

Д. Н. Дешиц, В.В. Слипень
БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ
ГЕНОТИПОВ *Mycobacterium tuberculosis*

Научный руководитель канд. мед. наук, доц. В. В. Слипень

*Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии,
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

Резюме. В работе представлены данные по частоте встречаемости генотипа *Beijing* у пациентов с легочной формой туберкулеза. Найдены специфические генетические маркеры, которые могут быть использованы в экспресс-генотипировании *M. tuberculosis* в клинической практике.

Ключевые слова: туберкулез, генотип *Beijing*, полиморфизм генов.

Resume. In work data are submitted on the frequency of occurrence of a genotype of *Beijing* at patients with a pulmonary form of tuberculosis. Are found specific genetic markers which can be used in express genotyping of *M. tuberculosis* in clinical practice.

Keywords: tuberculosis, genotype *Beijing*, polymorphism of genes.

Актуальность. В настоящее время туберкулез остается одной из наиболее значимых проблем здравоохранения во всем мире. Туберкулез является одной из 10 ведущих причин смерти от инфекционной патологии в мире. В 2015 году туберкулезом заболели 10,4 миллиона человек, и 1,8 миллиона человек (в том числе 0,4 миллиона человек с ВИЧ) умерли от этой болезни. В РБ заболеваемость туберкулезом в 2015 году составила 32,9 на 100 000 населения, а смертность от него 4,1 на 100 000 населения. Также проблема туберкулеза актуальна с экономической точки зрения. Высокие показатели ШЛУ и МЛУ туберкулеза могут быть связаны с распространением определенного эпидемического генотипа МБТ. Расшифровка структуры генотипов МБТ, циркулирующих в нашей стране, в соседних и в мире может создать предпосылки к разработке специфических противоэпидемических мероприятий.

Актуальность исследования генотипов обусловлена отсутствием внедренных в практику отечественного здравоохранения методик генотипирования микобактерий туберкулеза, а также ограниченными данными о геномном полиморфизме штаммов *M. tuberculosis* в Республике Беларусь.

Цель: изучить генетическую структуру циркулирующих в Республике Беларусь *M. tuberculosis* (МБТ) для выявления причин роста лекарственно-резистентного туберкулеза среди пациентов.

Задачи:

1. Определить частоту встречаемости МБТ генотипа *Beijing* у пациентов с туберкулезом.
2. Произвести поиск генетических сигнатур эпидемически значимых генотипов, которые можно использовать в экспресс-генотипировании МБТ в клинической практике.

Материал и методы. Были изучены клинические изоляты 48 микобактерий, из них 45 принадлежало *M. tuberculosis*, полученных от впервые выявленных и ранее леченых пациентов, больных туберкулезом легких из разных областей РБ и 5 принадлежало микобактериям другой этиологии. Использован молекулярно-генетический

метод: ПЦР в реальном времени с флюоресцирующими ДНК-зондами для детекции генотипа *Beijing*.

Экстракцию бактериальной ДНК проводили следующим образом: в 100 мкл 5% Chelex-100 в 1хТАЕ буфере вносили полную бактериальную петлю чистой культуры микобактерий; инкубировали при 95°C – 25 минут, клеточный дебрис осаждали ультрацентрифугированием (14000 об/мин – 10 мин).

Исследуемую экстрагированную ДНК в количестве 10 мкл вносили в 40 мкл ПЦР-смеси, содержащей из расчета на одну реакцию: а) 10хПЦР буфера – 5 мкл; б) 25 mM MgCl₂ – 5 мкл; в) раствор нуклеотидов (200 мкМ) – 5 мкл; г) Taq-полимеразу – 2 ед.; д) праймеры (по 20 пкмоль) и зонд (10 пкмоль) для генотипа *Beijing* (VjF 5-CTCGGCAGSTTCSTCGAT-3, VjR 5-CGAACTCGAGGCTGCCTACTAC-3, зонд – VjTM 5-R6G-ACGCCAGAGACCAGCCGCCGGCT-BHQ1-3); е) праймеры (по 20 пкмоль) и зонд (10 пкмоль) для микобактерий не генотипа *Beijing* (nVjF 5-AAGCATTCCTTG ACAGTCGAA -3, nVjR 5-GGCGCATGACTCGAAAGAAG-3, зонд – nVjTM 5-6FAM-TCCAAGAGGGTCTTTG-BHQ1-3); ж) деионизованную воду – add 40 мкл.

Аmplификацию осуществляли с использованием следующего режима: 94 °C – 4 мин, 45 циклов (95 °C – 30 с, 60 °C – 70 с). Детекцию флюоресценции проводили после каждой стадии отжига на каналах FAM и R6G.

Изучен полиморфизм генов *KatG*, *MgtC*, *Cyp121*, *VarC31* основных генотипов МБТ с помощью методов биоинформационного анализа. Первичная структура генов была получена из баз проекта Human Microbiome Project, NCBI, TubList, TBDB, Tbvar. Выравнивание и филогенетический анализ генов, оценка сходства и различий генов проводились с использованием программы MEGA7.

Результаты и их обсуждение. При проведении ПЦР в реальном времени были получены следующие результаты (рисунок):

1. В случае принадлежности МБТ к генотипу *Beijing* флюоресценция выше пороговой регистрировалась на канале R6G (красный).
2. В случае принадлежности МБТ к другим генотипам отмечалась флюоресценция на канале FAM (синий).
3. В случае микобактерий других видов флюоресценция не регистрировалась.

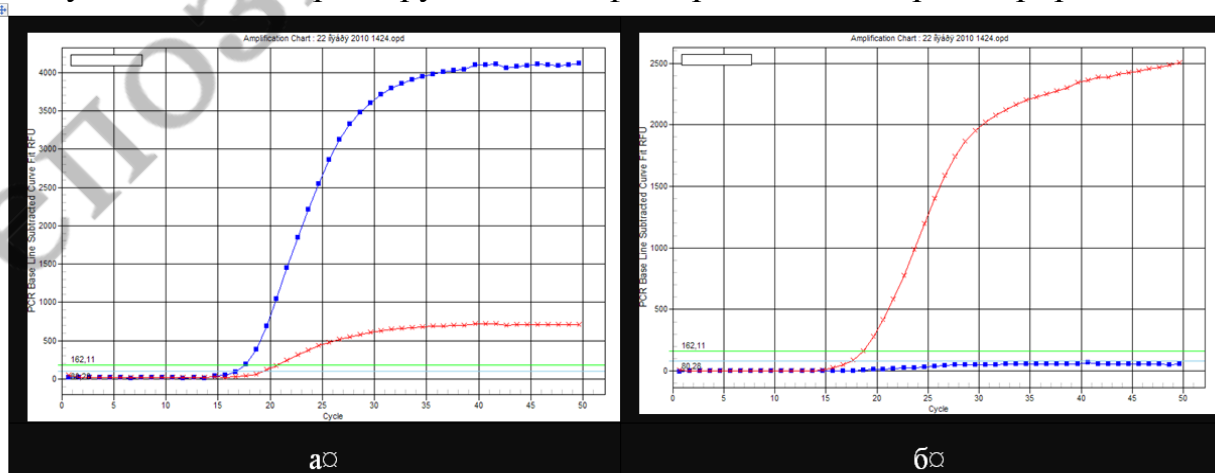


Рисунок 1 – Результаты ПЦР в реальном времени для идентификации штаммов генотипа *Beijing*

Было установлено, что из 43 культур *M. tuberculosis* 60,5% приходилось на долю генотипа *Beijing*. Из них 44,2% культур выделяли от пациентов мужского пола, 16,3% – женского. Из числа обследованных 52% были пациенты не из города Минска, у 33% пациентов, проживающих в других регионах (гомельской, гродненской, могилевской, витебской областях) культуры относились к генотипу *Beijing*, что свидетельствует о повсеместном распространении генотипа *Beijing* в РБ. У 26% исследованных пациентов был впервые выявленный туберкулез, у них частота выделения генотипа *Beijing* составляла 11,8%.

В связи с важностью экспресс детекции генотипов микобактерий с помощью нетрудоемких методов, которые можно использовать в клинической лабораторной диагностике, был произведен поиск генетических сигнатур основных генотипов *M. tuberculosis*, которые позволят идентифицировать ключевые генотипы микобактерий. При генетическом анализе полиморфизма генов *KatG* и *MgtC* не было найдено сигнатурных мутаций, характерных только для одного генотипа. Однако при анализе гена *Cyp121* была выявлена сигнатурная мутация, характерная для генотипа *Beijing* – замена аденина на цитозин в положении 388. Также была выявлена сигнатурная мутация в гене *VarC31*, характерная для генотипа CAS – выпадение аденина в положениях 63 и 64.

Выводы:

1. Показано доминирование генотипа *Beijing* у пациентов с туберкулезом, на долю которого приходилось 60,5% всех случаев ТБ, а также распространенность этого генотипа по всей территории РБ.

2. Частота выделения генотипа *Beijing* среди хронических пациентов была выше по сравнению с пациентами с впервые диагностированным туберкулезом - 48,9 и 11,6% соответственно.

3. Генотип *Beijing* приобретает эпидемическое распространение и требует проведения направленных противоэпидемических мероприятий.

4. Показаны сигнатурные мутации для генотипа *Beijing* (A388C в гене *Cyp121*) и для генотипа CAS (A63-, A64- в гене *VarC31*).

D. N. Dshchits, V. V. Slizen

BIOINFORMATION ANALYSIS OF GENETIC MARKERS OF GENOTYPES OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Tutor Candidate of Medical Sciences, associate professor V. V. Slizen

*Department of Microbiology, Virology, Immunology,
Belarusian State Medical University, Minsk*

Литература

1. Афанасьев, М. В. Молекулярное типирование клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / М. В. Афанасьев. – Москва, 2008. – 150 с.
2. Блаженко, Н. А. Фтизиопульмонология / Н. А. Блаженко, О. Н. Блаженко. – М.: Академия, 2006. – 20 с. – Библиогр.: с. 359.
3. Василенко, Н. В. Современные взгляды на генетические семейства *M. tuberculosis* / Н. В. Василенко, А. М. Будрицкий // Вестник ВГМУ. – 2014. – №5. – С. 16-22.

4. Генотипическая характеристика *M. tuberculosis* – возбудителей остро прогрессирующего деструктивного туберкулеза легких / О. В. Воронова, О. И. Уразова, Р. Р. Хасанова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – №1. – С. 12-18.

5. Туберкулез органов дыхания / под ред. Н. А. Блаженко. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2011. – 368 с.

6. Шитиков, Е. А. Геномная вариабельность возбудителей лекарственно-устойчивого туберкулеза, распространенных на территории Российской Федерации: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.04 / Е. А. Шитиков. – Москва, 2014. – 176 с.