

Молекулярно-генетические особенности туберкулеза в Монголии и граничащих с ней регионах России

М.В. Бадлеева¹, С.Н. Жданова², Э. Баасансүрэн³, О.Б. Огарков^{2,4,5},
Н. Эрдэнэгэрэл³, Е.А. Орлова², Т. Оюунтуяа³, Е.Д. Савилов^{2,5} (savilov47@gmail.com),
Б. Буянхишиг³, Б. Пунцаг³, Д. Нямхуу³

¹ ФГБОУ ВО Бурятский государственный университет, Улан-Удэ

² ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск

³ Национальный центр инфекционных заболеваний, Улан-Батор

⁴ ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет, Иркутск

⁵ Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ, Иркутск

Резюме

Проведен сравнительный молекулярно-эпидемиологический анализ структуры популяции возбудителя туберкулеза в Монголии и граничащих с ней регионах России с целью определения взаимного влияния на развитие эпидемического процесса инфекции в изучаемых странах. Выборочные оценки монгольской (309 штаммов) и российской (933 штамм) когорт микобактерий туберкулеза (МБТ) проведены по результатам генотипирования методами делеционного анализа по RD 105/207, MIRU-VNTR 24 и субтипирования клоновой группы CC2/W148 по наличию специфической делеции в *kdpD* гене. Результаты проведенного исследования свидетельствуют об обособленности действующих резервуаров инфекции ТБ, несмотря на активность исторически сформировавшегося миграционного потока между Монголией и Россией: на изучаемых территориях генотипический спектр МБТ качественно отличается. На российских территориях (республика Бурятия, Забайкальский край и Иркутская область) преобладают субтипы CC1, CC2 и BL7 генотипа Beijing, а в Монголии – субтип CC4 (64,5%) того же доминирующего генотипа. В приграничных с Россией и центральных аймаках Монголии молекулярно-генетическая структура МБТ не имеет значимых отличий.

Ключевые слова: туберкулез, молекулярная эпидемиология, Монголия, Россия, генотип Beijing.

Molecular-Genetic Features of Tuberculosis in Mongolia and in Russian Bordering Regions

M.V. Badleyeva¹, S.N. Zhdanov², E. Baasansuren³, O.B. Ogarkov^{2,4,5}, N. Erdenegere³, E.A. Orlova², T. Oyuntuyaa³,
E.D. Savilov^{2,5} (savilov47@gmail.com), B. Buyanhishig³, B. Puntsag³, D. Nyamhuu³

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Training «Buryat State University», Ulan-Ude

² Federal State Budgetary Institution of Science «Scientific Center of Family Health and Human Reproduction», Irkutsk

³ National Center for Infectious Diseases, Ulaanbaatar

⁴ Federal State Educational Institution of Additional Professional Education «Irkutsk State University», Irkutsk

⁵ Federal State Educational Institution of Additional Professional Education «Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education», Irkutsk

Abstract

A comparative molecular epidemiological analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Mongolia and the neighboring regions of Russia was conducted. The aim was the determining of mutual influence the TB in the studied countries. Selected samples of the Mongolian (309 strains) and Russian (933 strains) cohorts of *Mycobacterium tuberculosis* were carried out based on the results of genotyping (used deletion analysis for RD 105/207, MIRU-VNTR 24 genotyping and subtyping of the clone CC2/W148 by the specific deletion in the *kdpD* gene). The results of the study indicate the isolation of transmission of TB infection in Mongolia, despite the activity of the historically formed migration between Mongolia and Russia: in the studied territories, the genotypic spectrum is qualitatively different. The subtypes CC1, CC2 and BL7 of the genotype Beijing predominate in the Russian territories (Buryatia, Zabaykalsky Krai and Irkutsk Region), and the CC4 subtype of the genotype Beijing presents in Mongolia (64.5%). The molecular genetic structure of *Mycobacterium tuberculosis* has no significant differences in the borderlands with Russia and in the central provinces of Mongolia.

Key words: tuberculosis, molecular epidemiology, Mongolia, Russia, genotype Beijing

Введение

Монголия – страна с высоким бременем туберкулеза (ТБ), в 2015 г. заболеваемость составляла 428 на 100 тыс. населения [1]. Частота встречаемости ВИЧ-инфекции +ТБ невысока – 0,34 на 100 тыс. населения, но распространение ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) становится все более острой проблемой: на долю ТБ с МЛУ приходится 2,2% от всех впервые выявленных случаев ТБ, а среди пациентов с повторными курсами лечения – 33% [1]. По выборочным данным, в Монголии МЛУ возникает (до 60% случаев) в результате неудач лечения ТБ у пациентов с положительным мазком мокроты [2]. Учитывая, что МЛУ ТБ более часто регистрируется среди больных моложе 35 лет [2], формирование резервуара штаммов *M. tuberculosis* с МЛУ на территории Монголии имеет непродолжительную историю.

МЛУ ТБ имеет широкое распространение в соседних с Монголией странах – Китае и России. Монголия граничит с северо-западными провинциями Китая и четырьмя регионами Российской Федерации (Алтайский и Забайкальские края, Республики Тыва и Бурятия). Кроме того, важную роль в исторически сложившихся миграционных отношениях играет Иркутская область, через территорию которой проходит часть транссибирской железнодорожной и автомобильной магистралей, связывающих Монголию с Россией. Таким образом, представляет актуальность сравнительный молекулярно-эпидемиологический анализ структуры популяции возбудителя туберкулеза в Монголии и граничащих с ней регионах России.

Цель данной работы – определение взаимного влияния на активность передачи штаммов *M. tuberculosis* с МЛУ и развитие эпидемического процесса инфекции в Монголии и России.

Материалы и методы

Молекулярно-генетическому анализу были подвергнуты случайно отобранные клинические изоляты: 309 штаммов из Монголии и 933 – из России. Пограничные аймаки Монголии были представлены 148 штаммами, центральная территория – 161 штаммом, большая часть которых (83,2% – 134 из 161) выделена от пациентов из столицы – г. Улан-Батор. Из приграничных аймаков Монголии, граничащих с Россией, анализировали 110 штаммов, имеющих общую границу с Китаем – 38 штаммов. Выборка российских штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ) состояла из 337 изолятов из республики Бурятия, 29 изолятов – из Забайкальского края (Агинского АО) и 598 изолятов из Иркутской области. От мужчин получены 60,7% образцов, средний возраст пациентов варьировал в пределах $37,8 \pm 15,1$ лет.

ДНК штаммов *M. tuberculosis* генотипировали по 24 локусам MIRU-VNTR согласно протоколу сайта MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org>).

<http://www.miru-vntrplus.org> и <http://www.miruinfo.faces.jsessionid=89112F274226E781C7B0B0D9118FDD70>) и RD105/207, как описано Reed [3]. Идентификацию полученных по MIRU-VNTR-24 проводили с помощью онлайн инструментов баз данных SITVIT WEB (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE) и MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org>). Для субтипирования штаммов генотипа Beijing клоновой группы CC2/W148 по наличию специфической делеции в kdpD гене [4] использовали ПЦР с детекцией в реальном времени. Профили штаммов, верифицированные как генотип Beijing вышеуказанными методами, по 24 локусам MIRU-VNTR классифицировали по Merker M. с соавт. (2015 г.) [4]. В качестве референсных профилей генотипа Beijing использовали 1550 уникальных MIRU-VNTR паттернов, распределенных по семи клональным комплексам CC1-6 и BL7 (clonal complexes – CCs) [4]. Уровень кластеризации (clustering rate) оценивали по формуле: $CR = (n_c - c)/n$ [5], где n_c – общее количество кластеризованных штаммов, c – количество кластеров, n – общее количество штаммов. Кластером считали филогенетическую группу, состоящую из двух или более идентичных по 24-м локусам штаммов.

Статистическую обработку данных проводили в редакторе электронных таблиц MS Excel 14.0 и GraphPad Prism 7. Значимость различий между параметрами оценивали с помощью критерия χ^2 , различия считали значимыми при уровне достоверности $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ генетических профилей показал, что в Монголии преобладает пандемический генотип Beijing (228 из 309 – 73,8%). Остальные штаммы МБТ принадлежали к генетическим семействам: LAM – 33 (10,7%), T – 30 (9,7%), H – 9 (2,9 %) изолятов. Доля микст генотипов составляла 5,8% (18 из 309). Не удалось классифицировать используемыми методами (orphan) 2,9% (9 из 309) штаммов. В российской выборке штаммов генотип Beijing присутствовал в 68,4% (657 из 964) образцов ДНК с вариацией по регионам от 62,1 (Забайкалье) до 70,8% (Иркутская область). Минорные генотипы (LAM, T, Ural, S, H, Haarlem, Uganda и X) имели более широкий полиморфизм, чем в монгольской коллекции (табл. 1).

На основе данных UPGMA-древа профилей монгольских штаммов, были выявлены 122 (39,5 %) уникальных паттерна и 21 кластер, объединяющий 187 штаммов (табл. 2). Обнаруженная высокая частота кластеризации (53,7%) штаммов МБТ из Монголии была обусловлена преимущественно вариантами генотипа Beijing (частота кластеризации – 58,0%). Значительное количество генетических клонов (82 из 187 – 43,9%) обнаружены от больных ТБ, проживающих в г. Улан-Батор, что свидетельствует о наличии крупного резервуара инфекции и условий для его

Таблица 1

Генотипы МБТ, выделенные от больных ТБ на территории Монголии и граничащих с ней регионов России (%)

Генотип/ Регион изучения	Монголия	Республика Бурятия	Забайкальский край	Иркутская область	Всего*
Beijing	73,8	63,9	62,1	70,8	68,4
H	2,9	1,8	0,0	1,4	1,5
LAM	10,7	16,9	3,4	11,3	12,8
T	9,7	3,8	24,1	4,7	5,0
S	0	1,2	3,4	0,7	0,9
Haarlem	0	1,5	0,0	0,6	0,8
X	0	0,6	0,0	1,1	0,9
Ural	0	7,4	0,0	3,6	4,7
Uganda	0	0,3	0,0	0,4	0,4
orphan	2,9	0,6	6,9	1,9	1,7
mix	5,8	2,1	0,0	3,5	2,9
Итого, штаммов	309	337	29	598	964

* По приграничным с Монголией районам России

Таблица 2.

Генетические кластеры *M. tuberculosis*, циркулирующие в Монголии

Генотип	24-MIRU-VNTR профиль	Количество изолятов в кластере
Beijing	244233352544425173353823	58
	244233352534425173353823	33
	244233362544425173353823	32
	244233352544425173353923	6
	244233352534425173353923	6
	244233362544425173353923	4
	244233342644425173353823	4
	244233352644425173343823	3
	244233342544425173353823	3
	244233352634425153353823	3
	244233352534425153353823	3
	244233352644425173363723	2
	244233352544425183353823	2
	244233342644425153353833	2
	244233351534425173353823	2
	244233352544425173353323	2
LAM	132244332224125153322622	9
	142244332224125153322622	6
	142244332224125153322522	3
T	224243222334225153333622	2
	224243122334225153333522	2

стабильного существования. Эти данные согласуются с результатами исследований, представляющих доказательства активной передачи МЛУ вариантов возбудителя ТБ в крупных населенных пунктах Монголии, и прежде всего в Улан-Баторе, где проживает 45% населения [6].

Дальнейшее исследование монгольских профилей генотипа Beijing в соответствии с классификацией по M. Merker (2015 г.) показало, что подавляющее большинство (64,5% – 147 из 228) из них вошло в кластер CC4 (CC – клональный комплекс штаммов генотипа Beijing, определяемый по результатам 24 MIRU-VNTR типирования и полногеномного секвенирования).

Доминирующее количество российских штаммов генотипа Beijing входило в кластеры CC1 (49,7%) и CC2 (27,6%) (табл. 3). Кроме того, 24-MIRU-VNTR профили российских изолятов МБТ, вошедших в CC4 (6,3% – 41 из 657), имели отличия от монгольских представителей этого клонального комплекса.

Заключительным этапом исследований была оценка распространения специфического для клоновой группы W148/CC2 маркера – делеции в kdpD гене. Эта мутация не была обнаружена ни в одном случае среди монгольских штаммов генотипа Beijing. Напротив, среди изолятов российской коллекции было выявлено 21,2% (204 из 964) случаев клона W148/CC2, что качественно отличает изучаемые выборки МБТ из Монголии и России.

Таким образом, молекулярно-генетические исследования штаммов из Монголии свидетельствуют о доминировании генотипа Beijing (73,8%). Полученный нами результат выборочных исследований соответствует данным других исследователей о распространении этого генотипа в Монголии [7 – 9]. Обнаруженное распределение минорных генотипов МБТ также согласуется с недавно опубликованными данными о генотипической структуре популяции МБТ в Монголии [9].

Внутригенотипическая вариация доминирующего генотипа возбудителя на территории Монголии и России имеет различия, свидетельствующие о значительной изолированности циркулирующих в изучаемых странах популяций МБТ. Субтипы CC1 и CC2 весьма широко распространены в Иркутской области и Бурятии и являются основными возбудителями лекарственно-устойчивых форм ТБ в этих регионах [10], однако в Монголии CC1 кластер представлен единичными случаями, а CC2 вообще не обнаружен. Кроме того, не был выявлен ни один изолят клоновой группы W148, несущий наибольший потенциал МЛУ ТБ в России [11]. Это позволяет предположить, что между монгольской и юго-восточной российской популяциями возбудителя практически отсутствует трансмиссия, несмотря на тесную связь популяций хозяина.

Представленные в настоящей работе результаты соответствуют ранее описанным M. Merker с соавт. [4] данным о превалировании штаммов CC4, 24-MIRU-VNTR профили которых отличаются от российских. Поэтому несостоятельной оказывается гипотеза о трансграничном распространении МЛУ-ТБ вдоль Транссибирской магистрали с последующей диссеминацией по территории Монголии [9]. Доказательства гипотезы были основаны на пространственной и временной оценке эволюции МЛУ-ТБ в Монголии по частотам его появления с 2003 по 2012 гг. Обнаруженное увеличение числа случаев произошло последовательно на провинции, которые обслуживаются Транссибирской железной дорогой. Выявленные «горячие» точки, где относительный риск ТБ с МЛУ был значительно выше, чем в остальной части страны: Улан-Батор и соседние с ним населенные пункты, три северные и одна восточная провинции, которые представляют собой важные остановки на пути Транссибирской магистрали, связывающей Монголию, Россию и Китай [9]. Анализ 24-MIRU-VNTR профилей из указанных выше монгольских

Таблица 3.

Кластеры генотипа Beijing *M. tuberculosis*, выделенные от больных ТБ на территории Монголии и граничащих с ней регионов России (%)

Генотип/ Регион изучения	Монголия	Республика Бурятия	Забайкальский край	Иркутская область	Всего*
CC1	2,2	33,3	11,1	49,7	43,4
CC2	0,0	21,0	11,1	31,6	27,6
CC3	2,6	10,5	0,0	8,1	8,7
CC4	64,5	6,4	38,9	5,0	6,3
CC5	0,0	0,5	0,0	0,5	0,4
CC6	3,5	1,4	0,0	0,7	0,9
CC orphan	27,2	2,3	0,0	2,0	2,1
BL7	0,0	24,7	38,9	2,5	10,6
Всего, штаммов	228	216	18	423	657

*по приграничным с Монголией районам России

аймаков не выявил значимых отличий от генетических характеристик других провинций.

Следует заметить, что в Монголии железнодорожный транспорт обеспечивает почти 80% грузовых и 30% пассажирских перевозок, поддерживая экономические ресурсы малонаселенной страны [12]. Поэтому очевидно, что железная дорога связывает основные населенные пункты Монголии, где концентрируются очаги туберкулезной инфекции, в том числе с МЛУ, и создаются, вероятно, дополнительные условия для активной трансмиссии в результате внутренней миграции. Но вероятность трансграничной передачи ТБ с МЛУ с российской стороны недоказательна.

Сравнение 24-MIRU-VNTR профилей 147 монгольских штаммов субтипа CC4, объединенных в самые крупные генетические кластеры (58, 33 и 32 – см. кластеры № 1, 2, 3 в табл. 2) с референсными профилями из базы данных Merker с соавт. обнаружило полную идентичность. Эти профили совпадают по генетическим характеристикам МБТ, выявленным в Европе, Африке и Восточной Азии [4]. Согласно Merker с соавт. [4], штаммы субтипа CC4 по полногеномным данным могут быть дифференцированы Asian Africa 1 и Asian Africa 2, то есть быть общими для азиатских и африканских регионов. Учитывая исторически сложившиеся отношения Монголии со странами Восточной Азии,

можно предположить, что на территорию Монголии эти штаммы могли быть занесены из восточноазиатских стран, вероятно из Китая или ближайших стран Юго-Восточной Азии, но не России.

Выводы

1. Доминирование клонального кластера CC4 генотипа Beijing, высокая частота его кластеризации и равномерное распределение на территории центральной и пограничной Монголии свидетельствуют об устойчивом резервуаре инфекции, сконцентрированном в Улан-Баторе и распространяющемся на другие провинции Монголии.
2. В качестве источника распространения штаммов субтипа CC4 на территорию Монголии может выступать Восточная Азия, наиболее вероятно Китай или ближайшие страны Юго-Восточной Азии.
3. В России активность эпидемического процесса туберкулеза определяется отличными от монгольских вариантов возбудителя – преимущественно штаммами клональных кластеров CC1 и CC2 генотипа Beijing

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (15-04-00632 А)

Литература

1. Global Tuberculosis Report. (2016). Доступно на: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2016_
2. Dobler C.C., Korver S., Batbayar O., Nyamdulam B., Oyuntsetseg S., Tsolmon B. et al. Multidrug-Resistant Tuberculosis in Patients for Whom First-Line Treatment Failed, Mongolia, 2010 – 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21 (8): 1451 – 1454.
3. Reed M.B., Pichler V.K., McIntosh F., Mattia A., Fallow A., Masala S. et al. Major *Mycobacterium tuberculosis* lineages associate with patient country of origin. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (4): 1119 – 1128.
4. Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg N., Lecher S., Willery E. et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nature genetics.* 2015; 47 (3): 242 – 249.
5. Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rusch-Gerdes S., Willery E., Savine E. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44 (12): 4498 – 4510.
6. Gurjav U., Burneebaatar B., Narmandakh E., Tumenbayar O., Ochirbat B., Hill-Cawthorne G.A. et al. Spatiotemporal evidence for cross-border spread of MDR-TB along the trans-Siberian railway line. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2015; 19: 1376 – 1382.
7. van Soolingen D., Qian L., de Haas P.E., Douglas J.T., Traore H., Portaels F. et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33 (12): 3234 – 3238.
8. Кириллова Н.В., Федосова Е.А., Наранбат Н., Оюунтуяа Т., Буянхшиг Б., Энхсайхан Д. и др. Структура популяции *M. tuberculosis* в Монголии по результатам генотипирования полиморфизмов больших последовательностей. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011; 26 (4): 3 – 7.
9. Gurjav U., Erkhembayar B., Burneebaatar B., Narmandakh E., Tumenbayar O., Hill-Cawthorne G.A. et al. Transmission of multi-drug resistant tuberculosis in Mongolia is driven by Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to all first-line drugs. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2016; 12 (101): 49 – 53.
10. Жданова С.Н., Огарков О.Б., Винокурова М.К., Алексеева Г.И., Кравченко А.Ф., Савилов Е.Д. Моделирование распространения основных клонов возбудителя туберкулеза в Саха (Якутия). Туберкулез и болезни легких. 2017. 95 (7): 40 – 47.
11. Mokrousov I. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2015; 6 (95): 167 – 176.
12. Железнодорожный транспорт в Монголии. Доступно на: <https://ru.wikipedia.org/wiki>.

Reference

1. Global Tuberculosis Report. 2016. Available at: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2016
2. Dobler C.C., Korver S., Batbayar O., Nyamdulam B., Oyuntsetseg S., Tsolmon B. et al. Multidrug-Resistant Tuberculosis in Patients for Whom First-Line Treatment Failed, Mongolia, 2010 – 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21 (8): 1451 – 1454.
3. Reed M.B., Pichler V.K., McIntosh F., Mattia A., Fallow A., Masala S. et al. Major *Mycobacterium tuberculosis* lineages associate with patient country of origin. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (4): 1119 – 1128.
4. Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg N., Lecher S., Willery E. et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nature genetics.* 2015; 47 (3): 242 – 249.
5. Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rusch-Gerdes S., Willery E., Savine E. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44 (12): 4498 – 4510.
6. Gurjav U., Burneebaatar B., Narmandakh E., Tumenbayar O., Ochirbat B., Hill-Cawthorne G.A. et al. Spatiotemporal evidence for cross-border spread of MDR-TB along the trans-Siberian railway line. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2015; 19: 1376 – 1382.
7. van Soolingen D., Qian L., de Haas P.E., Douglas J.T., Traore H., Portaels F. et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33 (12): 3234 – 3238.
8. Kirillova N.V., Fedosova E.A., Naranbat N., Oyuntuyaa T., Buyanhshig B., Ehnhsajhan D. et al. Structure of *M. tuberculosis* population in Mongolia by genotyping of large sequence polymorphisms. *Moлекулярная генетика, микробиология i вирусология.* [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]. 2011; 26 (4): 3 – 7. (in Russian)