

*Слизень В. В.*

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕОГРАФИЯ  
*Mycobacterium tuberculosis* ГЕНОТИПА BEIJING**

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

Проблема туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью в настоящее время переросла в проблему трансконтинентального масштаба. Штаммы *M. tuberculosis* с множественной и широкой лекарственной устойчивостью показали свой потенциал неимоверно быстрого распространения, невзирая на административные границы между государствами [1–3]. Для изучения молекулярной эпидемиологии туберкулеза необходимо раскрыть причины роста циркуляции среди пациентов штаммов с лекарственной устойчивостью — множественной и широкой (МЛУ, ШЛУ), что может быть обусловлено распространением определённого генотипа микобактерий, проявляющего высокую вирулентность и резистентность.

В 2012 г. в Республике Беларусь зарегистрировано 3917 больных туберкулезом, в связи с чем инфекция сохраняет актуальность и существует

потребность в генотипировании микобактерий туберкулёза. Создание библиотек генов микобактерий, открытие вставочных элементов в геноме *M. tuberculosis* обусловили разработку методов генотипирования микобактерий, позволили расширить представления о времени и месте формирования различных генетических линий и их миграции на планете, дали возможность воссоздавать карты распространения различных генотипов. На основании данных генотипирования можно выделить 9 генетических семейств микобактерий туберкулезного комплекса, из которых наиболее распространены в Китае, Японии, Юго-Восточной Азии, странах бывшего Советского Союза являются штаммы генетического семейства Beijing, частота распространения которых в этих регионах варьирует от 30 до 70 % [6–10]. Повышенный интерес к генотипу Beijing связан с тем, что он обладает способностью к быстрому распространению, может иметь быстро прогрессирующее течение, вызывать диссеминированные формы туберкулезного процесса, приводит к активному бактериовыделению, обладает свойством высокой мутационной изменчивости, среди штаммов генотипа Beijing часто встречаются ШЛУ И МЛУ варианты.

**Цель работы** — изучить генетическую структуру циркулирующих в Республике Беларусь *M. tuberculosis*, проявляющих множественную устойчивость к противотуберкулезным лекарственным средствам.

#### **Материалы и методы**

Исследования проведены в рамках задания «Провести молекулярный мониторинг генотипов мультирезистентных *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории Республики Беларусь» ГПНИ «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация» 2014–2015 гг.

Исследованы 69 культур *M. tuberculosis*, выделенные от пациентов и проявлявшие фенотипическую устойчивость к офлоксацину (МИК  $\geq$  2 мкг/мл). Использован метод MIRU-VNTR типирования по 15 VNTR-локусам с детекцией методами электрофореза в агарозном геле и секвенирующего капиллярного электрофореза.

В ходе исследования ДНК микобактерий экстрагировали путём нагревания суспензии *M. tuberculosis* при 98 °С в течение 20 минут в 5 % Chelex-100 и 1xTAE буфере с последующим центрифугированием 13000 g в течение 20 минут.

С целью генотипирования *M. tuberculosis* определяли MIRU-VNTR профили для 15 локусов: 1) MIRU26, MIRU40, MIRU 4; ETRD; 2) MIRU 10, MIRU 16, MIRU 31(ETR E); 3) Mtub04, ETRC, ETRA; 4) Mtub30, Mtub39, QUB-4156; 5) QUB-11b, Mtub21, QUB-26, согласно инструкции на метод генотипирования *M. tuberculosis* 010–1015 (авторы: Слизень В. В., Суркова Л. К., Залуцкая О. М.).

**Биоинформатика.** Результаты капиллярного электрофореза учитывали с использованием программы Peak Scanner 1.0, Gen Marker 2.6.3. Для

анализа генотипов применяли программу MIRU-VNTR plus (<http://www.miru-vntrplus.org>) [11].

### Результаты и обсуждение

В 1995 г. van Soolingen опубликовал сообщение о том, что 86 % *M. tuberculosis*, выделяемых от больных туберкулезом в Пекине (Китай), имеют схожие многополосные профили при проведении ПДРФ анализа IS6110 и характерные паттерны при сполиготипировании. Эти штаммы были названы Пекин [16]. Позднее стало очевидным, что аналогичные штаммы циркулируют повсеместно. Позднее МБТ генотипа Beijing с множественной лекарственной устойчивостью были выделены в отдельную линию «W».

Изучение генотипов МБТ в Беларуси, выделенных в 2013 г., показало, что 58 % (n = 40) штаммов относились к генотипу Beijing (рис. 1), при этом в 95 кодоне у них находился триплет ACC, но не AGC. К генотипу TUR принадлежали 16 % (n = 11) изолятов МБТ, к Harlem — 23 % (n = 16). С помощью MIRU-VNTR у 3 % (n = 2) изолятов МБТ генотипы не были идентифицированы. Высокий удельный вес МБТ, принадлежащих к генотипу Beijing, может быть причиной увеличения доли МЛУ и ШЛУ туберкулеза в структуре заболеваемости.

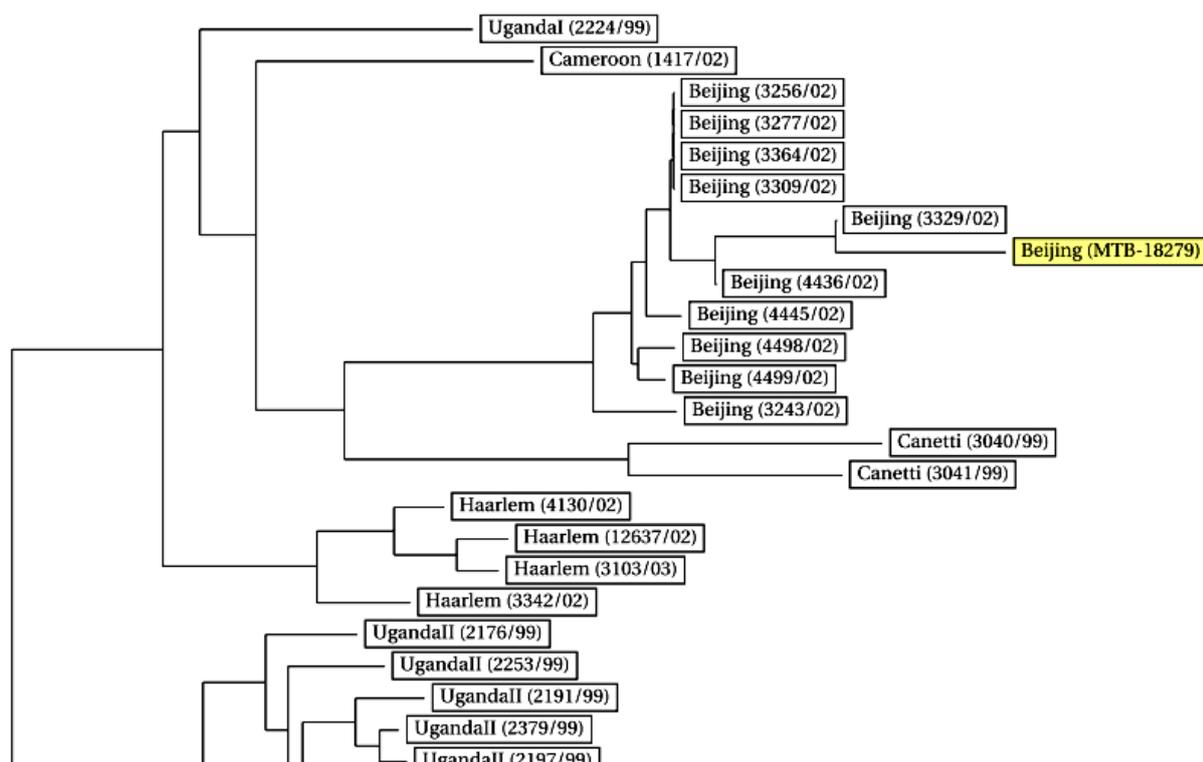


Рис. 1. Дендрограмма белорусских МБТ генотипа Beijing (крайняя правая позиция в дендрограмме) и выделяемых в других регионах

Все исследованные МБТ, относившиеся к генотипу Beijing, имели идентичный MIRU-VNTR профиль 2-3-5-3-3-5-4-4-4-2-3-4-6-7-5 (последовательность локусов MIRU04-MIRU40-MIRU26-MIRU10-MIRU16-

MIRU31-ETRA-ETRC-Mtub04-QUB4156-MTUB39-MTUB30-QUB11b-QUB26-MTUB21). На рис. 1 приведена дендрограмма, отражающая кластерирование генотипа Beijing с профилем 2-3-5-3-3-5-4-4-4-2-3-4-6-7-5, выделяемого в Беларуси, по отношению МБТ генотипа Beijing, выделяемых в других регионах.

История генотипа Beijing связана с его возникновением в период палеолита среди *Homo sapiens sapiens* К-М9 в Центральной Азии и распространением линии Beijing NTF\_IS6110 в начале неолита прото-китайско-тибетскими фермерами в восточной Азии (человеческая гаплогруппа О-М214/М122). Независимое проникновение генотипа Beijing из Восточной Азии в Северную Евразию и Южную Африку произошло, по всей видимости, недавно, и особенности распространения были связаны с влиянием демографических и климатических факторов [3].

Современные молекулярно-генетические методы типирования возбудителя туберкулеза позволяют показать, что, несмотря на генетическую гетерогенность популяции микобактерий в пределах каждой географической территории, можно выделить эпидемически значимые семейства микобактерий, которые представляют наибольшую опасность (рис. 2).

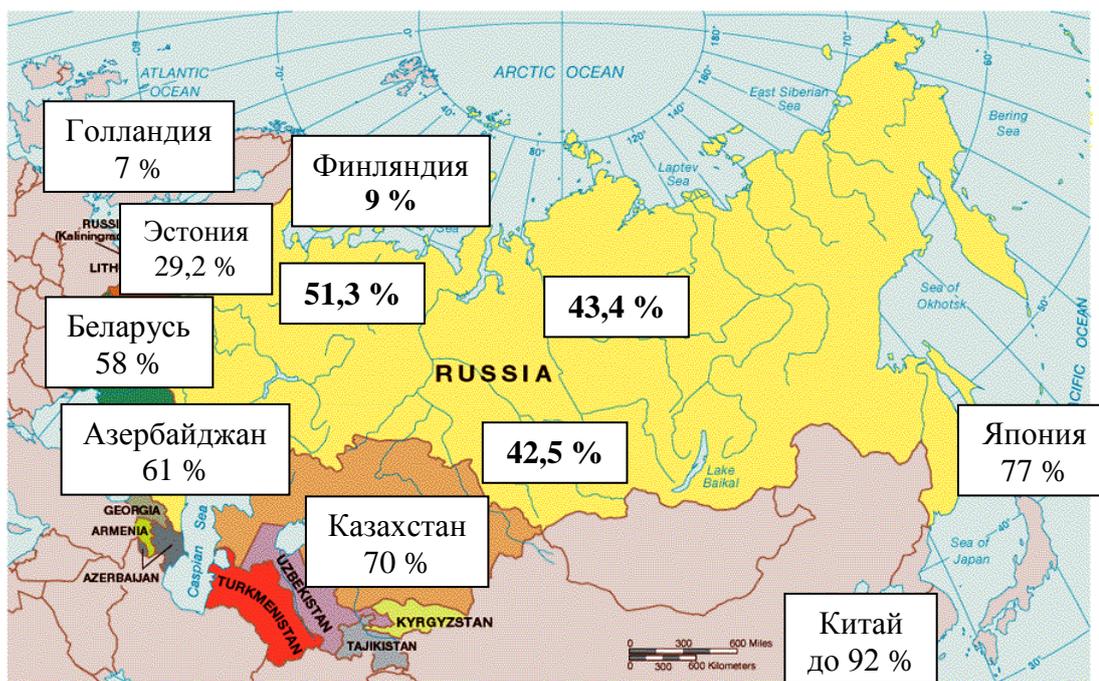


Рис. 2. Генетическая география *Mycobacterium tuberculosis* генотипа Beijing в странах постсоветского пространства

Историческим центром формирования генотипа «Пекин» является Китай. Согласно данным исследователей в Китае, генотип Beijing многие годы доминирует в этой стране, на его долю приходится в разных областях от 25 % до 91,7 % изолятов [5]. Другие страны Юго-Восточной Азии также остаются основным регионом циркуляции генотипа «Пекин». Так, из об-

шего числа генотипов *M. tuberculosis*, выявляемых на территории Японии, Южной Кореи, Вьетнама, Тибета, генотип «Пекин» является доминирующим (более 70 %). Для России, Украины, Казахстана, Узбекистана, Туркменистана, Киргизии, Азербайджана, Латвии, Эстонии, Армении, Грузии доля генотипа «Пекин» составляет 50 % и более [4, 5, 12]. В то же время в других странах, таких как Польша, Финляндия, Болгария, Турция, его доля не превышает условного порога в 10 %. В Казахстане 70 % выделяемых МБТ относятся к генотипу Beijing [13, 14]. В Финляндии на пекинский генотип приходится всего 9 % от всех лекарственно-устойчивых изолятов. В Голландии доля МБТ генотипа Beijing составляет 7 % (n = 296) [6, 15].

Таким образом, для генотипа Beijing на европейском континенте характерна «мозаичность» распределения, при этом высокие уровни распространения этого генотипа приходятся на страны бывшего Советского Союза. Генотип «Пекин» на территории России и стран постсоветского пространства является основным эпидемически значимым генотипом *M. tuberculosis*. По всей видимости, распространение генотипа «Пекин» в странах бывшего Советского Союза связано с предшествующей экспансией Российской Империи на Дальний Восток (конец XIX – начало XX века), когда этот генотип распространялся среди русских строителей Китайско-Восточной железной дороги, а позже с распространением среди заключенных в ГУЛАГах, а также в гражданском обществе СССР [4].

### **Выводы**

В Беларуси среди устойчивых к офлоксацину (МИК  $\geq 2$  мкг/мл) *M. tuberculosis* преобладают штаммы генотипа Beijing.

В Беларуси, как и в других постсоветских странах, в поддержании эпидемического процесса туберкулеза основное значение имеет генотип Beijing, длительная циркуляция одного генетического варианта приводит к накоплению мутаций, что сопровождается высокой долей МЛУ и ШЛУ вариантов МБТ генотипа Beijing.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Алексеева, С. И. Особенности течения туберкулеза у больных старших возрастных групп с разными генотипами микобактерий / С. И. Алексеева, Е. Ю. Зоркальцева, С. Н. Жданова // Практическая гериатрия : материалы II конф., Иркутск, 17 февраля 2011 г. / под ред. Ф. И. Белялова. Иркутск, 2011. С. 13–16.
2. Мониторинг заболеваемости и смертности от туберкулеза в Республике Беларусь / А. П. Астровко [и др.] // Итоги реализации Государственной программы «Туберкулез» на 2005–2009 годы и внедрения научных достижений в практическое здравоохранение : сб. материалов Респ. науч.-практ. конф., Минск, 24 июня 2010. С. 21–25.
3. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: Clues from human phylogeography / I. Mokrousov [et al.] // Genome Res. 2005. Vol. 15(10). С. 1357–1364.
4. Синьков, В. В. Реконструкция эпидемической истории «Пекинского» генотипа *Mycobacterium tuberculosis* в России и странах бывшего СССР по результатам сполито-

типирования / В. В. Синьков, Е. Д. Савилов, О. Б. Огарков // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011. № 3. С. 25–29.

5. Li, X. Non-Beijing Strains of *Mycobacterium tuberculosis* in China / X. Li, P. Xu, X. Shene // J. Clin. Microbiol. 2011. Vol. 49, N 1. P. 392–395.

6. *Comparative Study of IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism and Variable-Number Tandem-Repeat Typing of Mycobacterium tuberculosis Isolates in the Netherlands, Based on a 5-Year Nationwide Survey* / J. L. de Beer [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2013. Vol. 51, N 4. P. 1193–1198.

7. *Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis* / J. R. Glynn [et al.] // Emerg. Infect. Dis. 2002. Vol. 8, N 8. P. 843–849.

8. Новикова, А. С. Туберкулез: структура заболеваемости и трудности диагностики / А. С. Новикова, М. В. Ленькова // Молодой ученый. 2014. N 4. С. 372–376.

9. *Supply, P. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis* / P. Supply, C. Allix, S. Lesjeane // Clin. Microbiol. 2006. Vol. 44. P. 4498–4510.

10. *Use of Random Amplified Polymorphic DNA PCR To Examine Epidemiology of Stenotrophomonas maltophilia and Achromobacter (Alcaligenes) xylooxidans from Patients with Cystic Fibrosis* / J. W. Krzewinski [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2001. Vol. 39, N 10. P. 3597–3602.

11. *Evaluation and user-strategy of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates* / C. Allix-Béguec [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2008. Vol. 46, N 8. P. 2692–2699.

12. *Свежие случаи нозокомиальной передачи и генотипы Mycobacterium tuberculosis с множественной лекарственной устойчивостью* / А. Nodieva [et al.] // Int. J. Tuberc. Lung Dis. Vol. 14, N 4. P. 427–433.

13. *Simultaneous Detection and Strain Differentiation of Mycobacterium tuberculosis for Diagnosis and Epidemiology* / J. Kamerbeek [et al.] // J. Clin. Microbiol. 1997. Vol. 35, N 4. P. 907–914.

14. *Молекулярно-генетическая характеристика изолятов M. tuberculosis у больных туберкулезом легких г. Астана* / М. А. Дымова [и др.] // J. Microbiol. Methods. 2004. Vol. 57, N 3. P. 323–335.

15. *Sloot, R. Clustering of Tuberculosis Cases Based on Variable-Number Tandem-Repeat Typing in Relation to the Population Structure of Mycobacterium tuberculosis in the Netherlands* / R. Sloot, M. W. Borgdorff, J. L. de Beer // J. Clin. Microbiol. 2013. Vol. 51, N 7. P. 2427–2431.

*Slizen V. V.*

### **Genetic geography of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype**

The objective was to identify the genotypes of multi-drug resistant strains of *M. tuberculosis*, isolated from patients in Belarus. Sixty nine isolates of *M. tuberculosis*, exhibited phenotypic resistance to ofloxacin (MIC  $\geq$  2 mg/ml), were under study, their genotypes were detected by MIRU-VNTR typing method basing on detection of the difference in 15 VNTR-loci. It was shown the genotype Beijing to be the dominant, comprising 58 % (n = 40) of all MDR-MTB. Haarlem and TUR genotypes were detected in 23 and 16 % of isolates correspondingly. In Belarus, as in former USSR countries, the epidemic process

of tuberculosis is mainly maintained by genotype Beijing. Continuous circulation of genotype Beijing MTB results in accumulation of mutations and increases the proportion of MDR and XDR.