

На правах рукописи

Афанасьев Максим Владимирович

**Молекулярное типирование
клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis*.**

03.00.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2008

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию Российской Федерации

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Ильина Елена Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Торховская Татьяна Ивановна
(ФГУ НИИ Физико-химической медицины)

доктор химических наук, доцент
Сергиев Петр Владимирович
(Московский Государственный Университет им. Ломоносова)

Ведущая организация: ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича
РАМН

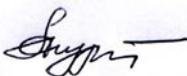
Защита диссертации состоится «17» декабря 2008 года в 10 часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.057.01 при ФГУ НИИ Физико-химической медицины Росздрава по адресу: 119992, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 1А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ НИИ Физико-химической медицины Росздрава.

Автореферат разослан «14» ноября 2008 года

Ученый секретарь Диссертационного Совета
доктор биологических наук

М. А. Мурина



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Туберкулез – хроническое инфекционное заболевание, характеризующееся поражением органов дыхания, костно-суставного аппарата, кожи, глаз, мочеполовых и некоторых других органов и систем. Широкое распространение туберкулезной инфекции в мире, большое количество случаев эпидемиологически опасных активных форм, высокий уровень смертности делают ее одной из актуальнейших проблем современной медицины и здравоохранения. Особую и весьма значительную роль в обострении ситуации с туберкулезом играет появление и все большее распространение штаммов микобактерий, устойчивых к лекарственным препаратам.

Необходимо отметить, что применяемые на сегодняшний день микробиологические методы выявления и характеристики микобактерий, являясь основными методами диагностики туберкулеза, весьма трудоемки, дороги, плохо стандартизуемы и длительны, что существенно снижает диагностическую ценность проводимых исследований, увеличивает сроки постановки и подтверждения диагноза, приводит к позднему выявлению больных – активных бактериовыделителей, вынуждает врачей эмпирически назначать противотуберкулезную терапию и не позволяет проводить своевременную коррекцию лечения в случае развития устойчивости.

Современные биохимические и генетические тесты позволяют существенно модернизировать традиционные микробиологические методики идентификации и характеристики микроба, а так же преодолеть ряд ограничений последних. Хотя расшифровкой биохимических, метаболических, генетических механизмов формирования устойчивости *M. tuberculosis* длительное время занимаются многие научно-исследовательские коллективы во всем мире, данная проблема остается до конца нерешенной. Одним из важнейших направлений в этой области является разработка и внедрение новых методов ускоренной детекции антибиотикоустойчивости микобактерий. В настоящее время для экспресс-диагностики лекарственной устойчивости туберкулеза предложено большое количество методик, однако каждая из них обладает рядом недостатков и ограничений и не может полностью соответствовать требованиям современной клинической микробиологии. Кроме того, до сих пор, в силу ряда объективных причин,

современные микробиологические, биохимические и генетические методы для исследования особенностей возбудителя туберкулеза на территории Российской Федерации применяются весьма ограничено, и информация о закономерностях появления и распространения устойчивости в популяции отечественных штаммов микобактерий носит отрывочный и ограниченный характер.

В процессе работы нами разработана методика, основанная на исследовании геномной ДНК, позволяющая быстро и эффективно выявлять генетические детерминанты лекарственной устойчивости, и наиболее полно отвечающая задачам скрининга и мониторинга распространения резистентных форм туберкулезной инфекции.

Исследование крупных, фенотипически охарактеризованных групп штаммов из различных регионов РФ позволило обновить и существенно дополнить имеющуюся на сегодняшний день информацию о совокупности изменений генетического материала, присущих лекарственно устойчивому туберкулезу, и об особенностях циркулирующих в отдельных регионах штаммов.

Цель работы. Целью настоящей работы являлась разработка и адаптация методов молекулярного типирования туберкулеза, и использование этих методов для комплексной характеристики популяции *M. tuberculosis*, циркулирующей на территории Российской Федерации

Задачи исследования:

1. Формирование коллекции образцов геномной ДНК микробиологически охарактеризованных клинических штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных из различных регионов Российской Федерации.
2. Разработка системы комплексной оценки лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* на основе знаний о молекулярных механизмах формирования устойчивости возбудителя, включающей определение известных нуклеотидных полиморфизмов в реакции минисеквенирования с последующим масс-спектрометрическим анализом.
3. Разработка системы комплексной оценки молекулярно-генетического разнообразия штаммов *M. tuberculosis*, включающей типирование

возбудителя с использованием технологии VNTR-анализа и сполиготипирования.

4. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика группы клинических штаммов *M. tuberculosis*, выделенных на территории Российской Федерации, включающая:

1) анализ распространенности и вклада различных механизмов в формирование лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*.

2) анализ структуры и оценку молекулярно-генетической гетерогенности исследуемой популяции *M. tuberculosis*.

Научная новизна и практическая значимость работы.

В работе современные методы анализа макромолекул, в частности ДНК, применены для характеристики и типирования клинических штаммов *M. tuberculosis*, отдельные методики отработаны впервые.

Впервые на основе ДНК-амплификации, минисеквенирования и масс-спектрометрического анализа нуклеиновых кислот разработана система для исследования нуклеотидных полиморфизмов бактериального генома, ассоциированных с лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis*.

По сравнению с другими аналогичными технологиями (ПЦР в реальном времени, ДНК-чипы), разработанная методика обладает более высокой производительностью и точностью тестирования при относительно низкой себестоимости.

С использованием разработанной технологии впервые изучены генетические основы реализации биохимических механизмов устойчивости к двум основным противотуберкулезным препаратам первого ряда (рифампицин, изониазид) у штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих в трех Федеральных Округах РФ.

Результаты этой работы подтверждают возможность применения описанной технологии для масштабного скрининга и мониторинга распространения множественной лекарственной устойчивости.

Показано, что мутации в 306 и 406 кодонах гена фермента арабинозилтрансферазы, предлагаемые другими авторами в качестве детерминант устойчивости к этамбутолу, не могут быть использованы для детекции и скрининга этамбутол-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* в

Центральном регионе РФ, поскольку обнаруживаются только у 54 % этамбутол-устойчивых штаммов.

В то же время впервые показана возможность тестирования этих генетических изменений как дополнительного маркера множественной лекарственной устойчивости туберкулеза.

Впервые на основании изучения особенностей структурной организации геномной ДНК проведена комплексная характеристика штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих в Московском регионе. Выявлено преобладание штаммов, относящихся к генетическому семейству Beijing (66,0 %), и установлена их роль в распространении множественной лекарственной устойчивости среди больных туберкулезом в Москве.

В целом результаты работы представляют несомненную практическую ценность и могут иметь значение для решения ряда прикладных задач современной клинической микробиологии и эпидемиологии туберкулезной инфекции.

Реализация и внедрение результатов работы в практику. Разработанная технология использована при выполнении Государственного Контракта № 06/365 от 15 марта 2006 г. на проведение работы по теме «Мониторинг лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза в Российской Федерации с использованием технологии масс-спектрометрии». Осуществляется внедрение результатов работы в клиничко-лабораторную практику лаборатории молекулярных методов диагностики ЦНИИ туберкулеза РАМН.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на расширенном межлабораторном заседании Отдела молекулярной биологии и генетики ФГУ НИИ физико-химической медицины Росздрава (Москва, 4 сентября 2008 г.), а также в ходе ряда международных конференций (55-я конференция по масс-спектрометрии Американского масс-спектрометрического общества (ASMS) (Индианаполис, 2007), 18-й Европейский конгресс по клинической микробиологии и инфекционным болезням (Барселона, 2008), 39-я Всемирная конференция по легочным заболеваниям (Париж, 2008)).

Публикации. Материалы диссертационной работы отражены в 8 публикациях (3 в рецензируемых журналах, 5 - тезисы сообщений на конференциях).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц и 11 рисунков. Состоит из следующих глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение и выводы», «Список литературы», который включает 209 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы. В работе использовано 976 клинических штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом из трех федеральных округов РФ: Центрального, Уральского и Сибирского, находившихся на лечении в ГУ ЦНИИ туберкулеза РАМН (г. Москва), ФГУ Уральский НИИ фтизиопульмонологии Росздрава (г. Екатеринбург) и ФГУ Новосибирский НИИ туберкулеза Росздрава (г. Новосибирск) в период с 1997 по 2006 год. Микробиологическая идентификация и выделение чистой культуры возбудителя проводилась в соответствии с процедурами, регламентированными Приказом № 109 МЗ РФ от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». Для контроля качества всех микробиологических и молекулярно-генетических процедур использовали референсный штамм *M. tuberculosis* H37Rv.

Определение устойчивости штаммов *M. tuberculosis*. Оценка лекарственной чувствительности штаммов к рифампицину и изониазиду методом абсолютных концентраций выполнялась в соответствии с Приказом № 109 МЗ РФ. Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) рифампицина, изониазида и этамбутола для 285 штаммов, выделенных в Центральном регионе РФ, проводилось в ходе культивирования бактериальных клеток на среде Дюбо с добавлением KNO_3 , содержащей различные концентрации препаратов: 160,0; 80,0; 40,0; 20,0; 10,0; 5,0 мкг/мл для рифампицина, 32,0; 16,0; 8,0; 4,0; 2,0; 1,0 мкг/мл для изониазида и 8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 мкг/мл для этамбутола. Рост *M. tuberculosis* определяли через 10 дней культивирования по цветной реакции с реактивом Грисса (в виде 7,5 % водного раствора) (нитратредуктазная реакция).

Генетический анализ штаммов *M. tuberculosis*. Выделение ДНК *M. tuberculosis* осуществлялось при помощи набора «ДНК – экспресс» (ТУ- 9398-450-17253567-03) производства ООО НПФ Литех, в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Для амплификации фрагментов генов *M. tuberculosis*, связанных с рассматриваемыми механизмами устойчивости, использовались праймеры MtrpoBf (5`-gaggcgatcacaccgcagac-3`) и MtrpoBr (5`-ggtacggcggttcgatgaac-3`) для локуса *rpoB*; MtkatGf (5`-accgaggetgctccgctgg-3`) и

MtkatGr (5'-cagctcccactcgtagccgt-3') для локуса *katG*; MtfabGf (5'-gcctcgctgcccagaaagg-3') и MtfabGr (5'-ctccggatccacgggtgggt-3') для фрагмента промоторной области *fabG-inhA*; embBF2 (5'-aagctggcgcaccttcacc-3') и embBR2 (5'-gccagcaggttgaataacc-3') а также MtEB406F (5'-ccatggtcttgcacc-3') и MtEB406R (5'-cacaccagtgtaatgc-3') для локуса *embB*.

Аmplification фрагментов генома *M. tuberculosis* проводили в реакционной смеси, содержащей 66 mM Tris-HCl pH 9,0; 16,6 mM (NH₄)₂SO₄; 2,5 mM MgCl₂, по 250 мкМ каждого дНТФ, 1 ед Taq-полимеразы (Promega, USA) и по 10 пмоль каждого праймера в объеме 25 мкл. Реакцию проводили в амплификаторе DNA Engine Tetrad 2 (MJ Research, USA) по универсальному профилю амплификации, адаптированному для максимального выхода ПЦР – продукта всех исследуемых локусов генома: 94°C – 5 мин., 35 циклов: 94°C – 15 сек., 61°C – 15 сек., 72°C – 15 сек., 72°C – 10 мин., 4°C – хранение.

Дефосфорилирование дНТФ и элиминацию оставшихся праймеров в пост-амплификационной смеси проводили, инкубируя образцы с 1 Ед антарктической фосфатазы (New England BioLabs, Великобритания) и 5 Ед экзонуклеазы I (Fermentas, Евросоюз) при 37°C в течение 30 минут с последующей инактивацией ферментов при 85° C в течение 10 минут. Реакцию термоциклического минисеквенирования проводили в 10 мкл реакционной смеси: 66 mM Tris-HCl pH 9,0; 16,6 mM (NH₄)₂SO₄; 2,5 mM MgCl₂; по 0,2 mM необходимых дНТФ и/или ддНТФ; по 10 пмолей соответствующего праймера (табл. 1) и 2 Ед TermiPol DNA Polymerase (Solis Biodyne, Эстония), используя в качестве матрицы амплифицированные фрагменты ДНК. Нарботку продуктов минисеквенирования осуществляли по профилю: 94°C – 20 сек, Та – 20 сек, 72° C – 15 сек, 70 циклов (где Та – температура отжига, подобранная для соответствующей системы) в амплификаторе DNA Engine Tetrad 2 (MJ Research, USA).

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, используемые в реакции минисеквенирования для идентификации маркеров лекарственной устойчивости в анализируемых локусах геномной ДНК *M. tuberculosis*.

Генетический локус	Мишень (кодон)	Название зонда	Последовательность зонда (5'-3'), Масса (Да)	Смесь дНТФ/ ддНТФ	Та (°C)	Ожидаемые массы продуктов реакции (Да)
<i>rpoB</i>	531 533	Mt531f Mt533r	gaccsacaagcggcgactg (5768) cagaccgcccgggcccc (4814)	дАТФ, дТТФ, дЦТФ, ддГТФ	59°	6673, 5439 (Ser531,Leu533) 6688 (Ser531–Leu) 6384 (Ser531–Trp) 5126 (Leu533–Pro)
	526	Mt526f Mt526r	gctgtcgggggtgacc (4930) cgccgacagtcggcgcttg (5806)	дТТФ, дГТФ, ддАТФ, ддЦТФ	53°	5203,7674 (His526) 5531, 6407 (His526–Tyr) 5227, 7649 (His526–Asn) 5556, 6383 (His526–Asp) 5203, 6079 (His526–Arg) 5203, 7700 (His526–Pro)

						5203, 6102 (His526–Leu)
	516	Mt516r1 Mt516r2 Mt516r3 Mt516r4	acagcgggtgttctg (4928) cccgacagcgggtgttctgc (6415) cccgacagcgggtgttctgcc (6704) cccgacagcgggtgttctgctc (6719)	дАТФ, дГТФ, дГТФ, ддЦТФ	49°	5834 (Asp516) 5843 (Asp516–Val) 5819 (Asp516–Val) 5530 (Asp516–Gly)
	513 511	Mt513f1 Mt513f2 Mt511f	ggcaccagccagctgagc (5494) ttcggcaccagccagctgagca (6705) gttcttcggcaccagccagc (6054)	дЦТФ, дГТФ, дГТФ, ддАТФ	61°	6080, 6984 (Gln513,Leu511) 6369 (Gln513–Pro) 6969 (Leu511–Pro)
	522 514	Mt522f Mt514ins	atggaccagaacaaccgctgt (6714) ccagccagctgagccaattc (6047)	дАТФ, дЦТФ, ддТТФ, ддГТФ	63°	7315, 6648 (Ser522,Phe514) 6335 (514 ins Phe)
<i>katG</i>	315	kG315f1 kG315f2 kG315r	taaggacgcgatcacc (4876) ggtaaggacgcgattacc (5823) catacgacctcgatgcct (5420)	дАТФ, дЦТФ, ддТТФ, ддГТФ	50°	5502, 5997 (Ser315) 6104 (Ser315–Asn) 5733 (Ser315–Thr)
<i>fabG1- inhA- промоторн ая область</i>	-15 -8	MtfG15f MtfG8r	cccgcccgcgcgaga (4849) gtggcagtcaccccgaca (5470)	дГТФ, дГТФ, ддАТФ, ддЦТФ	56°	5167, 5767 (-15C, -8T) 5824 (-15 C–T) 5849 (-8 T–C) 6047 (-8T–A) 5743 (-8T–G)
<i>embB</i>	306	EB306Fn2 EB306R	acgacggctacatcctgggc (6103) tggtcggcgactcgggc (5243)	ддАТФ, ддТТФ, дЦТФ, ддГТФ	59°	6400, 5829 (Met306) 6416, 5829 (Met306–Val) 6680, 5829 (Met306–Leu) 6400, 5845 (Met306–Thr) 6400, 5540 (Met306–Ile) 6400, 5556 (Met306–Ile) 6400, 5844 (Met306–Ile)
	406	EB406Fn	ggcctgcggccggag (4635)	дГТФ, дГТФ, ддАТФ, ддЦТФ	53°	5566 (Gly406) 4932 (Gly406–Ser) 4908(Gly406–Cys) 5261(Gly406–Asp) 5237(Gly406–Ala)

Очистку продуктов реакции минисеквенирования проводили следующими образом: входящий в состав набора SpectroCLEAN Kit (Sequenom, США) сорбент в количестве 8 мг растворяли в 16 мкл ультрачистой воды (Merck, Германия), полученную суспензию в объеме 24 мкл вносили в пробирку с продуктами реакции минисеквенирования. Содержимое пробирки тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 15 мин. Затем осаждали сорбент центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин.

Для проведения масс-спектрометрического анализа продуктов реакции аликвоту образца (0,2-1 мкл) с концентрацией олигонуклеотидов 10-30 пмоль/мкл, наносили на предварительно высушенную на планшете AnchorChip (600 мкм, Bruker Daltonics, Германия)

матрицу, приготовленную из насыщенного раствора 3-гидроксипиколиновой кислоты (Fluka, Германия) в 50% ацетонитриле (Merck, Германия) с добавлением 10 г/л цитрата аммония двухосновного (Fluka, Германия), и высушивали на воздухе.

Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного азотным лазером ($\lambda=337$ нм) с частотой импульсов до 20 Гц. Все измерения проводили в линейной режиме, детектируя положительно заряженные ионы с ускоряющим напряжением – 20.0 кВ, накапливающим электроде – 18,65 кВ, фокусирующей линзе – 9,2 кВ и временем задержки анализатора – 400 нсек. Для получения каждого масс-спектра использовали 50 импульсов лазера с мощностью излучения, установленной на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции-ионизации образца.

По наличию в масс-спектрах продуктов реакции пиков, соответствующих ионам определенной ожидаемой молекулярной массы, судили о нуклеотидном контексте в данном положении.

Определение нуклеотидных последовательностей локусов генома, принимающих участие в формировании устойчивости, проводили модифицированным методом Сенгера с использованием ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit и прибора ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США; “Hitachi” Япония) в соответствии с прилагаемыми инструкциями.

Анализ числа tandemных повторов в 24 локусах генома, так называемый VNTR-анализ (от англ. Variable Number Tandem Repeat), клинических штаммов *M. tuberculosis* осуществлялся по методикам, описанным ранее [Mazars et al., 2001; Supply et al., 2006].

Построение филогенетического древа осуществлялось методом попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (Unweighted pair-group method using arithmetic averages, UPGMA) при помощи web-ресурса MIRU-VNTR-plus (<http://88.198.5.195/MIRU/index.faces>, данные на июнь 2008 г.) [Allix-Béguet et al., 2008].

Спотлиготипирование осуществлялось по протоколу, описанному ранее [Kamerbeek et al., 1997] с использованием набора для сполиготипирования «Spoligotyping Kit» (Isogen Lifescience, № IM9701). Для определения семейства, к которому относился штамм, использовалась ранее опубликованная база SpolDB4 [Brudey et al., 2006]. Интернациональный сполиготип (Spoligotype International Type; SIT) каждого штамма определялся путем сравнения полученных результатов с базой данных SITVIT2 (Institut Pasteur de Guadeloupe; <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/outilsConsultation.jsp>; по состоянию на июнь 2008 г.).

Статистический анализ. Все статистические тесты проводили для уровня значимости $p < 0,05$. Для подтверждения наличия ассоциации исследуемых фенотипических и генетических признаков использовался метод χ -квадрат и двусторонний точный критерий Фишера. Основные статистические расчёты производили с помощью пакета Statistica 6.0. Для численной оценки вариабельности генетических локусов использовался индекс аллельного полиморфизма (h) [Selander et al., 1986]. Для численной оценки дискриминирующей способности методов типирования использовали индекс Хантера-Гастона ($HGDI$) [Hunter et al., 1988]. Согласно общепринятой практике, приемлемыми считаются методы типирования (или их комбинации), имеющие значение индекса Хантера-Гастона 0,9 и выше [Hunter et al., 1988].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования сформирована коллекция образцов геномной ДНК клинических штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом из 12 субъектов Российской Федерации. Ранее для всех штаммов ($n=976$) методом абсолютных концентраций определена устойчивость к рифампицину и изониазиду; для 285 штаммов, выделенных в микробиологической лаборатории ЦНИИ туберкулеза РАМН, методом серийных разведений определены значения МИК для рифампицина, изониазида и этамбутола. Объем и географическая неоднородность включенной в исследование выборки открывают возможность использования её для апробации вновь создаваемых средств молекулярно-генетического типирования *M. tuberculosis*, в частности, направленных на быстрое выявление случаев устойчивости *M. tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам.

С применением разработанной на основе ДНК-амплификации и масс-спектрометрического анализа продуктов реакции минисеквенирования системы исследования нуклеотидных полиморфизмов бактериального генома, ассоциированных с лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis*, для общей выборки из 976 клинических штаммов *M. tuberculosis* выполнен анализ генетических маркеров устойчивости к рифампицину и изониазиду. Анализ генетических маркеров устойчивости к этамбутолу проведен для 285 штаммов, выделенных в Центральном регионе РФ.

Группа образцов, состоящая из 115 клинических штаммов, выделенных от больных туберкулезом, постоянно проживающих в Московском регионе (Москва и Московская обл.), охарактеризована на основании оценки числа

тандемных повторов в структуре геномной ДНК (VNTR-анализ и сполиготипирование). Это дало возможность наиболее полно описать выборку *M. tuberculosis*, представляющую Московский регион, с молекулярно-генетической точки зрения, а также определить клинико-эпидемиологическое значение тех или иных штаммов.

Определение устойчивости к рифампицину, изониазиду, этамбутолу. По данным бактериологического анализа, основанного на методе абсолютных концентраций, из 976 клинических штаммов *M. tuberculosis* 553 (56,6 %) были идентифицированы как МЛУ (устойчивые к рифампицину и изониазиду), 278 (28,5 %) – как чувствительные, и 14 (1,4 %) и 131 (13,4 %) – как устойчивые только к рифампицину или изониазиду, соответственно.

Серди 285 штаммов, для которых была определена чувствительность к этамбутолу, только 79 (28,0 %) были чувствительны к этому препарату.

При анализе значений МИК рифампицина, изониазида и этамбутола для штаммов, выделенных в Центральном регионе, обнаружено большое количество штаммов с очень высоким уровнем устойчивости - >80 мкг/мл для рифампицина, > 8.0 мкг/мл для изониазида и >8 мкг/мл для этамбутола – 154 (54,0 %), 140 (49,1 %) и 99 (34,7 %) штаммов, соответственно, что превышает критическую концентрацию, рекомендованную приказом МЗ РФ № 109 для определения устойчивости, в два – три раза.

Анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*. На основании анализа данных современной литературы резюмирована информация о молекулярных механизмах формирования устойчивости *M. tuberculosis* к трем основным препаратам первого ряда противотуберкулезной терапии: рифампицину, изониазиду и этамбутолу. Эти данные использованы при разработке аналитического алгоритма регистрации генетических маркеров лекарственной устойчивости, представляющих собой точечные мутации в специфических локусах геномной ДНК микобактерии. Осуществлен дизайн праймерных систем для амплификации и реакции минисеквенирования 13 генетических локусов, изменения в которых ассоциированы с устойчивостью к этим противотуберкулезным препаратам.

С целью уменьшения себестоимости и повышения общей производительности анализа отработаны максимально универсальные условия проведения реакций амплификации и минисеквенирования, в цепочке

последовательных технологических этапов существенно минимизировано количество операций по переносу и разведению образцов, все процедуры приведены к формату 96-ти луночного планшета.

С использованием разработанных систем проведен комплексный анализ группы из 976 клинических штаммов *M. tuberculosis*, для каждого из которых был получен индивидуальный профиль из 11 генетических маркеров устойчивости к рифампицину и изониазиду [Ikryannikova et al., 2007; Афанасьев с соавт., 2007]. Для 285 клинических штаммов получены данные, включающие дополнительные генетические локусы, ассоциированные с устойчивостью к этамбутолу.

Проведен сравнительный анализ между профилем устойчивости штамма к противотуберкулезным препаратам и наличием и частотой встречаемости генетических маркеров устойчивости к ним.

В регионе, обуславливающим устойчивость к рифампицину (т.н. RRDR-регионе), *proV*-гена было выявлено семнадцать различных вариантов нуклеотидных замен в кодонах Ser513, Asp516, Ser522, His526, Ser531 и Leu533, а так же один вариант инсерции между 514 и 515 кодонами. Среди 567 рифампицин-устойчивых штаммов эти мутации были обнаружены у 506 (89,2 %) штаммов. Замена TCG531→TTG (Ser531→Leu) преобладала; этот вариант был обнаружен у 371 (73,3 %; 371/506) штамма. Следующие по частоте встречаемости – замены в кодонах His526 (42 штамма) и Asp516 (42 штамма). Наиболее вариабельным оказался His526 кодон: в нем было выявлено пять различных вариантов однонуклеотидных замен.

Мутации в локусах, обуславливающих устойчивость к изониазиду (Ser315 кодон *katG*-гена и/или позиции -8 и -15 промоторной области *mabA(fabG)* – *inhA* оперона), были выявлены у 625 штаммов (91,4 % от числа всех штаммов, устойчивых к изониазиду). Большая часть штаммов – 511 (81,7%; 511/625) имела нуклеотидную замену AGC→ACC (Ser→Thr) в 315 кодоне *katG*-гена. У 101 штамма (16,1 %) мутации были обнаружены одновременно в 315 кодоне *katG*-гена и позициях -8 или -15 промоторной области *mabA(fabG)* – *inhA* оперона. У четырех штаммов был обнаружен новый, ранее не описанный, вариант нуклеотидной замены в -8 позиции (T→C).

Из 285 штаммов, для которых микробиологическими методами была определена устойчивость к этамбутолу, 117 имели нуклеотидные замены в

Met306 и Gly406 кодонах *embB*-гена. Всего в двух исследованных кодонах было выявлено семь вариантов однонуклеотидных замен. Замены в Met306 кодоне преобладали – они были детектированы у 88 штаммов (79,2 %; 88/111). Среди мутаций в Gly406 у этамбутол-резистентных преобладал вариант GGC→GCC (Gly→Ala) – обнаружен у 14 штаммов. У шести штаммов, отнесенных методом абсолютных концентраций к этамбутол-чувствительным, были обнаружены мутации в Met306 (четыре штамма) и Gly406 (два штамма).

Результаты реакции минисеквенирования с последующей MALDI-ToF масс-спектрометрией были подтверждены прямым определением нуклеотидной последовательности ПЦР-фрагментов генов, включающих локусы – маркеры генетической устойчивости для 150 случайно выбранных штаммов.

Все варианты нуклеотидных замен, обнаруженных в исследуемой выборке, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Варианты нуклеотидных и аминокислотных замен, выявленных среди исследованных клинических штаммов *M. tuberculosis*¹.

Кодон	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Число штаммов (%)
Мутации в RRDR-регионе <i>groB</i>-гена			
533	CTG – CCG	Leu – Pro	11 (1,1)
531	TCG – TTG	Ser – Leu	371 (38,0)
	TCG – TGG	Ser – Trp	7 (0,7)
526	CAC – TAC	His – Tyr	11 (1,1)
	CAC – AAC	His – Asn	4 (0,4)
	CAC – GAC	His – Asp	13 (1,3)
	CAC – CGC	His – Arg	10 (1,0)
	CAC – CTC	His – Leu	4 (0,4)
522	TCG – TTG	Ser – Leu	2 (0,2)
516	GAC – GTC	Asp – Val	26 (2,7)
	GAC – GTA	Asp – Val	2 (0,2)
	GAC – GGC	Asp – Gly	1 (0,1)
	GAC – TTC	Asp – Phe	4 (0,4)
	GAC – TAC	Asp – Tyr	9 (0,9)
514	ins TTC	ins Phe	7 (0,7)
513	CAA – CCA	Gln – Pro	1 (0,1)
511	CTG – CCG	Leu – Pro	6 (0,6)
533 и 526	CTG – CCG и CAC – AAC	Leu – Pro и His – Asn	2 (0,2)
533 и 516	CTG – CCG и GAC – GGC	Leu – Pro и Asp – Gly	1 (0,1)
531 и 526	TCG – TTG и CAC – TAC	Ser – Leu и His – Tyr	4 (0,4)
	TCG – TTG и CAC – GAC	Ser – Leu и His – Asp	1 (0,1)
	TCG – TTG и CAC – CGC	Ser – Leu и His – Arg	1 (0,1)
	TCG – TGG и CAC – CTC	Ser – Trp и His – Leu	1 (0,1)
	TCG – TGG и CAC – TCC	Ser – Trp и His – Ser	1 (0,1)
	TCG – TGG и CAC – ACC	Ser – Trp и His – Thr	1 (0,1)
	TCG – TGG и CAC – AAC	Ser – Trp и His – Asn	1 (0,1)
526 и 516	CAC – TAC и GAC – GTC	His – Tyr и Asp – Val	1 (0,1)
516 и 511	GAC – GGC и CTG – CCG	Asp – Gly и Leu – Pro	3 (0,3)
Мутаций не обнаружено			470 (48,2)
Всего			976

Мутации в 315 кодоне <i>katG</i> -гена и промоторной области <i>fabG-inhA</i> -оперона			
KatG315	AGC – ACC AGC – ACA	Ser – Thr Ser – Thr	509 (52,1) 2 (0,2)
KatG315 и <i>inhA</i>	AGC – ACC и -15 C – T AGC – ACC и -8 T – C AGC – ACC и -8 T – A	Ser – Thr Ser – Thr Ser – Thr	88 (9,0) 4 (0,4) 9 (0,9)
<i>inhA</i>	-15 C – T		13 (1,3)
Мутаций не обнаружено			351 (36,0)
Всего			976
Мутации в 306 и 406 кодонах <i>embB</i> -гена			
306	ATG – ATН ² ATG – GTG ATG – ACG	Met – Ile Met – Val Met – Thr	42 (14,7) 48 (16,8) 1 (0,4)
406	GGC – GCC GGC – AGC GGC – GAC GGC – TGC	Gly – Ala Gly – Ser Gly – Asp Gly – Cys	16 (5,6) 7 (2,4) 1 (0,4) 1 (0,4)
Мутаций не обнаружено			169 (59,3)
Всего			285

¹Мутации в 306 и 406 кодонах *embB*-гена определены для 285 клинических штаммов *M. tuberculosis*, выделенных в Центральном ФО; ²Н – А, С или Т.

Сравнительный анализ результатов фенотипического (метод абсолютных концентраций) и генетического анализа устойчивости к рифампицину и изониазиду представлен в таблице 3.

Генетические детерминанты устойчивости к рифампицину были обнаружены у 89,2 % (506/567) рифампицин-устойчивых штаммов: при этом частота встречаемости мутаций в RRDR-регионе *proB*-гена была значительно выше среди штаммов с МЛУ, чем среди штаммов, монорезистентных к рифампицину – 89,9 % и 64,3 %, соответственно ($\chi^2=9,31$; $p=0,0023$).

Аналогичная закономерность наблюдалась и для изониазид-устойчивых штаммов – частота встречаемости мутаций в 315 кодоне *katG*-гена и/или *inhA*-промоторной области также была выше среди штаммов с МЛУ, чем среди монорезистентных штаммов - 93,6 % и 81,6 %, соответственно ($\chi^2=19,32$; $p<0,0001$), а в целом же генетические детерминанты устойчивости к изониазиду были обнаружены у 91,4 % (625/684) изониазид-устойчивых штаммов. Рифампицин- и изониазид-чувствительные штаммы мутаций в исследуемых локусах не имели. У 61 (10,7 %; 61/567) рифампицин-устойчивого и 59 (8,6 %; 59/684) изониазид-устойчивых штаммов изменений в соответствующих локусах также не обнаружено. Подобная закономерность наблюдалась и ранее [Wade et al., 2004] и может быть объяснена тем, что устойчивость этих штаммов *M. tuberculosis* обусловлена генетическими изменениями в других локусах генома и, возможно, реализуется за счет других, не известных пока механизмов.

Таблица 3. Сравнительный анализ результатов микробиологического и молекулярно-генетического тестирования 976 клинических штаммов *M. tuberculosis*.

		Генотип ¹ ; n (%)							
		<i>rpoB</i> _{mut}	<i>rpoB</i> _{mut} <i>katG</i> _{mut}	<i>rpoB</i> _{mut} <i>inhA</i> _{mut}	<i>katG</i> _{mut} <i>inhA</i> _{mut}	<i>katG</i> _{mut}	<i>rpoB</i> _{mut} <i>inhA</i> _{mut}	<i>inhA</i> _{mut}	WT ³
Фенотип ²	RIFr INHr (n=553)	11 (2.0)	397 (71.8)	81 (14.6)	7 (1.2)	24 (4.3)	8 (1.4)	1 (0.2)	24 (4.3)
	RIFr INHs (n=14)	9 (64.3)	0	0	0	0	0	0	5 (35.7)
	RIFs INHr (n=131)	0	0	0	13 (9.9)	90 (68.7)	0	4 (3.0)	24 (18.0)
	RIFs INHs (n=278)	0	0	0	0	0	0	0	278 (100)

¹ – *rpoB*_{mut} – выявлены мутации в RRDR-регионе *rpoB* гена; *katG*_{mut} – выявлены мутации в кодоне Ser315 *katG* гена; *inhA*_{mut} – выявлены мутации в позициях -8 или -15 промоторной области *fabG1 (mabA) – inhA* оперона;

² – устойчивость определялась методом абсолютных концентраций; RIFr – устойчивы к рифампицину, INHr – устойчивы к изониазиду

³ – wild type (WT), мутаций в исследуемых локусах не обнаружено.

В целом разработанная система продемонстрировала высокую диагностическую чувствительность, детектируя около 90% штаммов с МЛУ со 100% специфичность.

Наблюдаемый профиль мутаций среди рифампицин- и изониазид-устойчивых штаммов (преобладание замен в кодонах Ser351, His526 и Asp516 *rpoB*-гена и Ser315 *katG*-гена, соответственно) в целом достаточно характерен для многих регионов, как Российской Федерации [Gryadunov et al., 2005; Mikhailovich et al., 2001; Nikolayevsky et al., 2004], так и мира [Gegia et al., 2008; Hillemann et al., 2005; Zakerbostanabad et al., 2005].

В тоже время некоторые географические различия, регистрируемые в мире [Toungoussova et al., 2002; Tudo et al., 2004], вероятно, связаны с преобладанием в том или ином регионе штаммов *M. tuberculosis*, относящихся к разным генетическим семействам и циркулирующих внутри разных социальных групп человеческой популяции [Ignatova et al., 2006; Lipin et al., 2007].

В процессе сравнения частот встречаемости различных мутаций, ассоциированных с устойчивостью, в трех группах штаммов, выделенных в Центральном, Уральском и Западно-Сибирском регионах России были выявлены отличия как в частоте встречаемости мутаций в том или ином кодоне, так и в частоте встречаемости типа нуклеотидных замен в пределах одного кодона. Однако, для определения достоверности этих различий, их причин, и оценки возможности на основании полученных данных отслеживать эпидемиологические особенности распространения штаммов, устойчивых к

противотуберкулезным препаратам, необходимо на протяжении нескольких лет осуществлять мониторинг выделяемых штаммов. Отметим лишь, что во всех регионах среди устойчивых штаммов преобладают мутации, приводящие к резистентности высокого уровня.

Сравнительный анализ результатов фенотипической и молекулярно-генетической характеристики выборки из 285 клинических штаммов *M. tuberculosis*, в которой исследовались генетические детерминанты устойчивости к этамбутолу, представлен в таблице 4.

Таблица 4. Результаты микробиологического и молекулярно-генетического тестирования 285 штаммов *M. tuberculosis*.

Фенотип ⁵	N (%)	Генотип, N (%)						
		¹ wt	² <i>rpoB</i>	³ <i>katG/inhA</i>	<i>rpoB</i> ; <i>katG/inhA</i>	<i>rpoB</i> ; ⁴ <i>embB</i>	<i>katG/inhA</i> ; <i>embB</i>	<i>rpoB</i> ; <i>katG/inhA</i> ; <i>embB</i>
Чувствительный	43 (15,0)	43 (100,0)	-	-	-	-	-	-
RIFr	2 (0,7)	-	2 (100,0)	-	-	-	-	-
INHr	19 (6,7)	7 (36,8)	-	11 (57,9)	-	-	1 (5,3)	-
EMBr	3 (1,0)	3 (100,0)	-	-	-	-	-	-
RIFr INHr	15 (5,3)	-	-	1 (6,7)	9 (60,0)	-	1 (6,7)	4 (26,6)
RIFr EMBr	1 (1,0)	-	1 (100)	-	-	-	-	-
INHr EMBr	13 (4,6)	4 (30,7)	-	6 (46,1)	-	-	3 (23,1)	-
RIFr INHr EMBr	189 (66,3)	7 (3,7)	-	3 (1,6)	71 (37,5)	2 (1,0)	8 (4,2)	98 (51,8)
Всего	285	64 (22,5)	3 (1,0)	21 (7,4)	80 (28,0)	2 (0,7)	13 (4,6)	102 (35,8)

¹ – wild type, отсутствие мутаций в проанализированных локусах.

² – выявлены мутации в RRDR *rpoB* гена;

³ – выявлены мутации в кодоне Ser315 *katG* гена и/или в позициях -8 или -15 промоторной области *fabG1 (mabA) – inhA* оперона;

⁴ – выявлены мутации в Met306 или Gly406 кодонах *embB* гена.

⁵ - устойчивость определялась методом абсолютных концентраций; RIFr – устойчивы к рифампицину, INHr – устойчивы к изониазиду, EMBr – устойчивы к этамбутолу.

На сегодняшний день данные о связи мутаций в *embB*-гене с устойчивостью к этамбутолу носят противоречивый характер. В ряде работ показано, что мутации в этом гене могут встречаться и среди этамбутол-

чувствительных штаммов. В настоящее время этот вопрос окончательно не разрешен и убедительных объяснений наблюдаемых противоречий пока нет [Mokrousov et al., 2002; Plinke et al., 2006].

В выборке из 285 штаммов *M. tuberculosis*, для которых микробиологическими методами была определена чувствительность к этамбутолу, обнаружено 6 штаммов, имеющих мутации в *embB306/406*, но отнесенных методом абсолютных концентраций к этамбутол-чувствительным. Однако значение ингибирующей концентрации этамбутола для этих штаммов равнялось 2 мкг/мл (пороговое значение для метода абсолютных концентраций). Более того, у 50 штаммов с МИК этамбутола ≤ 1 мкг/мл и у оставшихся 24 штаммов с МИК этамбутола, равной 2 мкг/мл, мутаций в исследуемых локусах обнаружено не было. Можно предположить, что замены в 306 и 406 кодонах *embB*-гена у этих штаммов привели к формированию умеренной (промежуточной) устойчивости. Поскольку современные микробиологические методы используют для определения устойчивости к этамбутолу разные критические концентрации препарата, варьирующие в диапазоне от 2 мкг/мл до 7,5 мкг/мл, существует возможность не совсем корректно идентифицировать мутантные штаммы с промежуточным уровнем устойчивости, как этамбутол-чувствительные. Необходимо учитывать возможность формирования у таких штаммов клинически значимой устойчивости, которая может привести к неэффективности проводимой терапии.

Частота встречаемости мутаций в 306 и 406 кодонах *embB*-гена среди этамбутол-резистентных штаммов, циркулирующих в Центральном регионе, показана относительно низкой - около 54 % (111/206). С учетом литературных данных, демонстрирующих широкий диапазон частот встречаемости этих нуклеотидных замен у этамбутол-резистентных штаммов – от 95,5 % (США [Parsons et al., 2005]) до 30,0 % (Кувейт [Ahmad et al., 2007]) – использование этих мутаций в качестве маркеров этамбутол-устойчивости в некоторых регионах мира, в том числе и в Центральном регионе Российской Федерации, может оказаться затруднительным и недостаточно эффективным.

Тем не менее, была установлена достоверная связи между частотой встречаемости мутаций в *embB306/406* и числом препаратов, к которым фенотипически устойчив штамм (Таблица 5). В частности, мутации встречались

достоверно чаще среди МЛУ-штаммов (113/204; 55,4 %), чем среди моноустойчивых и чувствительных (4/81; 4,9%) ($\chi^2 = 60,99$; $P < 0,0001$).

Несмотря на низкую диагностическую чувствительность *embB306/406* локуса (около 55,4 %; 113/204) на фоне высокой специфичности (95,0 %; 77/81), была предпринята попытка оценить возможности использования данного генетического локуса в комбинации локусами *rpoB* и *katG/inhA*-промоторной области для быстрой диагностики МЛУ. Такой подход позволил добиться увеличения диагностической чувствительности выявления МЛУ до 94,6 %.

Таблица 5. Частоты встречаемости мутаций в 306 и 406 кодонах *embB*-гена в зависимости от профиля лекарственной устойчивости.

Фенотипическая устойчивость ¹	Число штаммов	Число штаммов с мутациями в <i>emb306/406</i> (%)	χ^2	р
Чувствительные	43	0	референсная группа для сравнения	
Устойчивые к одному препарату; RIF или INH или EMB	24	1 (4,1 %)	1,8	0,1775
Устойчивые к двум препаратам; RIF, INH (МЛУ) или RIF, EMB или INH, EMB	29	8 (27,5 %)	13,34	0,0003
Устойчивые к трем препаратам; RIF, INH и EMB	189	108 (57,1 %)	45,97	<0,0001
Устойчивые к одному или более препаратов	242	117 (48,3 %)	35,27	<0,0001

¹Устойчивость определена методом абсолютных концентраций. RIF – рифампицин, INH – изониазид, EMB – этамбутол.

Молекулярное типирование клинических штаммов *M. tuberculosis* и оценка гетерогенности популяции.

VNTR-анализ. Для 115 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных легочным туберкулезом в Москве и Московской области, установлено число тандемных повторов в 24 описанных ранее VNTR-локусах (MIRU-2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40; ETR-A, B, C; Mtub-04, 21, 29, 30, 34, 39; QUB-11b, 26, 4156). Таким образом, для каждого штамма был получен аллельный профиль, представленный набором аллельных вариантов по всем 24 локусам, где номер аллельного варианта соответствовал числу тандемных повторов в данном локусе.

Из обнаруженных различных VNTR-профилей (n=71) 59 (83,0 %) были уникальными (встречались только у одного штамма в выборке).

Оставшиеся штаммы были объединены в 12 кластеров (от 2 до 13 штаммов): из них три наиболее крупных, включающих 13 (11,3 %), 12 (10,4 %) и 9 (7,8 %) штаммов, имели VNTR-профили 223325173533424454433672, 223325153533424454433682 и 22332513533424454433662, соответственно.

Значение дискриминирующего индекса Хантера-Гастона (HGDI), рассчитанное на основании анализа аллельного полиморфизма 24 локусов, составило 0,968, что демонстрирует достаточно высокую разрешающую способность метода VNTR-типирования по 24 локусам.

Анализ аллельного полиморфизма каждого из 24 локусов в отдельности продемонстрировал разную степень изменчивости исследованных локусов. Семь локусов – MIRU-4, MIRU-20, MIRU-23, MIRU-27, ETR-B, M tub29 и M tub34 – были практически мономорфны ($0 < h < 0,1$). Лocus MIRU-24 был абсолютно не вариабелен – все штаммы, попавшие в нашу выборку, имели один и тот же аллельный вариант. Шесть локусов – MIRU-26, MIRU-31, ETR-A, M tub21, QUB-11b и QUB-26 – отличались наибольшим полиморфизмом ($h > 0,5$). Самый большой полиморфизм наблюдался по locusу QUB-11b ($h = 0,74$). Изменчивость остальных локусов варьировала в диапазоне от 0,11 (locus QUB-4156) до 0,48 (locусы MIRU-40 и M tub04).

Сполиготипирование.

Определена структура DR-региона для 115 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных легочным туберкулезом в Москве и Московской области, осуществлено сравнение полученных гибридизационных паттернов с представленными в базах данных SITVIT и SpolDB4. На основании проведенного сравнительного анализа каждому штамму присвоен соответствующий номер SIT и определен тип генетического семейства, к которому относится данный штамм.

Всего выявлено 20 генотипов, входящих в состав 15 генетических семейств. Шесть обнаруженных в нашей выборке генотипов (шесть штаммов) в имеющихся базах данных не представлены.

На основании результатов сполиготипирования было выделено семь кластеров, содержащих от 2 до 73 штаммов, имеющих идентичный номер SIT. Восемнадцать штаммов

(включая шесть штаммов с ранее не описанными сполиготипами) имели уникальные сполиготипы.

Наибольший кластер – 76 (66,0 %) штаммов – был образован штаммами, относящимися к семейству Beijing. Гораздо меньше штаммов входило в состав двух следующих по величине семейств – LAM и T – 12 (10,4 %) и 10 (8,7 %) штаммов, соответственно.

В целом, разрешающая способность метода сполиготипирования оказалась весьма низкой (HGDI=0,591), особенно для штаммов семейства Beijing. Сравнительный анализ использованных методов и их комбинаций представлен в таблице 6. При этом рассматривались разные варианты VNTR анализа – традиционный по 12 локусам, расширенный – 24 локуса, и редуцированный, включающий шесть наиболее полиморфных для данной выборки локусов.

Таблица 6. Сравнительный анализ использованных методов молекулярно-генетического типирования клинических штаммов *M. tuberculosis* и оценка их дискриминирующей способности.

Метод, исследуемая группа штаммов	Общее число генотипов	Число уникальных генотипов ¹	Число кластеров	Размеры кластеризованных групп	Значение HGDI
Сполиготипирование					
Все штаммы	26	19	7	2 – 73	0.591
Штаммы семейства Beijing	3	1	2	2 – 73	0.077
Штаммы, не относящиеся к семейству Beijing	23	18	5	2 - 8	0.935
VNTR-анализ, все штаммы					
24-VNTR ²	71	59	12	2 – 13	0.968
12-MIRU-VNTR ³	48	36	12	2 – 27	0.900
6-VNTR ⁴	49	36	13	2 – 20	0.940
Сполиго+24-VNTR					
Все штаммы	74	63	11	2 – 13	0.973
Штаммы семейства Beijing	36	26	10	2 – 13	0.953
Сполиго+12- VNTR					
Все штаммы					
Штаммы семейства Beijing	53	42	11	2 – 25	0.913
Beijing	17	11	8	2 – 25	0.801
Сполиго+6-VNTR					
Все штаммы					
Штаммы семейства Beijing	56	44	12	2 – 20	0.945
Beijing	22	14	8	2 – 20	0.880

¹ Уникальный генотип – генотип, представленный в исследуемой выборке одним штаммом.

² 24-VNTR – типирование с использованием 24 локусов: MIRU-2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40; ETR-A, B, C; Mtub-04, 21, 29, 30, 34, 39; QUB-11b, 26, 4156

³ 12-MIRU-VNTR – типирование с использованием 12 локусов MIRU: MIRU-2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40

⁴ 6-VNTR – типирование с использованием шести наиболее полиморфных локусов: MIRU-26, MIRU-31, ETR-A, M tub21, QUB-11b и QUB-26

Очевидно, что максимальная разрешающая способность (даже в пределах семейства Beijing) достигается при сочетанном использовании метода сполитипирования с VNTR-анализом по 24 локусам. Эта комбинация может рассматриваться как наиболее эффективный инструмент молекулярно-генетического типирования и длительного эпидемиологического мониторинга туберкулезной инфекции.

Рассмотренная нами комбинация из шести наиболее вариабельных VNTR-локусов, за счет возможной генетической нестабильности и гипервариабельности, не отвечает в полной мере задачам длительного молекулярно-эпидемиологического мониторинга. В то же время, за счет уменьшения объема работы, при сохранении высокой дискриминирующей способности, этот подход может использоваться для эпидемиологического исследования локальных вспышек, позволяя в кратчайшие сроки и с минимальными затратами исследовать эпидемический процесс и принимать меры по предотвращению распространения туберкулезной инфекции в человеческой популяции.

В целом, популяция *M. tuberculosis* Московского региона оказалась весьма гетерогенна. Выявленное распределение по генотипам (с преобладанием генотипа Beijing) характерно для Российской Федерации. При этом обнаружена значимая связь МЛУ с Beijing-генотипом; МЛУ-штаммы встречались достоверно чаще среди семейства Beijing (59/76; 77,6 %), чем среди штаммов других семейств (17/39; 43,6 %) ($\chi^2 = 13,3$; $p = 0,0003$). Также генетические детерминанты МЛУ достоверно чаще обнаруживались среди штаммов Beijing, чем среди штаммов других семейств ($\chi^2 = 4,87$; $p = 0,0274$).

Таким образом, очевидно, что штаммы семейства Beijing играют ведущую роль в распространении МЛУ *M. tuberculosis* в Московском регионе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высокий уровень заболеваемости туберкулезом, сохраняющийся в Российской Федерации обусловлен множеством факторов. Одним из важнейших условий продолжающегося распространения туберкулезной

инфекции является неэффективность терапии, связанная с появлением и широкой диссеминацией в человеческой популяции лекарственно-устойчивых штаммов возбудителя. Кроме того, слабо развитая в Российской Федерации система эпидемиологического мониторинга не позволяет разрабатывать и реализовывать системные эпидемиологические мероприятия, направленные на предотвращение распространения туберкулезной инфекции (в т.ч. и устойчивых форм) среди населения. Очевидно, что разработка и применение методов молекулярного типирования штаммов *M. tuberculosis* для российской популяции возбудителя весьма актуальная задача, которая может иметь важное практическое клинико-микробиологическое и эпидемиологическое значение.

В настоящей работе предложен комплексный подход оценки клинически и эпидемиологически значимых свойств возбудителя, основанный на изучении особенностей структурной организации геномной ДНК *M. tuberculosis*.

В ходе апробации разработанных методик проанализировано региональное распространение среди штаммов *M. tuberculosis* детерминант устойчивости к основным противотуберкулезным препаратам. Показана возможность использования для скрининга МЛУ-штаммов *M. tuberculosis* высокопроизводительной системы генетического анализа, основывающейся на технологии минисеквенирования с последующей MALDI-ToF – масс-спектрометрией.

Разработанная нами высокоинформативная производительная система генетического скрининга лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* нашла практическое применение в рамках выполнения Государственного Контракта № 06/365 от 15 марта 2006 г. на проведение работы по теме «Мониторинг лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза в Российской Федерации с использованием технологии масс-спектрометрии».

При помощи двух методов – VNTR-анализа и сполиготипирования – получены обновленные данные по молекулярно-генетическому разнообразию клинических штаммов *M. tuberculosis*, оценен вклад тех или иных генотипов в формирование и распространение устойчивости к основным противотуберкулезным препаратам в Московском регионе. Нами изучены и показаны возможности этих методов молекулярно-генетического анализа, взаимодополняющих и компенсирующих недостатки друг друга, для решения задач клинической микробиологии и эпидемиологии туберкулеза.

Результаты представленной работы способствуют осуществлению на территории Российской Федерации мониторинга туберкулезной инфекции на современном методологическом и техническом уровне.

ВЫВОДЫ

1. Сформирована коллекция из 976 образцов геномной ДНК клинических штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных легочным туберкулезом из более чем 12 субъектов Российской Федерации, входящих в состав трех Федеральных округов: Центрального, Уральского и Сибирского.
2. На основе MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа нуклеиновых кислот, являющихся продуктами специфической ферментативной реакции минисеквенирования, разработан и реализован подход обнаружения лекарственно-устойчивого туберкулеза, в том числе МЛУ с точностью 90 %.
3. Тестирование генетических изменений в 306 и 406 кодонах гена арабинозилтрансферазы, обнаруженных у 54 % этамбутол-устойчивых штаммов, повышает эффективность выявления МЛУ до 95 %, однако не может служить маркером устойчивости к этамбутолу.
4. Показана высокая дискриминирующая способность молекулярного типирования туберкулеза на основании анализа числа tandemных повторов в структуре геномной ДНК ($D=0,973$), в том числе для штаммов, относящихся к одному генетическому семейству ($D=0,953$).
5. Изменения в геномной ДНК, обуславливающие формирование МЛУ фенотипа, обнаружены в исследованной выборке клинических штаммов *M. tuberculosis* с высокой частотой (49,8 %), с преобладанием мутаций, приводящих к устойчивости высокого уровня к рифампицину и изониазиду.
6. Впервые для выборки клинических штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от пациентов, постоянно проживающих в Москве и Московской области, показано биологическое разнообразие со значительным преобладанием штаммов, относящихся к семейству Beijing (66,0 %), и продемонстрирована ведущая роль штаммов этого семейства в распространении МЛУ в Московском регионе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Afanas'ev M., Ikryannikova L., Il'ina E., Sidorenko S.V., Kuz'min A.V., Larionova E.E., Smirnova T.G., Chernousova L.N., Kamaev E.Y., Skorniakov S.N., Kinsht V.N., Cherednichenko A.G., Govorun V.M. Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation// J. Antimicrob. Chemother. - 2007. –Vol. 59. –P. 1057–1064.
2. Ikryannikova L., Afanas'ev M., Akopian T., Il'ina E.N., Kuz'min A.V., Larionova E.E., Smirnova T.G., Chernousova L.N., Govorun V.M. Mass-spectrometry based minisequencing method for the rapid detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*// J. Microbiol. Methods. -2007. –Vol. 70 (3). –P. 395-405.
3. Афанасьев М.В., Икрянникова Л. Н., Ильина Е. Н., Смирнова Т. Г., Ларионова Е. Е., Кузьмин А. В., Черноусова Л. Н., Камаев Е. Ю., Скорняков С. Н., Киншт В. Н., Чередниченко А. Г., Говорун В. М. Применение реакции мини-секвенирования с последующим MALDI-TOF масс-спектрометрическим анализом для оценки устойчивости к рифампицину и изониазиду штаммов *Mycobacterium tuberculosis*// Проблемы туберкулеза и болезней легких. -2007. -№7. –С. 37-42.
4. Ikryannikova L.N., M.V. Afanas'ev, E.N. Ilina, V.M.Govorun. Rapid detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* using maldi-tof mass-spectrometry based minisequencing method// In the International conference «Development of new generation anti-tuberculosis therapeutic agents. Problems, approaches, perspectives», Abstracts book. –2006. – P. 32.
5. Ilina E.N., L.N. Ikryannikova, V.A. Vereshchagin M. V. Afanas'ev. The universal high-throughput technology platform based on MALDI TOF MS as a tool for microbial typing// In the 3rd International Conference “Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanotechnologies for Medicine” Abstracts. – 2006, p. 60
6. Govorun V. M., E. N. Il'ina, M. V. Afanas'ev, L. N. Ikryannikova. MALDI-ToF mass-spectrometry based minisequencing method for rapid detection *Mycobacterim tuberculosis* resistance to rifampicin, isoniazid and ethambutol// In 55th ASMS Conference on Mass Spectrometry, 2007.
7. Afanas'ev M.V., E. N. Il'ina, T. G. Smirnova, E. E. Larionova, A. V. Kuz'min, S.N. Andreevskaya, L. N. Chernousova and V. M. Govorun. Genetic analysis of

Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Central region of Russia by VNTR-MIRU genotyping// In 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Clinical Microbiology and Infection, - 2008. - Vol. 14. –P. S1-S815.

8. Afanas`ev M. V., E. N. Il`ina, T. G. Smirnova, E. E. Larionova, A. V. Kuz`min, S. N. Andreevskaya, L. N. Chernousova and V. M. Govorun. Prevalence of drug-resistance associated mutations for *Mycobacterium tuberculosis* strains circulated in Russia// In 39th Union World Conference on Lung Health, Abstracts book. –Paris, 2008.

Список использованных сокращений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфат

ддНТФ – дидезоксинуклеотидтрифосфат

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость (англ. MDR – Multi-Drug Resistance)

п.о. – пар оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

MALDI-TOF масс-спектрометрия - времяпролётная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбционной ионизацией (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry)

MIRU – Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (Микобактериальные рассеянные повторяющиеся единицы)

ETR - Exact Tandem Repeats (Точные тандемные повторы)

VNTR – Variable Number of Tandem Repeats (полиморфизм числа тандемных повторов)

QUB – Queen University of Belfast (Королевский Университет Белфаста)