

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВИРУЛЕНТНОСТЬЮ, СРЕДИ ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ

© 2014 И.С. Концевая¹, В.В. Николаевский², О.Н. Макурина³

В работе рассмотрена распространенность полиморфизмов в генах *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированных с вирулентностью, их связь с генетическими группами, кластерами штаммов и лекарственной чувствительностью. Обнаружены ассоциации между полиморфизмами в гене *plcA* и рядом кластеров семейства штаммов LAM, в генах *dosT* и *pks15/1* и семейством Beijing, а также в гене *lipR* с большинством кластеров групп Ghana, Cameroon, Uganda и S. Выявленная взаимосвязь между изученными полиморфизмами и чувствительностью к препаратам носит опосредованный характер.

Ключевые слова: туберкулез, молекулярная эпидемиология, генотипирование, вирулентность, лекарственная устойчивость.

Введение

Туберкулез остается важной проблемой здравоохранения во всем мире и Российской Федерации в частности. Самарская область относится к областям с неблагоприятной обстановкой по туберкулезу, при этом заболеваемость превышает 75 случаев на 100 000 населения [1]. Особенности течения туберкулезной инфекции, многообразие клинических проявлений туберкулеза и типов заболевания во многом обусловлены сложными взаимоотношениями в системе "патоген-хозяин", в том числе особенностями иммунного ответа организма и рядом свойств возбудителя. Среди последних к числу важнейших характеристик относятся устойчивость к противотуберкулезным препаратам и различия в вирулентности штаммов. Генетической основой данных механизмов являются разнообразные полиморфизмы в определенных генах, в частности однонуклеотидные замены и более крупные вставки и делеции.

¹Концевая Ирина Сергеевна (belka@ostin.org), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

²Николаевский Владислав Владленович (v.nikolayevskyy@qmul.ac.uk), Колледж королевы Марии Университета Лондона, 2 Newark Street, London E1 2AT.

³Макурина Ольга Николаевна (makurina.on@mail.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

Одним из важнейших факторов вирулентности *M. tuberculosis* является фосфолипаза С. В процессе гидролиза фосфолипидов, катализируемого фосфолипазой С, образуются диацилглицерин, который в пораженных макрофагах выступает в роли важнейшей сигнальной молекулы, а также предшественника в синтезе триацилглицерина. Триацилглицерин, в свою очередь, выступает в роли энергетического хранилища в течение инкубационного периода *M. tuberculosis* [2].

В геноме микобактерий фосфолипаза С кодируется генами *plcA*, *B*, *C* и *D*, причем первые три гена образуют общий локус *plcABC*. Полиморфизмы в генах *plcA*, *B*, *C* и *D*, как правило, представляют собой вставки инсерционной последовательности IS6110 и делеции в соответствующих регионах. Вставки участка IS6110 были найдены в генах *plcA*, *plcB* и *plcC*, хотя данные о частоте встречаемости вставки различаются в разных исследованиях [3; 4].

В ряде исследований доказано, что мутантные по генам фосфолипазы С штаммы обладают сниженной вирулентностью [5]. Этим объясняется авирулентность штамма *M. bovis* БЦЖ, применяемого в качестве противотуберкулезной вакцины [6].

Важной особенностью *M. tuberculosis* является наличие сложной клеточной оболочки, богатой липидами особого типа [7]. Эта оболочка играет важную роль при формировании аэрозолей, содержащих клетки *M. tuberculosis*, и выживания этих клеток во внешней среде [8]. Кроме того, клеточная оболочка помогает микобактериям уклоняться от защитной системы инфицированного организма и выживать в суровых условиях внутриклеточной среды при длительном латентном инфицировании [9; 10]. К числу генов, ответственных за метаболизм липидов и формирование клеточной оболочки, относится *lipR*, кодирующий структуру фермента липазы.

Изучение полиморфизмов в гене *lipR* является важным в эпидемиологических исследованиях. Делеции в данном локусе могут говорить о возможных эпидемиологических связях между изучаемыми штаммами. Так, в американском исследовании [8] было обнаружено, что у эпидемиологически связанных штаммов чаще встречались делеции в гене *lipR*, нежели интактный тип гена. Мутации в гене *lipR* ухудшают способность штаммов к передаче другим организмам. Передача мутантного штамма, таким образом, требует более близкого и продолжительного контакта, чем передача штамма дикого типа.

Еще одним фактором вирулентности являются вырабатываемые клетками микобактерий фенольные гликолипиды, играющих роль в патогенезе микобактериальной инфекции. Показано, что продуцируемые штаммом *M. tuberculosis* фенольные гликолипиды подавляют образование Т-лимфоцитов и передачу сигналов в иммунной системе с помощью цитокинов [11]. Штаммы, продуцирующие фенольные гликолипиды, демонстрируют "гипервирулентные" свойства и в большинстве своем принадлежат семейству Beijing.

В образовании фенольных гликолипидов участвует фермент поликетидсинтаза Pks15/1, состоящий из двух субъединиц. Субъединица Pks1 содержит 5 доменов: ацилтрансферазу, дегидрогеназу, енолредуктазу, кеторедуктазу и ацилпереносящий белок; субъединица Pks15 представлена кетоацилсинтазой. Комплекс данных ферментов участвует в формировании фенольных гликолипидов в клетке *M. tuberculosis* [12].

Известны два типа мутаций, происходящих в гене *pks15/1*: вставки размером 1–6 или 7 п.н. Эти мутации приводят к смещению рамки считывания и, как следствие, к гиперпродукции фенольных гликолипидов рядом групп микобактерий

и повышению вирулентности. К числу таких групп относится семейство Beijing, *M. canetti* и *M. bovis* [13]. Многие другие семейства *M. tuberculosis*, в том числе H37Rv и клинический штамм CDC1551, обладают значительно пониженной способностью к выработке гликолипидов. Изучение мутаций в гене *pks15/1* раскрывает причины более широкого распространения некоторых штаммов, а также позволяет отследить возможные филогенетические связи между различными штаммами.

Попадая в организм человека, микобактерия начинает потреблять питательные вещества и размножаться. Для того чтобы остановить этот процесс, в макрофагах человека, поглотивших бактерию, создаются условия нехватки кислорода (гипоксии) и высокого содержания монооксида азота (NO), которые ингибируют размножение *M. tuberculosis*. Однако микобактерии туберкулеза выработали механизм, включающийся в условиях гипоксии или высокой концентрации монооксида азота в окружающей среде. Данный механизм переключает клетки на анаэробный тип питания, что заключается в переходе на альтернативные электрон-транспортные пути, включении нитратов в метаболизм, а также синтезе дезоксинуклеозидтрифосфатов в условиях недостатка кислорода [14; 15]. Описанный механизм регулируется комплексом DosR, состоящим из 48 генов, активность которого регулируется двухкомпонентной регуляторной системой. Данная система состоит из транскрипционного фактора DosR и одной из двух схожих сенсорных гистидинкиназ DosS и DosT [16; 17]. Оба фермента способны вступать в реакцию с гемом, и степень окисления железа гема контролирует их активность [18; 19]. Кислород в среде ингибирует активность ферментов, но при появлении кислорода или монооксида азота происходят фосфорилирование и активация киназ, что, в свою очередь, приводит к активации комплекса DosR.

Описанный механизм используется бактериями *M. tuberculosis* в периоды персистенции *in vitro*. Кроме того, предполагается, что он обеспечивает выживание микобактерий в период латентной ТБ инфекции, которая наблюдается у трети мирового населения и представляет собой хроническое, бессимптомное состояние [14; 15]. Наличие мутаций в комплексе генов DosR ухудшает адаптивные способности микобактерий к условиям гипоксии [20], наблюдаемым во время латентной ТБ инфекции или хронических фаз активного заболевания [15].

В исследованиях Рида показано, что у штаммов семейства Beijing экспрессия генов комплекса DosR в обычных условиях в 50 раз выше, чем у других штаммов [21]. Таким образом, штаммы Beijing обладают, по-видимому, значительными преимуществами и существенно лучше приспособлены к условиям гипоксии и высокой концентрации оксида азота в среде по сравнению с другими штаммами. Мутация, обнаруженная в гене *dosT*, коррелирует с гиперэкспрессией генов системы DosR, однако не является ее причиной. Вероятно, данная мутация играет компенсаторную роль для ограничения дальнейшей активности комплекса в условиях повышенной концентрации оксида азота [22].

Целью исследования было изучение полиморфизмов в генах *M. tuberculosis*, ассоциированных с вирулентностью, а также закономерности их связи с генетическими группами и кластерами штаммов и их чувствительностью к противотуберкулезным препаратам.

Материал и методы исследования

Анализ полиморфизмов в генах, ассоциированных с вирулентностью, проводился на 1304 изолятах *M. tuberculosis*, выделенных из мокроты пациентов с бакте-

риологически подтвержденным туберкулезом легких, проходивших стационарное или амбулаторное лечение в противотуберкулезных учреждениях г. Самары и Самарской области.

Обработку мокроты, выделение чистых культур микобактерий и их идентификацию, а также тесты на лекарственную чувствительность проводили с использованием системы автоматизированных жидких питательных сред ВАСТЕС MGIT 960 (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) в соответствии с рекомендациями производителя [23] и приказом № 109 [24]. Выделение ДНК из изолятов производили методом нагревания с хлороформом.

Выявление делеций и вставок в генах *plcA*, *plcB*, *plcC* и *lipR* [4] проводили методом ПЦР со специфическими праймерами с последующим электрофорезом на агарозном геле. Анализ полиморфизмов в генах *pks15/1* и *dosT* проводили методом пиросеквенирования [25].

Молекулярное генотипирование проводили с помощью типирования по локусам VNTR. Для кластеризации штаммов использовали программные средства Bionumerics v. 6.1 (Applied Maths, Ghent, Бельгия), при этом кластером считались два и более изолята с неразличимыми профилями VNTR.

Генетические группы штаммов определяли с помощью всемирной базы данных MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>) на основании данных сполиготипирования и VNTR-типирования.

Статистическую обработку результатов генотипирования и выявление значимых ассоциаций проводили при помощи программы WINPEPI. Для сравнения распределения генетических групп *M. tuberculosis* среди штаммов, объединенных общими фенотипическими признаками, использовали критерий согласия Пирсона (χ^2). Для сравнения распределения генетических групп *M. tuberculosis* использовали показатель соотношения (RR) с 95 %-ным интервалом достоверности (CI).

Результаты и их обсуждение

Среди штаммов в Самарской области полиморфизмы в генах *plcA*, *plcB*, *plcC*, *lipR*, *dosT* и *pks15/1* встречались в 35 (3,01 %), 2 (0,16 %), 6 (0,51 %), 142 (15,59 %), 979 (75,13 %) и 956 (74,05 %) штаммах соответственно. Распространенность полиморфизмов среди различных генетических групп характеризовалась выраженной неоднородностью. Статистически значимые различия были обнаружены для полиморфизмов в генах *plcA* ($\chi^2 = 353,944$ для дикого и $\chi^2 = 340,988$ для мутантного типа, $p < 0,001$), *dosT* ($\chi^2 = 1063,803$, $p < 0,001$), *pks15/1* ($\chi^2 = 1044,451$ для дикого типа и $\chi^2 = 1022,534$ для вставки 7 п.н., $p < 0,001$) и *lipR* ($\chi^2 = 244,037$ для дикого и $\chi^2 = 259,554$ для мутантного типа, $p < 0,001$), в то время как существенных различий в распространенности полиморфизмов в генах *plcB* и *plcC* обнаружено не было. Наличие полиморфизмов в генах *dosT* и *pks15/1* было ассоциировано с принадлежностью штамма к семейству Beijing (RR=7,070, 95 % CI=5,35–9,34 и RR=7,784, 95 % CI=5,79–10,46), в котором они имелись у 99,36 и 98,38 % штаммов соответственно. Мутации в гене *plcA* наблюдались, главным образом, среди штаммов семейства LAM (n=30, 35,7 %), а в гене *lipR* — в группах Ghana, Cameroon, Uganda и S (RR=7,017, 95 % CI=5,57–8,85).

Наши данные относительно ассоциированности полиморфизмов в генах *pks15/1* и *dosT* с семейством Beijing, а также *plcA* с семейством LAM хорошо согласуются с ранее опубликованными данными [13; 26; 27]. В то же время данные об ассоциированности дикого типа гена *lipR* со штаммами, принадлежащими к основной

генетической группе 2 (Cameroon, Uganda, X, Haarlem и LAM) [8], в нашем исследовании на территории Самарской области не подтвердились.

Анализ распространенности полиморфизмов среди кластеров штаммов *M. tuberculosis* выявил значимые различия для полиморфизмов в тех же генах, что и анализ по генетическим группам: *plcA* ($\chi^2 = 397,592$ для дикого и $\chi^2 = 406,803$ для мутантного типа, $p < 0,005$), *dosT* ($\chi^2 = 1078,96$, $p < 0,005$), *pks15/1* ($\chi^2 = 1031,404$ для дикого типа и $\chi^2 = 1008,738$ для вставки 7 п.н., $p < 0,005$) и *lipR* ($\chi^2 = 153,438$ для дикого, $\chi^2 = 155,313$ для мутантного и $\chi^2 = 52,220$ для смешанного типа, $p < 0,005$).

Хотя большинство исследуемых штаммов имели интактный ген *plcA* (96,90 %), вставки в данном гене достоверно чаще встречались у штаммов Samara227 и Samara228 семейства LAM, чем у всех остальных штаммов (RR=40,035, 95 % CI=24,24-66,12). Низкая распространенность лекарственной устойчивости в штаммах этих кластеров и потенциально сниженная вирулентность вследствие мутаций в гене фосфолипазы C позволяет предположить наличие компенсаторных механизмов, обусловивших сравнительно широкое распространение данных штаммов в Самарской области.

В группах уникальных штаммов и мелких кластеров, относящихся к евроамериканской линии, полиморфизмы в гене *lipR* встречались достоверно чаще (более 40 %), чем в среднем по популяции (не более 10 %) (RR=6,098, 95 % CI=4,44-8,38). По всей видимости, ген *lipR* играет незначительную роль в трансмиссивной способности штаммов. Ассоциированные с семейством Beijing, полиморфизмы *pks15/1* и *dosT*, вероятно, не являются кластерспецифическими и могут считаться генетическими маркерами данного семейства, что ранее было показано для других популяций [13; 22; 26].

Анализ распространенности полиморфизмов в генах *plcA*, *plcB*, *plcC*, *lipR*, *dosT* и *pks15/1* в группах штаммов с различными профилями лекарственной устойчивости продемонстрировал ассоциации для тех же генов (*plcA*, *lipR*, *dosT* и *pks15/1*). Полиморфизмы гена *plcA* и *lipR* достоверно чаще встречались среди полностью чувствительных штаммов и штаммов с моно- и полирезистентностью (RR=2,557, 95 % CI=1,25-5,24 и RR=2,291, 95 % CI=1,60-3,28 соответственно). Напротив, вставки размером 7 п.н. в гене *pks15/1* (RR=0,727, 95 % CI=0,64-0,83) и однонуклеотидные замены в гене *dosT* (RR=0,724, 95 % CI=0,64-0,82) встречались чаще в группе штаммов с МЛУ и ОЛУ. Полностью чувствительные штаммы и штаммы с моно- и полирезистентностью достоверно чаще имели интактный тип гена *pks15/1* (RR=2,841, 95 % CI=2,22-3,64). Более мелкие вставки (1-6 п.н.) чаще наблюдались в группах штаммов с МЛУ и ОЛУ (RR=0,000, 95 % CI=0,00-0,74).

Таким образом, лекарственная устойчивость штаммов в целом статистически достоверно ассоциирована с полиморфизмами в генах *dosT* и *pks15/1*, в то время как лекарственная чувствительность ассоциирована с дикими типами генов *dosT* и *pks15/1* и полиморфизмами в генах *plcA* и *lipR*. Однако ассоциации лекарственной устойчивости с генами вирулентности, скорее всего, носят опосредованный характер, являясь в первую очередь ассоциациями с теми или иными генетическими группами.

Наши данные в целом подтверждают существующие представления о том, что вирулентность и лекарственная устойчивость являются важными факторами в эпидемическом процессе *M. tuberculosis*, но механизмы их влияния различны. Вирулентность штаммов играет роль в заражении туберкулезом, тогда как лекарственная устойчивость непосредственно участвует в трансмиссии заболевания,

обеспечивая более длительное и массивное бактериовыделение и тем самым повышая вероятность заболевания других людей от пациента, инфицированного устойчивым штаммом. Скорее всего, и вирулентность, и лекарственную устойчивость можно рассматривать как факторы эволюционного успеха определенных групп *M. tuberculosis*, в частности, группы Beijing.

Литература

- [1] Туберкулез в Российской Федерации, 2010 г. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации. М., 2011. 280 с.
- [2] Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture / J. Daniel [et al.] // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 15. P. 5017–5030.
- [3] Analysis of genetic polymorphisms affecting the four phospholipase C (plc) genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates / C. Viana-Niero [et al.] // *Microbiology.* 2004. V. 150. № 4. P. 967–978.
- [4] Insertion- and deletion-associated genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* phospholipase C-encoding genes among 106 clinical isolates from Turkey / S. Talarico [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* 2005. V. 43. № 2. P. 533–538.
- [5] Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* / C. Raynaud [et al.] // *Mol. Microbiol.* 2002. T. 45. № 1. C. 203–217.
- [6] Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays / S.V. Gordon [et al.] // *Mol. Microbiol.* 1999. V. 32. № 3. P. 643–655.
- [7] *MymA* operon of *Mycobacterium tuberculosis*: its regulation and importance in the cell envelope / A. Singh [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* 2003. V. 227. № 1. P. 53–63.
- [8] Does the *lipR* gene of tubercle bacilli have a role in tuberculosis transmission and pathogenesis? / K.D. Sheline [et al.] // *Tuberculosis (Edinb).* 2009. V. 89. № 2. P. 114–119.
- [9] Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence / S.T. Cole [et al.] // *Nature.* 1998. V. 393. № 6685. P. 537–544.
- [10] Identification and structural characterization of an unusual mycobacterial monomeromycetyl-diacylglycerol / L. Kremer [et al.] // *Mol. Microbiol.* 2005. V. 57. № 4. P. 1113–1126.
- [11] A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response / M.B. Reed [et al.] // *Nature.* 2004. V. 431. № 7004. P. 84–87.
- [12] Polyketide versatility in the biosynthesis of complex mycobacterial cell wall lipids / T. Chopra [et al.] // *Methods Enzymol.* 2009. № 459. P. 259–294.
- [13] Role of the *pks15/1* gene in the biosynthesis of phenoglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenoglycolipids harbor a frameshift mutation in the *pks15/1* gene / P. Constant [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 41. P. 38148–38158.
- [14] Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin / D.R. Sherman [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 13. P. 7534–7539.
- [15] Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program / M.I. Voskuil [et al.] // *J. Exp. Med.* 2003. V. 198. № 5. P. 705–713.

- [16] Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* / H.D. Park [et al.] // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 48. № 3. P. 833–843.
- [17] DevR-DevS is a bona fide two-component system of *Mycobacterium tuberculosis* that is hypoxia-responsive in the absence of the DNA-binding domain of DevR / D.K. Saini [et al.] // *Microbiology.* 2004. V. 150. № 4. P. 865–875.
- [18] *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor / A. Kumar [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 28. P. 11568–11573.
- [19] DosT and DevS are oxygen-switched kinases in *Mycobacterium tuberculosis* / E.H. Sousa [et al.] // *Protein Sci.* 2007. V. 16. № 8. P. 1708–1719.
- [20] *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy / C. Boon [et al.] // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 24. P. 6760–6767.
- [21] The W-Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* overproduces triglycerides and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated / M.B. Reed [et al.] // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 7. P. 2583–2589.
- [22] Strains of the East Asian (W/Beijing) lineage of *Mycobacterium tuberculosis* are DosS/DosT-DosR two-component regulatory system natural mutants / A. Fallow [et al.] // *J. Bacteriol.* 2010. V. 192. № 8. P. 2228–2238.
- [23] Siddiqi S., Rusch-Gerdes S. MGIT Procedure Manual. For BACTEC MGIT 960 TB System (Also applicable for Manual MGIT). *Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) Culture and Drug Susceptibility Demonstration Projects* // FIND. 2006. 89 p.
- [24] Приказ Минздрава РФ №109 от 21.03.2003 "О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации".
- [25] Pyrosequencing: nucleotide sequencing technology with bacterial genotyping applications / C. Clarke [et al.] // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2005. V. 5. № 6. P. 947–953.
- [26] Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development / S. Gagneux [et al.] // *Lancet Infect Dis.* 2007. V. 7. № 5. P. 328–337.
- [27] Molecular characteristics of the *Mycobacterium tuberculosis* LAM-RUS family prevalent in Central Russia / S. Dubiley [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* 2007. V. 45. № 12. P. 4036–4038.

References

- [1] Tuberculosis in the Russian Federation, 2010. Analytical review of statistical indexes used in the Russian Federation. M., 2011. 280 p.
- [2] Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture / J. Daniel [et al.] // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 15. P. 5017–5030.
- [3] Analysis of genetic polymorphisms affecting the four phospholipase C (plc) genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates / C. Viana-Niero [et al.] // *Microbiology.* 2004. V. 150. № 4. P. 967978.
- [4] Insertion- and deletion-associated genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* phospholipase C-encoding genes among 106 clinical isolates from Turkey / S. Talarico [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* 2005. V. 43. № 2. P. 533–538.
- [5] Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* / C. Raynaud [et al.] // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 45. № 1. P. 203–217.

- [6] Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays / S.V. Gordon [et al.] // *Mol. Microbiol.* 1999. V. 32. № 3. P. 643–655.
- [7] MymA operon of *Mycobacterium tuberculosis*: its regulation and importance in the cell envelope / A. Singh [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* 2003. V. 227. № 1. P. 53–63.
- [8] Does the lipR gene of tubercle bacilli have a role in tuberculosis transmission and pathogenesis? / K.D. Sheline [et al.] // *Tuberculosis (Edinb.)*. 2009. V. 89. № 2. P. 114–119.
- [9] Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence / S.T. Cole [et al.] // *Nature*. 1998. V. 393. № 6685. P. 537–544.
- [10] Identification and structural characterization of an unusual mycobacterial monomeromycetyl-diacylglycerol / L. Kremer [et al.] // *Mol. Microbiol.* 2005. V. 57. № 4. P. 1113–1126.
- [11] A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response / M.B. Reed [et al.] // *Nature*. 2004. V. 431. № 7004. P. 84–87.
- [12] Polyketide versatility in the biosynthesis of complex mycobacterial cell wall lipids / T. Chopra [et al.] // *Methods Enzymol.* 2009. № 459. P. 259–294.
- [13] Role of the pks15/1 gene in the biosynthesis of phenoglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenoglycolipids harbor a frameshift mutation in the pks15/1 gene / P. Constant [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 41. P. 38148–38158.
- [14] Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin / D.R. Sherman [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 13. P. 7534–7539.
- [15] Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program / M.I. Voskuil [et al.] // *J. Exp. Med.* 2003. V. 198. № 5. P. 705–713.
- [16] Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* / H.D. Park [et al.] // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 48. № 3. P. 833–843.
- [17] DevR-DevS is a bona fide two-component system of *Mycobacterium tuberculosis* that is hypoxia-responsive in the absence of the DNA-binding domain of DevR / D.K. Saini [et al.] // *Microbiology*. 2004. V. 150. № 4. P. 865–875.
- [18] *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor / A. Kumar [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 28. P. 11568–11573.
- [19] DosT and DevS are oxygen-switched kinases in *Mycobacterium tuberculosis* / E.H. Sousa [et al.] // *Protein Sci.* 2007. V. 16. № 8. P. 1708–1719.
- [20] *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy / C. Boon [et al.] // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 24. P. 6760–6767.
- [21] The W-Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* overproduces triglycerides and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated / M.B. Reed [et al.] // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 7. P. 2583–2589.
- [22] Strains of the East Asian (W/Beijing) lineage of *Mycobacterium tuberculosis* are DosS/DosT-DosR two-component regulatory system natural mutants / A. Fallow [et al.] // *J. Bacteriol.* 2010. V. 192. № 8. P. 2228–2238.
- [23] Siddiqi S., Rusch-Gerdes S. MGIT Procedure Manual. For BACTEC MGIT 960 TB System (Also applicable for Manual MGIT). *Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) Culture and Drug Susceptibility Demonstration Projects* // FIND. 2006. 89 p.

- [24] Order № 109 by the Ministry of Health from 21.03.2003 "On improvement of tuberculosis control measures in the Russian Federation".
- [25] Pyrosequencing: nucleotide sequencing technology with bacterial genotyping applications / C. Clarke [et al.] // Expert Rev. Mol. Diagn. 2005. V. 5. № 6. P. 947–953.
- [26] Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development / S. Gagneux [et al.] // Lancet Infect Dis. 2007. V. 7. № 5. P. 328–337.
- [27] Molecular characteristics of the Mycobacterium tuberculosis LAM-RUS family prevalent in Central Russia / S. Dubiley [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2007. V. 45. № 12. P. 4036–4038.

Поступила в редакцию 12/II/2014;
в окончательном варианте — 12/II/2014.

GENETIC POLYMORPHISM OF GENES ASSOCIATED WITH VIRULENCE IN *MYCOBACTERIUM* *TUBERCULOSIS* STRAINS FROM SAMARA REGION

© 2014 I.S. Kontsevaya,⁴ V.V. Nikolayevskyy⁵ O.N. Makurina⁶

The prevalence of polymorphisms in Mycobacterium tuberculosis genes associated with virulence as well as its associations with genetic groups, clusters of strains and drug susceptibility was investigated in the article. The associations between polymorphisms in *plcA* gene and some LAM family clusters, *dosT* and *pks15/1* genes and Beijing family and *lipR* gene and the majority of Ghana, Cameroon, Uganda and S clusters were found. Detected interrelation between studied polymorphisms and drug susceptibility is of mediated character.

Key words: tuberculosis, molecular epidemiology, genotyping, virulence, drug susceptibility.

Paper received 12/II/2014.
Paper accepted 12/II/2014.

⁴Kontsevaya Irina Sergeevna (belka@ostin.org), the Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.

⁵Nikolaevskyy Vladislav Vladlenovich (v.nikolayevskyy@qmul.ac.uk), Queen Mary's College, University of London, London E1 2AT.

⁶Makurina Olga Nikolaevna (makurina.on@mail.ru), the Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.