

*На правах рукописи*

Вязовая Анна Александровна

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ И МНОЖЕСТВЕННАЯ  
ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ *Mycobacterium tuberculosis*

1.5.11 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера)

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, профессор

**Нарвская Ольга Викторовна**

**Официальные оппоненты:**

**Суворов Александр Николаевич** – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, отдел молекулярной микробиологии, заведующий

**Севастьянова Элина Викторовна** – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория молекулярно-генетических методов исследования отдела микробиологии, ведущий научный сотрудник

**Макарова Марина Витальевна** – доктор биологических наук, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», отдел проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии, главный научный сотрудник

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 202 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 202 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

**Борисова Ольга Юрьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Согласно прогнозам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в ближайшие десять лет туберкулез (ТБ), наряду с ВИЧ-инфекцией, останется одной из ведущих причин смертности от инфекционных болезней в мире (WHO. Global tuberculosis report 2020, 2021).

Основными факторами, поддерживающими глобальное бремя туберкулеза, являются рост заболеваемости за счет инфицирования устойчивыми к противотуберкулезным препаратам (ПТП) штаммами *Mycobacterium tuberculosis*, увеличение популяции ВИЧ-коинфицированных и лиц с ослабленным иммунитетом/иммуносупрессией, чему немало способствует пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2 (Нечаева О.Б., 2017; Беляков Н.А. и др., 2017, 2022; Васильева И.А., 2017, 2022; WHO. Global tuberculosis report 2021; Bostanghadiri N. et al., 2022; Starshinova A.A. et al., 2022). Вследствие недостаточной результативности лечения и мер инфекционного контроля среди впервые выявленных больных растет доля случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ), при котором изониазид и рифампицин, два наиболее сильнодействующих препарата, не эффективны (WHO. Global tuberculosis report 2018, 2021). Рекомендованная ВОЗ новая схема лечения МЛУ-ТБ с использованием, в частности, бедаквилина, не исключает формирования устойчивости и к этому препарату за счет геномных мутаций возбудителя (WHO. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance, 2021).

По состоянию на 2019 г. Российская Федерация (РФ) входила в число 30 стран мира с высоким бременем ТБ, на которые приходилось 87% случаев заболевания в мире (WHO. Global tuberculosis report 2020). При этом в России отмечена тенденция к снижению уровней заболеваемости (с 85,1 в 2008 г. до 41,2 в 2019 г.) и смертности (с 17,9 в 2008 г. до 5,1 в 2019 г.) от ТБ на 100 000 населения при неуклонном росте доли МЛУ-ТБ (с 13,0% в 2009 г. до 29,0% в 2018 г.) у впервые выявленных больных и четырехкратном увеличении (с 5,5% в 2009 г. до 23,1% в 2018 г.) доли пациентов с ВИЧ-ассоциированным туберкулезом (ВИЧ/ТБ) (Ресурсы и деятельность противотуберкулезных организаций Российской Федерации в 2018–2019 гг. (статистические материалы), 2020). Динамика основных эпидемиологических показателей по туберкулезу на территориях РФ неодинакова. Так, в 2019 г. выявлено превышение среднего показателя заболеваемости ТБ (25,2 на 100 тыс. населения) на ряде территорий Северо-Западного федерального округа (СЗФО). Доля больных туберкулезом органов дыхания с МЛУ возбудителя среди бактериовыделителей в СЗФО увеличилась с 43,3% в 2009 г. до 60,8% в 2017 г. (против 26,5% и 54,0% в России в целом). При этом резервуар возбудителя МЛУ-ТБ достоверно чаще пополнялся за счет впервые выявленных больных (Галкин В.Б. и др., 2019).

В качестве «золотого» стандарта этиологической диагностики туберкулеза до настоящего времени применяют трудоемкий и длительный микробиологический метод исследования. Однако даже ускоренное культивирование микобактерий на жидких питательных средах в системе ВАСТЕС 960 при определении лекарственной устойчивости (ЛУ) не позволяет изучать структуру популяций и следить за эволюцией *M. tuberculosis* – основного возбудителя туберкулеза человека, открытого Робертом Кохом еще в 1882 г.

В 90-х гг. прошлого столетия были разработаны первые технологии внутривидовой дифференциации штаммов *M. tuberculosis* на основе выявления хромосомных маркеров полиморфизма (инсерционный элемент IS6110, область прямых повторов – DR) (Van Embden et al., 1993; Kamerbeek J. et al., 1997). Полная нуклеотидная последовательность ДНК лабораторного вирулентного штамма H37Rv опубликована в 1998 г. (Cole S. et al., 1998). По мере накопления знаний об организации генома *M. tuberculosis* были выявлены полиморфные минисателлитные локусы MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) и VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) (Supply P. et al., 2001, 2006; Iwamoto T. et al., 2007). С появлением полногеномного секвенирования (Whole Genome Sequencing, WGS) (Vultos T. dos et al., 2008; Farhat M. et al., 2013; Witney A. et al., 2017; Cohen K. et al., 2019) описаны крупные делеции (Large-Sequence Polymorphisms, LSP) и однонуклеотидные замены (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP), пригодные для дифференциации штаммов, а также мутаций, ведущих к формированию лекарственной устойчивости (Van Rie A. et al., 2001; Fleischmann R.D. et al., 2002; Warren R. et al., 2004; Tsolaki A.G. et al., 2005; Huang T.S. et al., 2005; Gryadunov D. et al., 2005; Gagneux S. et al., 2006; Azhikina T. et al., 2006; Владимирский М.А. и др., 2008; Comas I. et al., 2009; Homolka S. et al., 2012; Mokrousov I. et al., 2012, 2014; Зименков Д.В. и др., 2014; Шитиков Е.А., 2014; Беспятовых Ю.А., 2016; Bespyatykh J. et al., 2019; Носова Е.Ю., 2021; Андреевская С.Н. и др., 2022). Эти исследования способствовали формированию представлений о принадлежности *M. tuberculosis* к числу строго клональных видов, подразделяемых на филогенетические линии/сублинии, семейства и кластеры (клоны), различающиеся по географическому распределению и ассоциации с субпопуляциями человека, способности к передаче, вирулентности и развитию лекарственной устойчивости (Mikhecheva N. et al., 2017; Gagneux S., 2018; Reiling N. et al., 2018; Couvin D. et al., 2019; Napier G. et al., 2020; Coscolla M. et al., 2021).

### **Степень разработанности темы исследования**

Молекулярно-генетические исследования на отдельных территориях России с использованием IS6110-RFLP, сполиготипирования (spoligotyping) и MIRU-VNTR-типирования, показали гетерогенность штаммов *M. tuberculosis*. Была установлена принадлежность значительной доли штаммов к генотипу Beijing (Шагинян И.А. и др., 1997; Нарвская О.В. и др., 1999; Черноусова Л.Н. и др., 2001; Toungousova O. et al., 2002; Шемякин И.Г. и др., 2002; Николаевский В.В. и др., 2005; Марьяндышев А.О. и др., 2007; Богун А.Г., 2010; Маркелов Ю.М., 2011; Afanas'ev M. et al., 2011; Dymova M. et al., 2011). Разрабатываются концепции возникновения, эволюции и филогеографии *M. tuberculosis* генетического семейства Beijing и других генотипов (Mokrousov I. et al., 2005, 2015; Савилов Е.Д. и др., 2011; Синьков В.В. и др., 2011; Огарков О.Б., 2014; Shitikov E. et al., 2017; Merker M. et al., 2018, 2022; Жданова С.Н. и др., 2021). Штаммы Beijing, имеющие профиль B0 и подобные ему профили IS6110-RFLP, были причислены к эпидемиологически и клинически значимому международному кластеру B0/W148, «успешному» в российской популяции *M. tuberculosis* (Bifani P. et al., 2002; Нарвская О.В., 2003; Mokrousov I. et al., 2012; Шитиков Е.А., 2014; Merker et al., 2015). В последнее десятилетие продолжается процесс накопления данных о циркуляции на территории России штаммов *M. tuberculosis* различных генотипов и спектре мутаций к основным ПТП (Умпелева Т.В., 2014, 2019; Концевая И.С. и др., 2014; Панов Г.В. и др., 2015; Cherednichenko A.G. et al., 2016; Шур К.В. и др., 2017;

Бадлеева М.В. и др., 2017; Жданова С.Н., 2018; Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2018; Хромова П.А. и др., 2018; Пасечник О.А., 2019; Panova A.E., 2022). Однако молекулярно-генетические исследования *M. tuberculosis* до настоящего времени не регламентированы и осуществляются, как правило, с использованием доступных выборок штаммов и различных по дискриминирующей способности методов исследования, что затрудняет сравнение и интерпретацию результатов.

В этой связи, с учетом тенденций развития эпидемического процесса, становится необходимой систематизация данных микробиологического мониторинга глобальной и территориальных популяций *M. tuberculosis* с использованием комплекса молекулярно-генетических методов исследования для изучения эволюции возбудителя, своевременной оценки клинической и эпидемиологической значимости циркулирующих штаммов в интересах оптимизации контроля МЛУ-ТБ.

**Цель исследования:** изучить генетическое разнообразие, мутации устойчивости к противотуберкулезным препаратам и установить распространенность генотипов, ассоциированных с первичной множественной лекарственной устойчивостью штаммов, в популяции *M. tuberculosis* на Северо-Западе России с использованием единого комплекса молекулярно-генетических методов исследования.

**Задачи исследования:**

1. Провести генотипирование штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных впервые выявленным туберкулезом легких в регионах Северо-Запада России, используя комплекс молекулярно-генетических методов.

2. Определить принадлежность штаммов *M. tuberculosis* к филогенетическим линиям/сублиниям, генетическим семействам и кластерам.

3. Провести сравнительный анализ фенотипической и генотипической устойчивости к основным противотуберкулезным препаратам штаммов *M. tuberculosis* различных генотипов на территориях Северо-Запада России.

4. Выявить ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью генотипы/кластеры штаммов и оценить их эпидемиологическую значимость с учетом региональных особенностей заболеваемости туберкулезом в Северо-Западном федеральном округе.

5. Изучить спектр мутаций, ассоциированных с устойчивостью *M. tuberculosis* к бедаквилину, используя метод полногеномного секвенирования.

6. Разработать способы быстрой идентификации актуальных вариантов генетического семейства Beijing и алгоритм генотипирования штаммов *M. tuberculosis*.

**Научная новизна исследования**

Молекулярно-генетический мониторинг впервые выявил неравномерность распределения генотипов *M. tuberculosis* и нарастание доли штаммов генотипа Beijing с первичной множественной лекарственной устойчивостью в субъектах Северо-Западного федерального округа.

Показано, что в структуре изученной популяции *M. tuberculosis* доминируют штаммы современной сублинии генетического семейства Beijing, принадлежащие к глобально распространенным генотипам B0/W148 и Central Asian/Russian (субтип CAO, впервые выявленный на территориях Северо-Запада России).

Выявленная высокая доля штаммов с множественной лекарственной устойчивостью, принадлежащих к кластеру 100-32 B0/W148, среди больных туберкулезом трудоспособного возраста (в т.ч. ВИЧ-позитивных), свидетельствует об эпидемическом характере распространения и клинической значимости данного генотипа *M. tuberculosis* на территориях Северо-Запада России с высокой плотностью населения.

Впервые в популяции *M. tuberculosis* на Северо-Западе России выявлены ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью кластеры 1065-32 Central Asian/Russian, 1071-32 древней сублинии Beijing и SIT262/Ural, представляющие потенциальную эпидемическую опасность.

Новые профили сполиготипирования *M. tuberculosis*, полученные в Северо-Западном федеральном округе и ранее неизвестные в России и за ее пределами, были депонированы в международную базу данных SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>). Сполигопрофилям, описанным в мире впервые, присвоены номера – SIT4165, SIT4250 и SIT4252.

Впервые разработан способ идентификации генотипа Central Asian/Russian (другое наименование – кластер 94-32) *M. tuberculosis* на основе аллель-специфической ПЦР-РВ для обнаружения уникальной замены G>A в позиции 294 гена *sigE* (Патент на изобретение РФ № 2689800). Впервые разработан способ выявления субтипа CAO Central Asian/Russian Beijing *M. tuberculosis* на основе мультиплексной ПЦР для обнаружения генотип-специфической вставки IS6110 в межгенной области Rv1359 – Rv1360 (Патент на изобретение РФ № 2735415). Впервые разработан способ установления принадлежности штаммов *M. tuberculosis* к современной или древней филогенетических сублиний генотипа Beijing на основе мультиплексной ПЦР-РВ для обнаружения замен GGA>CGA в кодоне 58 гена *mutT2* и CGG>GGG в кодоне 48 гена *mutT4* для (Патент на изобретение РФ № 2743365). Впервые разработан способ определения принадлежности штаммов *M. tuberculosis* к кластеру 1071-32 древней сублинии Beijing на основе ПЦР-РВ для выявления замены нуклеотида 222C>T в гене Rv0144 (Патент на изобретение РФ № 2768021).

Полученные новые для Российской Федерации данные о мутациях устойчивости к бедаквилину в генах *mmpR5* (Rv0678) и *atpE* (Rv1305) расширяют современные представления о спектре генов резистентности *M. tuberculosis*. Показано, что основной механизм устойчивости к бедаквилину у штаммов *M. tuberculosis* B0/W148 и CAO связан с мутациями в различных участках гена *mmpR5* (Rv0678), обеспечивающих эффлюкс препарата из микробной клетки.

Созданы электронные информационные базы данных («Сполигопрофили *Mycobacterium tuberculosis* на Северо-Западе России», ФИПС № 2014620898 и «Сполигопрофили штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Республике Коми», ФИПС № 2019622064), включающие уникальные характеристики штаммов (сполиготип, принадлежность к генетическому семейству, профиль фенотипической устойчивости к противотуберкулезным препаратам), которые могут применяться для изучения региональных особенностей и глобального разнообразия популяций возбудителя туберкулеза.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Впервые на обширной территории Северо-Запада России с использованием единого комплекса молекулярно-генетических методов исследования изучена пространственно-временная структура популяции *M. tuberculosis* и получены новые данные о генетическом

разнообразии и детерминантах устойчивости возбудителя к противотуберкулезным препаратам. Приведены факты, доказывающие неравномерность распределения генотипов в гетерогенных популяциях *M. tuberculosis* в субъектах Северо-Западного федерального округа.

Молекулярно-эпидемиологический мониторинг выявил тенденцию к увеличению доли эволюционно «успешного» генотипа Beijing в структуре территориальных популяций *M. tuberculosis*.

Установлены связи между первичной множественной лекарственной устойчивостью, ассоциированной с определенным спектром мутаций, и принадлежностью штаммов *M. tuberculosis* к различным генотипам, что позволяет оценить клиническую и эпидемиологическую значимость возбудителя. Разработаны теоретические положения, расширяющие границы представлений о значении разнообразия популяции *M. tuberculosis* в условиях широкого распространения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя.

Предложенный алгоритм генотипирования штаммов *M. tuberculosis*, включающий разработанные способы быстрого выявления основных генотипов и кластеров современной и древней сублиний *M. tuberculosis* Beijing, может быть применим для слежения за циркуляцией штаммов определенных генотипов и характеристики динамики пространственно-временной структуры популяции *M. tuberculosis*.

Разработанные электронные базы данных для накопления и сравнительного анализа информации о генотипах штаммов позволяют проводить молекулярно-генетический мониторинг популяции *M. tuberculosis*.

Профили сполиготипирования 408 штаммов депонированы в международную базу сполиготипов SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>).

Полногеномные последовательности 43 серийных изолятов *M. tuberculosis* 11 больных МЛУ-ТБ, леченных бедаквилином, депонированы в международном банке данных GenBank: NCBI Sequence Read Archive (project number PRJNA525341, PRJNA635788) *Mycobacterium tuberculosis* raw sequence reads (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=PRJNA525341>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=PRJNA635788>).

Сформирована коллекция ДНК штаммов, представляющих различные генетические семейства, линии/сублинии и кластеры, для исследования геномики и протеомики *M. tuberculosis* и оценки эффективности новых противотуберкулезных соединений. На представленной коллекции ДНК штаммов апробированы разработанные способы выявления генотипов, кластеров и филогенетических сублиний семейства Beijing *M. tuberculosis* методом ПЦР.

Результаты генотипирования *M. tuberculosis* внедрены в практическую деятельность бактериологической лаборатории ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России (акт внедрения от 01.12.2022 г.). Материалы диссертации внедрены в образовательный процесс Учебного отдела ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России – в программы повышения квалификации врачей (акт внедрения от 01.12.2022 г.), в курс лекций на кафедрах эпидемиологии, общественного здоровья и здравоохранения ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России (акт внедрения от 15.12.2022 г.), на кафедре фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Архангельск (акт внедрения от 12.12.2022 г.), в образовательный процесс

на кафедре поликлинической терапии и профилактической медицины с курсом общественного здоровья и здравоохранения ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова» и в работу микробиологической лаборатории ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер имени Галины Доржиевны Дугаровой», г. Улан-Удэ (акт внедрения от 14.12.2022 г.).

### **Методология и методы исследования**

Методология научной работы основана на современных научно обоснованных принципах изучения популяционной структуры *M. tuberculosis* и спланирована в соответствии с целью и задачами исследования. В качестве теоретического обоснования исследования использованы данные научной литературы, посвященные характеристике лекарственной устойчивости и генетической неоднородности штаммов *M. tuberculosis*. Планирование структуры исследований осуществляли на основе общенаучных репрезентативных методов: микробиологических, молекулярно-генетических, биоинформационных и статистических.

Предметом исследования служили биологические (генотипические и фенотипические) свойства штаммов *M. tuberculosis*. Объектом исследования являлись образцы ДНК штаммов (изоляты) *M. tuberculosis*, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом легких.

Протокол исследования был одобрен этической комиссией ФБУН эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (протокол № 46 от 29.11.2018) и СПб НИИФ (протокол № 31.2 от 27.02.2017). Организация и проведение диссертационного исследования одобрены ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (протокол № 10 от 30.11.2018).

### **Объекты исследования**

Изучены образцы ДНК 828 штаммов *M. tuberculosis* из коллекции СПб НИИФ – многопрофильного научно-клинического учреждения, оказывающего специализированную и высокотехнологичную медицинскую помощь в области диагностики и лечения туберкулеза населению СЗФО России. СПб НИИФ является научно-методическим центром по эпидемиологическому мониторингу и организации противотуберкулезной работы в субъектах СЗФО.

Выделение и первичное определение фенотипической лекарственной чувствительности культур *M. tuberculosis* больных туберкулезом легких проведено в региональных противотуберкулезных диспансерах: ГБУЗ АО «Архангельский клинический противотуберкулезный диспансер», г. Архангельск; БУЗ ВО «Вологодский областной противотуберкулезный диспансер», г. Вологда; ГБУЗ «Противотуберкулезный диспансер Калининградской области», г. Калининград; ГБУЗ «Республиканский противотуберкулезный диспансер», г. Петрозаводск, Республика Карелия; ГБУЗ РК «Республиканский противотуберкулезный диспансер», г. Сыктывкар, Республика Коми; ГОБУЗ «Мурманский областной противотуберкулезный диспансер», г. Мурманск; ГБУЗ «Противотуберкулезный диспансер» Псковской области, г. Псков; ГОБУЗ «Новгородский клинический специализированный центр фтизиопульмонологии», г. Великий Новгород.

Культуры *M. tuberculosis* с сопроводительной характеристикой (номер, дата посева и выделения, фенотипическая лекарственная устойчивость, пол, возраст, диагноз, место жительства пациента) поступали в бактериологическую лабораторию (зав. – к.м.н. Н.С. Соловьева) СПб НИИФ, где хранились для углубленного, в т.ч. молекулярно-генетического исследования в рамках договора о научном сотрудничестве № 556-2012/бс

от 31.07.2012 между ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и ФГБУ СПб НИИФ.

В зависимости от задач исследования были сформированы три группы штаммов *M. tuberculosis*. Первая (основная группа) группа включала 720 штаммов, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом легких в восьми регионах СЗФО с января 2014 г. по декабрь 2019 г. Основные критерии включения в исследование штаммов: культура *M. tuberculosis* выделена до начала лечения; наличие данных о фенотипической лекарственной чувствительности к ПТП изолята *M. tuberculosis*; возраст больного  $\geq 18$  лет; доступность сопроводительной информации (пол, возраст, диагноз, данные о проживании больного туберкулезом на территориях СЗФО). Вторая группа из 67 штаммов, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом легких в Псковской области в более ранние годы (2008–2009 гг.), была изучена для оценки динамических изменений популяции *M. tuberculosis* в данном регионе. Для исследования устойчивости к бедаквилину сформирована третья группа из 43 серийных изолятов *M. tuberculosis* от 11 больных МЛУ-ТБ, получавших лечение бедаквилином в противотуберкулезном диспансере Калининградской области в 2018–2019 гг.

### **Микробиологические исследования**

На базе бактериологической лаборатории СПб НИИФ в рамках договора о научном сотрудничестве совместно с к.м.н. Н.С. Соловьевой и к.м.н. В.Ю. Журавлевым проводилось рекультивирование, идентификация изолятов туберкулезных микобактерий до вида с использованием набора реагентов HAIN-GenoType MTBC (Hain Lifescience, Германия) и определение лекарственной чувствительности изолятов *M. tuberculosis* к широкому спектру ПТП (рифампицину, изониазиду, стрептомицину, этамбутолу, пипразинамиду, этионамиду, офлоксацину, канамицину, амикацину, циклосерину, каприомицину, ПАСК) непрямой метод абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена и модифицированным методом пропорций в жидкой среде Middlebrook 7H9 с противотуберкулезными препаратами с детекцией роста на системе ВАСТЕС MGIT 960 (BD, США). Оценка результатов определения чувствительности к ПТП изолятов возбудителя туберкулеза осуществлялась согласно Приказу Минздрава России № 951 от 29.12.2014 года «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания», используя следующие определения: множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) – устойчивость к изониазиду и рифампицину независимо от наличия устойчивости к другим противотуберкулезным препаратам, широкая лекарственная устойчивость (ШЛУ) – устойчивость к изониазиду, рифампицину, любому препарату из группы фторхинолонов и одному из группы инъекционных противотуберкулезных препаратов 2-го ряда: канамицину и/или амикацину и/или капреомицину, независимо от наличия устойчивости к другим противотуберкулезным препаратам; полирезистентность возбудителя; полирезистентность – устойчивость к двум и более противотуберкулезным препаратам, но не к сочетанию изониазида и рифампицина.

### **Молекулярно-генетические методы исследования**

Экстракция ДНК. Выделение тотальной ДНК из микробных лизатов культуры *M. tuberculosis*, выращенной на среде Левенштейна-Йенсена, проводили по стандартному протоколу (van Embden et al., 1993): к суспензии убитых нагреванием культур микобактерий добавляли лизоцим (Amresco, США) и инкубировали при 37°C. Дальнейшую обработку

проводили с использованием додецилсульфата натрия (AppliChem, Германия), протеиназы К (Евроген, Россия) и цетилтриметиламмония бромид (AppliChem, Германия). Полученный лизат обрабатывали смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1), центрифугировали, осаждали изопропанолом, промывали 70% этанолом, осадок высушивали и растворяли.

Оборудование. ПЦР проводили в амплификаторе «T100 Thermal Cycler» (Bio-Rad, США) и в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе «Rotor-Gene 6000» (Corbett Research, Австралия) с системой детекции флуоресцентного сигнала. Для визуализации результатов использовали гель-документирующую систему «Gel Doc XR+» (Bio-Rad, США).

Определение мутаций устойчивости к ПТП *M. tuberculosis*. Мутации в генах *rpoB*, *katG* и *inhA*, обуславливающие лекарственную устойчивость к рифампицину и изониазиду, определяли методом ПЦР-РВ с использованием тест-систем «Амплитуб-МЛУ-РВ» (ООО Синтол, Москва).

#### Генотипирование *M. tuberculosis*.

Дифференциацию штаммов на группы Beijing и non-Beijing проводили методом мультиплексной ПЦР-РВ, основанным на обнаружении специфичной для генотипа Beijing инсерции IS6110 в межгенной области *dnaA-dnaN* (Kurepina et al., 1998).

Кластер B0/W148 Beijing определяли с помощью мультиплексной ПЦР-РВ, основанной на выявлении вставки IS6110 в области Rv2664-Rv2665, с использованием сконструированных нами праймеров BZF (cgatcacttattgtgttgcg), BZR (taccacgtcctggccaggaa), BZRi (aacgccagagaccagccg) и флуоресцентно-меченых зондов PBZ (FAM-cgggtgagtcggagactctctgac-RTQ1) и nPBZ (HEX-ggcgatgggcttgattcctctga-BHQ2).

Кластер Central Asian/Russian (94-32) Beijing определяли разработанным нами способом выявления замены G>A в гене *sigE* (Патент на изобретение № 2689800 «Способ детекции изолятов *Mycobacterium tuberculosis* Beijing 94-32-кластера в формате реального времени»).

Субтип CAO Central Asian/Russian Beijing определяли по наличию вставки IS6110 в области Rv1359-Rv1360 методом мультиплексной ПЦР (Патент на изобретение № 2735415 «Способ выявления микобактерий туберкулеза Центрально-Азиатского эпидемического кластера генотипа Beijing»).

Древнюю сублинию Beijing определяли методом ПЦР, выявляя мутации в кодоне 48 гена *mutT4* (CGG>GGG) и в кодоне 58 гена *mutT2* (GGA>CGA) (Патент на изобретение № 2743365 «Способ детекции филогенетических сублиний генотипа Beijing *Mycobacterium tuberculosis* в формате реального времени») и вставку IS6110 в локусе NTF методом ПЦР (Wada T. et al., 2009). Кластер 1071-32 древней сублинии определяли путем выявления мутации C>T в гене Rv0144 (Патент на изобретение № 2768021 «Способ детекции генотипа *Mycobacterium tuberculosis* Beijing 1071-32-кластер в формате реального времени»).

Семейство LAM определяли методом ПЦР-RFLP-анализа с эндонуклеазой *MboII* (Fermentas, Литва), выявляя LAM-специфичную замену 309G>A в гене Rv0129c (Gibson A.L. et al., 2008). Подсемейства LAM-RUS и LAM-RDRio: мультиплексные ПЦР использовали для определения LAM-RUS по наличию делеции RD115 и специфической вставки IS6110 в гене *plcA* (Dubiley S. et al., 2007; Tsolaki A.G. et al., 2004); RDRio – по наличию делеции RD174 (Gibson A.L. et al., 2008).

Сполиготи́пирование использовали для анализа полиморфизма (наличие или отсутствие 43 спейсеров) DR-локуса *M. tuberculosis* (Kamerbeek J. et al., 1997). Профили

сполиготипирования сравнивали с международной базой сполиготипов *M. tuberculosis* SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>).

MIRU-VNTR-типирование: анализ 24 локусов VNTR и трех гипервариабельных локусов проводили согласно (Iwamoto T. et al., 2007; Supply P. et al., 2006). Принадлежность изолятов к генетической линии (lineage) устанавливали путем сравнения полученных MIRU-VNTR профилей изолятов с имеющимися в базе данных «MIRU-VNTRplus» (<http://www.miruvntrplus.org>). Для определения принадлежности к клональным комплексам (clonal complexes – CCs) внутри генотипа Beijing профили штаммов по 24 локусам MIRU-VNTR сравнивали с международной базой данных (Merker M. et al., 2015).

Полногеномное секвенирование. Полногеномное секвенирование проводили на платформе MiSeq или HiSeq (Illumina, США). Для подготовки ДНК-библиотек использовали ультразвуковую фрагментацию ДНК и набор NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs). Первичную обработку нуклеотидных прочтений в формате fastq проводили с помощью пакета программ Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>). Последовательности ДНК выравнивали на референсный геном *M. tuberculosis* H37Rv (NC\_000962.3) для поиска геномных вариантов с использованием Geneious 9 (Biomatters, Окленд, Новая Зеландия). Для анализа геномов использовали онлайн-ресурсы Phyresse (<https://bioinf.fz-borstel.de/mchips/phyresse>), PhyTB (<http://pathogenseq.lshtm.ac.uk/phytblive/index.php>) и TGS-TB (<https://gph.niid.go.jp/tgs-tb>).

#### **Статистические методы исследования**

При обработке данных, представленных в формате Excel (Microsoft Office), использовали методы описательной статистики и анализ непараметрических данных на платформе онлайн-сервиса StatTech v. 1.2.0 (ООО «Статтех», Россия) интернет-портала «Медицинская статистика» (<https://medstatistic.ru/calculators/calchit.html>). Для установления статистической значимости различий между группами использовали критерий хи-квадрат Пирсона, точный критерий Фишера для четырехпольной и произвольных таблиц (критический уровень значимости  $p < 0,05$ ), отношение шансов (OR) и отношение рисков (RR). Полученные данные представлены в виде таблиц и диаграмм.

Для оценки аллельного полиморфизма локусов и дискриминирующей способности MIRU-VNTR-типирования вычисляли индекс разнообразия Хантера-Гастона (HGI, Hunter Gaston Index) (Hunter P.R. et al., 1988). Уровень кластеризации (Clustering Rate) штаммов оценивали по формуле:  $CR = (nc - c)/n$ , где  $nc$  – общее количество кластеризованных штаммов,  $c$  – количество кластеров,  $n$  – общее количество штаммов. Кластером считали филогенетическую группу, состоящую из двух и более идентичных по 24 локусам штаммов (Supply P. et al., 2006). Построение дендрограмм проводили на платформе онлайн-базы данных MIRU-VNTRplus и с использованием алгоритма Unweighted pare group method (UPGMA). Для анализа родства между штаммами на основе полиморфизма 24 локусов MIRU-VNTR использовали алгоритм построения минимального связующего дерева (MST, minimum spanning tree) (<https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces#>).

#### **Личное участие автора в получении результатов**

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в выполнении диссертационной работы на всех её этапах, включая анализ научной литературы, обоснование темы, формулирование цели и задач, разработку дизайна исследования; автор самостоятельно осуществляла и разработала алгоритм генотипирования, систематизацию,

статистическую обработку и анализ полученных данных. Разработка способов определения основных генотипов Beijing *M. tuberculosis* и оформление заявок на патенты выполнены совместно с научными сотрудниками ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера д.б.н. И.В. Мокроусовым и ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России к.б.н. Е.А. Шитиковым. MIRU-VNTR-типирование с электрофоретической детекцией, выполнено в лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург) совместно с научными сотрудниками А.А. Герасимовой, Д.Р. Терентьевой и Р.С. Мударисовой. Микробиологические исследования и определение генотипической лекарственной устойчивости выполнены совместно с научными сотрудниками ФГБУ «НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России к.м.н. Н.С. Соловьевой и к.м.н. В.Ю. Журавлевым. Полногеномное секвенирование серийных изолятов *M. tuberculosis* проведено совместно с сотрудниками ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера д.б.н. А.В. Семеновым, к.б.н. Ю.В. Останковой и к.б.н. Д.Е. Полевым.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. В гетерогенной популяции *M. tuberculosis* на территориях Северо-Запада России преобладают штаммы Восточно-Азиатской (L2) и Евро-Американской (L4) филогенетических линий. В субпопуляции семейства Beijing (L2) преобладают неоднородные по локусам MIRU-VNTR и лекарственной чувствительности штаммы современной сублинии генотипов Central Asian/Russian и B0/W148.
2. В регионах Северо-Запада России с высокими показателями заболеваемости туберкулезом доминируют штаммы Beijing B0/W148 с множественной лекарственной устойчивостью, обусловленной преимущественно мутациями *rpoB* Ser531Leu и *katG* Ser315Thr.
3. В геномах серийных изолятов *M. tuberculosis* Beijing больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя, леченных бедаквилином, выявлены мутации в генах *tmpR5* (Rv0678) и *atpE* (Rv1305), ассоциированные с устойчивостью к данному препарату.
4. Разработаны способы ускоренного генотипирования штаммов генетического семейства Beijing *M. tuberculosis* и предложен поэтапный алгоритм для молекулярно-эпидемиологического мониторинга микробных популяций.

#### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность полученных результатов обеспечивается объемом проведенных исследований и выбором четких критериев включения репрезентативного материала. Экспериментальные данные получены с использованием комплекса молекулярно-генетических и бактериологических методов исследования, подвергнуты обработке и систематизации с помощью современных биоинформационных и статистических методов, и представлены в виде таблиц и графических изображений.

Диссертация выполнена в рамках научно-исследовательской работы ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера: «Разработка проблемы генетического разнообразия и изменчивости патогенных микобактерий (возбудителей туберкулеза и микобактериоза) и вакцины БЦЖ и научное обоснование лабораторных методов исследования нового поколения для диагностики и мониторинга популяций» (2015–2020 гг., АААА-А16-116061410036-3) и «Молекулярная и геномная эпидемиология туберкулеза и

микобактериоза: оценка динамических изменений структуры популяций возбудителей и эффективности лабораторных методов нового поколения для диагностики и мониторинга» (2021–2025 гг., АААА-А21-121021600206-5).

Диссертация апробирована на заседании Ученого совета ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (протокол № 1 от 23.12.2022 г.).

Материалы диссертации доложены и представлены на международных, всероссийских и региональных научно-практических конференциях: ежегодные конгрессы Европейского общества микобактериологов (Society of Mycobacteriology – ESM, Флоренция, Италия, 2013; Рига, Латвия, 2015; Катания, Италия, 2016; Дрезден, Германия, 2018; Валенсия, Испания, 2019; 2021); Международная конференция «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2013); конгрессы Национальной ассоциации фтизиатров (Санкт-Петербург, 2013, 2015, 2017, 2018, 2022); Научный симпозиум международной сети институтов Пастера (Париж, Франция, 2014); 1-й Азиатско-Африканский конгресс микобактериологии (Исфахан, Иран, 2015); конгрессы Федерации Европейских Микробиологических обществ (Federation of European Microbiological Societies, FEMS, Валенсия, Испания, 2017); 28-й Европейский конгресс по клинической микробиологии и инфекционным болезням (28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases – ESCMID, Мадрид, Испания, 2018); Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, Беларусь, 2018); всемирные конференции Союза по здоровью легких (Union World Conference on Lung Health, Индия, Хайдарабад, 2019; онлайн – 2020); XI Ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням (Москва, 2019); всероссийские конгрессы по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии, Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 2019, 2021, 2022); Молекулярная диагностика и биобезопасность (онлайн – 2020); Всемирный Микробиологический Форум (World Microbe Forum, онлайн – 2021); Международный конгресс Европейского респираторного общества (International Congress of the European Respiratory Society – ERS, онлайн – 2021); конгресс с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2022» (Москва, 2022); XV Национальный конгресс болгарских микробиологов с международным участием (XV Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation, Копривштица, Болгария, 2022).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 59 печатных работ, из них 34 статьи в рецензируемых изданиях, 12 – тезисы в рецензируемых изданиях, 9 – тезисы в сборниках трудов и материалах конференций, 4 – патенты на изобретение. Получено 2 свидетельства о регистрации базы данных.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 277 страницах, написана по традиционному плану, содержит введение (включающее методологию и методы исследования), обзор литературы, пять глав собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список литературы и 4 приложения. Работа иллюстрирована 89 таблицами и 39 рисунками. Список литературы содержит 338 источников, в том числе 85 отечественных и 253 иностранных.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Характеристика групп впервые выявленных больных туберкулезом легких

Исходя из цели и задач исследования, были изучены образцы ДНК 720 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных с 2014 г. по 2019 г. от впервые выявленных больных туберкулезом легких в восьми регионах Северо-Запада России: Республика Коми (130) и Республика Карелия (67), Архангельская (89), Вологодская (82), Калининградская (73), Мурманская (67), Новгородская (45) и Псковская (167) области. Основными диагнозами были инфильтративный (66,1%) и диссеминированный (19,6%) туберкулез легких; выявлены статистически значимые различия в структуре клинических диагнозов в зависимости от региона СЗФО ( $p < 0,001$ ). Среди пациентов преобладали мужчины (71,1%), что согласуется с общероссийскими показателями (Нечаева О.Б., 2017); соотношение полов в зависимости от региона СЗФО значимо не различалось ( $p = 0,660$ ). Медианный возраст пациентов обоего пола составил 42 года (95% ДИ 34-52) – возраст трудоспособного и наиболее социально активного населения, причем выявлены различия значений показателя в зависимости от пола ( $p = 0,014$ ) и региона СЗФО ( $p = 0,034$ ). Большинство пациентов в четырех регионах СЗФО были городскими жителями: Архангельская область – 69,7%, Вологодская область – 61,0%, Республика Коми – 65,4%, Мурманская область – 98,5%. Среди больных туберкулезом выявлено 49 ВИЧ-положительных (информация о ВИЧ-статусе больных ТБ была доступна для шести территорий (за исключением Республики Карелия и Псковской области)). ВИЧ-положительные пациенты выявлены преимущественно (77,5%) среди молодых (до 40 лет включительно) лиц и преобладали в группе мужчин (57,1%).

### Характеристика штаммов *M. tuberculosis* в регионах СЗФО

Региональные популяции *M. tuberculosis* различались по показателю первичной фенотипической чувствительности штаммов к ПТП, причем МЛУ-штаммы преобладали в Новгородской области и Республике Карелия ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 1).

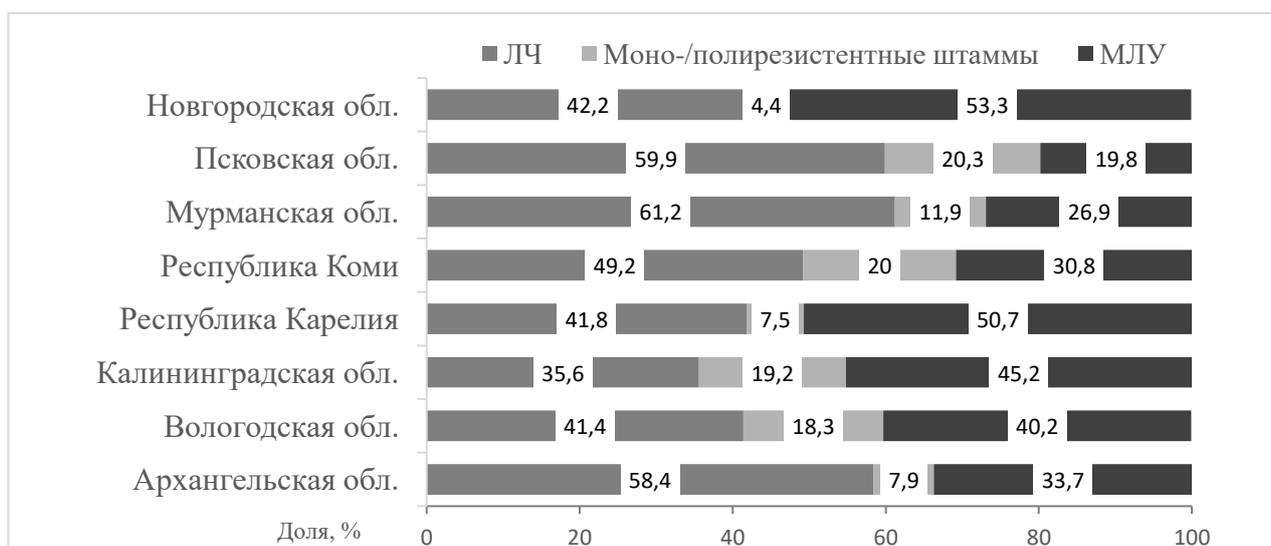


Рисунок 1 – Отношение к ПТП штаммов *M. tuberculosis* в регионах СЗФО

У МЛУ-штаммов *M. tuberculosis*, независимо от региона, устойчивость к рифампицину и изониазиду была обусловлена преимущественно мутациями *rpoB* Ser531Leu и *katG* Ser315Thr соответственно. По спектру мутаций устойчивости к изониазиду региональные популяции *M. tuberculosis* значимо не различались ( $p=0,499$ ), но имелись различия по спектру мутаций *rpoB* ( $p<0,001$ ). Наиболее разнообразный спектр мутаций *rpoB* (Ser531Leu, Asp516Tyr, Asp516Val, His526Leu, Ser531Trp) *M. tuberculosis* был выявлен в Новгородской области. В Мурманской области, напротив, выявлена лишь замена *rpoB* Ser531Leu. В Калининградской области, по сравнению с другими регионами, выявлена относительно высокая доля (15,6%) замены *rpoB* His526Tyr у штаммов *M. tuberculosis*. При этом во всех регионах у фенотипически устойчивых к рифампицину штаммов *M. tuberculosis* превалировала замена Ser531Leu в гене *rpoB*.

С помощью молекулярно-генетических методов (мультиплексная ПЦР и сполиготипирование) была установлена принадлежность штаммов *M. tuberculosis* к генотипу Beijing и группе non-Beijing, включающей другие генетические семейства (Таблица 1).

Таблица 1 – Генотипы *M. tuberculosis* в регионах СЗФО

Регион	Число штаммов <i>M. tuberculosis</i> (%)					
	Beijing	T	LAM	Ural	Haarlem	S/ X/ CAS1-Delhi/ Unknown
Архангельская обл.	60 (67,4)	13 (14,6)	2 (2,3)	4 (4,5)	4 (4,5)	-/-/ 1 (1,1)/ 5 (5,6)
Вологодская обл.	51 (62,2)	9 (11,0)	9 (10,9)	4 (4,9)	5 (6,1)	-/-/-/4 (4,9)
Калининградская обл.	46 (63,0)	11 (15,1)	10 (13,7)	4 (5,5)	-	1 (1,4)/ 1 (1,4)/-/-
Республика Карелия	36 (53,7)	10 (14,9)	8 (11,9)	9 (13,4)	3 (4,5)	-/ 1 (1,5)/-/-
Республика Коми	73 (56,2)	23 (17,9)	16 (12,3)	9 (6,9)	7 (5,4)	-/ 1 (0,8)/-/ 1 (0,8)
Мурманская обл.	35 (52,2)	6 (8,9)	5 (7,5)	13 (19,4)	2 (3,0)	-/ 1 (1,5)/-/ 5 (7,5)
Псковская обл.	85 (50,9)	25 (15,0)	32 (19,2)	4 (2,4)	14 (8,4)	-/-/ 1 (0,6)/ 6 (3,6)
Новгородская обл.	25 (55,6)	5 (11,1)	4 (8,9)	4 (8,9)	3 (6,7)	-/-/-/4 (8,9)

Штаммы группы non-Beijing различались профилями сполиготипирования (SIT), определяющими принадлежность к генетическому семейству. Несмотря на то, что SIT53 и SIT42 считаются глобально распространенными сполиготипами non-Beijing, они были обнаружены не во всех субпопуляциях *M. tuberculosis* на территориях СЗФО. Чаще всего SIT53/T определяли в Архангельской области (27,6%), где группа штаммов T была второй по численности после Beijing. Доля SIT42/LAM была наибольшей (18,5%) в Калининградской области. В Республике Карелия выявлен наиболее крупный кластер штаммов SIT40/T. Единственным сполиготипом, выявленным во всех восьми субъектах СЗФО, был SIT262, доля (18,8%) которого, как и в целом генотипа Ural (19,4%), была наибольшей в Мурманской области (Таблица 2).

Анализ результатов генотипирования штаммов *M. tuberculosis* в сопоставлении с ранее опубликованными данными выявил доминирование и увеличение удельного веса генотипа Beijing в регионах СЗФО в период наблюдения.

Таблица 2 – Генотипы штаммов *M. tuberculosis* non-Beijing в регионах СЗФО

SIT	Генотип	Число штаммов (%)							
		Архангельская обл. (n=29)	Вологодская обл. (n=31)	Калининградская обл. (n=27)	Респ. Карелия (n=31)	Респ. Коми (n=57)	Мурманская обл. (n=32)	Псковская обл. (n=82)	Новгородская обл. (n=20)
262	Ural	1 (3,4)	4 (12,9)	2 (7,4)	3 (9,7)	3 (5,3)	6 (18,8)	2 (2,4)	2 (10,0)
254	LAM	1 (3,4)	4 (12,9)	1 (3,7)	1 (3,2)	2 (3,5)	1 (3,1)	6 (7,3)	-
53	T	8 (27,6)	2 (6,5)	6 (22,2)	2 (6,5)	9 (15,8)	-	12 (14,6)	5 (25,0)
52	T	2 (6,9)	3 (9,7)	-	2 (6,5)	5 (8,8)	1 (3,1)	2 (2,4)	-
35	Ural	2 (6,9)	-	1 (3,7)	3 (9,7)	-	6 (18,8)	1 (1,2)	2 (10,0)
50	Haarlem	2 (6,9)	1 (3,2)	-	2 (6,5)	1 (1,8)	-	2 (2,4)	2 (10,0)
42	LAM	-	-	5 (18,5)	2 (6,5)	6 (10,5)	3 (9,4)	10 (12,2)	-
264	LAM	-	2 (6,5)	-	-	1 (1,8)	-	4 (4,9)	1 (5,0)
40	T	1 (3,4)	-	1 (3,7)	5 (16,1)	-	1 (3,1)	-	-
444	LAM	-	-	3 (11,1)	-	2 (3,5)	-	1 (1,2)	-
803	LAM	1 (3,4)	-	-	-	4 (7,0)	-	-	1 (5,0)
560	LAM	-	-	1 (3,7)	-	-	-	2 (2,4)	2 (10,0)
122	T	-	1 (3,2)	-	-	-	2 (6,3)	1 (1,2)	-
2	Haarlem	-	2 (6,5)	-	-	-	2 (6,3)	3 (3,7)	-
47	Haarlem	1 (3,4)	-	-	-	3 (5,3)	-	2 (2,4)	-
56	Unknown	1 (3,4)	2 (6,5)	-	-	-	-	1 (1,2)	-
266	LAM	-	-	-	1 (3,2)	-	-	2 (2,4)	-
20	LAM	-	-	-	1 (3,2)	-	-	1 (1,2)	-
506	LAM	-	-	-	-	1 (1,8)	-	1 (1,2)	-
1173	T	-	3 (9,7)	-	-	-	-	1 (1,2)	-
334	T	-	-	1 (3,7)	-	1 (1,8)	-	-	-
1255	T	-	-	-	1 (3,2)	-	1 (3,1)	-	-
1447	Ural	-	-	-	-	1 (1,8)	1 (3,1)	-	-
36	Haarlem	1 (3,4)	-	-	-	-	-	1 (1,2)	-
237	Unknown	-	-	-	-	1 (1,8)	1 (3,1)	-	-
119	X	-	-	-	1 (3,2)	1 (1,8)	-	-	-
26	CAS1-Delhi	1 (3,4)	-	-	-	-	-	1 (1,2)	-

Доля данного генотипа *M. tuberculosis* была максимальной в Архангельской области – 67,4%, в 2018 г., где с 2004–2006 г. (57,1%, Baranov A. et al., 2009) отмечен прирост на 10,3% параллельно с увеличением доли новых случаев МЛУ-ТБ (Елисеев П.И. и др., 2021). В расположенной по соседству Республике Коми доля генотипа Beijing достигла 56,2% (2017 г.), демонстрируя прирост на 14,3% (41,9% в 2004–2006 г. (Baranov A. et al., 2009)); в Мурманской области доля Beijing неуклонно росла (44,0 в 2003 г. (Mäkinen J. et al., 2011), 47,2% в 2006 г. (Baranov A. et al., 2009) и достигла 52,2% в 2017 г. Подобная тенденция наблюдалась и в Калининградской области, где за 10 лет на фоне роста удельного веса МЛУ-ТБ (Ершова А.В., 2016) доля генотипа Beijing увеличилась на 22,7% – с 40,3% (2006 г. (Mokrousov I. et al., 2009)) до 63,0%. В Республике Карелия доля штаммов данного генотипа составила 53,8% (2014 г.). Результаты первых популяционных исследований *M. tuberculosis* в Вологодской и Новгородской областях выявили принадлежность к генотипу Beijing более половины (62,2% и 55,6% соответственно) штаммов возбудителя.

Комбинация методов мультиплексной ПЦР позволила выявить неоднородность структуры субпопуляций *M. tuberculosis* Beijing в регионах СЗФО: большинство штаммов принадлежали к современной сублинии (крупные кластеры B0/W148, Central Asian/Russian, Central Asian/Russian подтип CAO и другие штаммы), единичные – к древней сублинии (Таблица 3).

Таблица 3 – Структура субпопуляции *M. tuberculosis* Beijing в регионах СЗФО

Регион	Число штаммов Beijing (%)				
	B0/W148	Central Asian/Russian	Central Asian/Russian подтип CAO	другие	древняя сублиния
Архангельская обл.	18 (30,0)	34 (56,7)	2 (3,3)	5 (8,3)	1 (1,7)
Вологодская обл.	6 (11,8)	34 (66,7)	7 (13,7)	3 (5,9)	1 (2,0)
Калининградская обл.	17 (37,0)	17 (37,0)	4 (8,7)	6 (13,0)	2 (4,3)
Республика Карелия	13 (36,1)	15 (41,7)	3 (8,3)	2 (5,6)	3 (8,3)
Республика Коми	26 (35,6)	43 (58,9)	2 (2,7)	1 (1,4)	1 (1,4)
Мурманская обл.	7 (20,0)	22 (62,9)	1 (2,9)	5 (14,3)	-
Псковская обл.	14 (16,5)	50 (58,8)	4 (4,7)	14 (16,5)	3 (3,5)
Новгородская обл.	10 (40,0)	12 (48,0)	3 (12,0)	-	-

При отсутствии значимых различий в частоте встречаемости генотипа Beijing в популяциях *M. tuberculosis* регионы СЗФО различались по численности кластеров Beijing, в частности, B0/W148 и Central Asian/Russian (включая подтип CAO) ( $p < 0,001$ ).

Впервые осуществленный мониторинг популяции *M. tuberculosis* в Псковской области показал нарастание доли штаммов Beijing с 44,6% (2008–2009 гг.), 44,9% (2015 г.) до 57,7% (2018 г.). При этом отмечено увеличение доли штаммов Central Asian/Russian с 20,0% в 2008–2009 гг. до 35,9% в 2018 г. ( $p = 0,037$ ); доли кластера B0/W148 существенно не различались: 12,3% – 2008–2009 гг., 10,3% – в 2018 г. ( $p = 0,699$ ). Среди штаммов non-Beijing доминировали сполиготипы SIT42/LAM и SIT53/T.

В структуре генотипов МЛУ-штаммов в регионах доминировал Beijing (кластеры B0/W148 и Central Asian/Russian (включая подтип CAO) и другие варианты, в т.ч. древняя сублиния (Рисунок 2).

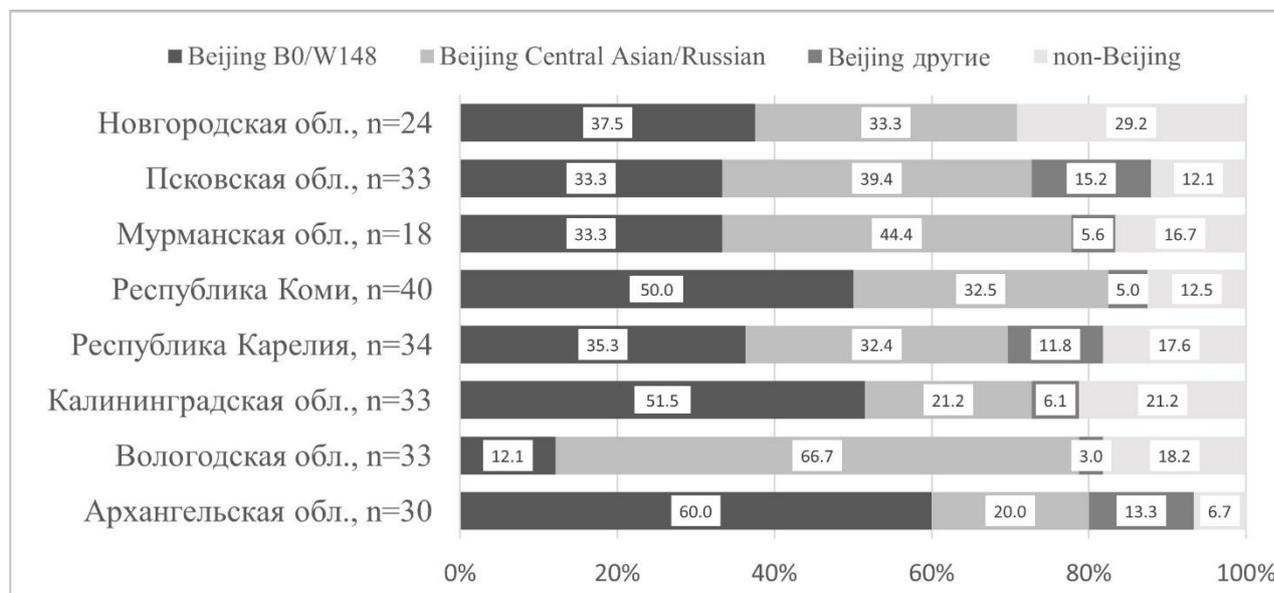


Рисунок 2 – Генотипы МЛУ-штаммов *M. tuberculosis* в регионах СЗФО

Среди МЛУ-штаммов наименьшая доля Beijing была выявлена в Новгородской области (70,8%), наибольшая – в Архангельской области (93,3%), имеющей один из самых высоких (33,8% в 2018 г.) в СЗФО показателей МЛУ возбудителя среди новых случаев ТБ (Елисеев П.И. и др., 2021). Наибольшие доли МЛУ-штаммов ( $\geq 50\%$ ) кластера B0/W148 обнаружены в Архангельской, Калининградской областях и в Республике Коми.

Анализ динамики субпопуляции Beijing в Псковской области выявил статистически значимые различия доли МЛУ-штаммов, принадлежащих к генотипам B0/W148 и Central Asian/Russian: 87,5% и 46,2% ( $p=0,023$ ) в 2008–2009 гг., 66,7% и 16,7% ( $p=0,009$ ) в 2015 г. и 87,5% и 34,6% ( $p=0,006$ ) в 2018 г. соответственно.

Дальнейшая дифференциация штаммов Beijing (в шести из восьми регионов СЗФО) выявила гетерогенность профилей MIRU-VNTR<sub>24</sub> (Рисунок 3).

MIRU-VNTR<sub>24</sub>-типирование 288 из 411 штаммов Beijing подтвердило гетерогенность изученной субпопуляции возбудителя и выявило кластеры штаммов, среди которых наиболее крупными в регионах СЗФО были 100-32 B0/W148 и 94-32 Central Asian/Russian (Рисунок 3, Таблица 4).

Таблица 4 – Основные кластеры MIRU-VNTR<sub>24</sub> штаммов Beijing в регионах СЗФО

Регион	B0/W148		Central Asian/Russian				
	100-32	4737-32	94-32	1065-32	95-32	99-32	1076-32
Вологодская обл.	4 (7,8)	1 (2,0)	18 (35,3)	2 (3,9)	8 (15,7)	1 (2,0)	-
Калининградская обл.	13 (28,3)	-	6 (13,0)	-	2 (4,3)	1 (2,2)	1 (2,2)
Республика Карелия	9 (25,0)	1 (2,8)	9 (25,0)	1 (2,8)	-	-	-
Республика Коми	21 (28,8)	3 (4,1)	17 (23,3)	8 (11,0)	1 (1,4)	3 (4,1)	1 (1,4)
Мурманская обл.	6 (17,1)	-	15 (42,9)	-	-	-	1 (2,9)
Псковская обл.	6 (13,3)	-	10 (22,2)	6 (13,3)	1 (2,2)	1 (2,2)	2 (4,4)

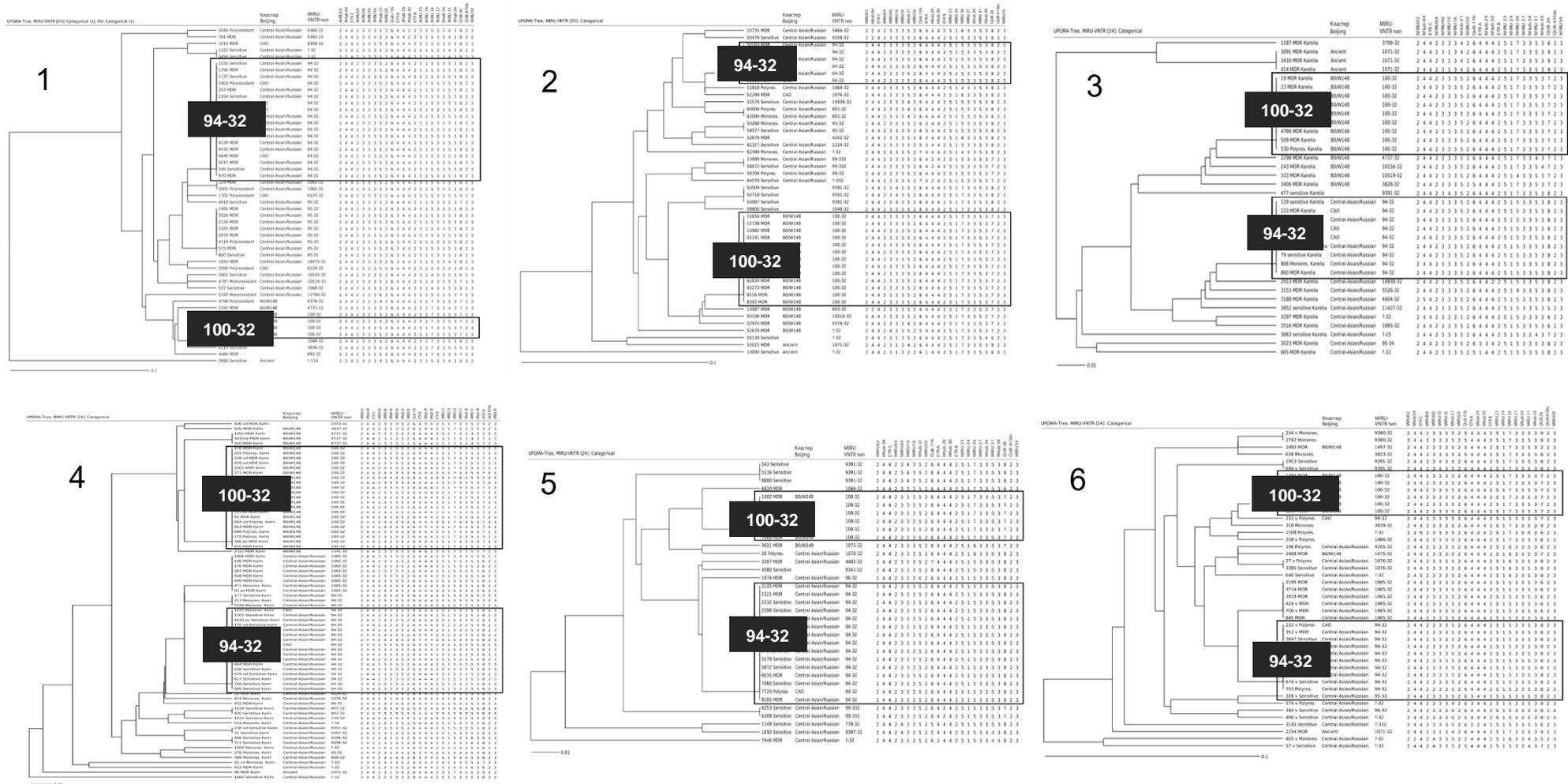


Рисунок 3 – Дендрограмма профилей MIRU-VNTR<sub>24</sub> штаммов *M. tuberculosis* Beijing (n=288)

1 – Вологодская область; 2 – Калининградская обл.; 3 – Респ. Карелия; 4 – Респ. Коми; 5 – Мурманская обл., 6 – Псковская обл.

Примечание: кластеры 100-32 и 94-32 выделены прямоугольными рамками. Для каждого штамма указаны номер, отношение к ПТП (Sensitive – ЛЧ, Mono-resistant – монорезистентность, Poly-resistant – полирезистентность, MDR – МЛУ), обозначение профиля согласно базе данных «MIRU-VNTRplus» (<http://www.miruvntrplus.org>)

Кластер 100-32 B0/W148 включал около четверти штаммов Beijing в Калининградской области, республиках Коми и Карелия; в наименьшей доле данный кластер был представлен в Вологодской области. Штаммы кластера 94-32 Central Asian/Russian преобладали в Мурманской и Вологодской областях (Таблица 4).

Анализ результатов генотипирования в сопоставлении с данными о фено- и генотипической лекарственной устойчивости штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных впервые выявленным туберкулезом легких в регионах, послужил основой для комплексной характеристики популяции возбудителя туберкулеза в СЗФО.

### Разнообразие структуры популяции *M. tuberculosis*

Фенотипическая чувствительность к ПТП была сохранена у 364 (50,6%) из 720 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом легких в восьми регионах СЗФО; МЛУ проявляли 245 (34,0%) штаммов, остальные были устойчивы к одному (монорезистентность) или нескольким (полирезистентность) ПТП. МЛУ-штаммы возбудителя чаще выделяли от больных среднего возраста (31-40 лет), чем от больных старше 60 лет (31,8% против 8,9%) ( $p=0,042$ ).

Для 695 (96,5%) из 720 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных впервые выявленным туберкулезом легких в регионах СЗФО, определена принадлежность к одному из 8 генетических семейств (генотипов); остальные 25 штаммов были отнесены к неклассифицируемой группе Unknown. Более половины штаммов *M. tuberculosis* принадлежали к генотипу Beijing Восточно-Азиатской филогенетической линии; остальные 309 штаммов (группа non-Beijing) были представителями генетических семейств T, LAM, Ural, Haarlem и других Евро-Американской филогенетической линии и семейства CAS1-Delhi Центрально-Азиатской филогенетической линии (Таблица 5).

Таблица 5 – Генотипы штаммов *M. tuberculosis*

Филогенетическая линия	Генотип (генетическое семейство, линия)	Число штаммов, абс. (%)
Восточно-Азиатская (L2)	Beijing	411 (57,1)
Евро-Американская (L4)	T	102 (14,2)
	LAM	86 (11,9)
	Ural	51 (7,1)
	Haarlem	38 (5,3)
	S	1 (0,1)
	X	4 (0,6)
Центрально-Азиатская (L3)	CAS1-Delhi	2 (0,3)
-	Unknown	25 (3,5)

Подавляющее большинство штаммов LAM (93%) были отнесены к сублинии LAM-RUS, также выявлены единичные штаммы LAM RD-Rio (Lazzarini L.C. et al., 2007), редко встречающиеся в России и странах Восточной Европы (Skiba Y. et al., 2019).

У штаммов *M. tuberculosis* различных семейств non-Beijing определено 90 вариантов профилей сполиготипирования, характеризующихся различной распространенностью в мире и России. Из них 15 сполито-профилей, описанных на территории страны впервые, были депонированы в международную базу данных SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>); семи из них присвоены номера SIT (4248, 4249, 4250, 4251, 4252, 4264 и 4265); остальные, не имеющие аналогов в базе данных, обозначены как «orphan». Преобладающими профилями сполиготипирования штаммов non-Beijing были SIT53/T (14,2%; 44/309), SIT42/LAM (8,4%; 26) и SIT262/Ural (7,4%; 23).

Штаммы *M. tuberculosis* различных генотипов были неоднородны по чувствительности к ПТП, причем более двух третей ЛЧ-штаммов представляли группу non-Beijing, значительная доля которых принадлежала к гетерогенному семейству Т (25,3%) (Таблица 6).

Таблица 6 – Отношение к ПТП штаммов *M. tuberculosis* различных генотипов

Генотип	Число штаммов (%)		
	ЛЧ (n=364)	М/П (n=111)	МЛУ (n=245)
Beijing	132 (36,3)	74 (66,7)	205 (83,7)
non-Beijing:	232 (63,7)	37 (33,3)	40 (16,3)
Т	92 (25,3)	5 (4,5)	5 (2,0)
LAM	60 (16,5)	14 (12,6)	12 (4,9)
Ural	32 (8,8)	10 (9,0)	9 (3,7)
Haarlem	27 (7,4)	5 (4,5)	6 (2,5)
S	-	1 (0,9)	-
X	4 (1,1)	-	-
CAS1-Delhi	2 (0,6)	-	-
Unknown	15 (4,1)	2 (1,8)	8 (3,3)

Примечание: ЛЧ – лекарственная чувствительность; М/П – моно- и полирезистентность

У МЛУ-штаммов non-Beijing преобладали сполитотипы SIT42/LAM (19,2%) и SIT262/Ural (34,8%). Вклад генотипов LAM и Ural в распространение МЛУ-ТБ отмечен также в ряде работ (Богун А.Г., 2010; Zalutskaya A. et al., 2013; Умпелева Т.В., 2014; Crudu V. et al., 2015; Sinkov V. et al., 2018; Brown T. et al., 2021). Единичные штаммы LAM (SIT42, SIT20 и SIT1321), отнесенные к сублинии RD-Rio, были преимущественно ЛЧ (5 из 6), в отличие от первоначально выявленных в Бразилии МЛУ-штаммов (Gibson A. et al., 2008).

В настоящем исследовании доказана связь МЛУ с принадлежностью штаммов *M. tuberculosis* к генотипу Beijing ( $p < 0,0001$ ; OR=6,69 [4,56-9,83]), что согласуется с опубликованными данными (Bifani P. et al., 1996; Narvskaya O. et al., 2002; Toungoussova O. et al., 2003; Parvati I. et al., 2010; Keikha M. et al., 2021).

Устойчивость МЛУ-штаммов к рифампицину и изониазиду была обусловлена преимущественно (81,2%; 199/245) характерными для российской популяции *M. tuberculosis* заменами в генах *rpoB* Ser531Leu и *katG* Ser315Thr, которые, не снижая жизнеспособности и вирулентности штаммов, способствуют поддержанию резервуара МЛУ-штаммов возбудителя (Нарвская О.В., 2003). При этом выявлены некоторые особенности спектра мутаций в зависимости от генотипа микроорганизма (Таблица 7).

Таблица 7 – Профили мутаций устойчивости МЛУ-штаммов *M. tuberculosis*

Профиль мутаций	Генотип					
	Beijing (n=205)	T (n=5)	LAM (n=12)	Ural (n=9)	Haarlem (n=6)	Unknown (n=8)
<i>katG</i> Ser315Thr, <i>rpoB</i> Ser531Leu	179 (87,3)	3 (60,0)	3 (25,0)	5 (55,6)	4 (66,7)	5 (62,5)
<i>katG</i> Ser315Thr, <i>rpoB</i> His526Tyr	3 (1,5)	1 (20,0)	1 (8,3)	-	-	-
<i>katG</i> Ser315Thr, <i>rpoB</i> His526Asp	-	-	-	-	1 (16,7)	1 (12,5)
<i>katG</i> Ser315Thr, <i>rpoB</i> His526Asn	1 (0,5)	-	-	-	-	-
<i>katG</i> Ser315Thr, <i>rpoB</i> His526Leu	1 (0,5)	-	-	-	-	-
<i>katG</i> Ser315Thr, <i>rpoB</i> Asp516Tyr	1 (0,5)	-	-	1 (11,1)	-	-
<i>katG</i> Ser315Thr, <i>rpoB</i> Ser531Trp	1 (0,5)	-	-	-	-	-
<i>katG</i> Ser315Thr, <i>rpoB</i> Leu533Pro	1 (0,5)	-	-	-	-	-
<i>katG</i> Ser315Thr, <i>inhA</i> C(-15)T, <i>rpoB</i> Asp516Val	-	-	1 (8,3)	-	-	2 (25,0)
<i>katG</i> Ser315Thr, <i>inhA</i> C(-15)T, <i>rpoB</i> His526Asp	-	-	3 (25,0)	-	-	-
<i>katG</i> Ser315Thr, <i>inhA</i> C(-15)T, <i>rpoB</i> His526Tyr	-	-	1 (8,3)	-	-	-
<i>katG</i> Ser315Thr, <i>inhA</i> C(-15)T, <i>rpoB</i> Ser531Leu	9 (4,4)	-	3 (25,0)	2 (22,2)	-	-
<i>inhA</i> C(-15)T, <i>rpoB</i> Ser531Leu	1 (0,5)	-	-	-	-	-
<i>katG</i> Ser315Thr, <i>inhA</i> T(-8)A/C, <i>rpoB</i> Ser531Leu	1 (0,5)	-	-	-	-	-
<i>katG</i> Ser315Thr, <i>rpoB</i> *	7 (3,4)	1 (20,0)	-	1 (11,1)	1 (16,7)	-

Примечание: \*мутации устойчивости к рифампицину, определяемые набором реагентов «Амплитуб-МЛУ-РВ», не обнаружены

Как видно из таблицы 7, канонический профиль мутаций – *rpoB* Ser531Leu и *katG* Ser315Thr имело подавляющее большинство (87,3%) МЛУ-штаммов Beijing и лишь 25% – LAM. У 66,7% МЛУ-штаммов LAM выявлены сочетание мутаций *katG* Ser315Thr и *inhA* C(-15)T, у 50% – мутации в кодонах 516 и 526 гена *rpoB*. У 10 МЛУ-штаммов канонические мутации устойчивости к рифампицину, определяемые набором реагентов «Амплитуб-МЛУ-РВ», не обнаружены.

Показатель первичной МЛУ штаммов Beijing в СЗФО составил 83,7%, демонстрируя абсолютный прирост за исследуемый период на 22,3% (темп прироста 36,3%) по сравнению с периодом 1996–2002 гг. – 61,4% (Нарвская О.В., 1999, 2003).

Доминирование семейства Beijing в популяции *M. tuberculosis* необязательно коррелирует с напряженностью эпидемической ситуации в регионе, что может быть связано с неоднородностью штаммов данного генотипа. Так, в Вологодской области, где регистрируется один из наименьших уровней заболеваемости ТБ по СЗФО и России (Ресурсы и деятельность противотуберкулезных организаций Российской Федерации в 2018–2019 гг., 2020), к генотипу Beijing принадлежало более половины (62,2%) штаммов, из них 81,8% обладали МЛУ.

Субпопуляция *M. tuberculosis* Beijing в СЗФО была представлена кластерами современной сублинии: Central Asian/Russian (включая субтип CAO) – 61,5% (253/411 штаммов) и B0/W148 – 26,7% (110/411) штаммов. Доля субтипа CAO, распространенного преимущественно в Средней Азии (Merker M. et al., 2018), в составе гетерогенного кластера

Central Asian/Russian в СЗФО составила 10,3% (26/253). Доля штаммов древней сублинии Beijing в структуре генотипов общей популяции *M. tuberculosis* на Северо-Западе России составила 1,5%, что в разы меньше чем в Западной Сибири (Mokrousov I. et al., 2019).

Территориальные субпопуляции *M. tuberculosis* значительно различались ( $p < 0,001$ ) по числу штаммов *M. tuberculosis* Central Asian/Russian и B0/W148. Так, наибольшие доли штаммов генотипа B0/W148 были выявлены в общих популяциях *M. tuberculosis* Калининградской (2015 г.) и Новгородской (2019 г.) областей (по 22,0%), где на протяжении десятилетия отмечалось превышение среднего показателя заболеваемости ТБ по СЗФО. Важно отметить, что в настоящем исследовании именно в этих двух областях СЗФО медианный возраст больных ТБ был наименьшим (37 лет), причем основную группу заболевших составляли пациенты преимущественно молодого и среднего возраста (29-48 и 32-46 лет соответственно). Известно, что смещение пика заболеваемости туберкулезом в более молодые возрастные группы является одним из индикаторов нарастания напряженности эпидемической ситуации (Нечаева О.Б., 2015).

Генотип Central Asian/Russian был наиболее распространенным (50,0%) у штаммов *M. tuberculosis* в Вологодской области, здесь же выявлена наименьшая доля B0/W148 (7%). При этом Вологодская область характеризовалась относительно спокойной эпидемической ситуацией по туберкулезу: в 2018 г. заболеваемость на 100 тыс. населения составляла 15,8 (в СЗФО – 28,6, в РФ – 44,4) (Ресурсы и деятельность противотуберкулезных организаций Российской Федерации в 2018–2019 гг., 2020). Штаммы B0/W148 выделяли преимущественно в районах Вологодской области с наиболее развитой транспортной инфраструктурой (северо-запад области – 18,2%). Отсутствие тесных контактов на территориях с низкой плотностью населения могло сдерживать распространение штаммов кластера B0/W148: их доля не превышала 7% в некоторых районах Республики Коми, где преобладают коренные жители, занятые в сельском хозяйстве.

В настоящем исследовании все штаммы B0/W148 ( $n=110$ ) проявляли лекарственную устойчивость, и была установлена ассоциация данного генотипа с МЛУ (87,3%) ( $p < 0,001$ ). Доля МЛУ-штаммов Central Asian/Russian, включая субтип CAO, была значительно меньше, чем B0/W148. Однако все штаммы субтипа CAO, доля которых в общей популяции *M. tuberculosis* СЗФО составила 3,6% (26/720), были лекарственно устойчивы, а 57,7% из них обладали МЛУ (Таблица 8).

Таблица 8 – Фенотипическая лекарственная чувствительность штаммов *M. tuberculosis* генотипа Beijing

Отношение к ПТП	Число штаммов, абс. (%)				
	B0/W148 (n=110)	Central Asian/Russian (n=227)	Central Asian/Russian субтип CAO (n=26)	Другие, современная сублиния (n=37)	Древняя сублиния (n=11)
ЛЧ	–	114 (45,1)	-	16 (43,2)	2 (18,2)
М/П	14 (12,7)	39 (17,2)	11 (42,5)	10 (27,3)	-
МЛУ	96 (87,3)	74 (32,6)	15 (57,7)	11 (29,7)	9 (81,8)

Примечание: ЛЧ – лекарственная чувствительность; М/П – моно- и полирезистентность

Следует отметить, что субтип САО, штаммы которого наиболее распространены и ассоциированы с устойчивостью к ПТП в Средней Азии (Mokrousov I. et al., 2009; Merker M. et al., 2015, 2018;), на территории России был выявлен в Самаре (Casali N. et al., 2014; Merker M. et al., 2018).

Полученные по СЗФО данные, согласуясь с результатами исследований в Центральном, Уральском и Сибирском федеральных округах (Умпелева Т.В., 2014; Шур К.В. и др., 2017; Жданова С.Н., 2018; Panova A. et al., 2022), свидетельствуют о клональной экспансии МЛУ-штаммов генотипа В0/W148 *M. tuberculosis* в России.

Доли случаев МЛУ-ТБ значительно различались у ВИЧ-положительных (n=49) и ВИЧ-негативных (n=434) пациентов в СЗФО: 53,1% против 35,0% (p=0,045). Отмечен повышенный в 1,5 раза риск выявления МЛУ-ТБ в группе ВИЧ-инфицированных лиц (RR=1,51 [1,13-2,03]), что согласуется с данными, полученными в других регионах России (Жданова С.Н., 2018; Попов С.А. и др., 2018; Пасечник О.А., 2019).

В структуре генотипов *M. tuberculosis* у пациентов с сочетанной инфекцией ТБ/ВИЧ в отличие от ВИЧ-негативных отмечено незначительное преобладание доли штаммов генотипа Beijing (69,4% против 59%), в частности В0/W148 (32,4% против 28,1%). При этом «успешность» В0/W148 в восприимчивой популяции в значительной мере проявлялась в группе ВИЧ-положительных (90,9%) чем у ВИЧ-негативных (48,6%) пациентов молодого (до 40 лет) возраста (p=0,009). Таким образом, пул ВИЧ-инфицированных способствует поддержанию устойчивого резервуара штаммов ассоциированного с МЛУ генотипа В0/W148 *M. tuberculosis*, способствуя распространению МЛУ-ТБ в регионе.

Исходя из положения о важности определения минимальных генетических различий между штаммами *M. tuberculosis* при установлении общности источника (Casali N. et al., 2014; Shitikov E. et al., 2017), оценке эпидемиологической значимости и эволюционной «успешности» генотипа (Огарков О.Б., 2007), в СЗФО была изучена однородность территориальных субпопуляций Beijing в целом и наиболее крупных кластеров Central Asian/Russian и В0/W148 с использованием высокодискриминирующей схемы генотипирования по 24 локусам MIRU-VNTR для расчёта уровня кластеризации (CR) (Supply P. et al., 2001, 2006).

MIRU-VNTR<sub>24</sub>-типирование 288 штаммов Beijing подтвердило гетерогенность изученной субпопуляции возбудителя. Выявлено 82 профиля MIRU-VNTR<sub>24</sub>, из них 24 были представлены кластерами, включавшими большинство (79,9%) штаммов (самые многочисленные – 94-32 (26%; 75/288) и 100-32 (20,1%; 59)) (Рисунок 4).

Наибольший аллельный полиморфизм штаммов Beijing, определяемый индексом Хантера-Гастона (HGI), отмечен в локусах QUB26 (HGI=0,617) и MIRU26 (HGI=0,543). У штаммов Central Asian/Russian наиболее вариабельным был локус QUB26 (HGI=0,382); девять (37,5%) из 24 локусов были однородны (HGI=0). Штаммы В0/W148 представляли более гомогенную группу, поскольку не различались по 15 (62,5%) локусам (включая упомянутые девять); наиболее полиморфным был локус MIRU31 (HGI=0,123).

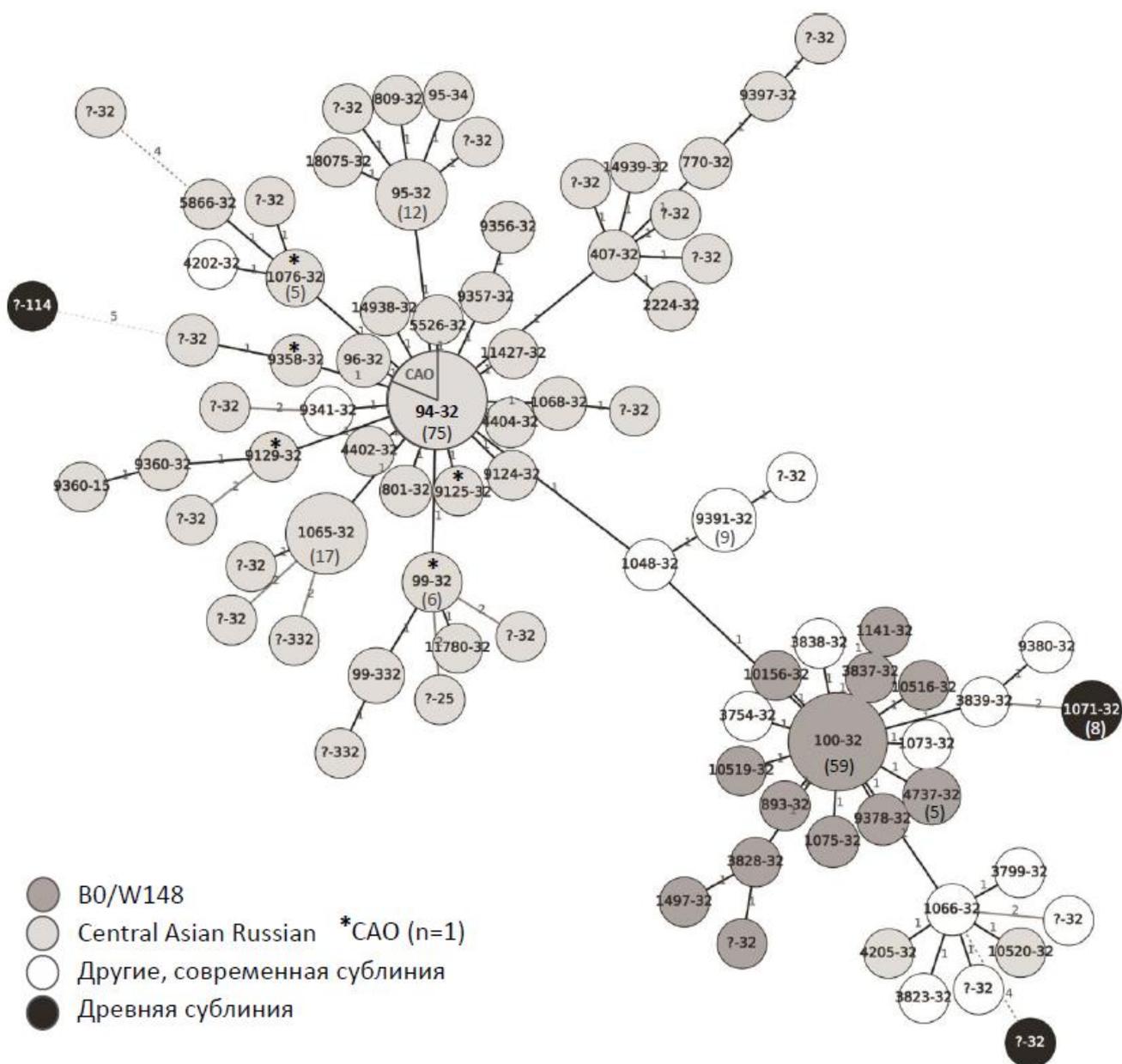


Рисунок 4 – Минимальное охватывающее дерево (Minimum Spanning Tree) профилей MIRU-VNTR<sub>24</sub> штаммов *M. tuberculosis* Beijing (<https://www.miru-vntrplus.org>)

Примечание: Размеры узлов пропорциональны числу штаммов (цифры в скобках обозначают число штаммов  $n \geq 5$ ) в составе кластера MIRU-VNTR<sub>24</sub>. Обозначения профилей MIRU-VNTR приведены согласно номенклатуре MLVA Mtbc15-9. Линии между узлами показывают изменения, касающиеся одного локуса – сплошные жирные, двух локусов – сплошные тонкие, трех и более локусов – прерывистая линии

В целом для всех штаммов Beijing дискриминирующая способность метода MIRU-VNTR-типирования по 24 локусам в соответствии с индексом Хантера-Гастона составила 0,713; наиболее гетерогенным был кластер Central Asian/Russian (без CAO) (0,830) по сравнению с гомогенными кластерами CAO (0,471) и B0/W148 (0,410).

Анализ профилей MIRU-VNTR<sub>24</sub> штаммов *M. tuberculosis* генотипа Beijing Central Asian/Russian и B0/W148 представлен в таблице 9.

Таблица 9 – Характеристика профилей MIRU-VNTR<sub>24</sub> штаммов *M. tuberculosis* Central Asian/Russian и B0/W148 генотипа Beijing

Штаммы Beijing	Профиль MIRU-VNTR <sub>24</sub> *	MLVA MtbC 15-9	СС	Число штаммов
Central Asian/Russian (n=176)	223325153533324682454433	9358-32	CC1	2
	223325153533424682444433	801-32	CC1	2
	223325153533422682454433	9357-32	CC1	2
	223325153633422682454433	9356-32	CC1	2
	223325153533424582454433	407-32	CC4	2
	223325153534424582454433	770-32	CC4	2
	223325153433424682254433	?-32	–	2
	223325143533424682454433	1068-32	CC3	3
	223325153533424682464433	96-32	CC1	3
	223325153533424672452433	99-332	CC1	4
	223325163533424682454433	1076-32	CC3	5
	223325153533424672454433	99-32	CC1	6
	223325153533324682454433	95-32	CC1	12
	223325153533424662454433	1065-32	CC1	17
223325153533424682454433	94-32	CC1	75	
B0/W148 (n=77)	223325173533424672444433	9378-32	CC2	2
	223325163533424672454433	1075-32	CC2	2
	223325173433424672454433	4737-32	CC2	5
	223325173533424672454433	100-32	CC2	59

Примечание: \* числовой профиль – число повторов в каждом локусе MIRU-VNTR: 12 локусов MIRU, ETR-A, ETR-B, ETR-C, QUB-11b, QUB-26, QUB-4156, Mtub04, Mtub21, Mtub29, Mtub30, Mtub34 и Mtub39; клональный комплекс (clonal complex, CC, Merker M. et al., 2015); « – » нет данных

Большинство штаммов Central Asian/Russian (включая субтип CAO) (79,0%; 139/176) входили в состав 15 кластеров MIRU-VNTR<sub>24</sub>, которые представляли клональные комплексы CC1, CC3 и CC4 согласно международной базе данных (Merker M. et al., 2015). К CC1 принадлежали кластеры 95-32, 1065-32 и наиболее крупный – 94-32 (42,6%; 75), представители которого распространены на территориях РФ и постсоветского пространства, в частности в Казахстане (Afnas'ev M. et al., 2011; Merker M. et al., 2015; Skiba Y. et al., 2015; Жданова С.Н. и др., 2017; Шур К.В. и др., 2017; Хромова П.А. и др., 2018; Pole I. et al., 2020). Однако MIRU-VNTR<sub>24</sub>-типирование не позволило дифференцировать субтип CAO Central Asian/Russian, в отличие от разработанного способа выявления данного субтипа путем определения вставки IS6110 в области Rv1359-Rv1360 с помощью метода ПЦР.

Подавляющее большинство штаммов B0/W148 (88,3%; 68/77) были отнесены к четырем кластерам клонального комплекса CC2: 100-32 (86,8%; 59/68), 4737-32, 1075-32, 9378-32) (Таблица 9). Штаммы кластера 100-32 выявляют повсеместно в России, на территориях бывшего Советского Союза, Европы, США (завезены иммигрантами из бывшего СССР) и реже – в Юго-Восточной Азии (Afnas'ev M. et al., 2011; Merker M. et al., 2015; Skiba Y. et al., 2015; Жданова С.Н. и др., 2017; Шур К.В. и др., 2017; Хромова П.А. и др., 2018; Pole I. et al., 2020).

Высокие уровни кластеризации (CR>0,6) штаммов Central Asian/Russian и B0/W148 современной сублинии Beijing, определяемые по 24 локусам MIRU-VNTR (Supply P. et al.,

2006; Iwamoto T. et al., 2007) свидетельствуют о доминировании данных генотипов в популяции возбудителя на территориях СЗФО. При этом более выраженная однородность B0/W148 (CR=0,83) предполагает относительно недавнее происхождение и распространение штаммов данного генотипа по сравнению с Central Asian/Russian (CR=0,71). Эти данные согласуются с предположением о происхождении и первичном проникновении штаммов B0/W148 в Европейскую часть России из Западной Сибири вследствие миграций населения в 1960–1980-е гг. (Жданова С.Н. и др., 2021; Merker M. et al., 2022).

В распределении *M. tuberculosis* генотипов Central Asian/Russian и B0/W148 и их основных MIRU-VNTR<sub>24</sub>-кластеров в возрастных группах населения значимых различий не выявлено. Однако отмечены разнонаправленные тенденции уменьшения доли кластера 100-32 B0/W148 и увеличения доли кластера 94-32 Central Asian/Russian в старших возрастных группах (> 50 лет) (Рисунок 5).

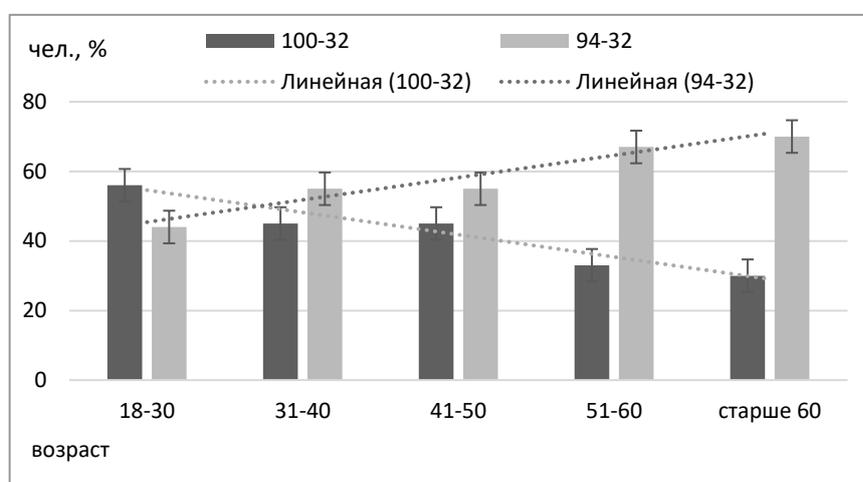


Рисунок 5 – Распределение кластеров 100-32 и 94-32 в возрастных группах пациентов

Штаммы 1071-32 (клональный комплекс BL7) (n=8; в целом по СЗФО – 1,1%) древней сублинии Beijing в разных долях выявлены в республиках Карелия и Коми, Псковской и Калининградской областях. Следует отметить, что относительно высокая доля МЛУ кластера 1071-32 древней сублинии Beijing недавно обнаружена в Омской области (9,5%) (Пасечник О.А., 2019).

Уровень кластеризации, отражающий способность к передаче, у чувствительных к ПТП штаммов Beijing в СЗФО был существенно ниже (CR=0,17) по сравнению с МЛУ-штаммами (CR=0,62). Вероятно, пациенты, инфицированные лекарственно-чувствительными штаммами, быстрее и эффективнее излечиваются, в связи с чем уменьшается число контактов, а, следовательно, и риск распространения таких штаммов в человеческой популяции.

Сравнительный анализ фенотипической лекарственной устойчивости штаммов Beijing основных кластеров MIRU-VNTR<sub>24</sub> (100-32, 4737-32, 94-32, 1065-32, 95-32, 99-32, 1076-32, 9391-32 и 1071-32) приведен в таблице 10. МЛУ-штаммы доминировали в кластерах 1071-32 (древняя сублиния), 4737-32 и 100-32 B0/W148, а также 1065-32 Central Asian/Russian

( $p < 0,001$ ). При этом наиболее многочисленный кластер 94-32 Central Asian/Russian в равных долях включал ЛЧ и МЛУ штаммы.

Таблица 10 – Отношение к ПТП штаммов *M. tuberculosis* основных кластеров MIRU-VNTR<sub>24</sub>

Генотип Beijing	Кластер MIRU-VNTR <sub>24</sub>	Число штаммов (%)		
		ЛЧ	М/П	МЛУ
B0/W148	100-32	-	10 (16,9)	49 (83,1)
	4737-32	-	-	5 (100)
Central Asian/Russian	94-32	33 (44,0)	9 (12,0)	33 (44,0)
	1065-32	-	2 (11,8)	15 (88,2)
	95-32	3 (25,0)	3 (25,0)	6 (50,0)
	99-32	2 (33,3)	4 (66,7)	-
	1076-32	1 (20,0)	3 (60,0)	1 (20,0)
Современная сублиния	9391-32	9 (100)	-	-
Древняя сублиния	1071-32	-	-	8 (100)

Примечание: ЛЧ – лекарственная чувствительность; М/П – моно- и полирезистентность

Единичные, в т.ч. МЛУ, штаммы 4737-32 B0/W148 были выявлены в ряде стран Европы, в частности, в Португалии, где в результате анализа эпидемических связей был сделан вывод об их клональной экспансии, вероятно, из бывших советских республик (European Centre for Disease Prevention and Control. Molecular typing for surveillance of multidrug-resistant tuberculosis in the EU/EEA, 2017; Merker M. et al., 2015; Perdigão J. et al., 2020).

МЛУ-штаммы кластера 1065-32 обнаружены в граничащей с Эстонией Псковской области (35,3%; 6/17) и внутреннем регионе РФ – Республике Коми (17,5%; 7/40). Штаммы с множественной лекарственной устойчивостью кластера 1065-32 выявлены в ряде стран Европы, причем наибольшая доля – в Литве (32,7%; 17/52) (Merker M. et al., 2015) и Эстонии (31,0%; 9/29) (European Centre for Disease Prevention and Control. Molecular typing for surveillance of multidrug-resistant tuberculosis in the EU/EEA, 2017).

Единичные штаммы кластера 9391-32 ( $n=9$ , все чувствительные к ПТП) современной сублинии Beijing присутствовали в субпопуляциях *M. tuberculosis* Мурманской, Калининградской, Псковской областей и Республики Карелия, имеющих сухопутные границы с зарубежными странами.

С другой стороны, как видно из таблицы 10, основной пул МЛУ-штаммов Beijing распределялся по трем кластерам MIRU-VNTR<sub>24</sub>: 100-32 генотипа B0/W148; 94-32 и 1065-32 генотипа Central Asian/Russian. Поэтому был проведен ретроспективный анализ ранее выделенных в России штаммов тех же кластеров с аналогичными характеристиками, с использованием дополнительных гипервариабельных локусов (VNTR 3232, VNTR 3820 и VNTR 4120) в сочетании с IS6110-RFLP-типированием (Рисунок 6).

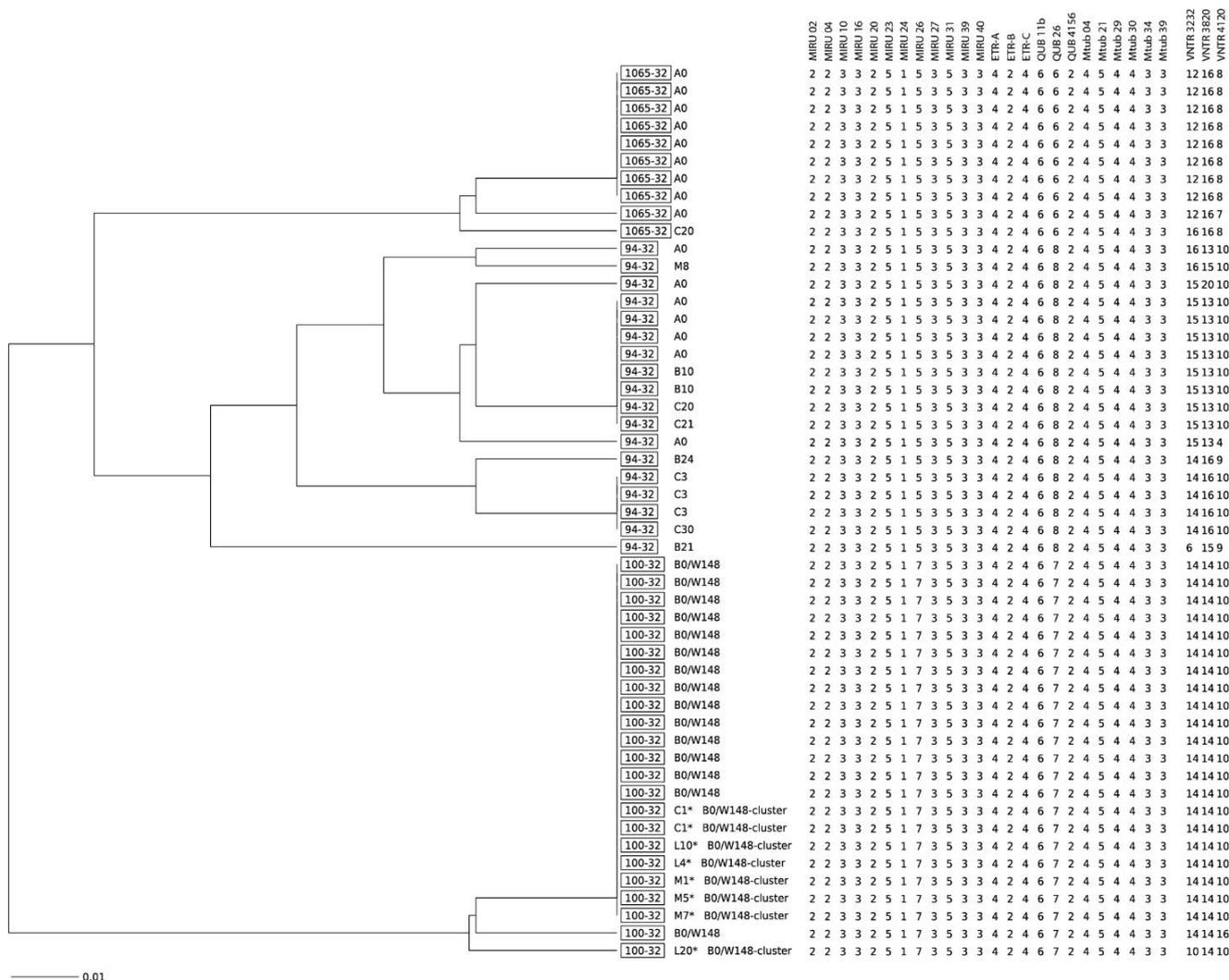


Рисунок 6 – Дендрограмма профилей MIRU-VNTR<sub>24</sub> и трех гипервариабельных локусов штаммов *M. tuberculosis* Beijing

Примечание: обозначения кластеров MIRU-VNTR<sub>24</sub> приведены согласно номенклатуре MLVA Mtbc15-9 в прямоугольных рамках; профили IS6110-RFLP указаны справа

Штаммы Beijing 100-32 были гомогенны по трем гипервариабельным локусам (CR=0,83), но несколько различались паттернами IS6110-RFLP (CR=0,65) (Таблица 11).

Таблица 11 – Характеристика кластеров 100-32, 94-32 и 1065-32 Beijing

Кластер MIRU-VNTR <sub>24</sub>	Число штаммов	IS6110-RFLP				VNTR			
		Число RFLP-типов	Число кластеров	Число штаммов в кластерах (%)	CR	Число VNTR-типов	Число кластеров	Число штаммов в кластерах (%)	CR
100-32	23	8	2	17 (73,9)	0,65	3	1	21 (91,3)	0,83
94-32	18	9	3	12 (66,7)	0,50	7	2	12 (66,7)	0,50
1065-32	10	2	1	9 (90,0)	0,80	3	1	9 (90,0)	0,80

Так, локусы VNTR3232, VNTR3820 и VNTR4120 содержали 14, 14 и 10 повторов соответственно у 91,3% штаммов 100-32. Практически все штаммы 1065-32 (90,0%), за исключением одного, имели профиль A0 IS6110-RFLP и одинаковый числовой профиль по трем гипервариабельным локусам – 12 16 18. Штаммы 94-32 отличала большая гетерогенность (CR=0,50) по сравнению со штаммами 100-32 и 1065-32. Выраженная гомогенность кластеров 100-32 B0/148 и 1065-32 Central Asian/Russian может отражать повышенную способность таких штаммов к распространению в восприимчивой популяции.

Поскольку штаммы *M. tuberculosis* генотипа Beijing, в частности кластеры B0/W148 и Central Asian/Russian (включая CAO), представляют значительную долю популяции возбудителя туберкулеза в России, поэтапный алгоритм быстрого выявления этих генотипов методом ПЦР может применяться для проспективного скрининга, ретроспективной оценки больших коллекций штаммов и в целом для микробиологического и эпидемиологического мониторинга МЛУ-ТБ.

### **Разработка способов ускоренного генотипирования штаммов Beijing и алгоритм исследования популяции *M. tuberculosis***

Актуальные методы выявления и генотипирования *M. tuberculosis* Beijing – MIRU-VNTR<sub>24</sub>, сполиготипирование, секвенирование нескольких генов или полногеномное секвенирование трудоемки, затратны по времени и требуют специальных знаний в области биоинформационной обработки полученных данных и филогенетического анализа (Kamerbeek J. et al., 1997; Supply P. et al., 2001; Merker et al., 2015).

Учитывая изложенное, на основе различных модификаций ПЦР нами были разработаны ускоренные способы выявления значимых вариантов – кластера 94-32 (Central Asian/Russian), субтипа CAO, древней и современной филогенетических сублиний и кластера 1071-32 древней сублинии в субпопуляции *M. tuberculosis* Beijing.

Выбор мишеней для амплификации специфических участков генома, нуклеотидных последовательностей для конструирования праймеров и флуоресцентно-меченных зондов проведен с использованием биоинформационного и филогенетического анализа данных полногеномного секвенирования референтного штамма H37Rv (GenBank NC\_000962.3) и нескольких сотен штаммов *M. tuberculosis*, представленных в международных электронных базах данных (National Center for Biotechnology Information и European Nucleotide Archive).

Обобщенные данные о распространенности линий, сублиний, генетических семейств (генотипов), кластеров, полученные в результате генотипирования 720 штаммов возбудителя туберкулеза, выявили принадлежность более половины (57,1%) изученных в СЗФО штаммов *M. tuberculosis* к генетическому семейству Beijing, превалирование в субпопуляции Beijing современной сублинии – штаммов Central Asian/Russian, включая ассоциированный с устойчивостью к ПТП субтип CAO, и эпидемиологически и клинически значимый генотип B0/W148. Анализ представленных в работе данных и публикаций, посвященных методам генотипирования *M. tuberculosis*, позволил создать оптимальный алгоритм поэтапного генотипирования штаммов при исследовании гетерогенности популяции возбудителя с использованием разработанных на основе метода ПЦР способов идентификации актуальных вариантов Beijing (Рисунок 7).

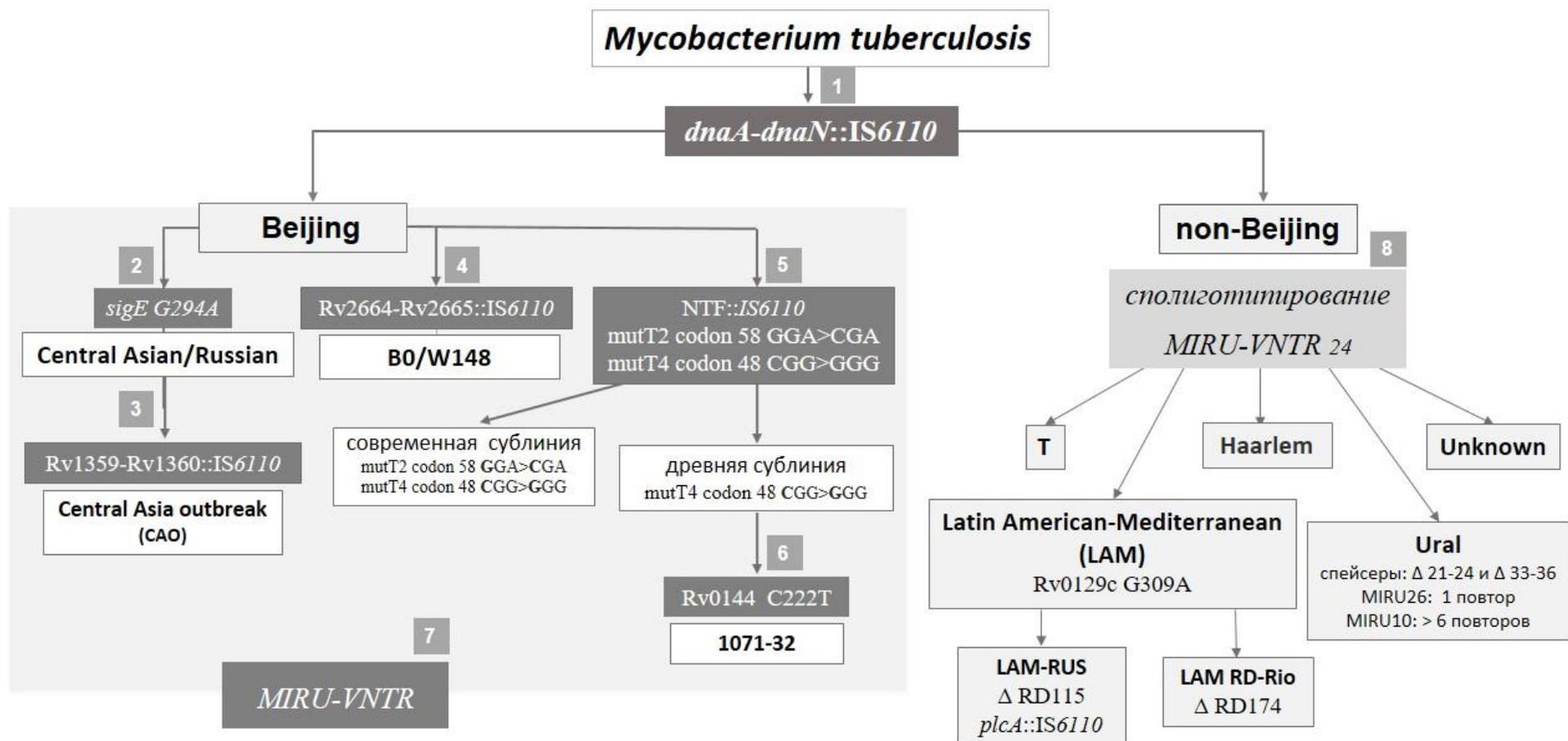


Рисунок 7 – Алгоритм генотипирования *M. tuberculosis*

Этапы генотипирования штаммов *M. tuberculosis*:

1. Определение принадлежности штаммов к генотипу Beijing путем выявления специфической инсерции IS6110 в межгенной области *dnaA-dnaN* (Kurepina et al., 1998) методом мультиплексной ПЦР-РВ.

2. Идентификация генотипа Central Asian/Russian (другое наименование – кластер кластера 94-32) Beijing разработанным нами способом на основе аллель-специфической ПЦР-РВ для амплификации фрагмента гена *sigE* с целью обнаружения замены G>A в геномной позиции 1364706 референтного штамма *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank NC\_000962.3) (Патент на изобретение РФ № 2689800). Нуклеотидные последовательности сконструированных праймеров (94-32FOR, 94-32REV), флуоресцентно-меченных зондов (94-32WT, 94-32MUT) и условия ПЦР приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов, условия ПЦР-РВ для идентификации кластера 94-32 (Central Asian/Russian) Beijing *M. tuberculosis*

Праймер, зонд	Нуклеотидная последовательность 5' – 3'	Условия ПЦР
94-32FOR	gtcctgggatgagctggtc	ПЦР смесь (конечный объем 30 мкл): 1 U Taq ДНК полимеразы («Силекс», Москва), для ПЦР-РВ, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> («Силекс», Москва), 200 μM каждого из дНТФ («Евроген», Москва), по 5 пмоль праймеров и зондов. Режим ПЦР: 95 С, 10 мин; далее 40 циклов 94 С, 15 с; 60 С, 40 с. Считывание сигнала флуоресценции при 60°С.
94-32REV	cgaccggaacaccctgataa	
94-32WT	FAM-cggctggcttatcggc-BHQ1	
94-32MUT	HEX -gtaccggctagcttatcg-BHQ2	

Анализ результатов ПЦР-РВ проводили по кривым накопления флуоресцентного сигнала по каждому из каналов: HEX – специфического продукта амплификации (фрагмента ДНК гена *sigE* с заменой G>A в позиции 294) для кластера 94-32, FAM – для любого другого варианта генотипа Beijing *M. tuberculosis*. При отсутствии сигнала флуоресценции по обоим каналам делается вывод о недостаточном количестве и/или качестве ДНК или ингибировании реакции ПЦР и невозможности какого-либо вывода о наличии или отсутствии ДНК штамма Beijing 94-32-кластера в образце.

3. Выявление субтипа CAO Central Asian/Russian разработанным нами способом на основе мультиплексной ПЦР для обнаружения генотип-специфической вставки IS6110 в межгенной области Rv1359 - Rv1360 в позиции 1531009 генома референтного штамма *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank NC\_000962.3) (Патент на изобретение РФ № 2735415). Нуклеотидные последовательности сконструированных праймеров, условия и оценка результатов ПЦР (Таблица 13).

Таблица 13 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров и условия ПЦР для идентификации субтипа CAO

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5' – 3'	Условия ПЦР
Pr6110	cgtaactcgacctgaaagacg	ПЦР смесь (конечный объем 25 мкл): 1 U полимеразы Taq («Силекс», Москва), 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> («Силекс», Москва), 200 μM каждого из дНТФ («Евроген», Москва), по 15 пмоль каждого праймера. Режим ПЦР: 95°С, 2 мин, 40 циклов 95°С, 20 с, 63°С, 30 с, 72°С, 50 с и элонгация 72°С, 50 с.
PrF	ggatggctccttgctgggtg	
PrR	gtatgagcacaagacaccgc	

Визуализацию продуктов амплификации проводили путем электрофореза в горизонтальном 1,3% агарозном геле, отмечая наличие характерного для штаммов *M. tuberculosis* Beijing кластера CAO фрагмента 559 п.н. (для других генотипов – 275 п.н.).

4. Идентификация B0/W148 у штаммов Beijing (которые не были отнесены к генотипу Central Asian/Russian) на основе мультиплексной ПЦР-РВ для выявления вставки IS6110 в области Rv2664 - Rv2665 в позиции 2982598/9 генома референтного штамма *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank NC\_000962.2).

5. Установление принадлежности к современной либо древней сублинии остальных штаммов Beijing, не относящихся к Central Asian/Russian и B0/W148, с помощью ПЦР для выявления вставки IS6110 в локусе NTF *M. tuberculosis* (Wada T. et al., 2009) и ПЦР-РВ для обнаружения замен GGA>CGA в кодоне 58 гена *mutT2* и CGG>GGG в кодоне 48 гена *mutT4* (Патент на изобретение РФ № 2743365). Нуклеотидные последовательности праймеров, флуоресцентно-меченных зондов, условия ПЦР-РВ приведены в таблице 14.

Таблица 14 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров, зондов, условия ПЦР-РВ для идентификации филогенетических сублиний Beijing

Праймер, зонд	Нуклеотидная последовательность 5' – 3'	Условия ПЦР
58mutT2F	cggttgacacggctcttgg	ПЦР смесь (конечный объем 30 мкл): 1 U Taq ДНК полимеразы «горячего старта» для ПЦР-РВ («Синтол», Москва), 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> («Силекс», Москва), 200 μM каждого из дНТФ («Евроген», Москва), праймеры и зонды (по 5 пмоль каждый кроме зонда mutT2-58m-HEX-4 пмоль). Режим ПЦР: 95°C, 3 мин; далее 40 циклов 95°C, 15 с; 63°C, 40 с. Считывание сигнала флуоресценции – при 63°C.
58mutT2R	gcaatatcgtcgccacac	
48mutT4F	acaagccaaatcacgtcgac	
48mutT4R	aaccctccagccgatggt	
58mutT2WT	FAM-5'-ctgggactcgaggtcgc-RTQ1	
58mutT2MUT	HEX-5'-actgcgactcgaggtcg-BHQ2	
48mutT4WT	ROX-5'-agcgggtcccgggtcc-BHQ2	
48mutT4MUT	Cy5-5'-agcgggtcccgggtcc-BHQ2	

Регистрацию экспоненциального роста накопления сигнала флуоресценции по каналам HEX и Cy5 указывала на принадлежность штамма к современной сублинии, по каналам FAM и Cy5 – к древней сублинии, по каналам FAM и ROX – к ранне-древней сублинии генотипа Beijing *M. tuberculosis*.

6. Определение принадлежности к кластеру 1071-32 древней сублинии Beijing с использованием ПЦР-РВ для выявления замены нуклеотида 222C>T в гене *Rv0144* (Патент на изобретение РФ № 2768021). Нуклеотидные последовательности сконструированных праймеров (1071F, 1071R) и флуоресцентно-меченных зондов (1071WT, 1071MUT) и условия ПЦР-РВ приведены в таблице 15.

Оценку результатов проводили по кривым накопления флуоресцентного сигнала между 20–35 циклом ПЦР-РВ: по каналу FAM регистрировали накопление продукта амплификации фрагмента ДНК, специфического для кластера 1071-32 генотипа Beijing, по каналу HEX – для любого другого генотипа *M. tuberculosis*.

Таблица 15 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров, зондов, условия ПЦР-РВ для определения кластера 1071-32 древней сублинии Beijing

Праймер, зонд	Нуклеотидная последовательность 5' – 3'	Условия ПЦР
1071F	ссаасggtaggtассааgс	ПЦР смесь (конечный объем 30 мкл): 1 U Taq ДНК полимеразы для ПЦР-РВ «Синтол», Москва), 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> «Синтол», Москва), 200 μM каждого из дНТФ («Евроген», Москва), по 5 пмоль праймеров и зондов. Режим ПЦР: 95°C, 5 мин; далее 45 циклов 95°C, 30 с; 60°C, 10 с, 72°C, 20 с. Считывание сигнала флуоресценции при 60°C.
1071R	gcttccgagtgctcatctgct	
1071WT	R6G-gttcaatgtcgtcacggc[c-lna]g-BHQ1	
1071MUT	FAM-gttcaatgtcgtcacggc[t-lna]g-BHQ1	

7. Тонкая дифференциация штаммов генотипа Beijing с использованием метода MIRU-VNTR-типирования по дискриминирующим локусам (Supply P. et al., 2001) для мониторинга и оценки эпидемиологической значимости генотипов *M. tuberculosis*.

8. Сполиготипирование (Kamerbeek J. et al., 1997) и/или MIRU-VNTR по 24 локусам (Supply P. et al., 2001) штаммов *M. tuberculosis* non-Beijing. При определении принадлежности штаммов *M. tuberculosis* с неоднозначно трактуемыми сполигопрофилями (SITVIT2) к генетическим семействам LAM и Ural следует учитывать дополнительные филогенетические маркеры: выявление замены G309A в гене *Rv0129c* для генотипа LAM, наличие единственного повтора в локусе MIRU26 и более шести повторов в локусе MIRU10, а также отсутствие сигналов гибридизации 29-31 и 33-36 в профиле сполиготипирования для генотипа Ural (Gibson A., et al., 2008; Mokrousov I. et al., 2012)

### Мутации резистентности к бедаквилину серийных изолятов *M. tuberculosis*

Широкая циркуляция МЛЮ-штаммов *M. tuberculosis* привела к разработке новых ПТП, в том числе перспективного перорального препарата бедаквилина, рекомендуемого для лечения МЛЮ-ТБ с 2014 года (WHO. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance, 2021; Global tuberculosis report 2017). Однако в процессе лечения формируется устойчивость *M. tuberculosis* к бедаквилину за счет геномных мутаций, перечень которых постоянно пополняется, что требует оценки их клинической значимости (Andries K. et al., 2014; Zimenkov D.V. et al., 2017; Kadura S. et al., 2020).

С этой целью было проведено полногеномное секвенирование МЛЮ, пре-ШЛЮ и ШЛЮ серийных изолятов *M. tuberculosis* 11 больных МЛЮ-ТБ, которые проходили курсы лечения ПТП, в т.ч. бедаквилином. Полногеномные нуклеотидные последовательности 43 серийных изолятов *M. tuberculosis* были депонированы в Sequence Read Archive (SRA) NCBI, USA (архив чтений последовательностей Национального центра биотехнологической информации): PRJNA525341 и PRJNA635788, BioProject *Mycobacterium tuberculosis* raw sequence reads, Kaliningrad, Russia.

Все 43 изолята *M. tuberculosis* принадлежали к генетическому семейству Beijing, причем большинство (81,4%) – к кластеру B0/W148, остальные – к субтипу CAO Central Asian/Russian.

Были проанализированы последовательности генов *atpE* (Rv1305), *mmpR5* (Rv0678), *perQ* (Rv2535c) и Rv1979c, мутации в которых ассоциированы с устойчивостью к бедаквилину (Andries K. et al., 2014; Almeida D. et al., 2016; Zimenkov D.V. et al., 2017; Battaglia S. et al., 2020; Ismail N. et al., 2021).

Генетические маркеры устойчивости к бедаквилину (несинонимические однонуклеотидные замены, вставки, делеции, дупликация) были выявлены только в генах *mmpR5* (Rv0678) и *atpE* (Rv1305) у 44,2% (19/43) изолятов *M. tuberculosis* Beijing, полученных от 6 из 11 пациентов (Рисунок 8). При этом в 16 изолятах пяти пациентов (П2, П3, П8, П9 и П10) обнаружены мутации в различных участках гена *mmpR5*, в частности, часто выявляемые в позиции 198 (Kadura S. et al., 2020; Guo Q. et al., 2022), обеспечивающие эффлюкс препарата (Andries K. et al., 2014). Гетерорезистентность (присутствие дикого и мутантного аллелей в одной и той же позиции в гене *mmpR5*) отмечена у большинства серийных изолятов (11 из 12) четырех пациентов. У одного ВИЧ-положительного пациента П2 серийные изоляты, включая полученный до начала лечения бедаквилином, содержали только мутантный аллель p.Leu43Pro в гене *mmpR5*, что может быть связано с длительным использованием противогрибкового препарата (флуконазол), имеющего общие механизмы устойчивости с бедаквилином (Milano A. et al., 2009). В изолятах пациента П8 с несколькими эпизодами прерывания лечения, которое закончилось неудачей, были обнаружены четыре варианта мутаций в гене *mmpR5* – с.147insC, p.Glu21\_Gln22dup, p.Ala36Val и с.198del в различных сочетаниях.

Как видно из рисунка 8, у пациента П10 инсерция (вставка) с.198insC (позиция в геноме 779187) в гене *Rv0678*, приводящая к сдвигу рамки считывания и образованию укороченного белка MmpL5, была обнаружена в 79% считываний в первом изоляте 2229, полученном после 13 дней лечения с применением бедаквилина. Данная мутация сохранялась и после отмены препарата (изолят 503).

У пациента П3 на период лечения бедаквилином в изоляте 8425 выявлено одновременно две мутации: p.Gln76Lys гена *Rv0678* (позиция в геноме 779215) и делеция с.422\_430del, которая привела к сдвигу рамки считывания (Рисунок 8).

Мутация p.П66Met гена *atpE* выявлена в серийных изолятах, полученных в процессе и после прекращения лечения пациента П5 бедаквилином. Мутации в гене *atpE* встречаются реже, чем в *mmpR5*, однако обеспечивают высокий уровень устойчивости к бедаквилину за счет предотвращения его взаимодействия с мишенью – АТФ-синтазой (Nieto Ramirez L.M. et al., 2020).

У пациентов, в изолятах *M. tuberculosis* которых мутации в генах *mmpR5* (Rv0678) и *atpE* (Rv1305) не были обнаружены, курсы лечения оказались эффективными и привели к прекращению бактериовыделения.

С помощью комплекса классических молекулярно-генетических методов (мультиплексная ПЦР, сполиготипирование, MIRU-VNTR-типирование) и полногеномного секвенирования в России исследована пространственно-временная структура популяций *M. tuberculosis* в субъектах СЗФО. Данные о распространенности генотипов, спектре мутаций, ассоциированных с резистентностью к современным и новым ПТП, являются основой для совершенствования методов выявления, оценки клинической и эпидемиологической значимости и мониторинга циркулирующих вариантов возбудителя МЛУ-ТБ.

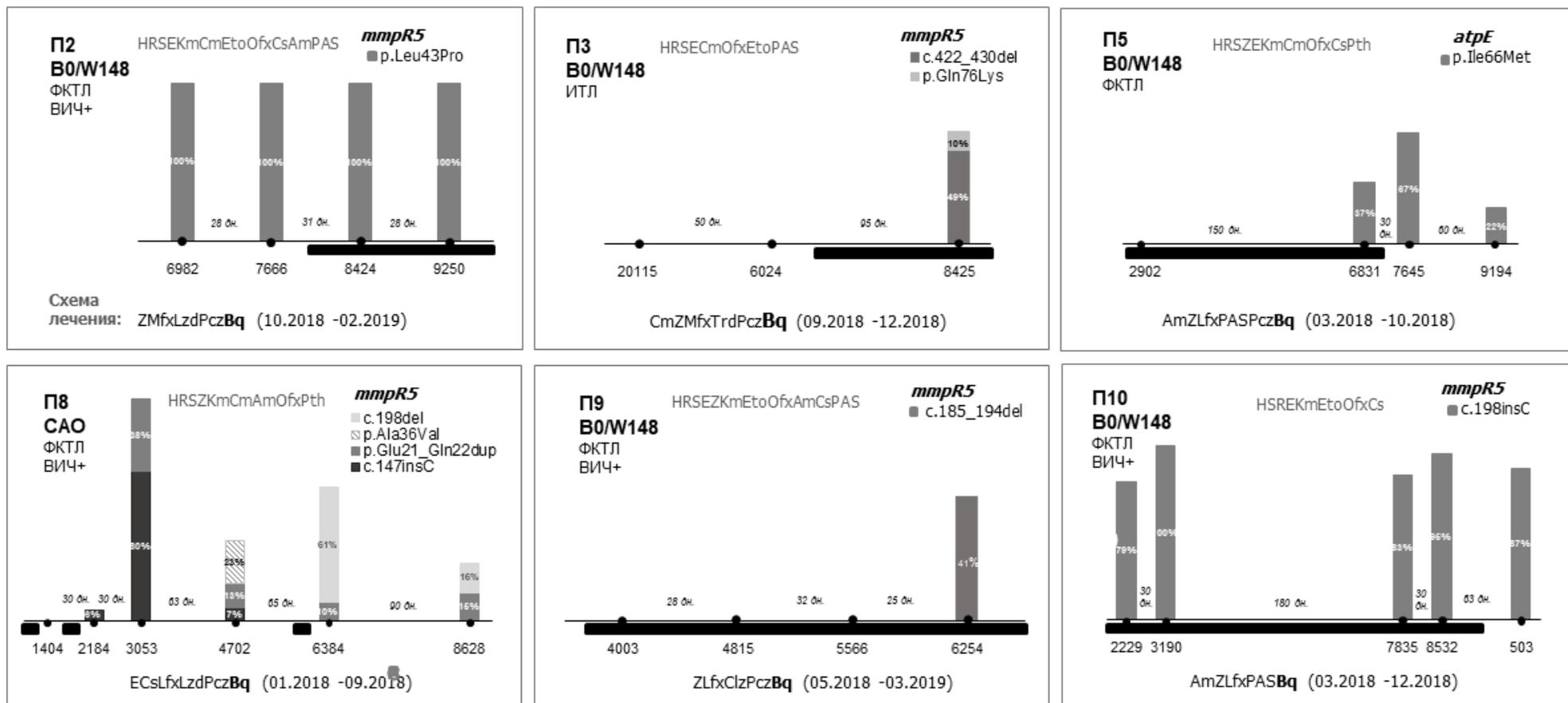


Рисунок 8 – Мутации устойчивости к бедаквину серийных изолятов *M. tuberculosis* больных ШЛУ-ТБ с неэффективным курсом лечения

Примечание: на оси курсивом указаны временные промежутки (число дней, дн.) между посевами серийных изолятов; в столбцах показан процент чтений с выявленными мутациями; периоды применения бедаквина обозначены черными прямоугольниками. ИТЛ – инфильтративный туберкулез легких, ФКТЛ – фиброзно-кавернозный туберкулез легких. Сверху приведен профиль фенотипической ЛУ. Н – изониазид, R – рифампицин, S – стрептомицин, E – этамбутол, Z – пиразинамид, Km – канамицин, Am – амикацин, Eto – этионамид, Cm – капреомицин, Ofx – офлоксацин, Cs – циклосерин, PAS – пара-аминосалициловая кислота, Lfx – левофлоксацин, Mfx – моксифлоксацин, Pcz – перхлорон, Bq – бедаквлин, Clz – клоfazимин, Lz – линезолид, Trd – теризидон, Pth – протионамид

## ВЫВОДЫ

1. В восьми субъектах Северо-Западного федерального округа структура популяции *M. tuberculosis*, представленная штаммами впервые выявленных больных туберкулезом легких, неоднородна: 57,1% штаммов принадлежали к генотипу Beijing Восточно-Азиатской филогенетической линии (L2), остальные (non-Beijing) – к семействам T (14,2%), LAM (11,9%), Ural (7,1%), Haarlem (5,3%), S и X (суммарно 1,6%) Евро-Американской линии (L4).

2. В гетерогенной субпопуляции *M. tuberculosis* Beijing преобладали генотипы 94-32 Central Asian/Russian и 100-32 B0/W148. В субпопуляции non-Beijing выявлено 90 профилей сполиготипирования, из них 19 описаны впервые; преобладали сполиготипы SIT53/T (14,2%), SIT42/LAM (8,4%) и обнаруженный во всех регионах Северо-Запада России сполиготип SIT262/Ural (7,4%) с наибольшей долей штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (34,8%).

3. Среди штаммов *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью 83,7% принадлежали к генотипу Beijing. Устойчивость к рифампицину и изониазиду 87,3% штаммов Beijing (независимо от их принадлежности к определенному кластеру) и 50,0% штаммов non-Beijing была обусловлена мутациями *rpoB* Ser531Leu и *katG* Ser315Thr. Штаммы Beijing Central Asian/Russian отличались от B0/W148 разнообразием спектра мутаций в гене *rpoB* и более высокой частотой мутаций в гене *inhA*. У мультирезистентных штаммов генотипа LAM выявлены замены в кодонах 516 и 526 гена *rpoB* в сочетании с мутациями *katG* и *inhA*.

4. В кластерах генотипа Beijing древней сублинии 1071-32, современной сублинии – 100-32 и 4737-32 B0/W148, 1065-32 Central Asian/Russian доля штаммов с множественной лекарственной устойчивостью превышала 80%. Циркуляция на территориях СЗФО с высокими показателями заболеваемости туберкулезом (Калининградская область и Республика Коми) штаммов с множественной лекарственной устойчивостью кластера 100-32, наряду с тенденцией к их распространению среди молодых возрастных групп, свидетельствует об эпидемиологической значимости генотипа B0/W148 Beijing.

5. Серийные изоляты *M. tuberculosis* 11 больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя, леченных бедаквилином, принадлежали к генотипу Beijing, преимущественно B0/W148 (81,8%). Мутации устойчивости к бедаквилину в разных участках генов *mmpR5* (Rv0678) и *atpE* (Rv1305) выявлены в изолятах *M. tuberculosis* 6 (54,5%) пациентов.

6. Разработаны способы быстрого выявления основных генотипов и кластеров современной и древней сублиний Beijing, которые могут быть использованы в предложенном алгоритме генотипирования штаммов *M. tuberculosis* при проведении молекулярно-эпидемиологического мониторинга микробных популяций.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Предложенный алгоритм генотипирования возбудителя туберкулеза с использованием комплекса молекулярно-генетических методов на основе полимеразной цепной реакции может быть рекомендован для идентификации линий, сублиний, семейств и кластеров при проведении молекулярно-эпидемиологического мониторинга популяций *M. tuberculosis*.

Учитывая доминирование штаммов *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью в кластерах 100-32 и 4737-32 B0/W148, 1065-32 Central Asian/Russian современной сублинии, 1071-32 древней сублинии семейства Beijing и SIT262 семейства Ural, целесообразно проводить детекцию мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам, и слежение за циркуляцией данных генотипов для оценки их эпидемиологической значимости.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшие исследования должны быть направлены на оптимизацию использования молекулярно-генетических методов, в т.ч. полногеномного секвенирования, для выработки единых регламентированных алгоритмов популяционных исследований *M. tuberculosis*.

Необходимо расширить изучение молекулярно-генетических механизмов развития устойчивости *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам и их комбинациям для оптимизации схем лечения и создания диагностических тест-систем нового поколения.

Целесообразно создание общедоступных обновляемых компьютерных баз данных для обмена информацией о циркулирующих вариантах возбудителя туберкулеза, полученной с помощью «новых» (WGS) и «классических» (spoligotyping, MIRU-VNTR, IS6110-RFLP и др.) методов молекулярного типирования.

Необходимо проводить исследования «фитнеса» штаммов *M. tuberculosis* различных генотипов в ассоциации с трансмиссивностью, лекарственной устойчивостью, принимая во внимание гетерогенность популяций человека, ВИЧ-статуса и тяжести клинических проявлений туберкулеза у пациентов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Вязовая, А.А. Характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Псковской области / А.А. Вязовая, В.Ю. Журавлев, И.В. Мокроусов, Т.Ф. Оттен, Е.П. Павлова, В.В. Кришевич, Б.И. Вишневский, О.В. Нарвская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 6. – С. 27–31.
2. Мокроусов, И.В. Геноидентификация эпидемиологически и клинически значимого варианта *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 / И.В. Мокроусов, О.В. Нарвская, А.А. Вязовая, Т.Ф. Оттен, Б.И. Вишневский // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – Т. 89, № 10. – С. 33–36.
3. Вязовая, А.А. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Псковской области / А.А. Вязовая, И.В. Мокроусов, Т.Ф. Оттен, Б.И. Вишневский, О.В. Нарвская // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – Т. 89, № 6. – С. 35–39.
4. Мокроусов, И.В. Высокоразрешающее типирование штаммов генотипа Beijing российской популяции *Mycobacterium tuberculosis* / И.В. Мокроусов, А.А. Вязовая, Д.А. Старкова, О.В. Нарвская // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – Т. 89, № 7. – С. 46–53.
5. Mokrousov, I. *Mycobacterium tuberculosis* population in northwestern Russia: an update from Russian-EU/Latvian border region / I. Mokrousov, A. Vyazovaya, T. Otten, V. Zhuravlev, E. Pavlova, L. Tarashkevich, V. Krishevich, B. Vishnevsky, O. Narvskaya // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, No. 7: e41318.
6. Вязовая, А.А. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезным спондилитом / А.А. Вязовая, Н.С. Соловьева, В.Ю. Журавлев, И.В. Мокроусов, О.А. Маничева, Б.И. Вишневский, О.В. Нарвская // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. – 2013. – № 5. – С. 20–26.
7. Вязовая, А.А. Генотипическая характеристика и фенотипическая лекарственная устойчивость штаммов *Mycobacterium tuberculosis* / А.А. Вязовая, И.В. Мокроусов, Н.С. Соловьева, О.А. Маничева, Т.Ф. Оттен, Б.И. Вишневский, О.В. Нарвская // Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций: материалы междунар. конф., Санкт-Петербург, 5–7 июня 2013. – Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3, № 2. – С. 121.
8. Vyazovaya, A. Molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype isolates from Russia / A. Vyazovaya, I. Mokrousov, N. Solovieva, T. Otten, B. Vishnevskiy, O. Narvskaya // 34th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Abstract book, Florence, Italy, 30 June-3 July, 2013. – 2013. – P. 64–65.
9. Вязовая, А.А. Генотипы и лекарственная устойчивость клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* на Северо-Западе России / А.А. Вязовая, И.В. Мокроусов, Н.С. Соловьева, О.А. Маничева, Т.Ф. Оттен, Б.И. Вишневский, О.В. Нарвская // Сб. тезисов II Конгресса Национальной ассоциации фтизиатров, Санкт-Петербург, 28–30 ноября 2013 г. – 2013. – С. 64.
10. Mokrousov, I. Real-time PCR assay for rapid detection of epidemiologically and clinically significant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype isolates / I. Mokrousov,

- A. Vyazovaya, V. Zhuravlev, T. Otten, J. Millet, W.W. Jiao, A.D. Shen, N. Rastogi, B. Vishnevsky, O. Narvskaya // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 52, No. 5. – P. 1691–1693.
11. Mokrousov, I. *Mycobacterium tuberculosis* Latin American-Mediterranean family and its sublineages in the light of robust evolutionary markers / I. Mokrousov, A. Vyazovaya, O. Narvskaya // *J. Bacteriol.* – 2014. – Vol. 196, No. 10. – P. 1833–1841.
12. Vyazovaya, A. Tuberculous spondylitis in Russia and prominent role of multidrug-resistant clone *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 / A. Vyazovaya, I. Mokrousov, N. Solovieva, A. Mushkin, O. Manicheva, B. Vishnevsky, V. Zhuravlev, O. Narvskaya // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2015. – Vol. 59, No. 4. – P. 2349–2357.
13. Mokrousov, I. Trends in molecular epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Republic of Karelia, Russian Federation / I. Mokrousov, A. Vyazovaya, N. Solovieva, T. Sunchalina, Y. Markelov, E. Chernyaeva, N. Melniova, M. Dogonadze, D. Starkova, N. Vasilieva, A. Gerasimova, Y. Kononenko, V. Zhuravlev, O. Narvskaya // *BMC Microbiol.* – 2015. – Vol. 15. – P. 279.
14. Vyazovaya, A. Dominance of the Beijing genotype among XDR *Mycobacterium tuberculosis* strains in Russia / A. Vyazovaya, I. Mokrousov, V. Zhuravlev, N. Solovieva, T. Otten, B. Vishnevsky, O. Narvskaya // *International Journal of Mycobacteriology.* – Т. 4. – 2015. – P. 84–85.
15. Вязовая, А.А. Структура популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Республике Карелия / А.А. Вязовая, И.В. Мокроусов, О.В. Нарвская // Сб. тезисов IV Конгресса Национальной ассоциации фтизиатров, Санкт-Петербург, 19–21 ноября 2015 г. – 2015. – С. 134–136.
16. Vyazovaya, A. Molecular snapshot of *Mycobacterium tuberculosis* population in Republic of Karelia, Russian Federation / A. Vyazovaya, N. Solovieva, T. Sunchalina, N. Melnikova, J. Kononenko, D. Starkova, I. Mokrousov, V. Zhuravlev, O. Narvskaya. // 36th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Abstract Book, Riga, Latvia, 28 June – 1 July, 2015. – 2015. – P. 79.
17. Вязовая, А.А. Молекулярная характеристика мультирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* на Северо-Западе России / А.А. Вязовая, И.В. Мокроусов, В.Ю. Журавлев, Н.С. Соловьева, Т.Ф. Оттен, О.А. Маничева, Б.И. Вишневский, О.В. Нарвская // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2016. – Т. 34, №1. – С. 30–33.
18. Васильева, Н.Р. Генотипы штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью и клинико-эпидемиологические особенности туберкулеза легких / Н.Р. Васильева, А.А. Вязовая, В.Ю. Журавлев, Н.С. Соловьева, И.В. Мокроусов, О.В. Нарвская // *Инфекция и иммунитет.* – 2016. – Т. 6, № 2. – С. 179–183.
19. Вязовая, А.А. Характеристика популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Республике Карелия / А.А. Вязовая, Н.С. Соловьева, Т.В. Сунчалина, И.В. Мокроусов, В.Ю. Журавлев, О. В. Нарвская // *Туберкулез и болезни лёгких.* – 2016. – № 8. – С. 48–53.
20. Mokrousov, I. Latin-American-Mediterranean lineage of *Mycobacterium tuberculosis*: Human traces across pathogen's phylogeography / I. Mokrousov, A. Vyazovaya, T. Iwamoto, Y. Skiba, I. Pole, S. Zhdanova, K. Arikawa, V. Sinkov, T. Umpeleva, V. Valcheva, M. Alvarez Figueroa, R. Ranka, I. Jansone, O. Ogarkov, V. Zhuravlev, O. Narvskaya // *Mol. Phylogenet. Evol.* – 2016. – Vol. 99. – P. 133–143.

21. Mokrousov, I. Next-Generation Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* / I. Mokrousov, E. Chernyaeva, A. Vyazovaya, V. Sinkov, V. Zhuravlev, O. Narvskaya // *Emerg. Infect. Dis.* – 2016. – Vol. 22, No. 6. – P. 1127–1129.

22. Вязовая, А.А. Молекулярная эпидемиология туберкулеза в Калининграде: 10 лет спустя / А.А. Вязовая, Г.М. Ахмедова, Н.С. Соловьева, А.А. Герасимова, Д.А. Старкова, Е.Н. Туркин, В.Ю. Журавлев, О.В. Нарвская, И.В. Мокроусов // *Инфекция и иммунитет.* – 2017. – Т. 7, № 4. – С. 367–374.

23. Mokrousov, I. Emerging peak on the phylogeographic landscape of *Mycobacterium tuberculosis* in West Asia: Definitely smoke, likely fire / I. Mokrousov, E. Shitikov, Y. Skiba, S. Kolchenko, E. Chernyaeva, A. Vyazovaya // *Mol. Phylogenet. Evol.* – 2017. – Vol. 116. – P. 202–212.

24. Вязовая, А.А. Генотипы штаммов *Mycobacterium tuberculosis* в Калининградской области / А.А. Вязовая, Н.С. Соловьева, Г.М. Ахмедова, Е.Н. Туркин, А.А. Герасимова, И.В. Мокроусов, В.Ю. Журавлев, О.В. Нарвская // Молекулярная диагностика 2017: сб. тр. IX Всерос. науч. - практ. конф., Москва, 18–20 апреля 2017 г. – 2017. – Т. 1. – С. 492.

25. Вязовая, А.А. Распространенность различных генетических семейств *Mycobacterium tuberculosis* в Псковской области / А.А. Вязовая, М.З. Догондзе, Н.С. Соловьева, А.А. Герасимова, Е.П. Павлова, В.В. Кришевич, В.Ю. Журавлев, О.В. Нарвская, И.В. Мокроусов // VI Конгресс Национальной ассоциации фтизиатров, Санкт-Петербург, 23–25 октября 2017 г.: тезисы докладов / под ред. П.К. Яблонского. – Санкт-Петербург, 2017. – С. 50–51. URL: [http://nasph.ru/index/tezisy\\_vi\\_kongressa/0-131](http://nasph.ru/index/tezisy_vi_kongressa/0-131) (дата обращения: 13.01.2023).

26. Мокроусов, И.В. О важности применения эволюционно надежных маркеров для детекции штаммов *Mycobacterium tuberculosis* генетического семейства LAM / И.В. Мокроусов, О.А. Пасечник, А.А. Вязовая, А.И. Блох, Е.Н. Черняева, В.Л. Стасенко // *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии.* – 2018. – № 3. – С. 60–66.

27. Пасечник, О.А. Мета-анализ распространенности *Mycobacterium tuberculosis* генотипов Beijing и Latin-American Mediterranean в Российской Федерации и странах ближнего зарубежья / О.А. Пасечник, А.И. Блох, А.А. Вязовая, В.Л. Стасенко // *Журнал инфектологии.* – 2018. – Т. 10, № 3. – С. 97–107.

28. Mokrousov, I. Rapid assay for detection of the epidemiologically important Central Asian/Russian strain of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype / I. Mokrousov, E. Chernyaeva, A. Vyazovaya, Y. Skiba, N. Solovieva, V. Valcheva, K. Levina, N. Malakhova, W.W. Jiao, L.L. Gomes, P.N. Suffys, M. Kütt, N. Aitkhozhina, A.D. Shen, O. Narvskaya, V.J. Zhuravlev // *J. Clin. Microbiol.* – 2018. – Vol. 56, No. 2: e01551-17.

29. Vyazovaya, A. Emerging resistant clones of *Mycobacterium tuberculosis* in a spatiotemporal context / A. Vyazovaya, K. Levina, V. Zhuravlev, P. Viiklepp, M. Kütt, I. Mokrousov // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2018. – Vol. 73, No. 2. – P. 325–331.

30. Вязовая, А.А. Структура популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Республике Коми / А.А. Вязовая, Е.Э. Прошина, И. Авадений, А.А. Герасимова, Н.С. Соловьева, С.А. Водопьянов, В.Ю. Журавлев, О.В. Нарвская, И.В. Мокроусов // Тезисы XX Междунар. конгр. МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии, Москва 23–

25 мая 2018. – Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2018. – Т. 20. – Приложение 1. – С. 15.

31. **Вязовая, А.А.** Генотипы *Mycobacterium tuberculosis* в Мурманской области / А.А. Вязовая, Н.С. Соловьева, Н.Ю. Гаврилова, А.А. Герасимова, И. Авадений, А.О. Бычкова, Е.В. Аникиева, В.Ю. Журавлев, О.В. Нарвская, И.В. Мокроусов // Тезисы докладов VII Конгресса Национальной ассоциации фтизиатров, Санкт-Петербург, 15–17 ноября 2018 г. – 2018. – С. 37–38.

32. **Vyazovaya, A.** Population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in the Komi Republic, Russian Federation / A. Vyazovaya, E. Proshina, S. Toinova, I. Avadenii, A. Gerasimova, N. Solovieva, O. Narvskaya, V. Zhuravlev, I. Mokrousov // 39th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Abstract Book, Dresden, Germany, 1–4 July, 2018. – 2018. – P. 106.

33. **Мокроусов, И.В.** Применение полногеномного анализа для определения молекулярных маркеров значимых генетических кластеров *Mycobacterium tuberculosis* в России / И.В. Мокроусов, Е.Н. Черняева, А.А. Вязовая, В.Ю. Журавлев // Патогенез. – 2019. – Т. 17, № 4. – С. 43–49.

34. **Mokrousov, I.** Acquisition of bedaquiline resistance by extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain of Central Asian Outbreak clade / I. Mokrousov, G. Akhmedova, D. Polev, V. Molchanov, A. Vyazovaya // Clin. Microbiol. Infect. – 2019. – Vol. 25, No. 10. – P. 1295–1297.

35. **Shitikov, E.** Simple assay for detection of the Central Asia Outbreak clade of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. / E. Shitikov, A. Vyazovaya, M. Malakhova, A. Guliaev, J. Bespyatykh, E. Proshina, O. Pasechnik, I. Mokrousov // J. Clin. Microbiol. – 2019. - Vol. 57, No. 7: e00215-19.

36. **Вязовая, А.А.** Генетическое разнообразие штаммов *Mycobacterium tuberculosis* в регионах Северо-Запада России / А.А. Вязовая, А.А. Герасимова, Д.А. Старкова, Н.С. Соловьева, Г.М. Ахмедова, Т.В. Сунчалина, Р.А. Тарашкевич, Н.Ю. Гаврилова, Е.Э. Прошина, В.Ю. Журавлев, О.В. Нарвская, И.В. Мокроусов // Сб. трудов XI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, Москва, 1–3 апреля 2019 г. – 2019. – С. 38–39.

37. **Вязовая, А.А.** Геномный полиморфизм популяции возбудителя туберкулеза в Республике Коми / А.А. Вязовая, Е.Э. Прошина, С.В. Тоинова, И. Авадений, А.А. Герасимова, Н.С. Соловьева, В.Ю. Журавлев, О.В. Нарвская, И.В. Мокроусов // Материалы науч.-практ. конф. по мед. микологии (XXII Кашкинские чтения), Санкт-Петербург, 12–15 июня 2019 г. – Проблемы медицинской микологии. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 53.

38. **Mokrousov, I.** Early ancient sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: unexpected clues from phylogenomics of the pathogen and human history / I. Mokrousov, A. Vyazovaya, O. Pasechnik, A. Gerasimova, M. Dymova, E. Chernyaeva, M. Tatarintseva, V. Stasenko // Clin. Microbiol. Infect. – 2019. – Vol. 25, No. 8: 1039.e1-1039.e6.

39. **Vyazovaya, A.** Prevalence and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in northwestern Russia. / A. Vyazovaya, I. Mokrousov, A. Gerasimova, N. Solovieva,

I. Avadenii, O. Kulikova, V. Zhuravlev, O. Narvskaya // International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. – 2019 – Vol. 23, No. 10. – Suppl. 2: S398.

**40. Mokrousov, I. Genomic signatures of drug resistance in highly resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the early ancient sublineage of Beijing genotype in Russia / I. Mokrousov, V. Sinkov, A. Vyazovaya, O. Pasechnik, N. Solovieva, P. Khromova, V. Zhuravlev, O. Ogarkov // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2020. – Vol. 56, No. 2: 106036.**

**41. Vyazovaya, A. Increased transmissibility of Russian successful strain Beijing B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis*: Indirect clues from history and demographics / A. Vyazovaya, E. Proshina, A. Gerasimova, I. Avadenii, N. Solovieva, V. Zhuravlev, O. Narvskaya, I. Mokrousov // Tuberculosis (Edinb). – 2020. – Vol. 122: 101937.**

**42. Вязовая, А.А. Структура популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Вологодской области – регионе с низкой заболеваемостью туберкулезом / А.А. Вязовая, И.А. Лебедева, А.А. Герасимова, Н.С. Соловьева, В.Ю. Журавлев, О.В. Нарвская, И.В. Мокроусов // Молекулярная диагностика и биобезопасность-2020: сб. материалов конгр. с междунар. участием (Москва, 6–8 октября 2020 г.) / под ред. В.Г. Акимкина, М.Г. Твороговой. – Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2020. – С. 161.**

**43. Vyazovaya, A. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the Russian region with unexpectedly low TB incidence / A. Vyazovaya, I. Lebedeva, A. Gerasimova, N. Solovieva, N. Ushakova, O. Narvskaya, V. Zhuravlev, V. Pavlov, I. Mokrousov // International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. – 2020 – Vol. 10 – Suppl. 2: S347.**

**44. Вязовая, А.А. Молекулярно-генетический анализ популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Вологодской области – регионе с низкой заболеваемостью туберкулезом / А.А. Вязовая, И.А. Лебедева, Н.Б. Ушакова, В.В. Павлов, А.А. Герасимова, Н.С. Соловьева, В.Ю. Журавлев, О.В. Нарвская // Инфекция и иммунитет. – 2021. – Т. 11, № 3. – С. 497–505.**

**45. Mokrousov, I. Spatiotemporal dynamics of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Contrasting trends and implications for tuberculosis control in EU high-priority country / I. Mokrousov, A. Vyazovaya, K. Levina, A. Gerasimova, V. Zhuravlev, P. Viiklepp, M. Kütt // Transbound. Emerg. Dis. – 2021. – Vol. 68, No. 2. – P. 896–906.**

**46. Mokrousov, I. Frequent acquisition of bedaquiline resistance by epidemic extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Russia during long-term treatment / I. Mokrousov, G. Akhmedova, V. Molchanov, E. Fundovnaya, E. Kozlova, Y. Ostankova, A. Semenov, N. Maslennikova, D. Leontev, V. Zhuravlev, E. Turkin, A. Vyazovaya // Clin. Microbiol. Infect. – 2021. – Vol. 27, No. 3. – P. 478–480.**

**47. Mokrousov, I. Practical approach to detection and surveillance of emerging highly resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing 1071-32-cluster / I. Mokrousov, A. Vyazovaya, V. Sinkov, A. Gerasimova, P. Ioannidis, W. Jiao, P. Khromova, D. Papaventsis, O. Pasechnik, J. Perdigão, N. Rastogi, A. Shen, Y. Skiba, N. Solovieva, P. Suffys, S. Tafaj, T. Umpeleva, D. Vakhrusheva, I. Yarusova, S. Zhdanova, V. Zhuravlev, O. Ogarkov // Sci. Rep. – 2021. – Vol. 11, No. 1: 21392.**

**48. Вязовая, А.А. Молекулярно-генетический анализ *Mycobacterium tuberculosis* в Архангельской области / А.А. Вязовая, П.И. Елисеев, А.А. Герасимова, Н.С. Соловьева, О.В. Нарвская, В.Ю. Журавлев, И.В. Мокроусов, А.О. Марьяндышев // Материалы науч.-**

практ. конф. по мед. микологии (XXIV Кашкинские чтения), Санкт-Петербург, 9–11 июня 2021 г. – Проблемы медицинской микологии. – 2021. – Т. 23, № 2. – С. 68–69.

49. **Vyazovaya, A.** The Beijing genotype dominates the multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* population in North-West Russia / **A. Vyazovaya, A. Gerasimova, N. Solovieva, D. Starkova, N. Vasilieva, D. Terentieva, R. Mudarisova, V. Zhuravlev, O. Narvskaya** // *European Respiratory Journal*. – 2021. – Vol. 58– Suppl. 65.

50. **Вязовая, А.А.** Молекулярно-генетический мониторинг популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Мурманской области / **А.А. Вязовая, Н.Ю. Гаврилова, А.А. Герасимова, А.О. Бычкова, И. Авадений, Е.В. Аникиева, Н.С. Соловьева, В.Ю. Журавлев, И.В. Мокроусов, О.В. Нарвская** // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2022. – Т. 40, № 2. – С. 21–27.

51. **Mokrousov, I.** Impact of pathobiological diversity of *Mycobacterium tuberculosis* on clinical features and lethal outcome of tuberculosis / **I. Mokrousov, O. Pasechnik, A. Vyazovaya, I. Yarusova, A. Gerasimova, A. Blokh, V. Zhuravlev** // *ВМС Microbiol.* – 2022. – Vol. 22, No. 1. – P. 50.

52. **Вязовая, А.А.** Структура популяции *Mycobacterium tuberculosis* в регионах Северо-Запада России / **А.А. Вязовая, А.А. Герасимова, Н.С. Соловьева, В.Ю. Журавлев, О.В. Нарвская, И.В. Мокроусов** // *Молекулярная диагностика и биобезопасность-2022: сб. материалов конгр. с междунар. участием (Москва, 27–28 апреля 2022 г.)* / под ред. В.Г. Акимкина, М.Г. Твороговой. – Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2022. – С. 50.

53. **Вязовая, А.А.** Динамика структуры популяции *Mycobacterium tuberculosis* на севере России / **А.А. Вязовая, Н.Ю. Гаврилова, Д.Р. Терентьева, А.А. Герасимова, Н.С. Соловьева, О.В. Нарвская, В.Ю. Журавлев, И.В. Мокроусов** // *Материалы науч.-практ. конф. по мед. микологии (XXV Кашкинские чтения), Санкт-Петербург, 8–10 июня 2022 г. – Проблемы медицинской микологии*. – 2022. – Т. 24, № 2. – С. 55.

54. **Vyazovaya, A.** Primary multidrug resistance and major clusters of the epidemiologically significant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Northwest Russia / **A. Vyazovaya, A. Gerasimova, N. Solovieva, V. Zhuravlev, I. Mokrousov** // *XVth National Congress of Bulgarian Microbiologists with International Participation, Abstract Book, Koprivshtica, Bulgaria, 5–8 October, 2022*. – 2022. – P. 82.

55. **Vyazovaya, A.** Genetic diversity and primary drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains in Northwestern Russia / **A. Vyazovaya, A. Gerasimova, R. Mudarisova, D. Terentieva; N. Solovieva, V. Zhuravlev, I. Mokrousov** // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11, No. 2. – P. 255.

## ПАТЕНТЫ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

1. Патент 2689800 Российская Федерация, МПК G01N 33/569 (2006.01), C12Q 1/6876 (2018.01). Способ детекции изолятов *Mycobacterium tuberculosis* Beijing 94-32-кластера в формате реального времени / **Мокроусов И.В., Вязовая А.А., Черняева Е.Н., Соловьева Н.С., Нарвская О.В., Журавлев В.Ю.**, заявитель и патентообладатель: ФГБУ СПб НИИФ Минздрава России, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Роспотребнадзора (RU). – № 2017142885; заявл. 07.12.2017; опубл. 29.05.2019, Бюл. № 16. – 2 с.

2. Патент 2735415 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68 (2006.01). Способ выявления микобактерий туберкулеза Центрально-Азиатского эпидемического кластера генотипа Beijing / Мокроусов И.В., Шитиков Е.А., **Вязовая А.А.**, Скиба Ю.А., Малахова М.В., Беспятовых Ю.А., Соловьева Н.С., Журавлев В.Ю., заявитель и патентообладатель: ФГБУ СПб НИИФ Минздрава России, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора, ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России (RU). - № 2019136849; заявл. 15.11.2019; опубл. 02.11.2020, Бюл. № 31. – 2 с.

3. Патент 2743365 Российская Федерация, МПК C12Q 1/686 (2018.01), C12Q 1/689 (2018.01), G01N 33/569 (2006.01), C12R 1/32 (2006.01). Способ детекции филогенетических сублиний генотипа Beijing *Mycobacterium tuberculosis* в формате реального времени / Мокроусов И.В., **Вязовая А.А.**, Герасимова А.А., Соловьева Н.С., Журавлев В.Ю., заявитель и патентообладатель: ФГБУ СПб НИИФ Минздрава России, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора (RU). - № 2020116755; заявл. 12.05.2020; опубл. 17.02.2021, Бюл. № 5. – 2 с.

4. Патент 2768021 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68 (2006.01), C12N 15/00 (2006.01). Способ детекции генотипа *Mycobacterium tuberculosis* Beijing 1071-32-кластер в формате реального времени / **Вязовая А.А.**, Синьков В.В., Пасечник О.А., Бадлеева М.В., Хромова П.А., Ярусова И.В., Жданова С.Н., Герасимова А.А., Соловьева Н.С., Журавлев В.Ю., Огарков О.Б., Мокроусов И.В., заявитель и патентообладатель: ФГБУ СПб НИИФ Минздрава России, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора, ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (RU). - № 2021108842; заявл. 31.03.2021; опубл. 23.03.2022, Бюл. № 9. – 2 с.

## СВИДЕТЕЛЬСТВА О РЕГИСТРАЦИИ

1. Свидетельство о регистрации базы данных RU № 2014620898 «Сполигопрофили *Mycobacterium tuberculosis* на Северо-Западе России» / Нарвская О.В., Журавлев В.Ю., Соловьева Н.С., Оттен Т.Ф., Вишневский Б.И., Мокроусов И.В., **Вязовая А.А.**, Шульгина М.В.; заявитель и правообладатель: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, ФГБУ СПб НИИФ Минздрава России (RU). – № 2014620366; заявл. 26.03.2014; опубл. 26.06.2014.

2. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2019622064 Российская Федерация. «Сполигопрофили штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Республике Коми» / Мокроусов И.В., Журавлев В.Ю., Соловьева Н.С., Прошина Е.Э., **Вязовая А.А.**, Нарвская О.В., Герасимова А.А.; заявитель и правообладатель: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, ФГБУ СПб НИИФ Минздрава России (RU). – № 2019621966; заявл. 30.10.2019; опубл. 13.11.2019.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
ЛУ – лекарственная устойчивость  
ЛЧ – лекарственная чувствительность  
МЛУ – множественная лекарственная устойчивость (MDR – multiple drug-resistance)  
МЛУ-ТБ – туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя  
п.н. – пар нуклеотидов  
ПТП – противотуберкулезные препараты  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени  
ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость  
ШЛУ-ТБ – туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью возбудителя  
CR – Clustering Rate (уровень кластеризации)  
DR – Direct Repeat (область прямых повторов)  
HGI – Hunter Gaston Index (индекс разнообразия Хантера–Гастона)  
IS6110-RFLP – Insertion Sequence 6110 Restriction Fragment Length Polymorphism  
(полиморфизм длин фрагментов рестрикции IS6110)  
LAM – Latin American Mediterranean (Латиноамерикано-Средиземноморское семейство)  
MIRU – Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (микобактериальные рассеянные повторы)  
RFLP – Restriction fragment length polymorphism (полиморфизм длин фрагментов рестрикции)  
SNP – Single Nucleotide Polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)  
UPGMA – Unweighted pair-group method of arithmetic averages (невзвешенный парно-групповой метод арифметических средних)  
VNTR – Variable Number Tandem Repeats (вариабельное число tandemных повторов)  
WGS – Whole Genome Sequencing (полногеномное секвенирование)