

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В Г. АСТАНА

Ауганова Д.Н.<sup>1</sup> , Атавлиева С.Ш.<sup>1</sup> , Амиргазин А.О.<sup>1</sup> , Акишева А.С.<sup>2</sup>, Абельденов С.К.<sup>1</sup> , Цепке А.Б.<sup>2</sup>, Тарлыков П.В.<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Национальный центр биотехнологии, Кургальжинское шоссе, здание 13/5, Астана, 010000, Казахстан

<sup>2</sup> ГКП «Городской центр фтизиопульмонологии» акимата г. Астана, улица А1, строение 5, Астана, 010000, Казахстан  
auganova@biocenter.kz

## АБСТРАКТ

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения Казахстан занимает лидирующие позиции по количеству случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ). Данная работа направлена на изучение клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулировавших в г. Астана в 2021–2022 гг. Из 198 собранных изолятов *M. tuberculosis* 175 изолятов (88,38%) принадлежали семейству L2/Beijing, оставшиеся 23 (11,62%) принадлежали семейству L4. В работе применялось генотипирование изолятов, направленное на определение генетического семейства *M. tuberculosis*, а также полногеномное секвенирование отобранных 24 изолятов L2/Beijing с их последующим биоинформатическим анализом. По результатам анализа 62,5% изолятов были отнесены к генотипу Central Asia Outbreak. Остальные генотипы были представлены Central Asia (20,8%), B0/W148 (12,5%) и Clade A (4,2%). Кроме того, была проведена фенотипическая и генотипическая характеристика устойчивости выбранных изолятов к противотуберкулёзным препаратам. Одной из возможных причин распространения резистентных форм туберкулеза на территории страны является преобладание генетического кластера Central Asia Outbreak, ассоциированного с МЛУ-ТБ.

**Ключевые слова:** *Mycobacterium tuberculosis*, лекарственная устойчивость, рифампицин, изониазид.

## ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез, вызываемый бактериальным агентом *Mycobacterium tuberculosis*, является одним из самых смертельных инфекционных заболеваний в мире. Текущие статистические данные относят туберкулез к высококонтагиозным инфекциям. Согласно отчетам ВОЗ, ежегодно количество новых случаев заболевания оценивается в среднем в 10 миллионов случаев [1, 2]. Инфекционное заболевание поражает легкие в большей степени, но также может поражать и другие органы.

Микобактерии не образуют споры, в оптимальных условиях при температуре 37°C количество бактерий удваивается каждые сутки и примерно к третьей неделе формируются шероховатые колонии желто-коричневого оттенка на твердой питательной среде [3]. Референсный штамм H37Rv был первым представителем микобактерий, чей геном был полностью прочтен. Геном состоит из 4018 генов с высоким процентом GC (65,9%); его размер составляет 4,4 Мб [4].

Устойчивость к анти-туберкулезным препаратам является одной из причин, ухудшающей эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу. Процент чувствительности к противотуберкулезным препаратам первого ряда быстро снижается, как указано в текущем докладе ВОЗ по туберкулезу. Глобальное бремя туберкулеза остается высоким. В 2022 г. было зарегистрировано 10,6 млн. случаев заболевания (на 4,5% больше зарегистрированных случаев по сравнению с 2020 годом) и 1,6 млн. смертельных случаев [1, 5]. Бремя лекарственно-устойчивого туберкулеза также выросло: количество случаев рифампицин-резистентного туберкулеза, подтвержденного лабораторными тестами с 2020 года, увеличилось на 3% [6].

В 2021 году глобальной программой по борьбе с туберкулезом Всемирной организации здравоохранения

(ВОЗ) было принято обновленное определение туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ). Туберкулез, вызванный штаммами *Mycobacterium tuberculosis* и соответствующие определения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) или рифампицин-устойчивого туберкулеза (РУ-ТБ) и также имеющего устойчивость к фторхинолону и к одному из препаратов, относящихся к группе А. Противотуберкулезные препараты группы А являются высокоэффективной группой лекарств второго ряда, применяющих при длительном лечении, включают в себя левофлоксацин, моксифлоксацин, бедаквилин и линезолид [7].

Микобактерия является клональной бактерией, имеющей отличительные характеристики, зависящие от различных факторов, к примеру от географического происхождения, или подвергающиеся изменениям, увеличению численности и глобальному распространению [8]. Примером последнего фактора выступает семейство Beijing и его сублинии.

Комплекс *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) разделяют на 7 линий в зависимости от распространения по географическим регионам [9]. Линия L2 состоит из следующих сублиний: L2.1 и L2.2. L2.1 часто встречается в южных регионах Китая. Также, известно другое название данной линии – «прото-Beijing». Другая же линия (L2.2) – Beijing, состоит из нескольких сублиний [10].

Маркерами сублиний семейства Beijing являются два маркера делеции (RD207, RD105). Согласно исследованиям эволюции микобактерии генотип L2.2 подразделяют на две сублинии: предковая и современная [11]. Предковые штаммы L2.2 образуют отдельный генетический кластер на филогенетическом дереве. Известно, что современная сублиния является причиной вспышек данной инфекции в мире, и чаще всего ее связывают с приобре-

тением лекарственной устойчивости [12]. Маркеры делеции определяют различие прото-Beijing изолятов с интактным участком RD207 и делецией RD105. Также, для идентификации применяют методы связанные с определением вставки IS6110 в геномной области NTF локуса [13].

Эволюция прото-Beijing штаммов долгое время была спорным вопросом, так как высокая доля распространения приходится на северные регионы Китая, что исконно считалось местом возникновения этого генотипа. Данное предположение подтвердилось в одном исследовании, однако опровергалось в другом [14]. Прото-Beijing изоляты были найдены и в южных регионах Китая. Таким образом, была выдвинута идея о последовательном происхождении и эволюции генотипа [10]

Компенсаторные мутации возникают после приобретения резистентной мутации и снижают затраты на приспособление, связанные с приобретением устойчивости. Компенсаторные мутации определяются как побочный эффект, связанный с появлением устойчивости к изониазиду и аминогликозидам. Механизм действия рифампицина основан на связывании РНК-полимеразы, кодируемой геном *rpoB*, что приводит к ингибированию процесса транскрипции. Клинические изоляты *Mycobacterium tuberculosis*, устойчивые к рифампицину, состоят из мутаций в детерминантной области протяженностью 81 п.н. гена *rpoB* [15].

При изучении истории эволюции, устойчивости и передачи изолятов *M. tuberculosis* на территории стран бывшего СССР, кластер, циркулирующий в данном регионе, получил название Центральное-Азиатская вспышка (CAO). Именно на долю CAO приходилось около трех четвертей всех изолятов МЛУ-ТБ в годы проведения данного исследования [16].

Несколько исследований показывают, что основная особенность роста заболеваемости туберкулеза во всем мире связана с предполагаемой приспособляемостью штаммов *M. tuberculosis*. В большинстве исследований изучалось приобретение бактериями устойчивости к антибиотикам, связанными с затратами на приспособляемость [5, 17]. Мутации могут приводить к структурным и функциональным изменениям бактериальных белков. Устойчивость к препаратам может быстро развиваться, когда происходят мутации в генах, контролирующих транскрипцию и синтез белка [18, 19]

На сегодняшний день наблюдается тенденция роста количества случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью. Ввиду этого изучение компенсаторных мутаций лекарственно-устойчивых изолятов *M. tuberculosis* поможет понять механизмы развития и пере-

дачи лекарственной устойчивости.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Фенотипический анализ и выделение ДНК

Образцы лекарственно-устойчивых изолятов *Mycobacterium tuberculosis* были культивированы ГКП «Городской центр фтизиопульмонологии» акимата г. Астана. Фенотипический анализ образцов получен с применением системы ВАСТЕС MGIT 960 (Becton Dickinson), определяющей чувствительность к препаратам, применяемых при терапии туберкулеза. Для определения лекарственной чувствительности образцы были высеяны на среде с добавлением противотуберкулезных препаратов первой линии – изониазида (INH), рифампицина (RIF), стрептомицина (STR), этамбутола (EMB) и пипразинамида (PZA), а также с применением препаратов второй линии – левофлоксацина (LFQ), моксифлоксацина (MFQ), амикацина (AMK), канамицина (KAN), капуреомидина (CAP), бедаквилина (BDQ) и клофазимина (CFZ). Перед проведением анализа по определению генотипов, образцы были инактивированы нагреванием при 95°C.

Всего было собрано 198 образцов изолятов *Mycobacterium tuberculosis* в виде инактивированного кипячением термолизата. Далее проводилось выделение очищенной ДНК из термолизата. Для выделения ДНК был использован набор QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) с использованием оптимизированного протокола для выделения ДНК *M. tuberculosis*.

### Аmplification региона IS6110 *dnaA-dnaN*

Генотипирование семейства L2 (Beijing) проводилось определением вставки региона IS6110 *dnaA-dnaN*, характерной для данного семейства путем постановки ПЦР в режиме реального времени с использованием Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time System (Bio-Rad Laboratories). Реакционная смесь состояла из 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific), 200 мкМ dNTP, 4 пмоль каждого праймера и 1,5 пмоль флуоресцентно меченого зонда FAM и 2,5 пмоль - HEX, последовательности которых представлены в таблице 1, 1 е.а. Taq DNA Pol (Thermo Scientific) и ДНК с концентрацией от 0,5 до 1 нг. Программа амплификации включает в себя 94°C – 3 мин, затем 30 циклов: 94°C – 10 сек, 60°C – 50 сек. После определения генотипов изолятов было отобрано 26 образцов, в том числе 3 дубликата с разностью во времени сбора изолятов 1 месяц.

### Полногеномное секвенирование

Пробоподготовку изолятов для полногеномного секвенирования проводили с применением набора Illumina DNA Prep Kit, Nextera Index Kit и MiSeq Reagent Kit v3

**Таблица 1.** Последовательности праймеров и флуоресцентно меченых зондов, применяемые для амплификации

Наименование праймера	Последовательность
BGR	5'-CGCCGGGACTGTATGAGTCT-3'
BGF2	5'-CTCTCCCAGGTACACCAGTCA-3'
BGRi	5'-TCGATGAACCACCTGACATGAC-3'
Наименование зонда	Последовательность
FAM	5'-CGGCATGTCCGGAGACTCCAGTTC-3'
HEX	5'-TGGCTGTGAGTGTGCTGTCGCTGTGCACA-3'

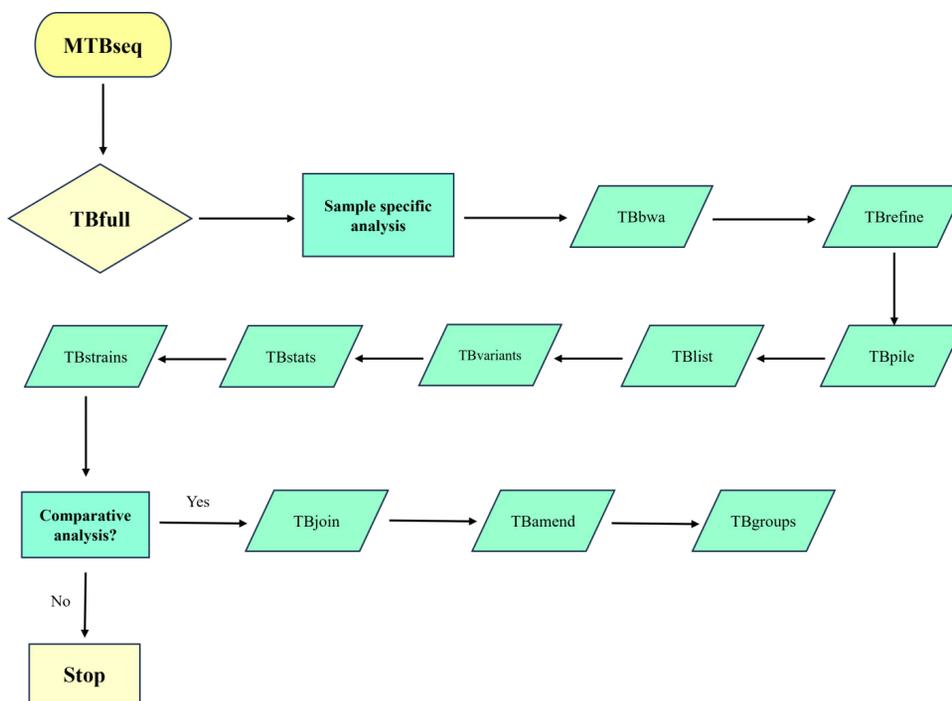


Рис. 1. Схематическое представление анализа изолятов на основе сервера MTBseq [20].

(600 циклов) в соответствии с протоколом производителя. Количественная оценка ДНК библиотек проводилась определением концентрации библиотек с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen). После пулирования библиотека была очищена с помощью магнитных частиц AMPure XP в соотношении 0,8:1. Для загрузки в секвенирующую систему Illumina Miseq была использована библиотека с финальной концентрацией 8 пмоль. Секвени-

рование проводилась на платформе Miseq (Illumina).

Биоинформатический и филогенетический анализ

Последовательности ДНК, полученные на приборе Miseq, были выравнены, и картированы с применением сервера MTBseq v1.0.3 ([https://github.com/ngs-fzb/MTBseq\\_source](https://github.com/ngs-fzb/MTBseq_source)). Далее были определены полиморфизмы, а также проведен филогенетический и сравнительный анализ изолятов. Все этапы биоинформатического ана-

**Таблица 2.** Сравнение фенотипических и генотипических характеристик клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, отобранных для полногеномного секвенирования.

Противотуберкулезные препараты и анализы	Фенотипический анализ	Генотипические анализы				
		TB-Profiler		PhyResSe		
	S	R	S	R	S	R
Изониазид	2	22	3	21	2	22
Рифампицин	2	22	3	21	2	22
Этамбутол	4	20	3	21	2	22
Пиразинамид	14	10	15	9	12	12
Стрептомицин	-*	-*	3	21	2	22
Фторхинолоны (Ofx, Mfx, Lfx, Cpx)	6	18	8	16	7	17
Аминогликазиды (Km, Am)	23	1	19	5	20	4
Клофазимин	23	1	23	1	22	2
Этионамид, Протионамид	17	7	22	2	10	14
Циклосерин	24	-	23	1	24	-
Парааминосалициловая кислота	-*	-*	23	1	23	1
Линезолид, бедаквилин	19	5	23	1	22	2

\* Фенотипические тесты на определение устойчивости к стрептомицину и парааминосалициловой кислоте не были проведены.

лиза представлены на Рисунке 1, включая этап для сопоставления с эталонным геномом (TBbwa), этап выравнивания ридов с учетом инсерций и делеций (TBrefine). Следующий этап – создание pileup файлов для суммирования выровненных ридов (TBpile). TBlist – этап для создания списка позиции из выходного файла предыдущей стадии – pileup, содержащий данные о количестве нуклеотидов в выровненных ридов для каждой позиции генома. TBvariants – обеспечивает выход файлов вариации последовательностей из списка позиции TBlist. TBstat – при данном шаге происходит расчет количества картирования и обнаружение вариации набора данных. На последнем этапе TBstrain – происходит классификация семейств и генотипов на основе SNP. Визуализация посчитанного дерева проводилась с помощью FigTree v1.4.4.

Помимо этого, также были применены биоинформатические инструменты (PhyResSe, TB-profiler, Mykrobe) для определения генотипов изолятов и устойчивости к противотуберкулезным препаратам.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Было выделено ДНК из 198 клинических образцов *Mycobacterium tuberculosis* с лекарственной устойчивостью. При анализе генотипов на основе ПЦР для определения вставки региона IS6110 *dnaA-dnaN* было выявлено, что 175 образцов относятся к семейству L2 Beijing, что составляет 88,38% всей выборки, оставшиеся 23 изолята (11,62%) принадлежали семейству L4 *Mycobacterium tuberculosis*.

Проведен сравнительный анализ показателей фенотипического и генотипического исследования устойчивости к антибиотикам и противотуберкулезным препаратам. Сравнение генотипических характеристик резистентности проводили в биоинформатических инструментах TB-Profiler, PhyResSe и MTBseq. Результаты сравнения представлены в таблице 2.

При сравнении результатов фенотипического и гено-

типических тестов можно заметить несоответствия. Результаты, полученные с помощью TB-Profiler и PhyResSe различаются для некоторых противотуберкулезных препаратов. В меньшей степени расхождения видны для аминогликозидов, клофазимина, циклосерина и линезолида. Количество устойчивых изолятов для клофазимина и линезолид/бедаквилина при анализе с помощью TB-Profiler было 1 из 24 (4,2%), в то время как PhyResSe показал 2 из 24 (8,3%) резистентных изолятов. При исследовании аминогликозидов на устойчивость, TB-Profiler определил 5 из 24 (20,8%) резистентных изолятов, в то время как PhyResSe показал 4 из 24 (16,7%). Аналогичная картина складывается для циклосерина, TB-Profiler определил 1/24 (4,2%) резистентный изолят, в то время как PhyResSe установил полную восприимчивость к антибиотику. Существенные различия можно наблюдать при сравнении результатов тестов пиразинамида и этионамид/протионамида. TB-Profiler определил 9/24 (37,5%) резистентных изолятов к пиразинамиду, в то время как PhyResSe 12/24 (50%) клинических изолятов. При анализе устойчивости к этионамид/протионамиду было выявлено, что PhyResSe определил 14/24 (58,3%) устойчивых изолятов, что является на 12 изолятов больше показателей TB-Profiler 2/24 (8,3%).

Сполиготики всех изолятов в выборке были определены и совпадали с профилем изолятов семейства L2 (Таблица 3).

На основе полученных полногеномных данных было сконструировано филогенетическое дерево. В качестве референсного штамма был использован геном *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NC\_000962.3) по умолчанию. Выравнивание, сопоставление с референсным геномом, картирование и удаления повторов проводили на сервере MTBseq. Визуализацию сконструированного дерева проводили с помощью FigTree (Рисунок 2).

В выборке было определено 4 кластера семейства B2 Beijing: преобладающие количество относилось к Central Asia Outbreak 15/24 (62,5%). К кластеру Central Asia, явля-

**Таблица 3.** Сублинии, профили сполиготипов и маркеров делеции клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*.

Изолят	Сполиготип	Маркер делеции	Сублиния	
1028	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
1561	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Europe/Russian W148 outbreak
3775	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
4800	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
5023	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia
5099	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
5135	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
5194	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
5195	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
5219	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
5264	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Europe/Russian W148 outbreak
5313	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
5382	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia

5628	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Europe/Russian W148 outbreak
6242	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia
6466	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia
6616	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
6646	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
7076	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia
7357	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
7389	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
7678	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
7923	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Central Asia Outbreak
8316	000000000003771	RD105, RD207, RD181	2.2.1	Clade A

ющемся вторым по количеству изолятов относится 5/24 (20,8%), B0/W148 (12,5%), и наименее встречаемый кластер – Clade A (4,2%).

Анализ компенсаторных мутаций был проведен посредством поиска SNP в отсековенных образцах. Поиск компенсаторных мутаций был осуществлен по кодирующим РНК-полимеразу генам *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, отвечающим за компенсаторные мутации. Например, предполагаемый компенсаторный механизм мутации *rpoB*, найденной в одном из исследованных образцов заключается в аминокислотной замене *Thr585Ser*, которая приводит к ингибированию процесса транскрипции (Таблица 4). Другим примером является замена глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту. Данная замена приводит к мутации в гене *rpoC*, что было идентифицировано в 45% (9/20) всех секвенированных образцов.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной статье обсуждались лекарственная устойчивость, компенсаторные мутации и текущая ситуация с устойчивостью к противотуберкулезным препаратам в

Республике Казахстан. Показано, что клональные комплексы L2/Beijing преобладают в популяции лекарственно-устойчивых изолятов г. Астана. Из 198 собранных изолятов *M. tuberculosis* 175 изолятов (88,38%) принадлежали семейству L2/Beijing, оставшиеся 23 (11,62%) принадлежали семейству L4. Полногеномное секвенирование отобранных 24 изолятов L2/Beijing с их последующим биоинформатическим анализом показало преобладание генотипа Central Asia Outbreak, представляющего 62,5% изолятов. Больше соответствие предположения устойчивости противотуберкулезным препаратам первой линии с фенотипическим анализом показал PhyResSe. Значительное расхождение TB-Profler и PhyResSe в количестве проявляются при определении устойчивости протионамида этионамида.

Было обнаружено 13 компенсаторных мутации в генах *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* кодирующие РНК-полимеразу. Эволюция лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* обусловлена различными факторами с разным эффектом. На частоту и тип мутации могут влиять генотипы лекарственной устойчивости. Различные мутации могут вызы-

**Таблица 4.** Компенсаторные мутации в семействе L2/Beijing, связанные с мутацией *rpoB* S450L, где П – полярный тип замены, а НП – неполярный тип замены [21]

Ген	Компенсаторная мутация	Частота	Тип замены	Энергия ( $\Delta\Delta G$ , ккал/моль)	Гибкость ( $\Delta\Delta S_{\text{вib}}$ , ккал/моль)
<i>rpoC</i>	V1039A	4	НП-НП	1,266	-3,570
<i>rpoC</i>	D485N	2	П-П	0,917	-4,029
<i>rpoC</i>	G519S	2	НП-П	1,024	-3,801
<i>rpoC</i>	K717Q	2	П-П	1,028	-3,533
<i>rpoA</i>	T187A	2	П-НП	0,143	0,104
<i>rpoC</i>	V431M	1	НП-НП	1,064	-4,096
<i>rpoC</i>	V483G	1	НП-НП	-0,793	-3,064
<i>rpoC</i>	V517L	1	НП-НП	1,785	-4,121
<i>rpoB</i>	Y564H	1	П-П	1,399	-3,783
<i>rpoB</i>	T585S	1	П-П	0,025	-4,287
<i>rpoB</i>	E761D	1	П-П	1,463	-4,275
<i>rpoA</i>	D190A	1	П-НП	0,025	0,595
<i>rpoA</i>	G31S	1	НП-П	0,083	-0,448

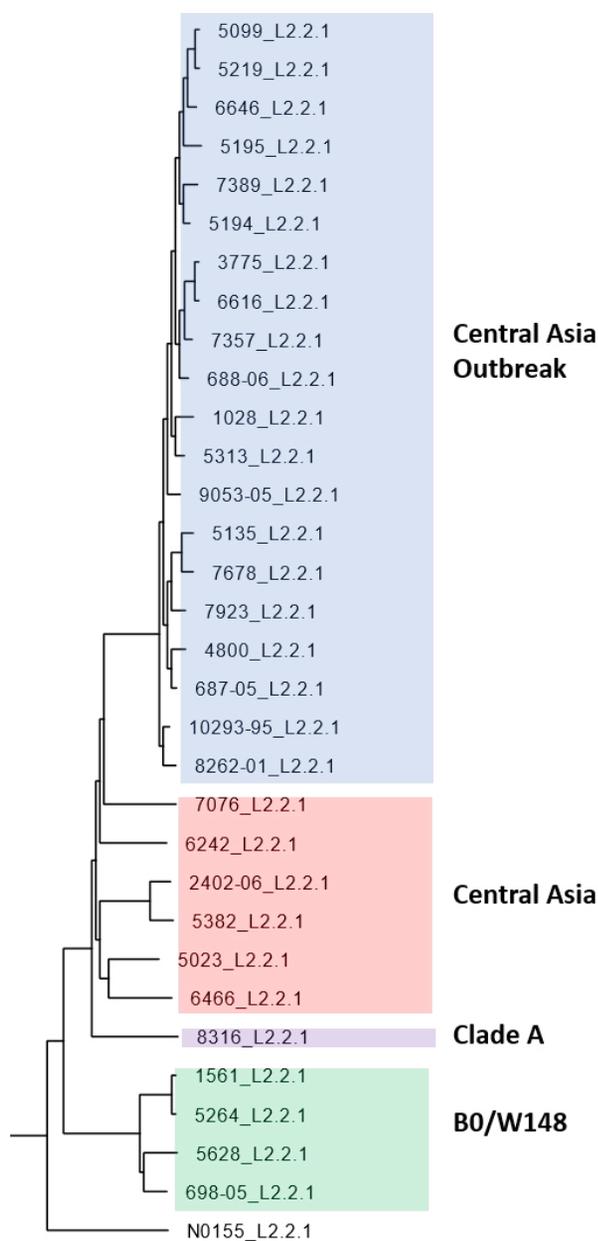


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное с помощью сервера MTBseq и визуализированное в FigTree.

вать разные уровни лекарственной устойчивости и разные затраты на приспособляемость. Он связан с МЛУ-ТБ, а также с высоким уровнем лекарственной устойчивости и компенсаторными мутациями. Для борьбы с лекарственно-устойчивым туберкулезом необходимы новые подходы и новые противотуберкулезные препараты. В этом смысле детальное знание эволюционных механизмов способствует разработке точных моделей для лучшего контроля лекарственной устойчивости.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Это исследование выполнено в рамках гранта AP19676216, финансируемого Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

## ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Global Tuberculosis Reports 2023 // World Health Organization. – 2023.
2. United Nations. Sustainable Development Goals Report 2022 // United Nations. – 2022.
3. Gordon S. V., Parish T. Microbe profile: Mycobacterium tuberculosis: Humanity's deadly microbial foe // Microbiology. – 2018. – Vol. 164. – №. 4. – С. 437–439.
4. Cole S., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., ... & Barrell B. G. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence // Nature. – 1998. – Vol. 393. – №. 6707. – С. 537–544.
5. WHO. Global Tuberculosis Reports 2021 // World Health Organization. – 2021.
6. WHO. Global Tuberculosis Reports 2020 // World Health Organization. – 2020.
7. WHO. WHO consolidated guidelines on tuberculosis // World Health Organization Press. – 2022.
8. Comas I., Coscolla M., Luo T., Borrell S., Holt K. E., Kato-Maeda M., ... & Gagneux S. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans // Nature Genetics. – 2013. – Vol. 45. – №. 10. – P. 1176–1182.
9. Gagneux S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis // Nature Reviews Microbiology. Nature Publishing Group. – 2018. – Vol. 16. – №. 4. – P. 202–213.
10. Luo T., Comas I., Luo D., Lu B., Wu J., Wei L., ... & Gao Q. Southern East Asian origin and coexpansion of Mycobacterium tuberculosis Beijing family with Han Chinese // Proceedings of the National Academy Sciences. – 2015. – Vol. 112. – №. 26. – P. 8136–8141.
11. Mokrousov I., Narvskaya O., Otten T., Vyazovaya A., Limeschenko E., Steklova L., Vyshnevskiy B. Phylogenetic reconstruction within Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype in northwestern Russia // Research in Microbiology. – 2002. – Vol. 153. – №. 10. – P. 629–637.
12. Coscolla M., Gagneux S. Consequences of genomic diversity in Mycobacterium tuberculosis // Seminars in Immunology. Academic Press. – 2014. – Vol. 26. – №. 6. – P. 431–444.
13. Mokrousov I., Ly H. M., Otten T., Lan N. N., Vyshnevskiy B., Hoffner S., Narvskaya O. Origin and primary dispersal of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: clues from human phylogeography // Genome Research. – 2005. – Vol. 15. – №. 10. – P. 1357–1364.
14. Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg N., Lecher S., Willery E., ... & Wirth T. Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage // Nature Genetics. Nature Publishing Group. – 2015. – Vol. 47. – №. 3. – P. 242–249.
15. Ma P., Luo T., Ge L., Chen Z., Wang X., Zhao R., ... & Bao L. Compensatory effects of M. tuberculosis rpoB mutations outside the rifampicin resistance-determining region // Emerging Microbes & Infections. – 2021. – Vol. 10. – №. 1. – P. 743–752.
16. Merker M., Barbier M., Cox H., Rasigade J. P.,

Feuerriegel S., Kohl T. A., ... & Niemann S. Compensatory evolution drives multidrug-resistant tuberculosis in Central Asia // *Elife*. – 2018. – Vol. 7. – P. 1–31.

17. WHO. Global Tuberculosis Reports 2018 // World Health Organization. – 2018.

18. Nahid P., Mase S. R., Migliori G. B., Sotgiu G., Bothamley G. H., Brozek J. L., ... & Seaworth B. Treatment of drug-resistant tuberculosis an official ATS/CDC/ERS/IDSA clinical practice guideline // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2019. – Vol. 200. – №. 10. – P. 93–142.

19. Millard J., Ugarte-Gil C., Moore D. A. J. Multidrug resistant tuberculosis // *BMJ*. – 2015. – Vol. 350. – P. 1–6.

20. Kohl T. A., Utpatel C., Schleusener V., De Filippo M. R., Beckert P., Cirillo D. M., Niemann S. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of Mycobacterium tuberculosis complex isolates // *PeerJ*. PeerJ Inc. – 2018. – Vol. 6. – P. 1-13.

21. Aуганова D., Атвлиева S., Амргазин А., Акисхева А., Тсепке А., Тарлыков P. Genomic Characterization of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis L2/Beijing Isolates from Astana, Kazakhstan // *Antibiotics*. – 2023. – Vol. 12. – №. 10. – P. 1–17.

## REFERENCES

1. WHO. Global Tuberculosis Reports 2023 // World Health Organization. – 2023.

2. United Nations. Sustainable Development Goals Report 2022 // United Nations. – 2022.

3. Gordon S. V., Parish T. Microbe profile: Mycobacterium tuberculosis: Humanity's deadly microbial foe // *Microbiology*. – 2018. – Vol. 164. – №. 4. – P. 437–439.

4. Cole S., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., ... & Barrell B. G. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence // *Nature*. – 1998. – Vol. 393. – №. 6707. – P. 537–544.

5. WHO. Global Tuberculosis Reports 2021 // World Health Organization. – 2021.

6. WHO. Global Tuberculosis Reports 2020 // World Health Organization. – 2020.

7. WHO. WHO consolidated guidelines on tuberculosis // World Health Organization Press. – 2022.

8. Comas I., Coscolla M., Luo T., Borrell S., Holt K. E., Kato-Maeda M., ... & Gagneux S. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans // *Nature Genetics*. – 2013. – Vol. 45. – №. 10. – P. 1176–1182.

9. Gagneux S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis // *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group. – 2018. – Vol. 16. – №. 4. – P. 202–213.

10. Luo T., Comas I., Luo D., Lu B., Wu J., Wei L., ... & Gao Q. Southern East Asian origin and coexpansion of Mycobacterium tuberculosis Beijing family with Han Chinese // *Proceedings of the National Academy Sciences*. – 2015. – Vol. 112. – №. 26. – P. 8136–8141.

11. Mokrousov I., Narvskaya O., Otten T., Vyazovaya A., Limeschenko E., Steklova L., Vyshnevskiy B. Phylogenetic reconstruction within Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype in northwestern Russia // *Research in Microbiology*. – 2002. – Vol. 153. – №. 10. – P. 629–637.

12. Coscolla M., Gagneux S. Consequences of genomic diversity in Mycobacterium tuberculosis // *Seminars in Immunology*. Academic Press. – 2014. – Vol. 26. – №. 6. – P. 431–444.

13. Mokrousov I., Ly H. M., Otten T., Lan N. N., Vyshnevskiy B., Hoffner S., Narvskaya O. Origin and primary dispersal of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: clues from human phylogeography // *Genome Research*. – 2005. – Vol. 15. – №. 10. – P. 1357–1364.

14. Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg N., Lecher S., Willery E., ... & Wirth T. Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage // *Nature Genetics*. Nature Publishing Group. – 2015. – Vol. 47. – №. 3. – P. 242–249.

15. Ma P., Luo T., Ge L., Chen Z., Wang X., Zhao R., ... & Bao L. Compensatory effects of M. tuberculosis rpoB mutations outside the rifampicin resistance-determining region // *Emerging Microbes & Infections*. – 2021. – Vol. 10. – №. 1. – P. 743–752.

16. Merker M., Barbier M., Cox H., Rasigade J. P., Feuerriegel S., Kohl T. A., ... & Niemann S. Compensatory evolution drives multidrug-resistant tuberculosis in Central Asia // *Elife*. – 2018. – Vol. 7. – P. 1–31.

17. WHO. Global Tuberculosis Reports 2018 // World Health Organization. – 2018.

18. Nahid P., Mase S. R., Migliori G. B., Sotgiu G., Bothamley G. H., Brozek J. L., ... & Seaworth B. Treatment of drug-resistant tuberculosis an official ATS/CDC/ERS/IDSA clinical practice guideline // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2019. – Vol. 200. – №. 10. – P. 93–142.

19. Millard J., Ugarte-Gil C., Moore D. A. J. Multidrug resistant tuberculosis // *BMJ*. – 2015. – Vol. 350. – P. 1–6.

20. Kohl T. A., Utpatel C., Schleusener V., De Filippo M. R., Beckert P., Cirillo D. M., Niemann S. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of Mycobacterium tuberculosis complex isolates // *PeerJ*. PeerJ Inc. – 2018. – Vol. 6. – P. 1-13.

21. Aуганова D., Атвлиева S., Амргазин А., Акисхева А., Тсепке А., Тарлыков P. Genomic Characterization of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis L2/Beijing Isolates from Astana, Kazakhstan // *Antibiotics*. – 2023. – Vol. 12. – №. 10. – P. 1–17.

**MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ISOLATES CIRCULATING IN ASTANA****Auganova D.<sup>1</sup>, Atavliyeva S.<sup>1</sup>, Amirgazin A.<sup>1</sup>, Akisheva A.<sup>2</sup>, Abeldenov S.<sup>1</sup>, Tsepke A.<sup>2</sup>, Tarlykov P.<sup>1</sup>**<sup>1</sup> National Center for Biotechnology, 13/5 Korgalzhyn Highway, Astana, 010000, Kazakhstan<sup>2</sup> City Center for Phthisiopulmonology of the Akimat of Astana, A1 Street, Building 5, 010000, Astana, Kazakhstan  
auganova@biocenter.kz**ABSTRACT**

According to the World Health Organization, Kazakhstan takes a leading position in the number of cases of multidrug-resistant tuberculosis. This work is aimed at studying clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* circulating in Astana in 2021–2022. Among 198 *M. tuberculosis* isolates collected, 175 (88.38%) belonged to the L2/Beijing family, and the remaining 23 samples (11.62%) belonged to the L4 family. During the research used genotyping aimed at determining the genetic family of *M. tuberculosis*, as well as whole-genome sequencing of selected 24 L2/Beijing isolates with their subsequent bioinformatics analysis. According to the analysis results, 62.5% of isolates were assigned to the Central Asia Outbreak genotype. The remaining genotypes were represented by Central Asia (20.8%), B0/W148 (12.5%) and Clade A (4.2%). Besides that, phenotypic and genotypic characterization of the resistance of selected isolates to anti-tuberculosis drugs was carried out. One of the possible reasons for the spread of resistant forms of tuberculosis in the country is the predominance of the Central Asia Outbreak genetic cluster associated with MDR-TB.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, drug-resistance, rifampicin, isoniazid.**АСТАНА ҚАЛАСЫНДА ТАРАЛҒАН MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ИЗОЛЯТТАРЫНЫҢ МОЛЕКУЛЯРЛЫ ГЕНЕТИКАЛЫҚ СИПАТАМАЛАРЫ****Ауганова Д.Н.<sup>1</sup>, Атавлиева С.Ш.<sup>1</sup>, Амиргазин А.О.<sup>1</sup>, Акишева А.С.<sup>2</sup>, Абельденов С.К.<sup>1</sup>, Цепке А.Б.<sup>2</sup>, Тарлыков П.В.<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Ұлттық биотехнология орталығы, Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан<sup>2</sup> Астана қаласы әкімдігінің «Қалалық фтизиопульмонологиялық орталығы» мемлекеттік коммуналдық кәсіпорны, А1 көшесі, 5 құрылыс, Астана, 010000, Қазақстан  
auganova@biocenter.kz**ТҮЙІН**

Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының мәліметі бойынша Қазақстан көптеген дәріге төзімді туберкулез жағдай саны бойынша жетекші орын алады. Аталған зерттеу жұмысы 2021–2022 жылдары Астана қаласында таралған *Mycobacterium tuberculosis* изоляттарын зерттеуге бағытталған. Жиналған 198 *M. tuberculosis* изолятының 175-і (88,38%) L2/Beijing тұқымдасына, ал қалған 23-і (11,62%) L4 тұқымдасына жатады. Зерттеу жұмысы *M. tuberculosis* генетикалық тұқымдасын анықтауға бағытталған генотиптеу, сондай-ақ таңдалған L2/Beijing тұқымдасына жататын 24 изоляттарының толық геномды секвенирлеу, содан кейінгі биоинформатикалық талдау әдістері қолданылды. Талдау нәтижелері бойынша үлгілердің 62,5% Central Asia Outbreak генотипіне тиесілі. Қалған анықталған генотиптер – Central Asia (20,8%), B0/W148 (12,5%) және Clade A (4,2%). Сонымен қатар, таңдалған изоляттардың туберкулезге қарсы дәрілерге төзімділігінің фенотиптік және генотиптік сипаттамалары атқарылды. Елімізде дәріге төзімді туберкулез таралуының ықтимал себептерінің бірі – көптеген дәріге төзімді туберкулезбен Central Asia Outbreak генетикалық кластерінің басым болуы болып табылады.

**Кілтгі сөздер:** *Mycobacterium tuberculosis*, дәріге төзімділік, рифампицин, изониазид.