

Получена: 19 июня 2019 / Принята: 2 июля 2019 / Опубликовано online: 30 октября 2019

УДК 616-002.5; 577.21

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *M. TUBERCULOSIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ КАЗАХСТАНА

Айнур Ж. Ахметова^{1,2}, [http:// orcid.org/0000-0002-5557-3338](http://orcid.org/0000-0002-5557-3338)

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

Асхат Б. Молкенов¹, <http://orcid.org/0000-0003-2339-5204>

Улыкбек Е. Каиров¹, <http://orcid.org/0000-0001-8511-8064>

Венера Л. Бисмилда³, SCOPUS ID: 8441834800

Ляйля Т. Чингисова³, SCOPUS ID: 39261046300

Улан А. Кожамкулов¹, <http://orcid.org/0000-0002-9782-7631>

¹ National Laboratory Astana, Назарбаев университет, г. Нур-Султан, Республика Казахстан;

² Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, г. Нур-Султан, Республика Казахстан;

³ Национальный научный центр фтизиопульмонологии Республики Казахстан, г. Алматы, Республика Казахстан.

Резюме

Несмотря на то, что уровень заболеваемости туберкулезом снижается с каждым годом в Казахстане, широкое распространение лекарственно-устойчивого туберкулеза ставит под угрозу борьбу против туберкулеза. По данным различных исследований, генотип W-Beijing *M. tuberculosis* ассоциирован с лекарственной устойчивостью и вызывает более тяжелые формы туберкулеза. Цель работы: оценка спектра мутаций в гене *katG*, промоторных областях *fabG-inhA*, *oxyR-ahpC* и *rpoB* отвечающих за лекарственную устойчивость *M. tuberculosis* к изониазиду и рифампицину и определение генетических семейств 103 мультирезистентных клинических изолятов *M. tuberculosis* распространенных в Казахстане по методу Сэнгера и сполитипированию, соответственно. Среди 103 мультирезистентных штаммов *M. tuberculosis* в Казахстане преобладала мутация в 531 кодоне Ser→Leu *rpoB* гена (87,4%) и в 315 кодоне Ser→Thr *katG* гена (97%) обуславливающих устойчивость к рифампицину и изониазиду, соответственно. Более 80% штаммов *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью были отнесены к наиболее вирулентному и широко распространенному в мире генотипу Beijing. Таким образом, штаммы семейства Beijing *M. tuberculosis* являются доминирующими среди мультирезистентных и лекарственно-устойчивых штаммов в Казахстане.

Ключевые слова: туберкулез, сполитипирование, множественная лекарственная устойчивость.

Abstract

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MULTIDRUG RESISTANT *M. TUBERCULOSIS* STRAINS DISTRIBUTED IN THE TERRITORY OF KAZAKHSTAN

Ainur Zh. Akhmetova^{1,2}, [http:// orcid.org/0000-0002-5557-3338](http://orcid.org/0000-0002-5557-3338)

Ainur R. Akilzhanova^{1,2}, <http://orcid.org/0000-0001-6161-8355>

Askhat B. Molkenov¹, <http://orcid.org/0000-0003-2339-5204>

Ulykbek E. Kairov¹, <http://orcid.org/0000-0001-8511-8064>

Venera L. Bismilda³, SCOPUS ID: 8441834800

Lyailya T. Chingissova³, SCOPUS ID: 39261046300

Ulan A. Kozhamkulov¹, <http://orcid.org/0000-0002-9782-7631>

¹ National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Nur-Sultan city, Republic of Kazakhstan;

² L.N.Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan city, Republic of Kazakhstan;

³ National Scientific Center for Phthisiopulmonology of the Republic of Kazakhstan, Almaty city, Republic of Kazakhstan.

In spite of that the rate of tuberculosis is decreasing every year in Kazakhstan wide distribution of drug-resistant tuberculosis threatens tuberculosis control. According to various studies, *M. tuberculosis* W-Beijing genotype is associated with drug resistance and more severe forms of tuberculosis. Aim of the study: estimation of mutations spectrum in *katG*, *fabG-inhA*, *oxyR-ahpC* and *rpoB* responsible for drug resistance of *M. tuberculosis* to isoniazid and rifampicin, and

determination of genetic families of 103 multidrug resistant clinical isolates of *M.tuberculosis* spread in Kazakhstan by Sanger method and spoligotyping, respectively. Among 103 multidrug resistant strains in Kazakhstan mutations at 531 codon Ser→Leu of *rpoB* gene (87,4%) and at 315 codon Ser→Thr of *katG* gene (97%) responsible for resistance to rifampicin and isoniazid respectively were prevailed. More than 80% of multidrug resistant *M.tuberculosis* strains were referred to Beijing genotype, the most virulent and widely spread genotype in the world. *M. tuberculosis* Beijing family strains prevail among multidrug and drug resistant strains in Kazakhstan.

Key words: tuberculosis, spoligotyping, multidrug resistance.

Түйіндеме

ҚАЗАҚСТАН ТЕРРИТОРИЯСЫНДА ТАРАЛҒАН КӨПТІК ДӘРІГЕ ТӨЗІМДІ *M.TUBERCULOSIS* ШТАММДАРЫНЫҢ МОЛЕКУЛАЛЫҚ СИПАТТАМАСЫ

Айнур Ж. Ахметова^{1,2}, <http://orcid.org/0000-0002-5557-3338>

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

Асхат Б. Молкенов¹, <http://orcid.org/0000-0003-2339-5204>

Улыкбек Е. Каиров¹, <http://orcid.org/0000-0001-8511-8064>

Венера Л. Бисмилда³, SCOPUS ID: 8441834800

Ляйля Т. Чингисова³, SCOPUS ID: 39261046300

Улан А. Кожамкулов¹, <http://orcid.org/0000-0002-9782-7631>

¹ National Laboratory Astana, Назарбаев университеті, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы;

² Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы;

³ ҚР Ұлттық фтизиопульмонология ғылыми орталығы, Алматы қ., Қазақстан Республикасы.

Қазақстанда туберкулез ауруының көрсеткіштері жылдан жылға төмендеуіне қарамастан, дәріге төзімді туберкулездің кең таралуы туберкулезге қарсы күреске қауіп төндіруде. Әр түрлі зерттеулер мәліметтеріне сәйкес W-Beijing *M.tuberculosis* генотипі дәрілік төзімділік пен туберкулездің ауыр формаларымен ассоциацияланған. Жұмыстың мақсаты: изониазид пен рифампицинге *M.tuberculosis* дәрілік төзімділігін анықтайтын *katG* гені, *fabG-inhA*, *oxyR-ahpC* промоторлық аймақтары мен *rpoB* геніндегі мутациялар спектрін, және 103 мультирезистентті *M.tuberculosis* клиникалық изоляттарының генетикалық тұқымдастарын сәйкесінше Сэнгер әдісі мен сполиготиптеу әдісімен бағалау және анықтау. Қазақстандағы 103 көптік дәріге төзімді *M.tuberculosis* штаммдарының арасында сәйкесінше рифампицин мен изониазидке төзімділікті анықтайтын *rpoB* генінің 531 кодонындағы мутация Ser→Leu (87,4%) және *katG* генінің 315 кодонындағы мутация Ser→Thr (97%) басымдылық көрсетті. Көптік дәріге төзімді *M.tuberculosis* штаммдарының 80% көбі ең вирулентті, дүниежүзінде кең таралған Beijing генотипіне жататыны анықталды. Beijing *M.tuberculosis* тұқымдасының штаммдары Қазақстанда таралған мультирезистентті және дәріге төзімді штаммдар арасында басым.

Түйін сөздер: туберкулез, сполиготиптеу, көптік дәріге төзімділік.

Библиографическая ссылка:

Ахметова А.Ж., Акильжанова А.Р., Молкенов А.Б., Каиров У.Е., Бисмилда В.Л., Чингисова Л.Т., Кожамкулов У.А. Молекулярная характеристика мультирезистентных штаммов *M.TUBERCULOSIS*, циркулирующих на территории Казахстана // Наука и Здоровоохранение. 2019. 5 (Т.21). С. 45-52.

Akhmetova A.Zh., Akilzhanova A.R., Molkenov A.B., Kairov U.E., Bismilda V.L., Chingisova L.T., Kozhamkulov U.A. Molecular characterization of multidrug resistant *M.TUBERCULOSIS* strains distributed in the territory of Kazakhstan // *Nauka i Zdravookhranenie* [Science & Healthcare]. 2019, (Vol.21) 5, pp. 45-52.

Ахметова А.Ж., Акильжанова А.Р., Молкенов А.Б., Каиров У.Е., Бисмилда В.Л., Чингисова Л.Т., Кожамкулов У.А. Қазақстан территориясында таралған көптік дәріге төзімді *M.TUBERCULOSIS* штаммдарының молекулалық сипаттамасы // Ғылым және Денсаулық сақтау. 2019. 5 (Т.21). Б. 45-52.

Введение

В настоящее время туберкулез (ТБ), вызываемый штаммами *Mycobacterium tuberculosis* все еще остается важной глобальной проблемой здравоохранения в мире. Несмотря на эффективную схему лечения в 2017 году в мире было зарегистрировано 10 миллионов новых случаев ТБ и 1,6 миллионов смертей среди больных ТБ, что меньше по сравнению с 2016г., когда было зарегистрировано 10,4 миллионов новых случаев

ТБ и 1,7 миллионов смертей [WHO, 2018; WHO, 2017]. Уровень заболеваемости снижается с каждым годом, однако, широкое распространение лекарственно-устойчивого ТБ, особенно мультирезистентного или ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ), ассоциированного с устойчивостью к основным противотуберкулезным препаратам первого ряда – изониазиду и рифампицину ставит под угрозу борьбу против туберкулеза. Проблема туберкулеза остается

актуальной и в Казахстане. По данным Национального научного центра фтизиопульмонологии (г. Алматы) в 2017 г. показатели заболеваемости и смертности от туберкулеза в Казахстане составили 52,2 и 3,0 случаев на 100 000 населения, соответственно [Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, 2018]. Согласно данным ВОЗ, Казахстан входит в тридцатку стран с высокими показателями МЛУ-ТБ в мире [WHO, 2018].

С помощью методов генотипирования определены и классифицированы 7 основных генетических линий микобактерий туберкулеза, среди которых в нашем регионе преобладают линия 2 (Восточно-Азиатская) и 4 (Евро-Американская), включающие множество генетических семейств *M.tuberculosis* таких как Beijing, Haarlem, CAS (Central Asian strain), LAM (Latin American Mediterranean) и другие. Результаты генотипирования показали, что в различных географических регионах распространены разные генотипы с разными характеристиками [Ramazanadeh *et al.*, 2014]. Поэтому необходимо знать природу лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, циркулирующих на территории определенного географического региона. Одним из самых широко распространенных генотипов является китайский генотип Beijing. Этот генотип часто встречается в Азиатских странах, но в последнее время распространяется на многих континентах мира. Генотип преобладает среди молодых индивидуумов и ассоциирован с лекарственной устойчивостью [European Concerned Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis, 2006]. Также молекулярно-эпидемиологические исследования показали, что штаммы генотипа Beijing *M.tuberculosis* вызывают более тяжелые формы туберкулеза и в большинстве случаев приводят к неудаче лечения по сравнению с другими штаммами [Mathuria *et al.*, 2016].

В настоящее время существует более 10 методов генотипирования. MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats) анализ и сполитипирование являются наиболее широко используемыми методами генотипирования *M.tuberculosis*, так как дискриминирующая способность данных методов, почти такая же, как и у золотого стандарта IS6110-RFLP типирования.

Рифампицин в качестве противотуберкулезного препарата был впервые использован в 1972 г. Препарат имеет высокое бактерицидное действие. Рифампицин ингибирует элонгацию м-РНК [Nguyen *et al.*, 2016], и в большинстве случаев рифампицин-устойчивые микобактерии накапливают мутации ассоциированные с лекарственной устойчивостью в структурном регионе *groV* гена, который кодирует β -субединицу бактериальной РНК-полимеразы, в частности в так называемом RRDR (rifampicin resistance-determining region) регионе между кодонами 507-533. Среди всех рифампицин-устойчивых изолятов мутации в *groV* гене были найдены в 95% случаев [Prim *et al.*, 2015; Myo *et al.*, 2018]. Изониазид является пролекарством, активируется ферментом каталазы-пероксидазы (*katG*), который кодируется геном *katG* для создания никотинил-НАД продукта [Zhang *et al.*, 1992].

Активированный комплекс связывается с редуктазой белка переносчика еноил-ацила (*inhA*) и ингибирует синтез миколовой кислоты [Zhang *et al.*, 1992]. 50-95% изониазид-устойчивых изолятов имеют миссенс мутацию в 315 кодоне *katG* гена (S315T) [Miotto *et al.*, 2018; Chin *et al.*, 2018]. Нуклеотидная замена C-15T в промоторном регионе *fabG-inhA* приводит к повышенной экспрессии *inhA* и является второй наиболее распространенной мутацией среди изониазид-устойчивых образцов, данная нуклеотидная замена была найдена у 6-43% изониазид-устойчивых изолятов [Zhang *et al.*, 2009; Rattan *et al.*, 1998; Ahmad *et al.*, 2009; Sreevatsan *et al.*, 1997]. Также в 10-18% случаев были найдены мутации в промоторной области *oxyR-ahpC*. Ген *ahpC* кодирует алкил-гидропероксид редуктазу, которая вовлечена в клеточную регуляцию оксидативного стресса [Jagielski *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018].

Цель данного исследования: оценка спектра мутаций в генах, отвечающих за лекарственную устойчивость *M.tuberculosis* к изониазиду и рифампицину и определение генетических семейств 103 клинических изолятов *M.tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) распространенных в Казахстане.

Материалы и методы

Объектами исследования являются 103 мультирезистентных клинических изолятов микобактерий туберкулеза из различных областей Казахстана, бактериальные референсные штаммы *M.tuberculosis*.

В исследование включены больные туберкулезом с положительным результатом посева мокроты на *M.tuberculosis*. Информированное согласие было подписано каждым пациентом. На каждого пациента была также заполнена информационная карта, в которую были занесены все эпидемиологические и клинические данные, результаты микробиологических тестов. Протокол исследования и информированное согласие, и все виды рекрутинга, были одобрены этическим комитетом Центра наук о жизни (протокол №20 от 22.09.2017г. Заседания этической комиссии Центра наук о жизни АОО "Назарбаев Университет"). Микробиологическая идентификация и выделение чистой культуры *M.tuberculosis* патогена проводились в референс-лаборатории Национального научного центра фтизиопульмонологии Республики Казахстан, г. Алматы.

Микробиологические методы исследования *M.tuberculosis*

Для роста микобактерий туберкулеза для посева была использована твердая питательная среда Левенштейна-Йенсена, все посевы инкубировались при 36-37°C до появления роста колоний. Из всех пробирок с выросшими колониями и отобранных для определения лекарственной чувствительности, готовились мазки для микроскопического исследования. Данные мазки окрашивались по Цилю - Нильсену.

Определение *in vitro* чувствительности к противотуберкулезным препаратам осуществлялась на плотной среде Левенштейна-Йенсена 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 подтверждалась молекулярно-генетическими тестами HAIN-тест (GenoType® MTBDR plus) и GeneXpert (Dx System).

Лекарственная чувствительность к рифампицину и изониазиду проводилась по методу абсолютных концентраций в соответствии с рекомендациями ВОЗ на среде Левенштейна-Йенсена, содержащей 40 µg/ml рифампицина или 0,2-1 µg/ml изониазида, соответственно [WHO., 2003]. Результаты микробиологических исследований записывались через 28 дней после посева культуры. Изоляты считаются устойчивыми в случае, когда более 20 колоний выросло на средах, содержащих противотуберкулезные препараты.

Сполиготи́пирование клинических изолятов *M.tuberculosis*

Для проведения сполиготипирования микобактерий туберкулеза использовали протокол по подготовке образцов, регенерации мембран, подготовке буферов, расходного материала, по разработанному протоколу в микобактериологической лаборатории Wadsworth center (штат Нью-Йорк, США).

Для амплификации изучаемых участков ДНК использовали праймеры соответствующие спейсерным последовательностям. Проводилась Саузерн-блот-гибридизация т.е. гибридизация олигонуклеотидов соответствующего состава, нанесенных на мембрану с уникальными спейсерными последовательностями для определения наличия или отсутствия спейсерных последовательностей.

Ампликоны, включающие спейсерные промежутки DR-региона, полученные с использованием биотинилированных праймеров, гибридизовались со специфическими зондами, закрепленными на нейлоновой мембране. Для сполиготипирования использовался набор «Spoligotyping Kit» (Isogen Lifescience) с биотинилированными праймерами и мембраной.

Для амплификации DR-региона использовались нижеописанные праймеры:

DRa : 5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3',
DRb : 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3'

ПЦР-амплификацию DR-региона проводили при температуре отжига 55°C. Качественную оценку полученных продуктов амплификации осуществляли путем электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием.

Для каждого клинического изолята *M.tuberculosis* записывалось наличие или отсутствие сигнала в двоичном формате, где для каждого из 43 спейсерных промежутков DR-региона единицей (1) обозначалось наличие гибридизационного сигнала, а нулем (0) – его отсутствие. Обработку мембраны после гибридизации и визуализацию продуктов реакции проводили в соответствии с рекомендациями производителя.

Клинические изоляты *M.tuberculosis* с одинаковыми сполиготипами группировались в кластеры, в результате подсчитывалось количество как уникальных (единичных), так и кластеров с двумя и более изолятами.

Анализ полученных данных сполиготипирования проводили с использованием ранее опубликованной

базы SpolDB3 и SpolDB4. Международный сполиготип (Spoligotype International Type; SIT) каждого штамма определялся путем сравнения полученных результатов с базой данных SITVIT web (Institute Pasteur de Guadeloupe). При необходимости проводилась постановка сполиготипирования в 2-3 повторностях.

Секвенирование генов, обуславливающих устойчивость к базовым противотуберкулезным препаратам изониазиду и рифампицину

ПЦР-амплификацию фрагментов генов клинических штаммов *M.tuberculosis*, определяющих генетическую лекарственную устойчивость к рифампицину – *rpoB*; изониазиду – *katG*, промоторную область *inhA-fabG*, *oxyR-ahpC* оперона проводили при температуре отжига 63°C. Для оценки полученных ампликонов проводили визуализацию продуктов амплификации путем электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием.

Далее осуществляли дефосфорилирование 5'-концевых фосфатных групп дНТФ в реакционной смеси путем внесения в нее 5 мкл смеси, содержащей 10x ПЦР буфер, 2,5 mM MgCl₂ и 0,5 ед. щелочной фосфатазы (Shrimp Alkaline Phosphatase (Fermentas, Литва). Проводилась инкубация в течение 30 минут при 37°C с последующей инактивацией фермента прогреванием в течении 15 минут при 85°C. Далее эти образцы дополнительно обрабатывали экзонуклеазой *E.coli* (Exol, Fermentas, Литва), добавляя к вышеописанной реакционной смеси 5 ед. Exol, с аналогичными условиями инкубации.

Затем была проведена очистка сиквенс-ПЦР продуктов и осаждение ДНК ацетат Na-спиртовой смесью. Денатурацию проводили в течение 2 минут при 95°C.

Определение нуклеотидных последовательностей локусов генома, принимающих участие в формировании устойчивости, проводили с использованием ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit на приборе ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в соответствии с прилагаемыми инструкциями производителя. Для проведения реакции секвенирования использовались те же праймеры, что и в реакции амплификации. Выравнивание и сравнительный анализ полученных последовательностей генов *rpoB*, *katG*, *fabG-inhA*, *oxyR-ahpC* проводили с референсной последовательностью штамма *M.tuberculosis* H37Rv (NC_000962) с помощью программного пакета Geneious.

Результаты

Проведена оценка профиля мутаций в генах, определяющих лекарственную чувствительность *M.tuberculosis* к изониазиду и рифампицину и генотипирование 103 клинических изолятов *M.tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью или мультирезистентных (MDR), циркулирующих в Республике Казахстан. Мультирезистентные клинические изоляты *M.tuberculosis* от больных с впервые выявленным туберкулезом из разных регионов Казахстана были собраны в референс-лаборатории Национального научного центра фтизиопульмонологии Республики Казахстан.

Изучаемые таргетные гены *rpoB*, *katG*, промоторные

области *fabG-inhA* и *oxyR-ahpC* оперона *M.tuberculosis* были секвенированы на автоматизированном генетическом анализаторе ABI 3730 (Applied Biosystems). Определение генетических семейств *M.tuberculosis* проводили одним из широко используемых методов – методом сполитипирования. Сполитипирование проводили с помощью коммерчески доступного набора «Oscium Biosolutions Inc» с использованием стандартного протокола.

Результаты генотипирования показали, что преобладающим генетическим семейством среди 103 мультирезистентных штаммов является генотип Beijing, который идентифицирован в 89 случаях (86,4%). Остальные семейства, которые были определены: LAM - 7 (6,8%), Haarlem - 3 (2,9%), T - 3 (2,9%) и U - в 1 (0,9)

случае.

В настоящем исследовании, W-Beijing был преобладающим генотипом среди штаммов с множественной лекарственной устойчивостью *M.tuberculosis*, выделенных в Казахстане. На рисунке 1 показаны результаты сполитипирования некоторых казахстанских изолятов *M.tuberculosis*. Клинические изоляты *M.tuberculosis* семейства Beijing, гибридационный паттерн которых характеризуется отсутствием сигналов между 1 и 34 спейсерными последовательностями на рисунке показаны под номерами 7-10, 13-15, 17, 19-21, 25-27, 31-33, 35, 36, 40, положительные контроли - референтный штамм *M. tuberculosis* H37Ra и BCG-bovis под номерами 1 и 2, соответственно.

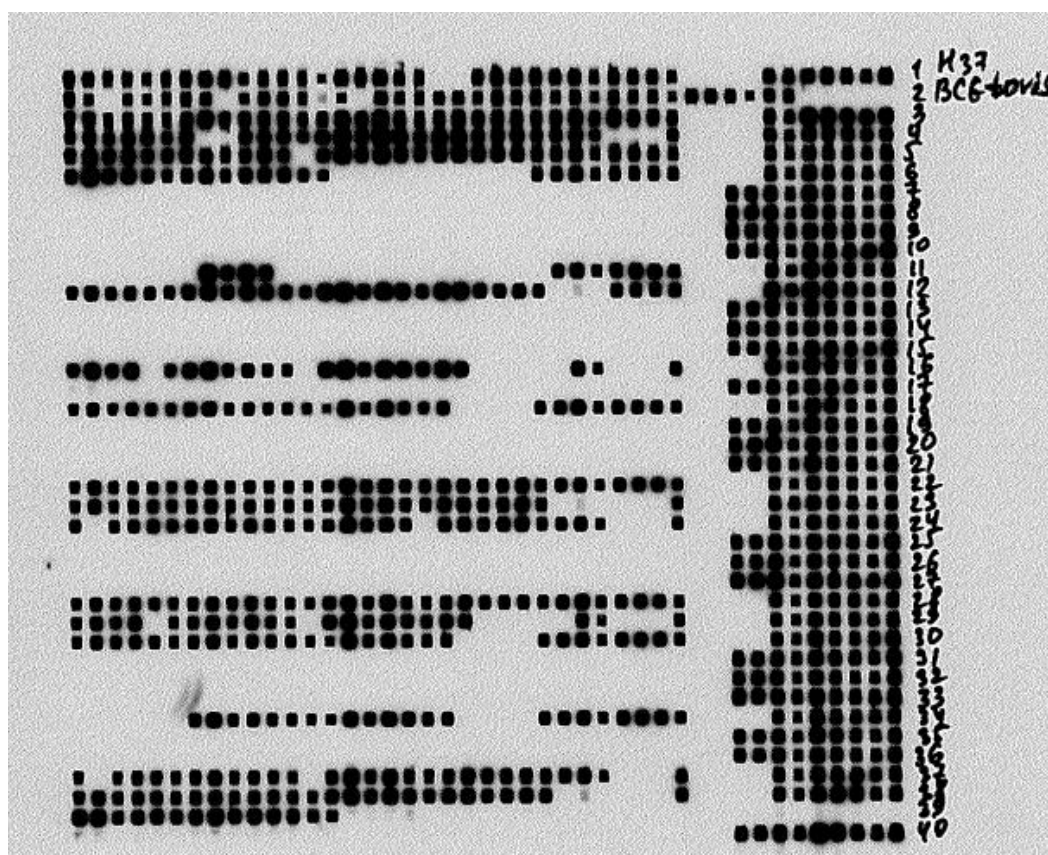


Рисунок 1. Пример снимка сполитипофиля при сполитипировании казахстанских изолятов *M.tuberculosis*.

Наиболее частым сочетанием мутаций в генах, обуславливающих устойчивость одновременно к изониазиду и рифампицину стала комбинация мутаций в 315 кодоне гена *katG* Ser→Thr (AGC→ACC) и 531 кодоне гена *rpoB* Ser→Leu (TCG→TTG) в 87 случаях (84,47%) (таблица 1).

Стоит отметить, что у одного мультирезистентного штамма не обнаружены мутации в изучаемых генах (0,97%), в одном случае определены мутации только в гене *rpoB* (Ser531Leu), обуславливающих устойчивость к рифампицину и в трех случаях (2,91%) определены мутации только в гене *katG* (Ser315Thr), определяющих устойчивость к изониазиду.

Секвенирование гена *rpoB*, обуславливающего лекарственную устойчивость к рифампицину, выявил

мутации в 4 кодонах: Ser531, Asp516, His526 и Leu533. Миссенс-мутация гена *rpoB* кодона 531 с заменой Ser/Leu была наиболее распространенной среди мутаций, ответственных за резистентность к рифампицину – у 89 (87,4%) изолятов.

В случае резистентности к изониазиду наиболее распространенной (97,0%) мутацией была нуклеотидная замена в кодоне 315 Ser/Thr, включая 5 случаев (4,8%) с двойной мутацией, когда замена одновременно происходила у гена *katG* и в -15 позиции промоторной области *fabG-inhA* оперона. Мутация в положении - 15 промоторной области *fabG-inhA* оперона была обнаружена в шести случаях (5,8%).

Таблица 1.

Мутации в генах, определяющих устойчивость к рифампицину и изониазиду среди 103 мультирезистентных клинических изолятов *M. Tuberculosis*.

Мутации в генах, обуславливающих устойчивость к INH – изониазиду (<i>katG</i> , <i>fabG-inhA</i>), RIF – рифампицину (<i>rpoB</i>)	Позиция и аминокислотная замена	Нуклеотидная замена	Количество изолятов	%
Нет мутаций	-	-	1	0,97
Только в гене <i>katG</i>	Ser315Thr	AGC-ACC	3	2,91
Только в гене <i>rpoB</i>	Ser531Leu	TCG-TTG	1	0,97
<i>katG</i>	Ser315Thr	AGC-ACC	87	84,47
<i>rpoB</i>	Ser531Leu	TCG-TTG		
<i>katG</i>	Ser315Thr	AGC-ACC	1	0,97
<i>rpoB</i>	His526Leu	CAC-CTC		
<i>fabG-inhA</i>	-15	C-T	1	0,97
<i>rpoB</i>	Ser531Leu	TCG-TTG		
<i>katG</i>	Ser315Thr	AGC-ACC	2	1,94
<i>rpoB</i>	Ser531Trp	TCG-TGG		
<i>katG</i>	Ser315Thr	AGC-ACC	1	0,97
<i>rpoB</i>	Asp516Val	GAC-GTC		
<i>katG</i>	Ser315Thr	AGC-ACC	1	0,97
<i>rpoB</i>	Leu533Pro	CTG-CCG		
<i>katG</i>	Ser315Thr	AGC-ACC	5	4,85
<i>rpoB</i>	His526Leu	CAC-CTC		
<i>fabG-inhA</i>	-15	C-T		
Всего:			103	100

Обсуждения

Demay *et.al* в своей статье описали общедоступную международную базу данных SITVITWEB, которая включала в себя информацию по генотипированию 62582 клинических изолятов *M. tuberculosis* комплекса из 153 стран происхождения пациентов (105 стран изоляции) [Demay *et.al.*, 2012]. В SITVITWEB включены данные генотипирования по 3 широко распространенным методам – сполитипирование, MIRU-VNTR анализ по стандартным 12 локусам и 5 ETR локусам.

Анализ результатов сполитипирования в базе данных SITVITWEB показал, что в Северной Америке почти все генотипы (LAM, Beijing, T, X, Haarlem) были найдены в одинаковых пропорциях (около 20%). В Южной Америке превалирует генотип LAM – 49,3%, генотипы T и Haarlem встречаются в 26,7% и 15,7% случаев, соответственно.

В Европе генотип T является самым распространенным генотипом (35%), данный генотип преобладает в Северной, Южной и Западной Европе. В то время как генотип Haarlem преобладает в Восточной Европе и является вторым по значимости генотипом распространенным в Европе (24%).

В субрегионах Африки (кроме Западной Африки и Центральной Африки, где доминирует *M.africanum* – 37% и 7,3%, соответственно) наиболее распространенным генотипом является LAM. Изоляты малоизученного семейства T присутствуют во всех субрегионах Африки в одинаковом количестве ~20%. Штаммы семейства Beijing были найдены в трех Африканских субрегионах (Северная, Восточная и Южная Африка) в разной степени, в самой высокой степени (21,5%) были идентифицированы в Южной Африке. Изоляты семейства CAS были найдены в

Восточной и Северной Африке в 11,8% и 7,2%, соответственно. Генотип S был выявлен в Северной Африке (8%) и Южной Африке (5,8%).

По результатам анализа данных сполитипирования в базе данных SITVITWEB 51,20% изолятов из России («Северная Азия») принадлежали генотипу Beijing, самому распространенному генотипу в Центральной, Восточной и Юго-Восточной Азии (~50%). По классификации стран по регионам авторы статьи отнесли Россию к новому субрегиону (Северная Азия) вместо того, чтобы включить Россию в Восточную Европу. Это связано с географическим расположением страны и со схожим распространением специфических ТБ генотипов в России (в большинстве случаев китайского генотипа Beijing) и в Центральной, Восточной и Юго-Восточной Азии. Генотип EAI является самым часто встречающимся генотипом в Юго-Восточной и Южной Азии (37,6% и 33%, соответственно). Изоляты семейства CAS были выявлены в Южной и Западной Азии в 30,1% и 9,6% случаях, соответственно. Генотип T является самым распространенным генотипом в Западной Азии (35,4%).

Было опубликовано несколько работ по изучению генотипов *M.tuberculosis*, распространенных в Казахстане [Kubica *et.al.*, 2005; Skiba *et.al.*, 2015; Akhmetova *et.al.*, 2015].

Kubica и др. [Kubica *et.al.*, 2005] в своей работе провели генотипирование 142 устойчивых клинических изолятов *M.tuberculosis*, которые были собраны в 2001 г. из 9 различных областей Казахстана. Результаты сполитипирования показали, что 100 (70,4%) из 142 изолятов были отнесены к генотипу Beijing.

Skiba и др. [Skiba *et.al.*, 2015] генотипировали 151 клинических изолятов *M.tuberculosis* из различных областей Казахстана, выделенных от ТБ пациентов в

2008 г. методами MIRU-VNTR анализа и сполитогипирования. Генотип Beijing был выявлен в 72,2% случаях (n=109), доминирующий класстер 94-32 (n=101). Другие семейства, которые были определены -LAM (n=17), Ural (n=8), NEW-1 (n=3) и новый кластер KAZ-1 (n=8). Мультирезистентные штаммы в значительной степени преобладали среди штаммов Beijing (64/109) и LAM (7/17) по сравнению с другими семействами (1/25; P=0.0006 и 0.01, соответственно) [Skiba *et al.*, 2015].

В нашей предыдущей статье [Akhmetova *et al.*, 2015] среди 77 пиразинамид-устойчивых и пиразинамид-чувствительных клинических изолятов *M.tuberculosis*, собранных в 2011 г. из разных регионов Казахстана 78,4% изолятов принадлежали генотипу Beijing.

В работе Luo D и др. [Luo *et al.*, 2019], проведенной в провинции Цзянси Китая по результатам генотипирования 157 мультирезистентных изолятов 84,1% всех образцов были отнесены к генотипу Beijing. Мутации, ассоциированные с устойчивостью к рифампицину и изониазиду были найдены в 93,6% случаях в *rpoB* гене и 88,5% случаях в *katG* гене, промоторной области *fabG-inhA* и *oxyR-ahpC*, соответственно среди мультирезистентных изолятов. Преобладала мутация Ser531Leu в гене *rpoB* (55,4%) и Ser315Thr в гене *katG* (56,3%). В другой работе [Afanas'ev *et al.*, 2011] было собрано 115 изолятов *M.tuberculosis* в Москве (Россия), в выборке преобладали МЛУ-ТБ образцы. Мутации в RRDR регионе *rpoB* гена были обнаружены у 64 (83,1%) из 77 рифампицин-устойчивых изолятов, наиболее распространенной мутацией была Ser531Leu (76,5%). Среди изониазид-устойчивых изолятов мутации были найдены в гене *katG* и промоторной области *fabG-inhA* у 79 (84%) из 94 изолятов.

В исследованиях Hillemann и др. [Hillemann *et al.*, 2005] было проведено секвенирование генов *katG*, промоторных областей *fabG-inhA* и *oxyR-ahpC*, и гена *rpoB*, отвечающих за лекарственную устойчивость к противотуберкулезным препаратам первого ряда изониазиду и рифампицину, соответственно 92 МЛУ-ТБ, 50 только изониазид устойчивых (INH^r/RMP^s) и 10 чувствительных изолятов *M.tuberculosis* из Казахстана. Анализ *rpoB* гена МЛУ-ТБ изолятов выявил 10 разных мутаций в 5 кодонах, где наиболее часто мутации встречались в кодоне 531 (65,2%), 526 (23,9%) и 516 (7,6%). В значительно высокой степени мутация *rpoB* S531L была найдена среди штаммов генотипа Beijing по сравнению с другими генотипами (71,2% vs. 46,2%, P=0.027). Среди всех 92 МЛУ-ТБ изолятов вне зависимости от их генотипа, мутация в кодоне 315 *katG* гена (S315T) была определена в 100% случаях. Однако, в контрольной группе INH^r/RMP^s S315T мутация в значительной степени преобладала среди штаммов семейства Beijing по сравнению с другими семействами (96,9% vs. 71,4%, P=0.012).

В нашей предыдущей работе, проведенной в 2009 г. [Kozhamkulov *et al.*, 2011] анализ мутаций в генах *katG*, промоторных областей *fabG-inhA* и *oxyR-ahpC*, и гене *rpoB* 323 лекарственно-устойчивых клинических изолятов *M.tuberculosis* (включая 259 МЛУ-ТБ, 59 изониазид-устойчивых и 13 рифампицин-устойчивых) идентифицировал мутации в S531L (82,7%) и S315T (98,4%) кодонах *rpoB* и *katG* генах ассоциированных с

рифампицин - и изониазид-устойчивостью являются самыми часто встречаемыми. В 526 (8,4%), 533 (1,5%) и 516 (1,1%) кодонах *rpoB* гена мутации были найдены в меньшей степени. И в 6,2% случаев мутации не были выявлены в *rpoB* гене рифампицин-устойчивых изолятов. Также как и в исследованиях Hillemann и др. [Hillemann *et al.*, 2005] мутации в промоторных областях *fabG-inhA* и *oxyR-ahpC* были определены менее чем в 10% случаев (включая двойные мутации).

Анализ литературных данных по лекарственной устойчивости и мутациям в генах, ассоциированных с мультирезистентностью показал, что в Казахстане и соседних странах отмечается преобладание мутаций S531L и S315T в *rpoB* и *katG* генах, соответственно с незначительным отклонением в частоте встречаемости в разных странах. Это подтверждает, что в данном регионе циркулируют и доминируют штаммы с мультирезистентной устойчивостью и представляют семейство Beijing.

Выводы

Была проведена оценка спектра мутаций в генах, отвечающих за лекарственную устойчивость *M. tuberculosis* к изониазиду и рифампицину и генотипирование 103 мультирезистентных (MDR) клинических изолятов *M. tuberculosis* распространенных в Казахстане. В настоящее время для популяции мультирезистентных штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующей на территории Казахстана, характерна высокая частота встречаемости мутаций с аминокислотной заменой в 531 кодоне Ser→Thr гена *rpoB*, обуславливающая устойчивость к рифампицину и преобладание мутаций в 315 кодоне *katG* гена Ser→Thr, определяющей устойчивость к изониазиду. Более 80% мультирезистентных штаммов *M.tuberculosis* составляют штаммы семейства Beijing, наиболее вирулентного и распространенного штамма во многих регионах мира. В данном исследовании было определено, что в настоящее время штаммы семейства Beijing *M.tuberculosis* являются доминирующими среди мультирезистентных и лекарственно-устойчивых штаммов в Казахстане и являются основными генотипами.

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. Afanas'ev M., Ikryannikova L., Il'ina E., Kuz'min A., Larionova E., Smirnova T., Chernousova L., Govorun V. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* circulated in Moscow, Russian Federation // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011. 30 (2): 181-91.
2. Ahmad S., Mokaddas E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis // Respir Med. 2009. №103. P. 1777-1790. 10.1016/j.rmed.2009.07.010.
3. Akhmetova A., Kozhamkulov U., Bismilda V., Chingissova L., Abildaev T., Dymova M., Filipenko M.,

Ramanculov E. Mutations in the *pncA* and *rpsA* genes among 77 *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kazakhstan // Int J Tuber Lung Dis. 2015. 19 (2): 179-184.

4. Chin K.L., Sarmiento M.E., Norazmi M.N., Acosta A. DNA markers for tuberculosis diagnosis // Tuberculosis. 2018. №113. P.139-152.

5. Demay C., Liens B., Burguiere T., Hill V., Couvin D., Millet J., Mokrousov I., Sola C., Zozio T., Rastogi N. SITVITWEB – A publicly available international multimer database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology // Infection, Genetics and Evolution. 2012. №12. P. 755-766.

6. European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis. Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance // Emerg Infect Dis. 2006. №12. P. 736-743.

7. Jagielski T., Bakula Z., Roeske K., Kamiński M., Napiórkowska A., Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z., Bielecki J. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates // J Antimicrob Chemother. 2014. №69 (9). P. 2369-75. doi: 10.1093/jac/dku161. Epub 2014 May 22.

8. Hillemann D., Kubica T., Agzamova R., Bismilda V., Rusch-Gerdes S., Niemann S. Rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Kazakhstan // Int J Tuber Lung Dis. 2005. 9 (10): 1161-1167.

9. Kozhamkulov U., Akhmetova A., Rakhimova S., Belova E., Alenova A., Bismilda V., Chingissova L., Ismailov S., Ramanculov E., Momynaliev K. Molecular characterization of rifampicin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Kazakhstan // Jpn J Infect Dis. 2011. 64 (253-255).

10. Kubica T., Agzamova R., Wright A., Aziz M.A., Rakhishvili G., Bismilda V., Richter E., Rusch-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.

11. Liu L., Jiang F., Chen L., Zhao B., Dong J., Sun L., Zhu Y., Liu B., Zhou Y., Yang J., Zhao Y., Jin Q., Zhang X. The impact of combined gene mutations in *inhA* and *ahpC* genes on high levels of isoniazid resistance amongst *katG* non-315 in multidrug-resistant tuberculosis isolates from China // Emerg Microbes Infect. 2018. №7 (1). P. 183. doi: 10.1038/s41426-018-0184-0.

12. Luo D., Chen Q., Xiong G., Peng Y., Liu T., Chen X., Zeng L., Chen K. Prevalence and molecular characterization of multidrug-resistant *M.tuberculosis* in Jiangxi province, China // Sci Rep. 2019. 9 (1): 7315.

13. Mathuria J.P., Srivastava G.N., Sharma P., Mathuria B.L., Ojha S., Katoch V.M. et al. Prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its association with drug resistance in North India // J Infect Public Health. 2016.

14. Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan. Statistic TB Review (Editor Adenov M.M.). National TB Center, Almaty, 2018. P. 75 (in Russian).

15. Miotto P., Zhang Y., Cirillo D.M., Yam W.C. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis // Respirology. 2018. №23. P. 1098-1113.

16. Myo T. Zaw, Nor A. Emran, Zaw Lin. Mutations inside rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // Journal of Infection and Public Health. 2018. №11. P. 605-610.

17. Nguyen L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis* an update // Arch. Toxicol. 2016. №90. P. 1585-604.

18. Prim R.I., Marcos M.A., Senna S.G., Nogueira C.L., Figueiredo A.C.C. and de Oliveira J.G. Molecular profiling of drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* // Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015. №110. P. 618-623.

19. Ramazanzadeh R., Sayhemiri K. Prevalence of Beijing family in *Mycobacterium tuberculosis* in world population: systematic review and meta-analysis // Int J Mycobacteriol. 2014. №3 (1). P. 41-45.

20. Rattan A., Kalia A., Ahmad N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives // Emerg Infect Dis. 1998. №4. P. 195-209.

21. Skiba Y., Mokrousov I., Ismagulova G., Maltseva E., Yurkevich N., Bismilda V., Chingissova L., Abildaev T., Aitkhozhina N. Molecular snapshot of *Mycobacterium tuberculosis* population in Kazakhstan: a country-wide study // Tuberculosis. 2015. №95. P. 538-546.

22. Sreevatsan S., Pan X., Zhang Y., Deretic V., Musser J.M. Analysis of the *oxyR-ahpC* region in isoniazid-resistant and-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities // Antimicrob Agents Chemother. 1997. №41. P.600-606.

23. Zhang Y., Heym B., Allen B., Young D., Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* // Nature. 1992. №358. P. 591-3.

24. Zhang Y., Yew W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // Int J Tuberc Lung Dis. 2009. №13. P. 1320-1330.

25. World Health Organization (1998): Laboratory services in tuberculosis control. Part III: culture. Global Tuberculosis Programme (WHO/TB/98.258). Geneva: World Health Organization, 1998, P.10-28.

26. World Health Organization (2003): Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis: Second edition World Health Organization. Global Tuberculosis Programme (WHO/CDS/TB/2003.320). Geneva: World Health Organization, 2003, P.8-12.

27. World Health Organization. Global tuberculosis report 2017. Geneva: World Health Organization, 2017. P.21

28. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization, 2018. P.1-4.

Контактная информация:

Ахметова Айнур Жармухамбетовна - MSc, 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 409.

E-mail: ainur.akhmetova2@nu.edu.kz;

Телефон: +7 7172 70 93 18