

ВЫЯВЛЕНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ВАРИАНТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Т.В. Умпелева, Л.А. Голубева, Л.С. Лавренчук, Н.И. Еремеева, М.А. Кравченко
ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России,
г. Екатеринбург

DETECTION OF EPIDEMIOLOGY SIGNIFICANT GENOTYPE OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN CLINICAL MATERIAL

T.V. Umpeleva, L.A. Golubeva, L.S. Lavrenchuk, N.I. Eremeeva, M.A. Kravchenko

В работе представлены данные генотипирования и определения спектра мутаций лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом, находящихся на лечении в клинике Уральского НИИ фтизиопульмонологии г. Екатеринбурга в 2012–2016 гг. Показаны возможности технологий «Амплитуб-Beijing» (НПК «Синтол»), GenoType® MTBDR (Hain Lifescience) и тест-системы «ТБ-ТЕСТ» (ООО «Биочип-ИМБ») для проведения внутривидовой дифференциации *M. tuberculosis* и выявления эпидемиологически-значимых вариантов возбудителя туберкулеза (Beijing МЛУ) непосредственно из клинического материала.

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, лекарственная устойчивость, генотипирование

This study presents genotyping and drug resistance mutations data of *M. tuberculosis* isolated from tuberculosis patients from 2012 to 2016 in Ural Research Institute of Phthiopolmonology, Ekaterinburg. We performance capabilities of Ampli-tub-Beijing (Sintol, Russia), GenoType® MTBDR (Hain Lifescience, Germany) and TB-TEST (Biochip-IMB, Russia) test-systems for differentiation and diagnostic of epidemiology significant variants of *M. tuberculosis* (Beijing MDR) in clinical samples.

Keywords: *M. tuberculosis*, drug resistance, genotyping

Введение

Распространение штаммов возбудителя туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ и ШЛУ) ставит задачу внедрения в практику лабораторий противотуберкулезных учреждений ускоренных методов определения лекарственной устойчивости возбудителя. В настоящее время на территории России рекомендованы к применению четыре молекулярно-генетических подхода, позволяющих в короткие сроки идентифицировать мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* (МБТ) к противотуберкулезным препаратам (ПТП), непосредственно в диагностическом материале, полученном от больного туберкулезом:

1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени (определение ЛУ МБТ к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам).
2. ДНК-стриповая технология (определение ЛУ МБТ к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, этамбутолу, аминокликозидам/полипептиду).
3. Биочиповая технология (определение ЛУ МБТ к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам).
4. Картридная технология GeneXpert MTB/RIF – определение ЛУ МБТ к рифампицину [9].

При этом данные о наличии или отсутствии мутаций, ассоциированных с ЛУ к ПТП, должны учитываться лечащим врачом не только с точки зрения выбора режима химиотерапии, но

также с точки зрения эпидемиологической опасности больного и его размещения в противотуберкулезном стационаре. Однако генетическая вариабельность МБТ представляет собой не только полиморфизмы в генах, ответственных за возникновение ЛУ, но и захватывает другие участки генома. В настоящее время известно, что генетически неоднородная российская популяция возбудителя туберкулеза насчитывает более 20 генетических семейств/линий, среди которых доминируют Beijing (50–80%), LAM (10–40%), Ural (2–15%), Haarlem (2–15%) [1, 3, 4, 7, 8]. В пределах каждой генетической линии можно выделить отдельные группы или кластеры генетически родственных штаммов. На основе данных генотипирования были выделены отдельные кластеры изолятов, ассоциированные с МЛУ и имеющие эпидемиологическое и клиническое значение на территории России (Beijing B0) [1-3, 6, 8, 10, 13]. В классическом варианте генотипирование проводят при выделении культуры *M. tuberculosis* с использованием сполитипирования, MIRU-VNTR- и IS6110-RFLP-типирования и других методов исследования геномного полиморфизма микобактерий [11, 12, 13]. Однако в последнее время появились коммерческие тест-системы, позволяющие проводить «грубое» генотипирование возбудителя туберкулеза непосредственно в клиническом материале и выделять его эпидемиологически значимые варианты: «Амплитуб-Beijing» (НПК «Синтол», Россия), «ТБ-ТЕСТ» (ООО Биочип-ИМБ, Россия) и «СПОЛИГО-БИОЧИП» (ООО «Биочип-ИМБ», Россия).

Цель исследования

Оценить возможность использования тестов «Амплитуб-Beijing» (НПК «Синтол», Россия) и «ТБ-ТЕСТ» («ООО Биочип-ИМБ», Россия) для внутривидовой дифференциации микобактерий туберкулеза, выделенных из клинического материала.

Материалы и методы исследования

Для исследования было отобрано 255 образцов операционного материала, полученного от больных, оперированных по поводу туберкулеза легких в клинике Уральского НИИ фтизиопульмонологии в 2012–2014 гг. Во всех образцах была выявлена ДНК *M. tuberculosis complex* и в 241 случае определены мутации, ассоциированные с устойчивостью к ПТП.

Выделение и амплификацию ДНК *M. tuberculosis* проводили с использованием наборов «РеалБест ДНК МВТС» (ООО «Вектор-Бест», Россия) и «Амплитуб-РВ» (НПК «Синтол», Россия) на приборе CFX (BioRad, США).

Определение мутаций в генах *rpoB*, *katG* и *inhA*, обуславливающих устойчивость к рифампицину и изониазиду, проводили с использованием набора GenoType® MTBDRplus (Hain Lifescience, Германия), в генах *gyrB*, *rrs*, *embB*, обуславливающих устойчивость к фторхинолонам, аминогликозидам/капрео-

мицину, этамбутолу – с использованием набора GenoType® MTBDRsl (Hain Lifescience, Германия).

Для дифференциации изолятов на группы Beijing и non-Beijing методом ПЦР использовали ПЦР-тест-систему «Амплитуб-Beijing» (НПК «Синтол», Россия).

С 2016 г. в лаборатории Уральского НИИ фтизиопульмонологии начались исследования по определению спектра мутаций в генах *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis*, *embB*, обуславливающих устойчивость к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, аминогликозидам, этамбутолу, и принадлежности выделенных изолятов к эндемичным для территории России семействам Beijing, Haarlem, LAM, Ural с использованием тест-системы «ТБ-ТЕСТ» (ООО «Биочип-ИМБ», Россия). Для оценки возможностей данной тест-системы был отобран 21 образец клинического материала, выделенного в 2016 г. от 21 больного и положительный по данным количественной ПЦР. Операционный материал был представлен 12 образцами (пять – костная ткань, семь – ткань легкого), мокрота – шестью, моча и материал, полученный при фибробронхоскопии по одному образцу. Выделение и амплификацию ДНК *M. tuberculosis* проводили с использованием набора «Амплитуб-РВ».

Статистическую обработку данных проводили с использованием таблиц сопряженности и критерия χ^2 с поправкой Йетса; статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

По результатам генотипирования 255 изолятов, выделенных из операционного материала, установлена принадлежность к генетической группе Beijing или non-Beijing у 251 (98,4%). Из них к генотипу Beijing принадлежало 206 (82,1%) образцов, к генетической группе non-Beijing – 38 (15,1%). В 7 (2,7%) случаях была выявлена смесь генотипов.

Анализ данных определения мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, и генотипа МБТ позволил установить, что среди представителей генотипа Beijing 134 (65,0%) изолята обладают МЛУ, 12 (5,8%) – ШЛУ, в то время как в группе non-Beijing только 3 (7,9%) изолята обладали МЛУ, а изолятов с ШЛУ не выявлено ($p < 0,01$). Мутаций, обуславливающих ЛУ к ПТП, не выявлено у 31 (15,1%) и 18 (47,3%) изолятов в группах Beijing и non-Beijing, соответственно. Среди представителей генотипа Beijing с МЛУ у 125 (92,5%) выявлено сочетание мутаций к рифампицину *rpoB* S351L и изониазиду *katG* S315T1 (табл. 1). Как видно из таблицы, ШЛУ обладали только изоляты Beijing с указанным выше сочетанием мутаций ($p < 0,01$). Ранее было показано, что данное сочетание замен характерно для представителей генотипа Beijing и обеспечивает устойчивость к высоким концентрациям рифампицина и изониазида *in vitro*, не снижая жизнеспособности и вирулентности микроорганизма [6].

Таблица 1. Спектр лекарственной устойчивости изолятов *M. tuberculosis*, принадлежащих к генетическим группам Beijing и non-Beijing, определенный наборами «Амплимутб-Beijing», GenoType® MTBDRplus и GenoType® MTBDRsl

Генотип	Мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью к ПТП			Количество изолятов	Количество изолятов, обладающих мутациями, ассоциированными с лекарственной устойчивостью к ПТП			ШЛУ
	Рифампицин <i>rpoB</i>	Изониазид			Фторхинолоны <i>gyrA</i>	Этамбутол <i>embB</i>	Аминогликозиды/ Капреомицин <i>rrs</i>	
		<i>katG</i>	<i>inhA</i>					
Beijing	wt	wt	wt	31	—	1	—	—
	wt	S315T1	wt	36	—	6	—	—
	wt	wt	C15T	1	—	—	—	—
	wt	S315T1	C15T	2	—	—	—	—
	D516V	S315T1	wt	8	—	1	—	—
	S531L	S315T1	wt	116	11	37	13	12
	S531L	S315T1	C15T	8	1	1	1	—
	A516V	S315T1	C15T	1	—	—	—	—
	S531L	S315T1	T8C	1	1	1	—	—
non-Beijing	wt	wt	wt	18	—	—	—	—
	wt	S315T1	C15T	6	—	—	—	—
	wt	wt	C15T	2	—	—	1	—
	wt	S315T1	C15T	1	—	—	—	—
	S531L	S315T1	C15T	3	—	1	—	—
	H526Y	wt	C15T	1	—	—	—	—
Смесь	wt	wt	C15T	5	—	—	—	—
	wt	S315T1	C15T	1	—	—	—	—

wt – «дикий тип», отсутствие мутации

Мутации, ассоциированные с устойчивостью к фторхинолонам, выявлены у 13 изолятов: в гене *gyrA* у шести изолятов встретились замены D94G, у двух – D94A и у трех изолятов – A90V.

Мутации в гене *embB*, ассоциированные с устойчивостью к этамбутолу, выявлены у 47 изолятов, 38 из них содержали замену M306V, пять – A306V, два – M306I, в четырех случаях идентифицировать мутации не удалось.

У 14 изолятов обнаружены мутации, ответственные за устойчивость к аминогликозидам/капреомицину: из них у 13 изолятов в гене *rrs* отмечена замена A1401G и у одного изолята – G1484T.

Исследование 21 образца клинического материала с использованием набора «ТБ-ТЕСТ» установило у 19 (90,4%) принадлежность к генотипу Beijing, из них девять (42,8%) принадлежало к кластеру B0. Один изолят был классифицирован как Ural, и в одном случае изолят принадлежал к Европееко-Американской линии, однако установить принадлежность к определенному генотипу не удалось (табл. 2).

Оценка результатов генотипирования и спектра определяющих лекарственную устойчивость мутаций с помощью набора «ТБ-ТЕСТ», выявила, что среди 19 изолятов Beijing 11 (57,8%) обладали мутациями в генах *rpoB* и *katG*, ответственных за МЛУ-фенотип, причем семь из них принадлежали к кластеру Beijing B0. Среди этих семи изолятов три содержа-

ли мутации, обеспечивающие проявление ШЛУ-фенотипа. Интересно отметить, что из девяти представителей кластера Beijing B0 один изолят (клинический материал – резектат легкого) не содержал мутаций, ассоциируемых с устойчивостью к исследуемым ПТП.

Мутации, ассоциированные с устойчивостью к фторхинолонам, выявлены у восьми изолятов, из них четыре обладали набором из 2–3 мутаций. При этом спектр мутаций был достаточно велик: в гене *gyrA* замена D94G выявлена у двух изолятов, у одного изолята в этом гене выявлена смесь клеток с мутациями и без мутаций, замена S91T – у четырех изолятов; в гене *gyrB* – замены G509A, D500N, R485C, R485H выявлены в одном изоляте каждая.

Мутации в гене *embB*, ассоциируемые с устойчивостью к этамбутолу, выявлены у 10 изолятов: M306V – у шести изолятов, D354A и Q497K – по два изолята, G406D и V309F – по одному изоляту. В двух образцах выявлено сочетание двух мутаций.

У девяти изолятов обнаружены мутации, ответственные за устойчивость к аминогликозидам/капреомицину: в гене *eis* в позиции G10A – три изолята, C14T – два изолята и по одному изоляту – мутации G37T и C12T. В гене *rrs* замена A1401G отмечена у одного изолята, а еще один изолят сочетал мутантные в этой позиции особи МБТ и клетки дикого типа.

Таблица 2. Спектр лекарственной устойчивости изолятов *M. tuberculosis*, принадлежащих к генетическим группам Beijing и non-Beijing, определенный наборами «Амплимутб-Beijing», GenoType® MTBDRplus и GenoType® MTBDRsl

Генотип	Количество изолятов	Мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью к ПТП		Количество изолятов	Количество изолятов, обладающих мутациями, ассоциированными с лекарственной устойчивостью к ПТП			ШЛУ
		Рифампицин <i>rpoB</i>	Изониазид <i>katG</i>		Фторхинолоны <i>gyrA, gyrB</i>	Этамбутол <i>embB</i>	Аминогликозиды/капреомицин <i>rrs, eis</i>	
Beijing	10	S531L	S315T1	3	2	2	1	—
		A516T	S315T1	1		1	1	—
		Asr516Tyr	wt	1	1	1	1	—
		wt	S315T1	1	—	—	—	—
		wt	wt	4	1	—	—	—
BeijingBO	9	S531L	S315T1	7	4	6	6	3
		wt	S315T1	1	—	—	—	—
		wt	wt	1	—	—	—	—
Ural	1	wt	wt	1	1	—	—	—
Не определен	1	wt	wt	1	—	—	—	—

wt – «дикий тип», отсутствие мутации

Заключение

Проведенное исследование показало возможность применения современных подходов, основанных на ПЦР, для анализа генетической гетерогенности изолятов, выделенных непосредственно из клинического материала. Так, использование ПЦР в режиме реального времени для определения принадлежности изолятов к генетическим группам Beijing и non-Beijing и идентификация ассоциированных с устойчивостью к ПТП мутаций ДНК-стриповой технологией позволили разбить выборку на отдельные группы изолятов и в 48,1% случаев выделить наиболее значимый в эпидемиологическом плане вариант возбудителя – Beijing с сочетанием замен *rpoB* S531L и *katG* S315T1. Исследование 21 образца клинического мате-

риала с использованием тест-системы «ТБ-ТЕСТ», несмотря на немногочисленность выборки, показало возможность определения большего спектра мутаций, ответственных за развитие фенотипической устойчивости к фторхинолонам, этамбутолу, аминогликозидам, по сравнению с наборами производства Hain Lifescience. В 42,8% случаев был выявлен эпидемиологически значимый для России вариант возбудителя туберкулеза Beijing B0.

Таким образом, молекулярно-генетические методы, позволяющие изучать гетерогенность популяции *M. tuberculosis*, должны являться основой современных технологий мониторинга распространения туберкулезной инфекции и персонализированной тактики лечения пациентов.

Литература

1. Вязовая А.А., Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Псковской области // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 6. – С. 35-39.
2. Дымова М.А. Альховик О.И., Чердниченко А.Г. и др. Идентификация генотипов *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированных с резистентностью и чувствительностью к лекарственным препаратам // Микробиология. – 2012. – Т. 13. – С. 672-681.
3. Маничева О.А., Нарвская О.В., Мокроусов И.В. и др. Лекарственная устойчивость, жизнеспособность и вирулентность in vitro штаммов *Mycobacterium tuberculosis* различных генотипов // Инфекция и иммунитет. – 2011. – Т. 1. – № 4. – С. 341-348.
4. Маркелов Ю.М., О.В. Нарвская Циркуляция штаммов возбудителя с множественной лекарственной устойчивостью на территории Республики Карелия // Туберкулез и болезни легких. – М., 2010. – № 2. – С. 54-57.
5. Мокроусов И.В., Нарвская О.В., Вязовая А.А. и др. Генотипирование эпидемиологически и клинически значимого варианта *M. tuberculosis* Beijing B0/W148 // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 10. – С. 33-36.
6. Нарвская О.В. Генотипирование *Mycobacterium tuberculosis* и его роль в эпидемическом процессе: дис. д-ра мед. наук. – СПб., 2003. – 173 с.
7. Николаевский В.В., Балабанова Я.М., Браун Т. и др. Молекулярное генотипирование штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Центральном регионе России: эффективность сполитипирования и MIRU-VNTR // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2005. – № 4. – С. 9-13.
8. Умпелева Т.В., Кравченко М.А., Еремеева Н.И. и др. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Уральского региона России // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3. – № 1. – С. 21-28.
9. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. – М. – Тверь: ООО «Издательство «Трида», 2014. – 72 с.

10. Drobniewski F., Balabanova Y., Ruddy M. et al. Rifampin- and multidrug-resistant tuberculosis in Russian civilians and prison inmates: dominance of the Beijing strain family // *Emerg. Infect. Dis.* – 2002. – Vol. 8. – № 11. – P. 1320-1326.
11. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – № 35. – P. 907-914.
12. Supply P., Allix C., Lesjean S. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – № 44. – P. 4498-4510.
13. Surikova O., Voitech D., Kuzmicheva G. et al. Efficient differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family from Russia using highly polymorphic VNTR loci // *Eur. J. Epidemiol.* – 2005. – Vol. 20. – № 11. – P. 963-974.
14. Van Embden J.D., Cave M.D., Crawford J.T. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology // *J. Clin. Microbiol.* – 1993. – № 31. – P. 406-409.

Сведения об авторах

Умпелева Татьяна Валерьевна – старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России, кандидат биологических наук

Адрес: 620039, г. Екатеринбург, ул. 22-го Партсъезда, д. 50

Тел. + 7 (343) 333-44-66; моб. + 7 (903) 078-03-73

e-mail: tumpeleva@ya.ru

Голубева Людмила Андреевна – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России

Адрес: 620039, г. Екатеринбург, ул. 22-го Партсъезда, д. 50

Тел. + 7 (343) 333-44-66

e-mail: golubeva.luda2010@ya.ru

Лавренчук Леонид Сергеевич – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России

Адрес: 620039, г. Екатеринбург, ул. 22-го Партсъезда, д. 50

Тел. + 7 (343) 333-44-66

e-mail: leon5d@list.ru

Кравченко Марионелла Анатольевна – заведующая лабораторией экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России, кандидат биологических наук

Адрес: 620039, г. Екатеринбург, ул. 22-го Партсъезда, д. 50

Тел. + 7 (343) 333-44-66

e-mail: kravchenko@urniif.ru

Еремеева Наталья Ивановна – старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России, кандидат биологических наук

Адрес: 620039, г. Екатеринбург, ул. 22-го Партсъезда, д. 50

Тел. + 7 (343) 333-44-66

e-mail: eremeevani@ya.ru