

С.Н.Жданова¹, О.Б.Огарков^{1,2,3}, В.В.Синьков¹, П.А.Хромова¹,
Е.А.Орлова¹, М.Е.Кошечев⁴, Е.Д.Савилов^{1,2}

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ОСНОВНЫХ КЛОНОВ ГЕНОТИПА BEIJING MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

¹Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск; ²Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования; ³Иркутский государственный университет; ⁴Иркутская областная клиническая туберкулезная больница

Цель. Оценка динамики изменения структуры популяции возбудителя туберкулеза в Иркутской области на основе сравнительной характеристики генотипов микобактерий туберкулеза, полученных от больных из контрастных возрастных групп. *Материалы и методы.* С помощью 24-локусного MIRU-VNTR типирования были охарактеризованы 588 эпидемически не связанных штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ), выделенных от 567 больных туберкулезом (ТБ), из которых 160 штаммов принадлежали пациентам из контрастных возрастных групп. Из них 59 штаммов были выделены от «молодых» больных ТБ, родившихся после 1990 года, и 101 изолят от родившихся до 1955 года включительно. *Результаты.* Две трети выборки образцов МБТ (427/567) принадлежало генотипу Beijing с доминированием двух его субтипов, принадлежащих современным эпидемически распространяющимся в мире клональным комплексам CC1 и CC2. Высокий уровень кластеризации профилей этих вариантов генотипа Beijing у «пожилых» и «молодых» пациентов в Иркутской области свидетельствует о наличии стойкого очага инфекции и активной трансмиссии на протяжении последних 50 лет.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 88—94

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, генотип Beijing, эпидемические субтипы

S.N.Zhdanova¹, O.B.Ogarkov^{1,2,3}, V.V.Sinkov¹, P.A.Khromova¹,
E.A.Orlova¹, M.E.Kosheev⁴, E.D.Savilov^{1,2}

EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF MAIN CLONES DISTRIBUTION GENOTYPE BEIJING OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS WITHIN IRKUTSK REGION

¹Scientific Center of Family Health Problems and Human Reproduction, Irkutsk; ²Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education; ³Irkutsk State University; ⁴Irkutsk Regional Clinical Tuberculosis Hospital, Russia

Aim. To estimate the dynamics changes in the population structure of the tuberculosis (TB) pathogen in the Irkutsk region by comparison of genotypes of *M. tuberculosis* from patients of different age groups. *Materials and methods.* 588 epidemiologically unrelated strains of *M. tuberculosis* isolates from 567 TB patients were characterized using 24-locus MIRU-VNTR typing. 160 strains belonged to patients of different age groups. 59 strains were isolated from the «young» people with TB who were born after 1990 and 101 isolates from people who were born before 1955. *Results.* Two-thirds of the samples (427/567) were genotype Beijing with the dominance of two subtypes belonging to the modern epidemic clonal complexes CC1 and CC2. The high level of clustering profiles of CC1 and CC2 genotype Beijing in «older» and «young» patients in the Irkutsk region indicates the presence and active transmission of epidemic CC1 and CC2 subtypes over the past fifty years.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No 6, P. 88—94

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, the genotype Beijing, epidemic subtypes

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение в России множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) возбудителя туберкулеза (ТБ) связывают со значительным распространением наиболее «успешных» современных клонов генотипа Beijing, доминирующего в Северной и Восточной Азии [5, 6, 14]. Кроме потенциала антибиотикорезистентности штаммы этого генотипа несут способность усугублять течение ТБ как на уровне инфекционного процесса (изменение патологических реакций, развитие внутриорганной и внелегочной диссеминации) [8, 9, 12, 17], так и путем активизации эпидемического процесса (эпидемические вспышки болезни) [13, 16]. Глобальное распространение и формирование устойчивых очагов инфекции, вызванных штаммами Beijing, ассоциировано с массовыми миграционными волнами и особенностями иммунного ответа, сформировавшегося у местного населения в процессе адаптации к разным генетическим вариантам возбудителя ТБ [3, 13].

Иркутская область стабильно занимает одно из ведущих мест по заболеваемости и распространенности ТБ в Сибирском федеральном округе и в Азиатской части России, которая всегда имела более высокий градиент бремени туберкулеза по сравнению с Европейской частью страны [2]. Кроме того, в Восточносибирском регионе широкомасштабно развивается эпидемия ВИЧ-инфекции, обеспечивающая немалый вклад в заболеваемость ТБ [4]. Наряду с вышеуказанными проявлениями эпидемиологического неблагополучия по ТБ, Иркутская область является территорией с активными миграционными процессами на протяжении всего периода существования Российской империи, СССР и последующего периода развития Российской Федерации. Поэтому рассматриваемый регион может выступать в качестве модели, где по следам прежних экспансий ТБ могут быть отслежены основные динамические изменения популяции возбудителя этого заболевания и установлены основные тенденции распространения его «современных» вариантов.

Цель настоящего исследования — оценка динамики изменения структуры популяции возбудителя туберкулеза в Иркутской области на основе сравнительной характеристики генотипов микобактерий туберкулеза, полученные от больных из контрастных возрастных групп.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализ включена выборка из 588 эпидемически не связанных штаммов МБТ, выделенных от 567 больных туберкулезом легких из различных районов Иркутской области, находившихся на лечении в Иркутской областной клинической туберкулезной больнице в 2010 — 2015 гг. Из этой выборки были дополнительно отобраны 160 штаммов из контрастных по возрасту групп, которые значимо не отличались по национальной принадлежности. Штаммы выделены преимущественно от лиц славянской (156 штамма) национальности. Большинство штаммов — 111 образцов были выделены от мужчин. Когорту «молодых» составляли 59 пациентов, родившихся, начиная с 1990 года, а группу «пожилых» (101) — родившихся до 1955 года включительно.

Экстракцию ДНК штаммов МБТ проводили из инактивированных культур. Перед выделением образцы центрифугировали, ДНК выделяли из осадка бором ДНК-сорб В (Интерлабсервис, Россия) согласно протоколу производителя. MIRU-VNTR генотипирование проводили по протоколу сайта MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/miruinfo.faces;jsessionid=>

89112F274226E781C7B0B0D9118FDD70). С помощью пакета филогенетических программ сайта осуществляли первичное определение генотипов МБТ. Для уточнения распространенности штаммов также использовался ресурс открытой базы данных SITVIT (URL: http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/query). Генотипы семейства Beijing дополнительно субтипировались по участкам генома RD105/RD207, как описано ранее [1]. Для выявления субтипа B0/W148 генотипа Beijing использован принцип, предложенный в работе [12]. Для обнаружения вставки инвертированного повтора IS6110 между генами Rv2664 и Rv2665 использованы праймеры и зонды собственного дизайна (табл. 1). ПЦР проводили с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе LightCycler Nano (Roche) с использованием всех приведенных в табл. 1. олигонуклеотидов в одной реакции. Праймеры и зонды синтезированы НПФ «Синтол», реагенты для ПЦР приобретали в компании Интерлабсервис.

Профили штаммов, верифицированные как генотип Beijing вышеуказанными методами, по 24 локусам MIRU-VNTR сравнивали с базой данных, приведенной в [11]. В качестве рефересных профилей генотипа Beijing использовали 1550 уникальных MIRU-VNTR паттернов, распределенных по семи клональным комплексам (clonal complexes — CCs) [11]. Уровень кластеризации (clustering rate) оценивали по формуле: $CR = (n_c - c) / n$ [19], где n_c — общее количество кластеризованных штаммов, c — количество кластеров, n — общее количество штаммов. При этом кластером считали филогенетическую группу, состоящую из двух или более идентичных по 24 локусам штаммов. Для анализа полученных MIRU-VNTR паттернов использовали пакеты программ MIRU-VNTRplus. Матрица генетических дистанций между исследуемыми и рефересными профилями клональных комплексов из базы данных [11] получена с помощью пакета программ сайта MIRU-VNTRplus. Статистическую обработку данных проводили в редакторе электронных таблиц MS Excel 7.0 и пакетом программ статистического анализа R. Значимость различий между параметрами оценивали с помощью непараметрического критерия χ^2 , возрастно-половые различия в группах устанавливали с помощью критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом MIRU-VNTR по 24 локусам оценена популяционная структура *M. tuberculosis* в Иркутской области. За период наблюдения наибольшее количество штаммов — 75,3% (427/567) принадлежало к генотипу Beijing. Штаммы генотипа LAM обнаружены в 10,2% (58/567) случаев, T и Ural занимали соответственно третье и четвертое место по распространенности —

Таблица 1. Структура праймеров и зондов для обнаружения вставки инвертированного повтора IS6110 между генами Rv2664 и Rv2665 *M. tuberculosis*

Название	Структура олигонуклеотида 5'→3'	Примечание
W139F	GCGACCCGCCGTCTCCTGA	
Rv2665R	TCGGCCGTACGGACGACGAT	
TnsR	CGAGGCTGCCTACTACGCTC	
Probe 37	(FAM)-TT (C-LNA)CTCTGACAGCAACA (C-LNA)CAGTT-(RTQ1)	Для индикации штаммов поп-B0/W148
Probe 48	(R6G)-AGACTCTCTGATCT(G-LNA)AGAC (C-LNA)TCA-(BHQ2)	Для индикации штаммов кластера B0/W148

Таблица 2. Генотипы МБТ, выделенные от больных ТБ легких в Иркутской области

Генотип (субтип)	Число кластеров по 24-локусному профилю			Общее число кластеризованных изолятов			Частота кластеризации, CR			Штаммы с МЛУ, %			
	Показатель	Общая выборка	«Пожи- лые»	«Моло- дые»	Общая выборка	«Пожи- лые»	«Моло- дые»	Общая выборка	«Пожи- лые»	«Моло- дые»	Общая выборка	«Пожи- лые»	«Моло- дые»
Beijing		27	6	3	324	44	22	0,70	0,54	0,48	41,5	28,6	23,1
(Beijing CC1)		6	2	2	151	23	12	0,84	0,70	0,67	29,7	16,7	20,0
(Beijing CC2 (B0/W148))		4	1	1	115	13	10	0,82	0,63	0,64	58,2	42,1	42,9
Другие субтипы Beijing		17	3	0	58	8	—	0,34	0,24	—	39,3	33,3	—
T		1	—	—	3	—	—	0,08	—	—	24,0	25,0	—
Ural		1	1	—	2	2	—	0,05	0,13	—	30,0	12,5	—
LAM		7	—	—	18	—	—	0,19	—	—	36,2	12,5	—
H		—	—	—	—	—	—	—	—	—	33,3	—	—
X		—	—	—	—	—	—	—	—	—	16,7	—	—
Общий показатель		36	7	3	347	46	22	0,56	0,39	0,36	45,4	24,8	18,9

4,4% (25/567) и 3,5% (20/567) соответственно. Изоляты всех этих семейств отличались значительной генетической гетерогенностью. Также большим генетическим разнообразием отличались минорные генотипы X, H, S, Uganda и Haarlem — от 3 до 6 изолятов в выборке. В 3,7% случаев были выявлены микст-генотипы МБТ. Используемыми методами не были идентифицированы 2,5% (14/567) штаммов.

Из генотипов Beijing самыми распространенными в рассматриваемой выборке были штаммы CC1 (167/427). Этот субтип имел все проявления лекарственной устойчивости от сохраненной чувствительности до широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) без значимых отличий от других представителей Beijing и non Beijing. Наряду с этим разнообразие профилей MIRU-VNTR 24 штаммов субтипа Beijing CC1 свидетельствует о накоплении большого резервуара инфекции в течение определенного времени его существования и, вероятно, активной роли миграционной трансмиссии инфекта из других территорий. Эту гипотезу подтверждает обнаружение идентичного профиля Beijing CC1 (244233352644425153353823) у 70,6% (122/172) штаммов этого варианта, что может быть связано с активностью очага инфекции в регионе. В группе CC1 в 11 случаях были обнаружены специфические для B0/W148 инсерции инвертированной IS6110, в большинстве случаев (7/11) несшие МЛУ или ШЛУ.

Субтип Beijing CC2 (113/134) в популяции МБТ Иркутской области представлял в основном варианты, также отвечающие классификации B0/W148 по наличию специфической инвертированной инсерции IS 6110 [12], за исключением только двух обнаруженных нами случаев несовпадения систематизации B0/W148 и CC2 (2/113). Среди доминирующих вариантов генотипа Beijing было выявлено значимое преобладание МЛУ и ШЛУ только у штаммов Beijing MIT17 (67/134) — второго по частоте встречаемости варианта по сравнению с другими генотипами ($\chi^2=3,182$ $p=0,03$). При этом Beijing CC2 non B0/W148 в трети случаев имел также МЛУ и ШЛУ (3/8).

Следующий этап анализа включал в себя сравнительное изучение 160 изолятов, полученных от больных разных поколений из Иркутской области (табл. 2). С этой целью путем MIRU-VNTR генотипирования по 24 локусам и классификации паттернов по клональным комплексам из работы [11] проанализирована структура популяции *M.tuberculosis* и определено сходство срав-

ниваемых структур. Исследование показало, что высокотрансмиссивные субтипы, представленные клональными группами CC1 и CC2, несущие антибиотикорезистентность, одинаково часто проявлены ($\chi^2=1,056$; $p=0,152$) у больных из контрастных по возрасту групп. Не обнаружено различий в частоте выявления клона B0/W148 у пациентов из сравниваемых групп ($\chi^2=0,021$; $p=0,442$). Единственным значимым отличием ($\chi^2=3,0$; $p<0,05$) выборки «пожилых» от «молодых» было наличие других (неэпидемических) субтипов генотипа Beijing, в то время как у рожденных после 1990 г. встречались только высокоэпидемические CC1 и CC2 субтипы (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка глобального распространения штаммов генотипа Beijing на территории Евразии позволила сформулировать ряд концепций о вероятной истории его экспансии на территорию России и стран, входивших в СССР [3, 13]. Ранее представленная нами гипотеза на основе модели взрывообразного распространения штаммов этого генотипа в XX веке, связанного с их заносом с территории Китая [3, 15], согласуется с полученными нами данными по CC1 кластеру. Однако отсутствие субтипа B0/W148 генотипа Beijing в Китае [13] предполагает другой сценарий появления его в России. В качестве возможного источника данного варианта возбудителя ТБ рассматривается территория Западной Сибири [13], откуда с волнами послевоенной миграции он мог распространиться по территории СССР, а в постсоветское время — в другие регионы мира. Для доказательства предполагаемой истории экспансии субтипа B0/W148 генотипа Beijing было осуществлено MIRU-VNTR генотипирование по 24 локусам штаммов МБТ, циркулирующих на территории Иркутской области, а также в контрастных по возрасту группах больных ТБ (до 25 лет и после 55).

Гипотеза, положенная в основу исследования, состоит в том, что момент заноса и недавнего эпидемического распространения наиболее «успешных» вариантов генотипа Beijing на изучаемой территории может быть отслежен путем сравнения структуры популяции штаммов МБТ в разных поколениях больных ТБ. Принимая во внимание концепцию о подавляющем заражении МБТ в детском возрасте, особенно на территориях с высоким бременем ТБ [10], выборка генотипов «пожилых» людей, в целом, отражает генетическое разнообразие возбудителя туберкулеза, сформировавшегося на изучаемой территории более пятидесяти лет назад, а штаммы, выделенные от «молодых» пациентов, соответствуют текущей эпидемической ситуации [7, 18].

В целом, мы не обнаружили какие-либо кластеры, состоящие исключительно из штаммов, принадлежащих «пожилым» больным ТБ в Иркутской области. К тому же, в рассматриваемой популяции МБТ среди «молодых» больных не было ожидаемого увеличения частоты субтипа Beijing CC2 (B0/W148). Уровень его встречаемости не имел значимых различий в когорте «молодых» (11/59) и «пожилых» (24/101) пациентов ($\chi^2=0,311$; $p=0,288$). Частота кластеризации штаммов (CR) среди «пожилых» пациентов оказывается достаточно высокой (CR=0,39), не имеющей значимых отличий от показателя «молодых» пациентов (CR=0,36), ($\chi^2=0,949$; $p=0,165$). В сравниваемых возрастных группах, как и в общей выборке, кластеризующиеся штаммы значительно чаще обнаруживались среди субтипов генотипа Beijing ($\chi^2=39,6$; $p<0,01$), их CR была наивысшей в общей структуре МБТ — 0,70, на этом фоне CR штаммов nonBeijing была равна 0,10. Внутри выборки штаммов генотипа

Beijing среди «молодых» пациентов CR была незначительно ниже (0,48), чем среди «пожилых» (0,55).

Такая ситуация может свидетельствовать об устойчивом резервуаре инфекции за счет уже сформировавшейся популяции МБТ, отличающейся разнообразием циркулирующих вариантов в основном за счет субтипов Beijing, среди которых ведущую роль в активной передаче и распространении МЛУ играет один из клонов Beijing CC1. Филогенетический анализ профилей Beijing CC1 из Иркутской области в сопоставлении с данными глобальной базы из работы [11] позволил установить, что подобные иркутским профили циркулируют в Центральной Азии и Европе, где описана МЛУ эпидемия ТБ, вызванного CC1 штаммами [12, 14]. Вместе с тем, присутствующие в глобальной базе Beijing российские профили CC1 в большинстве случаев отличаются от полученных нами, что может указывать на возникшее разнообразие в процессе недавней эволюции этого клона на обширной территории России после заноса из Северного Китая и эпидемического распространения его во второй половине XX века [3].

Штаммы Beijing B0/W148, также отвечающие классификации CC2 и одинаково часто встречающиеся у больных ТБ разных поколений, являются филогенетически самыми молодыми представителями Beijing. Недавнее распространение штаммов Beijing CC2 (B0/W148) в иркутской популяции подтверждается низким разнообразием профилей на фоне более высокой кластеризации по сравнению с Beijing CC1. При этом самый большой кластер с идентичными характеристиками MIRU-VNTR 24 имел полное сходство с европейским CC2 (244233352644425173353723) — 109/134. Значительно меньшие по величине два кластера Beijing CC2 из Иркутской области (4/134 и 5/134 изолятов) отвечали профилям CC2 из Центральной Азии. В совокупности полученные данные согласуются с гипотезой массовой трансмиссии B0/W148 по всей территории бывшего СССР. Отсутствие полностью совпадающих с российскими Beijing CC2 представителями в базе Merker M. et al [11] может свидетельствовать, как и в случае Beijing CC1, о возникшей вариации, носящей незначительный характер и, вместе с тем, давшей самостоятельный очаг инфекции на изучаемой территории.

Работа поддержана РФФИ (грант 15-04-00632 А).

ЛИТЕРАТУРА

1. Жданова С.Н., Огарков О.Б., Степаненко Л.А. и др. Применение делеционного анализа по RD105 для выявления генотипа Пекин Mycobacterium tuberculosis. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2011, 2:194-197.
2. Краснов В.А., Ревякина О.В., Филимонов П.Н. и др. Влияние отдельных демографических и географических факторов на оказание противотуберкулезной помощи в регионах Сибири и Дальнего Востока. Туберкулез и болезни легких. 2012, 8: 10-15
3. Синьков В.В., Савилов Е.Д., Огарков О.Б. Эпидемиология туберкулеза в России: молекулярные и исторические доказательства в пользу сценария распространения пекинского генотипа M. tuberculosis в XX в. Туберкулез и болезни легких. 2012, 3: 57-62.
4. Туберкулез в Российской Федерации, 2012/2013/2014 гг. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. М., 2015.
5. Borgrell S., Gagneux S. Strain diversity, epistasis and the evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Clin. Microbiol. Infect. 2011, 17: 815-820.
6. Casali N., Nikolayevskyy V., Balabanova Y. et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. Nat. Genet. 2014, 46: 279-286.

7. Groenheit R., Ghebremichael S., Pennhag A. et al. Mycobacterium tuberculosis strains potentially involved in the TB epidemic in Sweden a century ago. *PLOS One*. 2012, 7(10):e46848.
8. Hanekom M., Gey van Pittius N.C., McEvoy C. et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011, 91 (6): 510-523.
9. Lasunskaja E., Ribeiro S.C., Manicheva O. et al. Emerging multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes Infect*. 2010, 12 (6): 467-475.
10. Marais B.J., Gie R.P., Schaaf H.S. et al. The natural history of childhood intra-thoracic tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 2004, 8 (4): 392-402.
11. Merker M., Blin C., Mona S. et al. Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage. *Nat. Genet*. 2015, 47 (3): 242-249.
12. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A. et al. Russian «successful» clone B0/W148 of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: a multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. *J. Clinical Microbiology*. 2012, 50 (11): 3757-3759.
13. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev*. 2013, 26 (2): 342-360.
14. Mokrousov I. Mycobacterium tuberculosis phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015, 95 (1): S167-76.
15. Ogarkov O., Mokrousov I., Sinkov V. et al. «Lethal» combination of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype and human CD209 –336G allele in Russian male population. *Infect. Genet. Evol*. 2012, 12 (4): 732-736.
16. Parwati I., van Crevel R., van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains. *Lancet Infect. Dis*. 2010, 10 (2): 103-111.
17. Reed M.B., Domenech P., Manca C. et al. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*. 2004, Sep 2; 431 (7004): 84-87.
18. Smit P.W., Haanperä M., Rantala P. et al. Genotypic characterization and historical perspective of Mycobacterium tuberculosis among older and younger Finns, 2008-2011. *Clin. Microbiol. Infect*. 2014, 20 (11): 1134-1139.
19. Supply P., Allix C., Lesjean S. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol*. 2006, 44 (12): 4498-4510.

Поступила 04.04.17

Контактная информация: Жданова Светлана Николаевна, к.м.н.,
664003, Иркутск, ул. К. Маркса, 3, р.т. (3952) 33-34-25
