

Получена: 29 мая 2020 / Принята: 14 июля 2020 / Опубликовано online: 31 августа 2020

DOI 10.34689/SH.2020.22.4.007

УДК 616-002.5; 577.21

## ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *M. TUBERCULOSIS* В КАЗАХСТАНЕ

Улан А. Кожамкулов<sup>1</sup>, <http://orcid.org/0000-0002-9782-7631>

Айнур Ж. Ахметова<sup>1,2</sup>, [http:// orcid.org/0000-0002-5557-3338](http://orcid.org/0000-0002-5557-3338)

Венера Л. Бисмилда<sup>3</sup>, Scopus ID: 8441834800

Ляйля Т. Чингисова<sup>3</sup>, Scopus ID: 39261046300

Айнур Р. Акильжанова<sup>1,2</sup>, <http://orcid.org/0000-0001-6161-8355>

<sup>1</sup> Центр наук о жизни, National Laboratory Astana, Назарбаев университет, г. Нур-Султан, Республика Казахстан;

<sup>2</sup> Кафедра общей биологии и геномики, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г. Нур-Султан, Республика Казахстан;

<sup>3</sup> Национальный научный центр фтизиопульмонологии Республики Казахстан, г. Алматы, Республика Казахстан.

### Резюме

Туберкулез, особенно лекарственно-устойчивый туберкулез все еще остается актуальной проблемой медицины в Казахстане. Заболеваемость мультирезистентным туберкулезом в стране за 12 лет увеличилась в 8 раз, с 1,7 до 13,5 на 100000 человек в период между 2003 и 2015 гг. По данным исследований в различных странах, штаммы семейства Beijing *M.tuberculosis* были ассоциированы с лекарственной устойчивостью, в частности с мультирезистентным туберкулезом. Цель работы: провести генотипирование 192 лекарственно-устойчивых клинических изолятов *M.tuberculosis* в Казахстане методом сполиготипирования и определить взаимосвязь между лекарственной устойчивостью и генотипом Beijing *M.tuberculosis*. Результаты сполиготипирования показали, что генотип Beijing является наиболее распространенным среди лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* (74,48%) в Казахстане. Определение взаимосвязи генотипа Beijing *M. tuberculosis* с лекарственной устойчивостью продемонстрировали, что более чем в 50% случаев данный генотип встречался среди полирезистентных (70,9%) и мультирезистентных (87,75%) изолятов.

**Ключевые слова:** туберкулез, лекарственная устойчивость, сполиготипирование.

### Abstract

## GENOTYPING OF DRUG-RESISTANT CLINICAL ISOLATES OF *M. TUBERCULOSIS* IN KAZAKHSTAN

Ulan Kozhamkulov<sup>1</sup>, <http://orcid.org/0000-0002-9782-7631>

Ainur Akhmetova<sup>1,2</sup>, [http:// orcid.org/0000-0002-5557-3338](http://orcid.org/0000-0002-5557-3338)

Venera Bismilda<sup>3</sup>, Scopus ID: 8441834800

Lyailya Chingissova<sup>3</sup>, Scopus ID: 39261046300

Ainur Akilzhanova<sup>1,2</sup>, <http://orcid.org/0000-0001-6161-8355>

<sup>1</sup> Center for Life Sciences, National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Nur-Sultan city, Republic of Kazakhstan;

<sup>2</sup> Department of General Biology and Genomics, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan city, Republic of Kazakhstan;

<sup>3</sup> National Scientific Center for Phthisiopulmonology of the Republic of Kazakhstan, Almaty city, Republic of Kazakhstan.

Tuberculosis, especially drug-resistant tuberculosis remains a major health problem in Kazakhstan. The incidence of multidrug-resistant tuberculosis in the country was increased by 8 times over 12 years from 1,7 to 13,5 per 100,000 population between 2003 and 2015. According to investigations in different countries Beijing *M.tuberculosis* family strains were associated with drug-resistance, specifically with multidrug-resistant tuberculosis. Aim of the study is to conduct genotyping of 192 drug-resistant clinical isolates of *M.tuberculosis* in Kazakhstan by spoligotyping technique and determine a correlation between drug resistance and Beijing *M.tuberculosis* genotype. Spoligotyping results demonstrated that Beijing genotype is the most widespread genotype among drug-resistant *M. tuberculosis* clinical isolates in Kazakhstan (74,48%). Determination of correlation between drug resistance and Beijing *M.tuberculosis* genotype showed that the genotype was found in more than 50% cases among polyresistant (70,9%) and multidrug resistant (87,75%) isolates.

**Key words:** tuberculosis, drug resistance, spoligotyping.

Түйіндеме

**ҚАЗАҚСТАНДА ТАРАЛҒАН ДӘРІГЕ-ТӨЗІМДІ *M. TUBERCULOSIS*  
КЛИНИКАЛЫҚ ИЗОЛЯТТАРЫН ГЕНОТИПТЕУ****Улан А. Кожамкулов**<sup>1</sup>, <http://orcid.org/0000-0002-9782-7631>**Айнур Ж. Ахметова**<sup>1,2</sup>, <http://orcid.org/0000-0002-5557-3338>**Венера Л. Бисмилда**<sup>3</sup>, Scopus ID: 8441834800**Ляйля Т. Чингисова**<sup>3</sup>, Scopus ID: 39261046300**Айнур Р. Акильжанова**<sup>1,2</sup>, <http://orcid.org/0000-0001-6161-8355><sup>1</sup> Өмір туралы ғылымдар орталығы, National Laboratory Astana, Назарбаев университеті, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы;<sup>2</sup> Жалпы биология және геномика кафедрасы, Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия Ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы;<sup>3</sup> ҚР Ұлттық фтизиопульмонология ғылыми орталығы, Алматы қ., Қазақстан Республикасы.

Туберкулез, әсіресе дәріге-төзімді туберкулез Қазақстанда медицинаның өзекті мәселелерінің бірі болып қалуда. Мультирезистентті туберкулезбен ауру көрсеткіштері біздің мемлекетімізде 12 жыл ішінде 8 есеге көбейді, 2003 және 2015 жылдар аралығында 100000 халыққа 1,7-ден 13,5-ке көбейді. Әр түрлі мемлекеттердегі зерттеулердің мәліметтері бойынша, Beijing *M.tuberculosis* тұқымдасының штамдары дәрілік төзімділікпен ассоциацияланған, әсіресе мультирезистентті туберкулезбен. Жұмыстың мақсаты: Қазақстанда таралған 192 дәріге-төзімді *M.tuberculosis* клиникалық изоляттарын сполиготиптеу әдісімен генотиптеу және дәрілік төзімділік пен Beijing *M.tuberculosis* генотипінің арасындағы байланысты анықтау. Сполиготиптеу нәтижелері W-Beijing генотипі дәріге-төзімді *M.tuberculosis* штамдарының арасында ең кең таралған генотип екенін көрсетті (74,48%). Beijing *M.tuberculosis* генотипінің дәрілік төзімділікпен байланысын анықтау аталған генотиптің 50% жоғары жағдайында полирезистентті (70,9%) және мультирезистентті (87,75%) изоляттардың арасында кездесетінін көрсетті.

**Түйін сөздер:** туберкулез, дәріге төзімділік, сполиготиптеу.

**Библиографическая ссылка:**

Кожамкулов У.А., Ахметова А.Ж., Бисмилда В.Л., Чингисова Л.Т., Акильжанова А.Р. Генотипирование лекарственно-устойчивых клинических изолятов *M. Tuberculosis* в Казахстане // Наука и Здравоохранение. 2020. 4 (Т.22). С. 71-79. doi 10.34689/SH.2020.22.4.007

Kozhamkulov U., Akhmetova A., Bismilda V., Chingissova L., Akilzhanova A. Genotyping of drug-resistant clinical isolates of *M. Tuberculosis* in Kazakhstan // *Nauka i Zdravookhranenie* [Science & Healthcare]. 2020, (Vol.22) 4, pp. 71-79. doi 10.34689/SH.2020.22.4.007

Кожамкулов У.А., Ахметова А.Ж., Бисмилда В.Л., Чингисова Л.Т., Акильжанова А.Р. Қазақстанда таралған дәріге-төзімді *M. Tuberculosis* клиникалық изоляттарын генотиптеу // Ғылым және Денсаулық сақтау. 2020. 4 (Т.22). Б. 71-79. doi 10.34689/SH.2020.22.4.007

**Введение**

С каждым годом увеличивается число лекарственно-устойчивых штаммов, как мультирезистентных штаммов, обуславливающих устойчивость к основным двум противотуберкулезным препаратам первого ряда – изониазиду и рифампицину, так и XDR штаммов, устойчивых к обоим наиболее действенным противотуберкулезным препаратам, изониазиду и рифампицину, в сочетании с устойчивостью к любому из фторхинолонов (таких как левофлоксацин или моксифлоксацин) и по меньшей мере к одному из трех инъекционных препаратов второй линии (амикацин, капреомицин или канамицин) [WHO, 2015].

В Казахстане сохраняются высокие показатели заболеваемости туберкулезом. По данным Национального научного центра фтизиопульмонологии Республики Казахстан в Казахстане насчитывалось в

2017 г. 52,2 и 3,0 случаев заболевания и смертности от туберкулеза на 100 000 населения соответственно. Заболеваемость МЛУ ТБ увеличилась с 1,7 до 13,5 на 100000 человек в период между 2003 и 2015 гг. [National TB Center, 2017].

В различных географических регионах могут встречаться штаммы с лекарственной устойчивостью с различными мутациями в генах, обуславливающих лекарственную устойчивость. Поэтому важно исследовать природу лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, циркулирующего на территории определенного географического региона. Генетические исследования *M. tuberculosis* в Казахстане больше касались вопросов определения мутаций в генах *M. tuberculosis*, обуславливающих устойчивость к основным противотуберкулезным препаратам и генотипированию штаммов, циркулирующих в Казахстане [Kozhamkulov et al., 2011; Akhmetova et al.,

2015; Ibrayeva *et al.*, 2014; Skiba *et al.*, 2015; Kubica *et al.*, 2005], лишь две публикации касаются предварительных данных полногеномного секвенирования двух клинических изолятов *M.tuberculosis* [Kairov *et al.*, 2015; Ilin *et al.*, 2015].

Методы генотипирования *M. tuberculosis* играют важную роль в контроле и мониторинге туберкулеза. С помощью данных методов можно отследить ТБ инфекцию во время вспышек, чтобы найти источник заболевания, контролировать трансмиссию заболевания, выявить смешанные инфекции, а также определить или исключить лабораторные ошибки, дифференцировать рецидивные случаи туберкулеза от реактивации заболевания для назначения правильного режима лечения [Verver *et al.*, 2004; Garcia de Viedma *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2011; Coll *et al.*, 2018].

Различные методы генотипирования позволяют идентифицировать множество семейств *M. tuberculosis* таких как Beijing, Haarlem, LAM (Latin American-Mediterranean), X, Ural, CAS (Central Asian Strain), T, EAI (East African-Indian) и т.д. Некоторые семейства *M. tuberculosis* эндемичны в определенных географических регионах, в то время как другие, например, Beijing широко распространены в мире и отвечают за сохраняющиеся высокие эпидемиологические показатели туберкулеза.

Генотип Beijing часто встречается в Азиатских странах, но в последнее время распространяется на многих континентах мира. Генотип преобладает среди молодых индивидуумов и ассоциирован с лекарственной устойчивостью. Также была показана ассоциация определенных кластеров генотипа Beijing с МЛУ-ТБ и повышенной трансмиссивностью [Yin *et al.*, 2016; Niemann *et al.*, 2010; San *et al.*, 2018]. В 1995 году изоляты *M. tuberculosis* с такими же характеристиками были найдены в г. Пекине (Китай), и эта группа изолятов была названа Пекинская «Beijing» [Reichman *et al.*, 2001]. Пекинский (Beijing) генотип преобладает среди молодых людей и связан с несколькими вспышками в разных частях мира. Сообщалось также об ассоциации некоторых кластеров Beijing генотипа с МЛУ-ТБ и повышенной трансмиссивностью. Впервые штаммы семейства Beijing были определены во время вспышки МЛУ-ТБ в 1990-х годах в Нью-Йорке (США).

**Цель данного исследования:** провести генотипирование лекарственно-устойчивых клинических изолятов *M.tuberculosis* распространенных на территории Казахстана с помощью метода сполитипирования и определить взаимосвязь между лекарственной устойчивостью и семейством Beijing *M.tuberculosis*.

#### Материалы и методы

Было собрано 192 лекарственно-устойчивых клинических изолята *M. tuberculosis* от впервые выявленных случаев туберкулеза из различных регионов Казахстана в 2014-2018 годы. Протокол исследования и информированное согласие были утверждены этическим комитетом Центра наук о жизни, протокол №20 от 22.09.2017 г. заседания этической комиссии Центра наук о жизни Назарбаев Университета. Идентификация микробиологическими методами, а также выделение ДНК *M.tuberculosis* было

проведено в референс-лаборатории Национального научного центра фтизиопульмонологии Республики Казахстан (г. Алматы).

#### Микробиологические методы

Для посева патологического материала проводили деконтаминацию модифицированным методом Петрова. Твердая питательная среда Левенштейна-Йенсена была использована для посева микобактерий туберкулеза. Пробирки с посевами инкубировались при 36-37°C. Рост колоний был отмечен на 3-6 неделе в виде сухих безпигментных R-колоний. Для микроскопического анализа были отобраны все пробирки с выросшими колониями и были использованы для определения лекарственной чувствительности. Мазки окрашивались по методу Циль-Нильсена.

Дополнительно проводили подготовку выросших на плотных средах лекарственно-устойчивых штаммов (пересев на плотные питательные среды Левенштейна-Йенсена), т.е. ресуспендировали. Предварительно взяли достаточное количество выросшей культуры *M.tuberculosis* в пробирку с бусами и хорошо растирали по стенке пробирки, затем добавляли по 0,1-0,2 мл бактериальной суспензии в среду Левенштейна-Йенсена и оставляли в термостате при 37°C до появления роста микобактерий туберкулеза.

Лекарственная чувствительность к противотуберкулезным препаратам 1 ряда определялась методом абсолютных концентраций и методом пропорций [WHO, 1998; WHO, 2003] и с использованием системы BACTEC-MGIT 960 Mycobacteria Growth Indicator Tube (BD Diagnostic Systems, США). Лекарственная чувствительность к рифампицину и изониазиду определялась по методу абсолютных концентраций согласно инструкции ВОЗ на среде Левенштейна-Йенсена, содержащей 40µg/ml рифампицина или 0,2-1µg/ml изониазида, соответственно [WHO, 2003]. И результаты микробиологического анализа были получены через 28 дней после посева культуры. Изоляты считаются устойчивыми если более 20 колоний выросло на средах, содержащих противотуберкулезные препараты.

Также лекарственную чувствительность *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам определяли методом пропорций к 4 антибактериальным препаратам 1 ряда (H-изониазиду, R-рифампицину, S-стрептомицину, E-этамбутолу). Если рост бактерий на питательной среде, содержащей противотуберкулезный препараты, превышал 1,0% штамм считался устойчивым.

#### Выделение ДНК *M.tuberculosis*

Использовалась процедура выделения ДНК для использования в амплификации. Бактериальная петля с микроорганизмами помещалась в 1 мл буфера TE (10 mM Трис-НСI, 1 mM ЭДТА, pH 7,0) и бактерии лизировались кипячением при 80°C в течение 45-60 мин. Клетки центрифугировали (12000 об/мин в течение 5 мин), а затем замораживали в течение ночи при -20°C. Супернатант был использован для амплификации в генотипировании микобактерий туберкулеза.

Выделение тотальной геномной ДНК образцов коллекции было проведено с использованием метода,

описанного Van Soolingen D. [Van Soolingen *et al.*, 1995; Van Soolingen *et al.*, 2003].

#### Генотипирование клинических изолятов *M. tuberculosis* методом сполиготипирования

Сполиготипирование (spoligotyping, от англ. Spacer Oligonucleotide Typing) - метод генотипирования, который заключается в определении структуры генетического региона *M. tuberculosis* DR-региона, состоящего из нескольких десятков повторяющихся последовательностей (35 п.о) и уникальных по своему нуклеотидному составу спейсерных участков между ними (длиной от 36 до 41 п.о).

Сполиготипирование клинических изолятов *M. tuberculosis* было проведено с использованием разработанной микобактериологической лабораторией Wadsworth center (штат Нью-Йорк, США) протокола по подготовке образцов, регенерации мембран, подготовке буферов, расходного материала.

Для амплификации DR-региона использовали праймеры соответствующие спейсерным участкам. Для детекции наличия или отсутствия спейсерных участков проводилась Саузерн-блот-гибридизация олигонуклеотидов соответствующего состава, нанесенных на мембрану с уникальными спейсерными последовательностями. Ампликоны гибридизовались со специфическими зондами, закрепленными на нейлоновой мембране. Сполиготипирование было

проведено с помощью набора «Spoligotyping Kit» (Isogen Lifescience) с биотинилированными праймерами и мембраной.

Для амплификации DR-участка использовали следующие праймеры:

DRa : 5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3',

DRb : 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3'

Для ПЦР амплификации DR-региона использовали Термоциклер Eppendorf (США). Для запуска ПЦР реакции был использован универсальный алгоритм амплификации, адаптированный для максимального выхода ПЦР-продукта всех исследуемых участков ДНК: 96°C – 3 мин., 30 циклов: 94°C – 1 мин., 55°C – 1 мин., 72°C – 30 сек., 72°C – 5 мин., 4°C – хранение. Качественная оценка полученных продуктов амплификации была проведена с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием.

Для каждого образца *M. tuberculosis* регистрировалось наличие или отсутствие сигнала в двоичном формате, то есть для каждого из 43 спейсерных промежутков DR-участка единицей (1) отмечалось наличие гибридизационного сигнала, а нулем (0) – его отсутствие (рисунок 1). Обработку мембраны после гибридизации и визуализацию продуктов амплификации проводили согласно рекомендациям производителя.

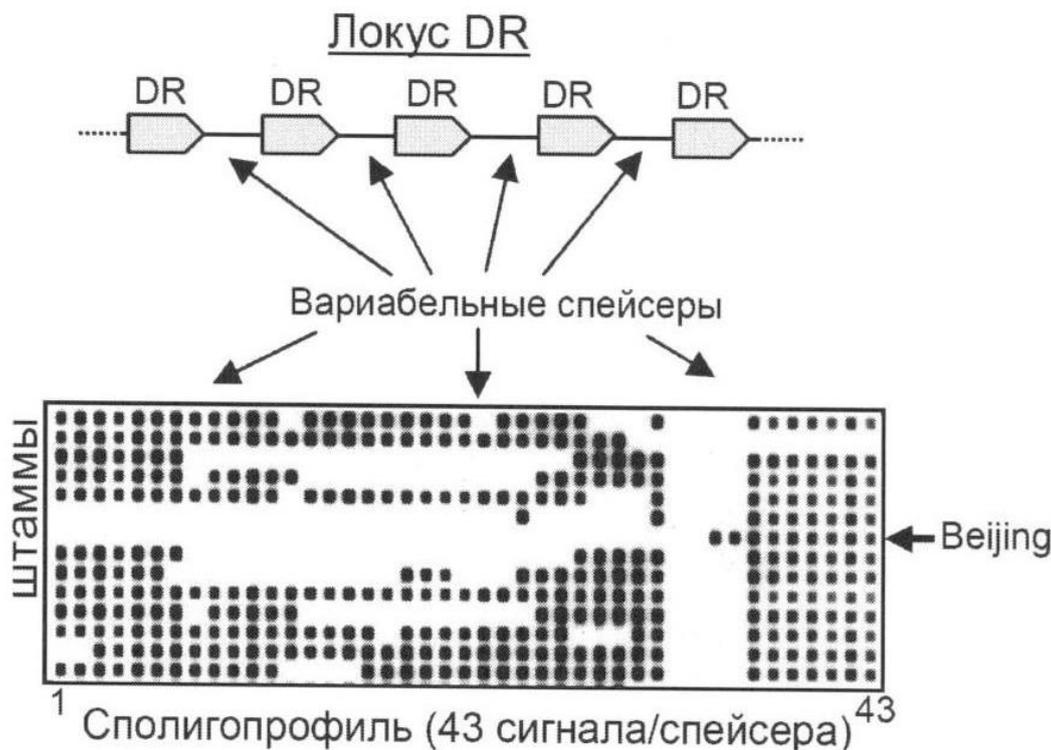


Рисунок 1. Пример сполигопаттернов различных штаммов *M. tuberculosis*.

Клинические изоляты *M. tuberculosis* с идентичными сполиготипами объединялись в кластеры. В итоге, высчитывалось количество как уникальных (единичных), так и кластеров с двумя и более изолятами.

Полученные данные сполиготипирования были анализированы с помощью ранее опубликованных баз

данных SpolDB3 и SpolDB4. Международный сполиготип (Spoligotype International Type; SIT) каждого изолята был установлен путем сравнения полученных результатов с базой данных SITVIT web (Institute Pasteur de Guadeloupe). Сполиготипирование проводилось в 2-3 повторностях, где было необходимо.

**Результаты исследования**

Проведены микробиологические методы исследования *M.tuberculosis*: посев, выделение культуры микобактерий туберкулеза, тест определения лекарственной чувствительности к противотуберкулезным препаратам 1 ряда.

Тесты на лекарственную чувствительность *M.tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам

проводились методом пропорций и абсолютных концентраций: - к 4 антибактериальным препаратам 1 ряда (H-изониазиду, R-рифампицину, S-стрептомицину, E-этамбутолу).

В таблице 1 представлены данные теста на лекарственную устойчивость и процентное соотношение различных форм среди 192 лекарственно-устойчивых клинических изолятов *M.tuberculosis*.

Таблица 1

**Характеристика лекарственно-устойчивых клинических изолятов *M.tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам.**

(Table 1. Characteristics of drug-resistant clinical isolates of *M. tuberculosis* to the main antituberculosis drugs).

Лекарственная устойчивость	Количество	%
<i>Всего лекарственно-устойчивых клинических изолятов, включая</i>	192	100
Любая устойчивость, включая ЛУ к стрептомицину (SM) S	166	86,46
Любая устойчивость, включая ЛУ к изониазиду (INH) I	149	77,60
Любая устойчивость, включая ЛУ к рифампицину (RMP) R	109	56,77
Любая устойчивость, включая ЛУ к этамбутолу (EMB) E	121	63,02
<i>Всего монорезистентных (устойчивость только к одному препарату), включая</i>	39	20,31
устойчивость только к S	19	9,90
устойчивость только к I	10	5,21
устойчивость только к R	3	1,56
устойчивость только к E	7	3,65
<i>Мультirezистентных (обязательная комбинация устойчивости к INH+RMP), включая</i>	98	51,04
устойчивость к S+I+R+E	86	44,79
устойчивость к S+I+R	10	5,21
устойчивость к I+R	2	1,04
<i>Полирезистентных (любые комбинации ЛУ, кроме INH+RMP)</i>	55	28,65
устойчивость к S+I+E	16	8,33
устойчивость к I+E	2	1,04
устойчивость к S+I	23	11,98
устойчивость к S+R+E	2	1,04
устойчивость к R+E	2	1,04
устойчивость к S+R	4	2,08
устойчивость к S+E	6	3,13

SM (S) - стрептомицин, INH (I) – изониазид, RMP (R) – рифампицин, EMB (E) - этамбутол.

Среди 192 клинических изолятов *M.tuberculosis* 98 (51,04%) были мультirezистентные, 55 (28,65%) – полирезистентные, 39 (20,31%) - монорезистентными *M.tuberculosis*. Комбинация устойчивости к 4 основным противотуберкулезным препаратам к S + I + R + E была распространена у 86 (44,79%) изолятов, среди штаммов с множественной лекарственной устойчивостью у 98 (51,04%) *M.tuberculosis* изолятов и составляла почти половину всей лекарственно-устойчивой коллекции *M. tuberculosis*.

Среди монорезистентных изолятов *M.tuberculosis* наиболее часто выявлялась устойчивость к стрептомицину в 19 случаях (9,9%), и менее чем в 6% случаях отмечалась устойчивость к изониазиду, этамбутолу и рифампицину. Семь комбинаций лекарственной устойчивости полирезистентных клинических изолятов *M.tuberculosis* были обнаружены среди 55 (28,65%) клинических изолятов, где наиболее часто встречалась комбинация лекарственной устойчивости к стрептомицину и изониазиду – 23 (11,98%).

Характеристика 192 лекарственно-устойчивых клинических изолятов *M.tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам показала

преобладание мультirezистентных штаммов (51,04%), тогда как полирезистентные и монорезистентные штаммы *M.tuberculosis* составляли 28,65% и 20,31%, соответственно. При этом комбинация лекарственной устойчивости к 4 основным противотуберкулезным препаратам к S + I + R + E была преобладающей и встречалась в 44,79% случаях среди штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. Эти данные показывают, преобладание среди лекарственно-устойчивых штаммов *M.tuberculosis*, циркулирующих в Казахстане, штаммов с множественной (мультirezистентной) лекарственной устойчивостью, наиболее сложной формы лекарственной устойчивости, требующей длительной госпитализации, более токсичных и дорогостоящих химиопрепаратов.

**Генотипирование и определение генетических семейств собранной коллекции лекарственно-устойчивых клинических изолятов *M.tuberculosis*, циркулирующих в Казахстане**

Определение генетических семейств *M.tuberculosis* проводили одним из широко используемых методов сполитипирования. Сполитипирование проводили с использованием коммерчески доступного набора

«Ocum Biosolutions Inc» с использованием стандартного протокола.

Методом сполитипирования была определена структура DR-региона для 192 лекарственно-устойчивых штаммов *M.tuberculosis*. Для каждого штамма был получен гибридизационный паттерн, образующийся в результате взаимодействия уникальных зондов, иммобилизованных на нейлоновой мембране, с фрагментами DR-региона каждого из исследованных штаммов.

Сравнительный анализ полученных данных с международной базой SpolDB4, SITVITweb ([http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd\\_myc.html](http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myc.html)) разделил исследованную выборку на 6 генетических семейств. По результатам сполитипирования выделено 7 кластеров, относящихся к 6 генетическим семействам и содержащих от 2 до 143 клинических

изолятов *M. tuberculosis*, имеющих идентичный сполитипаттерн. Восемь клинических изолятов *M. tuberculosis* имели уникальный профиль. Для некоторых изолятов, сполитипофили, которых не обнаружены в базе данных SpolDB4, SITVITweb, идентификацию и прогностическую оценку исходных генотипов проводили с использованием ресурса <http://tbinsight.cs.rpi.edu> Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY, USA.

На основании результатов сполитипирования определено, что наибольший кластер лекарственно-устойчивых штаммов *M.tuberculosis* – был образован штаммами, относящимися к семейству Beijing 143 (74,48%).

Меньше штаммов входило в состав четырех следующих по величине семейств: T – 23 (11,98%), LAM – 11 (5,73%), Haarlem – 10 (5,21%), U – 4 (2,08%) and MANU-2 – 1 (0,52%) (рисунок 2).

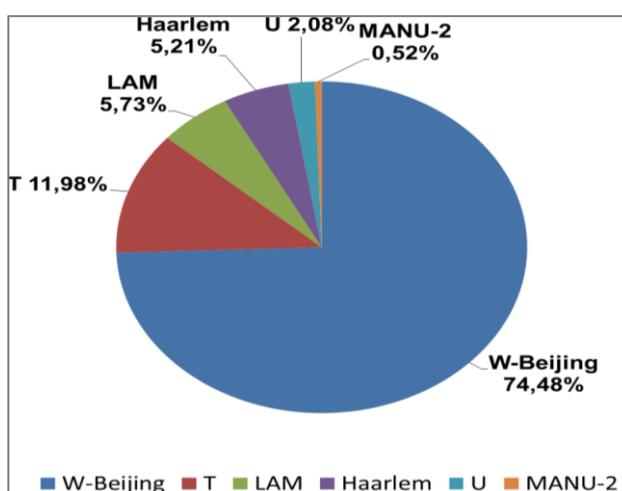


Рисунок 2. Генетические семейства *M.tuberculosis*, выделенных лекарственно-устойчивых штаммов.  
(Figure 2. *M. tuberculosis* genetic families of isolated drug-resistant strains)

В таблице 2 представлено распределение выборки по генетическим семействам и субтипам 192 лекарственно-устойчивых клинических изолятов *M.tuberculosis*, где можно выделить доминирующий генотип W-Beijing 143 (74,48) и четыре наиболее

распространенных субтипа среди генетических семейств *M.tuberculosis*: T1 – 12 (6,25%); LAM9 – 9 (4,68%); T5-Rus1 – 8 (4,16%); H3-Ural-1 – 8 (4,16%), остальные генотипы представлены в меньшем количестве и составляют каждый менее 3%.

Таблица 2.

**Генетические семейства и субтипы *M.tuberculosis*, выделенных штаммов *M.tuberculosis*.**

(Table 2. Genetic families and subtypes of *M. tuberculosis* of isolated *M. tuberculosis* strains).

Семейство	Субтип	Число штаммов (%)
Beijing	Beijing	143 (74,48)
T	T1	12 (6,25)
	T5-Rus1	8 (4,16)
	T3	2 (1,04)
	T1-Rus2	1 (0,52)
Haarlem	H3-Ural-1	8 (4,16)
	H3	2 (1,04)
LAM	LAM9	9 (4,68)
	LAM5	1 (0,52)
	LAM1	1 (0,52)
U	U	4 (2,08)
MANU	MANU-2	1 (0,52)
Всего:		192 (100)

**Определение взаимосвязи между лекарственной устойчивостью и семейством Beijing *M.tuberculosis***

Генетическое семейство Beijing *M.tuberculosis* было доминирующим генотипом среди лекарственно-устойчивых штаммов.

Общее количество генотипа Beijing *M.tuberculosis* составило 143 (74,48%) из общего количества лекарственно-устойчивых штаммов, тогда как представители других семейств non-Beijing составляли 49 (25,52%), что почти в три раза меньше генотипа Beijing (таблица 3).

Таблица 3

**Распределение лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам среди различных генотипов *M. tuberculosis*, циркулирующих в Казахстане.**

(Table 3. Distribution of drug resistance to anti-tuberculosis drugs among different genotypes of *M. tuberculosis* circulating in Kazakhstan)

Генотипы	Лекарственная устойчивость				
	Монорезистентные (%)	Полирезистентные (%)	МЛУ(MDR) (%)	всего:	
Beijing	18 (46,15%)	39 (70,90%)	86 (87,75%)	143 (74,48%)	
Все Non-Beijing,	21 (53,84)	16 (29,09)	12 (12,24)	49 (25,52%)	
включая в т.ч.	H3-Ural-1	4	3	1	8
	H3	2			2
	LAM5			1	1
	LAM1	1			1
	LAM9	2	4	3	9
	T1	4	6	2	12
	T5-RUS1)	2	2	4	8
	T1-Rus-2	1			1
	T3	2			2
	U	3		1	4
MANU-2		1		1	
Итого:	39 (100%)	55 (100%)	98 (100%)	192 (100%)	

Если рассматривать отдельные категории лекарственной устойчивости, то более 50% из двух основных резистентных групп MDR (87,75%) изолятов и полирезистентных (70,9%) составляли представители Beijing. Среди монорезистентных штаммов *M.tuberculosis* генотип Beijing встречался в 46,15%.

**Обсуждения**

Методы генотипирования были использованы в эпидемиологических исследованиях туберкулеза в различных странах. С помощью методов генотипирования в современном мире проведена классификация и определены 7 основных генетических линий микобактерий туберкулеза, среди которых в мире преобладают линия 2 (Восточно-Азиатская) и 4 (Евро-Американская), наиболее распространенные семейства микобактерий туберкулеза: Beijing, LAM (Latin American-Meditereanean), Haarlem, Ural, CAS (Central Asian Strain), T, EAI (East African-Indian). Некоторые из генетических семейств *M. tuberculosis* продолжают циркулировать на ограниченных территориях, в то время как другие семейства широко распространились в мире, вероятно, по причине повышенной вирулентности и трансмиссивности (например, Beijing и LAM).

В Казахстане было проведено несколько исследований по молекулярному генотипированию *M. tuberculosis* [Akhmetova et al., 2015; Ibrayeva et al., 2014; Kubica et al., 2005; Skiba et al., 2015]. В работе Akhmetova и др. [Akhmetova et al., 2015] были охарактеризованы мутации в генах *pncA* и *rpsA* у пирозинамид-устойчивых и пирозинамид-чувствительных изолятов *M.tuberculosis* (общее количество изолятов 77) в Казахстане и в данной

работе было использовано 12 MIRU-VNTR типирование для исследования потенциального использования генотипирования в определении пирозинамид-устойчивости. В исследовании Ibrayeva и др. [Ibrayeva et al., 2014] была изучена генетическая вариабельность *M.tuberculosis* изолятов циркулирующих в пенитенциарной системе Казахстана (60 изолятов) и гражданском секторе (125 изолятов), и были сравнены их профили лекарственной устойчивости. В работах Kubica и др. [Kubica et al., 2005] и Skiba и др. [Skiba et al., 2015] было проведено генотипирование для 142 и 151 клинических изолятов *M.tuberculosis* из различных регионов Республики Казахстан собранных в 2001 г. и 2008 г., соответственно. Целью работы Kubica и др. (2005 г.) было определить частоту генотипа Beijing среди лекарственно-устойчивых изолятов *M.tuberculosis* методами сполитипирования и IS6110 RFLP. Целью статьи Skiba и др. (2015 г.) являлась оценка семейств *M.tuberculosis* распространенных на территории Казахстана с помощью методов 24 MIRU-VNTR генотипирования и сполитипирования, а также оценка роли идентифицированных генотипов в распространении лекарственно-устойчивого туберкулеза. В нашем исследовании мы провели генотипирование 192 лекарственно-устойчивых клинических изолятов *M.tuberculosis* из различных регионов Казахстана собранных в 2014-2018 гг. методом сполитипирования и исследовали взаимосвязь между лекарственной устойчивостью и генотипом Beijing *M.tuberculosis*.

Результаты генотипирования 192 лекарственно-устойчивых изолятов *M.tuberculosis* показали, что изоляты семейства Beijing *M.tuberculosis* были

выявлены в 74,48% случаев (143 клинических изолята). Изоляты генотипа Beijing в основном были определены среди мультирезистентных (87,75%) и полирезистентных (70,9%) клинических изолятов *M.tuberculosis*. В своей работе Kubica и др. [Kubica *et al.*, 2005] также показали, что около 70% всех лекарственно-устойчивых изолятов *M.tuberculosis* собранных в Казахстане были отнесены к генотипу Beijing. В их работе, генотип Beijing был ассоциирован с лекарственной устойчивостью в целом ( $p=0.001$ ). В исследованиях Skiba и др. [Skiba *et al.*, 2015] было определено, что 88,9% мультирезистентных изолятов принадлежали генотипу Beijing ( $p<0.0001$ ), почти столько же как и в нашей работе (87,75%). Для того, чтобы в нашей работе оценить статистическую значимость ассоциации генотипа Beijing с различными лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза (мультирезистентным, полирезистентным и монорезистентным ТБ) в дальнейшем будет проведено ДНК секвенирование генов отвечающих за лекарственную устойчивость.

Семейство Beijing (Пекинский) часто встречается в азиатских странах, преобладает среди молодых людей и связан с несколькими вспышками в разных частях мира. Впервые штаммы семейства Beijing были определены во время вспышки мультирезистентного туберкулеза в 1990-х годах в Нью-Йорке (США). В 1995 году изоляты *M. tuberculosis* с такими же характеристиками были найдены в г.Пекине (Китай), и эта группа была названа Пекинская «Beijing» [Reichman *et al.*, 2001]. В настоящее время штаммы «W-Beijing» или «Beijing» встречаются почти на всех континентах нашей планеты. Семейство Beijing в основном широко распространено в Пекине (Китай), где 92% всех изолятов принадлежали к этому семейству. Данный вид семейства Beijing является вирулентным и наиболее распространенным в странах азиатского региона и странах бывшего СССР и ассоциирован с лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам [Yin *et al.*, 2016; Niemann *et al.*, 2010; San *et al.*, 2018]. Среди европейских стран штаммы Beijing в основном распространены в странах Восточной Европы и бывшего СССР.

#### Выводы

Таким образом, с помощью сполитипирования установлено, что генотип Beijing микобактерий туберкулеза является наиболее распространенным среди лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* (74,48%), циркулирующих на территории Казахстана. Выяснение взаимосвязи генотипа семейства Beijing *M. tuberculosis* с лекарственной устойчивостью позволило установить, что наиболее часто ЛУ встречается среди клинических изолятов *M. tuberculosis* семейства Beijing, особенно среди полирезистентных и мультирезистентных штаммов. Генотипирование *M. tuberculosis* позволяет выявлять эпидемиологически распространенные и значимые генетические семейства, например Beijing, позволяет вести постоянный контроль за данными генотипами путем изучения молекулярно-генетических особенностей клинических изолятов *M. tuberculosis*, циркулирующих в Казахстане.

Работа выполнена в рамках проекта «Изучение генетических особенностей лекарственно-устойчивых MDR и XDR клинических изолятов *M.tuberculosis* на основе данных полногеномного секвенирования и генотипирования» по грантовому финансированию №AP05134737 на 2018-2020 гг.

Конфликт интересов не заявлен.

Все авторы в равной мере принимали участие в проведении исследования и написании статьи.

#### Литература:

1. Akhmetova A., Kozhamkulov U., Bismilda V. *et al.* Mutations in the *pncA* and *rpsA* genes among 77 *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kazakhstan // *International Journal Tuberculosis and Lung Diseases*. 2015. №19(2). P. 179-184.
2. Coll P., Garcia de Viedma D. Molecular epidemiology of tuberculosis // *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018. №36(4). P. 233-240.
3. Garcia de Viedma D., Marin M., Hernangomez S. *et al.* Tuberculosis recurrences: reinfection plays a role in a population whose clinical/epidemiological characteristics do not favor reinfection // *Arch Intern Med*. 2002. №162. P. 1873-1879.
4. Ibrayeva A., Kozhamkulov U., Raiymbek D. *et al.* Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in the penitentiary system of Kazakhstan // *International Journal Tuberculosis and Lung Diseases*. 2014. №18(3). P. 298-301.
5. Ilin A.I., Kulmanov M.E., Korotetskiy I.S. *et al.* Complete Genome Sequence of Multidrug-Resistant Clinical Isolate *Mycobacterium tuberculosis* 187.0, Used To Study the Effect of Drug Susceptibility Reversion by the New Medicinal Drug FS-1 // *Genome announcements*. 2015. №3(6). P. 1-2.
6. Kairov U., Kozhamkulov U., Molkenov A., Rakhimova S. *et al.* Draft Genome Sequences of Two Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Sputum of Kazakh Patients // *Genome announcements*. 2015. №3(3). P. 1-2.
7. Kozhamkulov U., Akhmetova A., Rakhimova S. *et al.* Molecular characterization of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Kazakhstan // *Japanese Journal of Infectious Disease*. 2011. №64. P. 253-255.
8. Kubica T., Agzamova R., Wright A., Aziz M.A., Rakishhev G., Bismilda V., Richter E., Rüsç-Gerdes S., Niemann S. The Beijing genotype is a major cause of drug-resistant tuberculosis in Kazakhstan // *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005. №9(6). P. 646-653.
9. Navarro Y., Herranz M., Perez-Lago L. *et al.* Systematic survey of clonal complexity in tuberculosis at a populational level and detailed characterization of the isolates involved // *J Clin Microbiol*. 2011. №49. P. 4131-4137.
10. Niemann S., Diel R., Khechinashvili G., Gegia M., Mdivani N., Tang Y. *Mycobacterium Tuberculosis* Beijing Lineage Favors the Spread of Multidrug-Resistant Tuberculosis in the Republic of Georgia // *J Clin Microbiol*. 2010. №48(10). P. 3544-50.
11. Reichman L.B. *et al.* The global epidemic of multi-drug-resistant tuberculosis. - New York: McGraw-Hill. 2001. P.320.

12. San et.al. Insight into multidrug-resistant Beijing genotype *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Myanmar // *International Journal of Infectious Diseases*. 2018. №76. P. 109-119.
13. Skiba Y., Mokrousov I., Ismagulova G. et al. Molecular snapshot of *Mycobacterium tuberculosis* population in Kazakhstan: A country-wide study // *Tuberculosis*. 2015. №95(5). P. 538-546.
14. Statistic TB Review (Editor Zh.K. Ismailov). Ministry of Health Republic of Kazakhstan. – Almaty: National TB Center. 2017. P. 75.
15. Van Soolingen, D., Qian, L., de Haas, P. E. et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia // *J. Clin. Microbiol.* 1995. №133. P. 3234-3238.
16. Van Soolingen D., Kremer K., Vynnycky E. New perspectives in the molecular epidemiology of tuberculosis // In book: *Mycobacteria and TB*. Berlin. 2003. №2. P. 17-45.
17. Verver S., Warren R.M., Munch Z. et al. Proportion of tuberculosis transmission that takes place in households in a high-incidence area // *Lancet*. 2004. №363. P. 212-214.
18. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part III. Geneva. WHO. 1998. P. 65.
19. World Health Organization. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. Ed. 2nd. Geneva. World Health Organization. 2003. P. 73.
20. World Health Organization: Global tuberculosis report 2015 (Ed. 20th). Geneva: World Health Organisation. 2015. P. 204.
21. Yin Q.Q. et al. Evolutionary history and ongoing transmission of phylogenetic lineages of *M. tuberculosis* Beijing genotype in China // *Scientific reports*. 2016. №6:34353. P. 1-11.

**Контактная информация:**

**Кожамкулов Улан Анетович** – к.м.н, ведущий научный сотрудник Лаборатории геномной и персонализированной медицины, ЧУ «National Laboratory Astana», Назарбаев университет.

**Почтовый адрес:** 010000, г. Нур-Султан, проспект Кабанбай батыра, 53, блок S1, кабинет 420.

**E-mail:** ulan.kozhamkulov@nu.edu.kz;

**Телефон:** +7 7172 69 49 77