

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА MIRU-VNTR ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

Е. В. АНТУШЕВА¹, И. В. ТАРАСОВА², П. И. ЕЛИСЕЕВ², А. О. МАРЬЯНДЫШЕВ¹

¹ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет», г. Архангельск

²ТБУЗ АО «Архангельский клинический противотуберкулезный диспансер», г. Архангельск

Цель исследования: научить эффективность применения молекулярно-генетического метода MIRU-VNTR при молекулярно-эпидемиологических исследованиях у больных туберкулезом легких.

Материалы и методы: 20 больных с рецидивом туберкулеза легких; 12 больных туберкулезом с гетерорезистентным результатом теста на лекарственную чувствительность микобактерий туберкулеза (МБТ); 7 человек, заболевших туберкулезом во время нахождения в медико-социальном учреждении; взрослый и ребенок из семейного очага туберкулеза, связь между заболеванием которых была сомнительной. Проводили сравнение генетического паттерна штаммов МБТ по 9-10 локусам MIRU-VNTR.

Результаты. Рецидивы туберкулеза в 55% случаев связаны с заражением новым штаммом МБТ, остальные случаи – реактивация эндогенного штамма МБТ. При гетерорезистентных результатах тестов на лекарственную чувствительность МБТ лишь у 1 (8,3%) из 12 пациентов обнаружено смешанное инфицирование двумя штаммами МБТ, в остальных случаях были МБТ одного генотипа, но с разной лекарственной устойчивостью. Расследование вспышки туберкулеза (7 заболевших) в закрытом медико-социальном учреждении доказало наличие нескольких разных источников заражения. Расследование семейного контакта доказало факт передачи инфекции в семейном очаге и установило источник заражения.

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы, микобактерии туберкулеза, туберкулез легких, рецидив туберкулеза, вспышка туберкулеза в закрытых учреждениях.

MIRU-VNTR TECHNIQUE FOR MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF TUBERCULOSIS

E. V. ANTUSHEVA¹, I. V. TARASOVA², P. I. ELISEEV², A. O. MARIANDYSHEV¹

¹Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia

²Regional Clinical TB Dispensary, Arkhangelsk, Russia

Goal of the study: to study the efficiency of using MIRU-VNTR molecular genetic technique for molecular epidemiological studies among pulmonary tuberculosis patients.

Materials and methods: 20 patients with pulmonary tuberculosis relapses, 12 pulmonary tuberculosis patients with hetero-resistant results of drug susceptibility testing, 7 patients who developed tuberculosis during staying in a medical social unit, one adult and one child exposed to tuberculosis in their families with doubtful correlation between their diseases. The genetic pattern of *M. tuberculosis* strains for MIRU-VNTR 9-10 loci have been compared.

Results. 55% of tuberculosis relapses are related to infection with a new *M. tuberculosis* strain, the remaining cases belong to re-activation of the endogenous strain of *M. tuberculosis*. In case of hetero-resistant results of DST the mixed infection with two strains of *M. tuberculosis* was found only in 1 (8.3%) out of 12 patients, in the remaining cases *M. tuberculosis* belonged to the one genotype but with different resistance patterns. Contact tracing of tuberculosis break-out (7 patients) in the closed medical social unit proved the presence of several sources of the infection. Contract tracing of the family exposure proved the actual infection transmission in the family and the source of the infection was identified.

Key words: molecular genetic techniques, tuberculous mycobacteria, pulmonary tuberculosis, tuberculosis relapse, tuberculosis break-out in closed units.

Молекулярно-генетические методы (МГМ) исследования микобактерий туберкулеза (МБТ) все шире применяются в изучении эпидемического процесса при туберкулезе [2]. МГМ позволяют достоверно подтвердить источник инфекции и установить скрытые контакты, что важно как на популяционном уровне, так и в индивидуальных случаях внутри очагов инфекции [4]. Одним из самых важных вопросов фтизиатрии является распространенность повторного заражения МБТ (так называемая «суперинфекция») при рецидиве туберкулеза [5]. МГМ позволяют сравнить генотипы микобактерий у впервые выявленных больных и при последующем рецидиве заболевания [3].

Трудности в трактовке лекарственной чувствительности МБТ, определяемой методом Genotype MTBDRplus, возникают при получении гетерорезистентного результата, что может быть обусловлено как присутствием в организме разных штаммов МБТ, так и ошибкой проведения теста. Инфицирование несколькими штаммами МБТ является клинически значимым явлением и может влиять на динамику заболевания. Провести дифференциальную диагностику и определить наличие нескольких штаммов МБТ у больного невозможно без применения методов молекулярно-эпидемиологических исследований [7].

МГМ MIRU-VNTR позволяет визуально оценить сходства и различия штаммов МБТ и может

использоваться в молекулярно-эпидемиологических исследованиях.

Цель исследования: изучить эффективность применения МГМ MIRU-VNTR при молекулярно-эпидемиологических исследованиях у больных туберкулезом легких, связанных с определением частоты повторного заражения МБТ при рецидиве заболевания, при трактовке гетерорезистентных результатов тестов лекарственной чувствительности МБТ, при расследовании вспышек туберкулеза в закрытых учреждениях и семейных очагах.

Материалы и методы

В ГБУЗ АО «АКПТД» в 2010, 2011, 2013, 2014 г. было зарегистрировано 120 пациентов с рецидивом туберкулеза. Для проведения сравнения генотипов микобактерий у больных туберкулезом при впервые выявленном заболевании (первый эпизод) и при рецидиве туберкулеза (рецидив) было необходимо наличие замороженных культур МБТ по обоим эпизодам, что имело место лишь у 20 пациентов, которые и включены в данное исследование.

В исследование были включены все 12 человек, у которых в 2013 г. методом Genotype MTBDRplus был выявлен гетерорезистентный результат теста на лекарственную чувствительность МБТ.

На возможность включения в исследование были проанализированы данные 9 человек, заболевших туберкулезом с 2009 по 2011 г. в период нахождения в закрытом медико-социальном учреждении. Критерием исключения было отсутствие бактериовыделения, поэтому в исследование вошли 7 человек.

В исследование были включены 2 пациента (взрослый и ребенок) из семейного очага туберкулеза, связь между заболеванием которых была сомнительной.

Всего в исследование был включен 41 больной туберкулезом.

При изучении источника инфекции, вызвавшего рецидив туберкулеза, с использованием молекулярно-генетического типирования по MIRU-VNTR [6] проводили сравнение генетического паттерна двух штаммов МБТ: первого – из материала больного, полученного при первом эпизоде туберкулеза, и второго, полученного при рецидиве туберкулеза. Сравнение проводили по 9 локусам MIRU-VNTR. Расхождение количества аллелей более чем по 1 локусу свидетельствовало, что рецидив заболевания был вызван другим штаммом МБТ.

При изучении случаев гетерорезистентных результатов тестов на лекарственную чувствительность выполняли генотипирование каждого штамма по 9 локусам MIRU-VNTR. Визуализировалось наличие одного или двух аллелей по каждому локусу. Наличие двух аллелей по одному локусу или более свидетельствовало о присутствии в материале от больного двух штаммов МБТ.

При изучении вспышки туберкулеза в закрытом медико-социальном учреждении было проведено сравнение по 10 локусам MIRU-VNTR образцов ДНК МБТ, полученных от 7 пациентов. Одинаковый паттерн свидетельствовал об инфицировании МБТ из одного источника, различия в паттерне – о наличии разных источников заражения [1].

Тот же принцип использовали при изучении материала, полученного от 2 пациентов из семейного очага.

Результаты исследования

При изучении рецидивов туберкулеза различия в паттерне штаммов МБТ по 2-7 локусам были обнаружены у 11 (55%) больных из 20 (рис. 1-2). Это доказывает, что рецидив туберкулеза у них явился следствием повторного заражения новым штаммом МБТ, несмотря на наличие эндогенной инфекции МБТ, с которой был связан первый эпизод заболевания. У остальных пациентов рецидив туберкулеза был вызван реактивацией эндогенного штамма МБТ. У 7 (63,6%) из 11 больных, заболевших в результате повторного заражения МБТ, не совпадала лекарственная устойчивость МБТ, полученных в первом эпизоде и при рецидиве, у 2 (18,2%) – совпадала, еще у 2 – совпадала частично.

При изучении случаев гетерорезистентных результатов теста лекарственной чувствительности МБТ наличие двух аллелей по 5 из 9 локусов MIRU было обнаружено у 1 (8,3%) из 12 пациентов (рис. 3). Это свидетельствует о том, что лишь у этого пациента заболевание было вызвано двумя штаммами МБТ, у остальных 11 пациентов были МБТ одного генотипа, но с разной лекарственной устойчивостью.

При изучении вспышки туберкулеза в закрытом медико-социальном учреждении было выявлено, что одинаковый паттерн по 9 локусам MIRU-VNTR имеется у 5 из 7 больных. Из оставшихся 2 больных у одного паттерн ДНК отличался по 3 из 10 локусов, еще у одного обнаружено присутствие двух штаммов МБТ, о чем свидетельствовала визуализация двух аллелей по 7 из 10 локусов MIRU, при этом ни один из штаммов не совпадал по паттерну с таковыми у других пациентов (табл.). Это доказывало наличие разных источников инфекции, вызвавших вспышку туберкулеза в этом учреждении.

При расследовании случая заболевания туберкулезом в семейном очаге туберкулеза путем сравнения культур МБТ, полученных от предполагаемого источника инфекции (взрослого) и заболевшего (ребенка), различий в паттерне ДНК МБТ не было. Несмотря на то что больной (предполагаемый источник инфекции изучаемого семейного контакта) проживал в отдаленной местности и отрицал тесный контакт с заболевшим ребенком, методом MIRU-VNTR была выявлена идентичность штаммов МБТ в обоих

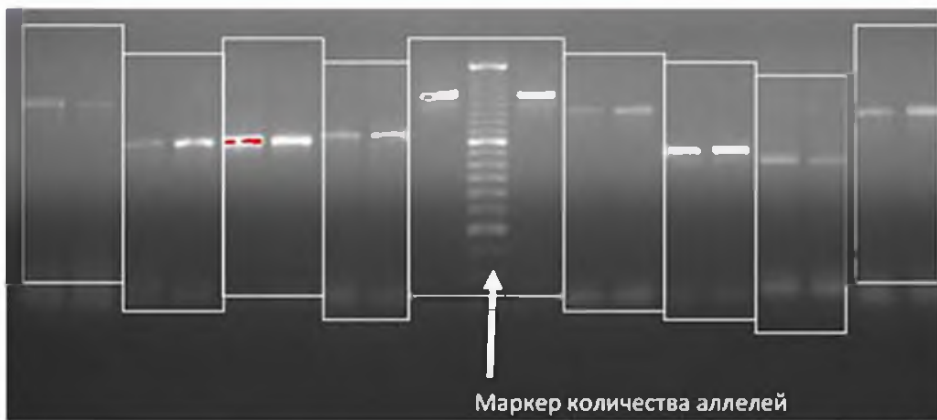


Рис. 1. Снимок агарозного геля с результатом генотипирования двух штаммов МБТ (первый эпизод и рецидив) одного из пациентов. Образцы ДНК МБТ первого эпизода и рецидива расположены попарно (обведены). Штрихи расположены на одном уровне – различий в количестве аллелей по 9 локусам MIRU нет, паттерн ДНК МБТ одинаков при первом эпизоде и рецидиве

*Fig. 1. Image of agarose gel with genotyping results of two strains of *M. tuberculosis* (new disease and relapse) of the same patient. DNA samples of *M. tuberculosis* of the new disease and relapse are located as pairs (in square). The streaks are located on the same level – there is no difference in the number of alleles for 9 MIRU loci, DNA pattern of *M. tuberculosis* is identical in the new disease and relapse*

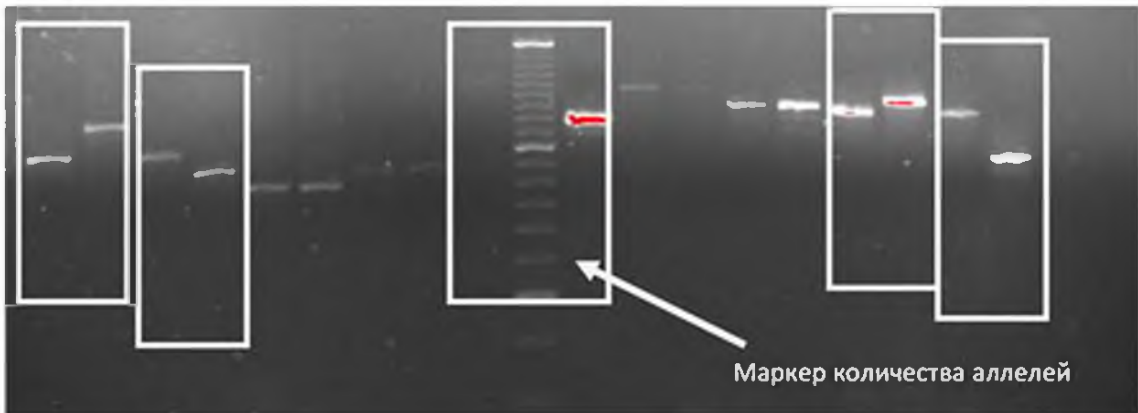


Рис. 2. Снимок агарозного геля с результатом генотипирования двух штаммов МБТ (первый эпизод и рецидив) одного из пациентов. Образцы ДНК МБТ первого эпизода и рецидива расположены попарно. Пять пар штрихов расположены на разном уровне – выявлены различия по 5 из 9 локусов MIRU (обведены), что является признаком изменения паттерна ДНК МБТ при рецидиве заболевания

*Fig. 2. Image of agarose gel with genotyping results of two strains of *M. tuberculosis* (new disease and relapse) of the same patient. DNA samples of *M. tuberculosis* of the new disease and relapse are located as pairs. Five pairs of streaks are located at different levels – difference was found in 5 out of 9 MIRU loci (in square), which the symptom of the change in *M. tuberculosis* DNA pattern in case of relapse*

случаях, что доказало путь передачи инфекции и источник заражения (рис. 4).

Заключение

Молекулярно-генетическое типирование МБТ по MIRU-VNTR было успешно применено при молекулярно-эпидемиологическом расследовании и установило следующее:

- Более половины (55%) случаев рецидива туберкулеза было связано с повторным заражением новым штаммом МБТ. Остальные случаи были обусловлены реактивацией эндогенного штамма МБТ.
- При расследовании случаев гетерорезистентных результатов тестов на лекарственную чувствитель-

ность лишь у 1 (8,3%) пациента было обнаружено смешанное инфицирование двумя штаммами МБТ. В остальных случаях это было обусловлено присутствием МБТ одного генотипа, но с разной лекарственной устойчивостью.

- Расследование вспышки туберкулеза (7 заболеваний) в закрытом медико-социальном учреждении доказало наличие нескольких разных источников заражения.
- Расследование семейного контакта доказало факт передачи инфекции в семейном очаге и установило источник заражения.
- Молекулярно-генетическое типирование по MIRU-VNTR необходимо проводить всем больным туберкулезом с бактериовыделением, выяв-

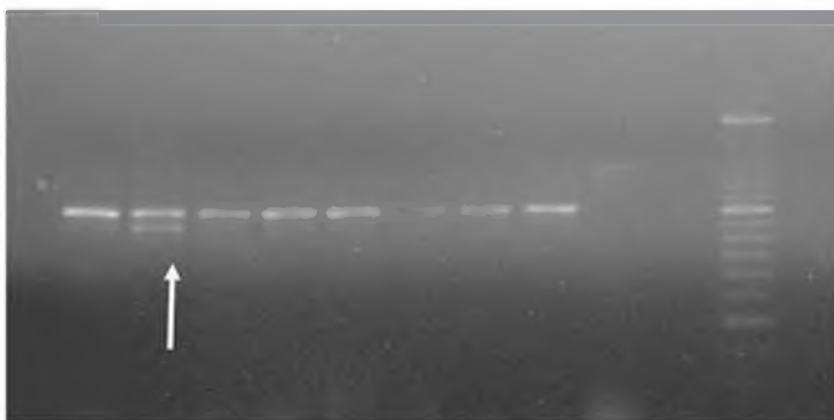


Рис. 3. Снимок агарозного геля с результатами генотипирования образцов ДНК МБТ с гетерорезистентным результатом ТЛЧ по локусу MIRU 2. Стрелкой указано наличие двух аллелей по данному локусу в одном из исследуемых образцов – признак двух видов ДНК в материале

Fig. 3. Image of agarose gel with genotyping results of *M. tuberculosis* DNA samples with hetero-resistant DST results for MIRU 2 locus. The arrow points at two alleles in this locus in one of the tested samples – it is the sign of two types of DNA in the sample

Таблица. Количество аллелей по 9 локусам MIRU-VNTR (МБТ) у 7 пациентов закрытого медико-социального учреждения

Table. Number of alleles in 9 MIRU-VNTR loci (*M. tuberculosis*) in 7 patients from the closed medical social unit.

No	MIRU 16	MIRU 2	MIRU 10	MIRU 4	MIRU 23	MIRU 40	MIRU 27	MIRU 24	MIRU 31	MIRU 26
1	1 2	2 3	2 3	2 2	5 6	1 1	3 3	1 1	3 3	5 6
2	3	2	2	2	5	3	3	1	5	7
3	3	2	2	2	5	3	3	1	5	7
4	3	2	2	2	5	3	3	1	5	7
5	3	2	2	2	5	3	3	1	5	7
6	3	2	3	2	5	3	3	2	5	5
7	3	2	2	2	5	3	3	1	5	7

Примечание: полужирным шрифтом указаны различия паттерна.

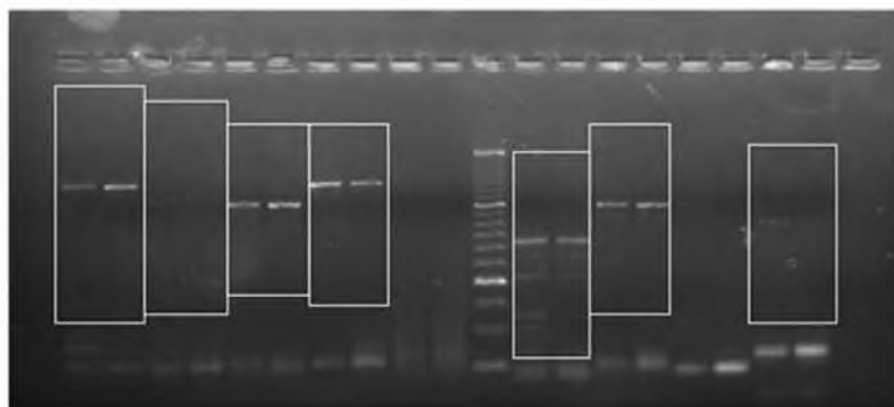


Рис. 4. Снимок агарозного геля с результатами генотипирования культур МБТ пациентов из семейного очага. Образцы ДНК МБТ от обоих пациентов расположены парно (обведены). Различий по 7 локусам MIRU не выявлено

Fig. 4. Image of agarose gel with genotyping results of *M. tuberculosis* cultures of the patients exposed to TB in the family. DNA samples of *M. tuberculosis* of both patients are located as pairs (in circles). No difference has been found in 7 MIRU loci.

ленным в регионе, что позволит создать базу данных всех штаммов МБТ, циркулирующих в данной местности, и выявить пути распространения инфекции, что позволит полнее описать эпидемический процесс в регионе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ангушева Е. В., Миронюк О. М., Тарасова И. В. и др. Расследование вспышки туберкулеза в медико-социальном учреждении Архангельской области с использованием молекулярно-генетических методов // Туб. – 2014. – Т. 91, № 3. – С. 36-39.
2. Баранов А. А., Марьяндышев А. О. Применение методов молекулярной биологии для исследования микобактерий туберкулеза // Туб. – 2008. – Т. 85, № 4. – С. 3-7.
3. Bryant J. M., Harris S. R., Parkhill J. et al. Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a retrospective observational study // Lancet Respir. Med. – 2013. – Vol. 1, № 10. – P. 786-792.
4. Genewein A., Telenti A., Bernasconi C. et al. Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community // Lancet. – 1993. – Vol. 342. – P. 841-844.
5. Lambert M. L., Hasker E., Van Deun A., Roberfroid D. et al. Recurrence in tuberculosis: relapse or reinfection? // Lancet Infect. Dis. – 2003. – Vol. 3, № 5. – P. 282-287.
6. Supply P., Lesjean S., Savine E. et al. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39. – P. 3563-3571.
7. Yeh R. W., Hopewell P. C., Daley C. L. Simultaneous infection with two strains of *Mycobacterium tuberculosis* identified by restriction fragment length polymorphism analysis // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 1999. – Vol. 3. – P. 537-539.

REFERENCES

1. Antusheva E.V., Mironyuk O.M., Tarasova I.V. et al. Investigation of tuberculosis break-out in medical social units of Arkhangelsk Region with the use of molecular genetic techniques. *Tub.*, 2014, vol. 91, no. 3, pp. 36-39. (In Russ.)
2. Baranov A.A., Maryandyshev A.O. Use of molecular biology techniques for investigation of tuberculous mycobacteria. *Tub.*, 2008, vol. 85, no. 4, pp. 3-7. (In Russ.)
3. Bryant J.M., Harris S.R., Parkhill J. et al. Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a retrospective observational study. *Lancet Respir. Med.*, 2013, vol. 1, no. 10, pp. 786-792.
4. Genewein A., Telenti A., Bernasconi C. et al. Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. *Lancet*, 1993, vol. 342, pp. 841-844.
5. Lambert M.L., Hasker E., Van Deun A., Roberfroid D. et al. Recurrence in tuberculosis: relapse or reinfection? *Lancet Infect. Dis.*, 2003, vol. 3, no. 5, pp. 282-287.
6. Supply P., Lesjean S., Savine E. et al. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, vol. 39, pp. 3563-3571.
7. Yeh R.W., Hopewell P.C., Daley C.L. Simultaneous infection with two strains of *Mycobacterium tuberculosis* identified by restriction fragment length polymorphism analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 1999, vol. 3, pp. 537-539.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет»,
163002, г. Архангельск, пр. Новгородский, д. 28.

Антушева Елена Владимировна
аспирант,
Тел.: 8 (8182) 68-37-67.
E-mail: antu6@yandex.ru

Марьяндышев Андрей Олегович
член-корреспондент РАМН, профессор, заведующий
кафедрой фтизиатрии и пульмонологии,
Тел.: 8 (8182) 66-05-64.
E-mail: maryandyshev@mail.ru

ГБУЗ АО «Архангельский клинический
противотуберкулезный диспансер»,
163002, г. Архангельск, пр. Новгородский, д. 28.

Тарасова Ирина Викторовна
заведующая клинико-диагностической лабораторией.

Елисеев Платон Иванович
врач клинико-диагностической лаборатории.
E-mail: pediatrics@yandex.ru

Получено 18.02.2016

FOR CORRESPONDENCE:

Northern State Medical University,
28, Novgorodsky Ave., Arkhangelsk, 163002.

Elena V. Antusheva,
Post-Graduate Student,
Phone: +7 (8182) 68-37-67.
E-mail: antu6@yandex.ru

Andrey O. Maryandyshev,
Correspondent Member of RAMS, Head
of Phthisiopulmonology Department,
Phone: +7 (8182) 66-05-64.
E-mail: maryandyshev@mail.ru

Arkhangelsk Clinical TB Dispensary,
28, Novgorodsky Ave., Arkhangelsk, 163002

Irina V. Tarasova
Head of Clinical Diagnostic Laboratory.

Platon I. Yeliseev
Doctor of Clinical Diagnostic Laboratory.
E-mail: pediatrics@yandex.ru

Submitted on 18.02.2016