

УДК 575.167

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ГРУПП *Mycobacterium tuberculosis* ПО РАЙОНАМ САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ

© 2014 И.С. Концевая<sup>1</sup>, В.В. Николаевский<sup>3</sup>, А.В. Садыхова<sup>1</sup>, А.М. Ковалёв<sup>2</sup>,  
О.А. Игнатъева<sup>1</sup>, Ю.Д. Родионова<sup>2</sup>, Я.М. Балабанова<sup>3</sup>, О.Н. Макурина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Самарский государственный университет, г. Самара

<sup>2</sup>Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер имени Н.В. Постникова, г. Самара

<sup>3</sup>Колледж королевы Марии Университета Лондона

Поступила 13.02.2014

В статье рассмотрена структура популяции возбудителя туберкулеза легких *Mycobacterium tuberculosis* и распространённость различных генетических групп и кластеров штаммов по районам Самарской области.

**Ключевые слова:** туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, кластеры, генетические группы, районы Самарской области.

Туберкулез остается важной проблемой здравоохранения во всем мире и Российской Федерации в частности. Самарская область относится к регионам России с неблагоприятной обстановкой по туберкулезу, где уровень заболеваемости в 2011 году (78,5 случаев на 100 тыс. населения) превышает средний показатель по стране (73,0 случая на 100 тыс. населения) [11]. Особую тревогу вызывает рост уровней заболеваемости лекарственно-устойчивыми штаммами возбудителя туберкулеза – *Mycobacterium tuberculosis*. Преобладающим семейством штаммов, циркулирующим в Самарской области, является семейство Beijing [12]. Оно характеризуется высокой степенью внутригрупповой гомогенности, а также повышенной вирулентностью, патогенностью и ассоциированностью с лекарственной устойчивостью [3-6, 10].

К настоящему времени имеются лишь единичные данные по популяционно-генетической структуре штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих в Самарской области, распространённости различных генетических групп и их ассоциированности с лекарственной устойчивостью и вирулентностью.

Целью данного исследования было изучение генетической структуры популяции и закономерностей циркуляции и распространения основных генетических групп *M. tuberculosis* в Самарской области.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили 1304 изолята *M. tuberculosis*, выделенных из мокроты пациентов с бактериологически подтвержденным диагнозом туберкулез легких, проходивших стационарное или амбулаторное лечение в противотуберкулезных учреждениях Самарской области. Из них у 807 (61,89%) пациентов туберкулез был выявлен впервые, а 497 (38,11%) пациентов получали противотуберкулезное лечение в прошлом.

Обработку мокроты, выделение чистых культур микобактерий и их идентификацию, а также тесты на лекарственную чувствительность проводили с использованием системы автоматизированных жидких питательных сред BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) в соответствии с рекомендациями производителя [18]. Выделение ДНК из изолятов производили методом нагревания с хлороформом. Молекулярно-генетический анализ ДНК изолятов включал (1) сполитипирование с гибридизацией на мембранах с нанесенными олигонуклеотидными пробами [16] и (2) генотипирование по 9-ти и 17-ти локусам VNTR для штаммов семейства Beijing (VNTR 1982, 2163B, 3232, 4052, MIRU 10, 23, 26, 31, 40) и штаммов остальных семейств (VNTR 1982, 3232, MIRU 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40, ETR-A, B, C) соответственно [19].

Кластерный анализ проводили с использованием программы Bionumerics v. 6.1 (Applied Maths, Ghent, Бельгия). Генетические группы штаммов определяли с помощью всемирной базы данных MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>) на основании данных сполитипирования и VNTR-типирования.

Статистическую обработку результатов генотипирования и выявление значимых ассоциаций проводили при помощи программы WINPEPI. Для сравнения распределения генетических групп *M. tuberculosis* среди штаммов, объединенных общими фенотипическими признаками, использовали критерий согласия Пирсона ( $\chi^2$ ). Для сравнения распределения генетических групп *M. tuberculosis* использо-

Концевая Ирина Сергеевна, аспирант, [belka@ostin.org](mailto:belka@ostin.org); Николаевский Владислав Владленович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, [v.nikolayevskyy@qmul.ac.uk](mailto:v.nikolayevskyy@qmul.ac.uk); Садыхова Анна Викторовна, аспирант, [antima2008@rambler.ru](mailto:antima2008@rambler.ru); Ковалёв Александр Михайлович, кандидат биологических наук, [alexferreiro@yandex.ru](mailto:alexferreiro@yandex.ru); Игнатъева Ольга Андреевна, аспирант, [ignatyevaolga@rambler.ru](mailto:ignatyevaolga@rambler.ru); Родионова Юлия Дмитриевна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией, [u.d.mashkova@gmail.com](mailto:u.d.mashkova@gmail.com); Балабанова Янина Михайловна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, [y.balabanova@qmul.ac.uk](mailto:y.balabanova@qmul.ac.uk); Макурина Ольга Николаевна, доктор биологических наук, профессор, [makurina.on@mail.ru](mailto:makurina.on@mail.ru)

вали показатель соотношения (RR) с 95%-ным интервалом достоверности (CI).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованной нами выборке 71,6% составляли штаммы семейства Beijing, при этом доля штаммов семейств, принадлежащих к Евро-Американской группе (Haarlem, LAM, S, Uganda, Ghana, Cameroon, URAL и X) составила 23,2%. Наибольшее количество штаммов Евро-Американской группы, обнаруженных в Самарской области, относилось к семействам LAM (8,9%) и URAL (7,5%). Штаммы остальных семейств встречались значительно реже (0,3-5,7%). Семь штаммов (0,5%) не были определены до семейства использованными в исследовании методами (таб. 1).

**Таблица 1.** Распределение генетических групп в исследованной выборке *M. tuberculosis*

Генетическая группа	Количество (% от общего числа штаммов)
Beijing	934 (71,6%)
Cameroon	11 (0,8%)
Delhi/CAS	1 (0,1%)
EAI	1 (0,1%)
Ghana	22 (1,7%)
Haarlem	74 (5,7%)
LAM	116 (8,9%)
S	11 (0,8%)
Uganda	25 (1,9%)
URAL	98 (7,5%)
X	4 (0,3%)
Неклассифицированные	7 (0,5%)
Всего	1304

**Таблица 2.** Распределение пациентов, включенных в исследование, по районам проживания

Место проживания (город или район)	Количество пациентов в исследовании
Самара	549
Тольятти	154
Сызрань	104
Чапаевск	64
Новокуйбышевск	51
Кинельский	39
Красноярский	29
Похвистнево	26
Ставропольский	26
Отрадный	14
Жигулевск	13
Кинель-Черкасский	12
Кошкинский	12
Сергиевский	12
Шигонский	12
Приволжский	11
Безенчукский	10
Больше-Глушицкий	10
Борский	10
Челно-Вершинский	10
Богатовский	8
Больше-Черниговский	8
Клявлинский	8
Красноармейский	8
Октябрьск	7
Пестравский	7
Шенталинский	7
Елховский	5
Камышлинский	5
Алексеевский	4

Сызранский	4
Иса克林ский	3
Нефтегорский	3
БОМЖ	59

Больные легочным туберкулезом, от которых были получены штаммы микобактерий, используемые в данном исследовании, проходили стационарное лечение в девяти специализированных больницах и диспансерах, расположенных в городах Самара (Самарский областной противотуберкулезный диспансер и Самарская областная туберкулезная больница), Тольятти (Тольяттинский противотуберкулезный диспансер), Сызрань (Сызранский противотуберкулезный диспансер), Новокуйбышевск (Новокуйбышевский противотуберкулезный диспансер), Чапаевск (Чапаевский противотуберкулезный диспансер), Отрадный (Отраденский противотуберкулезный диспансер), Кинель (Кинельский противотуберкулезный диспансер) и Похвистнево (Похвистневский противотуберкулезный диспансер). Наибольшее количество больных находилось на излечении в г. Самаре (843 пациента), наименьшее – в г. Кинеле (11 пациентов).

Больные туберкулезом в нашем исследовании проживали в 9 городах и 22 районах Самарской области. Не имели определенного места жительства на момент исследования 59 пациентов (таб. 2).

С целью выявления особенностей эпидемиологии штаммов микобактерий, циркулирующих в Самарской области, на основании результатов многолокусного VNTR-типирования был проведен кластерный анализ штаммов, при этом штаммы семейства Beijing и остальные штаммы анализировались раздельно. Кластером считались два и более изолята с неразличимыми профилями VNTR. Из кластерного анализа исключили 50 штаммов (3,8%) в связи с неполными данными по профилю VNTR. Уровень кластеризации для группы определялся как отношение количества штаммов, входящих в состав кластеров, к общему количеству штаммов в выборке. Штаммы, не входящие ни в один кластер, считались уникальными. Общий уровень кластеризации составил 81,6% (1024 из 1254 штаммов), при этом уровни кластеризации среди двух групп были достоверно различны, составив в группе Beijing 87,7% (790 из 901 штаммов), а в группе остальных семейств – 66,3% (234 из 353 штаммов) (RR=1,323, 95% CI=1,22-1,43). В обеих группах для дальнейшего анализа нами были выделены по 5 кластеров, содержащих наибольшее количество штаммов (табл. 3 и 4).

Наиболее крупные кластеры в семействе Beijing (Samara4, Samara24, Samara12, Samara17 и Samara16) насчитывали от 34 до 253 штаммов, при этом их доля составила 53,72% от общего количества штаммов Beijing (таб. 3). Кластеры в группе штаммов, не относящихся к семейству Beijing, были существенно мельче, при этом на долю пяти крупнейших из них (Samara255, Samara227, Samara205, Samara228 и Samara201) пришлось лишь 20,4% всех штаммов группы (таб. 4).

Уровень кластеризации внутри генетической группы является одним из важных индикаторов, характеризующих как текущий эпидемиологический процесс, так и, возможно, степень эволюционной

«успешности» группы по сравнению с другими. При высоком уровне кластеризации можно предполагать активный эпидемиологический процесс внутри той или иной группы.

**Таблица 3.** MIRU-VNTR профиль 5 крупнейших кластеров штаммов, принадлежащих семейству Beijing

Кластер (количество штаммов)	Число повторов в локусах								
	MIRU					VNTR			
	10	23	26	31	40	2163b	3232	1982	4052
Samara4 (n=253)	3	5	5	5	3	6	12	8	6
Samara24 (n=103)	3	5	7	5	3	6	14	6	7
Samara12 (n=54)	3	5	5	5	3	6	14	8	8
Samara17 (n=40)	3	5	5	5	3	6	12	8	8
Samara16 (n=34)	3	5	5	5	3	6	15	8	8

**Таблица 4.** MIRU-VNTR профиль 5 крупнейших кластеров штаммов, не принадлежащих семейству Beijing

Кластер (количество штаммов)	Число повторов в локусах													ETR		
	MIRU												A	B	C	
	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40				
Samara255 (n=18)	2	2	7	2	2	5	1	1	3	2	2	3	4	2	5	
Samara227 (n=17)	1	2	4	3	2	5	1	5	3	2	2	4	2	2	2	
Samara205 (n=13)	2	2	4	3	2	5	1	4	3	3	2	3	2	2	3	
Samara228 (n=12)	1	2	4	3	2	5	1	5	3	2	2	5	2	2	2	
Samara201 (n=12)	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3	3	2	3	

Так, на основании обнаруженных нами чрезвычайно высоких показателей кластеризации внутри семейства Beijing (почти 90%), можно сделать вывод о его активной трансмиссии в Самарской области. Важно отметить, что основной вклад в распространение семейства Beijing вносят крупнейшие 5 кластеров, составляющие более половины всех штаммов семейства Beijing в данном регионе. Их особая роль в структуре заболеваемости туберкулезом легких в Самарской области может быть обусловлена как факторами самого микроорганизма (ассоциированность с лекарственной устойчивостью, патогенность и вирулентность), так и внешними популяционно-эпидемиологическими факторами (изначально более высокая распространенность данных штаммов, например в местах лишения свободы).

Полученные данные о распределении групп и уровнях кластеризации штаммов согласуются с предыдущими результатами исследований как в других регионах России [2, 6, 8, 9, 14, 17], так и в Самарской области [1, 13, 15]. Следует отметить, что доля штаммов семейства Beijing в структуре популяции *M. tuberculosis* в Самарской области за последнее десятилетие выросла с 62,0% в 2001-2002 гг. [15] до 67,9% в 2005 г. [7] и до 71,6% в 2008-2009 гг.

Проведенный нами анализ выявил ряд различий в распространенности генетических групп *M. tuberculosis* по медицинским учреждениям и районам проживания, при этом проживание в городах было ассоциировано с риском заражения штаммами семейства Beijing, а в сельской местности – штаммами других семейств. Достоверные различия в распространенности по районам были выявлены для кластеров Samara227 и Samara228, не относящихся к Beijing ( $\chi^2=59,566$ ,  $p=0,003$  и  $\chi^2=61,044$ ,  $p=0,002$  соответственно), а также кластера Samara17 семейства Beijing ( $\chi^2=47,66$ ,  $p=0,047$ ) и всей группы Beijing в целом ( $\chi^2=48,470$ ,  $p=0,040$ ). По медицинским учреждениям достоверно различалась распространенность кластера Samara4 семейства Beijing ( $\chi^2=29,448$ ,  $p<0,005$ ), а также группы кластеров штаммов, не принадлежащих семейству Beijing и не относящихся к пяти крупнейшим кластерам ( $\chi^2=16,015$ ,  $p=0,042$ ).

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о главенствующей роли контактов по месту проживания, работы либо учебы в инфицировании штаммом семейства

Beijing, однако за эпидемиологический процесс отвечает не семейство в целом, а лишь несколько крупных кластеров внутри него. Одной из причин распространенности штаммов семейства Beijing может являться внутрибольничное заражение вследствие неадекватных мер инфекционного контроля. Это подтверждается выявленным нами преобладанием кластеров Samara4 ( $\chi^2=8,574$ ,  $p=0,003$ ) и Samara24 ( $\chi^2=6,163$ ,  $p=0,013$ ) семейства Beijing, среди пациентов, получавших лечение в прошлом.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балабанова Я.М., Николаевский В.В., Радди М., Дробневский Ф., Черноусова Л.Н., Гольшевская В.И., Ерохин В.В., Кузнецов С.И., Захарова С.М., Мелентьев А.С., Федорин И.М. Преобладание штаммов *Mycobacterium tuberculosis* семейства Beijing и факторы риска их трансмиссии в Самарской области // Пробл. туб. и бол. легк. 2006. №2. С. 31-37.
2. Вязовая А.А., Журавлев В.Ю., Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф., Павлова Е.П., Кришевич В.В., Вишневский Б.И., Нарвская О.В. Характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Псковской области // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. № 6. С. 27-31.
3. Дьмова М.А., Никонов С.Д., Акулинушкин А.И., Осигренко А.П., Филипенко М.Л. Преобладание *Mycobacterium tuberculosis* семейства Beijing у больных с тяжелыми формами туберкулеза // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: биология, клиническая медицина. 2008. Т. 6. № 3-1. С. 106-109.
4. Дьмова М.А., Ольховик О.И., Чередниченко А.Г., Храпов Е.А., Петренко Т.И., Филипенко М.Л. Генотипирование изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, характеризующихся широкой лекарственной устойчивостью // Вестник Новосибирского государственного университета. 2013. Т. 11. № 1. С. 110-117.
5. Лац А.А., Савилов Е.Д. Делеционный анализ по RD181, RD150, RD142 штаммов генотипа Пекин *Mycobacterium tuberculosis* у больных туберкулезом в Иркутской области // Сибирский медицинский журнал. 2012. Т. 113. № 6. С. 88-90.
6. Маничева, О. А., Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Вязовая А.А., Журавлев В.Ю., Барнаулов А.О., Догондзе М.З., Оттен Т.Ф., Вишневский Б.И. Лекарственная устойчивость, жизнеспособность и вирулентность in vitro штаммов *Mycobacterium tuberculosis* различных генотипов // Инфекция и иммунитет. 2011. Т. 1. № 4. С. 341-348.
7. Николаевский В.В., Балабанова Я.М., Браун Т. Молекулярное генотипирование штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, цир-

- кулирующих в центральной России: эффективность сполито-тирования и VNTR-MIRU // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2005. № 4. С. 9-14.
8. Огарков О.Б., Жданова С.Н., Зарбуев А.Н., Бадлеева М.В., Унтанова Л.С., Темирбаева И.В., Лац А.А., Савилов Е.Д. Полиморфизм *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом в пенитенциарной системе Бурятии: высокая распространенность генотипа Пекин // Сибирский медицинский журнал. 2012. Т. 113. № 6. С. 54-57.
  9. Савилов Е. Д. Жданова С.Н., Огарков О.Б., Лац А.А., Зарбуев А.Н. Генотип LAM *Mycobacterium tuberculosis* в Бурятии // Сибирский медицинский журнал. 2013. Т. 121. № 6. С. 140-142.
  10. Степанишина В.Н., Лупин М.Ю., Дубилей С.А., Игнатова А.Н., Шемякин И.Г. Доминирующие генотипы штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от заключенных в поселке Озерки // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2007. № 3. С. 27-32.
  11. Туберкулез в Российской Федерации: аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации, 2010 г. М.: Триада, 2011. 280 с.
  12. Balabanova Y., Drobniewski F., Fedorin I., Zakharova S., Nikolayevskyy V., Atun R., Coker R. The Directly Observed Therapy Short-Course (DOTS) strategy in Samara Oblast, Russian Federation // Respir Res. 2006. Vol. 7. P. 44.
  13. Balabanova Y., Nikolayevskyy V., Ignatyeva O., Kontsevaya I., Rutterford C.M., Shakhmistova A., Malomanova N., Chinkova Y., Mironova S., Fedorin I., Drobniewski F.A. Survival of civilian and prisoner drug-sensitive, multi- and extensive drug-resistant tuberculosis cohorts prospectively followed in Russia // PLoS One. 2011. Vol. 6. № 6. P. e20531.
  14. Chernyaeva E., Dobrynin P., Pestova N., Matveeva N., Zhemkov V., Kozlov A. Molecular genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains spread in different patient groups in St. Petersburg, Russia // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012. Vol. 31. № 8. P. 1753-1757.
  15. Drobniewski F., Balabanova Y., Nikolayevskyy V., Ruddy M., Kuznetsov S., Zakharova S., Melentyev A., Fedorin I. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia // Jama. 2005. Vol. 293. № 22. P. 2726-2731.
  16. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology // J Clin Microbiol. 1997. Vol. 35. № 4. P. 907-914.
  17. Mokrousov I., Vyazovaya A., Otten T., Zhuravlev V., Pavlova E., Tarashkevich L., Krishevich V., Vishnevsky B., Narvskaya O. *Mycobacterium tuberculosis* population in northwestern Russia: an update from Russian-EU/Latvian border region // PLoS One. 2012. Vol. 7. № 7. P. e41318.
  18. Siddiqi S., Rusch-Gerdes S. MGIT Procedure Manual. For BACTEC MGIT 960 TB System (Also applicable for Manual MGIT). *Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) Culture and Drug Susceptibility Demonstration Projects* // FIND. 2006. 89 p.
  19. Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rusch-Gerdes S., Willery E., Savine E., de Haas P., van Deutekom H., Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez M.C., Fauville M., Niemann S., Skuce R., Kremer K., Locht C., van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* // J Clin Microbiol. 2006. Vol. 44. № 12. P. 4498-4510.

## PREVALENCE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* GENETIC GROUPS IN SAMARA REGION

© 2014 I.S. Kontsevaya<sup>1</sup>, V.V. Nikolayevskyy<sup>3</sup>, A.V. Sadykhova<sup>1</sup>, A.M. Kovalyov<sup>2</sup>, O.A. Ignatyeva<sup>1</sup>, Y.D. Rodionova<sup>2</sup>, Y.M. Balabanova<sup>3</sup>, O.N. Makurina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Samara State University

<sup>2</sup>Samara Region Clinic Tuberculosis Dispensary named after N.V. Postnikov

<sup>3</sup>Queen Mary College, University of London

The population structure of *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of lung tuberculosis, as well as prevalence of various strain lineages and clusters in Samara region is investigated in the paper.

**Key words:** tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, lineages, clusters, Samara region areas.

---

Kontsevaya Irina, PhD student of Biochemistry Department, Samara State University, belka@ostin.org; Nikolayevskyy Vladislav, PhD, Senior research associate, Queen Mary College, University of London, v.nikolayevskyy@qmul.ac.uk; Sadykhova Anna, PhD student of Biochemistry Department, Samara State University, antima2008@rambler.ru; Kovalyov Alexander, PhD, biologist of Samara Region Clinic Tuberculosis Dispensary named after N.V. Postnikov, alexferreiro@yandex.ru; Ignatyeva Olga, PhD student of Biochemistry Department, Samara State University, ignatyevaolga@rambler.ru; Rodionova Yulia, MD, Head of the laboratory of Samara Region Clinic Tuberculosis Dispensary named after N.V. Postnikov, u.d.mashkova@gmail.com; Balabanova Yanina, MD, Senior research associate, Queen Mary College, University of London, y.balabanova@qmul.ac.uk; Makurina Olga, PhD, professor, Biochemistry Department, Samara State University, makurina.on@mail.ru