

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ УРАЛЬСКИХ ИЗОЛЯТОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Т.В. Умпелева¹, А.А. Вязовая², М.А. Кравченко¹, Н.И. Еремеева¹, О.В. Нарвская²

Genotyping of isolates *Mycobacterium tuberculosis* from Ural

T.V. Umpeleva, A.A. Vyazovaya, M.A. Kravchenko, N.I. Eremeeva, O.V. Narvskaya

Предложена схема генотипирования возбудителя туберкулеза в Уральском Федеральном округе, 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.

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

According to suggested scheme genotyping of *M. tuberculosis* in Ural region of Russia is based on 2-step assay: the real-time PCR for differentiation of Beijing/non-Beijing isolates 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.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, genotyping, MIRU-VNTR, spoligotyping, Beijing, non-Beijing.

Введение

Микробиологический мониторинг возбудителя туберкулеза в современных условиях основан на анализе специфических нуклеотидных последовательностей хромосомной ДНК *M. tuberculosis* (МБТ), с использованием методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР) – MIRU-VNTR-типировании и сполиготипировании, также IS6110-RFLP и других методах исследования геномного полиморфизма микобактерий [3, 6, 7]. Соотношение отдельных генотипов в популяциях МБТ может существенно различаться в разных странах и географических регионах мира, что следует учитывать при разработке стратегий генотипирования микроорганизма [1, 2, 4, 5].

Цель 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 Российской Федерации.

Материалы и методы

178 культур *M. tuberculosis* и 90 образцов ДНК МБТ, выделенных из клинического материала, были получены от вновь выявленных, эпидемиологически не связанных между собой

больных туберкулезом в 2009-2012 гг. в лабораториях ГБУЗ «Свердловский областной противотуберкулезный диспансер» и ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии» 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 осаждали 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 iCycler iQ5 (BioRad, США).

Генотипирование изолятов *M. tuberculosis* проводили методом MIRU-VNTR, используя 15 локусов [6] и дополнительно три гипервариабельных локуса [2] для изолятов генотипа Beijing, сгруппированных в кластеры. Для постановки ПЦР использовали реактивы ООО «Интерлабсервис» (г. Москва) и праймеры [2, 6] ООО «Синтол» (г. Москва). ПЦР осуществляли в термоциклере «Терцик», ООО «ДНК технология». Продукты ПЦР

¹ ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, г. Екатеринбург

² ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, г. Санкт-Петербург

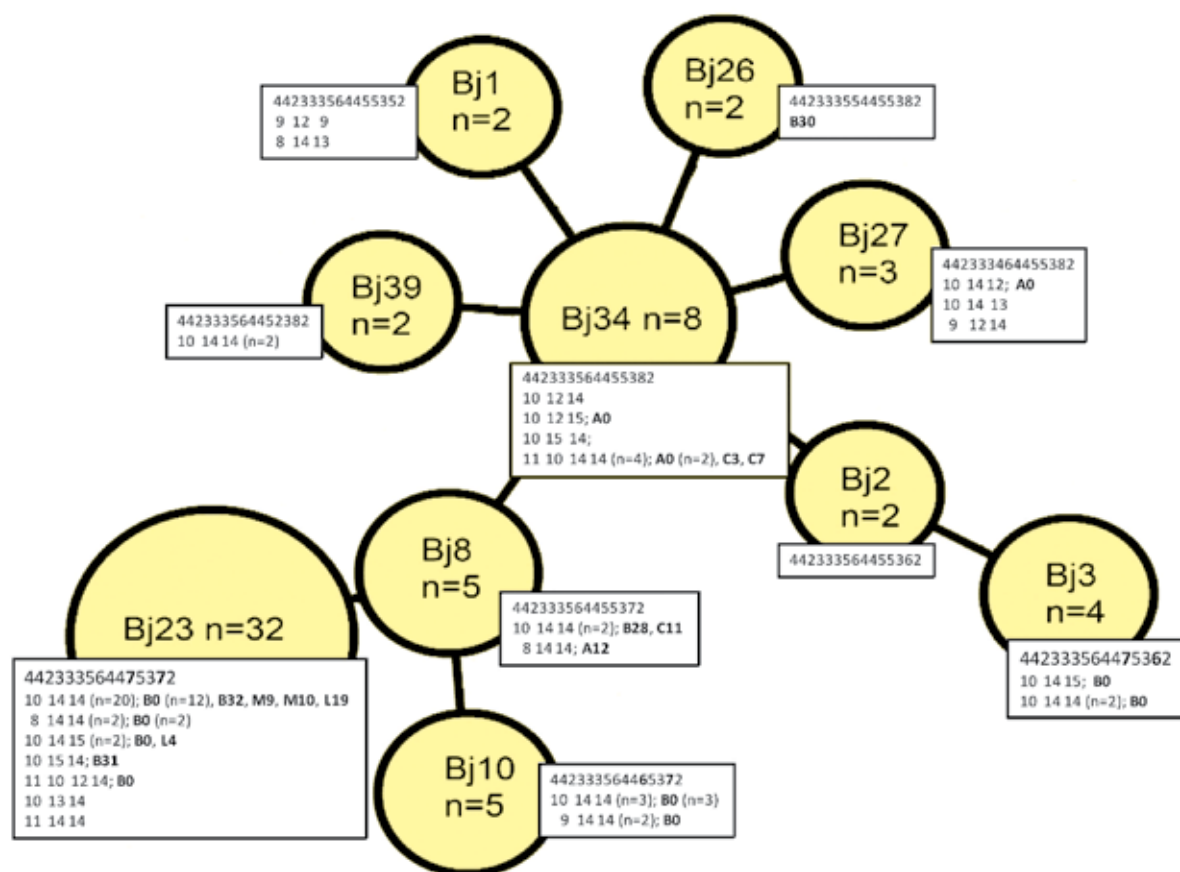


Рис. 1. Минимальное охватывающее древо (Minimum spanning tree) профилей MIRU-VNTR (15 локусов) клинических изолятов *M. tuberculosis* Beijing вновь выявленных больных туберкулезом.

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.

подвергали электрофорезу в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, результаты визуализировали с помощью системы документации гелей «GelDoc» (BioRad, США).

Сполиготикирование [3] и IS6110-RFLP-типирование [7] проводили на базе лаборатории молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (г. Санкт-Петербург). Принадлежность к генетической группе/линии (lineage, clade) определяли путем сравнения полученных профилей изолятов с имеющимися в компьютерных базах данными: «MIRU-VNTRplus» <http://www.miru-vntrplus.org>, в международной базе данных SITVITWEB http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/ и ее обновленной версии SITVIT2. Профили IS6110-RFLP сравнивали с представленными в базе данных НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Для количественной оценки вариабельности генетических локусов и дискриминирующей способности схем генотипирования рассчитывали индекс разнообразия Хантера-Гастона (HGDI) согласно <http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>.

Результаты и обсуждение

С помощью ПЦР в режиме реального времени определена принадлежность 178 изолятов *M. tuberculosis* и 75 образцов клинического материала, содержащего 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 (80 изолятов) выделено 64 MIRU-VNTR-профиля, которые представляли пять генетических групп: LAM (28,8%), URAL (26,3%), Haarlem (17,5%), Tur, S и неклассифицированную группу (Unknown). Двадцать восемь изолятов (35%) были сгруппированы в 12 кластеров, содержащих по два-четыре изолята в каждом. Анализ структуры DR-области хромосомы всех изолятов non-Beijing методом сполитипирования позволил выделить 43 сполитипа (SIT), принадлежавшие к 15 генетическим семействам: наиболее многочисленное – H3 (25%) – включало изоляты MIRU-VNTR группы URAL. Значения HGDI для MIRU-VNTR-типирования и

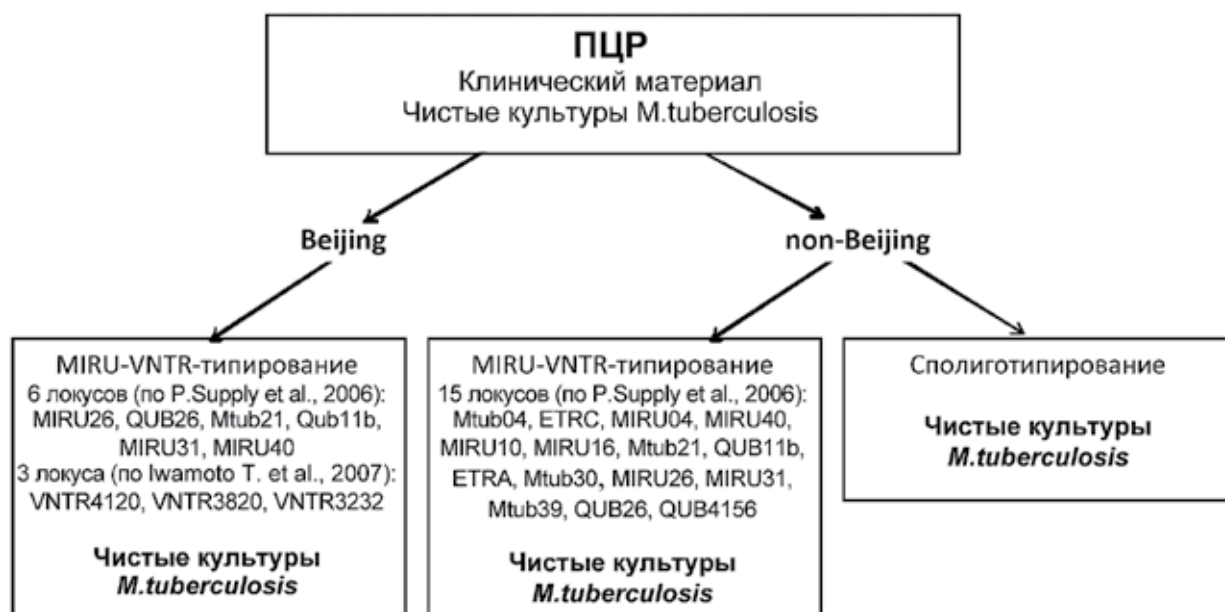


Рис. 2. Схема генотипирования изолятов *M. tuberculosis*

сполиготипирования 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 [2] были получены для 53 из 65 изолятов, что позволило разбить 7 из 10 MIRU-VNTR-кластеров Beijing.

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 шести (MIRU26 QUB26 MIRU31, Mtub21, QUB11b, MIRU40) дискриминирующих локусов MIRU-VNTR для генотипирования изолятов Beijing (HGDI=0,875). Использование данного набора, включавшего шесть из 15 «классических» локусов [6], несколько снижало и без того относительно невысокий уровень дискриминации изолятов (HGDI=0,885). Напротив, включение трех дополнительных локусов [2] позволило существенно увеличить дискриминирующую способность 6-локусной схемы типирования (HGDI=0,939).

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 сход-

ства 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 индивидуальны (т.е. обнаружены у одного изолята), остальные представляли два крупных кластера: A0 и B0, включавших пять 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 наиболее 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 [6] и/или сполиготипированием. Минимальный набор из шести локусов стандартной схемы (MIRU26, QUB26, Mtub21, Qub11b, MIRU31, MIRU40) и три дополнительных локуса (VNTR4120, VNTR3820, VNTR3232) следует использовать для генотипирования изолятов генотипа Beijing (рис. 2).

Литература

1. Cowan L.S., Diem L., Monson T. et al. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. – P. 688–695.
2. Iwamoto T., Yoshida S., Suzuki K. et al. 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 // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2007. – Vol. 272. – P. 282–283.
3. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35. – P. 907–914.
4. Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R. et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 37. – P. 2607–2618.
5. 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. – Vol. 46. – P. 3576–3584.
6. Supply P., Allix C., Lesjean S. et al. Proposal for standardization of optimized *Mycobacterium tuberculosis* interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44. – P. 4498–4510.
7. Van Embden J., Cave M., Crawford J. et al. Strain identification on *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology // *J. Clin. Microbiol.* – 1993. – Vol. 31. – P. 406–409.

Сведения об авторах

Умпелева Татьяна Валерьевна – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, г. Екатеринбург
 Адрес: 620039, г. Екатеринбург ул. 22-го Партсъезда, д. 50
 Телефон (343) 333-44-66
 e-mail: tumpeleva@ya.ru

Вязовая Анна Александровна – старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, г. Санкт-Петербург, кандидат биологических наук
 Адрес: г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14
 Телефон (812) 325-27-10

Кравченко Марионелла Анатольевна – заведующая лабораторией экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, г. Екатеринбург, кандидат биологических наук
 Адрес: 620039, г. Екатеринбург ул. 22-го Партсъезда, д. 50
 Телефон (343) 333-44-63

Еремеева Наталья Ивановна – старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, г. Екатеринбург, кандидат биологических наук
 Адрес: 620039, г. Екатеринбург ул. 22-го Партсъезда, д. 50
 Телефон (343) 333-44-63

Нарвская Ольга Викторовна – заведующий лабораторией молекулярной микробиологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, г. Санкт-Петербург, доктор медицинских наук, профессор
 Адрес: г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14
 Телефон (812) 325-27-10