

## Сполиготипирование лекарственно-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Беларуси

Н.В. Василенко, А.А. Вязовая\*, И.В. Мокроусов\*, Е.В. Лимещенко\*, В.М.Семенов,  
О.В. Нарвская\*

Витебский медицинский университет, Витебск, Беларусь

\*ФГУН Санкт-Петербургский НИИЭМ имени Пастера Роспотребнадзора

## Spacer oligonucleotide typing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* circulating on the territory of Belarus

N. Vasilenko, A. Vyazovaya\*, I. Mokrousov\*, E. Limeschenko\*, V. Semenov, O. Narvskaya\*

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

\*Pasteur Institute, St. Petersburg

### Аннотация

Целью исследования явилось изучение генетической однородности лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории большинства областей Республики Беларусь. Методами полимеразной цепной реакции и сполиготипирования были изучены генотипы 194 лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом органов дыхания в Витебской, Гродненской, Брестской, Минской и Могилевской областях Республики Беларусь. Профили сполиготипирования белорусских штаммов *M. tuberculosis* сравнивали с имеющимися в базе данных ФГУН СПбНИИЭМ Пастера Роспотребнадзора и SpolDB4. Большинство профилей сполиготипирования имели аналоги в существующих базах данных: 88,6% - в Российской и 90,2% - в SpolDB4.

В результате проведенной научно-исследовательской работы было установлено, что доля штаммов генетического семейства Beijing составила 43,8%, семейства T - 34,0%, LAM - 10,8%, U - 3%, X - 1%, H - 2%. Выявлены также профили сполиготипирования, не зарегистрированные в международном банке данных SpolDB4 (1,5%). Среди генетически неоднородных лекарственно-устойчивых и мультирезистентных штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих в большинстве областей Беларуси, преобладают штаммы, принадлежащие к сполиготипам R0/1 (генотип Beijing, 43,8%) и R27/266 (генетическое семейство T, 28,4%).

### Ключевые слова

*M. tuberculosis*, лекарственная устойчивость, сполиготипирование, генотипы, Beijing

### Summary

The aim of the work: to determine the genotypes of the drug resistant strains of *M. tuberculosis* on the territory of Belarus. The present study was performed on 194 drug resistant strains of *M. tuberculosis* isolated in Vitebsk, Grodno, Brest, Minsk and Mogiljov regions of Belarus and previously characterized by polymerase chain reaction and spoligotyping. As a result of the performed scientific work it was determined genetical structure of *M. tuberculosis* population of Belarus: Beijing - 43,8%, T - 34,0%, LAM - 10,8%, U - 3%, X - 1%, H - 2%. That among the genetic inhomogeneous drug resistant and multiresistant strains of *M. tuberculosis*, circulating in the most regions of Belarus the majority of strains is belonging to the spoligotypes R 0/1 (genotype Beijing, 43,8%) and R27/266 (family T, 28,4%).

### Keywords

*M. tuberculosis*, drug resistans, spoligotyping, genotypes, Beijing

Неуклонный рост частоты лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза в Республике Беларусь свидетельствует о необходимости изучения структуры популяции лекарственно-устойчивых *M. tuberculosis* не только с помощью фенотипических, но и молекулярно-генетических методов. Одним из быстрых методов внутривидовой дифференциации штаммов *M. tuberculosis* является метод сполиготипирования (spacer oligonucleotide typing, spoligotyping - англ.), основанный на выявлении полиморфизма DR локуса хромосомы, который содержит короткие прямые повторы (DR, direct repeats - англ.) нуклеотидов размером 36 пар оснований, разделенные переменными по протяженности участками – спейсерами [1]. В настоящее время этот метод используют в молекулярной эпидемиологии, популяционной генетике и классификации *M. tuberculosis* complex [2, 3]. Анализ 1939 профилей сполиготипирования более 39 тысяч штаммов из 122 стран мира, приведенных в международной базе данных SpolDB4, позволил уточнить филогеографию и популяционную структуру вида *M. tuberculosis* [4]. В настоящее время выделяют несколько генетических линий (семейств/подсемейств) *M. tuberculosis*: Beijing, EAI (East African-Indian - восточноафрикано-индийское семейство), CAS (Central Asian – центрально-азиатское семейство), T (наиболее древнее, широко распространенное, но недостаточно изученное семейство), Haarlem, X (европейское семейство с малым количеством копий IS6110, широко распространенное так же в США и Великобритании), LAM (Latin American and Mediterranean – латиноамерикано-средиземноморское семейство) и некоторые другие [5]. Однако, до настоящего времени структура популяции *M. tuberculosis* на территории Республики Беларусь остается неизученной.

Целью настоящего исследования явилось изучение генетической однородности лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории большинства областей Республики Беларусь.

### Материалы и методы

Методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и сполиготипирования [1] проведено генотипирование 194 лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом органов дыхания в Витебской, Могилевской, Минской, Брестской и Гродненской областях в 2004 – 2005 г.г.

### Результаты и обсуждение

Генотипирование методом ПЦР [6] выявило принадлежность 85 (43,8%) из 194 штаммов *M. tuberculosis* к генетическому семейству Beijing. В дальнейшем, у всех штаммов «не-Beijing» и 23 штаммов Beijing была изучена генетическая однородность по DR-локусу хромосомы методом сполиготипирования.

В результате сполиготипирования 132 штаммов *M. tuberculosis* выявлено 22 варианта профилей сполиготипирования (сполиготипов), которые представлены на рисунке 1 в виде схематических профилей гибридизации амплифицированного участка ДНК с набором из 43 стандартных спейсерных олигонуклеотидов.

Профили сполиготипирования белорусских штаммов *M. tuberculosis* сравнивали с имеющимися в базе данных ФГУН СПбНИИЭМ Пастера Роспотребнадзора и SpolDB4 [4]. Большинство профилей сполиготипирования имели аналоги в существующих базах данных: 88,6% - в Российской (см. выше) и 90,2% (119 штаммов) – в SpolDB4.

23 штамма *M. tuberculosis* генетического семейства Beijing имели сполиготип R0/1, который характеризует отсутствие 1-34 сигналов в профиле гибридизации (Рис. 1). По данным Brudey et al. (2006), сполиготип 1, генотипа Beijing, выявленный у 11% изолятов *M. tuberculosis* различного географического происхождения, является одним из наиболее распространенных в мире [4].

Установлено, что 108 (99,1%) из 109 штаммов *M. tuberculosis*, не принадлежавших к генотипу Beijing, имели сходные профили гибридизации, характерной чертой которых было отсутствие спейсеров 33-36 (Рис. 1). Среди них наиболее распространенными оказались штаммы сполиготипа R27/266, характеризующиеся одновременным отсутствием 21-24 и 33 – 36 сигналов в профиле гибридизации (Рис. 1). Доля штаммов этого сполиготипа составила 28,4% (55 из 194). Сполиготип R27/266 [7] относят к подсемейству T1 генетического семейства T, наиболее распространенного в Европе [5]. Возможно, сполиготип R27/266 является эндемическим для Беларуси. Вместе с тем, столь широкая циркуляция штаммов этого сполиготипа на изучаемой территории требует углубленного изучения эпидемиологических особенностей его распространения.

К генетическому семейству T, которое является одним из наиболее филогенетически древних и распространенных в мире [5], относят



явились два штамма *M. tuberculosis* сполиготипа R124/150, имеющие положительный сигнал в 15 позиции (Рис. 1).

В целом, суммарная доля штаммов ( $n=21$ ) надсемейства LAM в исследуемой популяции лекарственно-резистентных *M. tuberculosis* составила 10,8%.

Невысокая распространенность характеризовала также лекарственно-резистентные штаммы *M. tuberculosis* генетических семейств Haarlem, U и X. Общая доля генетического надсемейства Haarlem, представленного штаммами сполиготипов R9/50, R16/35, R19/262, составила 2,1%. Генетическое семейство X в изученной выборке штаммов явилось самым малочисленным: один штамм (0,5%) сполиготипа R54/1254.

Доля штаммов различных генотипов в популяции лекарственно-устойчивых *M. tuberculosis* на территории изученных областей Беларуси представлена на рисунке 2.

Следует отметить, что профили сполиготипирования R143, R144 и R145, обнаруженные в некоторых областях Беларуси, не зарегистрированы в международном банке данных SpolDB4 и не встречались на территории Северо-Запада России. По одному штамму *M. tuberculosis* сполиготипов R143, R144 и R145 получено от больных из Витебской, Могилевской и Брестской областей, соответственно.

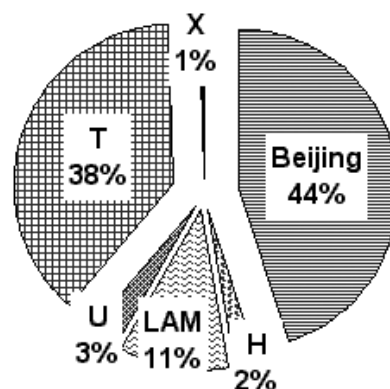
Согласно алгоритму существующей международной классификации можно предположить, что штамм *M. tuberculosis* сполиготипа

R145 относится к генетическому семейству T, которое характеризует наличие 31-го, а также 9-10 сигналов, по крайней мере, одного сигнала в позициях 21-24, и одновременное отсутствие 33 - 36 сигналов в профиле гибридизации [4, 7]. Штамм *M. tuberculosis* сполиготипа R143 соответствует характеристике генетического семейства LAM, подробно описанной выше. Штамм сполиготипа R144 наиболее близок по структуре DR-области к штаммам сполиготипа 1291 (SpolDB4) семейства MANU2, отличаясь от последнего наличием дополнительного сигнала в 21-й позиции.

### Заключение

Метод сполиготипирования позволил изучить структуру популяции возбудителя туберкулеза на территории Беларуси. Лекарственно-устойчивые штаммы *M. tuberculosis*, циркулирующие в большинстве областей Беларуси, неоднородны по структуре DR-области хромосомы. Среди них преобладают штаммы, принадлежащие к сполиготипам R0/1 (генотип Beijing) и R27/266. Высокая распространенность штаммов генотипа Beijing в Беларуси отражает ситуацию в России и в странах бывшего Советского Союза в целом. Причина столь широкого распространения штаммов сполиготипа R27/266 требует дальнейшего изучения.

Данное исследование выполнено при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований.



**Рис. 2.** Доля штаммов различных генотипов в популяции лекарственно-устойчивых *M. tuberculosis* на территории Республики Беларусь

## Литература

1. Нарвская О.В. и соавт. Генотипирование возбудителя туберкулеза методом сполиготипирования: пособие для врачей. – С.-Пб., 2004. – 19 с.
2. Van Soolingen D., Qian L., de Haas P. E. W. et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J. Clin. Microbiol.* 1995; № 33: 3234–3238.
3. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Intern. Med.* 2001; 249 (1): 1–26.
4. Brudey R., Driscoll J., Rigouts L. et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 2006; № 6: 23.
5. Filliol I., Driscoll J., van Soolingen D. et al. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41 (5): 1963–1970.
6. Mokrousov I., Otten T., Vyazovaya A. et al. PCR based methodology for detecting multi-drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family circulating in Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 22 (10): 342–348.
7. Sebban M., Mokrousov I., Rastogi N. et al. A data-mining approach to spaser oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioinformatics.* 2002; 18 (2): 235–243.
8. Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Лимещенко Е.В. и соавт. Характеристика циркулирующих на Северо-Западе России штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с использованием сполиготипирования. *Пробл. туб.* 2002; № 4: 44–47.