

УДК 616.002.5

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ УРАЛЬСКИХ ИЗОЛЯТОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

¹Скорняков С.Н., ¹Умпелева Т.В., ²Вязовая А.А., ¹Кравченко М.А.,
¹Еремеева Н.И., ²Нарвская О.В.

¹Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии
Министерства здравоохранения России, Екатеринбург, e-mail: tumpeleva@ya.ru;

²ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера,
Санкт-Петербург, e-mail: onarvskaya@gmail.com

В работе предложена схема генотипирования возбудителя туберкулеза в Уральском ФО РФ, согласно которой на первом этапе, с использованием ПЦР в режиме реального времени, осуществляется дифференциация изолятов *M. tuberculosis* на группы Beijing/non-Beijing. Последующее MIRU-VNTR-типирование изолятов генотипа Beijing проводится с использованием 9 локусов (MIRU26, QUB26, Mtub21, Qub11b, MIRU31, MIRU40 VNTR4120, VNTR3820, VNTR3232), изолятов других генотипов (non-Beijing) – 15 локусов (Mtub04, ETRC, MIRU04, MIRU40, MIRU10, MIRU16, Mtub21, QUB11b, ETRA, Mtub30, MIRU26, MIRU31, Mtub39, QUB26, QUB4156) и/или сполиготипирования. Предложенная схема позволяет эффективно и с наименьшими затратами определять принадлежность микобактерий туберкулеза к наиболее эпидемиологически значимым генетическим группам в целях мониторинга их распространения на территории Уральского региона.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, генотипирование, MIRU-VNTR, сполиготипирование, Beijing, non-Beijing

GENOTYPING OF ISOLATES MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FROM URAL

¹Skornyakov S.N., ¹Umpeleva T.V., ²Vyazovaya A.A., ¹Kravchenko M.A.,
¹Eremeeva N.I., ²Narvskaya O.V.

¹Ural Research Institute for Phthisiopulmonology, Yekaterinburg, e-mail: tumpeleva@ya.ru;

²St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, e-mail: onarvskaya@gmail.com

The article suggests a two-step scheme of genotyping *M. tuberculosis* in Ural region of Russia that includes the real-time PCR for differentiation of Beijing/non-Beijing isolates as the first step and further discrimination by MIRU-VNTR-typing using a set of 9 loci (MIRU26, QUB26, Mtub21, Qub11b, MIRU31, MIRU40 VNTR4120, VNTR3820, VNTR3232) for Beijing isolates, and 15 loci (Mtub04, ETRC, MIRU04, MIRU40, MIRU10, MIRU16, Mtub21, QUB11b, ETRA, Mtub30, MIRU26, MIRU31, Mtub39, QUB26, QUB4156) and/or spoligotyping for non-Beijing isolates. The suggested scheme is an efficient and more cost- and time-effective way to identify *Mycobacterium tuberculosis* with most epidemiologically significant genetic groups in order to monitor its spread within Urals region.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, genotyping, MIRU-VNTR, spoligotyping, Beijing, non-Beijing

Микробиологический мониторинг возбудителя туберкулеза в современных условиях основан на анализе специфических нуклеотидных последовательностей хромосомной ДНК *M. tuberculosis* с использованием методов, основанных на ПЦР – MIRU-VNTR-типировании и сполиготипировании, также IS6110-RFLP и других методов исследования геномного полиморфизма микобактерий [4–7]. Соотношение отдельных генотипов в популяциях *M. tuberculosis* может существенно различаться в разных странах и географических регионах мира, что следует учитывать при разработке стратегий генотипирования микроорганизма [7–10].

Цель данной работы – изучить региональные особенности генетической структуры популяции *M. tuberculosis* с помощью стандартизованных молекулярно-генетических методов и разработать схему

генотипирования возбудителя туберкулеза в Уральском федеральном округе РФ.

Материалы и методы исследования

178 культур *M. tuberculosis* и 90 образцов ДНК, выделенных из клинического материала, были получены от вновь выявленных эпидемиологически не связанных больных туберкулезом в 2009–2012 гг. в лабораториях ГБУЗ СО «ПТД», г. Екатеринбург, и ФГБУ «УНИИФ» Минздрава России.

Культивирование *M. tuberculosis* осуществляли общепринятым методом на среде Левенштейна – Йенсена. Колонии *M. tuberculosis* суспендировали в растворе, содержащем 9% NaCl и 20% глицерина. Часть суспензии сохраняли в пробирках для последующего IS6110-RFLP-типирования, другие инкубировали при 95°C – 30 мин для лизирования клеток, затем осадили при 3000 g, 1 мин. Супернатант использовали в качестве препарата ДНК для постановки ПЦР.

Для дифференциации изолятов на группы Beijing и non-Beijing использовали ПЦР-тест-систему «Амплитуб-Beijing», ООО «Синтол», г. Москва. ПЦР

выполняли в режиме реального времени на приборе iCyclerQ5 (BioRad, США).

Генотипирование изолятов *M. tuberculosis* проводили методом MIRU-VNTR, используя 15 локусов [5] и дополнительно три гипервариабельных локуса [10] для изолятов генотипа Beijing, сгруппированных в кластеры. Для постановки ПЦП использовали реактивы ООО «Интерлабсервис», г. Москва, и праймеры [2, 7] ООО «Синтол», г. Москва. ПЦП осуществляли в термоциклере «Терцик», ООО «ДНК технология». Продукты ПЦП подвергали электрофорезу в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, результаты визуализировали с помощью системы документации гелей «GelDoc», BioRad, США.

Сполиготицирование [6] и IS6110-RFLP-типирование [4] проводили на базе лаборатории молекулярной микробиологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, г. Санкт-Петербург. Принадлежность к генетической группе/линии (lineage, clade) определяли путем сравнения полученных профилей изолятов с имеющимися в компьютерных базах данных: «MIRU-VNTRplus» [1], в международной базе данных SITVITWEB [2] и ее обновленной версии SITVIT2. Профили IS6110-RFLP сравнивали с представленными в базе данных ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, г. Санкт-Петербург. Для количественной оценки вариабельности генетических локусов и дискриминирующей способности схем генотипирования рассчитывали индекс разнообразия Хантера – Гастона (HGDI) согласно [3].

Результаты исследования и их обсуждение

С помощью ПЦП в режиме реального времени определена принадлежность 178 изолятов *M. tuberculosis* и 75 образцов клинического материала, содержащих ДНК

M. tuberculosis, к генетическим группам Beijing и non-Beijing.

Анализ результатов MIRU-VNTR-типирования (15 локусов) 178 изолятов *M. tuberculosis* выявил 107 типов (MIT) MIRU-VNTR-профилей.

В пределах генетической группы non-Beijing ($n = 80$) было выделено 64 MIRU-VNTR-профиля, которые представляли пять генетических групп: LAM (28,8%), URAL (26,3%), Haarlem (17,5%), Tur, S и одну неклассифицированную группу (Unknown). Двадцать восемь изолятов (35%) были сгруппированы в 12 кластеров, содержащих по 2–4 изолята в каждом. Анализ структуры DR-области хромосомы всех изолятов non-Beijing методом сполитипирования позволил выделить 43 сполитипа (SIT) 15 генетических семейств: наиболее многочисленное – H3 (25%) включало изоляты MIRU-VNTR группы URAL. Значения HGDI для MIRU-VNTR-типирования и сполитипирования были достаточно высокими и составили 0,994 и 0,970 соответственно.

MIRU-VNTR-типирование (15 локусов) выявило неоднородность изолятов группы Beijing ($n = 98$), причем 65 (66,3%) из них входили в состав 10 кластеров. Самый многочисленный из кластеров включал 32 (32,7%) изолята (рис. 1). Данные генотипирования по трем дополнительным гипервариабельным локусам [10] были получены для 53 из 65 изолятов, что позволило разбить 7 из 10 MIRU-VNTR-кластеров Beijing.

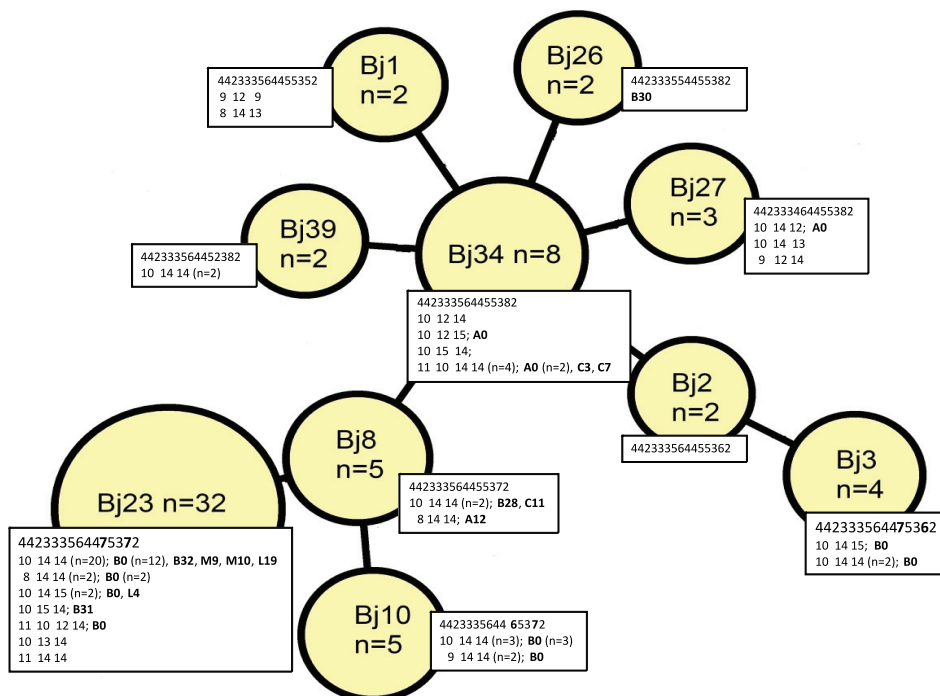


Рис. 1. Минимальное охватывающее древо (Minimum spanning tree) профилей MIRU-VNTR (15 локусов) клинических изолятов *M. tuberculosis* Beijing вновь выявленных больных туберкулезом

Размеры узлов пропорциональны числу изолятов в составе MIRU-VNTR-кластера. Числовой профиль (число повторов в каждом из 15 локусов – Mtub04, ETRC, MIRU04, MIRU40, MIRU10, MIRU16, Mtub21, QUB11b, ETRA, Mtub30, MIRU26, MIRU31, Mtub39, QUB26, QUB4156) показан в 1-й строке у каждого узла; ниже построчно приведены числовые профили для трех гипервариабельных локусов (VNTR4120, VNTR3820, VNTR3232) и профили IS6110-RFLP, обозначены жирным шрифтом. Цифры в скобках обозначают число изолятов, превышающее 1.

Самые большие значения HGDI (0,651 и 0,603) имели локусы MIRU26 и QUB26 соответственно. Локусы MIRU31, Mtub21, QUB11b, MIRU40 имели невысокую степень полиморфизма, значения HGDI:

0,243, 0,190, 0,173 и 0,155 соответственно. Для остальных локусов HGDI не превышал 0,100. Таким образом, был определен минимальный набор из 6 (MIRU26 QUB26 MIRU31, Mtub21, QUB11b, MIRU40) дискриминирующих локусов MIRU-VNTR для генотипирования изолятов Beijing (HGDI = 0,875). Использование данного набора, включавшего 6 из 15 «классических» локусов [5], несколько снижало и без того относительно невысокий уровень дискриминации изолятов (HGDI = 0,885). Напротив, включение трех дополнительных локусов [10] позволило существенно увеличить дискриминирующую способность 6-локусной схемы типирования (HGDI = 0,939).

Рекомендуемая нами схема MIRU-VNTR-типирования представлена на рис. 2.

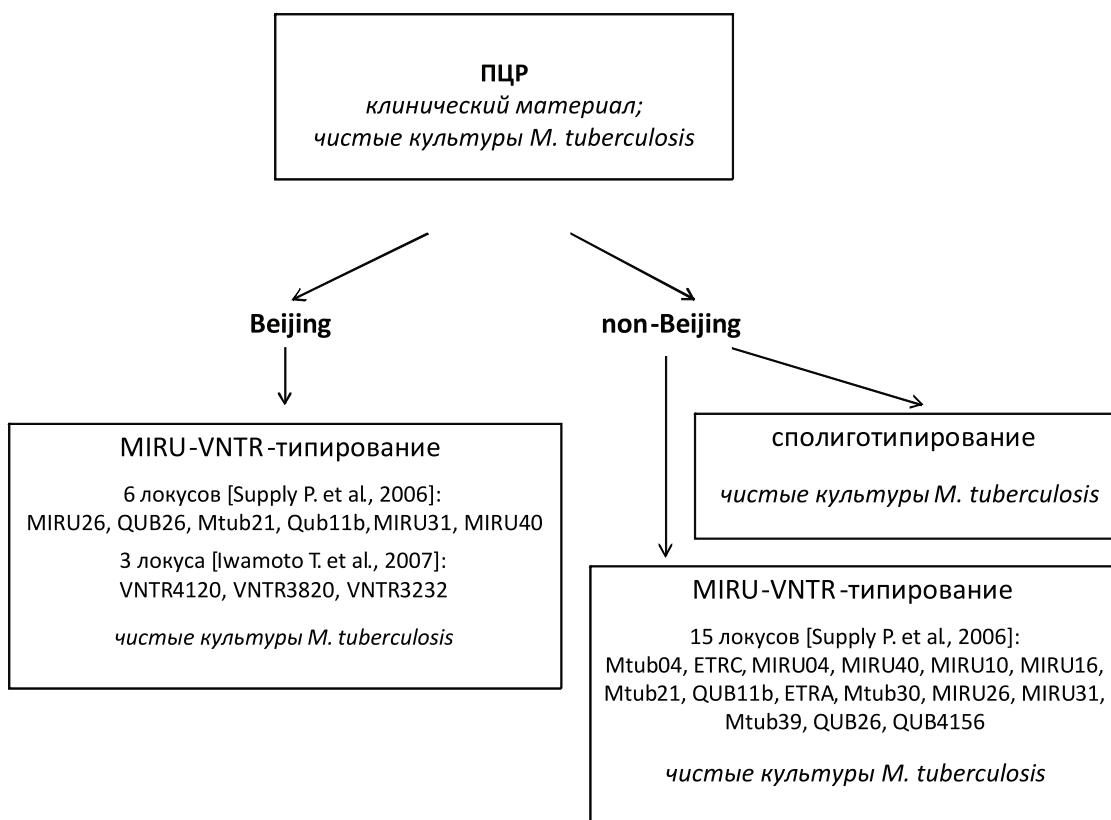


Рис. 2. Схема генотипирования изолятов *M. tuberculosis*

Данные IS6110-RFLP-типирования, полученные для 45 изолятов, еще больше повысили степень дифференциации в пределах MIRU-VNTR-кластеров (рис. 1). У изолятов *M. tuberculosis* Beijing выявлено 17 близкородственных (коэффициент сходства 83%) типов IS6110-RFLP-профилей, которые различались как по количеству

(15–19), так и по молекулярной массе фрагментов рестрикции хромосомной ДНК, содержащих участок последовательности инсерционного элемента IS6110. Пятнадцать (88%) из 17 вариантов профилей рестрикции IS6110 были индивидуальными (т.е. обнаружены у одного изолята), остальные представляли два крупных кластера: А0 и В0,

включавших 5 и 25 изолятов с идентичными профилями рестрикции соответственно. IS6110-RFLP-типирование, повысившее эффективность дифференциации изолятов *M. tuberculosis*, не может быть рекомендовано для широкого применения, поскольку является дорогостоящим и трудоемким методом, доступным лишь специализированным лабораториям.

Таким образом, для практического применения можно предложить схему генотипирования уральских изолятов *M. tuberculosis*, включающую на первом этапе их дифференциацию на группы Beijing и non-Beijing, с использованием ПЦР в режиме реального времени. Последующее генотипирование изолятов non-Beijing рекомендуется проводить с использованием 15 MIRU-VNTR-локусов [5] и / или сполитипированием. Минимальный набор из 6 локусов стандартной схемы (MIRU26, QUB26, Mtub21, Qub11b, MIRU31, MIRU40) и 3 дополнительных локуса (VNTR4120, VNTR3820, VNTR3232) следует использовать для генотипирования изолятов генотипа Beijing (рис. 2).

Список литературы/References

1. Database «MIRU-VNTRplus» (<http://www.miru-vntrplus.org>).
2. Database SITVITWEB http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE.
3. Database <http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>.
4. van Embden JD. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology / J.D. van Embden, M.D. Cave, J.T. Crawford [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1993. – № 31. – P. 406–409.
5. Supply P. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of Mycobacterium tuberculosis / P. Supply, C. Allix, S. Lesjean [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – № 44. – P. 4498–4510.
6. Kamerbeek, J. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology / J. Kamerbeek, L. Schouls, A. Kolk [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1997. – № 35. – P. 907–914.
7. Kremer K. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility / K. Kremer, D. van Soolingen, R. Frothingham [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37. – № 8. – P. 2607–2618.
8. Cowan L.S. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates in the United States / L.S. Cowan, L. Diem, T. Monson [et al.] // Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 688–695. 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. – P. 3576–3584.
9. Mokrousov I. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype in Russia: in search of informative VNTR loci / I. Mokrousov, O. Narvskaya, A. Vyazovaya [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2008. – № 46. – P. 3576–3584.
10. Iwamoto, T. 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, S. Yoshida, K. Suzuki [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – Vol. 272. – P. 282–283.

Рецензенты:

Мордовской Г.Г., д.м.н., заведующий отделом лабораторной диагностики, Свердловский областной противотуберкулезный диспансер, г. Екатеринбург;

Чугаев Ю.П., д.м.н., профессор кафедры фтизиатрии и пульмонологии, Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург.

Работа поступила в редакцию 15.09.2014.