

На правах рукописи

ФИЛИПЕНКО МАКСИМ ЛЕОНИДОВИЧ

Молекулярно-генетическое типирование *Mycobacterium tuberculosis*,
выявление мутаций генома, вызывающих резистентность
к противотуберкулезным препаратам

1.5.3 – молекулярная биология

Диссертация
в виде научного доклада
на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный консультант: Власов Валентин Викторович, д.х.н., академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, научный руководитель ИХБФМ СО РАН

Официальные оппоненты:

Шемякин Игорь Георгиевич, д.б.н., проф., зам. директора по научной работе, ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболенск

Тикунова Нина Викторовна, д.б.н., заведующая лабораторией молекулярной микробиологии, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

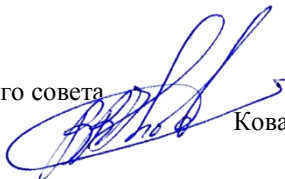
Лунин Владимир Глебович, д.б.н., заведующий лабораторией биологически активных наноструктур, ФГБУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, Москва

Защита состоится « » г. в __ часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ 03.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: Новосибирск 630090, пр-кт акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией в виде научного доклада можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Диссертация в виде научного доклада разослана « ____ »
_____ 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Уже в течение нескольких столетий туберкулез (ТБ) входит в число самых сложных для лечения и летальных инфекционных заболеваний. Всемирная Организация Здравоохранения сообщает о почти 10 миллионах заболевших туберкулезом и 1,5 миллионов умерших в 2021 году. Более семи тысяч человек умерли от этого инфекционного заболевания в 2020 году в РФ.

Туберкулез передается воздушно-капельным путем, следовательно, при возрастании числа больных активными формами туберкулеза с выделением бактерий в окружающую среду, риску заболевания подвергаются все группы населения. Таким образом, ключевым моментом снижения заболеваемости и смертности от туберкулеза является не только своевременный диагноз и адекватная терапия, но и обязательное выявление источника заражения для предупреждения дальнейшей трансмиссии инфекции.

Принципы молекулярной эпидемиологии, сформулированные несколько десятилетий назад, создали новый взгляд на динамику трансмиссии и способствовали изменению фокусов и обновлению практики контроля туберкулезной инфекции. Проведенное глубокое исследование генома микобактерий способствовало установлению новых связей между эпидемиологией, клиникой заболевания и генетическими вариациями, связанными с вирулентностью и трансмиссивностью. Молекулярно-эпидемиологические исследования вспышек туберкулеза с большим числом случаев заражения выявили, что больные заражены штаммами, имеющими идентичный генотип и классифицируются в эпидемиологически связанные кластеры, но только некоторые случаи такой трансмиссии могут быть подтверждены методами традиционной эпидемиологии.

На настоящий момент в арсенале исследователей и практиков находится несколько достаточно стандартизированных методов, позволяющих осуществить задачи и цели эпидемиологического исследования при туберкулезе, а именно:

- выявление путей передачи и источников заражения при исследовании локальных вспышек туберкулеза для пресечения распространения инфекции;
- контроль госпитальной инфекции, которая зачастую вызвана высоковирулентными полиантибиотикоустойчивыми штаммами; контроль лабораторной кроссконтаминации;
- установление правильного диагноза - реактивация существующего очага или реинфекция;

- выявление характерных конкретных генотипов штаммов микобактерий, ассоциированных с определенным географическим происхождением и циркулирующих на отдельных территориях;
- выявление главных путей перемещения эпидемически значимых штаммов микобактерий на большие дистанции; оценка глобальных путей передачи туберкулеза; идентификация штаммов с особыми свойствами высокой вирулентности и трансмиссивности.

Вышеупомянутые задачи являются в значительной степени популяционно специфичными и требуют проведения исследований на различных территориях, странах, этнических группах.

Другой очень важной и острой проблемой является возникновение и распространение лекарственно устойчивых микобактерий туберкулеза.

Частота встречаемости мутаций, определяющих резистентность микобактерий туберкулеза к тем или иным препаратам, в отдельно взятой популяции может в значительной степени влиять на выбор стратегии тестирования профиля резистентности изолятов и выбор схем лекарственного лечения пациентов. Использование молекулярной диагностики в определении устойчивости микобактерии туберкулеза может играть решающую роль в стратегии лечения, уменьшении стоимости этого лечения и, опосредованно, в уменьшении количества изолятов *M.tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью.

Сибирский регион РФ традиционно являлся одним из наиболее отягощенных туберкулезной инфекцией. В начале двухтысячных годов, когда начиналось настоящее исследование, заболеваемость и смертность от туберкулеза в Сибири составляли 160 и 25 на 100000 населения, соответственно. В тоже время, полностью отсутствовало изучение динамики трансмиссии туберкулеза и факторов лекарственной резистентности современными молекулярно-эпидемиологическими методами.

Таким образом, изучение клональной генетической структуры изолятов микобактерий, частоты и спектра мутаций, обуславливающих резистентность к лекарственным препаратам, в специфических популяциях и на определенных территориях играет ключевую роль, как в планировании противотуберкулезных мероприятий, так и в фундаментальном понимании эволюции этого опасного инфекционного агента.

Цель и задачи исследования. Основной целью настоящей работы было изучение генетических особенностей изолятов *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории бывшего Советского Союза, а также разработка новых подходов для клинической диагностики туберкулеза.

В ходе исследования решались следующие задачи:

1. Оценить эффективность VNTR-типирования на выборках изолятов *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории бывшего Советского

Союза, включая Западную Сибирь, изучить их клональную генетическую структуру.

2. Определить эффективность VNTR-типирования изолятов семейства Beijing в исследуемых выборках.
3. Охарактеризовать частоты и спектр мутаций, вызывающих лекарственную резистентность в изучаемых выборках изолятов, изучить их ассоциацию с выявленными генетическими семействами. Предложить новые подходы для выявления основных мутаций лекарственной устойчивости.
4. Разработать ключевые элементы диагностической платформы для изотермальной диагностики туберкулеза.

Научная новизна

В проведенном нами исследовании реализован комплексный подход к молекулярно-генетической характеристике изолятов *M.tuberculosis*. На момент начала этого исследования нами впервые были получены данные о клональной структуре изолятов *M.tuberculosis* в Западно-Сибирском регионе России, определен спектр и частоты мутаций, вызывающих резистентность к рифампицину. Впервые подробно охарактеризована коллекция изолятов *M.tuberculosis*, в том числе XDR-типа, циркулирующих на Новосибирской области. Разработан эффективный метод высокоразрешающего типирования изолятов семейства Beijing, получены данные о частотах встречаемости успешного российского клона B0/W148 в Западно-Сибирском регионе, что в дальнейшем позволило ряду других исследователей предложить теорию распространения этого клона в России и прилегающих странах. Нами был впервые изучен молекулярный профиль изолятов с XDR, циркулирующих на территории Западной Сибири, предложен ряд оригинальных методических подходов для выявления основных частотных мутаций, вызывающих лекарственную резистентность у микобактерий туберкулеза. Идентифицированы ассоциации принадлежности к определенному семейству/подсемейству *M.tuberculosis* с наличием таких мутаций.

Нами получены ключевые элементы платформы для клинической диагностики туберкулеза с помощью изотермальной амплификации нуклеиновых кислот. А именно – впервые клонированы и охарактеризованы два эффективных, устойчивых к контаминирующим веществам, характерным для клинических образцов, ферменты, обладающие цепь-вытесняющей активностью, обоснован выбор интеркалирующего красителя для детекции результатов амплификации. На основании анализа большого количества геномов изолятов *M.tuberculosis* предложены и охарактеризованы структуры олигонуклеотидных праймеров для real-time PCR и аллель-специфичной изотермальной петлевой амплификации (LAMP), предназначенные для более эффективной молекулярной диагностики туберкулеза.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные нами данные о клональной структуре изолятов *M.tuberculosis* в Западно-Сибирском регионе России уже были активно использованы для реконструкции эволюции и распространения различных генетических групп *M.tuberculosis* на территории России и Азии. Идентифицированные ассоциации генетических типов *M.tuberculosis* с наличием разных мутаций, вызывающих лекарственную резистентность у микобактерий туберкулеза, являются основой для более пристальных функциональных исследований, отбора изолятов для сравнительных полногеномных исследований. Нами показано, что VNTR-типирование может быть использовано для решения реальных клинических задач для улучшения/уточнения/смены протоколов лекарственной терапии и уточнения этиологии рецидива.

Предложенные нами подходы для выявления мутаций, вызывающих лекарственную резистентность, уже много лет используются для проведения научных исследований.

Наконец, разработанная платформа для клинической диагностики с помощью изотермальной амплификации нуклеиновых кислот имеет прямое практическое значение и уже сегодня находится в стадии коммерциализации.

Основные положения, выносимые на защиту

Клональная структура изолятов *M. tuberculosis* в Западно-Сибирском регионе, Казахстане и Украине носит неоднородный характер, отражающий особенности эпидемической экспансии различных генотипов *M. tuberculosis* со значительным преобладанием семейства Beijing. VNTR типирование в предложенном формате является мощным инструментом для дискриминации штаммов *M. tuberculosis* с различным уровнем генетического родства.

Полученные в результате исследования данные о типах и частотах мутаций лекарственной резистентности микобактерий легли в основу тест систем для их выявления в Российской Федерации в клинической практике и планирования структуры лекарственной терапии.

Разработанный метод скрининга мутаций лекарственной резистентности микобактерий с помощью анализа кривых плавления гетеродуплексов обладает приемлемой чувствительностью и специфичностью.

Полученные в результате данного исследования новые ДНК-полимеразы могут быть эффективно использованы в разработке диагностических систем, основанных на изотермальной амплификации нуклеиновых кислот.

Изотермальная амплификация является перспективным диагностическим направлением для выявления наличия ДНК микобактерий и функциональных мутаций их геномов.

Публикации и апробация работы

Основные результаты исследования отражены в 23 статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus и 7 журналах базы данных РИНЦ; получены 5 патентов на изобретение РФ. 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 конференциях: 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); Международная конференция «Фундаментальные науки - Биотехнологии и медицине» (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)

Личный вклад автора

Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии и руководстве на всех этапах исследования. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях. В большинстве совместных работ автору принадлежит ключевая роль по планированию и проведению экспериментов, обработке, оформлению и публикации результатов.

Автор выражает особую признательность сотрудникам клинических учреждений, участвующих в этом исследовании.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Генетическое типирование изолятов M.tuberculosis, циркулирующих на территории бывшего Советского Союза, включая Западную Сибирь.

Недавняя трансмиссия ТБ соответствует кластеризации изолятов (общий генотип по крайней мере с одним другим случаем), выделенных от пациентов в определенный интервал времени. Предполагается, что пациенты кластера принадлежат к цепочке недавней трансмиссии «успешного» генотипа или же обусловленной чисто бытовыми причинами.

Для количественной оценки дискриминирующей способности метода генотипирования использовали индекс Хантера-Гастона. Кластеризацию (CR, clustering rate) определяли как $(nc-c)/n$, где nc – общее количество кластеризованных штаммов, c – количество кластеров, n – общее количество штаммов. За кластер принимали филогенетическую группу, состоящую из двух или более идентичных по анализируемым VNTR локусам изолятов (Supply P. et al., 2006).

1.1 Молекулярно-генетические исследования изолятов микобактерий туберкулезного комплекса в Западно-Сибирском регионе, адаптация VNTR-типирования

С использованием метода амплификации варьирующих по числу tandemных повторов (VNTR) проведено типирование 24-х рифампицин-устойчивых изолятов микобактерий выделенных от пациентов, проживающих в Западно-Сибирском регионе (Филипенко с соавт., 2001) (Рис.1). Была обнаружена существенная вариабельность для локусов ETR A, C и E – 4, 3 и 4 аллеля, соответственно. Локусы B и D не давали полиморфизма внутри исследуемой выборки и, таким образом, их использование для VNTR типирования в сибирском регионе вряд ли оправданно из-за полного отсутствия информативности. Индекс Хантера-Гастона составил 0,72. Данное исследование было первым в РФ, в котором осуществили молекулярно-эпидемиологический анализ изолятов МТ из Западно-Сибирского региона РФ и в котором был применен метод VNTR-типирования.

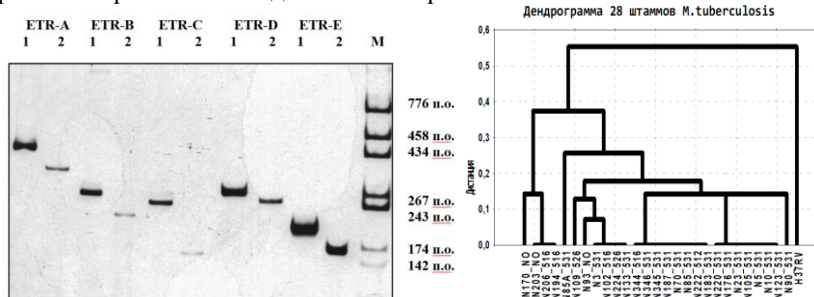


Рисунок 1. VNTR типирование 27-х рифампицин-устойчивых изолятов микобактерий выделенных от пациентов, проживающих в Западно-Сибирском регионе.

Существенным ограничением являлся малый размер выборки, что не позволяло сделать более детальную оценку эпидемиологической значимости полученных данных. Поэтому далее нами было проведено более масштабное исследование, бывшее пионерским на тот момент времени для Западно-Сибирского региона РФ.

В частности, на примере 101 случайно отобранного изолята микобактерий туберкулезного комплекса, выделенных от 84 больных туберкулезом в Сибирском регионе, мы продемонстрировали, что независимые методы генетического типирования *IS6110* RFLP и VNTR-типирование на основе пяти точных tandemных повторов ETR A, B, C, D, E дают сходные результаты и могут быть использованы для изучения клональной структуры популяции *Mycobacterium tuberculosis* в эпидемиологическом контексте Сибирского региона для выявления динамики трансмиссии туберкулезной инфекции (Норкина с соавт., 2003). Были выявлены наиболее распространенные генетические типы: штаммы семейства

Beijing, сполиготип S42 и VNTR-тип 32323, которые составили 52,3% выборки. Из числа изученных изолятов 28,5% были устойчивы к 4 используемым в медицинской практике противотуберкулезным средствам, 35,7% устойчивы к изониазиду и рифампицину, следовательно, по классификации ВОЗ, считаются полиантибиотикоустойчивыми (MDR). 33,3 % MDR штаммов составили штаммы VNTR типов 32425 и 42425 (сполиготип S1 или тип Beijing). Таким образом, семейство Beijing оказалось мажорным в Сибирском регионе 2001-2002 года.

Семейство Beijing является широко представленной клональной линией микобактерий туберкулеза, которая часто вызывает эпидемические вспышки. Это семейство генетически однородно и консервативно, поэтому типирование должно иметь достаточно высокое разрешение (наличие многих полиморфных маркеров). Мы предположили, что VNTR-типирование при использовании большого количества переменных геномных локусов может быть полезно для изучения клональной структуры этого семейства. Для этого проводили VNTR типирование на наборе из 99 клинических изолятов микобактерий туберкулеза и референтных штаммов (Surikova et al., 2005; Сурикова с соавт., 2005). Эти изоляты были охарактеризованы и классифицированы на несколько семейств генотипов на основе трех локусов ETR (A, C, E) и восьми дополнительных локусов ранее описанных как QUB и MIRU. Девяносто девять штаммов были разделены на 74 типа VNTR, 51 изолят семейства Beijing, предварительно идентифицированный IS6110-RFLP-типированием – VNTR 30 типов (Рис.2). Локусы QUB 26 и QUB 18 оказались высоко полиморфными и более дискриминирующими, чем другие локусы (HGDI = 0,8). Статистически значимое увеличение числа тандемных повторов в локусах ETR-A, -E, QUB 26, QUB 18, QUB 11B, Mtub21 было выявлено в группе Beijing по сравнению с генетически дивергентными штаммами, не относящимися к Beijing. Предложенная схема типирования высоко эффективна в выборках *M.tuberculosis*, где наблюдается значительное преобладание изолятов семейства Beijing.

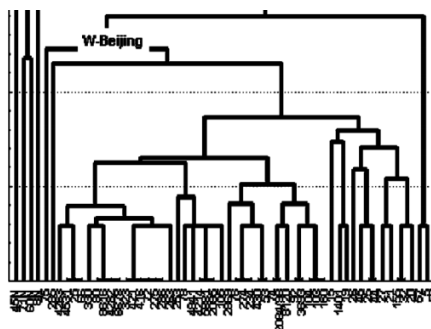


Рисунок 2. Дендрограмма 51-го изолята W-Beijing содержит 30 генотипов, включая 11 кластеров при совместном использовании для типирования локусов 11-VNTR (ETR-A, ETR-C, ETR-E, MIRU23, QUB 26, QUB 18, QUB 11B, Mtub29, Mtub39, MIRU 40 и Mtub21).

Далее нами было исследовано с помощью 15 MIRU-VNTR типирования 106 образцов ДНК изолятов *M.tuberculosis*, выделенных в 2007-2008 году в Новосибирске от впервые выявленных больных туберкулезом легких. Индекс дискриминации Гюнтера-Хадсона (HGDI) составил 0.98. На основе MIRU-типирования была построена дендрограмма кластеризации исследуемых изолятов (рис.3). 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), Haarlem 5 изолятов (6%). Помимо этого нам встретились 12 изолятов (12%) семейства Ural, 7 изолятов (7%) - семейства S. Была найдена ассоциация между принадлежностью к семейству Beijing и наличием мутации в 531 кодоне гена *rhoB* ($p < 0,001$).

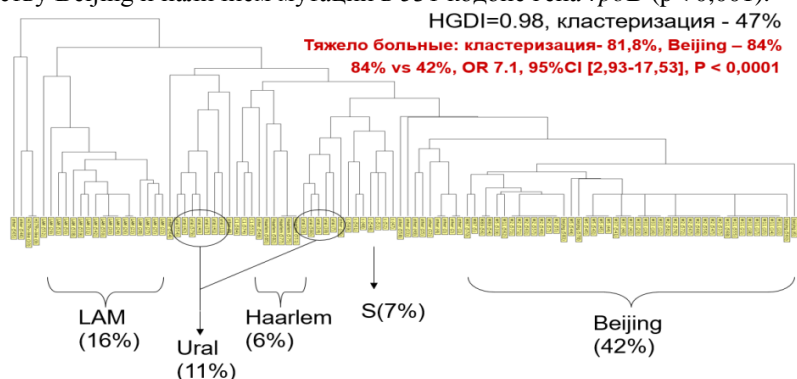


Рисунок 3. Результаты MIRU-типирования 106 изолятов *M.tuberculosis*, выделенных от первичных больных туберкулезом г. Новосибирска в 2007-2008 году.

Данные о частотах встречаемости клона M11 (B0/W148) в Западно-Сибирском регионе, полученные в данном исследовании, позволили ряду других ученых предложить теорию распространения этого клона в России и прилегающих странах.

1.2 Молекулярно-генетическое типирование изолятов *M.tuberculosis* из Украины и Казахстана

Нами было впервые проведено молекулярно-генетическое исследование методами VNTR- и RFLP-IS6110-типирования изолятов микобактерий туберкулеза, выделенных от 98 больных туберкулезом легких, проживающих на территории Харьковской области (Украина) (Dymova et al., 2011). Идентифицировано 75 различных генетических профилей. Среди впервые

выявленных больных наибольшее распространение имели штаммы семейства Beijing (31%) и LAM (14%). В группе вторично выявленных больных туберкулезом их встречаемость составила 39% и 29%, соответственно. Увеличение частоты встречаемости изолятов этих семейств при хроническом туберкулезе не было статистически значимо ($p=0.56$ и $p=0.15$, соответственно). Выявлено наличие ассоциации между принадлежностью к семейству LAM и множественной лекарственной устойчивостью изолятов ($R=0.27$, $p=0.0059$). Обращает на себя внимание большая распространенность штаммов этого семейства в г. Харькове – 23%. Кластер, выявленный при VNTR-типировании как LAM (сполиготип S42), при RFLP-типировании дал 6 различных вариантов рестрикционных профилей. Выявление таких больших кластеров с наличием многочисленных ветвей на дендрограмме кластеризации говорит о том, что данные штаммы распространились и циркулируют на этой территории давно. Частота встречаемости штаммов *M.tuberculosis* семейства LAM в Харькове сравнима со многими регионами России (19 %).

Показанная встречаемость изолятов семейства Beijing – 34 %, это ниже частоты встречаемости штаммов данного семейства в РФ (около 50%). Кроме того, представители данного семейства были в значительной степени генетически гетерогенны, что не свидетельствует об их недавней трансмиссии и высокой эпидемиологической значимости для данного региона на момент времени проведения исследования (2004 г). Обнаружено 7% изолятов семейства Harlem европейского происхождения. В европейских странах частота встречаемости этого семейства выше, например, в Скандинавии - 20%. Можно предположить следующую картину миграции разных семейств *M. tuberculosis*: генотип Beijing распространился на территорию Украины со стороны Восточной России, LAM – с Северо-Восточной России, Harlem – со стороны Европы. Кроме того, нами был выявлен значительный процент изолятов (45%), принадлежащих неидентифицированным пока семействам *M.tuberculosis* или имеющих индивидуальные некластризирующиеся генотипы.

При типировании изолятов *M.tuberculosis* из г.Нурсултан (Казахстан) 32 изолята (70%) принадлежали семейству Beijing. 22 изолятов семейства Beijing (68,8%) имели тип M2, наиболее распространенный в России, а вот тип M11 имели 12,5% изолятов, что может быть объяснено близостью РФ и прямым сообщением с Западной Сибирью, возможным местом происхождения данного типа. Например, в соседней с Казахстаном Киргизии штаммы типа M2 составили 50%, а M11 – только 2% (Mokrousov et al., 2009).

Таким образом, можно констатировать, что в соседних с нами странах также распространены *M.tuberculosis* семейства Beijing, при этом существует некая специфичность в распространении определенных типов микобактерий, вероятно обусловленных миграциями и транспортной доступностью близлежащих регионов.

1.3 Объединенное молекулярно-генетическое исследование 1454-х изолятов *M.tuberculosis*

С целью выявления ассоциации между принадлежностью к определенному генетическому семейству и наличием, либо отсутствием множественной лекарственной устойчивости нами было проведено объединенное молекулярно-генетическое исследование 1454-х изолятов *M. tuberculosis* методом VNTR-типирования (15 локусов), циркулирующих на различных территориях (132 изолята - Республика Тыва; 30 изолятов - о. Сахалин; 96 изолятов - г. Красноярск; 113 изолятов - г. Кемерово; 229 изолятов - г. Иркутск; 104 изолята - г. Владивосток; 106 изолятов - г. Новосибирск, 158 изолятов - г. Астана, а также публично доступные данные VNTR-профилей и лекарственной резистентности 323 изолятов *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории Перу, 115 изолятов *M.tuberculosis*, циркулирующих в г. Москва, и 48 изолятов *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории Киргизии) (Дымова с соавт., 2012). Наибольшая частота встречаемости (44%, 646 изолятов) наблюдалась у семейства Beijing *M.tuberculosis*, с меньшей частотой встречаемости выявлены: семейство LAM – 14,8% (216 изолят), семейство Haarlem – 7,7% (112 изолятов), семейство URAL- 4,3% (63 изолята), группа изолятов T16 – 2,4% (36 изолятов), группа изолятов T65 – 1,8% (27 изолятов), группа изолятов T15 – 1,6% (24 изолята).

Изоляты семейства Beijing из нашей выборки были идентифицированы до типов, согласно классификации, разработанной Мокроусовым И.В.. Наибольшую частоту встречаемости среди анализируемых изолятов семейства Beijing имели типы M2 – 34,9% (226 изолятов), далее по частоте встречаемости следовал тип M11 -17,6% (114 изолятов), тип M33 – 3,7% (24 изолятов), тип M5 – 2,9% (19 изолятов), тип M37 – 1,2% (9 изолятов), типы M42, M7, M87 – в равной доле по 1,1% (7 изолятов). Остальные известные типы встречались реже. Помимо этого в исследуемой выборке встретились изоляты, которые относились к семейству Beijing, но ранее не были описаны (31,4%, 203 изолята). Наиболее представительные их группы, согласно сквозной нумерации всей коллекции ДНК изолятов *M.tuberculosis*, были обозначены арабскими цифрами как №540 (8,5%, 55 изолятов), №548 (4,7%, 31 изолят) (рис.4).

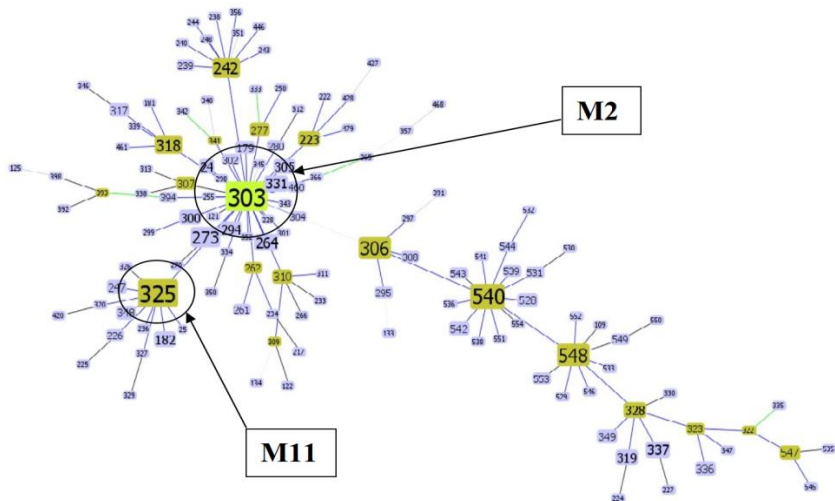


Рисунок 4. Минимальное охватывающее дерево по алгоритму eBurst с уровнем различий TLV (3 различия в генетическом профиле) 646 изолятов семейства Beijing *M.tuberculosis* на основе профилей VNTR с указанием основных типов MST в узлах дерева. Размер узла пропорционален количеству изолятов *M.tuberculosis*.

Найдена ассоциация между наличием МЛЮ и принадлежностью к типу М2 ($p=0.000$), типу М11 ($p=0.000$), группе MST типов №548 ($p= 0.003$) семейства Beijing *M.tuberculosis*. Для группы изолятов MST типа №540 найдена ассоциация между принадлежностью к данной группе и отсутствием МЛЮ ($p= 0.008$). Аналогичные результаты были получены для семейства Haarlem ($p= 0.000$), группы Т65 ($p= 0.001$), для семейства URAL ($p= 0.001$), и для группы Т16 ($p= 0.000$). Ранее нами было показано, что среди 44 клинических изолятов МТ, выделенных от больных с осложненным течением прогрессирующих форм деструктивного туберкулеза легких, подавляющее большинство случаев (84%) составили изоляты семества Beijing (37 из 44 изолятов) (Рот с соавт., 2008), что статистически значимо отличается от популяционной (ОШ 7,1, 95 % ДИ [2,93–17,53], $p < 0,0001$).

Ранее выявлено несколько доминирующих типов изолятов семейства Beijing, обладающих эпидемиологической значимостью на территории Российской Федерации. Наибольшей частотой встречаемости обладали пять типов – М2, М8, М11, М28, М33. Было выявлено, что тип М11 (более частое название Beijing B0/W148) является предковой линией, доминирует на территории Евразии, но отсутствует на территории Австралии и Южной Африки. Необходимо отметить, что изоляты типа М11 соответствуют вышеописанному типу B0 согласно RFLP-профилю. Другие типы преобладают в отдельных регионах, например, М12 - в Японии, М8 - в г. Ухане (Китай),

M33 - в Шанхае и Вьетнаме, хотя присутствуют и в других регионах. Тип M2 чаще встречается в России, при этом в России профили M11 и M2 составляют, соответственно, 17,7% и 70%, в Европе – 39,6% и 11,7%, в Японии - 15,7% и 0,8%, соответственно. 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. В данном исследовании нами также было выявлено доминирование этих двух типов, совокупно они составили 52,6% (340 изолятов). Известно, что изоляты этих типов обладают повышенной относительной приспособленностью и ростом в макрофагальных клетках ТНР-1, высокой способностью индуцировать синтез IL-10 и некроз макрофагов, что способствует повышенной трансмиссивности и вирулентности.

1.4 Молекулярно-генетическое типирование *Mycobacterium avium* с использованием VNTR

Молекулярно-генетическое типирование с помощью анализа VNTR было успешно применено нами для анализа *M.avium* с использованием описанных ранее четырех полиморфных локусов – VNTR 292, X3, 47, 7 (Ионина с соавт., 2015). Кластеризация выборки 22 изолятов *M.avium* по VNTR типам соотносилась с биохимическими различиями этих же микроорганизмов. Индекс Хантера-Гастона при использовании метода VNTR – типирования D=0.86, биохимических методов исследования D=0,67, что свидетельствует о большей диагностической эффективности метода VNTR – типирования для молекулярно-эпидемиологических целей.

1.5 Пример решения клинической задачи с использованием VNTR – типирования

VNTR-типирование было использовано для диагностики суперинфекции и микстинфекции *M.tuberculosis* с целью коррекции назначенного лечения. 37 серийных изолятов *M.tuberculosis* от больных с легочными формами, с изменением чувствительности к противотуберкулезным препаратам в процессе наблюдения и лечения, были подвергнуты VNTR-типированию по 6 локусам (Сурикова с соавт., 2005). Показано, что в 33,3% случаев суперинфекция и микстинфекция являются причиной изменения профиля устойчивости к противотуберкулезным препаратам. У 3 больных изменение профиля устойчивости сопровождалось заменой колонизирующего штамма на эпидемический клональный вариант Beijing. У 1 больного, напротив, наблюдали смену штамма семейства Beijing на штамм со сполиготипом S42. Один из промежуточных серийных изолятов от данного больного содержал смешанную культуру из 2 полиантибиотикоустойчивых штаммов *M. tuberculosis* (445476 + 222422). В одном случае смена инфицирующего штамма штаммами с измененными генотипами и профилями устойчивости к антибиотикам произошла 2 раза с интервалами 5-6 мес. Штамм с генотипом 343543 сменился на штамм с генотипом 452562 и затем на штамм с генотипом 445466, причем

окончательный вариант генотипа принадлежал к семейству Beijing. Серийные изоляты от 8 больных сохранили исходный генотип (Beijing). В данных случаях изменение спектра чувствительности к противотуберкулезным препаратам может быть связано с приобретением штаммами вторичной антибиотикоустойчивости в процессе лечения либо с погрешностями в лабораторной технике.

Можно констатировать, что VNTR-типирование является быстрой, удобной и эффективной техникой для систематического типирования изолятов *M.tuberculosis* в клинической практике с целью контроля лабораторной кроссконтаминации при смене тактики лечения.

Таким образом, суммируя вышесказанное, нами проведено первое масштабное молекулярно-эпидемиологическое исследование туберкулеза в Западно-Сибирском регионе России. Получены данные о генетической структуре изолятов *M.tuberculosis*, собранных в период с 2000 по 2010 годы. Показано, что одним из доминирующих семейств является семейство Beijing, в котором выделяются два часто кластиризирующих подсемейства M2 и M11. Они высоко статистически значимо ассоциированы с развитием лекарственной устойчивости.

В целом, встречаемость других основных генетических линий (Haarlem, LAM, Ural, S и уникальных изолятов) соответствует таковой в других регионах России, за исключением большей для Beijing M11. Несмотря на некоторую давность, наши данные являются отправной точкой дальнейшего прослеживания эволюции туберкулеза, путей и способов его распространения в РФ и современном мире. Полученные нами данные уже были использованы другими авторами для построения гипотез эволюции и экспансии отдельных генетических семейств *M.tuberculosis*.

Выполненное нами исследование показало высокую информативность VNTR-типирования, возможность быстрой разработки метода и адаптации к молекулярно-генетическим исследованиям других бактериальных инфекционных агентов.

2. Определение спектра и частоты встречаемости мутаций, вызывающих лекарственную резистентность *M.tuberculosis*

Одной из основных на сегодняшний день проблем, связанных с туберкулезом, является появление большого количества изолятов *M.tuberculosis*, устойчивых к одному или к нескольким противотуберкулезным препаратам, например, изолятов с множественной лекарственной устойчивостью, одновременной резистентностью к изониазиду и рифампицину. Ситуация усугубляется выявлением случаев туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью (XDR-extensively drug resistant), т.е. устойчивостью к изониазиду и рифампицину, фторхинолону, и по крайней

мере к одному из трех инъекционных препаратов второго ряда – канамицину, капреомицину, амикацину.

Микобактерия туберкулеза приобретает лекарственную устойчивость в основном за счет возникновения геномных мутаций, изменяющих структуру мишени или ферментов метаболизма лекарства или про-лекарства.

2.1 Базовые механизмы резистентности к рифампицину и изониазиду

В 2000 году нами были начаты пионерские в Западно-Сибирском регионе РФ работы по характеристике мутаций в генах *rpoB* (устойчивость к рифампицину) и в *katG* (устойчивость к изониазиду). В 2001 году нами было изучено 40 устойчивых к рифампицину клинических изолятов, выделенных от больных в Новосибирске. На тот момент это было первое исследование молекулярных основ резистентности к противотуберкулезным препаратам в Западно-Сибирском регионе РФ. Методом секвенирования обнаружено шесть ранее описанных в литературе аллелей. Частота мутаций в исследованных образцах несколько отличается от ранее сообщенных частот для других географических регионов: 21 штамм (52,5%) имел мутацию 531 Ser->Leu, 7 (17,5%) 516 Asp-Val и только 2 (5%) мутацию 516 His->Asp, превалирующую в ряде некоторых стран. Мы не выявили мутаций в первом кластере гена *rpoB* гена у пяти (12,5%) из 40 изолятов, устойчивых к рифампицину, что могло быть обусловлено как наличием других молекулярных детерминант резистентности, так и ошибками фенотипического определения резистентности к рифампицину.

Результаты дальнейших работ показали, что спектр мутаций в гене *rpoB* в целом существенно не отличается от уже описанного для ряда европейских стран (Норкина с соавт., 2003; Татьков с соавт., 2005; Сурикова с соавт., 2005). Для выявления наиболее распространенной и значимой мутации 531Ser->Leu в бета-субъединице РНК-полимеразы, вызывающей резистентность к рифампицину, нами был предложен простой метод на основе модифицированного ПДРФ-анализа с ферментом BstPAI (Dumova et al., 2011; Dumova et al., 2012).

Для изучения молекулярных механизмов устойчивости к изониазиду (INH) был проведен скрининг 96 изониазид-резистентного и 46 чувствительных изолятов *M.tuberculosis*, выделенных от пациентов Западно-Сибирского региона России (Воронина с соавт., 2004) на предмет наличия мутации 315AGC->ACC (Ser->Thr) гена *katG*, которая ассоциирована с возникновением резистентности к INH, с помощью ПДРФ и аллель-специфичной ПЦР (Mokrousov et al., 2002). Этот анализ показал высокую распространенность мутации 315 Ser->Thr в гене *katG* в Новосибирской и Кемеровской областях: в 94 % и 92 % случаев, соответственно. Шесть (6%) устойчивых к изониазиду изолятов *M.tuberculosis* не имели мутаций в 315 кодоне гена *katG*, что было подтверждено секвенированием. В дальнейшем

нами с помощью секвенирования было показано наличие в них двух мутаций - T15 и -A8 в промоторе гена *inhA*, а также одна мутация 335 Ile->Val *katG*.

Для быстрого скрининга мутаций в «коровом» регионе *rpoB*, кодирующей аминокислоты с 507 по 533 (кластер I), нами был предложен оригинальный простой метод (Филипенко с соавт., 2012; патент № 2485177). Он основан на пост-ПЦР анализе кривых плавления с высоким разрешением гетеродуплексов амплифицированных фрагментов ДНК (H-HRM), полученных в результате коампликации тестируемой ДНК и ДНК дикого типа (Рис.5). При анализе ДНК из рифампицин чувствительных и устойчивых изолятов, несущих тестируемую мутацию (3 и 14 изолятов, соответственно) метод показал 100%-ную чувствительность и специфичность. Суммарное время проведения анализа, начиная с биологического образца (бактериальные клетки или мокрота), не превышает 5.5 часов.

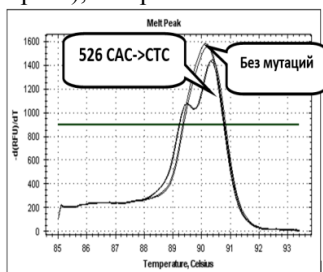


Рисунок 5. Выявление трансверсии 526 CAC->CTC в гене *rpoB* методом HRM с использованием коампликации тестируемой ДНК и ДНК дикого типа. На рисунке приведено графическое представление кривой плавления продуктов амплификации. По оси ординат отложены значения отрицательной производной интенсивности флуоресценции по температуре, по оси абсцисс – значения температуры в градусах.

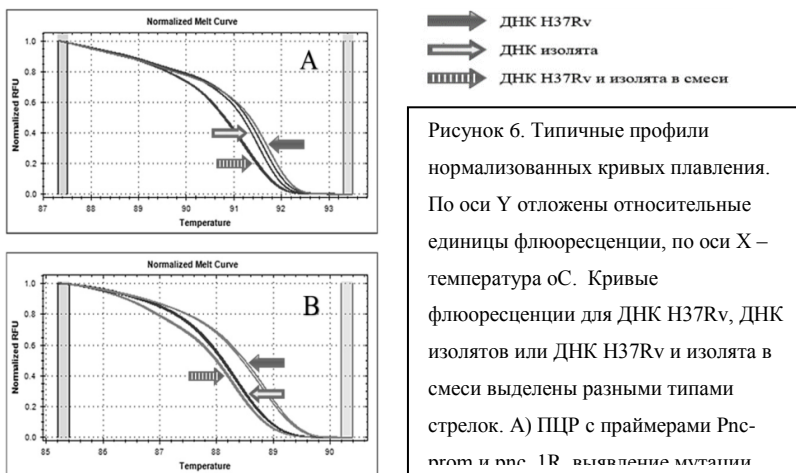
2.2 Молекулярные механизмы резистентности к пипразинамиду

С использованием секвенирования по Сенгеру для 41 пипразинамид-устойчивых (PZA-R) и 36 пипразинамид-чувствительных (PZA-S) клинических изолятов *M.tuberculosis*, выделенных от пациентов из 9-ти различных областей Казахстана, были охарактеризованы мутации в гене *pncA*, обуславливающие резистентность к пипразинамиду (Akhmetova et al., 2015). Мутации (большой частью уникальные) обнаружены у 38 изолятов - у 35-ти (85,3%) PZA-R и у 3 PZA-S. С помощью программ SIFT и PANTHER для 37 мутаций, найденных в гене *pncA* *in silico* предсказано негативное влияние на функцию белка пипразинамидазы ($p < 0.001$). Секвенирование гена *rpsA*, также потенциально влияющего на резистентность к пипразинамиду, не выявило значимых мутаций.

С использованием секвенирования по Сенгеру PZA-устойчивых (50) и PZA-чувствительных (50) клинических изолятов *M.tuberculosis*, выделенных от пациентов из Новосибирска, дополнительно было отобрано 45 изолятов PZA-R с мутациями с гене *pncA* и его промоторном участке, а также 49 PZA-S без мутаций.

Далее мы разработали и применили протоколы по сравнению эффективности выявления мутаций в гене *pncA*, ассоциированных с

устойчивостью *M.tuberculosis* к пиразинамиду, методом анализа кривых плавления продуктов амплификации 7-ми перекрывающихся пар праймеров с искусственным формированием гетеродуплексов (Н-HRM) за счет коампликации ДНК дикого типа и тестируемой ДНК, а также классического HRM анализа (Рис.6). С помощью HRM и Н-HRM была проанализирована ДНК 35 PZA-R изолятов, несущих мутации в гене *pncA*, 3 PZA-R изолята без мутаций в гене *pncA*, а также 20 PZA-S изолятов с геном *pncA* дикого типа. Чувствительность и специфичность HRM для выявления мутаций в гене *pncA* оказалась умеренной – 88,57% (ДИ 73,26%-96,80%) и 82,61% (ДИ 61,22%-95,05%), соответственно. Чувствительность Н-HRM теста составила 97,14% (ДИ 85,08%-99,93%) и специфичность 95,65% (ДИ 78,05%-99,89%), со значительным улучшением точности – 96,55% против 93,85% у HRM. В целом, несмотря на добавление дополнительной стадии уравнивания концентраций тестовой и контрольной микобактериальной ДНК, Н-HRM показал большую устойчивость и воспроизводимость при стандартных настройках математического обеспечения для обработки данных кривых плавления.



2.3 Определение профиля мутаций XDR изолятов *M.tuberculosis*

Было случайным образом выбрано двадцать девять изолятов с XDR *M.tuberculosis* от пациентов, проживающих в Новосибирске. Двадцать восемь изолятов принадлежали семейству Beijing, из которого 11 изолятов типа M11 (39%), два - типа M2 (7%) и один тип M33 (3%). Семнадцать изолятов (60,7%) из этого семейства демонстрировали уникальные генетические паттерны. Оставшиеся два изолята принадлежали к семейству LAM. Наблюдалась высокая конгруэнтность между двумя методами типирования (типирование

VNTR и делегитипирование), и области различий RD105, RD149, RD152, RD181 и RD207 отсутствовали в 28 изолятах семейства пекинских (Dymova et al., 2014).

Последовательности генов (*rpoB*, *katG*, *rrs*, *rpsL*, *tlyA*, *gidB*, *gyrA*, *gyrB*) были проанализированы для выявления мутаций, которые связаны с развитием устойчивости к рифампицину, изониазиду, амикацину, канамицину, капреомицину и офлоксацину. Наиболее распространенными мутациями среди изолятов XDR были S531L в *rpoB*, S315T в *katG*, различные мутации кодона 94 в *gyrA*, A90V в *gyrA*, K43R в *RpsL* и 1401 A → G в *rrs*; они лежат в основе устойчивости к рифампицину, изониазиду, офлоксацину, стрептомицину и канамицину/капреомицину, соответственно. Вышеупомянутые мутации в наименьшей степени снижают приспособленность (fitness) бактерий, что, по-видимому, может увеличивать вероятность их последовательного приобретения.

Мутации S531L *rpoB*, S315T *katG*, A90V *gyrA*, и 1401 A → G в *rrs* также преобладали (описывали более 75% резистентности) в выборке 288 изолятов Новосибирска, Кемерово, Томска и Красноярска, что позволяет предположить повышенный потенциал циркулирующих в Западно-Сибирском регионе микобактерий туберкулеза к развитию ШЛУ или даже ПЛУ.

Полученные нами данные о спектре и распространенности мутаций в геноме *M.tuberculosis*, связанных с развитием устойчивости к основному противотуберкулезным препаратом, были в дальнейшем использованы для разработки отечественных тест-систем для их клинического выявления.

3. Разработка эффективных методов диагностики туберкулеза с помощью выявления ДНК *M.tuberculosis*

3.1 Выделение нуклеиновых кислот из клинических образцов для диагностики туберкулеза

В 2005 году нами было проведено сравнение нескольких широко используемых методов выделения ДНК микобактерий туберкулеза из клинических образцов для дальнейшего использования в ПЦР. Мы использовали коммерческие наборы "ДНК-экспресс" (Литех, Россия) и "ДНК-сорб-В" (Амплисенс, Россия), классическую экстракцию фенол-хлороформом с дальнейшим спиртовым осаждением нуклеиновых кислот, быстрый щелочной лизис и сорбцию ДНК на силикогеле (Киншт с соавт., 2005). Все методы сравнивались по количеству выделенной ДНК и стабильности дальнейшего хранения препарата ДНК, а также по стоимости экстракции. "ДНК-экспресс" оказался наиболее эффективным при извлечении ДНК микобактерий туберкулеза, при этом его стоимость была наименьшей.

Гомогенное выделение ДНК с использованием 2-метокси этанол (метил целлозольва) (а именно этот вариант реализован в наборе «ДНК-экспресс») было впервые описано в (Inhorn et al., 2001) и в патенте US6939672B2 для выделения ДНК из уrogenитальных мазков. 2-метокси этанол является

эффективным растворителем. Он растворяет многие масла, смолы и парафины, и в то же время он растворяется в воде. По-видимому, именно с этим его свойством связана высокая эффективность выделения нуклеиновых кислот из микобактерий, обладающих толстой и весьма устойчивой к внешним факторам клеточной стенкой, состоящей из разных типов липидов.

В 2019 году нами было инициировано исследование возможности использования мазков буккального эпителия для выявления микобактериальной ДНК у бактериовыделителей, который значительно проще собрать по сравнению с получением мокроты или БАЛ. Чувствительность выявления ДНК *M.tuberculosis* в 49 образцах буккального эпителия пациентов с положительным бактериальным посевом составила: 71% для образцов ДНК, выделенных с помощью лизиса бактериальных клеток гуанидин изотиоцианатом и последующей сорбции ДНК на силикогеле с последующим выявлением микобактериальной ДНК посредством ПЦР в режиме реального времени, 76% для образцов ДНК выделенных с помощью модифицированного нами гомогенного экспресс метода с использованием 2-метокси этанола с последующим выявлением микобактериальной ДНК посредством ПЦР в режиме реального времени, 84% - с помощью экспресс метода и изотермальной амплификации микобактериальной ДНК. При анализе образцов буккального эпителия 61 здоровых контролей не было выявлено положительных образцов как при использовании экспресс метода выделения ДНК и выделения ДНК на силикогеле, так и при применении ПЦР в режиме реального времени или изотермальной амплификации. Таким образом, специфичность анализа всеми выше перечисленными методами составила 100%. Время пробоподготовки при использовании модифицированного гомогенного экспресс метода не превышает 15 мин, а сам протокол может быть реализован без использования дорогостоящего оборудования.

3.2 Создание универсальной платформы для диагностической изотермальной амплификации ДНК *M.tuberculosis* и других инфекционных агентов

Изотермическая амплификация ДНК (амплификация при постоянной температуре) является быстро развивающейся группой методов современной молекулярной диагностики. Предпосылкой для развития изотермической амплификации стала потребность в методах амплификации ДНК, позволяющих упростить приборную базу тестов, переход к диагностике в формате point-of-care, создание простых автоматических диагностических приборов. Наиболее важным элементом изотермальной амплификации являются применяемые ферменты, из которых наиболее значимы ДНК-полимеразы, обладающие цепь-вытесняющей активностью.

Мы провели клонирование, экспрессию и функциональную характеристику большого фрагмента (БФ) ДНК-полимеразы I *Geobacillus* sp. 777 (Oscorbin et al., 2015). Было установлено, что термостабильность, оптимальные концентрации ионов и рН БФ Gss-полимеразы не отличаются от

таковых для «классического фермента» БФ Vst-полимеразы, широко используемой для изотермальной амплификации. В тоже время БФ Gss-полимеразы более устойчив к ингибиторам амплификации (гепарину, этанолу, мочеvine и плазме крови человека), чем БФ Vst-полимеразы. Далее нами был получен набор химерных ферментов на основе БФ ДНК-полимеразы I *Geobacillus* sp. 777 и ДНК-связывающих белков (ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi* или Sto7d *Sulfolobus tokodaii*) (Рис.7), была проведена характеристика их биохимических свойств и оценена возможность использования для проведения диагностической изотермической петлевой амплификации (LAMP) (Oscorbin et al., 2017). Клонированные на основе БФ Gss-полимеразы химерные ферменты DBD-Gss, Sto-Gss, Gss-Sto с дополнительными ДНК-связывающими доменами (ДНК-связывающим доменом ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi* или Sto7d) показали более высокие процессивность и устойчивость к ингибиторам по сравнению с исходным ферментом (Рис.7).

Схема структур химерных ферментов

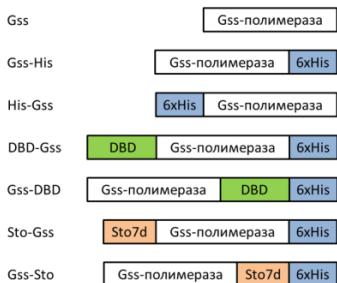
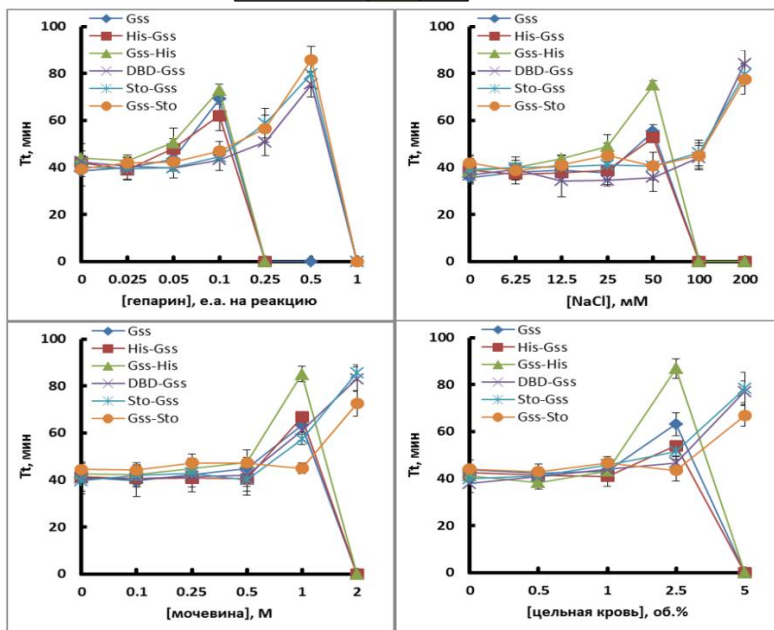


Рисунок 7. Устойчивость к ингибиторам оценивали по LAMP в реальном времени по матрице ДНК фага лямбда в их присутствии. На графиках



Так как в значительном числе диагностических тест-систем используются различные способы детекции результатов амплификации нуклеиновых кислот в режиме реального времени, нами был проведен скрининг интеркалирующих красителей, наиболее совместимых с проведением и мониторингом изотермальной петлевой амплификации (Oscorbin et al., 2016). Было установлено, что из шести красителей (SYTO-9, SYTO-13, SYTO-82, SYBR Green I, SYBR Gold, EvaGreen) оптимальными для проведения qLAMP являются SYTO-9 и SYTO-82, при этом последний показал большее отношение сигнала к шуму. Как SYTO-9, так и SYTO-82 позволяли обнаруживать с помощью qLAMP не менее 5 копий матрицы. Зависимость T_t от количества копий матрицы в реакции была линейной до 5 копий в случае

ДНК фага лямбда и 10^3 копий – для геномной ДНК *E.coli* и ДНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ). Надо отметить, что Syto82 возбуждается в связанном с ДНК состоянии при 540 нм и испускает при 560 нм, что отличается большей длиной волны, по сравнению с традиционными «зелеными» интеркалирующими красителями. Это может иметь значение при конструировании систем point-of-care с более бюджетными вариантами возбуждения флуоресценции.

3.3 Анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей *M.tuberculosis* как инструмент конструирования более эффективных диагностических систем

Нами проведено выявление наиболее консервативных и наиболее вариабельных участков в последовательностях специфичного для туберкулезного комплекса микобактерий инсерционного элемента *IS6110* с использованием 3609 геномов изолятов *M.tuberculosis*. Полноразмерная последовательность *IS6110* из референсного генома была найдена в 3231 (89,5%) геноме. Консервативными районами длиной не менее 20 нуклеотидов, для которых было найдено не более двух отличающихся последовательностей стали 44–71, 98–122, 179–205, 259–280, 358–381, 487–511, 673–692, 874–894 (относительно расположения *IS6110* в геномной сборке NC_000962.3: 889021–890375). Предсказанная на выборке полных геномов чувствительность *in silico* для двух разработанных наборов праймеров и зонда для количественной ПЦР (кПЦР) составила 99,1 и 98,4%, что значительно выше, чем предсказанная *in silico* для описанных в литературе (от 95,3 до 97,7%) (Рис.8). Для разработанной системы праймеров для проведения LAMP чувствительность была несколько ниже - 96,9% против 96,4% для праймеров из литературы.

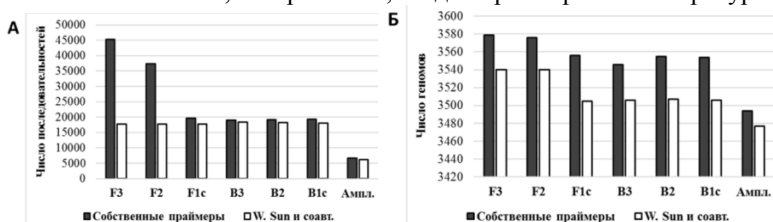


Рисунок 8. Сравнение разработанной системы праймеров для LAMP и праймеров из литературы по числу последовательностей *IS6110* (А) и числу геномов (Б), для которых предсказано *in silico*, что система их будет детектировать.

Для систем детекции на основе количественной ПЦР (кПЦР-1) предел обнаружения с вероятностью не менее 95% (LOD95%) составил 4 копии на реакцию, LOD90% на образцах искусственной мокроты - 200 клеток БЦЖ на мл. Для LAMP LOD95% был определен как 16 копий на реакцию, LOD90% на образцах искусственной мокроты составил 400 клеток БЦЖ на мл. При анализе ДНК из 46 культурально положительных и 41 отрицательного образца

мазок чувствительность КППР-1 составила 91,3%, LAMP - 86,9%, а специфичность - 100% для qКППР-1 и 97,6% для LAMP.

Разработанная система детекции на основе LAMP была переведена в колориметрический формат с визуальной детекцией результатов по окрашиванию пробирки после прохождения реакции. Полное время диагностического тестирования присутствия ДНК *M.tuberculosis* при анализе мазков буккального эпителия или языка пациентов составило 35-40 мин, что показывает значительный потенциал разработанного метода для внедрения в клиническую практику (Рис.9).



Рисунок 9. Минимальное оборудование (не включая пипетки и штатив) для анализа мазка буккального эпителия. Гомогенное выделение ДНК из буккального эпителия может осуществляться на том же термостате. Отделение коагулированного содержимого осуществляется в результате продавливания супернатанта через наконечник с фильтром. Термостат работает от питания 12 V, что может обеспечиваться аккумулятором. Позитивные образцы имеют зеленый цвет.

3.4 Разработка изотермального метода выявления мутаций, вызывающих лекарственную резистентность *M.tuberculosis*

В силу высокой важности быстрого выявления мутаций, определяющих резистентность МТ к лекарственным препаратам, мы оценили возможность применения двух схем методом LAMP (Рис.10) для выявления мутации TCG->TTG (S450L; S531L по старой номенклатуре) в гене *rpoB* *M.tuberculosis* (Филипенко с соавт., 2019).

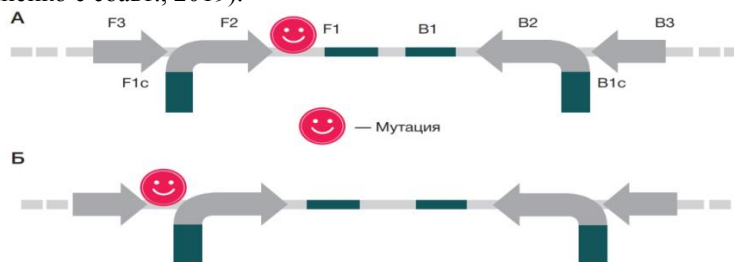


Рисунок 10. Схематичное изображение разных принципов аллель-специфичной изотермической петлевой амплификации (AS-LAMP): аллель-специфичный праймер FIP (А), аллель-специфичный праймер F3 (Б).

Нами показано, что применение схемы анализа с использованием аллель-специфичного праймера FIP по сравнению с F3 имеет лучшую разрешающую способность: разница между амплификацией мутации и аллеля дикого типа составила 22 ± 2.4 против 13 ± 4.1 мин. При использовании 100 геном-эквивалентов ДНК истинно положительный сигнал (амплификация *rpoB* гена с мутацией при использовании соответствующего аллель-специфического праймера) детектировался после $29,4 \pm 3.4$ мин. Положительный сигнал надежно визуализировался после добавления в реакцию SybrGreen I, как при освещении дневным светом, так и при использовании трансиллюминатора с УФ излучением (Рис.11).

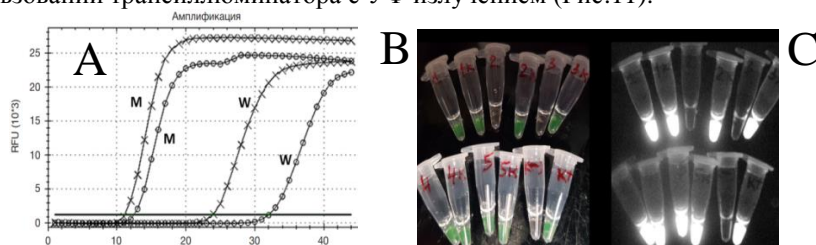


Рисунок 11. А) Кривые накопления флуоресценции продуктов AS-LAMP. Кривые, выделенные окружностями, соответствуют FIP-AS-LAMP, крестами - F3-AS-LAMP. По оси абсцисс минуты. В и С) Выявление мутации TCG->TTG (S450L) гена *rpoB* методом AS-LAMP с визуализацией продуктов амплификации добавлением интеркалирующего красителя SYBR Green I при естественном освещении (В) и UV-освещении 254 нм (С). Образцы 1, 4, 5 содержат мутацию, 2 и 3 — нет, их амплифицировали с праймером, специфичным для мутации, пробирки с «К» амплифицировали с праймером, специфичным для дикого типа.

С помощью разработанного метода была проанализирована выборка ДНК 20 RIFR изолятов *M.tuberculosis*, несущих мутацию S450L в гене *rpoB*, 10 RIFR изолятов, несущих другие мутации в гене *rpoB*, а также 18 RIFs изолятов без мутаций, наличие мутаций в которых было определено с помощью классического секвенирования по Сенгеру. Чувствительность и специфичность LAMP для выявления мутации S450L в гене *rpoB* составила 100%. Показано, что анализ может выполняться на грубых лизатах бактериальных клеток. При этом суммарное время проведения анализа, начиная с получения биологического образца, не превышает одного часа.

Разработанные нами методические подходы для выявления *M.tuberculosis*, а также структурных особенностей ее генома, ассоциированных с лекарственной резистентностью, обладают необходимыми характеристиками для дальнейшей разработки клинично-диагностических систем с целью

применения в клинической практике. В настоящий момент происходит коммерциализация ряда предложенных решений, описанных в данной работе.

Заключение

С прошлых веков и до настоящих дней туберкулез остается бичем общественного здравоохранения и одним из самых смертельных инфекционных заболеваний. Современные методы анализа генома микобактерий, в том числе и использованные в нашей работе, помогают лучше понять стратегию эволюции микобактерий туберкулеза, их взаимодействия с пациентом и специфичным лечением. В настоящей работе нами представлен пласт молекулярно-эпидемиологических данных в период с 2000 по 2010 годы. Несмотря на давность, эти данные абсолютно необходимы для прослеживания эволюции туберкулеза, путей и способов его распространения в современном мире. Разработка ключевых компонентов и их применения для изотермальной диагностики туберкулеза стали первыми исследованиями подобного рода в Российской Федерации, являются основой для дальнейшей разработки диагностических систем для других инфекционных агентов. Полагаем, что эта часть работы будет интенсивно развиваться, в первую очередь в сторону ее практического применения.

Настоящая работа представляет собой первое систематическое исследование, в результате которого охарактеризована как молекулярно-эпидемиологическая структура туберкулеза в Западно-Сибирском регионе, так и молекулярные механизмы резистентности к лекарственным препаратам, предложены методы выявления функциональных мутаций в геноме микобактерий.

Резюмируя, можно заключить, что результаты, полученные в настоящей работе, существенно расширяют наши знания и инструментарий борьбы с туберкулезом.

ВЫВОДЫ

- 1) Показано, что VNTR-типирование позволяет получить представление о клональной структуре изолятов микобактерий, циркулирующих на определенной территории, позволяет решать локальные клинические задачи, возникающие при лечении пациентов с туберкулезом.
- 2) На представительных выборках изолятов *M.tuberculosis*, собранных в период 2000-2010 г, показано, что наиболее представленным в Западно-

Сибирском регионе клональным семейством является семейство Beijing, доминируют генотипы M2 и M11, принадлежность к которым статистически значимо ассоциирована с возникновением мутаций, вызывающих лекарственную резистентность, но не снижающих приспособленность микобактерий.

3) Установленные особенности клональной генетической структуры изолятов микобактерий от пациентов, проживающих в Казахстане и в Украине, позволяют предположить активное проникновение на их территории изолятов семейства Beijing из России. В то же время, семейство LAM, по-видимому, является эндемичным для Западной Украины и в большей степени ассоциировано с лекарственной резистентностью.

4) Идентифицированные в исследуемых выборках изолятов *M.tuberculosis*, представленных в Западно-Сибирском регионе РФ, мутации лекарственной резистентности характеризуются минимальной потерей приспособленности микобактерий, что увеличивает дальнейший риск развития множественной и широкой лекарственной устойчивости. Этот тип мутаций характерен для проанализированных изолятов с широкой лекарственной устойчивостью, большая доля из которых логично является членами семейства Beijing.

5) Разработанный метод детекции мутаций лекарственной резистентности микобактерий с помощью анализа кривых плавления гетеродуплексов обладает достаточной чувствительностью и специфичностью для использования в качестве скринингового метода.

6) Полученные нами новые ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью обладают улучшенными для использования в изотермальной амплификации ДНК свойствами, показана возможность их применения для создания эффективных систем клинического выявления микобактериальной ДНК (в том числе при упрощенных быстрых методах выделения ДНК), а также мутаций в их геноме.

7) Разработанные нами с использованием современных биоинформационных подходов системы детекции микобактериальной ДНК на основе real-time PCR и LAMP с новыми ДНК-полимеразами показали улучшенные аналитические и клинико-диагностические характеристики и являются перспективными для дальнейшей адаптации к клинической практике.

Список работ:

Статьи в научных журналах:

Статьи в журналах входящих в WoS/SCOPUS:

1. **Филипенко М.Л.**, Дымова М.А., Чередниченко А.Г., Храпов Е.А., Мишукова О.В., Шварц Я.Ш. Выявление мутаций в гене *pncA* *Mycobacterium tuberculosis* с помощью модифицированного метода анализа кривых плавления продуктов ПЦР с высоким разрешением// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168. – № 8. – С. 220-226.
2. **Филипенко М.Л.**, Шамовская Д.А., Оскорбин И.П., Храпов Е.А., Чередниченко А.Г., Шварц Я.Ш. Выявление мутации *Ser450Leu* в гене *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* методом аллель-специфичной изотермической петлевой амплификации ДНК // Вестник РГМУ. – 2019. - №1. – С. 36-43. doi: 10.24075/vrgmu.2019.007.
3. Oscorbin I.P., Belousova E.A., Boyarskikh U.A., Zakabunin A.I., Khrapov E.A., **Filipenko M.L.** Derivatives of Bst-like Gss-polymerase with improved processivity and inhibitor tolerance// *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V.45. – P. 9595-9610. doi: 10.1093/nar/gkx645.
4. Pasechnik O.A., Dymova M.A., Stasenko V.L., Blokh A.I., Tatarintseva M.P., Kolesnikova L.P., **Filipenko M.L.** Molecular and genetic characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in the southern part of West Siberia // *Indian J Med Res.* – 2017. – V.146. – P. 49-55. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_162_16.
5. Oscorbin I.P., Belousova E.A., Zakabunin A.I., Boyarskikh U.A., **Filipenko M.L.** Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP)// *Biotechniques.* – 2016. – V.61. – P. 20-25. doi: 10.2144/000114432. eCollection 2016.
6. Чередниченко А.Г., Дымова М.А., Солодилова О.А., Петренко Т.И., Прозоров А.И., **Филипенко М.Л.** Выявление и характеристика рифампициностойчивых изолятов *Mycobacterium tuberculosis*// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 160. – № 11. – С. 608-612. doi: 10.1007/s10517-016-3243-3.
7. Akhmetova A., Kozhamkulov U., Bismilda V., Chingissova L., Abildaev T., Dymova M., **Filipenko M.**, Ramanculov E. Mutations in the *pncA* and *rpsA* genes among 77 *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kazakhstan// *Int J Tuberc Lung Dis.* – 2015. – V.19. – P. 179-184. doi: 10.5588/ijtld.14.0305.
8. Oscorbin I.P., Boyarskikh U.A., **Filipenko M.L.** Large Fragment of DNA Polymerase I from *Geobacillus* sp. 777: Cloning and Comparison with DNA Polymerases I in Practical Applications// *Mol Biotechnol.* – 2015. – V.57. – P. 947-959. doi: 10.1007/s12033-015-9886-x.
9. Dymova M.A., Cherednichenko A.G., Alkhovik O.I., Khrapov E.A., Petrenko T.I., **Filipenko M.L.** Characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates circulating in Siberia//

- BMC Infect Dis. – 2014. – V.14. – P. 478. doi: 10.1186/1471-2334-14-478.
10. Dymova M.A., 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 with tuberculosis in the Novosibirsk oblast, Russian Federation// J Med Microbiol. – 2011. – V.60. – P. 1003-1009. doi: 10.1099/jmm.0.027995-0. Epub 2011 Mar 24.
 11. 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. – V.11. – P. 77. doi: 10.1186/1471-2334-11-77.
 12. Киншт В.Н., Воронина Е.Н., **Филипенко М.Л.** Методы выделения ДНК Mycobacterium tuberculosis из клинических образцов для использования в ПЦР: сравнение и оценка// Клиническая Лабораторная Диагностика. – 2005. – №3. – С. 23-25.
 13. Surikova O.V., Voitech D.S., Kuzmicheva G., Tatkov S.I., Mokrousov I.V., Narvskaya O.V., Rot M.A., van Soolingen D., **Filipenko M.L.** Efficient differentiation of Mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing family from Russia using highly polymorphic VNTR loci// Eur J Epidemiol. – 2005. – V.20. – P. 963-974. doi: 10.1007/s10654-005-3636-5.
 14. Сурикова О.В., Войтих Д.В., Кузмичева Г.А., Татьков С.И., Мокроусов И.В., Нарвская О.В., **Филипенко М.Л.** Дифференциация микобактерий туберкулеза семейства W – Beijing, распространенных на территории Российской Федерации, на основе VNTR- типирования// Молекулярная Генетика, Микробиология И Вирусология. – 2005. – №3. – С. 22-29.
 15. Сурикова О.В., Войтих Д.В., Курунов Ю.Н., **Филипенко М.Л.** Опыт использования VNTR-типирования Mycobacterium tuberculosis для решения клинических задач: контроля за качеством лечения и работой лабораторной службы// Молекулярная Генетика, Микробиология И Вирусология. – 2005. – №2. – С. 21-24.
 16. Воронина Е.Н., Вихрова М.А., Храпов Е.А., Киншт В.Н., Норкина О.В., Горбунова Е.В., Шабалдин А.В., Глушков А.Н., Краснов В.А., **Филипенко М.Л.** Мутация Ser315Thr гена katG - основная причина устойчивости к изониазиду у изолятов Mycobacterium tuberculosis, распространенных в Новосибирской и Кемеровской областях// Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. – 2004. – №3. – С. 8-11.
 17. Mokrousov I., Otten T., Vyazovaya A., Limeschenko E., **Filipenko M.L.**, Sola C., Rastogi N., Steklova L., Vyshnevskiy B., Narvskaya O. PCR-based methodology for detecting multidrug-resistant strains of

- Mycobacterium tuberculosis* Beijing family circulating in Russia// Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2003. – V.22. – P. 342-348. doi: 10.1007/s10096-003-0944-0.
18. Норкина О.В., Киншт В.Н., Мокроусов И.В., Нарвская О.В., Курунов Ю.Н., Краснов В.А. **Филипенко М.Л.** Генетическое разнообразие *Mycobacterium tuberculosis* и оценка факторов риска распространения заболевания туберкулезом в Сибирском регионе России методами молекулярной эпидемиологии// Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. – 2003. – №3. – С. 9-18.
 19. Норкина О.В., **Филипенко М.Л.**, Никонова А.А., Киншт В.Н., Курунов Ю.Н., Краснов В.А., Татьков С.И. Молекулярно-генетическая характеристика устойчивых к рифампицину изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных в Новосибирске// Проблемы туберкулеза. – 2003. – №12. – С. 22-25.
 20. Mokrousov I., Otten T., **Filipenko M.**, Vyazovaya A., Chrapov E., Limeschenko E., Steklova L., Vyshnevskiy B., Narvskaya O. Detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by a multiplex allele-specific PCR assay targeting katG codon 315 variation// J Clin Microbiol. – 2002. – V.40. – P. 2509-2512. doi: 10.1128/JCM.40.7.2509-2512.2002.
 21. Narvskaya O., Otten T., Limeschenko E., Sapozhnikova N., Graschenkova O., Steklova L., Nikonova A., **Filipenko M.L.**, Mokrousov I., Vyshnevskiy B. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St. Petersburg, Russia// Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2002. – V.21. – P. 596-602. doi: 10.1007/s10096-002-0775-4.
 22. **Филипенко М.Л.**, Норкина О.В., Никонова А.А., Киншт В.Н., Нарышкина С.Л., Альховик О.В., Курунов Ю.Н., Краснов В.А. Типирование изолятов *Mycobacterium tuberculosis* в Сибирском регионе// ДАН. – 2001. – Т. 379. – №6. – С. 402-405.

Статьи в журналах не входящих в WoS/SCOPUS:

23. Ионина С.В., Дымова М.А., **Филипенко М.Л.**, Донченко Н.А. Генетическое разнообразие изолятов *Mycobacterium avium*, циркулирующих на территории Западной Сибири// Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2015. – № 4. – С. 31-37.
24. Потейко П.И., Ляшенко А.А., Лебедь Л.В., Дымова М.А., Крутько В.С., **Филипенко М.Л.**, Кашуба Д.А. Анализ мутации В 531 кодоне гена про В, ассоциированной с возникновением устойчивости к рифампицину на выборке микобактерий туберкулеза, выделенных у больных// Лікарська справа. – 2014. – №7/8. – С. 65-69.
25. Дымова М.А., Альховик О.И., Чередниченко А.Г., Кожамкулов У.А., Петренко Т.И., Раманкулов Е.М., **Филипенко М.Л.**

- Идентификация генотипов *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированных с резистентностью и чувствительностью к лекарственным препаратам// Биомедицинский журнал Медлайн.ру. – 2012. – Т. 13. – С. 672-681.
26. Дымова М.А., Ширшова А.Н., Храпов Е.А., Кожамкулов У.А., Петренко Т.И., Чередниченко А.Г., **Филипенко М.Л.** Молекулярные основы возникновения лекарственной устойчивости у *Mycobacterium tuberculosis*// Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2012. – Т. 10. – № 2. – С. 243-251.
27. **Филипенко М.Л.**, Дымова М.А., Храпов Е.А., Боярских У.А., Петренко Т.И., Чередниченко А.Г., Кожамкулов У.А., Раманкулов Е.М. Способ выявления устойчивых к рифампицину изолятов *Mycobacterium tuberculosis*// Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2012. – Т. 10. – № 2. – С. 101-106.
28. Рот М.А., Никонов С.Д., Акулинушкин А.И., **Филипенко М.Л.** *Mycobacterium tuberculosis* семейства Beijing в Новосибирской области: преобладание у больных с тяжелыми формами туберкулеза и связь с множественной лекарственной устойчивостью// Вестник НГУ. – 2008. – Т. 6. – №3. – С. 106-109.
29. Татьков С.И., Норкина О.В., **Филипенко М.Л.**, Сивков А.Ю., Болдырев А.Н., Азав М.Ш., Кишт В.Н., Курунов Ю.Н., Краснов В.А., Медведьева Е.В., Баранова О.И., Ивлев-Дунгау А.П., Боднев С.А., Блинова Л.Н., Пасечников А.Д. Молекулярная и генетическая характеристика рифампицин- и изониазид резистентных изолятов *Mycobacterium tuberculosis*// Вестник Российской Академии Мед.Наук. – 2005. – С. 26-36.

Патенты:

1. СПОСОБ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО КОМПЛЕКСА. Филипенко М.Л., Норкина О.В., Краснов В.А., Кишт В.Н. 2004 г. № 2237090
2. СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К РИФАМПИЦИНУ ИЗОЛЯТОВ *Mycobacterium tuberculosis*. Филипенко М.Л., Дымова М.А., Боярских У.А., Храпов Е.А., Петренко Т.И., Альховик О.И. 2013 г. № 2485177.
3. СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К ПИРАЗИНАМИНУ ИЗОЛЯТОВ *Mycobacterium tuberculosis*. Филипенко М.Л., Дымова М.А., Храпов Е.А., Боярских У.А. 2015 г. № 2552214.
4. СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК БАКТЕРИИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА. Кечин А.А., Храпов Е.А., Филипенко М.Л. 2022 № 2770803.

5. СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК БАКТЕРИИ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS С ПОМОЩЬЮ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ ПЕТЛЕВОЙ АМПЛИФИКАЦИИ. Кечин А.А, Оскорбин И.П., Филипенко М.Л. 2022 №2776163.