

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ "Стефан Ангелов"

Виолета Вълчева Вълчева

Молекулярно-генетични характеристики на щамове *Mycobacterium tuberculosis*, изолирани от различни региони на България

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация

За присъждане на образователна и научна степен "Доктор"

Научна специалност 01.06.12 Микробиология

Научен ръководител: ст.н.с. II ст. д-р Надя Маркова

Официални рецензенти: ст.н.с. II ст. д-р Тодор Кантарджиев, дмн

проф. Иван Митов, дмн

София, 2009

Дисертационния труд съдържа 187 страници, 31 фигури и 7 таблици. В библиографската справка са включени 344 заглавия, от които 26 на кирилица и 318 на латиница. Експерименталната работа е извършена в секция „Патогенни бактерии” на Институт по микробиология „Стефан Ангелов”-БАН и Институт „Пастър” Гваделупа и Санкт-Петербург, Русия.

Дисертационния труд е обсъден и насочен за защита от разширен научен семинар по “Патогенни микроорганизми и инфекциозна имунология” към Институт по микробиология „Стефан Ангелов” – БАН.

Издавам най-сърдечна благодарност на микробиологичните лаборатории при регионалните туберкулозни диспансери от София, Пловдив, Варна, Бургас, Хасково, Кърджали, Плевен, Велико Търново, Шумен и Враца за предоставените щамове *Mycobacterium tuberculosis*. Искам да благодаря и на научния ми ръководител ст.н.с. II ст. д-р Надя Маркова за отделеното време, възискателността и компетентната помощ при окончателното оформяне на дисертационния труд.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на **26.01.2009г. от 14.00 часа** на заседание на СНС по микробиология, вирусология и имунология при ВАК в аудиторията на Националния център по заразни и паразитни болести, бул. „Янко Сакъзов” № 26, гр. София.

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Националния център по заразни и паразитни болести, бул. „Янко Сакъзов” № 26, гр. София.

Използвани съкращения:

ПТП	- противотуберкулозни препарати
BCG	- Bacille-Calmette Guérin
Beijing	- Пекин
bp	- base pairs
DR	- direct repeats
EMB	- етамбутол
ETR	- exact tandem repeats
INH	- изониазид
IS	- insertion sequence
MDR-TB	- multi-drug-resistant tuberculosis
MIRU	- mycobacterial interspersed repetitive units
PCR	- polymerase chain reaction
QUB	- Queen's University of Belfast
RIF	- рифампицин
RFLP	- restriction fragments length polymorphism
STR	- стрептомицин
VNTR	- variable number of tandem repeats

ВЪВЕДЕНИЕ

Туберкулозата е инфекциозно заболяване, съществуващо от дълбока древност. През годините честотата му се е променяла с различна интензивност. В днешни дни се отбелязва световна тенденция за нарастване разпространението на туберкулозата. Зачестяват случаите на заболяване не само в бедните, но и в икономически развитите страни на Европа и другите континенти. Наблюдава се негативна тенденция за проява на атипични и тежки форми на туберкулоза, както и увеличаване случаите с лекарствена мултирезистентност. Всичко това води освен до изключително неблагоприятно въздействие върху индивида, семейството и обществото, но и до огромни щети и значителни разходи за лечение. Настоящата епидемиологична ситуация налага мобилизиране на всички усилия на обществото и държавата, включвайки както националните медицински структури, така и научния потенциал и елит по света и в страната ни за контрол на тази социално значима болест и ограничаването ѝ в рамките на новите европейски структури.

Липсата на сведения за популационната структура на *Mycobacterium tuberculosis* на територията на България, честотата и спектъра на мутации, разпространението на различни генотипове и едновременно с това липсата на данни за тяхното епидемиологично и патогенетично значение обуславят актуалността от системни изследвания върху генетичните вариации при туберкулозата. Развитието на това научно направление в България ще задълбочи познанието за особеностите и ранното откриване на лекарствено-резистентните щамове *Mycobacterium tuberculosis*, значението им за съвременната инфекциозна патология, профилактика и лечение, както и ще бъде добавена нова информация към световната база данни за пандемичното разпространение на туберкулозата в света.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящата дисертационна работа е да се извършат молекулярно-генетични изследвания и анализ на популационната структура на щамове *Mycobacterium tuberculosis* по отношение на генетичната им вариабилност и разпространението им в различни региони на България, както и детекция на специфичните мутации свързани с молекулярните механизми на резистентността към основните противотуберкулозни препарати.

Задачи:

1. Колекциониране на изолирани в различни области на България клинични щамове на *Mycobacterium tuberculosis* и изследване на геномния им полиморфизъм чрез молекулярно-генетични методи - IS6110-RFLP, сполиготипиране и MIRU-VNTR.

2. Установяване степента на генетично сходство и диференциране на щамовете чрез сравнителен геномен анализ и използване на комбинация от молекулярно-епидемиологични маркери (IS6110, DR, MIRU-VNTR). Идентифициране на преобладаващите генотипни варианти в популацията, циркулираща в България и сравнението ѝ с разпространените в съседните страни (Балканския регион) и по света генотипове.

3. Определяне честотата на лекарствена резистентност към основните противотуберкулозни средства - рифампицин, изониазид, етамбутол и стрептомицин (RIF, INH, EMB, STR) чрез установяване на мутации в гените *rpoB*507-533, *katG*315, *inhA* промоторния регион (в позиции от – 9 до – 25), *embB*306 и *rpsL*43.

4. Подбор на комбинация от подходящи молекулярно-епидемиологични маркери с цел създаване оптимизирана схема за епидемиологично типичане на разпространените в България генотипни варианти на *M. tuberculosis*.

Материали и методи

1. Бактериални изолати

Изследвани бяха 133 щамове на *M. tuberculosis*, изолирани от различни области в България и колекционирани в рамките на двугодишен период от време (2004-2006г.). В изследването бяха включени изолати от новорегистрирани пациенти, страдащи от белодробна туберкулоза. Щамове бяха предоставени от микробиологичните лаборатории при регионалните туберкулозни диспансери както следва: от София, Враца, Плевен, Велико Търново, Шумен, Варна, Бургас, Хасково, Кърджали и Пловдив.

Включените в изследването щамове, бяха рекултивирани на средата на Льовенщайн-Йенсен чрез инкубиране на 37°C за 28 до 42 дни. Всички култури показаха типичен растеж и морфология на колонии, както и киселинна устойчивост при оцветяване на препарати по Цил-Нилсен.

2. Изолиране на хромозомна ДНК (van Embden, 1993)

От всички щамове бе изолирана нативна, достатъчно пречистена хромозомна ДНК, която бе използвана за осъществяване на последващите генетични анализи. Електрофоретичен анализ потвърждава интактността, качеството и количеството на получения ДНК-съдържащ материал.

3. По-важни методи за генотипиране, използвани в дисертацията:

3.1. Определяне на генетичното разнообразие на щамове

3.1.1. Сполиготипиране (англ., *spacer oligonucleotide typing, spoligotyping*; Kamerbeek, 1997)

Амплифицираните след PCR продукти се хибридизират с 43 стандартизирани имобилизирани спейсърни олигонуклеотиди, ковалентно свързани към мембрана. Детекцията на хибридизираната

мембрана се осъществява чрез хемилуминисцентна реакция върху филм (Amersham). Получените профили (сигнали) се сравняват с международна база данни SpolDB4, подържана в Институт Пастър в Гваделупа за идентифициране на сполигопрофилите и тяхната филогеографска принадлежност.

3.1.2. IS6110-RFLP (van Embden, 1993)

Най-често използваният и стандартизиран за молекулярно типичане на изолати на *M.tuberculosis* комплекс е RFLP фингърпринтингът отчитащ полиморфизма по дължината на рестрикционните фрагменти. В основата на метода е детекция на инсерционната секвенция IS6110 в генома на *M. tuberculosis*. Рестрицираната хромозомна ДНК, разделена електрофоретично и пренесена върху мембрана (Hybond N⁺) чрез алкален блотинг се хибридизира с IS6110 сонда, маркирана с диоксигенин (DIG). Детекцията на хибридизираните мембрани се осъществява с кит за колориметрично ензимно оцветяване, съобразно инструкциите на фирмата производител. Получените хибридизационни профили се анализират с компютърните програми TotalLab (Nonlinear Dynamics Ltd., UK) – за изчисляване молекулните тегла на получените IS6110-RFLP фрагменти и Taxotron (Grimont, 2000) – за построяване на дендрограма.

3.1.3. MIRU-VNTR (Supply, 2001, 2006)

Методът позволява определянето на количеството копия на тандемните повтори в 24 независими полиморфни локуси (MIRU-VNTRs, *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats*) в генома на *M. tuberculosis*. В основата на метода е електрофоретичен анализ на получените чрез PCR амплифицирани 24-MIRU-VNTR локуси след което се определя молекулното тегло на PCR-продуктите. Резултатите се отчитат чрез сравняване със стандартна таблица

за молекулно тегло и брой копия (<http://www.MIRU-VNTRplus.org>). Номеричен код показва броя на тандемните повтори, намиращи се във всеки MIRU-VNTR локус.

3.2. Определяне на мутации в гените, свързани с резистентност към основните противотуберкулозни препарати - рифампицин, изониазид, етамбутол и стрептомицин

3.2.1. Детекция на мутации в *rpoB* гена, отговорен за резистентност към рифампицин (RIF), (Morcillo, 2002; Mokrousov, 2006)

Обект на изследване е фрагмент с дължина 81bp. от *rpoB* гена (кодони 507-533). Мутации в този участък определят резистентността към RIF. Амплифицираните след PCR продукти се хибридизират с имобилизирани олигонуклеотиди, ковалентно свързани към мембрана. Детекцията на хибридизираната мембрана се осъществява чрез хемилуминисцентна реакция върху филм (Hyperfilm, Amersham). Присъствието само на 5 “див” тип профили (сигнали) е доказателство за липса на мутации в *rpoB* гена (“див” алел), докато отсъствието им и вероятната поява на сигнал с мутантна проба доказва мутация в таргетните региони (кодони 507-533) и съответно резистентност към RIF.

3.2.2. Детекция на мутации в *katG* гена и *inhA* промоторният регион, определящи резистентност към изониазид (INH), (Mokrousov, 2002, 2004)

3.2.2.1. Обект на изследване е фрагмент с дължина 200bp. от ген *katG*, който обхваща кодон 315. Мутации в този участък определят резистентността към INH. В основата на метода е електрофоретичен анализ на получените чрез PCR амплифицирани и рестрицирани продукти. Като резултат от рестрикцията се получават два вида фрагменти: единият с

дължина 132bp. за мутантен алел или резистентност към INH и друг фрагмент с дължина 153bp. за “див” тип профил.

3.2.2.2. Обект на изследване е *inhA* промоторният регион в позиции от –9 до –25. Мутации в тези позиции определят резистентността към INH. Амплифицираните след PCR продукти се хибридизират с имобилизирани олигонуклеотиди, ковалентно свързани към мембрана. Детекцията на хибридизираната мембрана се осъществява чрез хемилуминисцентна реакция върху филм (Hyperfilm, Amersham). Присъствието на единичен сигнал е доказателство за липса на мутация в *inhA* в промоторния регион в позиции от –9 до –25 т.е “див” тип, а отсъствието му и появата на “мутантен” сигнал доказателство за мутация в *inhA* в позиция – 15.

3.2.3. Мутации в *embB* гена, определящ резистентност към етамбутол (EMB), (Mokrousov, 2002)

Обект на изследване е фрагмент с дължина 118bp. от *embB* гена, който обхваща кодон 306. Мутации в този участък определят резистентността към ЕМВ. В основата на метода е електрофоретичен анализ на получените чрез PCR амплифицирани и рестрицирани продукти. Като резултат от рестрикцията се получават два вида фрагменти: единият с дължина 74bp. за мутантен алел, определящ резистентност към ЕМВ и друг с дължина под 44bp. за “див” тип профил.

3.2.4. Мутации в *rpsL* гена, определящ резистентност към стрептомицин (STR), (Victor, 1999)

Обект на изследване е фрагмент с дължина 270bp. от *rpsL* гена, който обхваща кодон 43. Мутации в този участък определят резистентността към ЕМВ. В основата на метода е електрофоретичен анализ на получените чрез PCR амплифицирани и рестрицирани продукти. Като резултат от рестрикцията се получават два вида фрагменти: единият с дължина 270bp.

за мутантен алел, определящ резистентност към STR и друг фрагмент с дължина 210bp. за “див” тип профил.

4. Компютърен анализ за статистическа обработка и построяване на дендрограми

За изчисляване молекулните тегла на получените IS6110-RFLP профили се използва компютърната програма TotalLab (Nonlinear Dynamics Ltd., UK). Кластерният анализ се извършва на база изчисление на коефициента на Dice и Average linkage analysis (UPGMA), с помощта на компютърната програма Taxotron (Grimont, 2000).

Компютърната програма PAUP 4.0 (Swofford, 2002) се използва за построяване дендрограми на MIRU-VNTR профилите, тъй като работи с точни данни и не допуска процент на грешки.

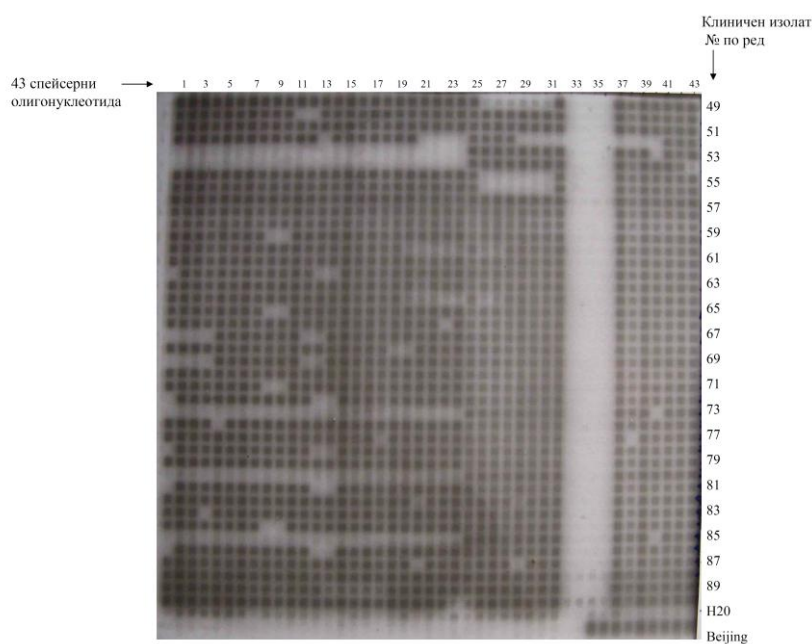
Индексът на HGI (англ., Hunter-Gaston discriminatory index, HGI) се изчислява по формула описана от Hunter (1988) за оценка на дискриминиращата способност на различните молекулярно-генетични методи и алелното разнообразие на отделните MIRU-VNTR локуси.

РЕЗУЛТАТИ

1. Определяне на генетичното разнообразие на щамове *M. tuberculosis* чрез използване на генетични маркери (DR, *IS6110* и MIRU-VNTR) и методи за генотипиране

1.1. Установяване на вариации в DR локуса - сполиготипиране

Методът сполиготипиране бе избран за начално охарактеризиране на щамовете, като целта беше да се направи първоначално групиране на изолатите на базата на сходство в техните сполигопрофили. Резултатите от сполиготипирането представляват профили, получени вследствие хибридизация с 43 спейсерни олигонуклеотида (фиг.1).



Фигура 1. Сполигопрофили на щамове *M.tuberculosis* (с номера от 49 до 89), получени вследствие хибридизация на DR-PCR продукти с 43 спейсерни олигонуклеотида, имобилизирани върху мембрана. H₂O - отрицателна контрола; щам Beijing – положителна контрола

Определени са сполигопрофилите на всички изследвани щамове и тяхната принадлежност към конкретния сполиготип и генотипно семейство съобразно международната глобална база данни в Институт Пастьор в

Въз основа на проведения анализ щамове бяха подразделени на 36 сполиготипа: 20 сполиготипа представляват единични изолати а останалите 113 изолата са групирани в 16 кластера, включващи от два до 33 щам (таблица 1).

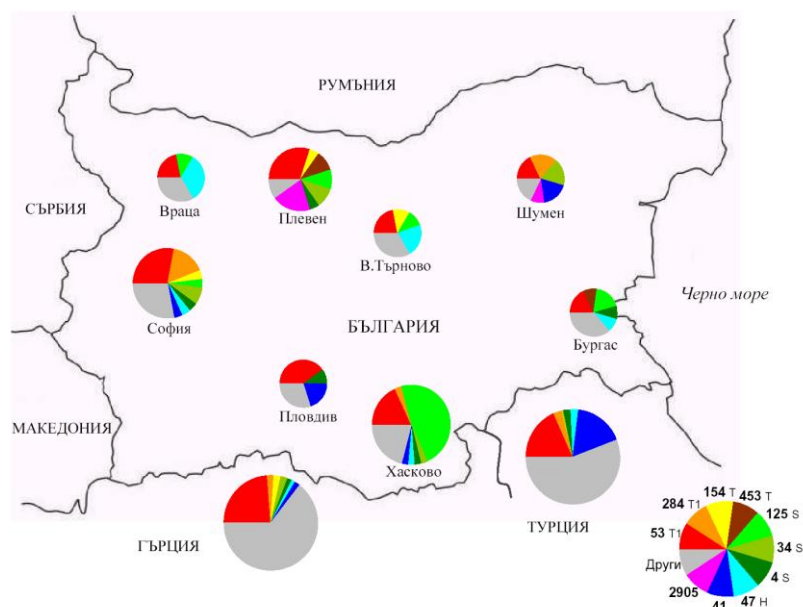
Локален номер	Спологиотип SIT/VIT2 ^a	Сполипрофили	Брой шамове ^c	Подсемејство	Разпределение по брой шамове в съседни страни			
					Румъния	Турция	Гърция	Русия
1	ST53	[Barcode]	33	T1	1	167	41	67
2	ST612	[Barcode]	1	T				
3	ST50	[Barcode]	2	H3	1	52	10	10
4	ST47	[Barcode]	7	H1	1	21	2	6
5	ST602	[Barcode]	1	U		9		1
6	Orphan*	[Barcode]	1					
7	ST44	[Barcode]	1	T5				
8	ST61	[Barcode]	1	LAM10_CAM				1
9	ST453	[Barcode]	3	T				
10	ST60	[Barcode]	1	LAM4				1
11	ST41	[Barcode]	6	LAM7_TUR	1	154	3	
12	ST40	[Barcode]	1	T4		2	2	4
13	ST1252	[Barcode]	1	T		1		1
14	ST878	[Barcode]	1	XI-VAR		3		
15	ST2906*	[Barcode]	2	U				
16	ST37	[Barcode]	2	T3		8	2	
17	Orphan*	[Barcode]	1					
18	ST2577	[Barcode]	1					
19	ST34	[Barcode]	7	S		3	4	
20	ST262	[Barcode]	1	H1-VAR		10		25
21	ST280	[Barcode]	2	T1_RUS2		2		5
22	ST144	[Barcode]	1	T				
23	ST154	[Barcode]	3	T		2	4	1
24	Orphan*	[Barcode]	1	H				
25	ST2139	[Barcode]	1	U		2		
26	ST205	[Barcode]	1	T		1		
27	Orphan*	[Barcode]	1	U				
28	ST90	[Barcode]	1	U				
29	Orphan*	[Barcode]	2	H				
30	Orphan*	[Barcode]	1	U				
31	ST2905*	[Barcode]	5	U				
32	ST284	[Barcode]	7	T1		26	4	1
33	ST1588	[Barcode]	2	LAM				
34	ST4	[Barcode]	5	LAM3 and S /convergent		22	3	2
35	ST1280	[Barcode]	1	T1_RUS2		2		5
36	ST125	[Barcode]	25	LAM/S				
Общ брой			133		14	897	172	1241

⁶ - в тази колекция от шамове

Данните показваха присъствието на два глобално разпространени сполиготипа ST53 и ST47. Особен интерес представляват 25 изолата (18.8%) от нашата колекция, принадлежащи към ST125. Според глобалната база данни (SITVIT2), ST125 принадлежи към семейство LAM (Latin American-Mediterranean) или S (Sicily). Друг интересен сполиготип е ST41, установен за 6 от българските изолата (4.5%). Според SITVIT2 той принадлежи към семейство LAM7_TUR.

Шест сполигопрофили на 7 от нашите изолата се отличаваха със своята уникалност, тъй като не бяха открити и отразени до този момент в SITVIT2. В нашето изследване те са отбелязани като нови сполиготипове. От съществено значение е да се отбележи също, че не бе открит нито един щам в българската колекция със сполиготип Beijing, който е известен с характерни свойства (лесна трансмисивност, лекарствена мултирезистентност и повишена вирулентност).

На фигура 2 е представено разпределението на циркулиращите сполиготипове по градове в България. Като общо процентното разпределение на сполиготиповете за отделните градове, преповтаря отбелязаната тенденция за цялата страна, но се отбелязват и специфични вариации за отделните области.

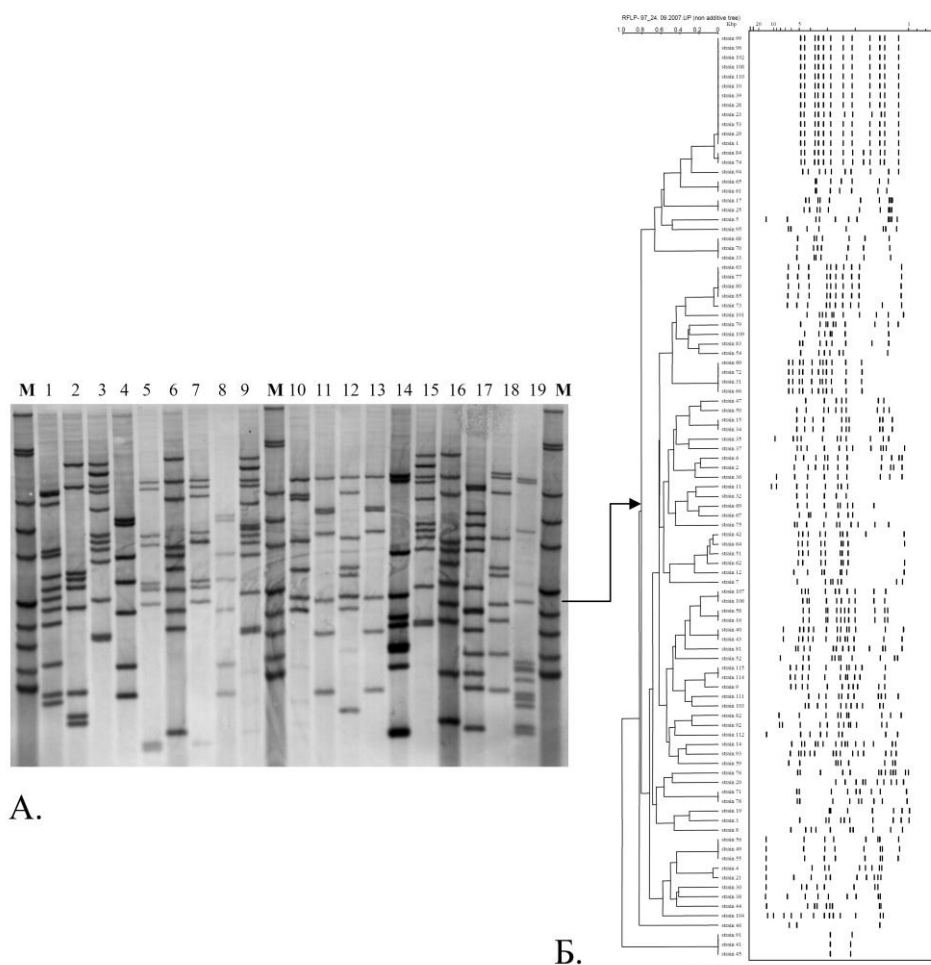


Фигура 2. Разпределение на сполиготиповете, циркулиращи в различни региони на България (размерът на диаграмите отразява броят на щамовете) и съседни страни (Гърция и Турция) по SITVIT2.

1.2. Установяване на вариации в положението и количеството на копията на инсерционната секвенция IS6110 с IS6110-RFLP фингърпринтинг

IS6110-RFLP фингърпринтингът е един от главните молекулярно-генетични методи, прилагани за щамова диференциация на *M. tuberculosis*. Предложен е като “златен” стандарт за епидемиологични проучвания. В нашето изследване IS6110-RFLP беше използван като втори основен метод за генотипиране на колекцията от щамове. Получените IS6110-RFLP профили бяха обработени с компютърните програми TotalLab за изчисление на молекулните тегла и Taxotron за построяване на дендрограми.

На фигура 3 са представени резултатите от генотипирането на 97 щама *M.tuberculosis* с IS6110-RFLP фингърпринтинг. От нея ясно се виждат обособените 15 кластери, като броят на щамовете вътре в тях варира от 2 до 12. Разграничават се 50 единични изолата. Броят на IS6110 копията варира от 2 до 15, като болшинството от изолатите съдържат 10-13 копия.



Фигура 3. IS6110-RFLP профили (фрагменти от хромозомна ДНК, съдържаща IS6110 инсерционната секвенция) на щамове *M.tuberculosis* изолирани в България. А. Оригинална снимка на Hybond⁺ мембрана с IS6110-RFLP профили на някои от щамове; М – референтен щам *M. tuberculosis* 14323 (стандартен маркер за сравнение на RFLP профили). Б. Дендрограма на IS6110-RFLP профили, показваща групирането на изолатите по сходство на IS6110-профилите.

1.3. Установяване на вариации в MIRU-VNTR локусите-генотипиране

Напоследък типирането с MIRU-VNTR придобива все по-голяма популярност поради високата дискриминираща способност на метода и разнообразието от маркери – вариабилния брой на тандемни повтори,

разпръснато локализиране в генома на *M.tuberculosis*. Методът позволява всеки изолат да бъде типизиран на базата на броя копия на повтарящите се елементи. Включването на голям брой локуси разкрива по-големите възможности на метода за изследване на геномния полиморфизъм в микобактериалната популация и надеждното му използване за епидемиологични проучвания.

Представителна извадка от 98 щамове от нашата колекция бяха изследвани по нововъведената 24-MIRU-VNTR локусова схема на Supply (2006). Резултатите са обобщени и представени на таблица 3. Броят на алелите и повторите, както и изчислените индекси на HGI за всеки VNTR локус, демонстрират дискриминиращите способности на всеки един от локусите в схемата. Данните показваха, че алелното разнообразие варира между различните MIRU-VNTR локуси. Локус MIRU24 не разграничи щамовете, тъй като показва HGI (0) и обратно локус QUB-26 е с най-големи възможности за щамово диференциране, тъй като HGI (0.827) е най-висок. Шест от локусите демонстрираха относително ниски стойности на HGI (0.106 – 0.154) а други пет - Mtub04, QUB11b, QUB26, Mtub21 и MIRU40 се оказаха най-вариабилните в нашето изследване т.е тези с най-висок HGI.

Таблица 2. Алелно разнообразие на 24 MIRU-VNTR локуси за 98 щамове от изследваната колекция, сравнени с данни от Япония, Китай и световен мащаб

Локален № на локусите	VNTR локуси	Брой алели	Брой повтори	HGI	HGI, в световен мащаб (глобална колекция) (N=494)	HGI, Япония, непринадлежащи към Beijing генотип (N=54)	HGI, Япония генотип Beijing (N=181)	HGI, Китай, генотип Beijing (N=72)
1	MIRU4	5	0-4	0.557	0.38	0.469	0.086	0.120
2	MIRU10	4	2-5	0.532	0.74	0.794	0.419	0.144
3	MIRU16	4	1-4	0.527	0.53	0.610	0.310	0.068
4	MIRU26	7	1-7	0.422	0.75	0.739	0.383	0.353
5	MIRU31	3	2-4	0.106	0.72	0.537	0.322	0.169
6	MIRU40	6	1-6	0.806	0.73	0.752	0.327	0.194
7	Mtub04	4	1-4	0.655	0.71	0.471	0.459	0.306
8	Mtub21	5	1-5	0.669	0.76	0.599	0.393	0.556
9	Mtub30	4	1-4	0.430	0.62	0.580	0.403	0.068
10	Mtub39	5	2-6	0.465	0.69	0.735	0.186	0.171
11	ETR-A	4	1-4	0.554	0.75	0.554	0.147	0.232
12	ETR-C	4	2-5	0.419	0.69	0.230	0.022	0.094
13	QUB-11b	7	1-7	0.773	0.82	0.748	0.772	0.651
14	QUB-26	9	2-10	0.827	0.84	0.798	0.741	0.518
15	QUB-4156	5	0-4	0.447	0.67	0.665	0.611	0.395
16	MIRU2	3	1-3	0.249	0.16	0.105	0	0
17	MIRU20	2	1-2	0.129	0.30	0.226	0.022	0.014
18	MIRU23	5	3-8	0.399	0.65	0.597	0.176	0.014
19	MIRU24	1	1	0	0.35	0.105	0	0
20	MIRU27	3	1-4	0.106	0.25	0.036	0.115	0.014
21	MIRU39	2	1-2	0.153	0.45	0.497	0.221	0.119
22	ETR-B	3	1-3	0.106	0.44	0.370	0.033	0.014
23	Mtub29	4	2-5	0.204	0.48	0.262	0.043	0.119
24	Mtub34	3	2-4	0.154	0.27	0.036	0.065	0.014
Средна стойност HGI				0.404	0.573	0.480	0.260	0.181

15 дискриминирани локуси

9 допълнителни локуси

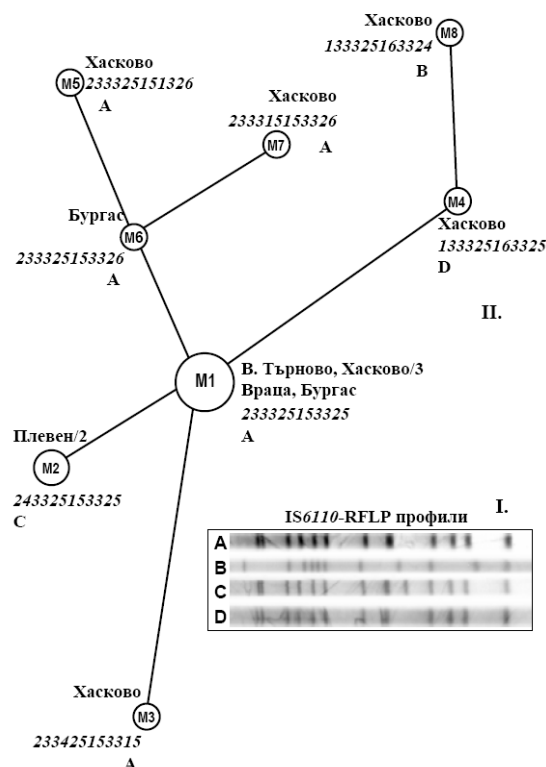
1.4. Сравнителен геномен анализ на щамове *M. tuberculosis* чрез използване комбинации от молекулярно-епидемиологични маркери и методи за типирание

С цел по-детайлно охарактеризиране на популационната структура на включените в нашето изследване щамове *M. tuberculosis*, в следващия етап от проучването бе извършен сравнителен геномен анализ чрез използване на комбинации от молекулярно-епидемиологични маркери и три от най-важните молекулярно-генетични метода за генотипиране (IS6110-RFLP, сполитипиране и MIRU-VNTR).

Особен интерес представлява сполиготип ST125, който присъства в 19 % в нашата колекция и до момента не се открива в никоя от съседните на България страни.

Анализът на който бяха подложени щамове от сполиготип ST125 с комбинирано използване на RFLP и 12-MIRU, показва любопитно разпределение и подреждане на изолатите от различните градове по сходство, очертаващо филогенетичните връзки помежду им.

Фигура 4 показва схема за филогенетичните връзки между подразделените с 12-MIRU осем варианта (M1-M8) на изследваните общо 14 щамове от сполиготип ST125. Както се вижда от фигурата, 10 от изолатите показват еднотипен IS6110 профил с 12 копия, обозначени като А, докато три други варианта (В, С, D), представени от един или два щамове, варират с по едно или две IS6110 копия (фиг.4I). Интерес представлява наблюдението, че два щамове с уникални IS6110 профили D и В показаха също и уникални MIRU профили - M4 и M8 (фиг. 4II). Останалите 10 щамове с идентични IS6110-RFLP профили, обозначени като А, бяха подразделени от 12-MIRU схемата в пет типа (M1, M3, M5, M6, и M7). M1 включва кластер от 6 еднакви щамове, а четири щамове се различават с уникални профили -M3, M5, M6 и M7. Изчислен бе $HGI_{MIRU} = 0.83$, който бе по-висок от $HGI_{IS6110} = 0.39$ за щамове от ST125, което потвърди по-добрата дискриминираща способност на 12 локусовата MIRU-VNTR схема в сравнение с IS6110-RFLP.



Фигура 4. (I) RFLP профили на щамове от сполиготип ST125 с различни IS6110 копия, означени с букви от А до D; (II). Дендрограма на 12-MIRU локусова схема за щамовете от сполиготип ST125. Всяко кръгче, възел или тип е описан с локален MIRU номер вътре в кръгчето, град на изолиране на щам и брой щамове (ако е повече от един). Размерът на кръгчетата е пропорционален на броя на щамовете, съответстващи на MIRU профила.

В следващите ни изследвания обект на сравнителен анализ бяха вариациите в популационната структура и връзките между установените вече генотипове на *M.tuberculosis*, циркулиращи в различни региони на България. За целта бяха използвани едновременно и трите молекулярно-генетични метода (IS6110-RFLP, сполиготипиране и MIRU-VNTR), а изследването беше извършено с подбрани 73 щам (фиг.5).

На фигура 5 ясно са обособени дванадесет IS6110-RFLP кластера (обозначени с римски цифри от I до XII). Повечето от тях бяха изцяло или

частично подразделени от 24-MIRU-VNTR метода. Маркираните MIRU-VNTR профили отразяват алелното разнообразие на всеки отделен локус вътре в IS6110-RFLP кластерите. Единствено в кластер II нямаше никакво подразделяне нито по IS6110-RFLP, нито по сполиготипиране или 24-MIRU-VNTR.

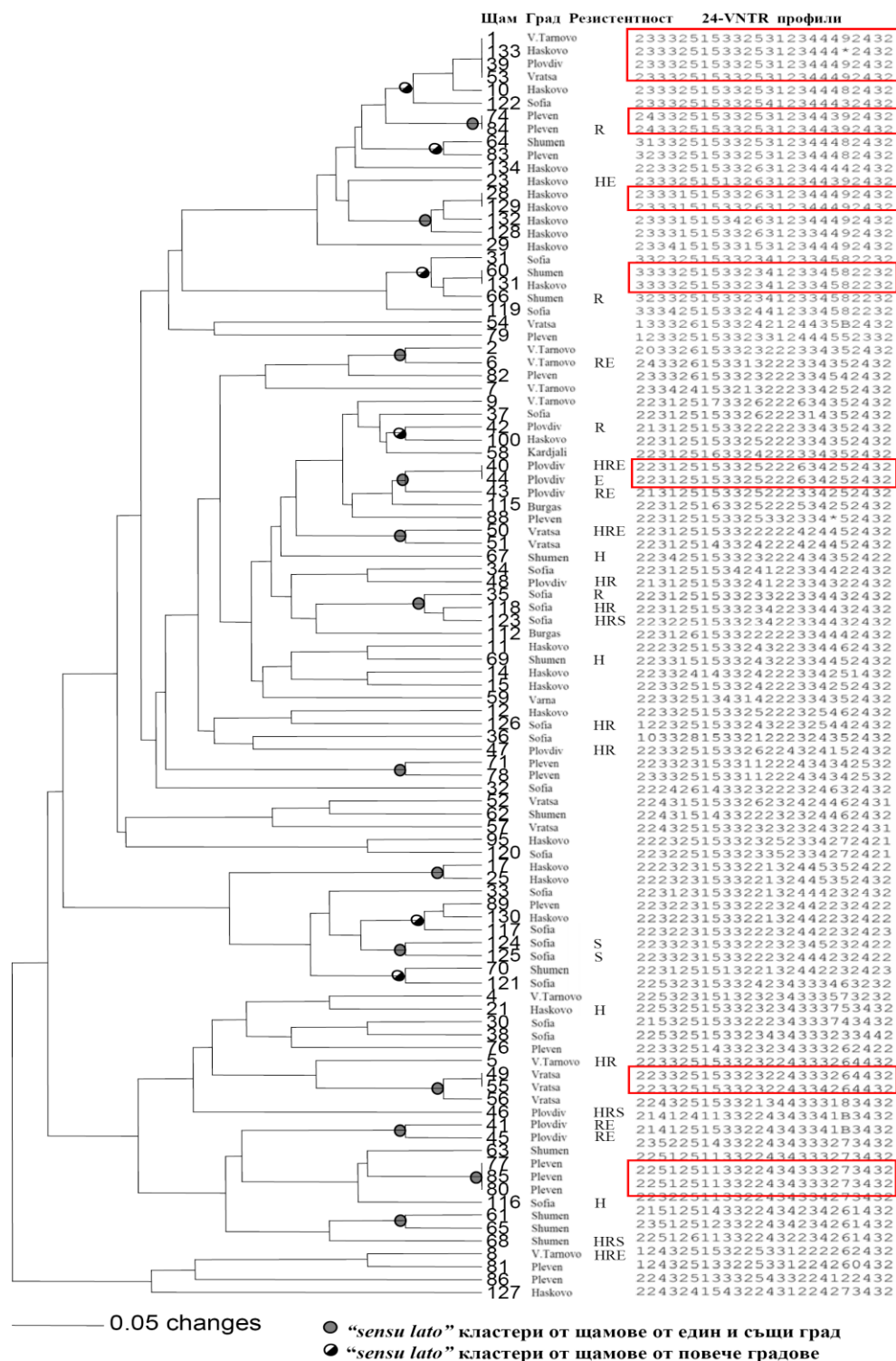
Трябва да отбележим, че при прилагането на 24-MIRU-VNTR локусовата схема и по-точното подразделяне на изолатите в някои от кластерите се получи интересна информация относно взаимовръзките между щамове на ниво град. Например IS6110-кластер IV (ST2905) се подраздели от 24-MIRU-VNTR на три щамове от Плевен с еднакви RFLP и MIRU-VNTR профили и един щам от Шумен, който се различаваше от тях в три от MIRU-VNTR локусите.

Друг вид анализ ни даде възможност да оценим трансмисията на щамове в съответните градове по “вертикална” линия, т.е. между близкородствени лица в семейства от една страна, и от друга - по “хоризонтална” линия, в резултат на миграция на хора между градовете.

За целта направихме сравнителна дендрограма, построена на база на 24-локусов VNTR метод на 98 щамове с добавена информация за град на изолиране на щамове. (фиг.6).

Построената от нас дендрограма ни дава възможност да формулираме кластери “*sensu lato*” (щамове, различаващи се в един или два VNTR локуса), отразяващи клонална еволюция във времето и кластери “*sensu stricto*” (щамове с идентични 24-локусови профили), показващи сходство на щамове на базата на “скорошна” трансмисия. Така се оформиха 7 “*sensu stricto*” и 19 “*sensu lato*” кластери.

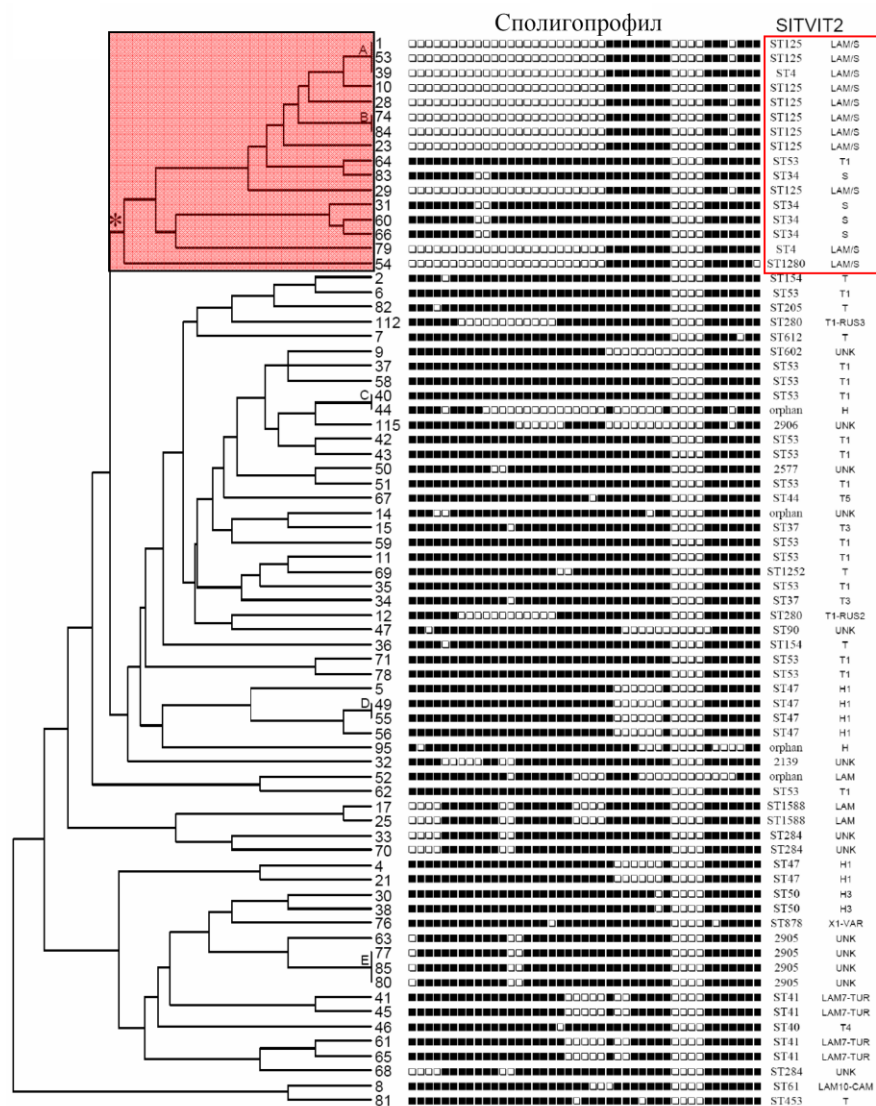
При сравнение на “*sensu lato*” кластерите по град на изолация се установи, че 13 от тях включват щамове от един и същи град, докато 6 съдържат щамове от повече градове. Оформените кластери от един и същи град отразяват фамилна/близкородствена трансмисия, която е ограничена за определен географски район. Обратно, оформените кластери от повече от един град отразяват „хоризонтална” трансмисия поради движението на хората между градовете. Тъй като, първият случай е по-често срещан в България, то локалната циркулация на клонове е по-съществен фактор, който трябва да се отчита при молекулярно-епидемиологичните изследвания на туберкулозата в България.



Фигура 6. UPGMA дендрограма на 98 от изследваните *M. tuberculosis* шамове, показваща групирането на изолатите по 24-MIRU-VNTR. Добавени са градовете на изолация на съответните шамове както и техните 24 VNTR профили.

Друг аспект на нашите изследвания беше изясняване на филогенетичния произход на българските щамове, принадлежащи към специфични генетични семейства (сполигосемейства), характерни за географската област, където най-често се срещат. Едно от най-разпространените сполигосемейства, към което принадлежат и някои от българските щамове е LAM/S (Latin American-Mediterranean/Sicily). Във връзка с това ние анализирахме някои от идентифицираните в нашата колекция LAM/S –сполитотипове (ST4, ST125, ST1280) и прецизирахме тяхната принадлежност към съответните генетични семейства.

С допълнителното приложение на наскоро разработения PCR метод на Marais (2006) - LAM-специфична PCR за определяне на IS6110-секвенцията, специфично разположена в генома на щамове *M.tuberculosis* от генетично сполигосемейство LAM ние доказахме, че тези сполитотипове (ST4, ST125, ST1280) нямат специфичната за LAM семейство IS6110 секвенция и затова не принадлежат към семейство LAM. От друга страна, на базата на сходство, установено с помощта на сравнителен анализ с 24-MIRU-VNTR локусовата схема, щамове от тези три сполитотипа бяха групирани близо и заедно със сполитотип ST34 (принадлежащ към семейство S) с което бе доказана тяхната принадлежност към семейство S(Sicily), (фиг.7).



Фигура 7. UPGMA дендрограма на 98 от изследваните *M. tuberculosis* щамове, показваща групирането на изолатите по 24-MIRU-VNTR и сравнена с техните сполито-профили и семейства. С букви са посочени обособените кластери. С правоъгълници са обозначени щамове, принадлежащи към сполитотипове ST4, ST34, ST125 и ST1280.

1.5. Приложение на нова схема за MIRU-VNTR типирание на изолирани в България щамове *M. tuberculosis*

Както се вижда от предходните ни експерименти, типирание на щамове *M. tuberculosis* с MIRU-VNTR се оказва най-ефективно, поради демонстрираната висока дискриминираща способност на метода в

сравнение с използваните други два метода (IS6110-RFLP и сполиготипиране). В най-новата 24-MIRU-VNTR схема на Supply (2006) се използва комбинация от голям брой локуси (24 локуса), което я определя като силно дискриминиращ метод за щамово диференциране. Но от друга страна приложението в практиката на тази мулти-локусова схема се оказва доста трудоемко, изисква повече време и средства. Във връзка с това ние решихме да приложим комбинация от пет локуса (MIRU40, Mtub04, Mtub21, QUB-11b, QUB-26), показали най-висока дискриминираща способност за диференциране на нашите щамове. За тази редуцирана схема направихме дендрограма и беше изчислен HGI, който показва сравнително висока стойност от 0.984. Получените резултати ни дадоха основание да смятаме, че предложената от нас 5-MIRU-VNTR локусова схема дава относително добра дискриминация за изследваните от нас щамове. Това стана ясно от сравнението на дискриминиращата способност на различните молекулярни методи (сполиготипиране, IS6110-RFLP и различните MIRU-VNTR локусови схеми), (таблица 3).

Сполиготипирането се оказва метод с най-ниска дискриминиращата способност, тъй като подраздели щамовете на 13 кластери и 18 единични изолата. Броят на изолатите в отделните кластери варираше от 2 до 14, а общо кластеризираните изолати бяха 55. HGI показва стойност от 0.939. IS6110- фингърпринтингът подраздели щамовете на 39 единични типа и 12 кластери с размер на кластера от 2 до 7 щамов, общо 51 типа. Броят на IS6110-копията варираше между 2 и 13 копия на профил (фиг.5, таблица 3).

Използването на пълния набор от 24-MIRU-VNTR локуси се отличи с най-висока дискриминираща способност, като подраздели щамовете на 81 единични и 7 кластеризирани изолата (HGI-0.997). За разлика от 15-MIRU-VNTR и другите методи като IS6110-RFLP и сполиготипиране, с приложението на 24-MIRU-VNTR бяха разграничени кластеризираните

щамове с номера 17 и 25 по вариации в броя на копията в локус Mtub34 (2 копия за щам с номер 17 и 3 копия за щам 25).

И накрая комбинацията от 5 най-полиморфни локуса демонстрира сравнително добра дискриминираща способност по-висока от двата основни метода сполиготипиране и IS6110-RFLP.

Таблица 3. Оценка на дискриминиращата способност на различните комбинации от методи за 73 щама *M.tuberculosis*;

*12-, 15-, 24-MIRU-VNTR локуси, съответстващи на предложените от Supply (2001; 2006); 5-MIRU-VNTR локуси включват най-полиморфните локуси на база вариации в броя на алелите и изчислените HGI в изследваната колекция от щамове: MIRU40, Mtub04, Mtub21, QUB-11b, QUB-26

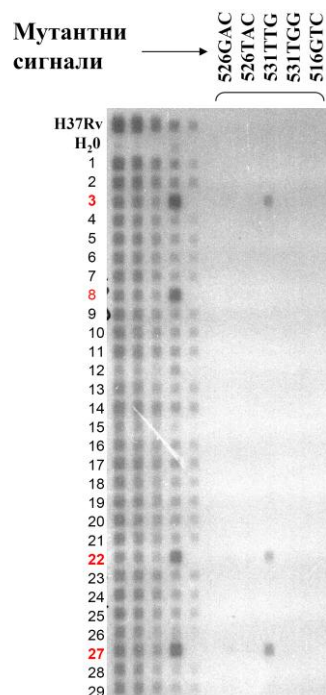
Метод*	Брой типове	Брой единични изолати	Брой кластеризирани изолати	Брой кластери	Размер на кластерите	HGI
24 MIRU-VNTR	64	61	12	5	2-3	0.997
15 MIRU-VNTR	65	59	14	6	2-3	0.996
12 MIRU-VNTR	62	55	18	7	2-4	0.994
5 MIRU-VNTR	45	28	45	17	2-4	0.984
IS6110-RFLP	51	39	34	12	2-7	0.983
Сполиготипиране	31	18	55	13	2-14	0.939

2. Определяне на мутации в гените, свързани с резистентност към основните противотуберкулозни препарати (RIF, INH, EMB, STR)

2.1. Мутации в *rpoB* гена в кодони 507-533, определящи резистентност към рифампицин (RIF)

Въз основа на проведения генетичен анализ на кодони 507-533 в *rpoB* гена, мутации бяха установени в 20 от 27 RIF резистентни щамове. Седемнадесет от тях имаха мутация в кодон 531 (TCG→TTG), десет от които са мултирезистентни (MDR). Два щамове са с мутация в кодон 526 (CAC→GAC), а един с мутация, засягаща кодони 530-534. В останалите 7 RIF-резистентни и всички 106 RIF-чувствителни щамове не се откриха мутации в кодони 507-533 на *rpoB* гена. Използваният метод показва стойности за чувствителност - 74.1% и за специфичност - 100%.

На фигура 8 са представени профилите, получени вследствие на хибридизация. Присъствието на пет типични сигнали без сигнали за мутантни проби беше доказателство за “див” тип профил на *rpoB* гена, а отсъствието им и присъствието на мутантни сигнали беше индикация за настъпила мутация в тези участъци и съответно придобита резистентност към RIF.

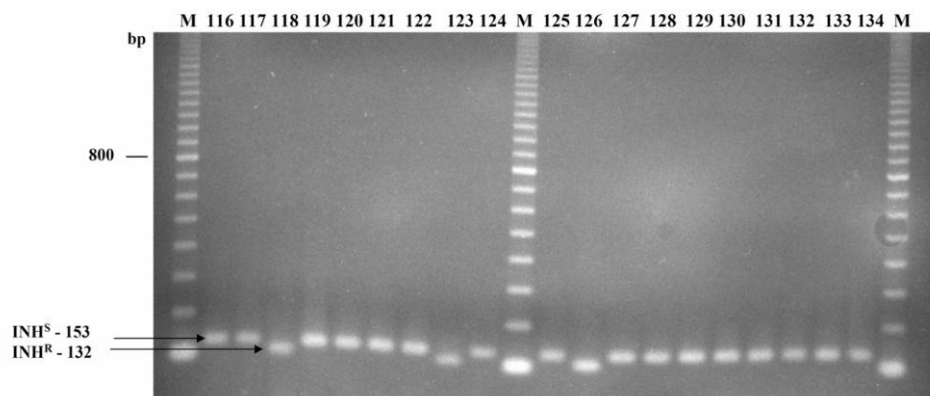


Фигура 8. Профили на щамове *M.tuberculosis*, получени вследствие на хибридизация. Щамове № 3, 22 и 27 с мутации TTG в кодон 531, а щам № 8- с мутация в кодони 530-534. H₂O-отрицателна контрола; H37Rv-положителна контрола – “див” тип профил.

2.2. Мутации в *katG* гена в кодон 315 и *inhA* промоторния регион в позиции от – 9 до – 25, определящи резистентност към изониазид (INH)

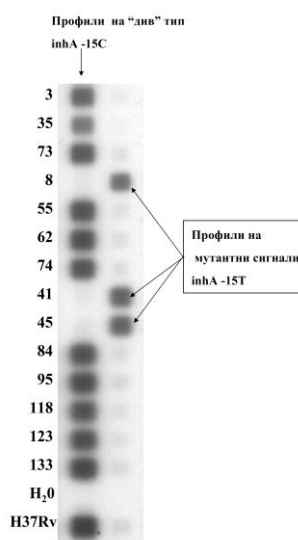
Детекцията на мутации в кодон 315 на *katG* гена, които водят до резистентност към INH показва, че в 10 от общо 22 INH-резистентни щамове имаше AGC→ACC мутация. В останалите 110 INH -чувствителни щамове не се откриха мутации в *katG* S315T (AGC>ACC), (фиг. 9).

Чувствителността на използваните генетични методи за определяне на резистентност към INH беше 45.5%, а специфичността - 99.1% .



Фигура 9. Агарозна гел електрофореза, показваща PCR-продуктите на рестрикция с *HpaII* на *katG315* гена; Щамове №118, 123, 126 с дължина на фрагмента 153bp., съответстващ на мутантен алел (резистентност към изониазид), а останалите щамове с дължина на фрагмента 132bp., съответстващ на “див” тип профил (чувствителност към изониазид). М-маркер на молекулните тегла “100 bp. DNA ladder”.

Беше направен анализ и на *inhA* промоторния регион, който показва, че четири щамове имаха мутация в този регион в позиция –15C>T (фиг.10).

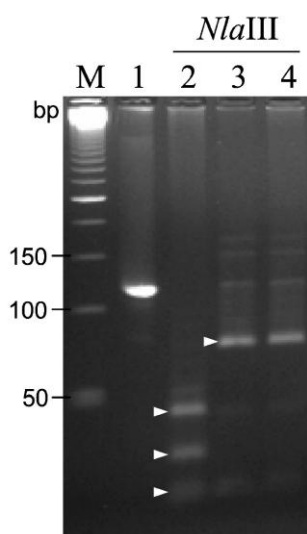


Фигура 10. Профили на щамове *M.tuberculosis*, получени вследствие на хибридизация. Щамове № 8, 41 и 45 с мутации *inhA* – 15T; H₂O-отрицателна контрола; H37Rv-положителна контрола – “див” тип профил.

2.3. Мутации в *embV* гена в кодон 306, определящи резистентност към етамбутол (ЕМВ)

Мутации в *embV* гена в кодон 306, които водят до резистентност към ЕМВ, бяха открити в 7 от 11 ЕМВ-резистентни щама. В останалите ЕМВ - чувствителни щама не се откриха мутации (фиг. 11).

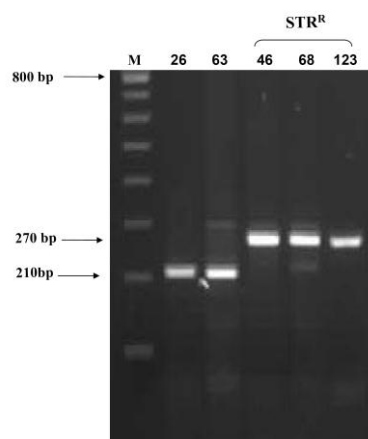
Генетичният анализ за определяне на резистентност към ЕМВ показва 63.6% за чувствителност на метода и 100% за специфичността му.



Фигура 11. Агарозна гел електрофореза, показваща PCR продуктите на амплифициран 118bp. *embV306* фрагмент; Линия 1 – не рестрициран PCR продукт (118 bp); Линия 2 – щам с “див” тип профил (ATG) с дължина 22, 30, и 44bp; Линии 3 и 4 – щамове с мутантни алели с дължина 74bp.; М-маркер на молкулните тегла “50 bp DNA ladder”.

2.4. Мутации в *rpsL* гена в кодон 43, определящи резистентност към стрептомицин (STR)

Мутации в *rpsL* гена в кодон 43, които водят до резистентност към STR, бяха открити в 4 от 6 STR-фенотипно резистентни щама. В останалите STR -чувствителни щама не се откриха мутации в *rpsL* 43 (фиг. 12).



Фигура 12. Агарозна гел електрофореза, показваща PCR продуктите на амплифициран 270bp. *rpsL43* фрагмент; Щамове № 46, 68 и 123 с дължина на фрагмента 270bp., съответстващ на мутантен алел (резистентност към стрептомицин), а останалите два – 26 и 63 - 210bp., съответстващ на “див” тип профил (чувствителност към стрептомицин); М-маркер на молекулните тегла “100 bp DNA ladder”.

2.5. Комплексен анализ на лекарствената устойчивост - моно, - поли и мулти - резистентност

Всички включени в проучването щамове на *M.tuberculosis*, изолирани от различни региони в България, бяха изследвани за фенотипна чувствителност/резистентност към рифампицин (RIF), изониазид (INH), етамбутол (EMB) и стрептомицин (STR). Обобщените данни са представени на таблица 4. От нея ясно се виждат, че 96 от щамове бяха напълно чувствителни а 37 резистентни. Резултатите показаха, че монорезистентност проявиха 40.5% (15/37) от изолатите, като повечето от тях към RIF (7/15) и INH (5/15). Шестнадесет (12%) бяха резистентни едновременно към основните противотуберкулозни препарати- RIF и INH, което ги класифицира като мултирезистентни (MDR) щамове. Общо седем (5.3%) щамове бяха резистентни към три противотуберкулозни средства. Полирезистентност, проявиха шест щамове, четири от които към RIF и EMB. Подробно са представени и броя на установените мутации в различните

гени, отговорни за придобиване на резистентност към четирите противотуберкулозни лекарства.

На таблица 5 е представено разпределението на резистентните щамове по сполиготипове. Сравнението на данните показва разнообразие на сполиготиповете с преобладаване на ST53 и ST125. Единадесет от 33 щама, принадлежащи към ST53 са резистентни, а шест - MDR. Интересното е, че само три от 25 щама принадлежащи към ST125 са резистентни, но нито един от тях MDR. Трябва да отбележим, че голяма част от 16-те MDR щамове принадлежат към изолатите с единични сполиготипове (7/16).

Таблица 4. Профили на резистентността на 133 щама *M. tuberculosis*; * Няма налична информация за три RIF + INH щама за *inhA* и *embB306* мутациите.

Профил на резистентността	Препарати	Брой изолати по фенотип (%)	Рифампицин (RIF) кодони 507-533			Изониазид (INH)		Етамбутол (EMB)	Стрептомицин (STR)
			<i>rpoB</i> 531 TCG>TTG	<i>rpoB</i> 526 CAC>TAC	<i>rpoB</i> 530- 534	<i>katG</i> 315 AGC>ACC	<i>inhA</i> -15C>T	<i>embB</i> 306 ATG> CATG	<i>rpsL</i> 43 AAG>AGG
Мултирезистентност (MDR)	RIF+INH*	9 (6.8%)	6			4	0	0	
	RIF+INH +EMB	4 (3.0%)	2		1	2	1	3	
	RIF+INH + STR	3 (2.2%)	2			2			2
Полирезистентност (но не и MDR)	RIF+EMB	4 (3.0%)	3			1	2	3	
	INH +EMB	1 (0.8%)							
	EMB +STR	1 (0.8%)							1
Монорезистентност	RIF	7 (5.3%)	4	2			1		
	INH	5 (3.7%)				2			
	EMB	1 (0.8%)						1	
	STR	2 (1.5%)							1
Чувствителни		96 (72.2%)							

Таблица 5. Разпределение на резистентните щамове по сполиготипове.* Броя на щамове в таблицата не отговаря на общия брой щамове в колекцията (n=133). Дадени са само по-големите сполиготипове, включващи повече от два щама както и единичните сполиготипове

Сполиготип	Брой щамове*		
	Всички	Резистентни	MDR
ST125	25	3	0
ST154	3	0	0
ST2905	5	1	0
ST284	7	3	1
ST34	7	1	0
ST4	5	0	0
ST41	6	3	0
ST453	3	1	1
ST47	7	2	1
ST53	33	11	6
Единични	20	11	7

ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Туберкулозата (ТБ) остава важен здравен проблем за България. Броят на новооткритите случаи се е увеличил до 42/100,000 през 2004г., но през следващите 2005г. и 2006г. се очертава тенденция на задържане (40/100,000 и 39/100,000) и постепенно намаляване през 2007г.-37/100,000. България е разположена в регион с контрастираща епидемиологична ситуация по отношение разпространението на туберкулоза. Докато заболяемостта от ТБ в южната съседка Гърция е 6.9/100,000 през 2005, то в Румъния и Турция е значително по-висока и достига стойности от 135.2/100,000 за Румъния и 28.1/100,000 за Турция (Euro TB, 2007).

Проследяването на популационната динамика на *M.tuberculosis*, разнообразието от генотипове и разпространението им в България и съседните страни заемат важно място в съвременните епидемиологични проучвания на туберкулозата в региона. Разработените в последните години авангардни молекулярно-генетичните методи намират приложение за типизиране на микобактериални щамове и изследване на вътревидовата популационна структура на *M.tuberculosis*. Диференцирането на голям брой изолати от различни източници дава полезна информация за определяне нивото на сходство помежду им и оформяне на специфични “клонове” от генетично подобни щамове. Откриването на групи от бактериални изолати със сходен тип и общ произход по време и място, би могло да даде ранен сигнал (“ранно предупреждение”) за потенциални епидемични взривове. Въвеждането на молекулярно-генетичните маркери и методи за щамово генотипиране на *M.tuberculosis* постави началото на нов подход за проследяване трансмисията, еволюцията и филогенетиката на микобактериите и за осъществяване на ефективен епидемиологичен надзор на туберкулозата (Kremer, 1999, Kwara, 2003).

Липсата на сведения за популационната структура и разпространението на различни генотипове на *Mycobacterium tuberculosis* на територията на България, както и на информация за честотата и спектъра на мутациите свързани с лекарствената резистентност наложиха необходимостта от настоящото проучване. Обект на изследването бяха молекулярно-генетичните характеристики на щамове *M.tuberculosis* изолирани от различни области в България, с цел определяне на циркулиращите генотипове и установяване на молекулярно-епидемиологичните връзки помежду им. Щамовата диференциация, извършихме с подбрани три основни метода, доказали своята висока дискриминираща способност, възпроизводимост и специфичност за типизиране на изолати на *M. tuberculosis*: сполиготипиране, IS6110-RFLP и MIRU-VNTR. Анализирахме

получените поотделно за всеки метод и в различни комбинации резултати, с оглед да получим максимално детайлна информация относно щамовото разнообразие на *M. tuberculosis* и да направим правилен подбор на оптимизирана схема за молекулярно епидемиологично типичане на изолатите в България.

Сполиготипирането беше избран като метод за начално охарактеризиране на щамовете, поради относително лесното му техническо изпълнение и възможността за интерпретиране на резултатите и сравняването им с международната базаданни SITVIT2, поддържана в Институт Пастър в Гваделупа. Изолатите бяха първоначално групирани на базата на сходство в техните спוליгопрофили. Изследваните 133 щама бяха разпределени в 36 сполитотипа. Голям процент (24.8%) от тях принадлежаха към ST53 (табл.1; фиг.2). Този глобално разпространен сполитотип представлява 6% от общия брой изолати по света според глобалната база данни SITVIT2. Информация за наличието му в съседните ни по географско разположение страни – Турция, Гърция и Румъния и в исторически свързаната със страната ни в миналото Русия, показва подобен процент на разпространение на ST53 в Турция (18.6%) и Гърция (23.8%) и доста по-нисък в Русия (5.4%) и Румъния (7.1%).

Другите най-често срещани сполитотипове в нашата колекция бяха ST47, ST41 и ST125. Сполитотип ST41 принадлежи към подсемейство LAM7_TUR и се определя като филогеографски специфичен за Турция поради присъствието му там в голям процент (154 щама от общо 897 щама) и същевременно рядкото му откриване в Гърция и Румъния (Zozio, 2005). Интересно е да отбележим, че “турският” сполитотип ST41 се открива в нашата колекция сред изолатите от Пловдив (2 щама), Шумен (2 щама), Хасково (1 щам) и София (1 щам). На базата на сравнение на MIRU- и IS6110-RFLP профилите на изолатите от ST41, открити в България и

Турция, могат да се очертаят връзки от еволюционен аспект между щамовете.

Особен интерес представлява сполиготип ST125, който присъства в 18.8% в нашата колекция и до момента не се открива в никоя от съседните на България страни което показва, че той циркулира за момента само на територията на България (фиг.2). Анализът на който бяха подложени щамовете от този сполиготип с комбинирано използване на IS6110-RFLP и 12-MIRU-VNTR локусовата схема, показва любопитно разпределение и подреждане на изолатите от различните градове по сходство, очертаващо филогенетичните връзки помежду им (фиг.4). Филогенетичното дърво, построено на базата на 12-MIRU типизирането, показва, че повечето щамове от ST125 се откриват в централната част на схемата (предоминиращ централен M1-MIRU тип). Предполага се, че съществуването на този MIRU-профил във времето е предшествовало останалите генотипове, като на него би могла да се отреди т.нар. “прародителска” позиция. В крайна сметка, филогенетичното дърво демонстрира от една страна относително далечно във времето присъствие на ST125 в България, и от друга неговото по-широко разпространение в днешно време. Голямото разклонение в разнообразни 12-MIRU профили предполага дълготрайна еволюция на сполиготип ST125 в България. Значителният процент на разпространение на ST125 в България (табл.1; фиг.2) и слабото му присъствие в други страни по света, както и отсъствието му в съседните ни държави според глобалната база данни SITVIT2, ни карат да предположим, че този сполиготип е филогеографски специфичен за страната ни.

От съществено значение е да се отбележи също, че в настоящото изследване не бе открит нито един щам изолиран в България и принадлежащ към сполиготип Beijing, който е широко разпространен в Русия и страните от Азия и е известен с мултирезистентните си

характеристики. Очевидно този сполиготип все още не е достигнал страната ни.

Типирането на изолираните от нас щамове на *M.tuberculosis* с 24-MIRU-VNTR локусовата схема се оказва от особен интерес, тъй като проучването засяга хетерогенна популация на *M.tuberculosis*, циркулираща на територията на една страна (България) с население без значима миграция на хора отвън.

Обект на дискусия в нашето изследване беше вариабилността, респективно различните нива на дискриминираща способност на всеки един от 24-те MIRU-VNTR локуса включени в различните MIRU-VNTR схеми (табл.2). За отбелязване е, че само един от локусите (MIRU-24) показва мономорфност. Смята се, че MIRU-24 локусът е относително филогенетично консервативен. Той е останал непроменен в еволюцията на *M.tuberculosis*, т.е. при формирането на съвременните “модерни” клонове (1 копие в локус MIRU24) от техните “древни” предшественици (2 или 3 копия в локус MIRU24). Поради това този локус намира приложение за разделяне на циркулиращите днес щамове и определянето им като “древен” или “модерен” тип (Sun, 2004).

Оценявайки възможностите на различните MIRU-VNTR локуси в различни комбинации, ние установихме, че допълването на 12-MIRU локусовата схема с избрани локуси от 15-MIRU-VNTR подобри дискриминацията на щамове чрез значително намаляване броя на кластерите и кластеризирани изолати (табл. 3).

Подобно на установения от нас полиморфизъм в отделните MIRU-VNTR локуси на щамове *M.tuberculosis* изолирани в България (табл. 2), Supply (2006) наблюдават същото голямо разнообразие в глобални колекции от щамове. Независимо от това, ние отбелязахме някои особености характерни и за българските щамове. Локусите които са най-полиморфни в България са също така и най-полиморфните локуси в други

машабни световни колекции (Supply, 2006). В същото време, някои глобално вариабилни локуси бяха слабо полиморфни в нашата колекция от щамове - напр. локус MIRU-31. Въпреки това, като цяло средната стойност на HGI за нашата колекция е приблизително близка с тази на големите колекции (ср. с-ст. $HGI_{Б-я} = 0.404$ / ср. с-ст. $HGI_{глобално} = 0.573$).

Във връзка с това предложената от нас комбинация от петте най-полиморфни локуси (MIRU-40, Mtub-04, Mtub-21, QUB-11b и QUB-26) с достатъчно висока дискриминираща способност се оказва рационална като редуцирана схема за първоначално типизиране на щамове *M. tuberculosis*, циркулиращи в България.

Съчетанието на MIRU-VNTR със IS6110-RFLP ни позволи да направим по-прецизно проследяване на локалните клонове на ниво град. За пример, IS6110-кластер IV от фигура 5 (сполиготип ST2905) беше подразделен от MIRU-VNTR както следва: три щамове от Плевен имаха идентични профили, а щам от Шумен се различаваше от тях в два локуса (MIRU-4 и MIRU-16).

Един от сериозните проблеми, заплашващи ефективността на химиотерапията и контрола на туберкулозата е нарастващият брой на случаи с множествена лекарствена резистентност (MDR-TB) (WHO, 2008). Преждевременното спиране на лечението и неправилната терапия са възможни предпоставки за селекция на спонтанни мутации и възникване на лекарствена резистентност към различни противотуберкулозни препарати. Затова и ранното откриване на резистентността към основните противотуберкулозни препарати, правилната и бърза детекция на резистентни щамове е необходимо условие за ефикасна химиотерапия и съставлява важен приоритет за контрола върху разпространението на мултирезистентни щамове (Balabanova, 2006).

По данни на СЗО през 2006г. процентът на случаи с MDR-TB сред новорегистрираните туберкулозни пациенти в България е тревожно висок

10.7%, в сравнение с относително ниските стойности отбелязани за съседните страни (Румъния-2.8%, Турция-1.4%, Гърция-1.1%, Македония-1.6% и Сърбия-0.4%) (WHO, 2008; Euro TB, 2008).

В нашето изследване бе установено, че процентът на MDR- щамове е 12% от общо изследваните щамове. Този процент е доста близък до данните обявени за страната ни от СЗО (НЦЗИ, 2007; WHO, 2008), което подкрепя представителността на извадката от изолати за обективното отразяване на разпространението на генни мутации, свързани с резистентността към противотуберкулозните препарати в България.

Използваните от нас молекулярни методи показаха висока специфичност и относително добра чувствителност при детекцията на мутации, обуславящи резистентността към рифампицин (RIF), етамбутол (EMB), изониазид (INH) и стрептомицин (STR).

По отношение на мутациите, свързани с резистентността към RIF най-висок процент бе отбелязан за мутация в *rpoB* S531L (TCG>TTG) сред изследваните от нас щамове (табл.4).

Особен интерес представлява фактът, че сред нашите изолати, не бяха открити щамове от Beijing генотип, така че високият процент на *rpoB* S531L мутацията, установен в нашето изследване не би могъл да се обясни със популационната структура на *M. tuberculosis* в България.

Друг вид мутация в генома на *M. tuberculosis*, обуславяща резистентност към етамбутола, е мутацията в *embB306* гена. В изследваната от нас популация, тази мутация бе открита в 7 изолата, от които 6 бяха резистентни към повече от един противотуберкулозен препарат и само един беше монорезистентен.

Две от най-често обсъжданите мутации, свързани с резистентността към изониазида (INH)- *katG* 315AGC>ACC и *inhA* -15C>T (Baker, 2005; Guo, 2006; Nikolayevskyy, 2007) бяха обект и на нашите изследвания.

В нашата колекция *katG* 315AGC>ACC и *inhA* -15C>T бяха открити в нисък процент INH-резистентни щамове. Само 10 от 22 INH-резистентни изолата имаха тези две мутации. *inhA* мутация бе открита само в един INH-резистентен щам, който също така имаше и *katG* 315 мутация. Другите три щамове с *inhA* мутация бяха INH-чувствителни.

Друг вид мутация в генома на *M. tuberculosis*, обуславяща резистентност към етамбутола, е мутацията в *embB306* гена. В изследваната от нас популация, тази мутация бе открита в 7 изолата, от които 6 бяха резистентни към повече от един противотуберкулозен препарат и само един беше монорезистентен.

Относително високият процент на MDR щамове на *M.tuberculosis*, изолирани в България, бихме могли да обясним с пропуски в лечението на болелите и недостатъчно ефективен контрол на туберкулозата. Установената монорезистентност в 15 от общо 37 резистентни към основните противотуберкулозни препарати щамове е резултат от неадекватно или прекъснато лечение на болните. Може би допълнителен индикатор за настъпила резистентност в резултат на недостатъчен контрол е и отбелязаната висока честота на *rpoB* S531L мутациите.

Друг интересен аспект на дискусия е връзката между лекарствената устойчивост и популационната структура на *M.tuberculosis*. Смята се, че една от причините за високия процент на резистентни щамове е специфичната асоциация на лекарствена устойчивост с отделни или преобладаващи клонове (генотипове) (Drobniewski, 2005; Nikolayevskyy, 2007).

Сравнението на данните по резистентност с тези от сполиготипирането, показаха хетерогенността на колекцията от щамове и преобладаването на два сполиготипа ST53 и ST125 (табл. 5). Двата най-големи сполиготипа в изследването ни ST53 и ST125 се отличаваха по процент на MDR или резистентни щамове. За разлика от ST53, ST125 не

включваше MDR щамове и разликата в процента на резистентни щамове между ST53 и ST125 беше статистически незначима ($p=0.11$), може би поради недостатъчно големият брой щамове като цяло в колекцията ни. Разнообразието на резистентни (вкл. MDR) щамове по сполиготип, позволи да предположим че придобиването и разпространението на (мулти)резистентна туберкулоза в България не е свързано с популационната структура на *M. tuberculosis* в страната ни .

В заключителен комбиниран анализ на базата на вариации в VNTR-тандемните повтори (24 -MIRU-VNTR локусовата схема) бяха оценени епидемиологичните връзки между щамове на *M.tuberculosis* в зависимост от града на изолация. Дендрограмата построена от групирания по сходство изолати (фиг.6), демонстрира относително хетерогенна структура на циркулиращата в България популация на *M. tuberculosis*.

Математическото моделиране на еволюцията на VNTR локусите в *M. tuberculosis* показва много ниска скорост на мутации т.е относително бавна промяна в количеството на копия в тандемните повтори (Grant, 2008). Това ни дава възможност да формулираме кластери “*sensu lato*” (щамове, различаващи се в един-два VNTR локуса), отразяващи исторически дълготрайна клонална еволюция и кластери “*sensu stricto*” (щамове с идентични 24-локусови профили), показващи сходство на щамове на базата на “скорошна” трансмисия.

В построената от нас дендрограма (фиг.6), ние открихме седем “*sensu stricto*” кластери, състоящи се от два до четири щамове (идентични 24-локусови профили), които хипотетично корелират със “скорошна” трансмисия и тясно родство между щамове. При сравнение на “*sensu lato*” кластерите по град на изолация се установи, че 13 от тях включват щамове от един и същи град (32 щамове), докато 6 съдържат щамове от повече градове (19 щамове). Оформените кластери от един и същи град отразяват фамилна/близкородствена трансмисия от “исторически

вертикален” тип, която е ограничена за определен географски район. Обратно, оформените кластери от повече от един град отразяват „хоризонтална” трансмисия поради движението на хората между градовете. Тъй като, първият случай е по-често срещан в България, то локалната циркулация на клонове е по-съществен фактор, който трябва да се отчита при молекулярно-епидемиологичните изследвания на туберкулозата в България. Същият анализ не идентифицира специфичен кластер свързан с резистентността, тъй като резистентните щамове са разпръснати по дендрограмата.

Въз основа на получените данни и тяхното обсъждане можем да обобщим, че използваният от нас комбиниран подход за молекулярно-генетична характеристика на 133 изолата на *M. tuberculosis* от различни региони в България позволи да се направи детайлен анализ на циркулиращите в страната щамове. Демонстрирано бе, че използваните от нас генетични методи и подходи могат успешно да бъдат прилагани за молекулярно-епидемиологични проучвания и установяване на лекарствена резистентност на изолати на *M. tuberculosis* за диагностични и изследователски цели. В заключение трябва да отбележим, че това е първото комплексно молекулярно-генетично проучване на щамове *M. tuberculosis*, изолирани в различни региони на България.

Изводи:

1. За първи път е извършено молекулярно-генетично проучване на циркулиращите в България щамове на *M.tuberculosis*. Доказано бе, че изследваната популация е доста хетерогенна и в нея преобладават няколко глобално разпространени международни (ST53, ST47, ST34), балкански (ST41, ST284) и специфични за България (ST125, ST2905) сполиготипа.
2. Трансмисия на мултирезистентни туберкулозни щамове с Beijing генотип не се откри в България, което очевидно показва, че този генотип все още не е достигнал страната ни.
3. Типирането на щамове *M. tuberculosis* с MIRU-VNTR метода показва най-висока дискриминираща способност в сравнение със сполиготипирането и IS6110-RFLP метода. Комбинираното използване на различните методи и MIRU-VNTR схеми дава възможност за по-детайлен анализ и щамово диференциране.
4. Предложената от нас оптимизирана 5-MIRU-VNTR локусова схема дава добра дискриминация за изследваните от нас щамове и може да се използва за първично генотипиране на циркулиращите в България щамове на *M. tuberculosis*
5. Установен бе процентът на разпространението на генни мутации, обуславящи лекарствена резистентност към основните противотуберкулозни препарати (рифампицин, изониазид, етамбутол и стрептомицин). Мутациите в *rpoB*(507-533), *katG*315, *embB*306, *inhA* и *rpsL*43 могат да се използват за бърза генетична детекция на резистентни щамове на *M.tuberculosis*.

6. Комбинираният анализ от сполиготипиране и MIRU-VNTR методите, показва, че придобиването на лекарствена резистентност и разпространението на резистентни щамове в България не е свързано със популационната структура на *M. tuberculosis*, в частност преобладаване на определен генотипен клон в страната ни.
7. Оценени бяха епидемиологичните връзки между щамове на *M. tuberculosis* в зависимост от града на изолация в България. Очертано бе значението на локално-специфичните клонове като важен фактор при молекулярно-епидемиологичните изследвания на туберкулозата в България.

Научни приноси, свързани с дисертационния труд

1. Проведено е първото за епидемиолого-изследователските цели задълбочено молекулярно-генетично изследване на циркулиращите в България щамове *M.tuberculosis*.
2. Оценени са дискриминиращите способности на три основни молекулярно-генетични метода - IS6110-RFLP, сполиготипиране и MIRU-VNTR, които дават възможност за по-детайлен анализ и щамово диференциране на разпространените в страната ни щамове *M. tuberculosis*.
3. Предложената от нас оптимизирана 5-MIRU-VNTR локусова схема, може да се използва с успех за дискриминация и първично генотипиране на щамове *M.tuberculosis* в България.
4. Определени са мутациите в гените, свързани с резистентността към основните противотуберкулозни препарати (рифампицин, изониазид, етамбутол и стрептомицин). Оценени са възможностите на генотипните методи за бърза детекция на резистентни щамове в страната ни.
5. Очертано бе значението на локално-специфичните клонове като важен фактор при молекулярно-епидемиологичните изследвания на туберкулозата в България.
6. Установено бе, че придобиването на лекарствена резистентност и разпространението на резистентни щамове в България не е свързано с циркулацията на отделни генотипни варианти/клонове.

Научни публикации, свързани с дисертационния труд

1. Valcheva V, Mokrousov I, Narvskaya O, Rastogi N, Markova N. 2008. Genetic Diversity of Mycobacterium tuberculosis Population in Bulgaria. In: Genetic Diversity. Nova Science Publishers. NY, USA. (accepted for publication).
2. Valcheva V., Mokrousov I., Narvskaya O., Rastogi N., Markova N. 2008. Molecular snapshot of drug-resistant and drug-susceptible Mycobacterium tuberculosis strains circulating in Bulgaria. Infect Genet Evol.; 8: 657-663.
3. Valcheva V., Mokrousov I., Narvskaya O., Rastogi N., Markova N. 2008. Utility of New 24-locus VNTR Typing for Discriminating Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates in Bulgaria. J. Clin. Microbiol.; 46: 3005-3011.
4. Valcheva V., Mokrousov I., Rastogi N., Narvskaya O., Markova N. 2008. Molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates from different regions of Bulgaria. J. Clin. Microbiol.; 46: 1014-1018.
5. Mokrousov I., Jiao W.W., Valcheva V., Vyazovaya A., Otten T., Ly HM., Lan N.N., Limeschenko E., Markova N., Vyshnevskiy B., Shen A.D., Narvskaya O. 2006. Rapid detection of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-based inverse PCR. J Clin Microbiol.; 44: 2851-2856.

Участия в конференции

1. Valcheva V., Mokrousov I., Narvskaya O., Rastogi N., Markova N. Utility of new 24-locus VNTR format for discriminating *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Bulgaria. 29th Congress of the European Society of Mycobacteriology. Plovdiv-Bulgaria, 6-9 July, 2008
2. Valcheva V., Mokrousov I., Rastogi N., Narvskaya O., Markova N. Molecular insight into drug resistant tuberculosis in Bulgaria. 29th Congress of the European Society of Mycobacteriology, Plovdiv-Bulgaria, 6-9 July, 2008
3. Valcheva V., Mokrousov I., Narvskaya O., Rastogi N., Markova N. Use of MIRU-VNTR Typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Bulgaria and comparison with IS6110-RFLP Typing and Spoligotyping. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelona-Spain, 19-22 April, 2008
4. Valcheva V., Mokrousov I., Narvskaya O., Rastogi N., Markova N. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Bulgaria. 28th Congress of the European Society of Mycobacteriology. Athens-Greece, 1-4 July, 2007
5. Valcheva V., Mokrousov I., Narvskaya O., Rastogi N., Markova N. Genetic strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Bulgaria. 4th Congress of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Europe Region, Riga-Latvia, 27-30 June 2007

6. Valcheva V., Mokrousov I., Narvskaya O., Markova N. 2006. Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with pulmonary tuberculosis in Bulgaria. 60 years Institute of Microbiology. Sofia-Bulgaria, 14 -16 March, 2007
7. Valcheva V., Mokrousov I., Narvskaya O., Markova N. Using of molecular markers for studying the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Bulgaria. 2nd National Student's Conference of Technical University. Sofia-Bulgaria, 11-13 October, 2006
8. Valcheva V., Mokrousov I., Narvskaya O., Markova N. 2006. Molecular-epidemiological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains originating from different region of Bulgaria. 11th Congress of the Bulgarian Society of Microbiologists. Varna-Bulgaria, 5-7 October, 2006