

ВИЯВЛЕННЯ СУЧАСНИХ ТА ПРЕДКОВИХ СУБЛІНІЙ ШТАМІВ РОДИНИ BEIJING У КИЇВСЬКІЙ ПОПУЛЯЦІЇ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Штами *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) родини Beijing викликають найбільше занепокоєння епідеміологів та клініцистів завдяки надзвичайно широкому розповсюдженню у всьому світі та здатністю частіше, ніж інші штами набувати лікарської стійкості до багатьох протитуберкульозних препаратів (ПТП). Велика кількість робіт присвячена опису спалахів туберкульозу, викликаного цим генотипом. Клінічні та молекулярно-епідеміологічні дослідження дозволили зробити висновки про певні унікальні властивості у тому числі здатність долати захисний ефект БЦЖ-вакцинації (BCG – *Bacillus Calmette-Guerin*), більшу трансмісивність у порівнянні з не-Beijing штамми, здатність швидко прогресувати від стадії інфекції до активної хвороби, та деякі інші патогенні властивості [1, 2]. Проте, загалом, штами родини Beijing демонструють досить широкий спектр вірулентних властивостей, що може пояснюватись генетичною гетерогенністю лінії у цілому.

У країнах колишнього Радянського Союзу частка родини Beijing, яка визначалась за допомогою різних методів, таких як споліготипування, VNTR (Varied Number of Tandem Repeats) іноді за різними наборами локусів та IS6110-ПДРФ (Поліморфізм Довжини Рестрикційних Фрагментів), варіює від 34 % (Харківська область, Україна) до 71,6 % (Казахстан) [3, 4]. У м. Києві за даними ETR-VNTR нами було встановлено, що родина Beijing складає 46,7 % усіх клінічних ізолятів [5]. Штами родини складають щонайменш 92,6 % штамів першої принципової генотипової групи (ПГГ-1), яка є епідеміологічно-значущою групою київської популяції завдяки виявленій асоціації зі стійкістю до ПТП першого ряду ізоніазиду. ETR-локуси, що були використані для генотипування штамів *M. tuberculosis* київської популяції, завдяки своїй природі повторюваних елементів, характеризуються вищим рівнем гомоплазії, ніж SNP- та LSP-маркери. Ми вважаємо, що для вдосконалення стратегії дослідження структури роди-

ни Beijing київської популяції *M. tuberculosis* та вивчення асоціацій між генотипом і клініко-епідеміологічними проявами доцільно застосувати більш одного методу генотипування і використовувати більш стабільні SNP- та LSP-маркери.

Одним зі специфічних генетичних маркерів генотипу Beijing є регіон *NTF*, який може містити інсерції мікобактеріального мобільного елемента IS6110. Три варіанти *NTF* з точки зору наявності або відсутності послідовності IS6110 були виявлені у штамів Beijing, що дозволяє на даний час поділити родину на три сублінії, які можливо розташувати за принципом еволюційного походження (рис.) [6]. Більшість Російських штамів відноситься до сублінії *NTF::IS6110*, або «сучасних/типових» і біля 7 % належить до «предкового/атипового» типу [6, 7]. У ряді робіт було показано, що штами «сучасної» гілки проявляють більші вірулентні властивості, ніж штами «предкові» сублінії [2].

Метою даної роботи є характеристика найбільш розповсюдженої родини Beijing у київській популяції *M. tuberculosis* за часткою штамів «сучасних» та «предкових» субліній, визначених за структурою локусу *NTF*.

Матеріали і методи

Культури мікобактерій туберкульозного комплексу (МТБК) були отримані від хворих на легеневий туберкульоз (ЛТБ) пацієнтів, що проживають у м. Києві. Діагноз туберкульоз був встановлений лікарями-фтизіатрами ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф.Г. Яновського НАМН України» на підставі рентгенологічних та клінічних обстежень. При надходженні хворого в стаціонар зразки мокротиння аналізувалися лікарями-лаборантами мікроскопічним (забарвлення за Цілем-Нільсеном) і мікробіологічними (посів на середовище Левенштейна-Йенсена) методами за стандартними методиками згідно Наказу МОЗ України від 06.02.2002 р. № 45 [8].

ДНК виділяли за стандартною методикою, інактивуючи культуру прогріванням при 80 °C [9]. Ізоляти бактеріальних культур були генотиповані на основі ETR-VNTR (за локусами ETR A, B, C, D, E) та SNP-типування групоспецифічного SNP *katG*⁴⁶³ [5, 10]. За стандартною схемою ДНК-зразок характеризували сукупністю числа копій кожного з 5 тандемних повторів (локуси ETR A, B, C, D, E), що відображається у п'ятизначному номері [10].

ПЛР-суміш містила 1 од. DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific), відповідний буфер, 200 мкМ dNTP та 0,5 мкМ прямого та зворотного праймерів. Мультиплексну ПЛР для локусу *NTF* виконували як вказано у першоджерелі [11]. Праймери для контрольної ділянки мобільного елемента *IS6110*, які продукують ПЛР-фрагмент довжиною 523 п.н. на ДНК усіх штамів, що містять *IS6110* (для київської популяції штамів *M. tuberculosis* не було знайдено тих, що не містили цього елемента) брали у концентрації 0,3 мкМ, а інші у концентрації 0,5 мкМ.

Реакції ПЛР виконували на ампліфікаторі 2720Tc (Applied Biosystems, США). Продукти ПЛР розділяли в агарозному (1,5–3 %) гелі з забарвленням бромистим етидієм, візуалізацією на УФ-транслюмінаторі і подальшою архівацією за допомогою системи аналізу результатів BG62-A2010 Gel Doc system Felix 1010 (Biostep, Німеччина).

Результати та обговорення

Першим етапом аналізу клінічних ізолятів київської популяції *M. tuberculosis* було їх SNP-типування за локусом *katG*⁴⁶³, яке дозволяє встановити приналежність до генотипових груп ПГГ-1 або ПГГ-2/3. Як було показано у попередніх роботах щонайменш 92,6 % штамів ПГГ-1 складають штами родини Beijing [5]. З 28 проаналізованих зразків 19 виявили приналежність до ПГГ-1. Надалі аналізували тільки цю групу. Більшість штамів (18) згідно з результатами ETR-VNTR типування мали тип 42435 і один – 42434.

Згідно результатам мультиплексної ПЛР локусу *NTF* усі штами мали структуру локусу, характерну для «сучасного» типу (рис.). Таким чином, очевидно, необхідно продовжити аналіз штамів *M. tuberculosis* родини Beijing для того, щоб охопити генотипи, які зустрічаються рідше, ніж найбільш поширений тип 42435.

Епідеміологічні дослідження, які вивчають поширення різних філогенетичних груп

M. tuberculosis родини Beijing в регіонах світу показали, що ріст поширеності ТБ викликаною Beijing генотипом обумовлений саме штамом сучасної сублінії, а не предковими штамми [2, 12]. Раніше була висунута гіпотеза про асоціацію географічного поширення всієї родини з регіонами, де широко застосовували вакцинацію БЦЖ [13]. Вона згодом набула уточнень завдяки дослідженням як глобальних, так і локальних популяцій. Так, у Японії вивчення динаміки популяційної структури виявило більш високий рівень трансмісії та здатність частіше вражати осіб молодшої вікової групи для штамів «сучасної» сублінії родини на відміну від «предкової» гілки, що зв'язали з введенням у певний період БЦЖ-вакцинації [11]. У Київській популяції *M. tuberculosis* тенденція до більшої здатності вражати пацієнтів молодшої вікової групи (16–24 роки) була виявлена в цілому для родини Beijing (без поділу на сублінії), ніж для інших штамів [5, 14]. Таким чином, детальніше вивчення ліній та субліній родини Beijing, розповсюджених на певній території, з використанням більшої кількості маркерів може дати точнішу картину адаптивних змін цих штамів.

Властивості «сучасних» та «предкових» штамів родини Beijing, асоційованих з вірулентністю, що дозволяють порівнювати різні філогенетичні підгрупи цієї родини на більш глибокому і предметному рівні, тільки починають досліджуватись. Дані деяких робіт підтверджують гіпотезу про те, що еволюція *M. tuberculosis* родини Beijing призвела до накопичення генетичних поліморфізмів, що посилюють бактеріальну вірулентність [2].

З методичної точки зору існує декілька альтернативних і додаткових підходів до розділення груп «сучасних» та «предкових» штамів родини Beijing. Так, мутації у двох ймовірних генах «мутаторів» *mutT2* та *mutT4* відділяють «сучасні» штами та розділяють «предкову» групу на «більш предкову» («more ancient») та «сучасну предкову» [2], які можна виявляти методами SNP-типування. Метод «інвертованої» *IS6110*-ПЛР було запропоновано для одночасного типування штамів і виявлення серед них двох зазначених груп, оскільки генотипи репродукувались достатньо стабільно [15]. При проведенні порівняльного MIRU-типування ізолятів *M. tuberculosis* родини Beijing у Японії були виявлені високополіморфні локуси (QUB-4156 та Mtub21), які також були корисні для класифікації субліній, що виділялись на основі локусу *NTF*

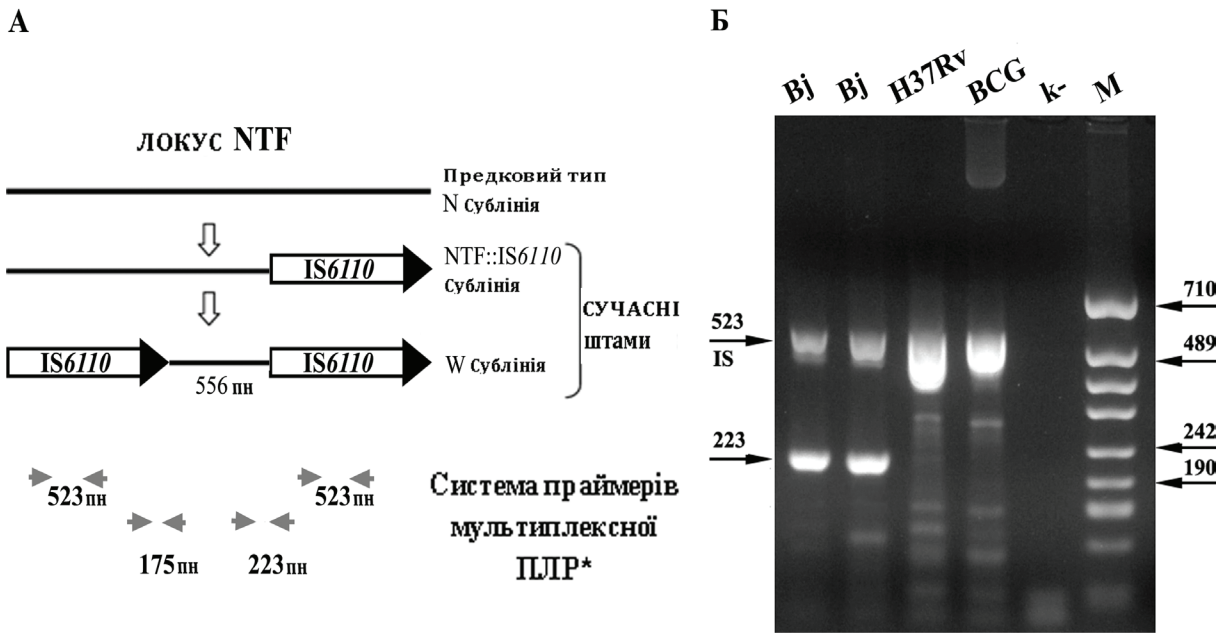


Рис. Структура локусу *NTF* у геномах штамів трьох субліній родини Beijing *M. tuberculosis* та результат мультиплексної ПЛР з праймерами до цього локусу на ДНК деяких ізолятів. **А** – схема інтеграції в геном *M. tuberculosis* родини Beijing мобільних елементів *IS6110* і напрямку еволюції субліній від «предкового» типу до «сучасного» [6] та розташування вздовж геномної ділянки праймерів, що утворюють систему мультиплексної ПЛР [11]. **Б** – електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР на ДНК штамів родини Beijing (Bj) та контрольних штамів МТБК *M. tuberculosis* H37Rv і *M. bovis* BCG, ліворуч відмічено розмір смуг ДНК-маркеру, праворуч – розміри відповідних ПЛР-фрагментів

[16]. Будь який з цих методів можливо застосувати додатково й для характеристики київської популяції штамів *M. tuberculosis*, у разі спрощення процедури або більшої загальної інформативності, наприклад, виявлення додаткових субліній сімейства Beijing, які відрізняються певними вірулентними властивостями.

Висновки

Необхідним є збільшення кількості проаналізованих ізолятів для достовірної оцінки співвідношення «сучасних» та «предкових» штамів у київській популяції клінічних штамів *M. tuberculosis*. Перспективним для більш оптимального аналізу можуть бути альтернативні методи виявлення штамів цих ліній на основі SNP-типування, MIRU-типування або «інвертованої» *IS6110*-ПЛР.

Робота виконана за державний кошт.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bifani P.J., Mathema B., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains // Trends Microbiol. – 2002. – 10, N 1. – P. 45–52.
2. Ribeiro S.C., Gomes L.L., Amaral E.P., Andrade M.R., Almeida F.M., Rezende A.L., Lanes V.R., Carvalho E.C., Suffys P.N., Mokrousov I., Lasunskaja E.B. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage // J. Clin. Microbiol. – 2014. – 52 – P. 2615–2624.
3. Dymova M.A., Liashenko O.O., Poteiko P.I., Krutko V.S., Khrapov E.A., Filipenko M.L. Genetic variation of *Mycobacterium tuberculosis* circulating in Kharkiv Oblast, Ukraine // BMC Infect. Dis. – 2011 – 11. – P. 77–87.
4. Муминов Т.А., Бейсембаева Ш.А., Жакипбаева Б.Т. Молекулярно-епидемиологические методы изучения распространенности возбудителей туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью в Казахстане // Молекулярно-генетические методы исследования в медицине и биологии: мат. междунар. науч.-практ. конф. – Караганда, 2012. – С. 35.

5. Чередник Ю.О., Анопрієнко О.В., Горovenko Н.Г., Фещенко Ю.І. ETR-VNTR та групоспецифічне SNP-типування штамів *Mycobacterium tuberculosis*, циркулюючих в м. Києві // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів – 2013. – 11, № 2. – С. 134–156.
6. Mokrousov I., Ly H.M., Otten T., Lan N.N., Vyshnevskiy B., Hoffner S., Narvskaya O. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: Clues from human phylogeography // Genome. Res. – 2005. – 5. – P. 1357–1364.
7. Mokrousov I., Narvskaya O., Limeschenko E., Otten T., Vyshnevskiy B. Novel IS6110 insertion sites in the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains from the St.Petersburg area of Russia, and evolutionary and epidemiological considerations // J. Clin. Microbiol. – 2002. – 40, N 4. – P. 1504–1507.
8. Фещенко Ю.І., Журило О.А., Клименко М.Т. Наказ МОЗ України № 5 від 06.02.2002 «Про затвердження інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції» (складена під керівництвом, та ін.). – 3б. норм.-директ. документів з охорони здоров'я, 2002. – № 2. – 111 с.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 397 с.
10. Frothingham R., Meeker-O'Connell W.A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats // Microbiology. – 1998. – 144. –P. 1189–1196.
11. Plikaytis B.B., Marden J.L., Crawford J.T., Woodley C.L., Butler W.R., Shinnick T.M. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Clin. Microbiol. – 1994 – 32, N 6. – P. 1542–1546.
12. Iwamoto T., Fujiyama R., Yoshida S., Wada T., Shirai C., Kawakami Y. Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan // J. Clin. Microbiol. – 2009. – 47, N 10. – P. 3340–3343.
13. Курунов Ю.Н., Краснов В.А., Мокроусов И.В., Филипенко М.Л, Киншт В.Н., Норкина О.В. Генетическое разнообразие *Mycobacterium tuberculosis* и оценка факторов риска распространения заболевания туберкулезом в сибирском регионе России методами молекулярной эпидемиологии // Мол. Ген. Микробиол. Вирусол. – 2003. – № 3. – С. 9–18.
14. Чередник Ю.О., Анопрієнко О.В., Горovenko Н.Г., Фещенко Ю.І. Генотипові та клініко-епідеміологічні характеристики ізолятів *Mycobacterium tuberculosis*, що циркулюють в м. Києві // Проблеми біології і медицини – 2013. – 1, № 4. – С. 220–225.
15. Mokrousov I., Jiao W.W., Valcheva V., Vyazovaya A., Otten T., Ly H.M., Lan N.N., Limeschenko E., Markova N., Vyshnevskiy B., Shen A.D., Narvskaya O. Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-based inverse PCR // J. Clin. Microbiol. – 2006. – 8 – P. 2851–2856.
16. Millet J., Miyagi-Shiohira C., Yamane N., Mokrousov I., Rastogi N. High-resolution MIRU-VNTRs typing reveals the unique nature of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Okinawa, Japan // Infection, Genetics and Evolution – 2012. – 12, N 4. – P. 637–641.

CHEREDNYK YU.O. ¹, ANOPRIYENKO O.V. ², BARBOVA A.I. ¹, ZHURYLO O.A. ¹

¹ State Institution National Institute of phthisiology and pulmonology named by F.G. Yanovsky of AMS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv-680, N. Amosova str., 10, e-mail: yurach@ukr.net

² Institute of molecular biology and genetics of NAS of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv-143, Akademika Zabolotnogo str., 150

IDENTIFICATION OF MODERN AND ANCIENT BEIJING STRAIN SUBLINEAGES IN KYIV'S POPULATION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Aims Characterization of *M. tuberculosis* Beijing family in Kyiv's clinical strains population by content of «modern» and «ancient» sublineages as defined by structure of NTF locus. **Methods.** Multiplex PCR of NTF locus, ETR-VNTR, and SNP-typing (*katG*⁴⁶³) of bacterial isolate DNA samples from Kyiv's patients with pulmonary tuberculosis. **Results.** 19 clinical isolates of *M. tuberculosis* strains belonged to the PGG-1 by SNP-typing and to two of the most prevalent ETR-VNTR Beijing genotypes (42435, 42434) showed NTF-locus structure characteristic to «modern» type. **Conclusions.** More samples should be analyzed to determine the proportion of «ancient» Beijing subtypes in Kyiv *M. tuberculosis* population. Alternative quick and convenient methods for detection of these sublineages could be considered for more effective strategy of *M. tuberculosis* monitoring in Kyiv.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, molecular epidemiology, NTF-locus.