

- Pneumonia Secondary to *Achromobacter Denitrificans*. *Ann. Med. Health. Sci. Res.* 2014; 4(1): S22—4.
11. Farr G., Pedram S. Community-Acquired Pneumonia with *Sphingomonas paucimobilis*. *Chest.* 2013; 10: 144. DOI: 10.1378/chest.1703090
12. Liao C.H., Teng L.J., Hsueh P.R., Chen Y.C., Huang L.M., Chang S.C. Nutritionally variant streptococcal infections at a University Hospital in Taiwan: disease emergence and high prevalence of beta-lactam and macrolide resistance. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38: 452—55.
13. Tarr P.E., Stock F., Cooke R.H., Fedorko D.P., Lucey D.R. Multi-drug-resistant *Corynebacterium striatum* pneumonia in a heart transplant recipient. *Transpl. Infect. Dis.* 2003; 5(1): 53—8.

Поступила 12.05.2017

Принята к печати 21.05.2017

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 579.873.21:579.253.2.083.3

Хромова П.А.<sup>1</sup>, Огарков О.Б.<sup>1,2,3</sup>, Жданова С.Н.<sup>1</sup>, Синьков В.В.<sup>1,4</sup>, Моисеева Е.Я.<sup>5</sup>, Цыренова Т.А.<sup>5</sup>, Кощеев М.Е.<sup>5</sup>, Зоркальцева Е.Ю.<sup>3</sup>, Савилов Е.Д.<sup>1,3</sup>

## ВЫЯВЛЕНИЕ ВЫСОКОТРАНСМИССИВНЫХ ГЕНОТИПОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ДЛЯ ПРОГНОЗА НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ТЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЁЗА

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», 664003, Иркутск;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет», 664003, Иркутск;

<sup>3</sup>Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования — филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ, 664049, Иркутск;

<sup>4</sup>ОГАУЗ «Иркутский областной клинический консультативно-диагностический центр», 664047, Иркутск;

<sup>5</sup>ОГБУЗ «Иркутская областная клиническая туберкулезная больница», 664039, Иркутск

Проведён биоинформационный поиск, разработан дизайн праймеров и TaqMan зондов для выявления ДНК возбудителя туберкулеза субтипов CC1 и CC2-W148 генотипа Beijing, а также генотипа Ural в различном клиническом материале (мокрота, спинномозговая жидкость, плевральная жидкость и др.) методом ПЦР в реальном времени. На 180 клинических образцах от 143 больных туберкулёзом (ТБ) лёгких проведена апробация чувствительности и специфичности разработанных тестов относительно исследований на генетическом анализаторе GeneXpert. Чувствительность для тестов на CC1, CC2-W148 и Ural относительно ПЦР анализатора GeneXpert составила 91%, 106% и 81% соответственно. Специфичность во всех случаях составила 100%. Образцы, несущие ДНК CC2-W148 генотипа, в параллельных исследованиях чаще были значимо положительны на мутации устойчивости к рифампицину — Rif(+) по результатам GeneXpert ( $\chi^2 = 27,1$ ;  $p < 0,01$ ) относительно других генотипов. В то же время выявление CC2-W148 штамма у больного чаще сопровождалось расхождением результатов: GeneXpert — Rif(+) и устойчивости к рифампицину в бактериологическом исследовании при окончательной валидации множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) ТБ ( $\chi^2 = 5,1$ ;  $p < 0,05$ ). Исследовано негативное влияние комбинации аллеля -336G гена CD209 пациента с генотипом микобактерии туберкулёза (МБТ) Beijing, обнаруженное ранее (Ogarkov et al., 2012). Наблюдали значимое преобладание широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) ( $\chi^2 = 4,3$ ;  $p < 0,05$ ) у больных с аллелем -336G гена CD209 в комбинации с клоном CC2-W148 по сравнению с остальными сочетаниями у больных. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования генотипирования возбудителя ТБ и пациента для раннего прогноза развития МЛУ/ШЛУ ТБ и других осложнений на этапах первичного обследования впервые выявленных больных ТБ.

Ключевые слова: эпидемические субтипы возбудителя туберкулёза; ПЦР-РВ тест для параллельного выявления генотипа CD209 пациента и субтипа CC2-W148.

Для цитирования: Хромова П.А., Огарков О.Б., Жданова С.Н., Синьков В.В., Моисеева Е.Я., Цыренова Т.А., Кощеев М.Е., Зоркальцева Е.Ю., Савилов Е.Д. Выявление высокотрансмиссивных генотипов возбудителя в клиническом материале для прогноза неблагоприятного течения туберкулёза. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62(10): 622-627. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-622-627>

Khromova P.A.<sup>1</sup>, Ogarkov O.B.<sup>1,2,3</sup>, Zhdanova S.N.<sup>1</sup>, Sinkov V.V.<sup>1,4</sup>, Moiseeva E.Ya.<sup>5</sup>, Tzyrenova T.A.<sup>5</sup>, Koscheev M.E.<sup>5</sup>, Zorkaltseva E.Yu.<sup>3</sup>, Savilov E.D.<sup>1,3</sup>

THE DETECTION OF HIGHLY-TRANSMISSIBLE GENOTYPES OF AGENT IN CLINICAL SAMPLES FOR PROGNOSIS OF UNFAVORABLE COURSE OF TUBERCULOSIS

<sup>1</sup>The research center of problems of family health and human reproduction, 664003 Irkutsk, Russia

<sup>2</sup>The Irkutskii state university, 664003 Irkutsk, Russia

<sup>3</sup>The Irkutskiaia medical academy of post-graduate training - the branch of The Russian medical academy of post-graduate education of Minzdrav of Russia, 664049 Irkutsk, Russia

<sup>4</sup>The Irkutskii oblastnoii clinical consultative diagnostic center, 664047 Irkutsk, Russia

<sup>5</sup>The Irkutskiaia oblastnaia clinical tuberculosis hospital, 664039 Irkutsk, Russia

The bio-information search was carried out and the design of primers and TaqMan probes was developed to detect DNA of agent of tuberculosis subtypes CC1 and CC2-W148 of Beijing genotype and also Ural genotype in various clinical material (phlegm, spinal fluid, pleural fluid, etc.) using real-time polymerase chain reaction technique. The 180 clinical samples from 143 patients with tuberculosis of lungs were used to carry out an approval of sensitivity and specificity of the developed tests concerning studies at the genetic analyzer GeneXpert. The sensitivity of tests on CC1, CC2-W148 u Ural relating to polymerase chain reaction of analyzer Gene Expert made up to 91%, 106% and 81% correspondingly. In all cases, the specificity made up to 100%. In parallel studies the samples with DNA of CC2-W148 genotype were more often positive on mutation of resistance to Rifampicin-Rif (+) according the results of GeneXpert ( $\chi^2 = 27,1$ ;  $p < 0,01$ ) related to other genotypes. At the same time, detection of CC2-W148 strain in patient was more often accompanied by discrepancy of results: GeneXpert - Rif (+) and resistance to Rifampicin in bacteriological study under ultimate validation of multiple medicinal resistance of tuberculosis ( $\chi^2 = 5,1$ ;  $p < 0,05$ ). The analysis was applied to negative effect of combination of allele-336G of CD209 gene of patient with genotype of tuberculosis mycobacterium Beijing detected previously (Ogarkov et al., 2012). The significant prevalence was observed related to widespread medicinal resistance ( $\chi^2 = 4,3$ ;  $p < 0,05$ ) in patients with allele-336G of CD209 gene in combination with CC2-W148 clone in comparison with other combinations in patients. The obtained results testify a possibility of application of genetic typing of tuberculosis agent and patient for early diagnosis of development of various complications of tuberculosis at the stages of primary examination of primarily detected patients with tuberculosis.

**Key words:** epidemic subtypes of tuberculosis agent; real-time polymerase chain reaction test; parallel detection; CD209 genotype; patient; CC2-W148 subtype.

**For citation:** Khromova P.A., Ogarkov O.B., Zhdanova S.N., Sinkov V.V., Moiseeva E.Ya., Tzyrenova T.A., Koscheev M.E., Zorkaltseva E.Yu., Savilov E.D. The detection of highly-transmissible genotypes of agent in clinical samples for prognosis of unfavorable course of tuberculosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (10): 622-627. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-622-627>*

**For correspondence:** Ogarkov O.B., doctor of medical sciences, chief researcher, the head of the department of epidemiology and microbiology. e-mail: bogarkov@yandex.ru

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Acknowledgment.** The study was implemented with the support of the grant of the Russian Foundation for Basic Research.

Received 23.05.2017  
Accepted 30.05.2017

По оценкам ВОЗ, около трети человеческой популяции инфицированы *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), при этом Российская Федерация входит в число 22 стран с наиболее неблагоприятной ситуацией по туберкулёзу (ТБ) [1]. Ранняя диагностика ТБ представляет только один из аспектов этой проблемы, но, пожалуй, наиболее сложный.

Безусловно, важнейшими в снижении глобального бремени ТБ служат социальные составляющие:

- улучшение условий жизни;
- снижение доли ВИЧ-инфицированных в популяции;
- качество питания;
- эффективность лечения заболевания и др.

Быстрая высокочувствительная диагностика ТБ должна быть неотъемлемой частью эпидемического и инфекционного контроля как в специализированных лечебных учреждениях, так и в популяции в целом.

Идеальный тест для экспресс-диагностики ТБ должен отвечать ряду ключевых критериев [2]:

- иметь чувствительность, превышающую 95% по отношению к бактериоскопическому и бактериологическому методам выделения;
- быть нацеленным на несколько уровней медицинского обслуживания от поликлиники до стационара;
- быть недорогим, доступным и быстрым;
- обладать предсказательной силой, в том числе быть пригодным для мониторинга лекарственной чувствительности и др.

В настоящее время наиболее близки к вышеназванным требованиям в лабораторной экспресс-диагностике ТБ «у постели больного», или «Point-of-Care Testing» (РОС), лабораторные исследования, выполняемые на генетическом анализаторе GeneXpert. Согласно Федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению ТБ с множественной и широкой лекарственной

устойчивостью (МЛУ/ШЛУ ТБ), в случае обнаружения устойчивости возбудителя к рифампицину молекулярно-генетическими методами с помощью GeneXpert (или иным валидированным способом) лечение осуществляют по четвертому режиму химиотерапии [3]. Несмотря на очевидные преимущества метода, такие как быстрота выполнения теста и возможность раннего прогноза МЛУ, исследования на GeneXpert не лишены ряда недостатков, таких как высокая стоимость исследования, ограниченность исследования только одним противотуберкулёзным препаратом. Кроме того, современные методы клинической лабораторной диагностики ТБ, в том числе основанные на молекулярно-генетических методах, совершенно не учитывают данные молекулярной эпидемиологии ТБ. Современные исследования свидетельствуют о циркуляции на территории России и других стран ряда эпидемических генотипов возбудителя, обладающих повышенной трансмиссивностью [4], способных вызывать нозокомиальные вспышки в туберкулёзных стационарах [5] и, вероятно, имеющих более высокую патогенность [6].

*Цель настоящего исследования* — разработка и апробация недорогих ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) тестов для выявления в мокроте и другом клиническом материале высокотрансмиссивных (эпидемических) генотипов возбудителя ТБ и аллеля -336G гена *CD209* пациента, комбинацию которых мы рассматриваем как неблагоприятно влияющую на исход ТБ [7].

*Материал и методы.* Соблюдение этических норм. Настоящее исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (НЦ ПЗСРЧ).

*Штаммы микобактерий.* Штаммы были получены с твердой питательной среды Левенштейна—Йенсена. Исследования устойчивости штаммов к противотуберкулёзным препаратам (ПТП) 1-го и 2-го рядов прово-

дли согласно стандартным операционным процедурам (СОП) Иркутской областной клинической туберкулёзной больницы (ИОКТБ). Исследования клинических образцов (мокроты, промывных вод бронхов и др.) проводили на 16-модульном анализаторе GeneXpert GXXVI-16-D (Cepheid), согласно СОП ИОКТБ с выявлением мутаций устойчивости к рифампицину — Rif(+). Оставшуюся от аликвотирования мокроту и другие клинические образцы инактивировали 50% изопропиловым спиртом с 1% СТАВ, согласно описанной ранее методике [7].

Выделение геномной ДНК из штаммов и клинических образцов (мокрота, плевральная жидкость и др.) проводили набором ДНК-сорб-В (Интерлабсервис, Россия). Олигонуклеотидные праймеры и зонды синтезированы НПФ «Синтол», реагенты для ПЦР приобретали в компании «Интерлабсервис». Структуры праймеров зондов, температура отжига и размер ампликонов для индикации CC1 и CC2-W148 кластеров генотипа Beijing, генотипа Ural, а также выявления аллеля –336G гена *CD209* [7] приведены в табл. 1. Дизайн и анализ

*in silico* праймеров и зондов выполнены с помощью онлайн программ Blastn и Primer-BLAST NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Методологию, разработанную для индикации динуклеотидной делеции в гене *kdpD*, специфичной для клона CC2-W148 генотипа Beijing [8], не приводят до решения Евразийской патентной организации (заявка № 201700085). Разработанные тесты с детекцией ПЦР-РВ испытывали на амплификаторе Light Cycler Nano (Roche), согласно разработанным в процессе работы протоколам. Статистическую обработку результатов проводили в таблицах Excel и программой Statistica v6.0.

*Результаты.* Приведённые в табл. 1 наборы праймеров и зондов были испытаны на специфичность выявления субтипов CC1, CC2-W148 генотипа Beijing и генотипа Ural с ДНК, выделенными из 120 культур МБТ и охарактеризованными ранее с помощью 24-локусного MIRU-VNTR генотипирования [11]. Выбор генотипов-мишеней определяли спектром эпидемически и клинически актуальных клонов, циркулирующих на территории

Таблица 1

Список праймеров и зондов, использованных для проведения исследования

| Название гена и (позиция SNP в геноме) | Структура олигонуклеотида 5'->3'                         | Размер ампликона (п.н.) | Tm, °C | Ссылка на источник | Примечание  |
|--|--|-------------------------|--------|--------------------|---|
| <i>CD209</i> (rs4804803)               | ACTGTGTTACACCCCTCCACTAG                                  | 91                      | 60     | [7]                | Прямой праймер для амплификации фрагмента CD209             |
|  | AGGAAAGCCAGGAGGTCACA                                     |                         |        |                    | Обратный праймер для амплификации фрагмента CD209           |
|  | (R6G)CTGC(C-LNA)(C-LNA)<br>(A-LNA)CCCTTGC(BHQ1)          |                         |        |                    | Зонд для индикации –336A аллеля CD209                       |
|  | (FAM)CTGC(C-LNA)(T-LNA)<br>(ALNA)CCCTTGC(BHQ1)           |                         |        |                    | Зонд для индикации –336G аллеля CD209                       |
| <i>pks8</i> (1884305)                  | (FAM)-TGGCGACATT(G-LNA)<br>(G-LNA)TCACTGCGG-(RTQ1)       | 100                     | 65     | [8]                | Зонд для индикации ДНК CC1 кластера                         |
|  | (R6G)-GTGGCGACATT(G-LNA)<br>(T-LNA)TCACTGCGG-(BHQ2)      |                         |        |                    | Зонд для индикации ДНК иных кластеров(non-CC1)              |
|  | GCGATGATGCGTAGAGAGCAC                                    |                         |        |                    | Прямой праймер для амплификации ДНК CC1/non-CC1 кластеров   |
|  | AACACCGCCGCGCAATCCATT                                    |                         |        |                    | Обратный праймер для амплификации ДНК CC1/non-CC1 кластеров |
| <i>cinA</i> (2147906)                  | (FAM)GACGATATG(A-LNA)<br>(T-LNA)(C-LNA)GTCGAG(BHQ1)      | 143                     | 60     | [9]                | Зонд для индикации ДНК Ural                                 |
|  | (R6G)ACGATATG(A-LNA)(C-LNA)<br>(C-LNA)GTCGAG(BHQ1)       |                         |        |                    | Зонд для индикации ДНК иных генотипов (non-Ural)            |
|  | TCGAGGCACAGCTGCGATT                                      |                         |        |                    | Прямой праймер для амплификации ДНК Ural/non-Ural           |
|  | CCAGCTCGTCGTCCAGCT                                       |                         |        |                    | Обратный праймер для амплификации ДНК Ural/non-Ural         |
| <i>инсерция IS6110 Rv2664-Rv2665</i>   | (R6G)-AGACTCTCTGATCT(G-LNA)<br>AGAC (C-LNA)TCA-(BHQ2)    | 198                     | 65     | [10]               | Зонд для индикации ДНК CC2-W148 кластера                    |
|  | (FAM)-TT(C-LNA)<br>CTCTGACAGCAACA(C-LNA)<br>CAGTT-(RTQ1) |                         |        |                    | Зонд для индикации ДНК иных кластеров (nonCC2-W148)         |
|  | GCGACCCGCGTCTCCTGA                                       |                         |        |                    | Прямой праймер для амплификации ДНК CC2-W148/non CC2-W148   |
|  | TCGGCCGTACGGACGACGAT                                     |                         |        |                    | Обратный праймер для амплификации ДНК CC2-W148/non CC2-W148 |
|  | CGAGGCTGCCTACTACGCTC                                     |                         |        |                    | Обратный праймер для амплификации ДНК CC2-W148/non CC2-W148 |

**Определение чувствительности и специфичности тестов на 100 образцах мокроты, 120 штаммах МБТ и 10 МОТ штаммах**

| Название гена и позиция мутации в геноме      | Позитивные результаты относительно GeneXpert как референс-метода (63/100) при исследовании образцов мокроты | Специфичность тестов при исследовании 120 МБТ и 10 МОТ штаммов |
|---|---|--|
| CC1 <i>pks8</i> (1884305)                     | 57/63 (91%)   | 100%   |
| CC2-W148 инсерция IS6110 <i>Rv2664-Rv2665</i> | 59/63 (94%)   | 100%   |
| CC2-W148 <i>kdpD</i> (2545delCT)              | 66/63 (105%)  | 100%   |
| Ural <i>cinA</i> (2147906)                    | 51/63 (81%)   | 100%   |

Таблица 3

**Демографические, генетические данные, ВИЧ-статус больных исследуемой выборки**

| Признак                                       | Значение признака |
|---|-------------------|
| Общее количество больных, абс.                | 143               |
| Мужчины                                       | 86                |
| Женщины                                       | 57                |
| Возраст, годы, среднее стандартное отклонение | 40,9 ± 11,9       |
| <i>CD209</i> , генотип                        |                   |
| AA  | 100               |
| AG  | 40                |
| GG  | 3                 |
| ВИЧ-положительные, абс. (%)                   | 35 (24,5%)        |

исследуемого региона и в России в целом [12]. Во всех случаях получено 100% совпадение результатов. Отсутствие неспецифической реакции разработанных тестов определяли аналогично с использованием 10 образцов ДНК, выделенных из клинических штаммов и относящихся к видам микобактерий, отличным от *M. tuberculosis* (МОТ). Проведенный тест показал полную видовую специфичность разработанных тестов (табл. 2).

Чувствительность тестов определяли на 100 образцах мокроты, отобранных случайным образом. Как видно из табл. 2, ПЦР набор на основе динуклеотидной делеции в гене *kdpD* показал большую чувствительность, чем используемый в качестве референсного теста GeneXpert. С помощью этого подхода было выявлено три дополнительных образца, позитивных на ДНК МБТ, по сравнению с результатами на GeneXpert.

Для оценки клинического значения разработанных тестов было исследовано 190 клинических образцов (мокрота, спинномозговая жидкость, операционный материал) от 186 больных ТБ, находившихся на стационарном лечении в ИОКТБ в 2016 г. Все исследования проведены в параллельных испытаниях с GeneXpert, как описано выше. Ретроспективный анализ клинических данных выявил 143 пациента из числа обследованных, имевших развернутую бактериограмму выделенных штаммов. Для дальнейшего анализа были отобраны только эти случаи. В табл. 3 приведены общие демографические данные выборки, генетический полиморфизм гена *CD209* – 336A/G, их ВИЧ-статус.

МЛУ ТБ оценивали по наличию устойчивости МБТ к рифампицину и изониазиду, ШЛЮ определяли при наличии МЛУ и устойчивости к канамицину и офлоксацину. В случае выявления МЛУ и

устойчивости к одному из двух антибиотиков (канамицину или офлоксацину), штамм обозначали как преШЛЮ.

Среди 39 больных, мокрота которых была положительна на присутствие ДНК CC2-W148 клона, 34 были позитивны на Rif(+) мутации в GeneXpert исследовании. Среди 104 больных, мокрота которых была позитивна на ДНК других генотипов (или других субтипов генотипа Beijing, например CC3, CC4, CC5, CC6 и BL7 [8]), выявлено только 38 Rif(+) случаев. Таким образом, Rif(+) мутации значимо чаще встречали в образцах с ДНК CC2-W148 субтипа ( $\chi^2 = 27,1; p < 0,01$ ). Следовательно, у больных, поражённых МБТ генотипа Beijing/CC2-W148, значимо чаще развивались случаи с МЛУ и ШЛЮ (табл. 4). Однако углублённый анализ выявил расхождение между прогнозом МЛУ/ШЛЮ по результатам исследования на GeneXpert и фенотипическим развитием МЛУ/ШЛЮ у штаммов. Анализ выявил семь случаев несовпадения Rif(+) результатов по данным GeneXpert с фенотипически проявившимся МЛУ-ТБ по итогам бактериологического анализа. Среди 39 образцов CC2-W148 клона в пяти случаях предварительный результат МЛУ не был подтверждён. В трёх случаях штаммы были чувствительны к рифампицину, в одном — к изониазиду, в одном — к изониазиду и рифампицину. В то же время среди остальных 104 случаях иных генотипов, т.е. не относящихся к клону Beijing/CC2-W148, выявлено только два таких несовпадения. Таким образом, МБТ клона Beijing/CC2-W148 значимо чаще ( $\chi^2 = 5,1; p < 0,05$ , с коррекцией по Йетсу) давали неправильный прогноз МЛУ при предварительном исследовании на мутации устойчивости к рифампицину на анализаторе GeneXpert.

Из 143 обследованных в девяти случаях выявлены смешанные генотипы W148/nonW148. В одном случае за время периода наблюдения у пациента произошла однозначная смена генотипа возбудителя, сопровождавшаяся развитием ШЛЮ. *Больной Б., 1987 г.р., поступил в ИОКТБ с диагнозом: рецидив ТБ лёгких, диссеминированная форма в фазе инфильтрации, ТБ внутри-*

Таблица 4

**Частота встречаемости МЛУ, преШЛЮ/ШЛЮ среди исследованных генотипов, абс. (%)**

| Генотип/субтип    | Всего | МЛУ        | преШЛЮ/ШЛЮ | $\chi^2; p^*$ |
|-------------------|-------|------------|------------|---------------|
| Beijing/CC1       | 21    | 9 (42,9%)  | 3 (14,3%)  | нет различий  |
| Beijing/CC2-W148  | 39    | 16 (41,0%) | 11 (28,2%) | 11,1; >0,01   |
| Ural              | 4     | 1 (25%)    | 0          | нет различий  |
| «Другие генотипы» | 79    | 18 (22,8%) | 11 (13,9%) | —             |

\* Сравнение суммарных данных МЛУ + преШЛЮ/ШЛЮ Beijing/CC1, Beijing/CC2-W148 и Ural со штаммами «другие генотипы».

Таблица 5

Частоты сочетания генотипов *CD209* пациентов и выделенных от них микст W148/nonW148 вариантов возбудителя ТБ

| Тип больных/Количество случаев                                  | Общий показатель | Микст генотипы W148/nonW148 | $\chi^2$ ; $p$                 |
|---|------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Больные с сочетанием -336G аллель + CC2-W148 генотип            | 16               | 6                           | $\chi^2 = 24,1^*$ ; $p < 0,01$ |
| Больные с иным сочетанием аллелей <i>CD209</i> и генотипами МБТ | 127              | 3                           |                                |

\* Коррекция по Йетсу.

грудных лимфатических узлов в фазе инфильтрации; ВИЧ-инфекция, стадия 4B, фаза прогрессирования, без ВААРТ. При поступлении на стационарное лечение в мокроте определено наличие ДНК МБТ Rif(+), микст-генотип (W148/non-W148). Через месяц лечения мокрота оставалась положительной на ДНК МБТ, Rif(+), однако генотип определяли однозначно как W148.

ДНК из мокроты 143 больных генотипирована на AA\AG\GG генотипы в позиции -336 гена *CD209* [7]. Получено следующее распределение генотипов — 100\40\3 соответственно, находящихся в равновесии по Харди—Вайнбергу ( $\chi^2 = 0,19$ ;  $p > 0,05$ ). Генотипы AG и GG мы рассматривали как неблагоприятные в случае сочетания их с генотипом возбудителя Beijing [7]. В настоящем анализе исследовали сочетание аллеля -336G *CD209* (генотипы GG и AG) у пациентов и CC2-W148 штамма возбудителя. Определено 16 таких случаев (табл. 5). У этих больных значимо чаще ( $\chi^2 = 24,1$ ;  $p < 0,01$  с коррекцией по Йетсу) выявляли смешанные генотипы W148/nonW148 по сравнению с остальными пациентами. В вышеописанной группе обнаружены 4 случая ШЛУ, 2 случая преШЛУ, 5 случаев МЛУ. У остальных 5 больных выявлены полирезистентные штаммы. С учётом того, что всего в выборке обнаружено только 12 ШЛУ штаммов, имеет место значимое преобладание ШЛУ случаев среди группы больных с неблагоприятным сочетанием -336G аллеля и Beijing/CC2-W148 генотипа ( $\chi^2 = 4,3$ ;  $p < 0,05$  с коррекцией по Йетсу).

**Обсуждение.** Общее количество обнаруженных микст-генотипов значительно меньше ожидаемого, описанного в аналогичном исследовании [13], проведённом в Южной Африке, что, по-видимому, свидетельствует о достаточной эффективности проводимых противоэпидемических мероприятий в ИОКТБ. Тем не менее, полученные результаты свидетельствуют о том, что внутрибольничная трансмиссия высокоэпидемического стационара все же возможна. По всей видимости, наиболее уязвимой группой больных, подверженной потенциальному нозокомиальному заражению высоко-трансмиссивным штаммом CC2-W148, несущим МЛУ/ШЛУ, в противотуберкулезном стационаре являются ВИЧ-инфицированные больные, а также носители минорного аллеля -336G гена *CD209*. Следует отдельно отметить, что подавляющее большинство случаев обнаружения ДНК CC2-W148 в мокроте совпадало с выявлением Rif(+) мутаций в исследовании GeneXpert. По всей видимости этот феномен связан с конститутивными мутациями в *rpoB* гене, что приводит к эпидемическому распространению МЛУ штаммами этого генотипа.

**Заключение.** Разработанная тест-система для выявления клона CC2-W148 в мокроте и другом клиническом материале можно рассматривать в качестве инструмента для клинической диагностики, а также метода, пригодного для проведения профилактики нозокомиальных вспышек МЛУ ТБ, вызванных данным эпидемическим штаммом [5].

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-00160 А.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. World Health Organization, Geneva; 2015.
2. Dheda K., Ruhwald M., Theron G., Peter J., Yam W.C. Point-of-care diagnosis of tuberculosis: past, present and future. *Respirology*. 2013; 18(2): 217—32.
3. Васильева И.А., Эргешов А.Э. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулёза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. Тверь: Триада; 2014.
4. Синьков В.В., Савилов Е.Д., Огарков О.Б. Реконструкция эпидемической истории «Пекинского» генотипа *Mycobacterium tuberculosis* в России и странах бывшего СССР по результатам сполитотипирования. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2011; 3: 25—9.
5. Narvskaya O., Otten T., Limeschenko E., Sapozhnikova N., Grashchenkova O., Steklova L. et al. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 21(8): 596—602.
6. Ribeiro S.C., Gomes L.L., Amaral E.P., Andrade M.R., Almeida F.M., Rezende A.L. et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(7): 2615—24.
7. Ogarkov O., Zhdanova S., Savilov E., Mokrousov I., Sinkov V., Antipina S. 'Lethal' combination of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and human CD209 -336G allele in Russian male population. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12(4): 732—6.
8. 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. *Nat. Genet.* 2015; 47(3): 242—9.
9. Синьков В.В., Огарков О.Б., Мокроусов И.В., Жданова С.Н. Эволюционное значение несинонимичных замен в геноме *Mycobacterium tuberculosis* генотипа Ural. *Молекулярная медицина*. 2016; 14(4): 44—50.
10. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Otten T., Jiao W.W., Gomes L.L. et al. Russian «successful» clone B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(11): 3757—9.
11. Жданова С.Н., Огарков О.Б., Степаненко Л.А., Лац А.А., Синьков В.В., Унтанова Л.С. и др. Применение делеционного анализа по RD105 для выявления генотипа Пекин *Mycobacterium tuberculosis*. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2011; 2: 194—7.
12. Жданова С.Н., Зоркальцева Е.Ю., Огарков О.Б., Воробьева О.А., Унтанова Л.С., Алексеева Г.И. и др. Характеристика лекарственно устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с помощью молекулярно-генетических методов. *Сибирский медицинский журнал*. 2011; 105(6): 228—30.
13. Hanekom M., Streicher E.M., Van de Berg D., Cox H., McDermid C., Bosman M. et al. Population structure of mixed *Mycobacterium tuberculosis* infection is strain genotype and culture medium dependent. *PLoS One*. 2013; 8(7): e70178. doi: 10.1371/journal.pone.0070178.

## REFERENCES

1. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2015*. World Health Organization, Geneva; 2015.
2. Dheda K., Ruhwald M., Theron G., Peter J., Yam W.C. Point-of-care diagnosis of tuberculosis: past, present and future. *Respirology*. 2013; 18(2): 217—32.
3. Vasilyeva I.A., Jergeshov A.Je. *Federal clinical recommendations for diagnosis and treatment of Tuberculosis with Multiply and Extensively Drug-Resistant Pulmonary*. Tver: Triada, 2014. (in Russian)
4. Sinkov V.V., Savilov E.D., Ogarkov O.B. Reconstruction of the epidemic history of the Beijing genotype of Mycobacterium tuberculosis in Russia and former soviet countries using spoligotyping. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2011; 3: 25—9. (in Russian)
5. Narvskaya O., Otten T., Limeschenko E., Sapozhnikova N., Grashchenkova O., Steklova L. et al. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 21(8): 596—602.
6. Ribeiro S.C., Gomes L.L., Amaral E.P., Andrade M.R., Almeida F.M., Rezende A.L. et al. Mycobacterium tuberculosis strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(7): 2615—24.
7. Ogarkov O., Zhdanova S., Savilov E., Mokrousov I., Sinkov V., Antipina S. 'Lethal' combination of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype and human CD209 –336G allele in Russian male population. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12(4): 732—6.
8. Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg N., Lecher S., Wilery E. et al. Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage. *Nat. Genet.* 2015; 47(3): 242—9.
9. Sinkov V.V., Ogarkov O.B., Mokrousov I.V., Zhdanova S.N. Evolutionary significance of non-synonymous substitutions for Mycobacterium tuberculosis of Ural genotype. *Molekulyarnaya meditsina*. 2016; 14(4): 44—50. (in Russian)
10. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Otten T., Jiao W.W., Gomes L.L. et al. Russian «successful» clone B0/W148 of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: a multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(11): 3757—9.
11. Zhdanova S.N., Ogarkov O.B., Stepanenko L.A., Laz A.A., Sinkov V.V., Untanova L.S. et al. The deletion analysis of RD105 is a useful tool in the evaluation of Beijing strains of Mycobacterium tuberculosis. *Byulleten Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoi akademii meditsinskikh nauk*. 2011; 2: 194—7. (in Russian)
12. Zhdanova S.N., Zorkalzeva E.U., Ogarkov O.B., Untanova L.S., Alekseeva G.I., Savilov E.D. Description of drug resistant strains Mycobacterium tuberculosis by the molecular genetic technique. *Sibirskij meditsinskiy zhurnal*. 2011; 105(6): 228—30. (in Russian)
13. Hanekom M., Streicher E.M., Van de Berg D., Cox H., McDermid C., Bosman M. et al. Population structure of mixed Mycobacterium tuberculosis infection is strain genotype and culture medium dependent. *PLoS One*. 2013; 8(7): e70178. doi: 10.1371/journal.pone.0070178.

Поступила 23.05.17

Принята к печати 30.05.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.98:578.823.2]-036.22-078

Зыкова Т.А.<sup>1</sup>, Шевякова Е.А.<sup>1</sup>, Колпаков С.А.<sup>2</sup>

## РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ И ВОЗМОЖНОСТИ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ РЕОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

<sup>1</sup>ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава РФ, 344037, Ростов-на-Дону;

<sup>2</sup>ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, 344000, Ростов-на-Дону, Россия

Освещена информация о проявлениях и возможных ассоциациях реовирусной инфекции. Приведены собственные результаты изучения распространённости, клинической значимости и возможностей серодиагностики реовирусной инфекции при различных патологических состояниях. Показано, что реовирусная инфекция широко распространена среди взрослого населения (60,6%) и детей (48,7%). Установлено, что с возрастом серопревалентность к реовирусам возрастает. Подтверждена этиологическая значимость реовирусов при различных острых заболеваниях, преимущественно респираторного тракта. Выявлено, что средний титр антител (АТ) к реовирусам нарастает у детей с острым гепатитом неустановленной этиологии и взрослых с хроническими неопухольвыми заболеваниями печени. Учитывая высокий уровень серопревалентности, подчеркнута значимость исследования парных сывороток в диагностике реовирусной инфекции.

Ключевые слова: реовирус; респираторно-вирусная инфекция; серопревалентность; злокачественные новообразования; лабораторная диагностика.

Для цитирования: Зыкова Т.А., Шевякова Е.А., Колпаков С.А. Распространённость и возможности серологической диагностики реовирусной инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(10): 627-631. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-627-631>

Zykova T.A.<sup>1</sup>, Shevyakova E.A.<sup>1</sup>, Kolpakov S.A.<sup>2</sup>

THE PREVALENCE AND POSSIBILITIES OF SEROLOGICAL DIAGNOSTIC OF REOVIRAL INFECTION

<sup>1</sup>The Rostovskii research oncologic institute of Minzdrav of Russia, 344037 Rostov-on-Don, Russia

<sup>2</sup>The Rostovskii research institute of microbiology and parasitology of Rospotrebnadzor, 344000 Rostov-on-Don, Russia

Для корреспонденции: Зыкова Татьяна Алексеевна, канд. мед. наук, зав. лаб. вирусологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России; e-mail: [tatiana2904@yandex.ru](mailto:tatiana2904@yandex.ru)