

Ю. А. Чередник, О. В. Аноприенко, Ю. И. Фещенко  
**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ  
 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS В УКРАИНЕ**

Институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф. Г. Яновского АМН Украины  
 Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

### Введение

Для решения вопросов эпидемиологии и понимания патогенеза заболевания необходима точная идентификация и характеристика инфекционного штамма. Интенсивные усилия по изучению генома *Mycobacterium tuberculosis* позволили выявить несколько полиморфных или гипервариабельных локусов, используемых для ДНК-типирования и обладающих с одной стороны высокой дискриминирующей способностью, с другой — достаточной стабильностью. Примерами таких локусов являются участки прямых повторов (DR), разделенных спейсерными последовательностями и являющихся основой метода сполиготипирования; локусы точных тандемных повторов (ETR), служащих мишенями метода ETR-VNTR; и инсерционные элементы, в частности IS6110, используемые в методе IS6110-RFLP.

Выявляя эти геномные маркеры, методы молекулярно-генетического типирования позволяют, во-первых, производить общую оценку интенсивности эпидемического процесса, во-вторых, решать ряд конкретных клинических задач. Для оценки эпидемической ситуации рассчитывают коэффициенты кластеризации штаммов и активности трансмиссии. В регионах с неблагоприятной эпидемической обстановкой по заболеваемости туберкулезом коэффициент активности трансмиссии может составлять от 50 до 75 %, то есть, теоретически каждые три из четырех проанализированных случаев заболевания являются результатом недавней трансмиссии [14]. Методы молекулярно-генетического типирования успешно применялись для определения случаев невыявленной трансмиссии, изучения причин возникновения локальных вспышек внутрибольничных инфекций, мониторинга адекватности терапии у конкретных больных, подтверждения случаев лабораторной контаминации [7, примеры в 8, 12].

При системном использовании молекулярно-биологическое типирование представляется рутинной и эффективной процедурой, которая позволяет повысить эффективность диагностики, сократить сроки лечения больных туберкулезом, улучшить систему эпиднадзора и контроль эффективности лечения, а также осуществить динамическое наблюдение за путями переноса микобактерий в регионе.

Метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (геномная дактилоскопия) с использованием гибридационного зонда на инсерционную последовательность IS6110 (IS6110-RFLP) является своеобразным "золотым стандартом" методов типирования клинических изолятов *M. tuberculosis* [10]. Дискриминирующая способность IS6110-RFLP выше методов сполиготипирования и ETR-VNTR типирования и составляет 99 %, а воспроизводимость — 100 % [10]. Стандартизация метода позволяет сравнивать ДНК-отпечатки между отдельными лабораториями и создавать базы данных IS6110-RFLP генотипов микобактерий [15]. Проведенные исследования позволили создать в разных странах локальные коллекции и базы данных, содержащие более 50000 охарактеризованных изолятов *M. tuberculosis* [8, 9].

На территории Украины информация о молекулярно-генетических характеристиках штаммов *M. tuberculosis* представлена единичными исследованиями, фрагментарна и не системна [2, 5, 6]. Целью работы является оценка целесообразности и перспективности использования в Украине метода IS6110-RFLP для типирования *M. tuberculosis* в сравнении с другими молекулярно-генетическими методами.

### Материалы и методы

Метод IS6110-RFLP состоит из трех этапов: выделения ДНК *M. tuberculosis* из бактериальной массы, получения зонда для гибридизации, Саузерн-блот гибридизации.

ДНК выделяли по стандартной методике, инактивировали культуру прогреванием при 80°C [1, 13]. *M. tuberculosis* выращена на среде Левенштейна-Йенсена и протестирована на чувствительность к лекарственным препаратам [3].

Для получения зонда инсерционной последовательности IS6110 использовали лиофильно-высушенный препарат BCG. Содержимое одной ампулы растворяли в 300 мкл раствора TE, суспендировали на вортексе и лизировали путем нагревания при 80°C 15 мин. Проводили депротеинизацию равным объемом хлороформа и охлаждали во льду. 1 мкл полученного таким образом экстракта ДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР. ПЦР-продукт длиной 245 пн получали с помощью праймеров Ins1 и Ins2 [15]. Для амплификации использовали набор фирмы Fermentas (Литва). Смесь готовили согласно рекомендациям фирмы производителя. Реакцию амплификации проводили на амплификаторе Biometra (Германия) по следующей программе: 95°C 3 мин; 30 циклов {94°C — 30с, 54°C — 30с, 72°C — 25с}; 72°C 3 мин. Фрагмент амплификации выделяли из агарозного геля с помощью набора GeneCleanII (Bio101 Inc., США).

Саузерн-блот гибридизацию проводили по стандартной методике [3]. ДНК, обработанную в течение 5 ч. рестриктазой PvuII (Fermentas, Литва), разгоняли в 0,8% агарозном геле в течение ночи. ДНК переносили на нейлоновые фильтры HybondN (Amersham, США). Гибридизацию проводили в растворе, содержащем 30 % формамид, 5х раствор Денхарда, 5хSSC; 0,1% SDS; 0,01% tPHK дрожжей [3]. Зонд метили с помощью набора "DNA labeling kit" (Fermentas, Литва). Фильтры отмывали, подсушивали на фильтровальной бумаге и экспонировали с рентгеновской пленкой AGFA в течение 0,5–12 часов с усиливающими экранами.

### Результаты и обсуждение

На рисунке представлен IS6110-RFLP анализ 10 эпидемиологически не связанных штаммов *M. tuberculosis*. Количество полос (от 2 у BCG до 16 у изолята на дорожке 4) отражает число копий инсерционного элемента [15]. Хотя в микобактериальном геноме были выявлены так называемые "горячие точки" интеграции IS6110, в целом, по литературным данным, повтор достаточно случайным образом распределен в геноме, и количество его копий варьирует в очень редких случаях от полного отсутствия до 26 копий [8]. Однако то, что инсерционный элемент имеет сайты предпочтительной интеграции в геноме, может приводить к возникновению одинаковых генотипов при отсутствии клональных связей между ними. Также с осторожностью следует трактовать сходные генотипы из-за возможности реактивации заболевания или случайных конвергентных событий. С другой стороны, когда предполагается эпидемиологический контакт, есть вероятность, что будет получен отличный от ожидаемого ДНК-отпечаток. Такие случаи иногда встречаются в обширных выборках и являются одной из причин применения более чем одного метода генотипирования в большинстве исследований.

Необходимо учитывать, что дискриминирующая способность метода IS6110-RFLP резко снижается для изолятов с количеством копий IS-элемента меньше шести [10]. Таким образом, для разных территорий необходима оценка частоты встречаемости штаммов с низкой копийностью IS6110.

Некоторые сложности метода IS6110-RFLP связаны с его трудоемкостью, потребностью в значительном количестве бак-

териальной массы для выделения ДНК и наличием современного оснащения для генотипирования. Учет и интерпретация результатов проводится с использованием специального программного обеспечения (Gelcompar, Taxotron, и т.п.).

Применение методов ПЦР способствует сокращению сроков проведения эксперимента благодаря возможности использования небольших количеств исследуемого материала и отсутствием длительных и трудоемких этапов типирования. Однако метод IS6110-RFLP обладает большей дискриминирующей способностью по сравнению с ETR-VNTR типированием и сполитипированием [10]. Методы с меньшей дискриминирующей способностью могут быть использованы для долговременных и широкомасштабных исследований популяционной структуры микобактерий, эволюции их патогенности, установления источников клональной диссеминации штаммов микобактерий [1, 8]. Более быстро-эволюционирующие маркеры IS6110 и ETR-повторы являются идеальными мишенями для целей практической медицины, таких как расследование случаев госпитальных вспышек, вызванных полирезистентными штаммами, контроль качества лечения больных, расследования контактных случаев в очагах туберкулеза и выявление лабораторной кросс-контаминации [1]. Важно еще раз отметить, что методы IS6110-RFLP, VNTR-типирование и сполитипирование, направленные на выявление разных геномных элементов, эффективно дополняют друг друга.

На приведенном рисунке, образцы № 4 и № 7 выявляют характер распределения полос ДНК, свойственный штаммам семейства Beijing — наиболее детально охарактеризованного клонального варианта *M. tuberculosis*. По данным молекулярной эпидемиологии, семейство Beijing претерпело относительно недавнюю клональную экспансию и получило широкое распространение во многих странах Азии, на территории России и США [8]. В ряде исследований показано что большинство штаммов с первичной мультирезистентностью принадлежат к семейству Beijing [8]. Была также выдвинута гипотеза об ассоциации географического распространения данного семейства с регионами, где широко применяли вакцинацию BCG [1, 8]. Однако этому предположению противоречит проведенное IS6110-RFLP типирование коллекции российских штаммов, которое позволило выявить существенное генетическое разнообразие изученных изолятов свидетельствующее, по мнению исследователей, об успешной экспансии семейства Beijing до введения вакцинации BCG в двадцатых годах [8]. Таким образом, описанные методы позволяют надежно паспортизовать штаммы *M. tuberculosis*, изучать и вести дальнейший поиск генетических факторов, участвующих в возникновении и развитии заболевания туберкулезом.

За последнее время было разработано значительное количество новых методов типирования, в основном на базе ПЦР, таких как MIRU-VNTR типирование, расширенная версия метода сполитипирования для и ряд других методов. Проведена оценка их воспроизводимости и дискриминирующей способности [11]. В некоторых странах, где созданы значительные базы данных классическими IS6110-RFLP типированием и сполитипированием эти новые модификации начинают применять для широкомасштабных скринингов [9, 14]. Тем не менее, метод IS6110-RFLP остается обязательным референтным методом, особенно в случае выявления новых вариантов генотипов. Кроме того, пластичность генома бактерий не исключает вероятности того, что изменение расположения инсерционной последовательности в микобактериальном геноме может являться причиной клональной экспансии определенного штамма *M. tuberculosis* и стать признаком, ассоциирующимся с клиническими проявлениями заболевания туберкулезом.

Задача эффективного мониторинга туберкулезной инфекции ставит клиницистов и исследователей в Украине перед необходимостью проведения широкомасштабного генотипирования *M. tuberculosis* и внедрения надежных и современных методов на территории Украины. Представляется остро необходимым создание банков штаммов и баз данных территориально распространенных изолятов *M. tuberculosis* с макси-

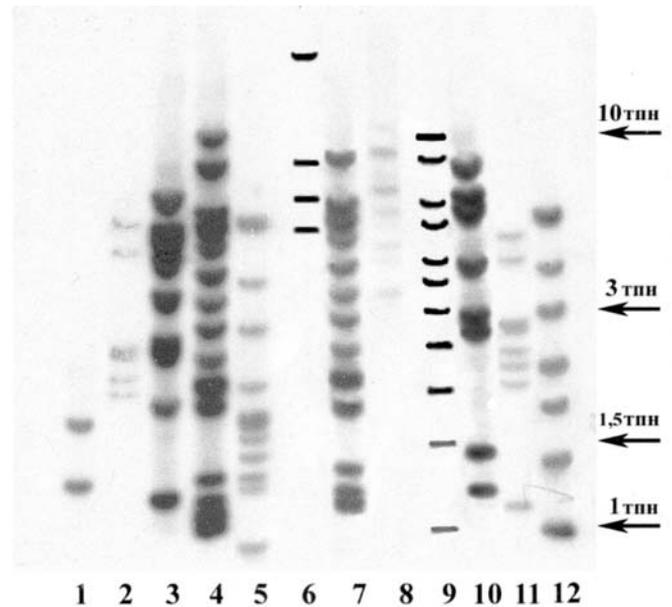


Рис. Радиоавтограф ДНК-фингерпринтов изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, полученных методом IS6110-RFLP

На дорожках нанесены обработанные рестриктазой PvuII образцы ДНК изолятов *M. tuberculosis*, отобранные случайным образом. В качестве контрольных использованы ДНК BCG и H37Rv (на дорожках 1 и 5 соответственно). Положение полос ДНК-маркера (дорожки 6 и 9) в данном варианте эксперимента на радиоавтографе отмечены вручную по расположению полос на геле. Стрелками слева отмечены длины некоторых маркерных полос на дорожке 7. Дорожки № 1 — BCG; 2 — изолят № 2 (чувств); 3 — изолят № 5 (HRE); 4 — изолят № 8 (SEtR); 5 — H37Rv, 6 — маркер ДНК фага  $\lambda$ /HindIII; 7 — изолят № 23 (HEtKRQ); 8 — изолят № 24 (SHEtKEQ); 9 — маркер "1 kb ladder"; 10 — изолят № 25 (SHEtRE); 11 — изолят № 26 (SHEtR); 12 — изолят № 27 (SHKR). В скобках указана кодировка устойчивости к антибиотикам: S — стрептомицин; H — изониазид; R — рифампицин; K — канамицин; E — этамбутол; Et — этионамин; Q — ципрофлоксацин.

мально полной эпидемиологической и молекулярно-генетической информацией. Для проведения сравнительной молекулярно-генетической характеристики распространенных на территории Украины штаммов оптимальной представляется стратегия использования ПЦР-методов в качестве экспресс-методов и IS6110-RFLP типирования в качестве обязательного референтного.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Генетическое разнообразие *Mycobacterium tuberculosis* и оценка факторов риска распространения заболевания туберкулезом в сибирском регионе России методами молекулярной эпидемиологии / Норкина О. В., Киншт В. Н., Мокровусов И. В. и др. // Мол. Ген. Микробиол. Вирусол. — 2003. — № 3. — С. 9–18.
2. Львова Л. В., Потейко П. И. Харьковская школа фтизиатрии: штрихи к портрету // Провизор. — 2004. — № 22. — ([http://www.provisor.com.ua/archive/2004/N22/art\\_12.htm](http://www.provisor.com.ua/archive/2004/N22/art_12.htm)).
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — Москва: Мир. — 1984. — 397 с.
4. Наказ МОЗ України № 45 від 06. 02. 2002 "Про затвердження інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції" (складена під керівництвом Феценко Ю. І., Журило О. А., Клименко М. Т. та ін.) // Зб. норм.-директ. документів з охорони здоров'я. — 2002. — № 2. — С. 63–111.
5. Наукові розробки Інституту фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України за 10 років / Феценко Ю. І., Мельник В. М., Петренко В. М. та інші // Укр. пульмонол. журн. — 2001. — № 2. — С. 5–13.
6. Николаевский В. В., Дробниевский Ф. А., Бажора Ю. И. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных в южном регионе Украины // Цитология и генетика. — 2004. — № 4. — С. 23–28.
7. Сурикова О. В., Войтиш Д. В., Курунов Ю. Н., Филипенко М. Л. Опыт использования VNTR-типирования *Mycobacterium tuberculosis* для решения клинических задач: контроля за качеством лечения и работой лабораторной службы // Мол. Ген. Микробиол. Вирусол. — 2005. — № 2. — С. 21–24.

8. *Bifani P. J., Mathema B., Kurepina N. E., Kreiswirth B. N.* Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains // *Trends Microbiol.* — 2002. — V. 10, № 1. — P. 45–52.
9. *Blackwood K. S., Wolfe J. N., Kabani A. M.* Application of mycobacterial interspersed repetitive unit typing to Manitoba tuberculosis cases: can restriction fragment length polymorphism be forgotten? // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — V. 42, № 11. — P. 5001–5006.
10. *Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility* / Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1999. — V. 37, № 8. — P. 2607–2618.
11. *Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for Mycobacterium tuberculosis complex strains* / Kremer K., Arnold C., Cataldi A., et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2005. — V. 43, № 11. — P. 5628–5638.
12. *Further acquisition of drug-resistance in multidrug-resistant tuberculosis during chemotherapy* / Toyota E., Sekiguchi J., Shimizu H. et al. // *Jpn. J. Infect. Dis.* — 2004. — V. 57, № 6. — P. 292–294.
13. *Molecular epidemiologic evaluation of transmissibility and virulence of Mycobacterium tuberculosis* / Rhee J. T., Piatek A. S., Small P. M. et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1999. — V.37, № 6. — P. 1764–1770.
14. *Occurrence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis* / van Soolingen D., Hermans P. W., de Haas P. E. et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1991. — V. 29, № 11. — P. 2578–2586.
15. *Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology* / van Embden J. D., Cave M. D., Crawford J. T et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1993. — V. 31, № 2. — P. 406–409.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В УКРАИНЕ

**Ю. А. Чередник, О. В. Аноприенко,  
Ю. И. Фещенко**

*Резюме*

Сообщение посвящено обсуждению необходимости и перспективности проведения широкомасштабного молекулярно-генетического типирования клинических изолятов *M. tuberculosis* на территории Украины. Приводятся данные о проведении и результатах системных исследований в других странах. На примере 10 изолятов продемонстрированы особенности метода IS6110-RFLP. Предложена стратегия для проведения сравнительной молекулярно-генетической характеристики распространенных на территории Украины штаммов ПЦР-методами в качестве экспресс-методов и IS6110-RFLP в качестве обязательного референтного.

## MOLECULAR GENOTYPING OF THE CLINICAL ISOLATES OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN UKRAINE

**Yu. O. Cherednik, O. V. Anopriyenko,  
Yu. I. Feshchenko**

*Summary*

Brief communication is dedicated to a necessity and perspectives of the realization of wide-ranging genotyping of *M. tuberculosis* clinical isolates in Ukraine. The data on the results of systematic worldwide studies are given. On the example of several isolated the peculiarities of the IS6110-RFLP method are demonstrated. The strategy proposed on the molecular-genetical characterization of strains disseminated in Ukraine with the PCR-based as the express methods and RFLP as the obligatory referent.