

УДК 616-002.5:579.253:579.873.21

ETR-VNTR ТА ГРУПОСПЕЦИФІЧНЕ SNP-ТИПУВАННЯ ШТАМІВ *Mycobacterium tuberculosis*, ЩО ЦИРКУЛЮЮТЬ У м. КИЄВІ

Ю.О. ЧЕРЕДНИК¹, О.В. АНОПРІЄНКО², Н.Г. ГОРОВЕНКО³, Ю.І. ФЕЩЕНКО¹

¹ ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф.Г. Яновського НАМН України»

Україна, 03680, Київ-680, вул. М. Амосова, 10

² Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

Україна, 03143, Київ-143, вул. Заболотного, 150

³ Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України

Україна, 03112, м. Київ, вул. Дорогожицька, 9

e-mail: yurach@ukr.net

Мета. Визначити генетичні профілі штамів *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), які циркулюють у м. Києві, за допомогою VNTR-типування (Varied Number of Tandem Repeats – типування варіабельних за кількістю тандемних повторів), SNP-типування (Single Nucleotide Polymorphism – поліморфізм поодиноких нуклеотидів) та делеційного аналізу і оцінити ефективність обраної комплексної стратегії генотипування. **Методи.** 120 ізолятів від хворих на туберкульоз легень м. Києва охарактеризовано за допомогою ПЛР-методів типування: ETR-VNTR (за локусами ETR (Exact Tandem Repeats) A, B, C, D, E), SNP-типування групоспецифічних SNP *katG*⁴⁶³ та *gyrA*⁹⁵ за допомогою ПДРФ-аналізу (поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів) та делеційного ПЛР-аналізу (делеція TbD1). **Результати.** Виявлено найрозповсюдженіші генетичні варіанти МБТ, які відповідають родинам першої «принципової генотипової групи» (ПГГ-1) Beijing (42435) та ПГГ-2 LAM (22232). У популяції 56,7% становили штами ПГГ-1, 29,2% – ПГГ-2 і 14,2% – ПГГ-3. 92,6% штамів, що належать до ПГГ-1, становили штами родини Beijing. Групоспецифічне SNP-типування дещо підвищує дискримінаційну здатність VNTR-типування на основі 5 ETR локусів. **Висновки.** Генотипування на основі SNP- і VNTR-типування адекватніше відображає еволюційну спорідненість штамів МБТ, ніж VNTR-типування на основі ETR та MIRU, і потребує подальшої оптимізації для підвищення дискримінаційної здатності методу.

Ключові слова: *Mycobacterium tuberculosis complex*, генотипування, ETR-VNTR, SNP-типування.

Вступ. Значні зусилля у напрямку боротьби з однією з найнебезпечніших хвороб людини – туберкульозом (ТБ) привели до того, що ТБ став не тільки виліковним захворюванням, а й контрольованим за допомогою комплексу заходів, що поєднують ефективну діагностику, адекватне повнооб'ємне лікування та соціально-епідеміологічний моніторинг [1]. На новому рівні усвідомлення важливості та небезпечності ТБ як суспільної загрози пов'язане з коепідемією туберкульозу з ВІЛ/СНІД, виникненням і поширенням мультирезистентних штамів МБТ та посиленням міграційних потоків.

Методи генетичного типування клінічних штамів *M.tuberculosis complex* (МТК) довели свою ефективність у контролюванні ТБ. Маркери типування повинні, з одного боку, мати певний ступінь варіабельності для забезпечення високого рівня дискримінаційної здатності методу на основі цих маркерів, з другого боку – бути достатньо стабільними. Мономорфні види, до яких належать й патогени людини і тварин МТК, виявили напрочуд низький ступінь гетерогенності послідовностей їхньої ДНК [2]. Методи, що використовуються для генотипування ізолятів МТК, базуються на різних за природою повторюваних елементах – кластеризованих коротких паліндромних повторях (локус DR – Direct repeat – основа методу споліготипування), розсіюваних повторях (MIRU (Mycobacterial interspersed repeat units), ETR (Exact tandem repeats) – мішені методу VNTR-типування варіабельних за кількістю тандемних повторів) та мобільних елементах (IS6110 – IS6110-ПДРФ). Загальною властивістю таких повторів є їх менша стабільність порівняно з SNP- та LSP-маркерами (поліморфізмом поодиноких нуклеотидів і довгих послідовностей), що робить більш вірогідними конвергентні події, які можуть призводити до детекції фальш-ідентичних генотипів [2, 3]. Проте для виявлення філогенетично значущих SNP та LSP знадобився тривалий і екстенсивний аналіз геномів МТК.

«Золотим стандартом» типування МТК тривалий час був метод IS6110-ПДРФ, оскільки його дискримінуюча здатність була (з певними застереженнями) максимальною. Проте, маючи й відомі недоліки [4], він поступово замінюється більш швидкими й зручними ПЛР-методами типування. Для підвищення дискримінуючої здатності ПЛР-типування виникає необхідність у збільшенні кількості локусів, що аналізуються (з 5 ETR до 24 MIRU, з 43 до 94 спейсерів локусу DR) [5, 6]. Це підвищує

вартість аналізу, ускладнює ПЛР-процедуру і ставить питання щодо доцільності їх широкого використання у скринінгових дослідженнях, які передбачають експрес-аналіз великої кількості зразків.

Метою даного дослідження було визначення генотипів штамів МБТ, що циркулюють у м. Києві, за допомогою комплексного підходу, що включає методи ETR-VNTR-типування на основі 5 класичних тандемних повторів (локуси ETRA, B, C, D, E), SNP-типування групспецифічних SNP *katG*⁴⁶³ та *gyrA*⁹⁵ та характеристику штамів на наявність специфічного для сучасних штамів *M.tuberculosis* LSP – делеції TbD1, а також проведення оцінки ефективності такої стратегії та аналіз шляхів мінімізації використання великої кількості мішеней та визначення найінформативніших маркерів.

Матеріали і методи

Характеристика зразків. Культури мікобактерій туберкульозного комплексу отримано протягом 2006–2011 років випадковим чином від 120 хворих на легеневий туберкульоз (ЛТБ) пацієнтів: 14 жінок (11,7 %) та 106 чоловіків (88,3 %), що проживають у м. Києві. Діагноз туберкульозу встановлено лікарями-фтизіатрами за даними рентгенологічно-флюорографічних та клінічних обстежень, під час перебування пацієнтів в ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф.Г. Яновського НАМН України» та Київській міській протитуберкульозній лікарні №1 з 2006 по 2011 рік згідно з Наказом МОЗ України № 384 від 09.06.06.

Культивування штамів та виділення ДНК. При надходженні хворого в стаціонар зразки мокротиння аналізували мікроскопічним (забарвлення за Цілем-Нільсенном) і мікробіологічними (посів на середовище Левенштейна-Йенсена) методами за стандартними методиками [7]. Матеріалом для молекулярно-генетичного дослідження була виділена від хворих культура МБТ. Ви-

ділення ДНК проводили відповідно до протоколу в інструкції виробника тест-системи «DNA extraction kit» (Seegene, Inc. Korea). Зразки ДНК накопичували і зберігали при -70°C . Для ампліфікації використовували 1–3 мкл з 200 мкл супернатанту, що містив досліджувану ДНК.

Методи генотипування. ETR-VNTR-типування проводили аналогічно Frothingham із співавт. [8]. За стандартною схемою ДНК-зразок характеризували сукупністю чисел кількості копій кожного з 5 тандемних повторів (локуси ETR A, B, C, D, E), що виражається в п'ятизначному номері. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) виконували за допомогою Taq-полімерази (Fermentas) у 20 мкл реакційної суміші, що містила буфер для полімерази, 300 мкМ dNTP, по 10 pmol прямого й зворотного праймерів для кожного з локусів, 1 од. Taq-полімерази і досліджувану ДНК. Як стандарт молекулярної маси використовували плазмідну ДНК pBluescript SK+, оброблену рестриктазою MspI.

Праймери для SNP-типування були сконструйовані за допомогою програми Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, США) (табл. 1). Проводили поступове розділення штамів: на першому етапі розділяли штами ПГГ-1 та ПГГ-2/3, на другому – ПГГ-2 і ПГГ-3. Для першого етапу проводили ПЛР до SNP *katG*⁴⁶³. Поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) встановлювали обробкою ПЛР-продукту розміром 343 п.н. рестриктазою MspI. Розмір фрагментів для штамів ПГГ 2/3 становив 198 п.н., 80 п.н. і 65 п.н. для штамів ПГГ-1 – 198 п.н. і 145 п.н. Система праймерів на групо-специфічну мутацію в положенні 95 гена *gyrA* включала праймер GyrA-F та праймер GyrA-r1 з модифікацією передостаннього нуклеотиду для створення сайту рестрикції SmaI. Обробка рестриктазою SmaI виявляла ПДРФ для штамів ПГГ-2 – 53 п.н +25 п.н. ПГГ-3 – 78 п.н. Для визначення делеції TbD1 використо-

ували праймери TbD1intS.F, TbD1intS.R і TbD1fla1-F, TbD1fla1-R та умови реакції згідно з [9].

Таблиця 1. Послідовності праймерів, що застосовані для SNP -типування МБТ

SNP	Назви праймерів	Послідовності праймерів (5'-3')
<i>katG</i> ⁴⁶³	F463 R463	ccgaccatgctggccactgacct cgcttgcgctaccacggaacg
<i>gyrA</i> ⁹⁵	GyrA-F GyrA-r1	cgagaccatgggcaactacca accagggctgggccaatgcs- caccg

ПЛР реакції виконували на ампліфікаторі 2720Tc (Applied Biosystems, США). Продукти ПЛР розділяли в агарозному (2,5 – 3 %) або поліакриламідному (8 %) гелях із забарвленням бромистим етидієм і візуалізували на УФ-трансліюмінаторі з подальшою архівацією за допомогою системи аналізу результатів BG62-A2010 Gel Doc system Felix 1010 (Biostep, Німеччина).

Аналіз даних. Дані частот генотипів представлені у вигляді середніх значень та стандартного відхилення. Дискримінаційний індекс (HGDI – Hunter-Gaston Discriminatory index) [10] розраховували за формулою:

$$HGDI = 1 - \left[\frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1) \right],$$

де N – загальна кількість штамів у популяції, S – кількість генотипів, n_j – кількість штамів, що належать до j -ої групи.

Кластерний аналіз і побудову дендрограм за алгоритмом UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) з використанням коефіцієнта «categorical» здійснювали за допомогою програми у базі даних MIRU-VNTRplus (<http://www.MIRU-VNTRplus.org>) [11]. Ідентифікацію штаму до певного типу або родини проводили з використанням бази даних MIRU-VNTRplus, а також опублікованих даних інших авторів [12–14].

Результати та обговорення

Стратегія генотипування, що була застосована для характеристики штамів МБТ, які циркулюють серед хворих м. Києва, заснована на еволюційній дивергенції трьох принципових генотипічних груп (ПГГ 1, 2, 3) представників МТК [15]. Штами *M. tuberculosis* з урахуванням поліморфізмів *katG*⁴⁶³, *gyrA*⁹⁵ і TbD1 можна розділити на 4 еволюційні групи: група предкових штамів (TbD1+, *katG*⁴⁶³ CTG, *gyrA*⁹⁵ ACC), сучасні штами МБТ ПГГ-1 (TbD1-, *katG*⁴⁶³ CTG, *gyrA*⁹⁵ ACC) та сучасні штами МБТ ПГГ-2 (TbD1-, *katG*⁴⁶³ CGG, *gyrA*⁹⁵ ACC) і ПГГ-3 (TbD1-, *katG*⁴⁶³ CGG, *gyrA*⁹⁵ AGC).

Безпосередньо ETR-VNTR-типування дозволяє визначити найрозповсюдженіші родини до певної міри споріднених штамів і об'єднувати їх у кластерні групи на підставі подібності профілів. На першому етапі здійснювали ETR-VNTR-типування за локусами ETRA, B, C, D (MIRU04) і E (MIRU31) 120 штамів МБТ, виділених від пацієнтів у м. Києві, яке виявило 22 різних ETR-генотипи. Як контрольні були генотиповані лабораторний штам *M. tuberculosis* H37Rv та *M. bovis* BCG. Серед клінічних штамів найчастіше зустрічалися генотипи профілів 42435 – 56 ізолятів, 22232 – 12 ізолятів і 32333 – 7 ізолятів. Загалом за результатами ETR-VNTR-типування 111 ізолятів входили до 13 кластерів різного розміру (від 56 до 2). Без додаткових маркерів база даних MIRU-VNTR_{plus} не дозволяє ідентифікувати більшість генотипів, зокрема 42435 і 22232, які за даними аналізу інших досліджень належать до найрозповсюдженіших як у світі, так і у країнах колишнього Радянського Союзу, родин Beijing та LAM (Latin American Mediterranean) [13, 14].

З обраних нами для генотипування SNP та LSP база даних MIRU-VNTR_{plus} містить делецію TbD1 та SNP *katG*⁴⁶³. Без урахування TbD1 деякі штами тільки за даними ETR-VNTR типування були віднесені MIRU-VNTR_{plus} до штамів *M. africanum*. При ви-

значенні наявності TbD1 у геномах відібраних ізолятів, усі 120 зразків показали делецію цієї ділянки, тобто належали до сучасних штамів *M. tuberculosis*. Контрольний штам *M. bovis* BCG показав наявність цієї ділянки в геномі. Результати ETR-VNTR-типування з урахуванням делеційного аналізу у вигляді дендрограми наведено на рисунку.

У табл. 2 наведено дані частотного розподілу ETR-алелів, який дозволяє підраховувати дискримінаційний індекс HGDI, або ступінь алейного поліморфізму, для кожного локусу.

На наступному етапі ізоляти були типовані по відношенню до SNP*katG*⁴⁶³ та *gyrA*⁹⁵ за допомогою ПЛР і ПДРФ. Загалом, 68 ізолятів (56,7 %) були віднесені до ПГГ-1, 35 (29,2 %) – до ПГГ-2 і 17 (14,2 %) – до ПГГ-3. На дендрограмі (рисунок) зазначено встановлену приналежність штамів до певної ПГГ. Чотири кластерні групи містили ізоляти, що належать до різних ПГГ, один кластер (32432) поєднував штами ПГГ-1 і ПГГ-3 і три кластери (32333, 22232 і 42433) – ПГГ2 і ПГГ-3. Таким чином, ETR-VNTR-типування окремо і ETR-VNTR та групспецифічне SNP-типування дають дещо відмінні результати кластеризації штамів і мають різні дискримінуючі здатності (табл. 3).

SNP-типування дозволило точніше визначити родини штамів і оцінити кількісний склад популяції клінічних штамів МБТ у м. Києві (табл. 4).

Таким чином, структура популяції Києва загалом досить гетерогенна, проте представлена сучасними штамми МБТ (TbD1-) з домінуванням штамів першої ПГГ. Штами родини Beijing складають абсолютну більшість – щонайменш 52,5 % від усіх проаналізованих ізолятів (з урахуванням того, що серед штамів, зарахованих до групи «інші», ПГГ-1 теж можуть бути Beijing-штами) і 92,6 % від кількості штамів, що належать до ПГГ-1. За частотними

Таблиця 2. Розподіл ETR-алелей серед ізолятів МБТ м. Києва

Локус	Кількість ізолятів для вказаних алельних варіантів ETR						HGDI	HGDI інші досл.
	1	2	3	3s	4	5		
ETR-A		20	21		79		0,51	0,554 [16] 0,701 [17]
ETR-B		120					0,0	0,018 [17] 0,71 [18]
ETR-C	16	12	84		8		0,48	0,419 [16] 0,659 [17]
ETR-D		2	116	1	1		0,06	0,557 [16] 0,089 [17]
ETR-E	1	28	25		7	59	0,663	0,106 [16] 0,636 [17]

характеристиками проаналізована вибірка, схожа з деякими популяціями МБТ Російської Федерації (близько 50 % штамів родини Beijing та 9–10 % – LAM) [19–21], тоді як серед клінічних ізолятів Харківської області частка штамів родини Beijing була суттєво нижчою (34 %), а частка LAM збігалася з встановленою для Болгарії (23 % і 22 % відповідно) [16, 22]. До 40 % штамів Beijing було виявлено в популяції МБТ Одеської області [17]. Причини таких роз-

біжностей в українських популяціях, ймовірно, криються у структурах вибірок, що потребує розширеного аналізу. Присутність тільки TbD1-штамів була дещо передбачуваною з огляду на дані інших регіонів колишнього Радянського Союзу, проте динамічні міграційні процеси у світі можуть вносити свої корективи і потребувати прискіпливішого моніторингу.

Оцінка ступеня алельного поліморфізму п'яти ETR-локусів для штамів київської

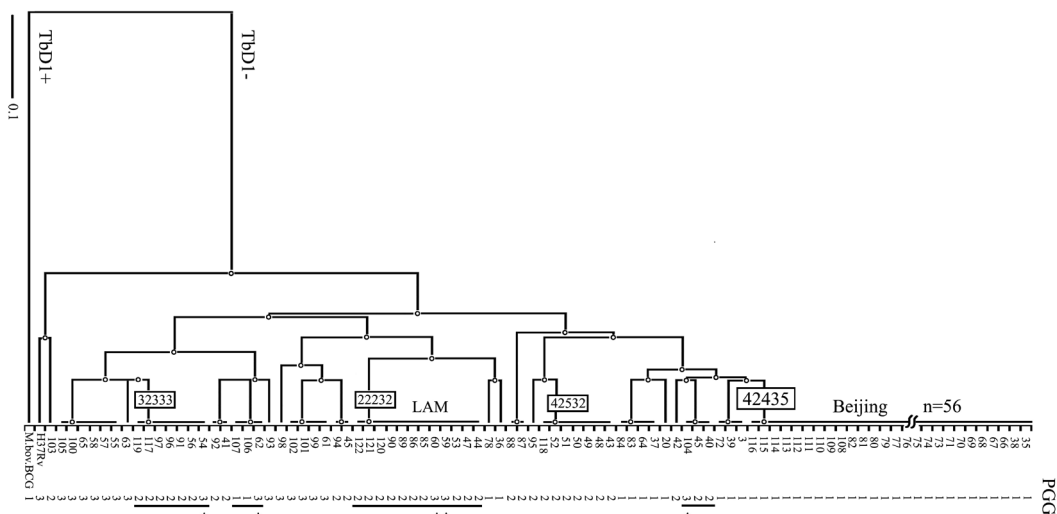


Рисунок. Дендрограма кластеризації 120 ізолятів МБТ, виявлених в м. Києві, на основі ETR-VNTR-типуння за локусами А, В, С, D і Е, та делеційного аналізу, побудована програмою бази даних MIRU-VNTRplus на основі алгоритму UPGMA. Підкреслено кластери зі штамми, що належать до різних ПГГ (позначені зірочками)

Таблиця 3. Порівняння двох варіантів типування

Метод	Співвідн. поодин./ кластер. ізоляти	Кількість кластерів	Штами, що кластеризуються, %	HGDI
ETR-VNTR	9/111	13	92,5	0,763
ETR-VNTR+SNP	12/108	14	90,0	0,768

Таблиця 4. Кількісний склад за ETR- та SNP-генетичними профілями штамів МТБ м. Києва

Склад	PGG 1				PGG 2					PGG 3		
	42435 Bj	42434 Bj	42335 Bj	Інші	22232 LAM	32333 Haarl.	42532 UR/Ug	42423 Camer.	Інші	32433	22433	Інші
N	56	4	3	5	10	6	7	2	10	6	4	7
%	46,7 ±6,8	3,3 ±1,6	2,5 ±1,3	4,2 ±1,8	8,3 ±2,8	5,0 ±2,1	5,8 ±2,2	1,7 ±1,6	8,3 ±2,8	5,0 ±2,1	3,3 ±1,6	5,8 ±2,2

Примітка. Скорочено вказані назви сімейств: Bj- Beijing; Haarl. – Haarlem; UR/Ug – URAL/Uganda; Camer. – Cameroon; Інш. – інші генотипи.

популяції виявила один низькополіморфний (ETR-D(MIRU04), HGDI < 0,3) і один мономорфний локус (ETR-B, HGDI=0), що збігається з даними для одеської популяції (табл. 2) [17]. Загалом, ці локуси виявляють себе низькополіморфними у багатьох популяціях [13, 23]. Проте цікаво, що є популяції з помірними (від 0,3 до 0,6) і навіть високими (>0,6) індексами поліморфізму цих локусів (табл. 2). Загалом дискримінаційна здатність ETR та MIRU-локусів залежить від еволюційної лінії МБТ, а дискримінаційні індекси, що значно відрізняються, можуть відображати превалювання різних еволюційних ліній в обраних регіонах. Тому для різних територій можлива і доцільна розробка й дещо відмінних стратегій генотипування [17, 23, 24]. Для регіонів із превалюванням родини Beijing слабоінформативним може бути метод споліготипування. Так, при аналізі одеської популяції HGDI для споліготипування штамів родини Beijing становив лише 0,173, а MIRU-VNTR для 15 локусів 0,723, що є високим показником, проте значно меншим, ніж для штамів, що не належать до родини Beijing (0,982). При аналізі Beijing-штамів взагалі лише один локус виявив помірний поліморфізм (MIRU26 HGDI>0,3), інші – значно нижчі. Для 6 ізолятів дані споліготи-

пування і MIRU-VNTR за 15 локусами не збігались, і помилково типували (за одним із методів) штами родини Beijing [17]. Псевдо-Beijing штами за даними споліготипування виділяли і в інших популяціях [3]. У деяких дослідженнях роблять висновки про те, що такі факти можуть відображати змішаність культур у цих «ізолятах» [17]. Проте накопичена на даний час інформація впевнено свідчить про те, що ці дані відображають менш стабільну природу повторюваних елементів і конвергентні події – феномен, який отримав назву гомоплазії [2]. Розраховані індекси гомоплазії для різних методів генотипування МБТ розподіляються по низхідній таким чином: 0,463 – для споліготипування; 0,236 – 15-локусне MIRU-VNTR; 0,172 – 24-локусне MIRU-VNTR; 0,006 – SNP-типівання [2].

Отже, на наш погляд, для точнішого встановлення епідеміологічних зв'язків штамів до стратегії генотипування необхідно включати стабільніші SNP-маркери і використовувати невеликий набір високополіморфних MIRU і ETR-локусів. Для різних популяцій пропонували дещо відмінні мінімальні набори. Локуси MIRU26, MIRU31(ETR-E) MIRU40, ETR-A були запропоновані при дослідженні одеської по-

пуляції [17]. Набір MIRU40, Mtub04, Mtub21, QUB-11b, QUB-26 показав велику дискримінаційну здатність при типунні популяції Болгарії [16]. Екстенсивний аналіз SNP *M. tuberculosis* виявив із 212 поліморфних локусів мінімальний набір SNP, які відділяють 6 філогенетично окремих SNP-кластерних груп (SCG) і 5 підгруп [25]. Таким чином, на основі аналізу наших даних та даних інших досліджень для підвищення дискримінаційної здатності стратегії генотипування можна запропонувати набір локусів ETR-A, ETR-C, MIRU31 (ETR-E) і MIRU26, MIRU40 та, з огляду на збагаченість київської популяції штамми родини Веїїнг, доповнити групспецифічні SNP-локусами, що поділяють цю родину на підгрупи [26, 27].

Висновки

Стратегія генотипування штамів МБТ на основі комбінації SNP-типуння і VNTR-типуння більш адекватно відображає еволюційну спорідненість штамів, ніж VNTR-типуння на основі ETR та MIRU, і є ефективнішою для вивчення локальних і глобальних епідеміологічних зв'язків та еволюційного аналізу МБТ, але вона потребує подальшої оптимізації для підвищення дискримінаційної здатності.

Перелік літератури

1. ВОЗ. Доклад о глобальной борьбе с туберкулезом. 2012г. http://www.who.int/tb/publications/global_report/ru/index.html
2. Comas I., Homolka S., Niemann S., Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies // PLoS One – 2009. – Vol. 4, № 11. – P. 7815.
3. Fenner L., Malla B., Ninet B. et al. «Pseudo-Beijing»: evidence for convergent evolution in the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*. // PLoS One – 2011. – Vol. 6, № 9. – P. 24737.
4. Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R. et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains:

interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol.37, № 8. – P. 2607–2618.

5. van Embden J.D., van Gorkom T., Kremer K. et al. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria // J. Bacteriol. – 2000. – Vol. 182, № 9. – P. 2393–4201.
6. 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. – Vol. 44, № 12. – P. 4498–4510.
7. Наказ МОЗ України №45 від 06.02.2002 «Про затвердження інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції» /складена під керівництвом Фещенко Ю.І., Журило О.А., Клименко М.Т., та ін. // Зб. норм.-директ. документів з охорони здоров'я. – 2002. – № 2. – С. 63–111.
8. Frothingham R., Meeker-O'Connell W.A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats // Microbiology – 1998. – Vol. 144. – P. 1189–1196.
9. Brosch R., Gordon S.V., Marmiesse M., et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2002. – Vol. 99, № 6. – P. 3684–3689.
10. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity // J Clin Microbiol. – 1988. – Vol. 26, № 11. – P. 2465–2466.
11. Allix-Bügues C., Harmsen D., Weniger T., et al. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46, №8. – P. 2692–2699.
12. Sola C., Ferdinand S., Mammina C., Nastasi A., and Rastogi N. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily based on spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with a spoligotyping database for population-based analysis // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39, № 4. – P. 1559–1565.
13. Zheltkova E., Raddy M.C., Malomanova N. et al. Typing of *Mycobacterium tuberculosis* cultures from Samara region by the variable number of tandem repeats // Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. – 2004. – Vol. 1. – P. 35–37.
14. Stepashina V.N., Ivanov I.I., Lipin M.I., Shemiakin I.G. Characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains genotype A1 // Mol.

- Gen. Mikrobiol. Virusol. – 2006. – Vol. 2. – P. 29–33.
15. Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K.E. et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94, № 18. – P. 9869–9874.
 16. Valcheva V., Mokrousov I., Narvskaya O., Rastogi N. and Markova N. Utility of new 24-locus Variable-Number Tandem-Repeat typing for discriminating *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates collected in Bulgaria // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46, № 9. – P. 3005–3011.
 17. Николаєвський В. В. Оптимізація стратегії генотипування штамів *Mycobacterium tuberculosis* в Одеській області України: порівняння методів споліготикування та VNTR. // Одеський медичний журнал – 2005. – Vol. 89, № 3. – С. 32–38.
 18. Go Eun Choi, Mi Hee Jang, Hyun-Jung Cho, et al. Application of single-nucleotide polymorphism and Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats analyses to clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea // Korean J. Lab. Med. – 2011. – Vol. 31. – P. 37–43.
 19. Norkina O.V., Kinsht V.N., Mokrousov I.V. et al. The genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and an assessment of risk factors of tuberculosis spread in Russia's Siberian region by molecular epidemiological methods // Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. – 2003. – Vol. 3. – P. 9–18.
 20. Mokrousov I., Otten T., Vyazovaya A., et al. PCR-based methodology for detecting multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family circulating in Russia // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 22, № 6. – P. 342–348.
 21. Kovalev S.Y., Kamaev E.Y., Kravchenko M.A. et al. Genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU-VNTR genotyping // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2005. – Vol. 9, № 7. – P. 746–752.
 22. Dymova M.A., Liaschenko O.O., Poteiko P.I. et al. Genetic variation of *Mycobacterium tuberculosis* circulating in Kharkiv Oblast, Ukraine // BMC Infect. Dis. – 2011. – Vol. 11. – P. 77–87.
 23. Mokrousov I., Narvskaya O., Limeschenko E. et al. Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42, № 6. – P. 2438–2444.
 24. Sun Y.J., Lee A.S., Ng S.T. et al. Characterization of Ancestral *Mycobacterium tuberculosis* by multiple genetic markers and proposal of genotyping strategy // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42, № 11. – P. 5058–5064.
 25. Filliol I., Motiwala A.S., Cavatore M. et al. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set // J. Bacteriol. – 2006. – Vol. 188, № 2. – P. 759–772.
 26. Rad M. E., Bifani P., Martin C. et al. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family // Emerg. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 9, № 7. – P. 838–845.
 27. Hanekom M., van der Spuy G. D., Streicher E. et al. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease // J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 45, № 5. – P. 1483–1490.

Представлено Л.Л. Лукаш
Надійшла 1.10.2013

ETR-VNTR И ГРУППОСПЕЦИФИЧЕСКОЕ SNP-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В г. КИЕВЕ

Ю.А. Чередник¹, О.В. Аноприенко²,
Н.Г. Горovenко³, Ю.И. Фещенко¹

¹ ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии имени Ф.Г. Яновского АМН Украины»
Украина, 03680, Киев-680, ул. Н. Амосова, 10

² Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины

Украина, 03143, Киев-143, ул. Заболотного, 150

³ Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика МОЗ
Украины

Украина, 03112, г. Киев, ул. Дорогожицкая, 9

e-mail: yurach@ukr.net

Цель. Определить генетические профили штаммов *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), циркулирующих в г. Киеве, с помощью VNTR-типирования (Varied Number of Tandem Repeats), SNP-типирования (Single Nucleotide Polymorphism) и делеционного анализа и оценить эффективность такой комплексной стратегии генотипирования. **Методы.** 120 изолятов от больных туберкулезом легких, проживаю-

щих в г. Киеве, были охарактеризованы с помощью ПЦР-методов типирования: ETR-VNTR (по локусам ETR (Exact Tandem Repeats) A, B, C, D, E), SNP-типирования группоспецифических SNP *katG*⁴⁶³ и *gyrA*⁹⁵ с помощью ПДРФ-анализа (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) и делеционного ПЦР-анализа (делеция TbD1). **Результаты.** Выявлены наиболее распространенные генетические варианты МБТ, которые соответствуют семействам ПГГ -1 Beijing (42435) и ПГГ-2 LAM (22232). В популяции 56,7 % составляли штаммы ПГГ-1, 29,2 % – ПГГ-2 и 14,2 % – ПГГ-3, 92,6 % штаммов, принадлежащих к ПГГ-1, составляли штаммы семействам Beijing. Группоспецифическое SNP-типирование незначительно повышает дискриминационную способность VNTR-типирования на основе 5 ETR-локусов. **Выводы.** Генотипирование штаммов МБТ на основе SNP- и VNTR-типирования более адекватно отражает эволюционное родство штаммов, чем VNTR-типирование на основе ETR и MIRU, и нуждается в дальнейшей оптимизации для повышения дискриминационной способности метода.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis* complex, генотипирование, ETR-VNTR, SNP-типирование.

ETR-VNTR AND SNP-TYPING OF PRINCIPAL GENOTYPIC GROUPS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS CIRCULATING IN KYIV

*Yu.O. Cherednyk*¹, *O.V. Anopriyenko*², *N.G. Gorovenko*³, *Yu.I. Feschenko*¹

¹ SO «F.G. Yanovskyi National institute of phthisiology and pulmonology, NAMS of Ukraine» Ukraine, 03680, Kyiv, N. Amosova str., 10
² Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str.,

150

³ P.L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, NAMS of Ukraine Ukraine, 03112, Kyiv, Dorogozhytska str., 9 e-mail: yurach@ukr.net

Aim is to determine the genetic profiles of *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) strains that circulate in Kyiv by VNTR (Varied Number of Tandem Repeats), SNP-typing (Single Nucleotide Polymorphism) methods and deletion analysis, and assess the effectiveness of the chosen complex strategy of genotyping.

Methods. 120 isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Kyiv were characterized by PCR typing methods: ETR-VNTR (for ETR (Exact Tandem Repeats) A, B, C, D, E loci), SNP-typing of group-specific SNP *katG*⁴⁶³ and *gyrA*⁹⁵ by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) and deletion PCR analysis (TbD1 deletion). **Results.** We found the most common genetic MBT variants, which correspond to the families of the first «principal genotypic group» (PGG-1) Beijing (42435) and PGG-2 LAM (22232). The population is composed of PGG-1 strains (56.7%) PGG-2 strains (29.2 %), and PGG-3 strains (14.2 %). 92.6 % of strains belonging to PGG-1 were from Beijing family. Group-specific SNP-typing somewhat increases the discriminatory ability of VNTR-typing based on 5 ETR loci. **Conclusions.** Genotyping based on SNP- and VNTR- typing more adequately reflects the evolutionary relationship of *Mycobacterium tuberculosis* strains than VNTR-typing based on MIRU and ETR and requires further optimization to improve the discriminatory ability of the method.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis* complex, genotyping, ETR-, VNTR-, SNP-typing.