

УДК 616-002.5-036.1-036.22

Т.А. МУМИНОВ<sup>1</sup>, Б.Т. ЖАКИПБАЕВА<sup>1</sup>, Ш.А. БЕЙСЕМБАЕВА<sup>1</sup>, К.Е. БЕРИКХАНОВА<sup>2</sup>,  
А.Р. АКИЛЬЖАНОВА<sup>2</sup>, А.М. ТЕРЛИКБАЕВА<sup>3</sup>, М.А. ДАРИШЕВА<sup>3</sup><sup>1</sup>Ассоциация фтизиатров РК, <sup>2</sup>Центр наук о жизни Назарбаев Университета,<sup>3</sup>Центр изучения глобального здоровья в Центральной Азии

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ МБТ

В статье представлены современные методы, используемые для изучения молекулярной эпидемиологии туберкулеза и критерии их выбора. Проведение исследований с применением методов молекулярного типирования может способствовать лучшему пониманию закономерностей распространения возбудителей разных субтипов из одного региона или страны в другой, изучить зависимость гетерогенности субтипов от географического расположения региона, установить возможную связь субтипов с вирулентностью, определить особенности передачи инфекции. Применение данных методов является надежным способом доказательства идентичности штаммов и представляется особенно актуальным в регионах с высокой эндемичностью заболевания, таких как Казахстан.

**Ключевые слова:** туберкулез, эпидемиология, генотип, секвенирование, MIRU-VNTR, ПЦР-сполиготимирование.

**В** течение последнего десятилетия общепризнано большое значение молекулярной эпидемиологии в исследовании туберкулеза. Методы генетического типирования *Mycobacterium tuberculosis complex* являются надежным способом доказательства идентичности штаммов и в настоящее время широко используются за рубежом для решения задач эпидемиологии туберкулеза [1, 2, 50, 51, 52, 56, 57, 58].

### Общие принципы молекулярной эпидемиологии

Молекулярная эпидемиология, как научное направление, возникла на стыке микробиологии, молекулярной биологии, популяционной генетики бактерий, таксономии и эпидемиологии более двух десятилетий назад.

Молекулярная эпидемиология туберкулеза представляет собой интеграцию методов молекулярной биологии, прослеживающей следы специфических штаммов *M.tuberculosis*, со стандартными способами эпидемиологических исследований по распространению инфекции среди разных групп населения. В сущности, молекулярная эпидемиология фокусируется на роли генетических факторов и факторов риска окружающей среды на молекулярном/клеточном или биохимическом уровне, в этиологии заболевания и распределении среди населения [3]. Например, отличаются ли определенные клинические изоляты по своей инфекционности, патогенности, чувствительности к лекарственным препаратам? В целом, высокая разрешающая способность методов генотипирования позволяет решать с их помощью как краткосрочные (оперативные, локальные эпидемиологические), так и долгосрочные задачи трансмиссии, а также и изучение эволюции видов.

В молекулярной эпидемиологии по-прежнему используются принципы общей эпидемиологии и традиционный дизайн исследований (типа «случай-контроль» и когортные).

С практической точки зрения наиболее важными областями применения результатов молекулярной эпидемиологии туберкулеза являются:

1. Клиника и эпидемиология туберкулеза – выявление и расследование вспышек заболевания, путей трансмиссии возбудителя, факторов, влияющих на распространение групп микобактерий, характеризующихся лекарственной устойчивостью и более высокой вирулентностью;

2. Лабораторная диагностика туберкулеза – выявление и контроль случаев внутрилабораторной контаминации, выявление смешанной инфекции и суперинфекции;

3. Научно-исследовательская работа – изучение филогении, клинико-эпидемиологического значения раз-

личных генетических групп для разработки новых вакцин и лекарственных препаратов.

Использование результатов генотипирования микобактерий условно можно разделить на следующие уровни: 1) организменный (индивидуальный, дифференциация случаев эндогенной реактивации и экзогенной реинфекции у больных), 2) микропопуляционный (выявление трансмиссии штаммов среди населения, обнаружение кластерных случаев заболевания), 3) макропопуляционный уровень (изучение глобального распространения различных генетических линий микобактерий и эволюции МТК).

Наиболее подходящими генетическими маркерами в молекулярной эпидемиологии являются те мишени, скорость дивергентной эволюции которых позволяет различать штаммы микобактерий в эпидемиологически несвязанных между собой случаях [4, 54, 55]. Маркеры, пригодные для генотипирования микобактерий, должны удовлетворять следующим критериям: быть строго специфичными для микобактерий туберкулеза, проявлять высокую степень гетерогенности в рамках популяции МТК, их стабильность не должна меняться, по крайней мере, несколько лет и не должна зависеть от формирования резистентности к противотуберкулезным препаратам в ходе лечения. Кроме того, скорость их эволюции должна коррелировать с клинико-эпидемиологическими данными для сохранения информативности.

### Современные методы, используемые для изучения молекулярной эпидемиологии туберкулеза и критерии их выбора

Современные методы молекулярно-эпидемиологического типирования микобактерий базируются в основном на выявлении и сравнении характеристик относительно быстро изменяющихся повторяющихся нуклеотидных последовательностей. Выбор этих методов в основном обусловлен их более высокой разрешающей способностью (чувствительностью), позволяющей выявить сходства и различия между штаммами, даже в случае отсутствия эпидемиологической информации. С методологической точки зрения можно их разделить на две группы, основанные и не основанные на полимеразной цепной реакции.

#### Методы, не основанные на ПЦР

Из группы не основанных на ПЦР методов наибольшее распространение получил IS6110 RFLP-анализ. Благодаря высокой разрешающей способности он использовался при анализе трансмиссии штаммов в качестве международного «золотого стандарта» генотипирования микобак-

терий вплоть до середины 2000-х гг. Общая Pvu11 эндонуклеаза, разрезающая ДНК на простые, симметричные части, используется в этом методе на основе Southern blot анализе. ДНК денатурируется, а затем гибридизируются рестриктированные фрагменты. Далее оценивался полиморфизм фрагментов по молекулярному весу. Информационное обеспечение сопровождалось соответствующей компьютерной программой.

За время, прошедшее с момента написания предыдущего обзора, появились сведения о генотипировании на основе полиморфизма GC-обогащенных повторяющихся последовательностей PGRS, также основанному на Southern blot гибридизационной технологии. Метод обладает более высокой разрешающей способностью и позволяет четко дифференцировать штаммы, ответственные за возникновение туберкулеза, связь штаммов между собой или отсутствие таковой в эпидемиологическом процессе

#### **Методы, основанные на ПЦР, – сполиготипирование и MIRU-VNTR**

Сполиготипирование основано на выявлении присутствия и последовательности спейсеров, разделяющих прямые повторы (direct repeats) нуклеотидных последовательностей в специфическом локусе генома *M. tuberculosis* (регион прямых повторов длиной 4394 п.н.). Из 43 типов спейсеров 37 оказались специфичными для *M. tuberculosis* и 6 других дополнительно характеризовали вакцинный штамм BCG *M. bovis*. Несмотря на относительно низкую разрешающую способность, сполитотипирование приемлемо для первоначального анализа популяционной структуры МТК и выявления основных генетических групп. В сочетании с другими методами он применим для проспективных молекулярно-генетических исследований. Например, в сочетании с IS6110 RFLP-типированием он используется как национальный стандарт в молекулярно-генетических исследованиях в США [7].

Благодаря цифровому формату регистрации результатов была создана постоянно обновляемая международная база сполиготипов и разработана Интернет-программа для работы с четвертой версией этой базы SpolDB4 для определения семейства сполиготипов. Анализ данных базы спологопрофилей позволил оценить глобальное распространение различных групп МТК, выявить доминирующие семейства.

Сполиготипирование обладает более низкой разрешающей способностью по сравнению с IS6110 RFLP, потому что направлено на выявление одного локуса, составляющего менее 0,1% генома *M. tuberculosis*. Тогда как второй метод выявляет распределение IS6110 элемента по всей длине генома.

В последние годы были предложены новые подходы выполнения этих методов. Например, для анализа расположения инсерционных элементов IS6110 был использован полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (amplified fragment length polymorphism, AFLP) [8].

Сполиготипирование было усовершенствовано с помощью новой лазерной технологии на основе дизайна микросфер с использованием большего числа мишеней, позволяющим проводить идентификацию и подсчет каждого продукта ПЦР [9]. Метод позволяет анализировать образцы менее чем за 15 секунд, и, как было недавно показано, его результаты соответствуют результатам при использовании классического метода, в котором в качестве основы используется мембрана [10].

Недавно был разработан новый альтернативный метод – адаптированная для детекции сполиготипов автоматизированная MALDI-TOF спектрометрия (MALDI-TOF MS), в котором этап гибридизации заменен на анализ удлинения мультплексных праймеров.

#### **MIRU-VNTR-генотипирование**

Метод основан на выявлении полиморфизма в мини- и микросателлитных локусах, количество которых в геноме референтного штамма *M. tuberculosis* H37Rv составляет несколько десятков. Была предложена стандартизированная номенклатура для их обозначения, соответствующая первым четырем цифрам в позиции локуса в геноме референтного штамма (например 3232, 4156 и др.) [11].

По сравнению с IS6110 RFLP генотипированием, MIRU-VNTR-метод более эффективен, менее трудоемок, меньше зависит от качества ДНК [12]. Эффективность метода можно значительно повысить, используя сиквенатор для автоматизации анализа длин ПЦР-фрагментов [13, 14].

Создана и постоянно обновляется Международная база данных профилей MIRU-VNTR-типирования микобактерий ([www.miruvntrplus/MIRU/index\\_faces](http://www.miruvntrplus/MIRU/index_faces), MIRU-VNTRplus (Allix-Beguecet et al., 2008) [www.miruvntrplus.org](http://www.miruvntrplus.org), SITVIT (Brudey et al., 2006) [www.pasteurgadeloupe.fr&8081/SITVITDemo/](http://www.pasteurgadeloupe.fr&8081/SITVITDemo/), TB-GIMS [www.cdc.gov/tb/programs/genotyping/tbgims](http://www.cdc.gov/tb/programs/genotyping/tbgims), TB-DB (Reddy et al., 2009) [www.tbdb.org/MyBASE](http://www.tbdb.org/MyBASE) (Zhu et al., 2009) [mybase.psych.ac.cn](http://mybase.psych.ac.cn), TBrowse (Bhardwaj et al., 2009) [tbrowse.osdd.net](http://tbrowse.osdd.net), MTbRegList (Jacques et al., 2005) [www.USherbrooke.ca/vers/MtbRegList](http://www.USherbrooke.ca/vers/MtbRegList), TBSGC (Terwilliger et al., 2003) [www.webtb.org/](http://www.webtb.org/), TubercuList (Cole, 1999) [genolist.pasteur.fr/TubercuListGenoMycDB](http://genolist.pasteur.fr/TubercuListGenoMycDB) (Catanho et al., 2006) 157.86.176.108/catanho/genomycdb/MGDD (Vishnoi et al., 2008) [mirna.jnu.ac.in/mgdd/](http://mirna.jnu.ac.in/mgdd/), SpolTools (Tanaka and Francis, 2006; Reyes et al., 2008) [www.emi.unsw.edu.au/spolTools/](http://www.emi.unsw.edu.au/spolTools/), SPOTCLUST (Vitol et al., 2006) [www.tbinsight.cs.rpi.edu/run\\_spotclust.html](http://www.tbinsight.cs.rpi.edu/run_spotclust.html) TB-lineage (Shabbeer et al., 2011; Aminian et al., 2010) [www.tbinsight.cs.rpi.edu/run\\_tb\\_lineage.html](http://www.tbinsight.cs.rpi.edu/run_tb_lineage.html), TB-Vis [www.tbinsight.cs.rpi.edu/run\\_tb\\_vis.html](http://www.tbinsight.cs.rpi.edu/run_tb_vis.html) Summary of Tools Surveyed [www.tbinsight.cs.rpi.edu/molepisurvey.html](http://www.tbinsight.cs.rpi.edu/molepisurvey.html)(57))

Разрешающая способность метода MIRU-VNTR-типирования прямо пропорциональна числу оцениваемых локусов. Кроме того, разрешающая способность отдельных локусов существенно различается (их подразделяют на слабо-, средне- и высокоразрешающие) [16, 58].

Первоначально был предложен набор из 12 локусов MIRU-VNTR, считавшийся эффективным для эпидемиологических целей [17, 58]. Тем не менее некоторые авторы обнаружили его ограничения, хотя при использовании в комбинации с методами генотипирования второго ряда получена хорошая дискриминация штаммов [18, 19, 20, 58]. Новый улучшенный набор из 24 локусов MIRU-VNTR с увеличенной дискриминирующей способностью был рекомендован, а также показана достаточная дискриминирующая способность набора из 15 локусов [21, 22]. Кроме того, первоначальный дизайн, основанный на простой ПЦР, был преобразован в формат с высокой пропускной способностью. Было предложено использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), хотя чаще используются мультплексная флуоресцентно-меченая ПЦР и капиллярный электрофорез [23, 24].

Методы генотипирования на основе 15 и 24 MIRU-VNTR локусов считаются альтернативой IS6110 RFLP, и в ряде популяционных исследований была показана хорошая корреляция их результатов [25-31, 58]. Тем не менее, появляются противоречивые данные [32]. При анализе гомогенных генетических линий, таких как семейство Beijing, в ряде исследований были получены худшие результаты дифференцирования штаммов. Для решения этой проблемы предлагаются наборы подходов к локусам с большей разрешающей способностью для данного семейства [33]. Включение в стандартизированные панели других гипервариабельных локусов было рекомендовано недавно для увеличения качества данных генотипирования [34]. При этом короткие сроки

получения результатов MIRU-VNTR-типирования позволяют использовать метод для целей оперативного эпидемиологического анализа [35].

Таким образом, благодаря описанным выше преимуществам метод MIRU-VNTR-типирования является на сегодняшний день наиболее распространенным методом генотипирования микобактерий.

#### **Методы, применяемые для филогенетического анализа микобактерий туберкулеза**

До начала 90-х годов 20 века геном *M.tuberculosis* считался почти полностью стабильным. К концу 2009 г. были полностью секвенированы геномы семи референтных штаммов *M.tuberculosis* комплекса (МТК), и почти полностью секвенированы геномы более 12 штаммов представителей крупных филогенетических групп [5].

Среди методов, применяемых для изучения филогении микобактерий, полиморфизм больших нуклеотидных последовательностей (LSPs) в частности, регионов различий (RDs), которые представляют собой ряд наиболее точно охарактеризованных уникальных элементов полиморфизма (делеции) [36, 37]. На основании анализа LSPs штаммы микобактерий туберкулеза были классифицированы в 6 главных линий, которые ассоциировались с определенными географическими регионами [38, 39].

Имеется несколько LSPs, специфичных для конкретных групп микобактерий. Например, делеции локусов RD105 и 207 являются специфичными для генетической группы Beijing, а делеции в локусах RD 149 и 152 специфичны для наиболее распространенного варианта этой группы подгруппы W/Beijing [40, 41]. Определение делеционных маркеров возможно как с помощью обычной ПЦР, так и автоматизированной технологии Gene Chip [42].

Несмотря на то, что микобактерии МТК характеризуются чрезвычайно высокой внутривидовой гомогенностью и отсутствием горизонтального переноса генов, благодаря использованию высокочувствительных методов в середине 1990-х гг. у них были выявлены полиморфные сайты [3]. Эти методы можно разделить на три группы: олигонуклеотидные замены (SNP, single-nucleotide substitution), полиморфизм длинных последовательностей нуклеотидов (LSP, long sequence polymorphism, включая large deletions, как RD, TbD1 и др.) и полиморфизм повторяющихся последовательностей нуклеотидов (IS, insertion sequence, VNTR, variable number tandem repeat, Spacers in the direct repeat region, DR region). Последний в соответствии с размером повторяющихся элементов подразделяется на микро- и минисателлиты (повторы с нуклеотидными последовательностями длиной 1-10 и 10-100 п.н., соответственно).

SNP подразделяются на синонимичные и несинонимичные полиморфизмы, имеющие различные эволюционные характеристики. Несинонимичные вызывают замену аминокислот и они подвержены естественному отбору. Считается, что именно эти мутации ответственны за устойчивость МТ к лекарствам [41, 51, 53]. Синонимичные SNP функционально нейтральны, не вызывают замены аминокислот и играют большую роль в кластеризации штаммов. Анализ SNP может быть использован в изучении филогенетических и популяционных тенденций МТК [31, 32, 16, 72].

Указанные полиморфизмы в геноме МТК характеризуются различной скоростью появления в процессе филогении, т.е. различной скоростью молекулярных часов. В целом повторяющиеся нуклеотидные последовательности изменяются быстрее, чем SNP и LSP. Изменения в последних двух во многих случаях являются уникальными эволюционными событиями, благодаря чему они используются в филогенетическом анализе [6]. В то же время изменения в повторяющихся последовательностях

случаются в ходе эволюции многократно и в различных направлениях, приводя к тому, что сходные паттерны могут обнаруживаться у эволюционно несвязанных групп микобактерий. Поэтому анализ полиморфизма повторяющихся последовательностей нуклеотидов является более приемлемым методом для целей эпидемиологического исследования.

Что касается вопросов контроля туберкулеза, к сожалению, имеющиеся эпидемиологические ресурсы в целом недостаточны для слежения за всеми случаями недавней передачи инфекции. После выявления более активно распространяющегося штамма на территории некоторые авторы разработали свою основанную на ПЦР стратегию для специфического мониторинга [43]. Эпидемиологический надзор за туберкулезом может быть улучшен путем идентификации кластеров, которые могут служить хорошими индикаторами недавней передачи инфекции. В то же время отсутствие эпидемиологического подтверждения за некоторыми кластерами может быть результатом недостаточной разрешающей способности использованных методов генотипирования, чтобы выявить истинную гетерогенность штаммов. И наоборот, некоторые эпидемиологически несвязанные больные туберкулезом независимо друг от друга могли быть инфицированы штаммами, которые доминируют на этой территории или являются эндемичными, а потому представляются кластерными случаями. В этом случае некоторые авторы предпочитают использовать методы генотипирования второго ряда, чтобы подтвердить генотипическую гомогенность [44, 45]. Интересные результаты получены при изучении вопроса, могут ли генотипы, составляющие кластеры в одной популяции, входить в кластеры в несвязанных популяциях, снижая этим их полезность как маркеров недавней трансмиссии. Например, преобладающие во многих местах штаммы генетического семейства Haarlem, разделялись главным образом с помощью MIRU-типирования, а наоборот, некоторые RFLP-варианты, принадлежащие к этому семейству, преобладали в несвязанных популяциях [46, 47].

С позиции практического здравоохранения необходима разработка новых молекулярных подходов для сокращения сроков проведения генотипирования и своевременного выявления передачи инфекции среди населения. Речь идет о возможности генотипирования микобактерий непосредственно в клинических образцах.

Мониторинг и своевременное выявление циркулирующих клонов МТК важны для контроля туберкулеза в плане выявления приоритетных групп населения, требующих адресных мер. Как видно из вышеизложенного, для чисто эпидемиологических целей более адаптированы методы IS6110 RFLP и MIRU-VNTR по 24 локусам. Комбинированное использование сполитипирования и MIRU-VNTR-типирования, вероятно, наиболее приемлемый компромисс – вариант, позволяющий распознать главные генотипические линии *Mycobacterium tuberculosis* комплекса, а также эффективно исследовать кластеризующиеся случаи для мониторинга текущей трансмиссии туберкулеза в определенной местности [48].

Недавние достижения в изучении генома микобактерий выявили более существенные генетические вариации на уровне целого генома. Соответственно, полногеномное секвенирование может стать средством для рутинных молекулярно-эпидемиологических исследований, если его стоимость станет сравнимой с традиционными методами генотипирования.

При выборе методов генотипирования микобактерий необходимо в первую очередь учитывать цели и задачи молекулярно-эпидемиологического исследования, а также ограничения, обусловленные методами и возмож-

ностями лаборатории. Важным ограничением многих молекулярно-генетических методов является проблема интерпретации молекулярных данных с целью обоснования эпидемиологических заключений. Вероятность ложной кластеризации особенно высока в регионах с высокими уровнями заболеваемости и высокой эндемичностью штаммов определенных генотипов.

Для того, чтобы избежать подобных ошибок, необходимо использовать для молекулярно-эпидемиологического анализа наиболее чувствительные методы, в особенности MIRU-VNTR-типирование с большим числом определяемых локусов. Кроме того, корректность результатов молекулярно-эпидемиологического исследования зависит от качества микробиологического исследования, тщательности эпидемиологического обследования эпидемических очагов и полноты выявления контактов, репрезентативности изучаемой выборки, а также достаточной продолжительности исследования на данной территории, которая должна составлять не менее двух лет [49].

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sola C., I. Filliol, M.C. Gutierrez et al. Spoligotype database of Mycobacterium tuberculosis: Biogeographic distributijn of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives // *Emerging infectious Diseases*. – 2001. – Vol.7. – N3. – P. 390
- van Rei A., Warren R., Richardson M. et al. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment // *N. Engl. J. Med.* – 1999. – Vol. 341, N16. – P. 1174-1179
- Mathema B., Kurepina N.E., Bifani P.J., Kreiswirth B.N. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2006. – Vol. 19, N4. – P. 658-685
- Шагинян И.А. Геномный полиморфизм в эпидемиологическом анализе бактериальных инфекций: автореф. дисс. ... докт. мед. наук: 14.00.30. – М., 1995. – 48 с.
- Galagan J.E., Sisk P., Stotle C. et al. TB Database 2010: Overview and update. *Tuberculosis*, Ooerger T.R., Koo S., No E.G et al. Genome analysis of multi-and extensively drug-resistance tuberculosis from KwaZulu-Natal, South Africa. – *PloS One*, 2009. – Vol.4., no. 11. – P. 7778
- Comas I., Homolka S., Niemann S. et al. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in Mycobacterium tuberculosis highlights the limitations of current methodologies // *PloS One*. – 2009. – Vol. 4, N 11. – P. 7815
- Clark C. M., Driver C. R., Munsiff S. S. et al. Universal genotyping in tuberculosis control program, New York City, 2001– 2003 // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 12, N 5. – P. 719-724
- Thorne N, Evans JT, Smith EG, et al. An IS6110-targeting fluorescent amplified fragment length polymorphism alternative to IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis for Mycobacterium tuberculosis DNA fingerprinting. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:964-70
- Cowan L.S., Diem L., Brake M.C., Crawford J.T. Transfer of a Mycobacterium tuberculosis genotyping method, Spoligotyping, from a reverse line-blot hybridization, membrane-based assay to the Luminex multianalyte profiling system. *J Clin Microbiol.* 2004;42:474-7
- Zhang J., Abadna E., Refregier G. et al. Mycobacterium tuberculosis complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *J Med Microbiol.* 2010;59:285-94
- Smittipat N., Billamas P., Palittapongarnpim M. et al. Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in Mycobacterium tuberculosis // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol. 43, N 10. – P. 5034-5943
- Alonso-Rodriguez N., Martinez-Lirola M., Sanchez M. L. et al. Prospective universal application of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping to characterize Mycobacterium tuberculosis isolates for fast identification of clustered and orphan cases // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – Vol. 47, N 7. – P. 2026-2032
- Kanduma E., McHugh T. D., Gillespie S. H. Molecular methods for Mycobacterium tuberculosis strain typing: a user's guide // *J. Appl. Microbiol.* – 2003. – Vol. 94, N 5. – P. 781-791
- Kwara A., Schiro R., Cowan L. S. et al. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of Mycobacterium tuberculosis isolates // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, N 6. – P. 2683-2685
- Allix-Beguec C., Harmsen D., Weniger T. et al. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTR plus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates // *J. Clin. Microbiol.* – 2008. – Vol. 46, N 8. – P. 2692-2699
- Shabbeer et al. / *Infection, Genetics and Evolution* 12 (2012) 767-781
- Sola C., Filliol I., Legrand E. et al. Genotyping of the Mycobacterium tuberculosis complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics // *Infect. Genet. Evol.* – 2003. – Vol. 3, N 2. – P. 125-133
- Sun Y.J., Bellamy R., Lee A.S. et al. Use of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing to examine genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Singapore. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1986-93
- Scott AN, Menzies D., Tannenbaum T.N. et al. Sensitivities and specificities of spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing methods for studying molecular epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:89-94
- G. de Viedma D., A.Rodríguez N, Anders S., et al. Evaluation of alternatives to RFLP for the analysis of clustered cases of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006;10:454-9
- Cowan L.S., Diem L., Monson T. et al. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates in the United States. *J Clin Microbiol.* 2005;43:688-95
- Oelemann M.C., Diel R., Vatin V. et al. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:691-7
- 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;44:4498-510
- Supply P., Lesjean S., Savine E. et al. Automated highthroughput genotyping for study of global epidemiology of Mycobacterium tuberculosis based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3563-71
- Evans J.T., Hawkey P.M., Smith E.G. et al. Automated highthroughput mycobacterial interspersed repetitive unit typing of Mycobacterium tuberculosis strains by a combination of PCR and nondenaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4175-80
- Oelemann M.C., Diel R., Vatin V. et al. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:691-7

- 27 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;44:4498-510
- 28 Evans J.T., Hawkey P.M., Smith E.G. et al. Automated highthroughput mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains by a combination of PCR and nondenaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4175-80
- 29 Alonso-Rodríguez N., Martínez-Lirola M., Sánchez M.L., et al. Prospective universal application of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping to characterize *Mycobacterium tuberculosis* isolates for fast identification of clustered and orphan cases. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2026-32
- 30 Allix-Beguec C., Fauville-Dufaux M., Supply P. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1398-406
- 31 Valcheva V., Mokrousov I., Narvskaya O. et al. Utility of new 24-locus variable-number tandem-repeat typing for discriminating *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates collected in Bulgaria. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3005-11
- 32 Blackwood K.S., Wolfe J.N., Kabani A.M. Application of mycobacterial interspersed repetitive unit typing to Manitoba tuberculosis cases: can restriction fragment length polymorphism be forgotten? *J Clin Microbiol.* 2004;42:5001-6
- 33 Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Russia: in search of informative variable-number tandem-repeat loci. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3576-84
- 34 Millet J., Miyagi-Shiohira C., Yamane N. et al. Assessment of mycobacterial interspersed repetitive unit-QUB markers to further discriminate the Beijing genotype in a population-based study of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Okinawa, Ryukyu Islands, Japan. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3606-15
- 35 Velji P., Nikolayevskyy V., Brown T., Drobniewski F. Discriminatory ability of hypervariable variable number tandem repeat loci in population-based analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains, London, UK. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1609-16
- 36 Alonso-Rodríguez N., Martínez-Lirola M., Sánchez M.L., et al. Prospective universal application of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping to characterize *Mycobacterium tuberculosis* isolates for fast identification of clustered and orphan cases. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2026-32
- 37 Reed M. et al. Major *Mycobacterium tuberculosis* Lineages Associate with Patient Country of Origin. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103. – 2006. – P. 2869-287
- 38 Gagneux S. et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – Vol. 47 (4). – P. 1119-1128
- 39 Comas I., Homolka S., Niemann S. and Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS ONE.* – 2009. – 4. – P. 7815
- 40 Flores L., Van T., Narayanan S. et al. Large Sequence polymorphisms Classify *Mycobacterium tuberculosis* strains with ancestral spoligotyping patterns. – *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45, no. 10. – P. 3393-3395.
- 41 Kato-Maeda M. et al. Differences among sublineages of the East-Asian line age of *Mycobacterium tuberculosis* in genotypic clustering // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2010. – Vol. 14 (5). – P. 538–544
- 42 Tsolaki A.G. et al. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. – P. 3185–3191
- 43 Tsolaki A.G., Hirsh A.E., DeRiemer K. et al. Functional and evolutionary Genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights from Genomic deletions in 100 strains // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101, no. 14. – P. 4865-4870
- 44 Ashworth M., Horan K.L., Freeman R. et al. Use of PCR based *Mycobacterium tuberculosis* genotyping to prioritize tuberculosis outbreak control activities. *J Clin Microbiol.* 2008;46:856-62
- 45 Borrell S., Thorne N., Espacal M. et al. Comparison of four-colour IS6110-fAFLP with the classic IS6110-RFLP on the ability to detect recent transmission in the city of Barcelona, Spain. *Tuberculosis (Edinb).* 2009;89:233-7
- 46 Van Deutekom H., Supply P., De Haas P.E. et al. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4473-9
- 47 Oelemann M.C., Diel R., Vatin V. et al. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:691-7
- 48 A. Rodríguez N., Martínez-Lirola M., Chaves F. et al. Differences in the robustness of clusters involving the *Mycobacterium tuberculosis* strains most frequently isolated from immigrant cases in Madrid. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1544-54
- 49 Rastogi N., Sola C. Molecular Evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex In: Palomino JC, Cardoso Lero S, Ritacco V, editors. *Tuberculosis 2007*: <http://www.tuberculosis-textbook.com/index.htm>
- 50 Coronado V.G., Beck-Sague C.M., Hutton M.D. et al. Transmission of multidrug resistant *M. tuberculosis* among persons with human immunodeficiency virus infection in an urban hospital: epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis // *J. Infect. Dis.* – 1993. – Vol. 168. – P. 1052-1055
- 51 Ross, B.C., Raios, K., Jackson, K., et al., Molecular Cloning of a Highly Repeated DNA Element from *Mycobacterium tuberculosis* and Its Use as an Epidemiological Tool, *J. Clin. Microbiol.*, 1992, vol. 30, no. 4, pp. 942–946
- 52 Yang, Z., Chaves, F., Barnes, P.F., et al., Evaluation of Method for Secondary DNA Typing of *Mycobacterium tuberculosis* with PTBNI2 in Epidemiologic Study of Tuberculosis, *J. Clin. Microbiol.*, 1996, vol. 34, no. 12, pp. 3044-3048
- 53 Maus, C.E., Plikaytis, B.B. and Shinnick, T.M., Mutation of *tlyA* confers Capreomycin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, no. 2, pp. 571–577
- 54 Ramaswamy, S. and Musser, J.M., Molecular Genetic Basis of Antimicrobial Agent Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 Update, *Tuberc. Lung Dis.*, 1998, vol. 79, no. 1, pp. 3–29
- 55 Rengarajan, J., Sasseti, C.M., Naroditskaya, V., et al., The Folate Pathway Is a Target for Resistance to the Drug para-Aminosalicylic Acid (PAS) in *Mycobacteria*, *Mol. Microbiol.*, 2004, vol. 53, no. 1, pp. 275–282
- 56 Comas I., Gagneux S. A role for systems epidemiology in tuberculosis research *Trends Microbiol.* 2011 October, 19(10): 492-500. doi:10.1016./j.tim.2011.07.002
- 57 Shabber A. et al Web tools for molecular epidemiology

of tuberculosis, Infection, genetics and Evolution 12(2012)767-781

58 Kontsevayaa I.S., Nikolayevskyb V.V. and Ya. M. Balabanov ab Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Objectives, Methods, and Prospects Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 2011, Vol. 26, No. 1, pp. 1–9. © Allerton Press, Inc., 2011.

#### ТҰЖЫРЫМ

**Т.А. МУМИНОВ<sup>1</sup>, Б.Т. ЖАКИПБАЕВА<sup>1</sup>,  
Ш.А. БЕЙСЕМБАЕВА<sup>1</sup>, К.Е. БЕРИКХАНОВА<sup>2</sup>,  
А.Р. АКИЛЬЖАНОВА<sup>2</sup>, А.М. ТЕРЛИКБАЕВА<sup>3</sup>,  
М.А. ДАРИШЕВА<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ҚР фтизиатрлар қауымдастығы,

<sup>2</sup>Назарбаев Университетінің өмір туралы ғылым орталығы,

<sup>3</sup>Орталық Азияда ғаламдық денсаулықты зерттеу орталығы

#### ТМБ ШТАМДАРЫНЫҢ ПОПУЛЯЦИЯЛЫҚ ВАРИАБІЛЬДІГІНІҢ (ӨЗГЕРГІШТІГІНІҢ) ЗЕРТТЕУДЕГІ МОЛЕКУЛЯРЛЫ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ МОНИТОРИНГІ

Мақалада туберкулездің молекулалық-эпидемиологиясын зерттеудің заманауи әдістері және оларды таңдау белгілері ұсынылған. Зерттеулерді молекулалық типтау әдісін қолданып өткізу әртүрлі субтиптердің белгілі бір аймақ немесе мемлекеттен басқа аймаққа тарау заңдылығын, субтип гетерогендігінің аймақтың географиялық орналасуына тәуелділігін, субтиптің вирулентікпен байланысын

зерттеу, жұқпаның таралу ерекшеліктерін анықтауда септігін тигізеді. Берілген әдістердің қолданылуы штаммдардың сәйкестігін дәлелдеу жолындағы сенімді әдістер және Қазақстан сияқты ауру тұрақты шұғырланған аймақтарда бұл әдістердің өзектілігі ерекше.

#### SUMMARY

**T.A. MUMINOV<sup>1</sup>, B.T. ZHAKIPBAEVA<sup>1</sup>,  
Sh.A. BEYSSEMBAEVA<sup>1</sup>, K.E. BERIKHANOVA<sup>2</sup>,  
A.R. AKILZHANOVA<sup>2</sup>, A.M. TERLIKBAEVA<sup>3</sup>,  
M.A. DARISHEVA<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Association of phthisiologists,

<sup>2</sup>Center for life sciences «Nazarbayev University»,

<sup>3</sup>Global Health Research Center of Central Asia

#### MOLECULAR AND GENETIC MONITORING FOR STUDYING POPULATION VARIABILITY OF MBT STRAINS

The paper presents the modern methods used to study tuberculosis molecular epidemiology and the criteria for their selection. Conducting research using molecular typing methods can contribute to a better understanding of various subtypes pathogens spread patterns from one region or country to another, allows studying the dependence between subtypes heterogeneity and geographical location of the region, establishing a possible link of subtypes with virulence, and determining the infection transmission peculiarities. These methods application is a reliable way to prove the strains identity and is particularly relevant for areas with high disease incidence, such as Kazakhstan.

УДК 616.23 – 053.6/81

**К.Е. АБУБАКИРОВА**

Городская поликлиника №6, г. Тараз

#### КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБОСТРЕНИЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

*Ведущей ролью в возникновении обострений бронхиальной астмы в 37% случаев являлось проведение недостаточной базисной терапии или отказ от нее и в 33% – присоединение респираторной инфекции. Ведущим симптомом в клинической картине обострения, вызванного контактом с аллергеном, являются приступы удушья, число которых вдвое выше, чем при обострениях, вызванных другими причинами; при обострении, ассоциированном с бактериальной инфекцией, статистически значимо преобладают кашель и количество мокроты.*

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, триггер, индекс курения, приступ удушья.

**Б**ронхиальная астма (БА) является одной из важнейших проблем терапии, что связано с ее значительной распространенностью, результаты эпидемиологических исследований свидетельствуют об увеличении заболеваемости [1]. Существует множество пусковых факторов, посредством которых стабильное течение БА переходит в фазу обострения путем стимуляции воспаления или провоцирования острого бронхоспазма, или того и другого [2]. Аллергены внешней среды рассматриваются как наиболее важные причины обострения БА, поскольку они могут первоначально сенсibilизировать дыхательные пути и провоцировать начало БА; в дальнейшем поддерживать развитие заболевания, вызывая появление астматических приступов [3]. Большой вклад в обострение БА также вносит присоединившаяся инфекция, которая является триггером, стимулируя клиническое проявление неинфекционной аллергии, играет роль аллергенов с формированием аллергического воспаления

и вызывает обструкцию бронхов путем неспецифической либерации биологически активных веществ бронхоконстрикторного действия [4, 5]. Одними из важнейших факторов, вызывающих обострения БА, являются недостаточная терапия заболевания, болезни верхних дыхательных путей и др. [4, 6]. В 2006 году в руководстве GINA обзорные выделены как самостоятельный фактор риска возникновения БА [2]. Таким образом, в настоящее время нет единой достоверной точки зрения на механизмы возникновения БА, ее течение и обострения.

Цель исследования – определить клинические особенности обострения бронхиальной астмы в зависимости от вызвавших его причин.

#### Материал и методы

Обследовано 115 больных БА (80 женщин и 35 мужчин), средний возраст которых составил 54,9±2,3 года. У большинства пациентов длительность БА превышала 5 лет и в среднем составила 8,6±0,6 года. Диагноз БА