

На правах рукописи



ДЫМОВА
Майя Александровна

**ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ
Mycobacterium tuberculosis
НА ТЕРРИТОРИИ СТРАН СНГ**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2011

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

к.б.н. Филипенко Максим Леонидович

Официальные оппоненты:

д.б.н, профессор, академик РАМН Ляхович Вячеслав Валентинович
к.б.н. Фоменко Наталья Владимировна

Ведущая организация:

ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи
РАМН

Защита состоится «__» _____ 2011 г. в «__» часов на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2011 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
к.х.н., доцент



Коваль В.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Туберкулез до сих пор остается серьезным инфекционным заболеванием, от которого ежегодно умирают более трех миллионов человек. Его инфекционным началом являются микобактерии туберкулезного комплекса, включающего *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. kanetti*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii* и *M. caprae* и другие. К настоящему времени использование секвенирования геномов микобактерий и их отдельных генов, применение разнообразных методов определения однонуклеотидного, делеционного и микросателлитного полиморфизма показало, что микобактерии туберкулеза более полиморфны, чем предполагалось ранее. Учитывая, что эволюция микобактерий проходила в постоянном взаимодействии с инфицированным им макроорганизмом, можно предположить, что генетическая вариабельность микобактерий могла бы реализовываться в различии как фенотипических свойств разных семейств микобактерий туберкулеза, так и в характере протекания заболевания.

Молекулярно-эпидемиологические исследования позволили выделить несколько относительно генетически гомогенных семейств *M. tuberculosis*, характеризующихся специфическими генетическими маркерами. Среди них семейство Beijing, которое представляют собой одну из самых «успешных» клад в современной всемирной эпидемии туберкулеза. Показано, что штаммы Beijing более вирулентны, и вызывают большие гистопатологические изменения, более быстрый рост и большую смертность. Семейство Beijing является наиболее распространенным среди новых случаев заболевания туберкулезом в разных регионах Российской Федерации и странах ближнего зарубежья. Сегодня часть эпидемиологических исследований показывают также связь между принадлежностью микобактерий семейству Beijing и наличием мутаций определяющих лекарственную устойчивость, а иногда и их типом. Отчасти это подтверждает гипотезу, что в эпоху активной химиотерапии туберкулеза, лекарственная устойчивость может способствовать распространению определенного генотипа *M.tuberculosis*. Однако пока экспериментальные исследования не смогли выявить основные механизмы, лежащие в основе этой связи. Таким образом, утверждение об ассоциации принадлежности микобактерии тому или иному семейству с вероятностью возникновения лекарственной устойчивости, а также с особенностями патогенности микобактерий, требует дальнейших исследований.

Появление микобактерий семейства Beijing может отражать тотальную тенденцию изменения в структуре популяции *M. tuberculosis*, вероятно, обусловленную антропогенными факторами (лечением антибиотиками и вакцинацией). Семейство Beijing изучено наиболее

подробно, но другие превалирующие семейства, такие как Haarlem и Africans могут также претерпеть подобные изменения.

Эволюционное движение микобактерий туберкулеза к новой популяции бактерий, которые труднее поддаются лечению и имеют более широкие возможности, чтобы обойти вакцинацию, будет являться основным препятствием нашим усилиям по борьбе с туберкулезом. Поэтому существует настоятельная необходимость более полного понимания механизмов, лежащих в основе появления «успешных» семейств *M. tuberculosis*, изучения популяционной структуры и ее динамики в отягощенных по туберкулезной инфекции районах, к которым относятся страны СНГ: Казахстане, Украине, Киргизии, а также в некоторых регионах Российской Федерации (РФ): Архангельской, Санкт-Петербургской, Самарской, Кемеровской, Новосибирской областях, республике Тыва, в Приморском крае, где наблюдаются высокая заболеваемость, смертность от туберкулеза и большой процент лекарственно устойчивых форм туберкулеза. Этот анализ должен быть распространен и на мониторинг лекарственной устойчивости на фенотипическом и генотипическом уровнях. Результаты таких исследований могут иметь чрезвычайно важные последствия для лечения туберкулеза и привести к нашему тотальному перевооружению для борьбы с этим заболеванием.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение генетического разнообразия изолятов *M.tuberculosis*, выделенных от больных, проживающих на территории стран СНГ, в том числе определение спектров и частот мутаций, ассоциированных с возникновением устойчивости к противотуберкулезным препаратам.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Выявить региональные особенности встречаемости различных семейств *M.tuberculosis*.
2. Изучить частоты встречаемости мажорных мутаций, ассоциированных с устойчивостью к основным противотуберкулезным препаратам (изониазиду и рифампицину)
3. Провести поиск ассоциаций между наличием мутаций, множественной лекарственной устойчивостью и принадлежностью исследуемых изолятов к тем или иным семействам *M.tuberculosis*.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые подробно охарактеризована коллекция изолятов *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории стран СНГ. Сделан сравнительный анализ частот встречаемости различных семейств *M. tuberculosis*, циркулирующих на данных территориях и вызывающих основные эпидемиологические вспышки. У данных генотипов выявлен профиль устойчивости,

определены спектры и частоты мутаций, ассоциированных с возникновением устойчивости к противотуберкулезным препаратам первого ряда, что способствует более эффективному выбору режима противотуберкулезной терапии. Проведен поиск ассоциаций принадлежности к определенному генотипу, наличию мутаций, определяющих устойчивость к рифампицину, и к множественной лекарственной устойчивости.

Апробация работы и публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей. Результаты работы также вошли в виде отдельной главы в коллективном сборнике «Роль микроорганизмов в функционировании живых систем: фундаментальные проблемы и биоинженерные приложения». Материалы диссертации представлены на 7 Международных конференциях: International Scientific Conference of students, post-graduate students and young scientists – Lomonosov – 2004 (г. Москва, Россия, 2004); International scientific conference «Development of international collaboration in field of study infectious diseases» (г. Новосибирск, Россия, 2004); International Conference on Chemical Biology (г. Новосибирск, Россия, 2005); 3rd Young Medics' International Conference (г. Ереван, Армения, 2005); Международная конференция «Фундаментальные науки - Биотехнологии и медицине» (г. Новосибирск, Россия, 2006); III Российская научная конференция с международным участием «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера» (г. Новосибирск, Россия, 2006); Международная конференция «Модели инновационного развития фармацевтической и медицинской промышленности на базе интеграции университетской науки и индустрии» (г. Долгопрудный, Россия, 2011).

Основные положения, выносимые на защиту.

- Структура популяции микобактерий туберкулеза, циркулирующих на территории стран бывшего СНГ гетерогенна с преобладанием изолятов семейства Beijing. На территории г. Владивостока циркулируют разнообразные изоляты семейства Beijing, нигде больше не встречающиеся. Повышенная частота встречаемости изолятов данного семейства в выборке больных с тяжелыми формами в г. Новосибирске подтверждает его повышенную вирулентность.
- Мажорными мутациями, обуславливающими возникновение устойчивости к рифампицину и изониазиду, являются нуклеотидные замены Ser315Thr в гене *katG* и Ser531Leu в гене *rpoB*.
- Сравнительный анализ профилей семейств микобактерий туберкулеза в исследуемых регионах показывает статистически значимое отличие выборки г. Владивостока от всех других изучаемых регионов. Наличие ассоциаций между отдельными семействами, мутациями и

наличием множественной лекарственной устойчивости варьирует между исследуемыми региональными выборками.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Текст изложен на 136 страницах, иллюстрирован 11 рисунками, включает 14 таблиц, список литературы содержит 225 библиографических источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Определение генетического разнообразия *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории г. Харькова, Украина

В работе использовано 98 образцов ДНК изолятов *M.tuberculosis*. В сформированной выборке преобладали мужчины – 81 (83%). Средний возраст пациентов составлял 40 лет, наиболее часто встречался инфильтративный туберкулез легких. Впервые выявленный туберкулез встретился у 36 больных (37%), вторично выявленный – у 62 (63%).

При MIRU–типировании данных образцов идентифицировано 75 генетических типов. По результатам типирования с использованием 15 полиморфных локусов, 67 изолятов имели уникальный для этой выборки профиль, остальные (31 изолят) входили в состав кластеров разного размера, с коэффициентом различия менее 0,125.

Индекс дискриминации Гюнтера-Хадсона (HGDI) данного метода составил 0,98. Процент кластеризации составил 31%. С помощью методов UPGMA и NJ, на основе MIRU-типирования была построена дендрограмма кластеризации изолятов *M. tuberculosis*, полученных от больных туберкулезом легких г. Харькова (рис.1).

На данной дендрограмме видно три больших ветви, которые состоят из более мелких кластеров или, в большинстве случаев, включают в себя уникальные по аллельному профилю изоляты. Две больших ветви соответствуют изолятам семейств Beijing и LAM. Средняя ветвь содержит изоляты семейств Ural и S, а также изоляты, имеющие уникальный для данной выборки генетический профиль, которые мы не смогли отнести ни к одному известному семейству; здесь и в дальнейшем данная группа обозначена как «other».

Семейство Beijing представлено в изучаемой выборке 32 изолятами (32,6 %). Из них 18 вошли в кластеры различного размера, 14 изолятов имели уникальный аллельный профиль, таким образом, внутри данной ветви процент кластеризации составил 56%.

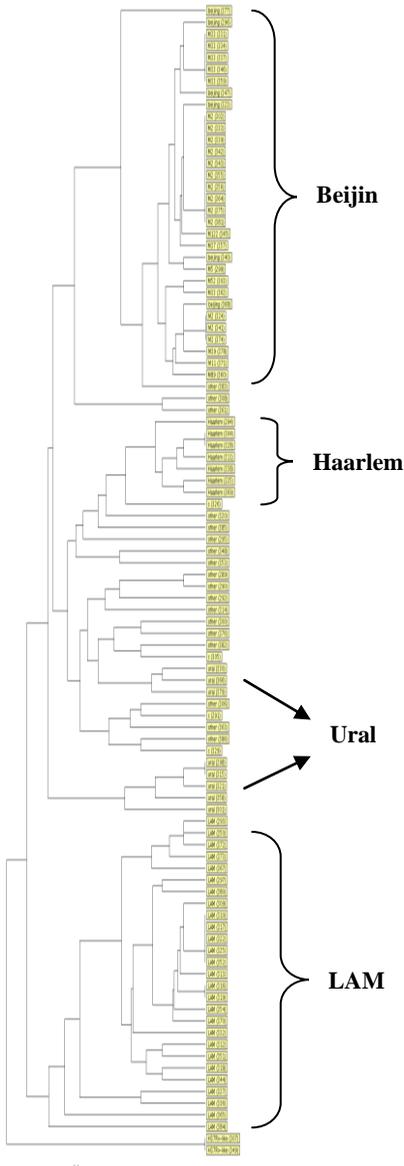


Рис. 1 Дендрограмма кластеризации 98 изолятов *M.tuberculosis*, выделенных от больных, проживающих в г. Харькове (Украина).

Типы изолятов семейства Beijing мы определяли согласно классификации, разработанной И. Мокроусовым. В результате, среди изолятов семейства Beijing наиболее часто встречались тип M2 - 13 изолятов (40%), и тип M33 - 6 изолятов (19%). Помимо типов M2 и M33, по одному изоляту встретилось: M122, M37, M5, M11, M89, M52, M39 типов. Известно, что изоляты M2 и M11 типов обладают повышенной относительной приспособленностью и ростом в макрофагальных клетках THP-1, высокой способностью индуцировать непротективный синтез цитокинов и некроз макрофагов. Шесть изолятов (19%) мы не смогли отнести ни к одному известному типу, согласно вышеуказанной классификации, и они были обозначены как «beijing».

Таким образом, показано, что представители данного семейства в значительной степени генетически гетерогенны, что вряд ли свидетельствует об их недавней трансмиссии и высокой эпидемиологической значимости для данного региона.

Большой кластер образовали представители семейства LAM - 27 изолята (27,5%). Стоит отметить большое количество уникальных генетических профилей у изолятов данного генотипа, лишь 7 изолятов из 27 вошли в кластеры по 5 и 2 изолятов каждый. Процент кластеризации внутри данной ветви составил 26%. Выявление таких больших кластеров с наличием многочисленных ветвей на дендрограмме кластеризации может свидетельствовать о том, что данные изоляты распространились и циркулируют на этой территории давно. Частота встречаемости штаммов *M.tuberculosis* семейства LAM в Харькове сравнима со многими регионами России, где она составляет от 10% до 19%. В исследованных выборках она варьировала от 11% до 16%. Кластер, образованный семейством Haarlem, состоял из 7 изолятов (7,2%), семейством Ural – 8 изолятов (8,2%), семейством S – 4 изолятов (4,1%), семейством «H37Rv – like» - 2 изолятов (2%). Остальные 18 изолятов (18,4%) мы не смогли отнести ни к одному известному ранее семейству, и они были обозначены как “other”.

Определение генетического разнообразия *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории г. Астана, Казахстан

В данной работе были использованы 46 ДНК изолятов *M. tuberculosis*. В выборку входили пациенты как женского (13 больных), так и мужского пола (33 больных), средний возраст которых составлял 40 лет. Преобладали больные с диагнозом инфильтративный туберкулез легких. Впервые выявленный туберкулез встретился у 14 больных (30%), вторично выявленный – у 32 (70%).

При MIRU-типировании 46 образцов ДНК *M. tuberculosis* было идентифицировано 22 генетических типа. По результатам типирования 28 изолятов входили в кластеры различного размера (с коэффициентом различия $< 0,1$), остальные 18 изолятов имели уникальный для данной выборки аллельный профиль и были обозначены как “other”. На основе результатов MIRU-типирования была построена дендрограмма кластеризации изолятов *M. tuberculosis* (рис.2). Индекс дискриминации Гюнтера – Хадсона (HGDI) данного метода составил 0,86, процент кластеризации - 61%. На данной дендрограмме видна одна большая ветвь, состоящая из изолятов *M. tuberculosis* семейства Beijing, и несколько мелких, которые включают в себя изоляты семейства LAM, Ural, S, а также уникальные по аллельному профилю изоляты. Кластер, содержащий изоляты генотипа Beijing, состоял из 29 изолятов (63%), и был гомогенным, процент кластеризации внутри семейства Beijing составил 95%. К типу M2 семейства Beijing принадлежало 22 изолята (76% от всех изолятов Beijing), 4 изолята (14%) принадлежало к M11 типу, 2 изолята (7%) – к M33 типу.

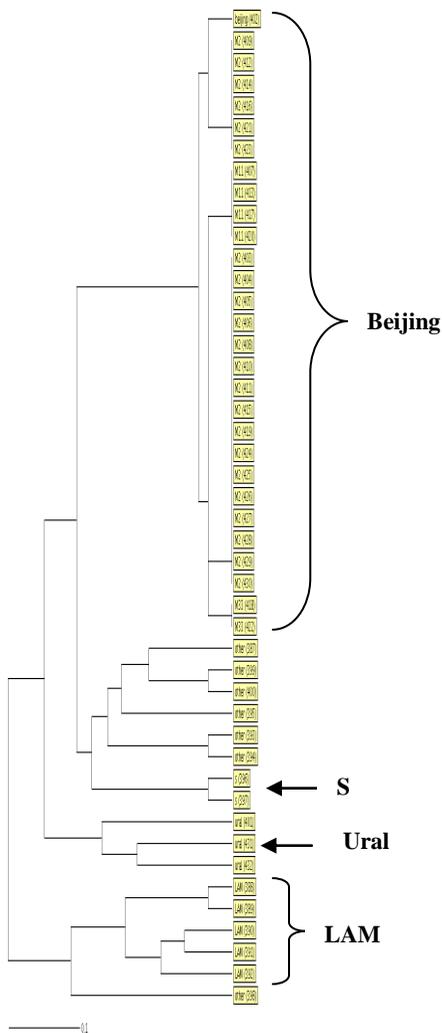


Рис. 2. Дендрограмма кластеризации 46 изолятов, выделенных от больных, проживающих в г. Астана (Казахстан).

Один изолят имел уникальный для данной выборки аллельный профиль, и мы не смогли отнести его к какому – либо известному типу семейства Beijing.

В целом, кластер, содержащий изоляты генотипа Beijing, был генетически гомогенным – 76% изолятов Beijing принадлежало к M2 типу, что, возможно, свидетельствует в пользу их недавней трансмиссии, и может говорить об активном эпидемическом процессе.

Полученные результаты совпадают с литературными данными: так, при генотипировании изолятов, циркулирующих в других областях Казахстана, 70,4% составляли изоляты, принадлежащие к семейству Beijing, причем их кластеризация составила 81%, что также подтверждает их высокую степень трансмиссивности. В западной части Китая частота встречаемости данного генотипа составляет 84,6%. Частота встречаемости изолятов типа M2 и M11 в выборке г. Астаны совокупно составила 56%. Это согласуется с литературными данными: в соседней с Казахстаном Киргизии изоляты типа M2 составили 50%, а M11 – 2%.

Совокупно тип M2 и тип M11 составляют около 88% всех изолятов семейства Beijing, циркулирующих на территории азиатской части РФ, и 77% — в европейской части РФ.

Пять изолятов (11%) принадлежали к семейству LAM. Данные изоляты имели уникальный для выборки генетический профиль. Три изолята (6%) принадлежало к семейству Ural, 2 изолята (4%) – к семейству S. Остальные 6 изолятов не вошли ни в один кластер, и имели уникальный для данной выборки генетический профиль; мы также не смогли отнести их ни к одному известному семейству, данные изоляты обозначены как «other».

Определение генетического разнообразия *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории г. Новосибирска, СФО, РФ

В работе было исследовано 106 образцов ДНК изолятов *M. tuberculosis*, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом легких. В сформированной выборке преобладали мужчины – 84 (79%) в возрасте 21 – 71 лет (средний возраст – 41 лет), наиболее частой формой был инфильтративный туберкулез легких.

При MIRU-типировании 106 образцов *M. tuberculosis* идентифицировано 69 генетических типов. 56 изолятов *M. tuberculosis* имели уникальный для данной выборки профиль, остальные 50 изолятов входили в состав кластеров различного размера, с коэффициентом различия от 0.04 и выше. Индекс дискриминации Гюнтера-Хадсона (HGDI) данного метода составил 0.98.

На основе MIRU-типирования была построена дендрограмма кластеризации изолятов *M.tuberculosis*, полученных от больных туберкулезом легких г. Новосибирска (рис. 3).

На дендрограмме имеется одна крупная ветвь и несколько мелких, с коэффициентом различия от 0,04 до 0,36. Процент кластеризации составил 47%. Семейство Beijing представлено в данной выборке 45 изолятами (42%). Изоляты типа M2 составили 33% (15 изолятов) из общего числа изолятов семейства Beijing. Девять изолятов (20%) принадлежало к типу M11, 6 изолятов (13%) – к типу M5, 4 (9%) – к типу M33, 3 (7%) – к типу M37, 2 изолята (4%) принадлежало к типу M89, и столько же - к типу M87; 4 изолята мы не смогли отнести ни к одному известному типу изолятов семейства Beijing.

Изоляты семейства LAM составили 16% от всей выборки (17 изолятов), 5 изолятов входили в кластеры небольшого размера (по 2 и 3 изолята в каждом), остальные имели уникальный профиль.

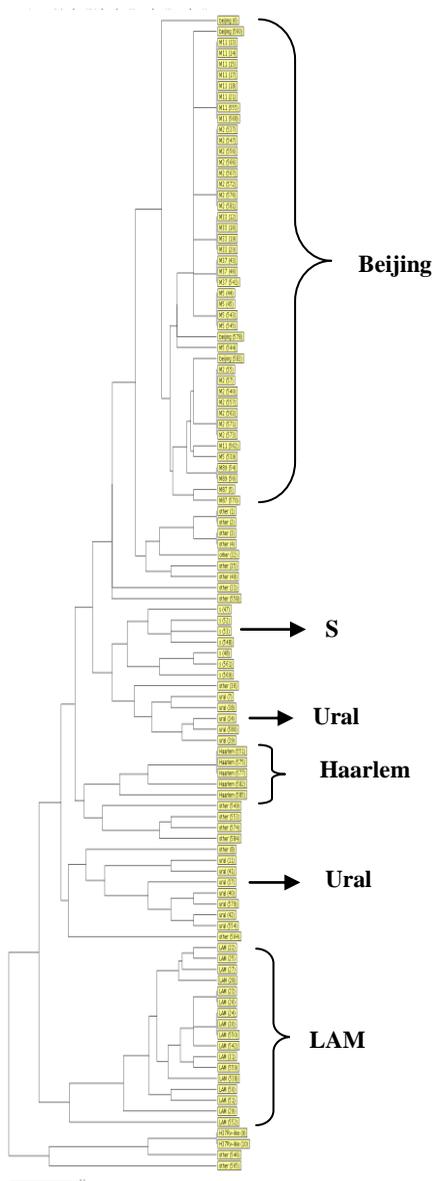


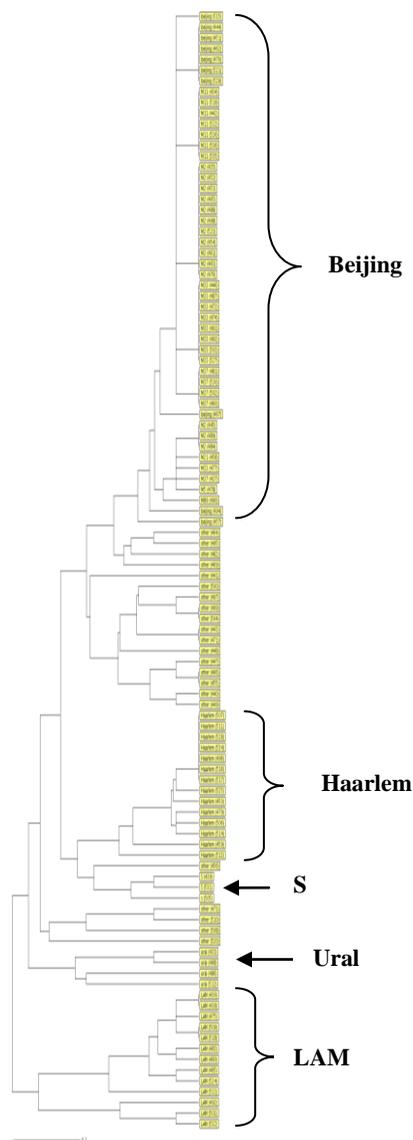
Рис. 3. Дендрограмма кластеризации 106 изолятов, выделенных от больных, проживающих в г. Новосибирске (РФ).

Семейство Haarlem в данной выборке было представлено 5 изолятами (6%), 3 из которых кластеризовались, остальные два имели уникальный аллельный профиль. Помимо этого нам встретились 12 изолятов (12%) семейства Ural, 7 изолятов (7%) - семейства S. Два изолята имели VNTR – профиль, схожий с H37Rv, в связи с этим мы обозначили их как «H37Rv-like» семейство (<http://miru-vnrplus.org/MIRU/index.faces>). Восемнадцать изолятов мы отнесли к группе «other».

Изоляты *M. tuberculosis* из выборки г. Новосибирска были выделены от больных с первичным туберкулезом легких, при этом, как было уже сказано выше, семейство Beijing составило 42%. Отдельная работа сделана в 2008 году по типированию изолятов *M. tuberculosis*, выделенных от больных с тяжелыми формами туберкулеза, проживающих на территории г. Новосибирска.

Сравнительный анализ двух выборок из г. Новосибирска (выборки больных с тяжелыми формами туберкулеза и популяционной выборки) показал статистически значимые отличия в частоте встречаемости изолятов семейства Beijing (84% vs 42%, OR 7.1, 95%CI [2,93-17,53], P < 0,0001), что подтверждает данные о повышенной вирулентности данного семейства микобактерий.

Определение генетического разнообразия *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории г. Владивостока (ДФО, РФ)



В работе были использованы 104 образца ДНК изолятов *M. tuberculosis*. В выборку входили пациенты как женского (17 больных), так и мужского пола (87 больных), средний возраст которых составлял 41 год. Преобладали больные с диагнозом фиброзно-кавернозный туберкулез. Впервые выявленный туберкулез составил 76 случаев (73%), вторично выявленный туберкулез – 28 (27%).

При MIRU-типировании данных изолятов было идентифицировано 60 генетических профилей. В кластеры различного размера вошли 56 изолятов, остальные имели уникальный для данной выборки аллельный профиль (рис.4). Процент кластеризации, таким образом, составил 54%. HGDI был достаточно высоким и составил 0,97. К семейству Beijing принадлежало 48 (46%) изолятов.

Среди них наибольший процент составили изоляты типа M2 – 14 изолятов (29%). Помимо этого встретились 9 изолятов (19%) типа M33, 7 изолятов (14%) – типа M11, 5 изолятов (10%) – типа M37, 1 изолят (2%) – типа M5, и один изолят (2%) – типа M89. Уникальный для данной выборки генетический профиль имели 10 изолятов (21%), и мы не смогли отнести их ни к одному известному типу семейства Beijing. Процент кластеризации внутри данного кластера был достаточно высоким (81%).

Рис.4. Дендрограмма кластеризации 104 изолятов, выделенных от больных, проживающих в г. Владивостоке (ДФО, РФ).

К семейству Haarlem принадлежало 14 изолятов (13%) из всей выборки, к семейству LAM – 13 изолятов (12,5%), к семейству Ural - 4 изолята (4%), 3 изолята (3%) - к семейству S. Мы не смогли отнести к каким бы то ни было известным семействам 22 изолята (21%), они были обозначены как «other».

Таким образом, особенностью изолятов семейства Beijing из выборки г. Владивостока стало нахождение разнообразных его типов, не встречающихся в других исследуемых регионах, что может быть обусловлено большими миграционными потоками людей из Китая, откуда берет свое происхождение данное семейство. Предполагают, что изначально распространение изолятов Beijing имело место в Китае более 2000 лет назад. Проникновение штаммов Beijing в Россию могло быть связано с евразийской экспансией монгольской империи Чингисхана в 13-15 веках, долгим и тесным взаимодействием Руси и Орды.

Сравнительный анализ распределения генетических профилей в исследуемых выборках

В результате MIRU-типирования по 15 MIRU-локусам 354 ДНК изолятов *M.tuberculosis* были получены 183 генетических профиля. Двести изолятов *M.tuberculosis* вошли в кластеры различного размера, 154 изолята имели уникальный для данной выборки профиль. Индекс дискриминации Гюнтера-Хадсона (HGDI) составил 0,97. Согласно принятой номенклатуре 286 изолятов *M.tuberculosis* были отнесены к различным семействам, 68 изолятов, которые мы не смогли определить в уже известные семейства были обозначены как «other». В таблице 1 приведены результаты MIRU-типирования с помощью 15-полиморфных локусов.

Таблица 1. Частоты встречаемости различных генотипов в исследуемых регионах.

Регион	Beijing	Other	LAM	Ural	Haarlem	S	H37Rv-like	Vcero
Астана	29 63%	7 15,20%	5 10,90%	3 6,50%	0	2 4,30%	0	46
Владивосток	48 46,20%	22 21,20%	13 12,50%	4 3,80%	14 13,50%	3 2,90%	0	104
Новосибирск	45 42,50%	18 17%	17 16%	12 11,30%	5 4,70%	7 6,60%	2 1,90%	106
Харьков	32 32,70%	18 18,40%	27 27,60%	8 8,20%	7 7,10%	4 4,10%	2 2%	98
Всего	154 43,50%	65 18,40%	62 17,50%	27 7,60%	26 7,30%	16 4,50%	4 1,10%	354

Наиболее часто встречаемыми были изоляты семейства Beijing, LAM и изоляты, не вошедшие в какое-либо определенное семейство, обозначенные как «other». Изоляты семейства Ural и Haarlem имели примерно одинаковую частоту встречаемости – 7,63% и 7,34%, соответственно. За ними по частоте встречаемости следовало семейство S (4,52 %), и H37Rv-like (1,1%).

Изоляты семейства Beijing имеют огромную эпидемиологическую значимость на территории, как Российской Федерации, так и бывшего СНГ. Среди 154 изолятов семейства Beijing наиболее распространенными являлись типы M2 (64 изолята, 41%). Изолятов типа M11 и M33 было равное количество в суммарной выборке - по 21 изоляту (17%). Большой процент составили изоляты, относящиеся к семейству Beijing, которые мы не смогли отнести ни к одному изветному типу согласно данной классификации– 23 изолята (15%). Они были обозначены как «beijing».

Нами был проведен сравнительный анализ распределения генетических профилей на исследуемых территориях. Было показано, что статистически достоверно отличается от совокупной выборки распределение генотипов в выборке из г. Владивостока ($\chi^2=35,93$, $p<0,001$). Возможно, в г. Владивостоке нахождение других генотипов или уже известных, но с другими частотами обусловлено большими миграционными потоками со странами неблагоприятными по туберкулезу.

Изучение лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам

Следующим этапом нашей работы было изучение частоты встречаемости мажорных мутаций, ассоциированных с устойчивостью к основным противотуберкулезным препаратам (изониазиду и рифампицину).

С помощью метода абсолютных концентраций (МАК), выполненного в соответствующих медицинских учреждениях, были получены следующие результаты: монорезистентный туберкулез наблюдался у 8% (29 больных), полирезистентный – у 11,5% (41 больного). Изоляты с устойчивостью к изониазиду в данной выборке составили 55,6% (197), к рифампицину - 34% (122), стрептомицину – 55,3% (196), этамбутолу – 28,2% (100), канамицину – 20% (72). У 5% (17 изолятов) не было приведено данных по устойчивости к стрептомицину и этамбутолу. У 28,5% (101 изолят) не была приведена устойчивость к канамицину. 22,5% (80 изолятов) были чувствительными ко всем препаратам. Изоляты *M. tuberculosis*, имеющие множественную лекарственную устойчивость (МЛУ), т.е. устойчивость к изониазиду и рифампицину, составили 31,3%, 111 изолятов.

Далее все образцы ДНК изолятов *M. tuberculosis* были протестированы на наличие мутаций, определяющих устойчивость к изониазиду и рифампицину. Выбор генетических мишеней, а именно мутаций Ser315Thr в гене *katG* и Ser531Leu в гене *rpoB*, был обусловлен наибольшей частотой встречаемости данных мутаций среди изолятов *M. tuberculosis*, устойчивых к изониазиду и рифампицину, соответственно, циркулирующих на территории Российской Федерации.

По результатам типирования был построен график типа «форест-плот», где обозначены частоты встречаемости данной мутации и доверительные интервалы (рис.5). При этом тест на гетерогенность показал отсутствие статистически значимых отличий в частотах встречаемости исследуемой мутации в изучаемых регионах ($\chi^2 = 2.71$, p -value 0.43).

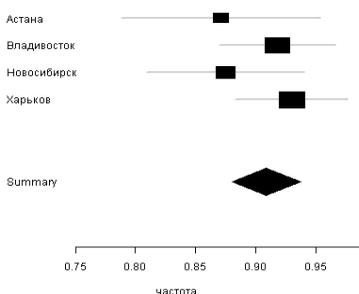


Рис. 5. График типа «форест-плот» частот встречаемости мутации Ser315Thr в гене *katG*, в исследуемых выборках.

Наибольшая частота встречаемости данной мутации среди изониазид-устойчивых изолятов наблюдалась в Харькове, где она составила 93%; наименьшая – в г. Астана (87,1%). Помимо этого мы не обнаружили мутации в 315 кодоне гена *katG* у 9,6% процента изолятов совокупной выборке, определенных с помощью фенотипического теста, как устойчивые к изониазиду. Данный процент не превышал 12,9% (по выборке из г. Астаны). Часть изолятов, определенных с помощью фенотипического теста как чувствительные, также несли нуклеотидную замену в 315 кодоне. Например, во Владивостоке эта частота достигала 18,6%. Так как нахождение мутации Ser315Thr в гене *katG* генома микобактерии облигатно определяет ее устойчивость к изониазиду, то, скорее всего, в данном случае мы имеем дело с ложноотрицательными случаями при проведении МАК. Мы не нашли достоверно значимых отличий в частотах встречаемости данной мутации у ИНH- устойчивых и у ИНH-чувствительных изолятов в исследуемых регионах при сравнении друг с другом. В совокупной выборке, состоящей из 354 изолятов

M. tuberculosis, было показано, что среди 197 INH- устойчивых изолятов 178 изолятов (90,4%) имело нуклетидную замену в данном кодоне. Среди 157 INH – чувствительных изолятов - 18 изолятов (11,5%) также имели мутацию в 315 кодоне гена *katG*.

Исследование частоты встречаемости мутаций в «коровом» регионе гена *groV*, кодирующего β -субъединицу ДНК-зависимой РНК-полимеразы, проводилось с помощью ПЦР-ПДРФ-анализа и секвенирования. Известно, что мутации в «коровом регионе» гена *groV* ассоциированы с возникновением устойчивости к рифампицину. По литературным данным, наиболее часто встречается мутация в 531 кодоне гена *groV* ($\approx 50\%$).

По результатам типирования был также построен график типа «форест-плот» (рис.6); максимальная частота встречаемости мутации в 531 кодоне гена *groV* среди RIF- устойчивых изолятов наблюдалась в выборке г. Владивостока и составила 87,0%.

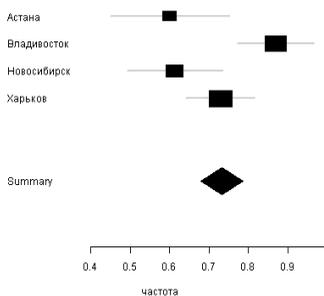


Рис. 6. График типа «форест-плот» частот встречаемости мутации Ser531Leu в гене *groV*, в исследуемых выборках.

При этом тест на гетерогенность показал, что полученные частоты встречаемости данной замены у RIF – устойчивых изолятов статистически достоверно отличались в изучаемых выборках ($\chi^2 = 14,35$, $p = 0,0025$).

Далее образцы, фенотипически устойчивые к рифампицину, но не имеющие мутации в 531 кодоне гена *groV*, были исследованы на предмет наличия других мутаций в «коровом регионе» гена *groV*. Данные мутации также ассоциированы с возникновением устойчивости к рифампицину, однако частота их возникновения меньше, чем в 531-м кодоне. Это связано с пониженной относительной приспособленностью изолятов, несущих данные мутации в гене *groV*, по сравнению с аллелем «дикого типа». В результате секвенирования «корового региона» гена *groV* были выявлены следующие нуклеотидные замены (табл. 2):

Таблица 2. Частота встречаемости мутаций в «коровом регионе» гена *rpoB*.

город	AGC509ACC	CTG511CCG	CTG511CCG	ATG515ATA	GAC516GTC	CAC526CTC	CAC526TAC	CAC526AAC	526 CACCTT	TTG531TCG	CTG533CCG
Астана	0	0	1 5%	1 5%	1 5%	2 10%	2 10%	0	0	12 60%	0
Владивосток	0	0	0	0	0	1 4%	1 4%	0	0	20 87%	0
Новосибирск	0	0	0	0	2 6%	0	1 3%	1 3%	0	19 61.3%	1 3%
Харьков	1 2%	1 2%	0	0	4 8%	1 2%	4 8%	0	1 2%	35 72.5%	2 4%
Всего	1 0.8%	1 0.8%	1 0.8%	1 0.8%	7 6%	4 3%	7 6%	1 0.8%	1 0.8%	86 70.5%	3 2%

Нами была подсчитана средняя частота встречаемости конкретной мутации относительно всех 122 RIF-устойчивых изолятов (последняя строка таблицы 2). В образцах из г. Харькова, устойчивых к рифампицину, наблюдалось наибольшее разнообразие различных нуклеотидных замен в «коровом» регионе, что может быть обусловлено гетерогенностью изолятов *M.tuberculosis* в этой выборке, уровень кластеризации которых составил всего 31%.

Поиск ассоциаций между принадлежностью к определенному семейству и наличием нуклеотидной замены (TCG->TTG) в 531 кодоне гена *rpoB*

С помощью статистического анализа нами была найдена ассоциация между принадлежностью к семейству Beijing и наличием мутации в 531 кодоне гена *rpoB* у изолятов, принадлежащих к выборкам из г. Новосибирска ($\chi^2=14,225$, $p < 0,001$) и г. Харькова ($\chi^2=4,224$, $p= 0,04$) (табл.3). В остальных выборках и в отношении других семейств такой взаимосвязи выявлено не было.

Таблица 3. Ассоциация между принадлежностью к определенному семейству и наличием нуклеотидной замены в 531 кодоне гена *groB* у RIF –устойчивых изолятов

Семейства	г. Харьков	г. Астана	г. Новосибирск	г. Владивосток	Всего
Beijing	$\chi^2=4,22$, p= 0,04	$\chi^2=1,49$, p= 0,22	$\chi^2=14,22$, p< 0,001	$\chi^2=0,11$, p= 0,73	$\chi^2=5,13$, p= 0,02
LAM	$\chi^2=2,51$, p= 0,11	$\chi^2=2,21$, p= 0,14	$\chi^2=2,23$, p= 0,13	$\chi^2=0,07$, p= 0,78	$\chi^2=0,94$, p= 0,33
Haarlem	$\chi^2=1,51$, p= 0,22	-	$\chi^2=1,22$, p= 0,27	$\chi^2=0,01$, p= 0,90	$\chi^2=0,23$, p= 0,63
S	$\chi^2=2,32$, p= 0,13	$\chi^2=0,82$, p= 0,36	$\chi^2=0,10$, p= 0,75	$\chi^2=0,33$, p= 0,56	$\chi^2=0,02$, p= 0,88
Ural	$\chi^2=2,04$, p= 0,15	$\chi^2=0,04$, p= 0,84	$\chi^2=0,98$, p= 0,32	-	$\chi^2=2,72$, p= 0,09
other	$\chi^2=1,75$, p= 0,19	$\chi^2=0,00$, p= 0,98	$\chi^2=1,69$, p= 0,19	$\chi^2=0,70$, p= 0,40	$\chi^2=1,26$, p= 0,26

Это согласуется с литературными данными - показано наличие ассоциации между принадлежностью к семейству Beijing и наличием мутации в гене *groB* в 531 кодоне в выборках из Казахстана, из Украины, Южной Африки. Следует отметить, что были найдены противоположные результаты при исследовании выборок из Восточной Азии, а также в Латвии. Таким образом, нахождение ассоциаций между принадлежностью к данному семейству и наличием мутаций, вызывающих резистентность к ПТП, зависят от региона, где циркулируют данные изоляты.

Помимо мутаций в генах определяющих устойчивость у изолятов генотипа Beijing были найдены уникальные нуклеотидные замены в предполагаемых генах (*mutT* и *ogt*), вовлеченных в репарацию ДНК, что отчасти может объяснить ускоренную адаптацию к противотуберкулезным препаратам или к неблагоприятным условиям внутриклеточной среды. При анализе суммарной выборки нами была найдена ассоциация между принадлежностью к семейству Beijing и наличием мутации в 531 кодоне гена *groB* ($\chi^2=5,131$, p= 0,023) у RIF – устойчивых изолятов, что еще раз подтверждает описанные выше результаты. В отношении других семейств таковой ассоциации найдено не было.

Выявление ассоциаций между наличием множественной лекарственной устойчивости и принадлежностью к тому или иному семейству

Поиск ассоциаций между наличием МЛУ и принадлежностью к определенному семейству проводили с помощью критерия χ^2 и уровня значимости p , причем в каждом случае рассматривали одну из изучаемых выборок (табл. 4).

Таблица 4. Ассоциация между принадлежностью к определенным семействам и МЛУ.

Семейства	г. Харьков	г. Астана	г. Новосибирск	г. Владивосток	Всего
Beijing	$\chi^2=3,47$ $p= 0,06$	$\chi^2=0,40$ $p= 0,52$	$\chi^2=1,83$ $p= 0,18$	$\chi^2=1,44$ $p= 0,23$	$\chi^2=1,18$ $p= 0,27$
LAM	$\chi^2=4,66$ $p= 0,03$	$\chi^2=0,004$ $p= 0,95$	$\chi^2=0,01$ $p= 0,92$	$\chi^2=0,34$ $p= 0,56$	$\chi^2=5,19$ $p= 0,02$
Haarlem	$\chi^2=3,63$ $p= 0,06$	-	$\chi^2=1,70$ $p= 0,19$	$\chi^2=1,43$ $p= 0,23$	$\chi^2=1,91$ $p= 0,16$
S	-	$\chi^2=0,06$ $p= 0,79$	$\chi^2=0,42$ $p= 0,51$	$\chi^2=0,64$ $p= 0,42$	$\chi^2=2,76$ $p= 0,09$
Ural	$\chi^2=0,004$, $p= 0,95$	$\chi^2=0,08$ $p= 0,77$	$\chi^2=1,91$ $p= 0,17$	-	$\chi^2=1,13$ $p= 0,28$
other	-	$\chi^2=0,55$ $p= 0,46$	$\chi^2=3,96$ $p= 0,04$	$\chi^2=1,43$ $p= 0,23$	$\chi^2=0,49$ $p= 0,48$

Выявлена ассоциация между семейством LAM и наличием МЛУ среди изолятов, относящихся к выборке г. Харькова ($\chi^2=4,66$, $p= 0,03$). Однако, мы не нашли такой ассоциации у изолятов из других выборок. При анализе суммарной выборки мы также обнаружили наличие ассоциации ($\chi^2=5,19$, $p= 0,02$).

При анализе группы изолятов «other» найдены следующие особенности: была обнаружена ассоциация между принадлежностью к группе «other» и отсутствием МЛУ у изолятов из выборки г. Новосибирска ($\chi^2=3,96$, $p= 0,04$). Остальные группы и семейства мы не анализировали ввиду их малочисленности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе представлены результаты исследований, направленных на изучение генетического разнообразия изолятов *M.tuberculosis*, циркулирующих в странах бывшего СНГ. Во всех регионах выявлено доминирование изолятов семейства Beijing, характеризующихся повышенной трансмиссивностью и вирулентностью.

Показано, что метод MIRU-типирования, использованный в данной работе для определения принадлежности изолятов *M.tuberculosis* к генетическому семейству, обладает высокой дискриминационной способностью. В результате проведенных исследования еще раз подтверждена возможность применения MIRU- типирования для решения комплекса эпидемиологических и клинико-лабораторных задач.

Сопоставлен генетический профиль выделенных изолятов с профилем их антибиотикоустойчивости и наличием мутаций, определяющих возникновение резистентности к основным противотуберкулезным препаратам, изониазиду и рифампицину. Результаты собственных исследований и литературные данные свидетельствуют о перспективности использования испытанных молекулярно-генетических подходов мониторинга туберкулезной инфекции.

ВЫВОДЫ

1. Определено генетическое разнообразие клинических изолятов микобактерий туберкулеза, выделенных от больных, проживающих на территории стран СНГ:

- Показано, что особенностью распределения генотипов в выборке г. Харькова было значительное количество генетически гетерогенных изолятов семейства LAM, что может свидетельствовать о том, что данные изоляты распространились и циркулируют на этой территории достаточно давно.
- Выявлено доминирование семейства Beijing *M.tuberculosis* во всех исследуемых выборках, частота встречаемости которого варьировала от 33% до 63%. Наибольшее разнообразие его подтипов, не встречающихся в других исследуемых регионах, обнаружено в г. Владивостоке. Это может быть обусловлено миграционными потоками людей из Китая, откуда данное семейство берет свое происхождение.
- Обнаружено, что частота встречаемости изолятов семейства Beijing у больных с тяжелыми формами туберкулеза легких в г. Новосибирске статистически значимо отличается от таковой популяционной, полученной в данном исследовании (84% vs 42%, OR 7.1, 95%CI [2,93-17,53], $P < 0,0001$), что подтверждает данные о повышенной вирулентности данного семейства микобактерий.

- Показано преобладание генетически гомогенных изолятов семейства Beijing (63%) в г. Астана, что может говорить об активном эпидемическом процессе на данной территории. Наибольшую частоту встречаемости имел тип M2 (76%), также наиболее распространенный в РФ.

- Во всех выборках выявлены изоляты *M.tuberculosis* с уникальным генетическим профилем, которые не относятся ни к одному известному семейству (от 15% до 21%). Наибольшее количество таких изолятов обнаружено в г. Владивостоке.

2. В исследуемых выборках замены Ser315Thr в гене *katG* и Ser531Leu в гене *rpoB* являются мажорными мутациями, вызывающими устойчивость к изониазиду и рифампицину (87,1 - 93% и 60 - 87%, соответственно). В г. Харькове выявили наибольшее разнообразие вариантов мутаций в «коровом регионе» гена *rpoB*, что может быть обусловлено гетерогенностью изолятов *M.tuberculosis* в этой выборке, уровень кластеризации которых составил всего 31%.

3. Найдена ассоциация между принадлежностью к семейству Beijing и наличием мутации Ser531Leu гена *rpoB* у изолятов, в совокупной выборке ($\chi^2=5,13$, $p=0,02$).

4. С помощью сравнительного анализа профилей семейств микобактерий туберкулеза в исследуемых регионах показано, что только выборка г. Владивостока статистически значимо отличалась от всех других изучаемых регионов ($\chi^2=35,94$; $p<0,001$). Наличие ассоциаций между отдельными семействами, мутациями и наличием множественной лекарственной устойчивости варьировало между исследуемыми региональными выборками. В частности, ассоциация семейства LAM с множественной лекарственной устойчивостью была найдена только в выборке г. Харькова ($\chi^2=4,66$, $p=0,031$), ассоциация семейства Beijing с мутацией в 531 кодоне гена *rpoB* обнаружена у изолятов, принадлежащих к выборкам г. Новосибирска ($\chi^2=14,22$, $p<0,001$) и г. Харькова ($\chi^2=4,22$, $p=0,04$).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **Дымова М.А.**, Никонов С.Д., Акулинушкин А.И., Огиренко А.П., Филипенко М.Л., Преобладание *Mycobacterium tuberculosis* семейства Beijing у больных с тяжелыми формами туберкулеза // Вестник НГУ. -2008. -Т. 6. -С. 106-110.
2. **Дымова М.А.**, Филипенко М.Л. «Молекулярная эпидемиология туберкулеза». **Коллективная монография** «Роль микроорганизмов в функционировании живых систем: фундаментальные проблемы и биоинженерные приложения». Под редакцией: Власова В.В., Дегерменджи А.Г., Колчанова Н.А., Пармона В.Н., Репина В.Е. Издательство СО РАН. Новосибирск. -2010. -С. 247-259.
3. **Дымова М.А.**, Кушугулова А.Р., Рахимова С.Е., Раманкулов Е.М., Жусупова Р.Ж., Храпов Е.А., Филипенко М.Л. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов *m.tuberculosis* у больных туберкулезом легких г. Астана // Бюллетень СО РАМН. -2011. -Т. 31. -С.107-112.
4. **Дымова М.А.**, Ляшенко А.А., Потейко П.И., Кашуба Д.А., Стадникова А.В., Крутько В.С., Филипенко М.Л. Генетическое разнообразие штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Харьковской области в Украине // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. -2011. - №1. -С.19-23
5. **Дымова М.А.**, 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. -V. 11:77. – doi:10.1186/1471-2334-11-77
6. **Дымова М.А.**, Kinsht V.N., Cherednichenko A.G., Khrapov E.A., Svistelnik A.V., Filipenko M.L. Highest prevalence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype isolates in patients newly diagnosed for tuberculosis in the Novosibirsk oblast, Russian Federation // J Med Microbiol. -2011. –V.60. -P.1003-1009

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит ближайших коллег и друзей, персонально, к.б.н. Сукоян М.А., к.б.н. Воронину Е.Н., к.г.-м.н. Павлову М.А., оказавших помощь в подготовке данной работы и заведующего гр. Фармакогеномики, к.б.н. Филипенко М.Л. за научное руководство.