ISSN 2524-0684 e-ISSN 2524-0692

УДК616-002.5; 577.21
МРНТИ 34.27.21
DOI: 10.53065/kaznmu.2023.23.41.005

Поступил в редакцию: 21.12.22.
Принято к публикации: 02.03.23.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РИФАМПИЦИН-УСТОЙЧИВЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *M. TUBERCULOSIS* В КАЗАХСТАНЕ

АХМЕТОВА А.Ж.[1,2], АБИЛОВА Ж.М.[1], ЖАРЫЛҚАСЫН Г.Н.[3], АКИЛЬЖАНОВА А.Р.[1,2], КОЖАМКУЛОВ У.А.[1]

[1]Лаборатория геномной и персонализированной медицины, National Laboratory Astana, Назарбаев университет, г. Астана, Казахстан
[2]Кафедра общей биологии и геномики, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, г. Астана, Казахстан
[3]Кафедра микробиологии и биотехнологии, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, г. Астана, Казахстан

Аннотация.

Введение. Лекарственно-устойчивый туберкулез остается актуальной проблемой в здравоохранении Казахстана. Казахстан одна из стран в мире с высоким количеством мультирезистентного туберкулеза, характеризующегося устойчивостью к основным антибиотикам первого ряда – рифампицину и изониазиду.

Цель данной работы: определить биологическое разнообразие и охарактеризовать мутации в *rpoB* гене рифампицин-устойчивых клинических изолятов *M. tuberculosis* из Казахстана.

Материалы и методы. В данной работе от больных с легочным туберкулезом было собрано 115 клинических изолятов *M. tuberculosis,* устойчивых к противотуберкулезному препарату первого ряда - рифампицину. Генотипирование всех 115 рифампицин-резистентных изолятов было проведено методом MIRU-VNTR с использованием 15 локусов. ДНК-секвенирование RRDR региона *rpoB* гена всех 115 рифампицин-устойчивых образцов *M. tuberculosis* было выполнено на секвенаторе ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Результаты. Согласно результатам MIRU-VNTR генотипирования, 86,1% образцов среди рифампицин-устойчивых изолятов были отнесены к семейству Beijing *M. tuberculosis*. Анализ нуклеотидных последовательностей всех устойчивых к рифампицину изолятов показал преобладание мутации в 531 кодоне *rpoB* гена с аминокислотной заменой серина на лейцин Ser531Leu в 82,6% случаев. В данной работе семейство Beijing *M. tuberculosis* было ассоциировано с мутацией Ser531Leu в 531 кодоне гена ($p<0.0001$), а генотип LAM *M. tuberculosis* был связан с мутацией His526Leu в 526 кодоне гена ($p<0.0001$).

ISSN 2524-0684 e-ISSN 2524-0692

Выводы. Большинство рифампицин-устойчивых M. tuberculosis в Казахстане принадлежат к семейству Beijing. Мутация Ser531Leu в 531 кодоне rpoB гена доминирует. Генотип Beijing связан с мутацией Ser531Leu, LAM – с His526Leu. Важность учета мутаций в 531 и 526 кодонах для скрининга подчеркнута.

Ключевые слова: туберкулез, *M. tuberculosis*, лекарственная устойчивость, рифампицин, *rpoB*, секвенирование, MIRU-VNTR анализ.

Введение. Туберкулез (ТБ) это инфекционное заболевание, возбудителем которого является *M. tuberculosis*. В основном, *M. tuberculosis* поражает легкие (туберкулез легких), также может поражать другие части тела (внелегочный туберкулез) [1, 2]. Туберкулез является одной из ведущих причин смерти от одного инфекционного агента после вируса иммунодефицита человека (ВИЧ)/синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) [2]. Согласно ежегодному докладу Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2020 году было выявлено 9,9 миллионов случаев туберкулеза, показатели смертности от ТБ составили 1,3 миллиона случаев среди ВИЧ-отрицательных случаев и 214 000 человек среди ВИЧ-положительных случаев [3]. Распространение лекарственно-устойчивого ТБ представляет собой серьезную проблему в борьбе с туберкулезом, в особенности распространение туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) либо мультирезистентного ТБ, который ассоциирован с устойчивостью к основным антибиотикам используемым в лечении ТБ – рифампицину и изониазиду. В 2019 году в мире было зарегистрировано 465 000 человек с мультирезистентным туберкулезом/рифампицин-устойчивым туберкулезом (РР-ТБ). В списке 30 стран с высокими показателями МЛУ-ТБ/РР-ТБ в мире есть и Казахстан [4].

Рифампицин один из самых эффективных противотуберкулезных препаратов первого ряда и является ключевым фактором, определяющим эффективность схем лечения [5]. В настоящее время устойчивость к рифампицину используется в качестве репрезентативного маркера МЛУ-ТБ [6]. Согласно данным ВОЗ, в 2019 г. МЛУ-ТБ был диагностирован у 78% ТБ пациентов, у которых была выявлена устойчивость к рифампицину [4]. Механизм действия рифампицина заключается в следующем: после попадания в клетку рифампицин связывается с β-субъединицей бактериальной РНК-полимеразы тем самым предотвращая транскрипцию информационной РНК (мРНК) и последующую трансляцию в белки [1, 5, 7]. Литературные данные показывают, что в основном устойчивые к рифампицину микобактерии имеют мутации в *rpoB* гене, который кодирует β-субъединицу бактериальной РНК-полимеразы. Мутации в данном гене обнаруживаются в RRDR (Rifampicin Resistance Determining Region) регионе между кодонами 507-533 в 95% случаях [8, 9].

Согласно данным опубликованных работ [10], в разных странах за распространение лекарственно-устойчивых микобактерий отвечают штаммы различных семейств *M. tuberculosis*, для которых характерны определенные мутации в тех или иных генах, ассоциированных с лекарственной устойчивостью. Во многих странах бывшего

ISSN 2524-0684 e-ISSN 2524-0692

Советского союза [11, 12, 13, 14] и Центральной Азии [15] резистентность к различным противотуберкулезным препаратам (ПТП) была ассоциирована с китайским генотипом Beijing, в то время как в Бразилии [16] и в других странах Латинской Америки [17] устойчивые к ПТП клинические изоляты были штаммами семейства LAM (Latin-American-Mediterranean) *M. tuberculosis.* В связи с этим несомненный интерес представляет изучение генетических особенностей резистентных к ПТП клинических изолятов *M. tuberculosis* в Казахстане.

Цель данной работы: характеристика биологического разнообразия и оценка мутаций в *rpoB* гене рифампицин резистентных клинических изолятов *M. tuberculosis* собранных на территории Казахстана.

Материалы и методы. В данное исследование включены 115 больных туберкулезом легких среди новых случаев заболевания из разных регионов Казахстана. Для всех пациентов были получены демографические и клинические данные из медицинских карт. Среди 115 пациентов 79 (68,7%) мужчин и 36 (31,3%) женщин. Возраст ТБ больных варьировал от 18 до 73 лет, средний возраст составил 34,8 лет.

Протокол исследования был утвержден этическим комитетом Центра наук о жизни (Протокол №05-2020 от 24 сентября 2020 г.).

Анализ лекарственной чувствительности к рифампицину был проведен в Национальном научном центре фтизиопульмонологии с использованием системы BACTEC MGIT 960 (BD Diagnostic Systems, США) в соответствии с протоколом производителя. Лизаты клеток *M. tuberculosis* всех собранных 115 рифампицин-устойчивых образцов были подготовлены с помощью кипячения на водяной бане при температуре 80°C в течении 60 минут. ДНК клинических изолятов *M. tuberculosis* было выделено согласно методике Van Soolingen и др. [18].

Генотипирование 115 рифампицин-резистентных изолятов *M. tuberculosis* было проведено по 15 MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive UnitsVariable Number Tandem Repeats) локусам, которые включали в себя 12 MIRU (MIRU2, MIRU4, MIRU10, MIRU16, MIRU20, MIRU23, MIRU24, MIRU26, MIRU27, MIRU31, MIRU39 и MIRU40) локусов и 3 ETR (ETRA, ETRB и ETRC) локуса как было описано ранее [19]. Для того, чтобы высчитать количество тандемных повторов в каждом локусе была использована программа Image Lab™ Software (Gel Doc™ XR+, Bio-Rad). Полученные 15-ти значные цифровые профили всех 115 клинических изолятов были загружены в базу данных www.miru-vntrplus.org и были сравнены с образцами из других стран.

Построение филогенетического древа и определение семейств *M. tuberculosis* было выполнено с помощью алгоритма UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean).

Нуклеотидные последовательности RRDR региона *rpoB* гена для 115 рифампицин-устойчивых образцов *M. tuberculosis* были определены методом Сэнгера на секвенаторе ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) согласно инструкциям производителя. Амплификация *rpoB* гена проводилась в ампилификаторе Eppendorf (Германия) при

ISSN 2524-0684 e-ISSN 2524-0692

температуре отжига праймеров 63°С. Анализ нуклеотидных последовательностей *rpoB* гена проводили с помощью программного обеспечения SeqScape (Applied BioSystems).

Для статистической обработки данных MIRU-VNTR генотипирования и ДНК-секвенирования *rpoB* гена клинических изолятов *M. tuberculosis* использовали статистическую программу SPSS. Для того чтобы проверить имеется ли связь между определенным семейством *M. tuberculosis* и определенной мутацией в *rpoB* гене применили Хи-квадрат Пирсона.

Результаты и их обсуждения. Было проведено генотипирование 115 клинических изолятов *M. tuberculosis* устойчивых к рифампицину по MIRUVNTR методу с использованием 15 локусов. По данным анализа MIRU-VNTR генотипирования было выявлено 34 генотипа среди рифампицин-резистентных изолятов, из них 25 (21,7%) генотипов были универсальными и найдены только у одного образца среди собранных изолятов *M. tuberculosis*. Оставшиеся 90 изолятов (78,3%) образовали 9 кластеров. В самой большой группе было идентифицировано 64 образца, 3 группы имели по 5 клинических изолятов, в один кластер вошли 3 образца и в 4 группах было найдено по 2 изолята *M. tuberculosis,* соответственно.

По результатам генотипирования, среди 115 рифампицин-резистентных клинических изолятов 86,1% образцов (n=99) принадлежали китайскому семейству Beijing *M. tuberculosis*. В 10,4% (n=12) случаев среди устойчивых к препарату образцов было идентифицировано латиноамериканское семейство LAM. Изоляты семейство Ghana были выявлены в 1,7% (n=2) случаев, и семейства *M. tuberculosis* URAL (0,9%) и Cameroon (0,9%) были определены у оставшихся двух изолятов, соответственно (рисунок 1).

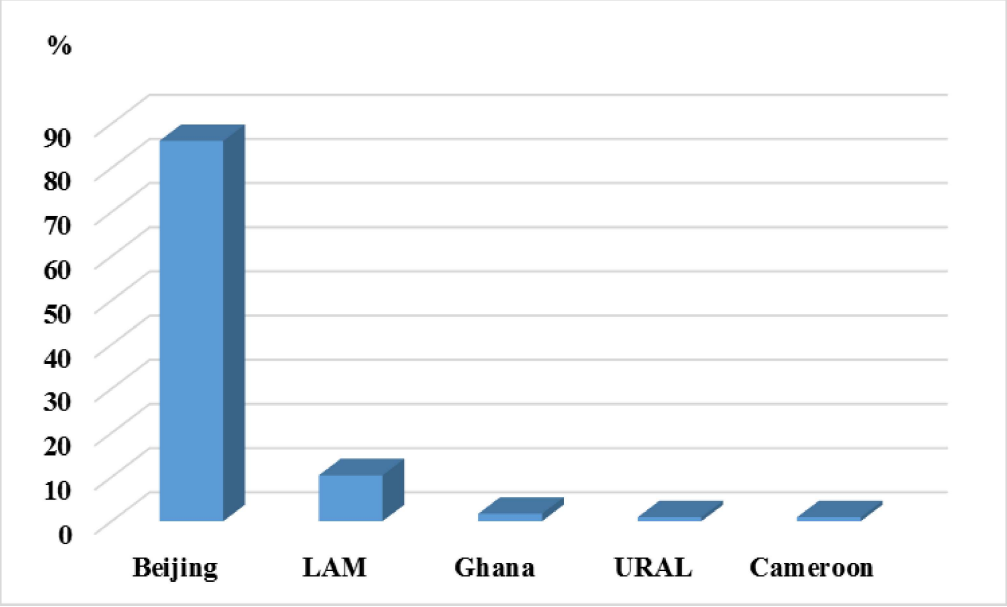


Рисунок 1 - Семейства *M. tuberculosis* среди рифампицин-устойчивых клинических изолятов в Казахстане (%)

ISSN 2524-0684 e-ISSN 2524-0692

Результаты секвенирования *rpoB* гена 115 рифампицин-устойчивых изолятов *M. tuberculosis* показали 6 вариантов мутаций в четырех кодонах гена – 516, 526, 531 и 533. В 531 кодоне *rpoB* гена было найдено три варианта мутаций у 98 резистентных образцов (85,2%). 82,6% изолятов из всей выборки (95 из 115 образцов) имели мутацию в 531 кодоне Ser531Leu (аминокислотная замена серина на лейцин). Аминокислотная замена серина на триптофан (Ser531Trp) в 531 кодоне была выявлена у двух образцов (2 из 115 изолятов) (1,7%). И мутация в 531 кодоне *rpoB* гена с аминокислотной заменой серина на фенилаланин Ser531Phe была обнаружена в 1 образце среди всех рифампицинустойчивых изолятов (0,9%). Мутация в 526 кодоне *rpoB* гена His526Leu (аминокислотная замена гистидина на лейцин) - вторая по значимости мутация, которая была найдена среди рифампицин-резистентных изолятов. Данную мутацию имели 7 из 115 образцов (6,1%). 2 образца среди всех резистентных изолятов показали мутации в 516 кодоне с заменой аминокислоты аспарагина на валин Asp516Val и в 533 кодоне с заменой аминокислоты лейцина на пролин Leu533Pro, соответственно. В остальных 8 устойчивых к рифампицину образцах не было обнаружено мутаций в *rpoB* гене (6,9%) (Таблица 1).

Таблица 1 – Мутации в *rpoB* гене рифампицин-устойчивых клинических изолятов *M. tuberculosis* в Казахстане

№ п/п	Кодон	Вид аминокислотной замены	Количество изолятов с аминокислотной заменой	Всего
1	516 кодон	Asp516Val	1 (0,9%)	1 (0,9%)
2	526 кодон	His526Leu	7 (6,1%)	7 (6,1%)
3	531 кодон	Ser531Leu	95 (82,6%)	98 (85,2%)
		Ser531Trp	2 (1,7%)	
		Ser531Phe	1 (0,9%)	
4	533 кодон	Leu533Pro	1 (0,9%)	1 (0,9%)
5	Нет мутаций		8 (6,9%)	8 (6,9%)
Всего			**115 (100%)**	**115 (100%)**

Статистический анализ полученных данных MIRU-VNTR генотипирования и секвенирования *rpoB* гена был проведен для 107 клинических образцов *M. tuberculosis*, которые имели мутации в том или ином кодоне гена. Результаты статистического анализа показали ассоциацию генотипа Beijing с Ser531Leu мутацией в 531 кодоне *rpoB* гена ($p<0.0001$). Среди резистентных изолятов с мутацией Ser531Leu (аминокислотная замена серина на лейцин) большая часть образцов (91,6%) принадлежала семейству Beijing *M. tuberculosis* по сравнению с non-Beijing группой (8,4%). Также статистический анализ показал связь между семейством LAM *M. tuberculosis* и His526Leu мутацией в 526 кодоне

ISSN 2524-0684 e-ISSN 2524-0692

(p<0.0001). Среди устойчивых изолятов с мутацией His526Leu (аминокислотная замена гистидина на лейцин) преобладающая часть образцов (85,7%) принадлежала семейству LAM по сравнению с non-LAM семейством.

Были проведены исследования касательно молекулярно-генетических характеристик штаммов *M. tuberculosis* распространенных на территории Республики Казахстан [19-24]. Но, только в некоторых из них рассматривалась связь определенного генотипа *M. tuberculosis* с мутациями в генах лекарственной устойчивости. В нашей предыдущей работе [20] были описаны мутации в *rpoB, katG, oxyR-ahpC* и *fabG-inhA* генах 259 мультирезистентных, 51 изониазид-устойчивых и 13 рифампицин-устойчивых клинических изолятов. Анализ мутаций в *rpoB* гене 272 рифампицин-устойчивых образцов показал мутации в 4 кодонах в 93,7% случаев (255 из 272 образцов). Больше всего в выборке мутации были найдены в 531 кодоне (82,7%), среди обнаруженных вариантов мутаций в данном кодоне преобладала мутация Ser531Leu с заменой аминокислоты серина на лейцин (80,9%). В меньшей степени мутации были найдены в 526 (8,4%), 533 (1,5%) и 516 (1,1%) кодонах. Среди 310 изониазидустойчивых изолятов мутации были определены в 99,7% случаев (309 из 310 изолятов). В основном, мутации встречались в 315 кодоне *katG* гена - Ser315Thr (замена аминокислоты серина на треонин) (90,3%). В данной статье хорошо описан спектр мутаций в *rpoB* гене среди устойчивых к рифампицину и изониазиду изолятов, однако для этих образцов не было проведено генотипирование. В статье Hilleman *et.al* [25] была выявлена ассоциация генотипа Beijing с мутацией Ser531Leu *rpoB* гена и с мутацией Ser315Thr *katG* гена среди мультирезистентых изолятов. В нашем исследовании мутация Ser531Leu *rpoB* гена тоже была ассоциирована с китайским генотипом Beijing, кроме того, в нашей работе мутация His526Leu *rpoB* гена была связана с латиноамериканским генотипом LAM среди рифампицин-устойчивых изолятов.

В данной работе в 6,9% случаях рифампицин-резистентные образцы не имели мутацию ни в каком кодоне *rpoB* гена. Аналогичная тенденция была показана и в других исследованиях [20, 26, 27, 28]. В нашем предыдущем исследовании [20] среди рифампицин-устойчивых изолятов (n=272) мутации в *rpoB* гене не были найдены в 6,2% случаях. В исследованиях проводимых в Морокке мутаций в *rpoB* гене клинических изолятов *M. tuberculosis* (n=116 и n=45) не было найдено у 15,5% [26] и 11,1% [27] образцов, соответственно. Среди рифампицин-резистентных изолятов (n=90) собранных из различных Азиатских стран 5,6% образцов не показали мутаций в *rpoB* гене [28]. Эти результаты могут свидетельствовать о мутациях в *rpoB* гене вне RRDR региона, которые были найдены меньше, чем в 5% случаях среди изолятов устойчивых к рифампицину [29, 30].

Выводы. В результате генотипирования в нашем исследовании 86,1% рифампицин-устойчивых клинических изолятов в Казахстане принадлежали китайскому семейству Beijing *M. tuberculosis.* Результаты секвенирования *rpoB* гена показали, что 85,2% образцов в выборке имели мутацию в 531 кодоне, с преобладанием мутации

ISSN 2524-0684 e-ISSN 2524-0692

Ser531Leu (82,6% в выборке). По данным статистического анализа, в нашей работе генотип Beijing был ассоциирован с Ser531Leu мутацией в 531 кодоне ($p<0.0001$), а генотип LAM с His526Leu мутацией в 526 кодоне ($p<0.0001$). Поэтому для проведения скрининговых исследований клинических изолятов *M. tuberculosis* циркулирующих на территории Казахстана по данным наших исследований важно учитывать мутации в 531 и 526 кодонах *rpoB* гена.

Конфликт интересов. Мы заявляем об отсутсвиии конфликта интересов.

Вклад авторов. Все авторы внесли равноценный вклад в разработку концепции, выполнение, обработку результатов и написание статьи.

Заявляем, что данный материал ранее не публиковался и не находится на рассмотрении в других издательствах.

Финансирование. Данное исследование было проведено в рамках грантового финансирования AP09259750 Министерства образования и науки Республики Казахстан на 2021-2023 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Singh R.Dwivedi SP, Gaharwar US, Meena R, Rajamani P, Prasad T. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // J Appl Microbiol. – 2019. - №128 (6). – P. 1547-1567.
2. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NCSA 3.0 IGO. – 2018. – P. 27-103.
3. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NCSA 3.0 IGO. – 2021. – P. 4-38.
4. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NCSA 3.0 IGO. – 2020. – P. 5-71.
5. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, RIF, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* // Respir. Res. – 2001. - № 2. – P. 164–168.
6. Garcia de Viedma D, del Sol Diaz Infantes M, Lasala F, Chaves F, Alcala L, Bouza E. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple RIF resistance mutation and highlevel isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* // J. Clin. Microbiol. - 2002. - №40. – P. 988–995.
7. Nguyen L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis* an update // Arch. Toxicol. - 2016. - №90. – P. 1585-604.
8. Myo T. Zaw, Nor A. Emran, Zaw Lin. Mutations inside rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // Journal of Infection and Public Health. - 2018. - №1. - P. 605610.
9. Prim RI, Marcos MA, Senna SG, Nogueira CL, Figueiredo ACC and de Oliveira JG. Molecular profiling of drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* // Mem Inst Oswaldo Cruz. - 2015. - №110. - P. 618-623.

ISSN 2524-0684 e-ISSN 2524-0692

10. Sinkov V, Ogarkov O, Mokrousov I, Bukin Y, Zhdanova S, Heysell SK. New epidemic cluster of pre-extensively drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Ural family emerging in Eastern Europe // BMC Genomics. – 2018. - №19 (1). – P. 762.
11. Vyazovaya A, Proshina E, Gerasimova A, Avadenii I, Solovieva N, Zhuravlev V, Narvskaya O, Mokrousov I. Increased transmissibility of Russian successful strain Beijing B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis*: Indirect clues from history and demographics // Tuberculosis. – 2020. - №122. – P. 101937.
12. Konstantynovska O, Poteiko P, Rogozhin A, Liashenko O, Solodiankin O, Sapko S. Features of different *M. tuberculosis* strains that were isolated from MDR-TB patients in Kharkiv, Ukraine // European Respiratory Journal. – 2016. - №48. – P. PA2750.
13. Slizen VV, Surkova LK, Titov LP. Beijing genotype dominance among circulating *Mycobacterium tuberculosis* in patients with pulmonary tuberculosis in Belarus // International Journal of Mycobacteriology. – 2021. - №10 (5). – P.19.
14. Gerasimova A, Vyazovaya A, Levina K, Kütt M, Mokrousov I. Tuberculosis in Estonia: a major impact of Russian MDR *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148-cluster // European Respiratory Journal. – 2020. - №56. – P. 1602.
15. Engström A, Antonenka U, Kadyrov A *et al*. Population structure of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Central Asia // BMC Infect Dis. – 2019. - №19. – P. 908.
16. Dalla Costa ER, Lazzarini LC, Perizzolo PF, Díaz CA, Spies FS, Costa LL, Ribeiro AW, Barroco C, Schuh SJ, da Silva Pereira MA, Dias CF, Gomes HM, Unis G, Zaha A, Almeida da Silva PE, Suffys PN, Rossetti ML. *Mycobacterium tuberculosis* of the RDRio genotype is the predominant cause of tuberculosis and associated with multidrug resistance in Porto Alegre City, South Brazil // J Clin Microbiol. – 2013. - №51(4). – P. 1071-7.
17. Grandjean L, Iwamoto T, Lithgow A, Gilman RH, Arikawa K, Nakanishi N, Martin L, Castillo E, Alarcon V, Coronel J, Solano W, Aminian M, Guezala C, Rastogi N, Couvin D, Sheen P, Zimic M, Moore DA. The Association between *Mycobacterium Tuberculosis* Genotype and Drug Resistance in Peru // PLoS One. – 2015. №18, V.10(5). – P. e0126271.
18. Van Soolingen D, Kremer K, Vynycky E. New perspectives in the molecular epidemiology of tuberculosis // In book: Mycobacteria and TB. Berlin. - 2003. - №2. - P. 17-45.
19. Akhmetova, A., Akilzhanova, A., Bismilda, V., Chingissova, L., Kozhamkulov, U. Use of 15 MIRU-VNTR genotyping for discriminating *M. tuberculosis* clinical isolates from Kazakhstan // Georgian Medical News. – 2021. - №7-8 (316-317). – P. 129-135.
20. Kozhamkulov U, Akhmetova A, Rakhimova S, Belova E, Alenova A, Bismilda V, Chingissova L, Ismailov Sh, Ramanculov E, and Momynaliev K. Molecular Characterization of Rifampicin- and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Kazakhstan // Jpn. J. Infect. Dis. – 2011. - №64. – P. 253-255.
21. Akhmetova A., Kozhamkulov U., Bismilda V et al. Mutations in the *pncA* and *rpsA* genes among 77 *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kazakhstan // International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases. – 2015. - №19 (2). – P. 179-184.

ISSN 2524-0684 e-ISSN 2524-0692

22. Kubica T., Agzamova R., Wright A., Aziz M.A., Rakishev G., Bismilda V., Richter E., Rüsch-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.
23. 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.
24. 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.
25. Hillemann D, Kubica T, Agzamova R, Venera B, Rüsch-Gerdes S, Niemann S. Rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Kazakhstan // Int J Tuberc Lung Dis. – 2005. - №9 (10). – P. 1161-7.
26. Ennassiri W, Jaouhari S, Sabouni R *et al.* Analysis of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Morocco using genotype® MTBDRplus assay // Journal of Global Antimicrobial Resistance. – 2018. - №12. – P. 197–201.
27. Bentaleb EM, Messaoudi MD, Abid M *et al.* Plasmid-based high-resolution melting analysis for accurate detection of *rpoB* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Moroccan patients // BMC Infectious Diseases. – 2017. - №17 (1). - P. 548.
28. Hirano K, Abe C, Takahashi M. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay // J Clin Microbiol. – 1999. - №37 (8). – P. 2663-6.
29. Heep M, Rieger U, Beck D, Lehn N. Mutations in the beginning of the *rpoB* gene can induce resistance to rifampin both in *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis* // Antimicrob Agents Chemother. – 2000. - №44. – P.1075-1077.
30. Zeng MC, Jia QJ, Tang LM. *rpoB* gene mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*isolates from rural areas of Zhejiang, China // J Int Med Res. – 2021. - №49 (3):300060521997596.

Сведения об авторах:

@Ахметова А.Ж – ORCID: http://orcid.org/0000-0002-5557-3338, научный сотрудник, Лаборатория геномной и персонализированной медицины, ЧУ «National Laboratory Astana», Назарбаев Университет; Кафедра общей биологии и геномики Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г.Астана, Казахстан, ainur.akhmetova2@nu.edu.

Абилова Ж.М – ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9671-4574, младший научный сотрудник, Лаборатория геномной и персонализированной медицины, ЧУ «National Laboratory Astana», Назарбаев Университет, г. Астана, Казахстан, zhannur.nurkina@nu.edu.kz.

ISSN 2524-0684 e-ISSN 2524-0692

Жарылқасын Г.Н – ORCID: http://orcid.org/0000-0001-8727-8969, выпускник, Кафедра биотехнологии и микробиологии, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г. Астана, Казахстан, gauhar.zharylkassyn@gmail.com.

Акильжанова А.Р - ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6161-8355, д.м.н., PhD, профессор, руководитель лаборатории, Лаборатория геномной и персонализированной медицины, ЧУ «National Laboratory Astana», Назарбаев Университет; преподаватель, Кафедра общей биологии и геномики, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г. Астана, Казахстан. akilzhanova@nu.edu.kz;

Кожамкулов У.А – ORCID: http://orcid.org/0000-0002-9782-7631, к.м.н, ассоциированный профессор, ведущий научный сотрудник, Лаборатория геномной и персонализированной медицины, ЧУ «National Laboratory Astana», Назарбаев Университет, г. Астана, Казахстан. ulan.kozhamkulov@nu.edu.kz.

Авторлар туралы мәліметтер:

Ахметова А.Ж. – ORCID: http://orcid.org/0000-0002-5557-3338, ғылыми қызметкер, Геномды және дербес медицина зертханасы, National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті, Астана қ., Қазақстан; Жалпы биология және геномика кафедрасы, Л. Н. Гумилев атындағы Еуразия Ұлттық университеті, Астана қ., Қазақстан, ainur.akhmetova2@nu.edu.

Абилова Ж.М. – ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9671-4574, кіші ғылыми қызметкер, Геномды және дербес медицина зертханасы, National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті, Астана қ., Қазақстан, zhannur.nurkina@nu.edu.kz.

Жарылқасын Г.Н. – ORCID: http://orcid.org/0000-0001-8727-8969, түлек, Микробиология және биотехнология кафедрасы, Л. Н. Гумилев атындағы Еуразия Ұлттық университеті, Астана қ., Қазақстан, gauhar.zharylkassyn@gmail.com

Акильжанова А.Р. - ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6161-8355, м.ғ.д., PhD, профессор, зертхана жетекшісі, Геномды және дербес медицина зертханасы, National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті, Астана қ., Қазақстан; оқытушы, Жалпы биология және геномика кафедрасы, Л. Н. Гумилев атындағы Еуразия Ұлттық университеті, Астана қ., Қазақстан, akilzhanova@nu.edu.kz

Кожамкулов У.А. – ORCID: http://orcid.org/0000-0002-9782-7631, м.ғ.к, ассоциацияланған профессор, жетекші ғылыми қызметкер, Геномды және дербес медицина зертханасы, National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті, Астана қ., Қазақстан, ulan.kozhamkulov@nu.edu.kz.

Information about authors:

Akhmetova A.Zh. – ORCID: http://orcid.org/0000-0002-5557-3338, Researcher, Laboratory of Genomic and Personalized Medicine, National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan; Department of General Biology and Genomics, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan, ainur.akhmetova2@nu.edu.

ISSN 2524-0684 e-ISSN 2524-0692

Abilova Zh.M. – ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9671-4574, Junior researcher, Laboratory of Genomic and Personalized Medicine, National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan, zhannur.nurkina@nu.edu.kz.

Zharylkassyn G.N. – ORCID: http://orcid.org/0000-0001-8727-8969, Graduate, Department of Microbiology and Biotechnology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan, gauhar.zharylkassyn@gmail.com

Akilzhanova A.R. - ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6161-8355, Doctor of Medical Sciences, PhD, Professor, Head of the Laboratory, Laboratory of Genomic and Personalized Medicine, National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan; Department of General Biology and Genomics, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan, akilzhanova@nu.edu.kz

Kozhamkulov U.A. – ORCID: http://orcid.org/0000-0002-9782-7631, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Leading researcher, Laboratory of Genomic and Personalized Medicine, National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan, ulan.kozhamkulov@nu.edu.kz.

ҚАЗАҚСТАНДА ТАРАЛҒАН РИФАМПИЦИН-ТӨЗІМДІ *M. TUBERCULOSIS* КЛИНИКАЛЫҚ ИЗОЛЯТТАРЫНЫҢ ГЕНЕТИКАЛЫҚ СИПАТТАМАСЫ

А.Ж.АХМЕТОВА[1,2], Ж.М.АБИЛОВА[1], Г.Н. ЖАРЫЛҚАСЫН [3], А.Р. АКИЛЬЖАНОВА[1,2], У.А. КОЖАМКУЛОВ [1]

[1]Геномды және дербес медицина зертханасы, National Laboratory Astana, Назарбаев университеті, Астана қ., Қазақстан

[2]Жалпы биология және геномика кафедрасы, Л. Н. Гумилев атындағы Еуразия Ұлттық университеті, Астана қ., Қазақстан

[3]Микробиология және биотехнология кафедрасы, Л. Н. Гумилев атындағы Еуразия Ұлттық университеті, Астана қ., Қазақстан

Түйіндеме

Кіріспе. Дәріге-төзімді туберкулез Қазақстанның денсаулық сақтау саласында өзекті мәселе болып қалуда. Қазақстан бірінші қатардағы негізгі антибиотиктерге – рифампицин мен изониазидке төзімділікпен сипатталатын мультирезистентті туберкулез көрсеткіші жоғары мемлекеттердің бірі.

Жұмыстың мақсаты: Қазақстанда таралған рифампицинге-төзімді *M. tuberculosis* клиникалық изоляттарының *rpoB* генінде мутацияларды сипаттау және олардың биотүрлігін анықтау.

Материалда мен әдістер. Аталған зерттеу жұмысында өкпе туберкулезі науқастарынан туберкулезге қарсы бірінші қатардағы препарат – рифампицинге төзімді 115 *M. tuberculosis* клиникалық изоляттары жиналды. Барлық 115 рифампицинге резистентті изоляттар MIRU-VNTR әдісімен 15 локус бойынша генотиптелді. 115

ISSN 2524-0684 e-ISSN 2524-0692

рифампицинге-төзімді *M. tuberculosis* үлгілерінің *rpoB* генінің RRDR аймағын ДНҚ-секвенирлеу ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) секвенаторында өткізілді.

Нәтижелер. MIRU-VNTR генотиптеу нәтижелеріне сәйкес, рифампицин-төзімді изоляттардың арасында 86,1% жағдайында үлгілер Beijing *M. tuberculosis* тұқымдасына жатты. Рифампицинге төзімділігі бар барлық изоляттардың нуклеотидтік тізбектерінің анализі 82,6% жағдайында *rpoB* генінің 531 кодонында сериннің лейцинге аминқышқылдық алмасуы бар Ser531Leu мутациясының басымдылығын көрсетті. Біздің жұмысымызда Beijing *M. tuberculosis* тұқымдасы геннің 531 кодонындағы Ser531Leu мутациясымен ассоциацияланды ($p<0.0001$), ал LAM *M. tuberculosis* тұқымдасы геннің 526 кодонындағы His526Leu мутациясымен байланысты ($p<0.0001$) болды.

Қорытынды. Қазақстандағы рифампицинге төзімді M. tuberculosis-тің көпшілігі Пекин отбасына жатады. rpoB генінің 531 кодонындағы Ser531Leu мутациясы басым. Бейжің генотипі Ser531Leu мутациясымен, LAM – His526Leu мутациясымен байланысты. Скрининг үшін 531 және 526 кодондарындағы мутацияларды қарастырудың маңыздылығына баса назар аударылады.

Түйінді сөздер: туберкулез, *M. tuberculosis*, дәрілік төзімділік, *rpoB*, секвенирлеу, MIRU-VNTR анализі.

GENETIC CHARACTERISTICS OF RIFAMPICIN-RESISTANT *M. TUBERCULOSIS* CLINICAL ISOLATES FROM KAZAKHSTAN

A.ZH. AKHMETOVA[1,2], ZH. M.ABILOVA[1], G.N. ZHARYLKASSYN[3], A.R. AKILZHANOVA[1,2], U.A. KOZHAMKULOV[1]

[1]Laboratory of Genomic and Personalized Medicine, National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan

[2]Department of General Biology and Genomics, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan

[3]Department of Microbiology and Biotechnology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan

Abstract

Introduction. Drug-resistant tuberculosis remains one of major health problems in Healthcare system of Kazakhstan. Kazakhstan is one of countries with high quantity of multidrug-resistant tuberculosis chracterized by resistance to the main antibiotics used to cure tuberculosis – rifampicin and izoniazid.

Objective of this study is to detect biodiversity and characterize mutations in *rpoB* gene of rifampicin-resistant *M. tuberculosis* clinical isolates from Kazakhstan.

Materials and methods. In this work, 115 *M. tuberculosis* clinical isolates resistant to the first line antibiotic – rifampicin were gathered from patients with pulmonary tuberculosis. Genotyping of 115 rifampicin-resistant isolates was performed by MIRU-VNTR method using

ISSN 2524-0684 e-ISSN 2524-0692

15 loci. DNA sequencing of RRDR region of *rpoB* gene of 115 rifampicin-resistant isolates of *M. tuberculosis* was done on ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Rresults. According to the MIRUVNTR genotyping results, 86,1% isolates among the resistant samples were isolates of Beijing *M. tuberculosis* family. Analysis of nucleotide sequences of all resistant to rifampicin isolates showed prevalence of mutations at 531 codon of *rpoB* gene with the amino acid substitution of serine to leucine Ser531Leu in 82.6% of cases. In our study Beijing *M. tuberculosis* family was associated with the Ser531Leu mutation at 531 codon of the gene ($p<0.0001$), LAM *M. tuberculosis* family revealed association with the His526Leu mutation at 526 codon of the gene ($p<0.0001$).

Conclusion. The majority of rifampicin-resistant M. tuberculosis in Kazakhstan belong to the Beijing family. The Ser531Leu mutation at codon 531 of the rpoB gene is dominant. The Beijing genotype is associated with the Ser531Leu mutation, LAM – with His526Leu. The importance of considering mutations at codons 531 and 526 for screening is emphasized.

Key words: tuberculosis, *M. tuberculosis*, drug resistance, *rpoB*, sequencing, MIRU-VNTR analysis.