

**П. Б. Антоненко, В. Й. Кресюн, Ю. І. Бажора, В. В. Годован, К. О. Антоненко**  
**ГЕНОТИПУВАННЯ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ЗА ШІСТЬМА ЛОКУСАМИ**

Одеський національний медичний університет

Для відстеження процесу поширення туберкульозної інфекції в розвинутих країнах впроваджено метод генотипування збудника туберкульозу. Цьому сприяло відкриття поліморфних ділянок, що повторюються, у ланцюжку нуклеотидів в ДНК *Mycobacterium tuberculosis*. Це надало можливість вивчити „молекулярні відбитки пальців” — генотипу збудника туберкульозу [14].

Застосування генотипування у клініко-епідеміологічних дослідженнях є визначальним у тих випадках, коли необхідно розрізнити первинну і вторинну (набуту) медикаментозну резистентність. Якщо генотипові зразки *M. tuberculosis* до й під час лікування збігаються, то це свідчить про набуття стійкості під час лікування. Причини цього можуть бути різні — невдала комбінація або недостатні дози препаратів, або недотримання пацієнтом рекомендацій щодо лікування. Якщо „молекулярні відбитки пальців” є різними, тоді це свідчить про повторне інфікування (реінфекцію) іншим штамом, що потребує корекції протитуберкульозного лікування [17].

Також застосування генотипування може допомогти в клініко-епідеміологічних дослідженнях, коли треба вирішити питання генезу рецидиву — або це результат активації мікобактерії, що вже знаходилась в організмі людини, або це результат інфікування новим штамом [16]. Також цей метод може виявити лабораторну крос-контамінацію [17].

Одним із методів генотипування є VNTR (Variable Number Tandem Repeats або Варіативна Кількість Тандемних Повторів), що базується на виявленні поліморфізму низки мінісателітних ділянок за допомогою індивідуальної пари праймерів [2].

Зазвичай, методом VNTR визначається 12, 15 або 24 локусів. За даними досліджень, проведених на Півдні України у попередні роки, роздільна здатність локусів VNTR була неоднаковою [4]. Найбільша чутливість спостерігалась при дослідженні локусів MIRU26, MIRU31, MIRU40, ETR-A (Exact Tandem Repeat).

Метою даного дослідження було генотипування *M. tuberculosis* шляхом визначення шести локусів VNTR (MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40, ETR-A) та вивчення особливостей генотипу медикаментозно-резистентних штамів мікобактерій у хворих на туберкульоз.

**Матеріали та методи дослідження**

Для вивчення медикаментозної чутливості штамів *M. tuberculosis* був проведений ретроспективний аналіз бактеріологічних досліджень, що були виконані у бактеріологічній лабораторії Одеської обласної клінічної протитуберкульозної лікарні (ООКПЛ) на протязі 2006 р [3]. Для отримання статистичних даних вивчали медичні карти пацієнтів, що перебували на лікуванні в ООКПЛ. Виділення ДНК культур збудника туберкульозу проводи-

ли з мокротиння хворих на базі бактеріологічної лабораторії ООКПЛ.

Генотипування проводили за допомогою полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР) шляхом визначення кількості повторів певних локусів, а саме MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40, ETR-A в генотипі *M. tuberculosis*. Для кожного локусу використовувалась своя пара праймерів, при цьому розмір фрагменту залежав від наявності та кількості повторів однакових ДНК-послідовностей [4].

Для визначення мутацій в кодони 315 гена *katG*, що обумовлює резистентність *M. tuberculosis* до ізоніазиду, проводили мультиплексну аель-специфічну ПЛР (МАС-ПЛР) з використанням трьох праймерів [10], з модифікацією [6]. Для визначення мутацій в кодонах 516, 526 та 531 гена *groV*, що обумовлюють резистентність *M. tuberculosis* до рифампіцину, також проводили МАС-ПЛР з використанням інших трьох праймерів [8].

Для виявлення приналежності штамів, що досліджуються, до родини *Beijing* застосовували визначення інсерційної послідовності IS6110 в регіоні між генами *dnaA* і *dnaN* методом ПЛР [12]. Як відомо, штамми родини *Beijing* характеризуються більшою медикаментозною резистентністю, вірулентністю і поліорганним ураженням організму [9,11].\*

Статистичну обробку отриманих матеріалів проводили за допомогою пакету програм Microsoft Excel.

Дана робота є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи, затвердженої МОЗ України «Імуногенетичні, епідеміологічні, фармакогенетичні та клініко-мікробіологічні аспекти взаємовідносин у системі „паразит-хазяїн” при туберкульозній інфекції в умовах зростання захворюваності на туберкульоз» (№ держреєстрації 0104U010501).

**Результати дослідження та їх обговорення**

Загалом було досліджено 106 ДНК-ізолятів. З цього числа 46 зразків належало до родини *Beijing* (43,4 %), 60 ізолятів — до інших родин (група non-*Beijing*) (56,6 %).

Були отримані дані щодо поширеності кількості повторів в шести локусах, що досліджувались (табл. 1). За кількістю повторів штамми родини *Beijing* найбільш відрізнялись від штамів групи non-*Beijing* за локусами MIRU31 і MIRU39.

Для визначення ефективності методу VNTR типування шляхом визначення 6-ти локусів було проведено аналіз поліморфізму та роздільної здатності локусів, що досліджувались, в обох групах за допомогою обчислення індексу Хантера-Гастона. Значення індексу від 0,6 і більше відзначає високу чутливість методу генотипування, від 0,3 до 0,6 — помірну чутливість, менше 0,3 — низьку чутливість [4].

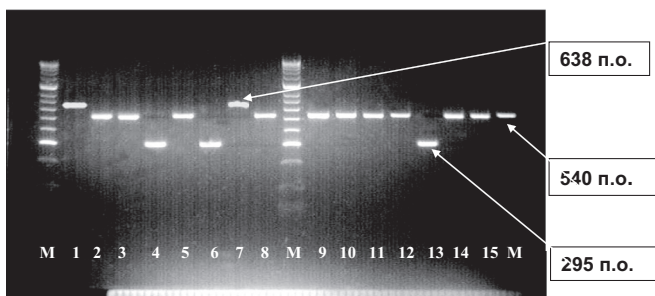
\* Окрему подяку висловлюємо науковому працівнику В. В. Ніколаєвському (National Mycobacterium Reference Unit, London, UK) за консультативну допомогу під час виконання даної роботи.

Таблиця 1  
Кількість повторів за 6 локусами в генотипі збудника туберкульозу

Локус	Штами родини Beijing	Штами групи non-Beijing
MIRU10	3	4>3>5
MIRU26	5>7>8	5>1>6
MIRU31	5>6	2>3
MIRU39	3	2
MIRU40	3>4>2	3>4>2
ETR A	4>5	3>2>4

Так, серед ізолятів родини Beijing, низький поліморфізм (низька чутливість) спостерігався у MIRU10 та MIRU39; помірний поліморфізм (помірна чутливість) — у MIRU40 і ETR-A; високий поліморфізм (висока чутливість) — у MIRU26 і MIRU31 (рис. 1,2). В той же час, зазначений метод виявив більшу чутливість серед ізолятів групи non-Beijing. Так, низький поліморфізм спостерігався у MIRU39; помірний поліморфізм — у MIRU31 і високий поліморфізм — у MIRU10, MIRU26, MIRU40 і ETR-A.

Комбіноване визначення всіх шести локусів для генотипування як серед ізолятів групи Beijing, так і серед



М – маркер молекулярної ваги; 4,6,13 – 295 пар основ (2 тандемних повтори); 2,3,5,8,9-12,14-16 – 540 п.о. (6 тандемних повторів); 1,7 – 638 п.о. (8 тандемних повторів)

Рис. 1. Поліморфізм кількості тандемних повторів локуса MIRU26

зразків групи non-Beijing було високоефективним (0,88 і 0,93 відповідно). Тобто визначення шести локусів може вважатися за достатньо інформативний і чутливий метод

генотипування, особливо за умов обмеженого матеріального забезпечення, коли визначення всіх 12 або 15, або 24 локусів є досить складним. Також в літературі є дані про генотипування за 6 локусами, але іншими, ніж були задіяні в даній роботі [5].

За даними MIRU10-MIRU26-MIRU31-MIRU39-MIRU40-ETRA типування найбільш поширеною комбінацією в групі штамів родини Beijing була 355335 (5 культур), рідше зустрічались комбінації 355344, 355345, 356335, 356344, 365334, 375334, 375344, 385334 (кожна комбінація зустрічалась у 2 ізолятів) і 385345 (3 ізолятів) (табл. 2). Загалом серед штамів родини Beijing було виявлено 10 кластерів, до яких належало 24 зразка. Решта — 22 зразки — належали до унікальних ізолятів. Попередні дослідження на півдні України виявили, що серед родини Beijing переважали ізоляти з профілями 355334 і 375334 [4].

В групі non-Beijing найчастіше відзначались комбінації 452242 (6 культур); 562242 і 712234 (по 3 культури кожна); 353233, 363233, 452252, 553213 (по 2 культури кожна). Загалом серед ізолятів групи non-Beijing було виявлено 7 кластерів, до яких належало 20 ДНК-ізолятів. Решта — 40 культур — належали до унікальних ізолятів.

Згідно міжнародної бази VNTR, що є на сайті <http://www.MIRU-VNTRplus.org>, за даними MIRU10-MIRU26-MIRU31-MIRU39-MIRU40-ETR A кластери 353233 і 363233 належать до групи Cameroon (Євро-Американська група); найбільш численні кластери 452242 і 452252 — до групи LAM (Євро-Американська група); кластер 553213 — є близьким до групи Haarlem (Євро-Американська група); кластер 712234 — до групи URAL (Євро-Американська група) [13].

Із числа 46 ДНК-ізолятів родини Beijing, 27 (58,7 %) були мультирезистентними (одночасно резистентні до ізоніазиду та рифампіцину), згідно культурального методу (табл. 2). З'ясувалось, що всі культури з комбінаціями 355335, 375344 і 385334 були мультирезистентними. Це частково співпадає з літературними даними, згідно яких ізоляти з профілем 375334 характеризувались високим рівнем мультирезистентності [1,15].

Серед 60 ДНК-ізолятів групи non-Beijing, 24 (40,0 %) були мультирезистентними. Більша частина штамів з

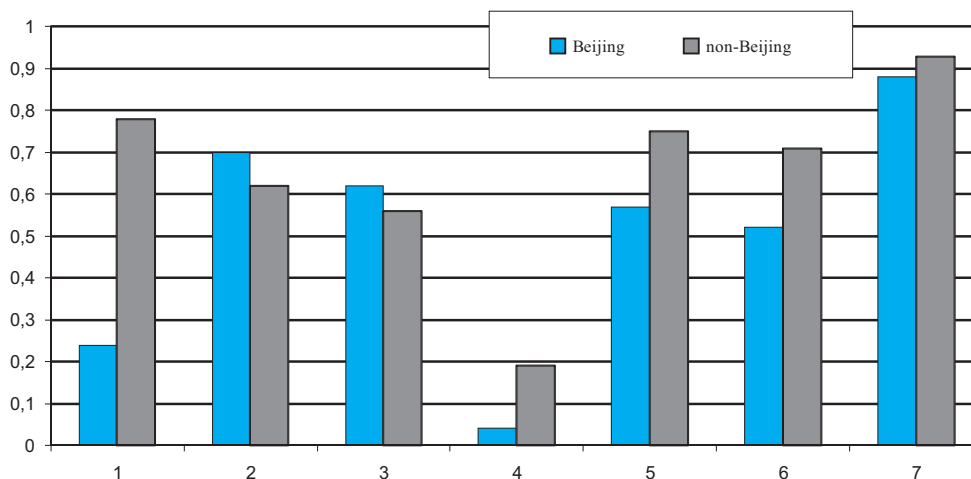


Рис. 2. Роздільна здатність методу VNTR-типування для ізолятів збудника туберкульозу, що належать до родини Beijing або групи non-Beijing

Таблиця 2

**Поширеність медикаментозної резистентності і низки епідеміологічних факторів серед різних кластерів збудника туберкульозу (%)**

VNTR-кластери (кількість ізолятів)	Рівень мутацій в гені		Мультирезистентність	ВІЛ-інфекція	Перебування в місцях позбавлення волі	ТБ-контакт
	katG	groB				
Родина Beijing						
355335(5)	80,0	60,0	100	20,0	40,0	80,0
355344(2)	0*	0	0	0	0	50,0
355345(2)	100	50,0	50,0	0	50,0	50,0
356335(2)	50,0	50,0	50,0	0	50,0	100
356344(2)	0*	50,0	50,0	0	50,0	50,0
365334(2)	50,0	50,0	50,0	50,0	0	50,0
375334(2)	100	50,0	0	50,0	50,0	100
375344(2)	100	100	100	100*	50,0	100
385334(2)	100	100	100	0	100	100
385345(3)	100	66,7	100	33,3	66,7	66,7
Всі штами (46)	69,6	58,7	58,7	23,9	34,8	65,2
Група non-Beijing						
353233(2)	0	0	0	0	0	0
363233(2)	50,0	0	0	0	50,0	100
452242(6)	83,3	83,3*	83,3*	0	0	66,7
452252(2)	50,0	100	0	50,0	0	50,0
553213(2)	100	50,0	50,0	100*	100*	100
562242(3)	66,7	33,3	100*	66,7	33,3	33,3
712234(3)	100	100*	100*	33,3	0	33,3
Всі штами (60)	45,0	33,3	40,0	26,7	26,7	55,0

Примітка. \* - P<0,05

комбінацією 452242 (5 з 6 ізолятів) були мультирезистентними. Також всі ізоляти з кластерів 562242 і 712234 були мультирезистентними.

Кожний другий ізолят з числа 46 зразків родини Beijing мав одночасно мутації в кодоні 315 гена katG і кодоні 516/526/531 гена groB (табл. 2). Було з'ясовано, що одночасно мали обидві зазначені мутації всі ДНК-ізоляти з комбінаціями 375344 і 385334.

З 60 ДНК-ізолятів групи non-Beijing, лише 15 (25,0 %) одночасно мали мутації, що досліджувались, в генах katG і groB. Більша частина штамів з комбінацією 452242 (5 культур з 6) і всі штами з комбінацією 712234 одночасно мали обидві мутації, що досліджувались.

Ізоляти родини Beijing кластерів 375334 і 375344 в 75 % випадків були виділені від хворих, що були ВІЛ-позитивними; в 50 % випадків хвороба закінчувалась смертю хворого; в 100 % хворобі передував контакт з хворим на туберкульоз (в половині випадків — в місцях позбавлення волі). Для порівняння, серед всіх хворих на туберкульоз, які виділяли збудника туберкульозу з родини Beijing, ВІЛ-позитивними були близько 21,7 % хворих; летальний наслідок на протязі першого року спостерігався у 8,7 % хворих; контакт з туберкульозними хворими мав місце у 63,4 % пацієнтів.

Генотипування ізолятів, що були отримані від пацієнтів, які одночасно хворіли на туберкульоз і були ВІЛ-

позитивними, має особливе значення, оскільки у цієї категорії хворих екзогенна реінфекція є головною причиною швидко прогресуючого туберкульозного процесу [1]. За літературними даними, серед родини Beijing саме ізоляти з профілем 375334 були звичайними серед пацієнтів, які попередньо перебували в місцях позбавлення волі [15].

Хворі, що виділяли збудник туберкульозу групи non-Beijing з профілем 553213, у 100 % були ВІЛ-інфіковані, у 100 % раніше були позбавлені волі.

Медикаментозна резистентність була найбільш поширеною саме у ізолятів родини Haarlem, причому, як за нашими дослідженнями, так і за даними електронної бази. До речі, обидва ізоляти, що є близькими до родини Haarlem, були виділені від ВІЛ-інфікованих хворих, які також раніше перебували в місцях позбавлення волі. Згідно літературних даних в центральному регіоні Росії серед ізолятів збудника туберкульозу домінували штами родин LAM і Beijing [7]. Ці штами відіграють значну роль в поширенні туберкульозної епідемії.

**Висновки**

1. Комбіноване визначення шести локусів MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40 і ETR-A для генотипування як серед ізолятів групи Beijing, так і серед групи non-Beijing було високо ефективним.

2. Серед ізолятів родини Beijing переважали такі кластери, як 355335, 355344, 355345, 356335, 356344, 375334, 375344, 385345, 385334. Серед ізолятів групи non-Beijing найпоширенішим був кластер 452242.

3. Високий рівень мультирезистентності є притаманним для кластерів 355335, 375344 і 385334 родини Beijing; для кластерів 452242 і 712234 в групі non-Beijing. Всі ізоляти кластерів 375344, 385334, 712234 мали мутації в генах katG і rpoB, які обумовлювали резистентність до ізоніазиду та рифампіцину відповідно.

4. Всі ізоляти кластерів 375344 і 553213 були виділені з мокротиння хворих, які були ВІЛ-інфікованими і мали попередній контакт з туберкульозними хворими.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Карачунский, М. А. Молекулярная эпидемиология туберкулеза [Текст] / М. А. Карачунский, Л. Н. Черноусова // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2007. — №4. — С. 3–7.
2. Молекулярно-генетические механизмы туберкулезной инфекции [Текст] / Ю.И. Бажора [и др.]. — Одесса: Одесский государственный медуниверситет, 2005. — 259 с.
3. Наказ МОЗ України № 384 від 09.06.2006р. „Протокол надання медичної допомоги хворим на туберкульоз” (складена під керівництвом Фещенка Ю.І., Кучугура-Кучеренко Л.В., Петренко В.М. та ін.) — К. — 2006. — 87 с.
4. Ніколаєвський, В. В. Оптимізація стратегії генотипування *Mycobacterium tuberculosis* в Одеській області України: порівняння методів споліготипування та VNTR [Текст] / В. В. Ніколаєвський // Одеський медичний журнал. — 2005. — № 3. — С. 32–39.
5. Опыт использования VNTR-типирования *Mycobacterium tuberculosis* для решения клинических задач: контроля за качеством лечения и работой лабораторной службы [Текст] / О. В. Сурикова [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология — 2005. — № 2. — С. 21 — 24.
6. Пат. 29211 Україна, МПК (2006) А61К 31/00, С12Q 1/68, С12R 1/32 Склад реактивної суміші для діагностики резистентності до ізоніазиду збудника туберкульозу / Антоненко К.О., Кресюн, В.І, Антоненко П.Б. (Україна); заявник і патентовласник Одес. держ. мед. ун-т. - № u200708746 ; заявл. 30.07.2007; опубл. 10.01.2008, Бюл. №1. — 4 с.
7. *Спוליгоптили* клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных у больных туберкулезом в центральном регионе России / Иванов И. Ю. [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких — 2004. — № 5. — С. 23–27.
8. Mokrousov, I. Allele-specific rpoB assays for detection of Rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Smears [Text] / I. Mokrousov, T/ Otten, B. Vyshnevskiy, O. Narvskaya // Antimicrobial agents and chemotherapy. — 2003. — Vol. 47, №7. — p. 2231–2235.
9. Antonenko, K. O. Mutations leading to drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection in Ukraine [Text] / K. O. Antonenko, V. I. Kresyun, P. B. Antonenko // Central European Journal of Medicine. — 2010.
10. Detection of Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by a multiplex allele-specific PCR assay targeting katG codon 315 variation [Text] / I. Mokrousov [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Vol.40, № 7. — p. 2509–2512.
11. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia [Text] / F. Drobniowski [et al.] // JAMA. — 2005. — Vol. 293, № 22. — P. 2726–2731.
12. Genotypic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Bangladesh and Prevalence of the Beijing Strain [Text] / S. Banu [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2004. — №42 (2).
13. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates [Text] / C. Allix-Béguec [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2008. — Vol. 46, № 8. — P. 2692–2699.
14. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies [Електронний документ] / Alonso-Rodríguez N., Martínez-Lirola M., Herránz M. [et al.] // BMC Microbiol. — 2008. Режим доступу: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/34>
15. Molecular epidemiology and prevalence of mutations conferring rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from the southern Ukraine [Text] / V. V. Nikolayevskyy [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. — 2007. — Vol.13, №2. — P. 129–138.
16. Recurrent tuberculosis from 1992 to 2004 in a metropolitan area [Text] / J. Cacho [et al.] // Eur. Respir. J. — 2007. — Vol. 30, № 2. — P. 333–337.
17. Re-infection vs reactivation as causes of tuberculosis recurrence in a high-burden country [Text] / G. Anyo [et al.] // The International journal of tuberculosis and lung diseases. — 2007. — Vol. 11, № 11 (suppl. 1). — P. 162.

#### ГЕНОТИПИРОВАНИЕ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ПО ШЕСТИ ЛОКУСАМ

П. Б. Антоненко, В. І. Кресюн, Ю. І. Бажора, В. В. Годован, К. О. Антоненко

##### Резюме

Целью данной работы было генотипирование *Mycobacterium tuberculosis* путем определения шести локусов VNTR (MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40, ETR-A) и определение особенностей генотипа штаммов *M. tuberculosis* с лекарственной устойчивостью у больных туберкулезом.

Локусы MIRU10, MIRU26, MIRU40 и ETR-A проявили высокий полиморфизм в группе non-Beijing, локусы MIRU26 и MIRU31 — в семействе Beijing. Комбинированное определение шести локусов - MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40 и ETR-A - для генотипирования как среди изолятов группы Beijing, так и среди группы non-Beijing было высоко эффективным. Поэтому генотипирование *M. tuberculosis* по 6-ти локусам может рассматриваться как более простая альтернатива определению 24 локусов.

Среди изолятов семейства Beijing преобладали такие кластеры, как 355335, 355344, 355345, 356335, 356344, 375334, 375344, 385345, 385334. Кластеры 355335, 375334 и 385334 имели высокий уровень мультирезистентности и мутаций в генах katG и rpoB. Среди изолятов в группе non-Beijing наиболее распространенным кластером был 452242, который вместе с кластером 712234 характеризовались высоким уровнем мультирезистентности и высокой частотой одновременных мутаций в генах katG и rpoB. Среди ВИЧ-инфицированных наиболее распространенными кластерами были в семействе Beijing 375344 и в группе non-Beijing — кластер 553213.

#### GENOTYPING OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BY SIX LOCI

P. B. Antonenko, V. I. Kresyun, Y. I. Bazhora, V. V. Godovan, K. O. Antonenko

##### Summary

The aim of the study was to obtain a genetic profiles of *Mycobacterium tuberculosis* through detection of six VNTR-loci (MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40, ETR-A) and to determine the peculiarity of the genotype of drug-resistant *M. tuberculosis* strains in tuberculosis patients.

Loci MIRU10, MIRU26, MIRU40 i ETR-A have exhibited high polymorphism in non-Beijing group, while loci MIRU26 and MIRU31 — in Beijing family. It was highly effective to detect the combination of six loci - MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40 i ETR-A — of Beijing and non-Beijing strains for their genotyping. That's why the genotyping of *M. tuberculosis* by 6 loci can be proposed as more simple alternative for detection of 24 loci.

Among Beijing family isolates there were such dominant clusters as 355335, 355344, 355345, 356335, 356344, 375334, 375344, 385345, 385334. Clusters 355335, 375334 and 385334 had high level of multi-resistance and mutations in katG and rpoB genes. The most spreading cluster among non-Beijing isolates was 452242 which along with cluster 712234 had high level of multi-resistance and mutations in katG and rpoB genes. Among HIV-infected patients the most prevalent cluster from Beijing family was 375344 and from non-Beijing group — cluster 553213.