

Кожамкулов У.А., Каиров У.Е.,  
Рахимова С.Е., Ережепов Д.А.,  
Ахметова А.Ж., Молкенов А.Б.,  
Утюбаев А., Акильжанова А.Р.

Назарбаев Университет,  
Частное учреждение «National  
Laboratory Astana»,  
Казахстан, г. Астана

**Идентификация генетических  
маркеров лекарственной  
устойчивости на  
основе полных геномов  
клинических изолятов  
*Mycobacterium tuberculosis***

Kozhamkulov U.A., Kairov U.E.,  
Rakhimova S.E., Yerezhepov D.A.,  
Akhmetova A.Zh., Molkenov A.B.,  
Utyubayev A., Akilzhanova A.R.

Nazarbayev University, Private  
institution «National Laboratory Astana»,  
Kazakhstan, Astana

**Identification of genetic markers  
of drug resistance based on  
whole genomes of clinical  
isolates of *M.tuberculosis***

Кожамқұлов Ұ.Ә., Каиров Ұ.Е.,  
Рахимова С.Е., Ережепов Д.Ә.,  
Ахметова А.Ж., Молкенов А.Б.,  
Өтібаев Ә., Ақылжанова А.Р.

Назарбаев Университеті, «National  
Laboratory Astana» жеке мекемесі,  
Қазақстан, Астана қ.

***M.tuberculosis* клиникалық  
изоляттарының толық  
геномдарының секвенирленуі  
негізіндегі дәрмекке  
төзімділіктің генетикалық  
маркерлерін анықтау**

Проведено полногеномное секвенирование 20 клинических изолятов *M. tuberculosis* с использованием современных методов и инструментов секвенирования нового поколения. Большинство изученных изолятов *M. tuberculosis* (18) относятся к семейству Beijing (происхождение восточно-азиатское East Asian), только два изолята показали принадлежность к семействам T (происхождение евро-американское Euro-American) и MANU-1 (индо-океанское Indo-Oceanic). Изучены генетические маркеры для диагностики лекарственно-устойчивых форм туберкулеза (MDR и XDR штаммы *M.tuberculosis*). Проведен анализ генетических локусов клинических изолятов *M. tuberculosis*, определяющих устойчивость к противотуберкулезным лекарственным препаратам из числа найденных геномных вариантов, а также соответствующие гены. Обнаружено от 13 до 30 генетических локусов с геномными вариантами среди полногеномных данных 20 изолятов *M. tuberculosis*. Найдены геномные варианты в четырех генах PE\_PGRS24, PPE24, PPE5, PE\_PGRS56, кодирующие белки семейства PE/PPE и являющиеся уникальными и представленными только для вида *Mycobacterium*, которые характерны только для MDR и XDR клинических изолятов. Белки данного семейства могут играть роль факторов вирулентности и способствовать успешному инфицированию.

**Ключевые слова:** туберкулез, микобактерии туберкулеза, ДНК, полногеномное секвенирование, лекарственная устойчивость, мутации.

Whole genome sequencing of 20 clinical isolated of *M. tuberculosis* using modern methods and instruments of next-generation sequencing. Most of the studied isolates (18) belong to Beijing family (Southern East Asian), with only two isolates were belong to T (Euro-American) and MANU-1 (Indo-Oceanic).

The genetic markers for diagnostics of drug resistant forms of tuberculosis (MDR and XDR штаммы *M.tuberculosis*) were studied. The analysis of genetic loci of clinical isolates of *M.tuberculosis* that determine the resistance to TB drugs among found genomic variants, and corresponding genes. We found from 13 to 30 genetic loci with genomic variants among whole genome data of these 20 isolates of *M.tuberculosis*. We found that genomic variants in four genes coding proteins of PE/PPE family and which are unique and represented only by *Mycobacterium* species are very specific and found only in MDR and XDR strains of mycobacteria. Proteins of this family can play a significant role as virulence factors and may contribute to the successful infection.

**Key words:** tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, DNA, whole genome sequencing, drug resistance, mutations.

Жаңа буынды секвенирлеудің заманауи әдістері мен құралдары көмегімен *M. tuberculosis* бактериясының 20 клиникалық изоляттарының толық геномды секвенирленуі іске асырылды. Зерттелген үлгілердің көбісі (18) Beijing туыстастығына (шығу тегі шығыс азиялық), ал тек екі үлгі сәйкесінше T (шығу тегі евро америкалық) мен MANU-1 (шығу тегі үнді-мұхиттық) туыстастықтарына жатады. Дәрмектерге төзімді туберкулез формаларын (*M. Tuberculosis*-тің MDR мен XDR штамдары) диагностикалаудың генетикалық маркерлері зерттелді. Анықталған геномдық варианттар негізінде *M. tuberculosis*-тің клиникалық изоляттарының туберкулезге қарсы қолданылатын дәрілік препараттарға төзімділікті анықтайтын генетикалық локустары талданды және жауапты гендері анықталды. *M. tuberculosis*-тің 20 изоляттарының толық геномдық мәліметтерінің негізінде геномдық варианттары бар 13-тен 30-ға дейін генетикалық локустар анықталды. PE/PPE туыстастығының белоктарын кодтайтын және бактериялардың *Mycobacterium* түріне ғана тән болатын PE\_PGRS24, PPE24, PPE5, PE\_PGRS56 гендерінің геномдық варианттары біз секвенирленген үлгілердің MDR және XDR клиникалық изоляттарына тән екені табылды. Осы туыстастықтың белоктары вируленттілік факторлары ретінде қарастырыла алады және сәтті инфекциялаудың себепкері бола алады.

**Түйін сөздер:** туберкулез, туберкулез микобактериялары, ДНК, толық геномдық секвенирлеу, дәрілік төзімділік, мутациялар.

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ  
ГЕНЕТИЧЕСКИХ  
МАРКЕРОВ  
ЛЕКАРСТВЕННОЙ  
УСТОЙЧИВОСТИ НА  
ОСНОВЕ ПОЛНЫХ  
ГЕНОМОВ  
КЛИНИЧЕСКИХ  
ИЗОЛЯТОВ  
MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS****Введение**

Несмотря на прогресс, достигнутый в сокращении глобальной заболеваемости лекарственно-чувствительного туберкулеза, появление туберкулеза с множественной (мультирезистентной) лекарственной устойчивостью (МЛУ или MDR-multidrug-resistant) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ или XDR extensively-drug resistant) в течение последнего десятилетия ставит под угрозу эти достижения и является препятствием для эффективного контроля туберкулеза [1]. С каждым годом увеличивается число лекарственно-устойчивых штаммов, как мультирезистентных штаммов, обуславливающих устойчивость к основным двум противотуберкулезным препаратам первого ряда – изониазиду и рифампицину, так и XDR штаммов, устойчивых к обоим наиболее действенным противотуберкулезным препаратам, изониазиду и рифампицину, в сочетании с устойчивостью к любому из фторхинолонов (таких как левофлоксацин или моксифлоксацин) и по меньшей мере к одному из трех инъекционных препаратов второй линии (амикацин, капреомицин или канамицин) [1].

Лечение пациентов, инфицированных мультирезистентными штаммами, требует применения более токсичных и дорогостоящих химиопрепаратов, длительной госпитализации и, тем не менее, часто остается неэффективным, обуславливая высокий удельный вес инвалидизации и смертности. Таким образом, высокий уровень заболеваемости и смертности и постоянно растущая заболеваемость мультирезистентным туберкулезом затрудняет усилия, направленные на борьбу с этой эпидемией.

В лабораторной диагностике и эпидемиологических исследованиях инфекционных заболеваний все больше стали применять методы полногеномного секвенирования, помогающие изучить генетическую структуру бактерий и вирусов, выявить особенности генома патогенов, проводить мониторинг генетической вариабельности, распространенности и происхождения инфекционных агентов [2,3].

Микобактерия туберкулеза достаточно изучена, но некоторые результаты показывают удивительную неоднородность бактериальных популяций, даже между штаммами с одинаковы-

ми MIRU/VNTR, RFLP профилями, или сполитогипами [4,5]. Многие вопросы остаются, тем не менее, открытыми. Научные работы многих ученых с использованием полногеномных методов исследований штаммов *M. tuberculosis* направлены на изучение динамики развития заболевания, передачи инфекции и лечения, изучение небольших очагов ТБ инфекции, изучение уникальных процессов эволюционной динамики, присущих распространению туберкулеза [6-8].

Сравнение полной последовательности генома H37Rv вирулентного чувствительного штамма (размер 4.41 Mbp) и клинического штамма CDC1551 (размер 4.40 Mbp), выявил примерно 1100 SNP [9]. Примерно 65% SNP являются несинонимичными заменами, что является необычным, в сравнении с другими бактериями, таких как кишечная палочка и сальмонелла. Анализ полиморфизма больших последовательностей (LSP) показывает, что микобактерии туберкулеза характеризуются меньшим генетическим разнообразием, чем другие бактерии. В крупном исследовании 100 клинических изолятов, в общей сложности были выявлены 68 различных делеций, в размере от 105 bp до примерно 12 Kbp [10]. Вместе эти LSP, представляют около 186 Kbp (~ 4,2%) генома H37Rv и влияют на 224 (~ 5,5%) гена, включая гены во всех основных функциональных категориях. Эти исследования показывают, что степень полиморфизма существует между различными штаммами микобактерий туберкулеза, который в соответствии с фенотипическим разнообразием наблюдается среди клинических изолятов [11]. Эти различия геномов микобактерий обеспечивают понимание эпидемиологии вспышек инфекции, факторов вирулентности отдельных штаммов. Примечательно, что половина полиморфизмов больших последовательностей (LSP) штаммов H37Rv и CDC1551 включают гены, полиморфные GC-богатые повторяющиеся последовательности (PGRS), кодирующие семейства белков Pro-Pro-Glu (PPE) и Pro-Glu (PE), обладающие иммуногенными свойствами и играющие определенную роль в патогенезе. Белки семейства PE/PPE *M. tuberculosis* кодируются приблизительно 168 генами (примерно 5% от общей кодирующей емкости генома) [9]. Функциональная активность данных белков PE/PPE не совсем изучена и белки являются уникальными и важными для микобактерий туберкулеза.

Генетические исследования *M. tuberculosis* в Казахстане больше касались вопросов определения мутаций в генах *M. tuberculosis*,

обуславливающих устойчивость к основным противотуберкулезным препаратам и генотипированию штаммов, циркулирующих в Казахстане [12-15], лишь одна публикация касается предварительных данных полногеномного секвенирования двух клинических изолятов *M. tuberculosis* [16].

Проведение дальнейших исследований генома микобактерий необходимо, чтобы выявить особенности генома казахстанских штаммов *M. tuberculosis* с различной лекарственной устойчивостью, проследить эволюцию патогенных факторов, выявить факторы вирулентности штаммов с множественной и широкой устойчивостью.

Целью исследования является определение полной последовательности генома клинических изолятов *M. tuberculosis* с различной лекарственной чувствительностью и изучение генетических маркеров лекарственной устойчивости туберкулеза, проведение сравнительного биоинформатического анализа между основными группами штаммов *M. tuberculosis*.

## Материалы и методы

Клинические изоляты микобактерий туберкулеза получены в референс-лаборатории от пациентов, проходивших лечение в Национальном центре проблем туберкулеза Республики Казахстан, г. Алматы. Выборка состояла из 20 клинических изолятов с различной лекарственной чувствительностью: 1) *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (MDR TB); 2) *M. tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью (XDRTB); 3) *M. tuberculosis* полирезистентные – различные сочетания лекарственной устойчивости, кроме сочетания H(изониазид)+R(рифампицин); 4) *M. tuberculosis* монорезистентный, устойчивые к одному из противотуберкулезных препаратов (например, устойчивость только к рифампицину, или только к изониазиду, этамбутолу, стрептомицину); 5) лекарственно-чувствительные *M. tuberculosis* ко всем противотуберкулезным препаратам. Лекарственная чувствительность *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам 1 и 2 ряда определялась методом абсолютных концентраций на твердой среде Левенштейна-Йенсена и с использованием системы BACTEC-MGIT 960 Mycobacteria Growth Indicator Tube (BD Diagnostic Systems, США).

Выделение тотальной геномной ДНК образцов коллекции было проведено с использованием метода, описанного Van Soolingen D. [17].

Генотипирование штаммов *M. tuberculosis*.

Подготовка образцов, регенерация мембран, подготовка буферов, расходного материала, проведение сполиготипирования микобактерий туберкулеза осуществлялось по разработанному протоколу в микобактериологической лаборатории Wadsworthcenter (г. Олбани, штат Нью-Йорк, США). В ПЦР-амплификации используются праймеры соответствующие спейсерным последовательностям. Присутствие или отсутствие спейсерных последовательностей определяется Саузерн-блот-гибридизацией, то есть проводится гибридизация олигонуклеотидов соответствующего состава, нанесенных на мембрану с уникальными спейсерными последовательностями Ампликоны, включающие спейсерные промежутки DR-региона, полученные с использованием биотинилированных праймеров, гибридизовались со специфическими зондами, закрепленными на нейлоновой мембране. Био-тинилированные праймеры и мембрана входили в состав набора для сполиготипирования «SpoligotypingKit» (IsogenLifescience, США). Сполиготип для каждого штамма записывался 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.

Подготовка библиотек для полногеномного секвенирования проводилась по протоколам производителя RapidLibraryPreparationMethodManualGSFLX+ SeriesXL+ (Roche diagnostics, Германия). Для осуществления эмульсионной ПЦР и обогащения магнитных бусинок с фрагментами ДНК использовали руководство завода-изготовителя Roche emPCR Method Manual– Lib-L SV(LV), где использовался набор emPCRKitLib-LSV(LV) (Roche diagnostics, Германия).

Полногеномное «shotgun» секвенирование было выполнено с использованием платформы Roche 454 GS FLX+ Titanium (Roche diagnostics) по стандартному протоколу GS-FLXPlus Sequencing Method-Manual\_XLPlusKit\_May2011 (Roche diagnostics, Германия).

Сборка полных геномов проводилась с использованием NEWBLERde novo assembler (454 Life Sciences, Branford, CT)(Roche diagnostics, Германия). Параметры сборки: ожидаемая глубина – 0; минимальная длина рида – 20; минимальная длина перекрытия – 40; минимальная идентичность перекрытия – 90%; параметр идентичности выравнивания – 2; параметр различности выравнивания – «-3»; пограничное значение для

всех контигов – 100; пограничное значение для больших контигов – 500; пограничное значение для скафолдов – 2000.

Выравнивание и картирование сиквенсовых ридов проводилось на референсный штамм *M.tuberculosis* H37Rv (NC\_000962.3, GCF\_000195955.2) с использованием GS Reference Mapping (454 Life Sciences, Branford, CT). Полный референсный геном был загружен из международной базы GenBank (National Center for Biotechnology Information). Сравнительный анализ обнаруженных геномных вариантов среди 20 изолятов проводили с применением диаграмм Венна. Поиск генетических локусов и генов, соответствующих определенной позиции в геноме, среди обнаруженных геномных вариантов проводился с применением разработанного биоинформатического скрипта.

## Результаты и их обсуждение

### Генотипирование *M.tuberculosis*

Проведен анализ на присутствие или отсутствие уникальных спейсерных нуклеотидных последовательностей DR-регионов генома микобактерий для определения генотипов изучаемых 20 клинических изолятов (таблица 1).

Сравнительный анализ полученных данных проводили с данными интернациональной базы SpolDB3, SpolDB4, SITVITweb([http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd\\_mycology.html](http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_mycology.html)), а также с базой данных микобактериологической лаборатории Wadsworthcenter (штат Нью-Йорк, США).

Большинство изученных изолятов *M. tuberculosis* (18) относятся к семейству Beijing (происхождение восточно-азиатское East Asian), только два изолята показали принадлежность к семействам T (происхождение евро-американское Euro-American) и MANU-1 (индо-океанское Indo-Oceanic). Анализ данных лекарственной чувствительности показал, что генотипы отличные от Beijing – T и MANU-1 являются лекарственно-чувствительными изолятами, тогда как, представители семейства Beijing имеют различный профиль лекарственной чувствительности (множественная лекарственная устойчивость или мультирезистентные MDR -8, широкая лекарственная устойчивость или XDR -3, полирезистентный – 1, монорезистентный – 1, чувствительные – 5).

Таким образом, 13 из 18 изолятов *M. tuberculosis* семейства Beijing относятся к лекарственно-устойчивым штаммам, что подтверждает данные о том, что большинство представителей семейства Beijing имеют ассоциацию с лекарственной устойчивостью.

**Таблица 1** – Генетические семейства и тип лекарственной чувствительности 20 исследуемых клинических изолятов *M.tuberculosis*

№ ID	Лекарственная чувствительность	Октал код	Семейство (генотип)	Линия происхождения
N1	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N2	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N3	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N4	чувствительный	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N5	XDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N6	чувствительный	777737663760771	T (T1)	Euro-American
N7	чувствительный	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N8	чувствительный	7747777742771	Manu1	Indo-Oceanic
N9	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N10	XDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N11	чувствительный	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N12	чувствительный	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N13	чувствительный	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N14	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N15	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N16	XDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N17	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N18	монорезистентный	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N19	полirezистентный	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)
N20	MDR	000000000003771	Beijing	East Asian (Beijing)

*Анализ геномных вариантов различных изолятов M.tuberculosis*

Основные статистические показатели проведенного биоинформатического анализа геномных вариантов для каждого из 20 изолятов представлены в таблице 2, где указаны показатели общего количества обнаруженных геномных вариантов для каждого исследованного изолята, отличающихся от референсного штамма *M.tuberculosis*H37Rv.

Для изучения геномных локусов, участвующих в возникновении устойчивости к основным лекарственным препаратам была проанализирована международная база данных «Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database». В результате анализа были отобраны наиболее часто встречающиеся мутации в гене-

тических локусах к основным лекарственным препаратам (таблица 3).

Для каждого полногеномного изолята были проанализированы генетические локусы, определяющие устойчивость к лекарственным препаратам из числа найденных геномных вариантов и соответствующие гены (таблица 2). Было обнаружено от 13 до 30 генетических локусов с геномными вариантами среди полногеномных данных 20 изолятов. В разработанной базе данных подробно приведены все обнаруженные геномные варианты (однонуклеотидные полиморфизмы, инсерции, делеции) для каждого изученного изолята с указанием общей глубины покрытия на данный вариант, описанием продукта гена, позиции в референсном геноме.

**Таблица 2** – Основные статистические показатели анализа геномных вариантов

Идентификатор	Лек. устойчивость	Общее кол-во геномных вариантов	Кол-во обнаруженных вариантов из международной базы «TBDrugResistance Mutation Database»	Кол-во генов
MTB-06-001	MDR	1768	26	14
MTB-06-002	MDR	1831	30	16
MTB-06-003	MDR	1721	26	15
MTB-06-009	MDR	1820	25	16
MTB-07-004	MDR	1799	27	17
MTB-07-005	MDR	854	18	15
MTB-07-007	MDR	1565	25	13
MTB-07-010	MDR	1685	26	16
MTB-06-005	XDR	1754	27	17
MTB-06-010	XDR	1780	26	16
MTB-07-006	XDR	1666	20	11
MTB-07-008	монорезистентный	1475	19	12
MTB-07-009	полирезистентный	1770	24	15
MTB-06-004	чувствительный	1741	23	12
MTB-06-006	чувствительный	1025	13	10
MTB-06-007	чувствительный	1651	16	12
MTB-06-008	чувствительный	1780	23	14
MTB-07-001	чувствительный	1737	22	14
MTB-07-002	чувствительный	1810	20	13
MTB-07-003	чувствительный	1641	19	12

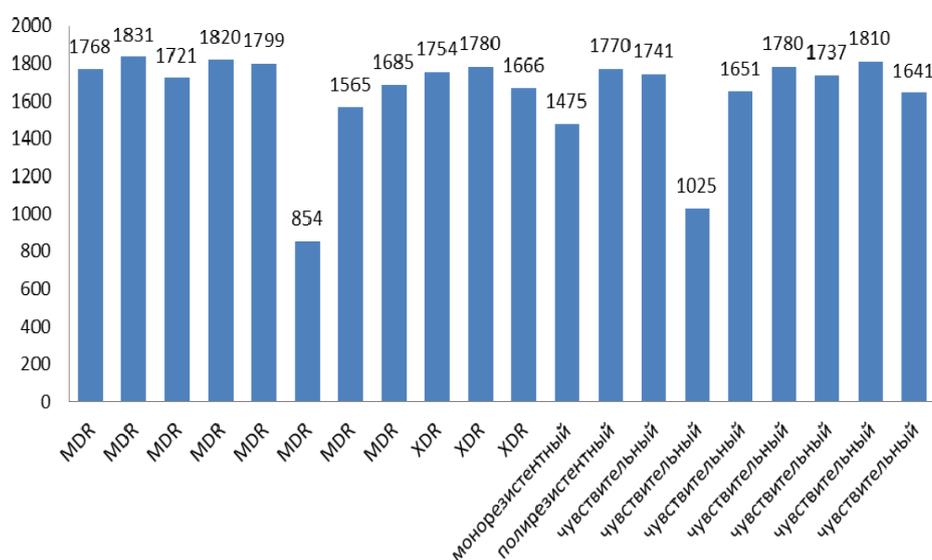
**Таблица 3** – Основные локусы лекарственной устойчивости *M.tuberculosis*, согласно базы данных «Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database»

Противотуберкулезный препарат	Локус	Ген
AMINOGLYCOSIDES (KANAMYCIN / CAPREOMYCIN / AMIKACIN / VIOMYCIN)	MTB000019, Rv1694	rrs, tlyA
ETHAMBUTOL	Rv0340, Rv0341, Rv0342, Rv0343, Rv1267c, Rv3124, Rv3125c, Rv3126, Rv3264c, Rv3266c, Rv3793, Rv3794, Rv3795	iniB, iniA, iniC, embR
ETHIONAMIDE	Rv1483, Rv1484, Rv3854c	mabA, inhA, ethA
FLUOROQUINOLONES	Rv0005, Rv0006	gyrB, gyrA
ISONIAZID	Rv0129c, Rv0340, Rv0341, Rv0342, Rv0343, Rv1483, Rv1484, Rv1592c, Rv1772, Rv1854c, Rv1908c, Rv1909c, Rv2242, Rv2243, Rv2245, Rv2247, Rv2427a, Rv2428, Rv2846c, Rv3139, Rv3566c, Rv3795	fbpC, iniB, iniA, iniC, mabA, inhA, ndh, katG, furA, srmR, fabD, kasA, accD6, oxyR, aphC, efpA, fadE24, nhoA, embB
PARA-AMINOSALISYLIC ACID	Rv2764c	thyA
PYRAZINAMIDE	Rv2043c	pncA
RIFAMPICIN	Rv0667, Rv3795	rpoB, embB
STREPTOMYCIN	MTB000019, Rv0682, Rv3919c	rrs, rpsL, gidB

На рисунке 1 представлено распределение всех обнаруженных геномных вариантов среди 20 изолятов. Для изолятов МТВ-07-005 и МТВ-06-006 было обнаружено аномально низкое количество генетических изменений в сравнении с референсным штаммом *M.tuberculosis* H37Rv и с общей группой по типу MDR и чувствительный. Практически все изоляты относятся к семейству Beijing, за исключением изолята МТВ-06-006, относящегося к семейству T – евро-американская линия происхождения, что может служить подтверждением существенного отличия МТВ-06-006 на уровне генетических

изменений. Наиболее отличным и интересным остается изолят МТВ-07-005, что требует его дальнейшего детального изучения.

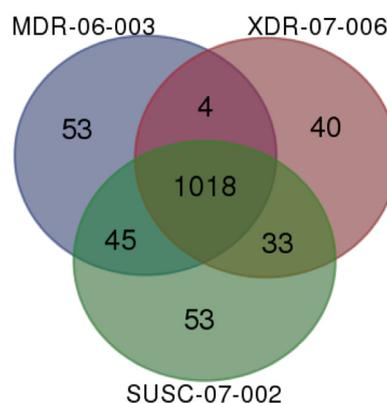
Нами были выбраны три основные клинические группы для проведения сравнительного биоинформатического анализа между изолятами – чувствительная (SUSC), MDR и XDR. В качестве отдельных представителей каждой группы были выбраны изоляты – МТВ-06-003, МТВ-07-006 и МТВ-07-002. Результат детекции и поиска общих и отличающихся генетических локусов, характерных для трех основных клинических групп представлен графически на рисунке 2.



**Рисунок 1** – Распределение обнаруженных геномных вариантов (полиморфизмы, делеции и инсерции) среди 20 изолятов согласно клинической характеристике

Из диаграммы легко проследить большее сходство MDR и XDR изолятов с чувствительным (SUSC) нежели между собой, на основании выбранных изолятов, так, например, между изолятами МТВ-06-003 и МТВ-07-006 обнаружено 4 общих генетических локуса (гены PE\_PGSR24, PPE24, PPE5, PE\_PGSR56), не найденных в МТВ-07-002. Между МТВ-07-002 и МТВ-06-003, а также между МТВ-07-002 и МТВ-07-006 обнаружено 45 и 33 общих уникальных генетических локуса, соответственно.

Обнаружено 1018 общих генетических локуса между тремя изолятами разных групп лекарственной чувствительности, основную часть из которых составляют, так называемые «ядерные (core)» генетические локусы – необходимые для обеспечения жизнедеятельности микобактерии.



**Рисунок 2** – Визуализация количества совпадений по геномным локусам, обнаруженных в трех типах изолятов в виде диаграммы Венна (чувствительный – SUSC, MDR и XDR) на примере МТВ-06-003, МТВ-07-006 и МТВ-07-002

Необходимо отметить, что обнаруженные геномные варианты в четырех генах PE\_PGRS24, PPE24, PPE5, PE\_PGRS56, характерные для MDR и XDR изолятов, относятся к семейству генов PE/PPE, являющихся уникальными и представленными только для вида микобактерий. Белки данного семейства генов могут играть роль факторов вирулентности и способствовать успешному инфицированию [18, 19, 20]. Т.е. мутации характерные для двух данных изолятов могут быть одним из дополнительных факторов вирулентности, дающих преимущество данным изолятам при взаимодействии с организмом хозяина и требуют дальнейшего изучения. Кроме того, в нашей базе данных имеются данные по обнаруженным геномным вариантам в конкретных генетических локусах, как уникальные и не повторяющиеся, так и те, которые являются смежными в сравнительном аспекте для разных изолятов, относящихся к разным группам по лекарственной чувствительности, а также сравнительная характеристика совпадений по геномным локусам, обнаруженных в трех типах изолятов.

В последнее время все большее внимание уделяется изучению и внедрению новых технологий полногеномного секвенирования, а также

внедрению современных молекулярно-генетических методов для диагностики *M. tuberculosis*. В данной работе определены полные последовательности геномов 20 клинических изолятов *M. tuberculosis* различной лекарственной чувствительностью, из базы данных «TuberculosisDrugResistanceMutationDatabase» отобраны основные 37 генов, ассоциированные с лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* к 9 базовым противотуберкулезным препаратам 1 и 2 ряда, были проанализированы соответствующие участки данных генов для каждого изолята, а также проведен сравнительный биоинформатический анализ между изолятами с различной лекарственной чувствительностью (чувствительные, MDR и XDR), где определены геномные варианты в четырех генах PE\_PGRS24, PPE24, PPE5, PE\_PGRS56, относящиеся к семейству протеинов PE/PPE, играющие ключевую роль в патогенезе и характерные для MDR и XDR изолятов.

*Работа выполнена в рамках проекта «Создание предпосылок персонализированного подхода в диагностике и лечении туберкулеза на основе полногеномного секвенирования M. tuberculosis» по бюджетной программе МОН РК «Грантовое финансирование научных исследований» на 2013-2015 гг.*

### Литература

- 1 World Health Organisation. Global tuberculosis report. 20<sup>th</sup> edition.-World Health Organisation, Geneva, Switzerland. – 2015. ISBN 978-92-4-156505-9.
- 2 Barzon L., Lavezzo E., Militello V., Toppo S., Palu G. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology // Int. J. Mol. Sci.- 2011.- Vol. 12.- P. 7861-7884. DOI: 10.3390/ijms12117861
- 3 Koser C.U., Ellington M.J., Cartwright E.J.P., Gillespie S.H., Brown N.M., Farrington M., Holden M.T.G., Dougan G., Bentley S.D., Parkhill. J., Peacock S.J. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology // PLoS Pathogen.- 2012.- Vol. 8. № 8.- P.1–9. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002824
- 4 Hershberg R., Lipatov M., Small P.M., Sheffer H., Niemann S., Homolka S., Roach J.C., Kremer K., Petrov D.A., Feldman M.W., Gagneux S. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography // Plos Biol. – 2008. – V.6(12). e311- P.2658-2671. DOI: 10.1371/journal.pbio.0060311
- 5 Niemann S., Köser C.U., Gagneux S., Plinke C., Homolka S., Bignell H., Carter R.J., Cheetham R.K., Cox A., Gormley N.A., Kokko-Gonzales P., Murray L.J., Rigatti R., Smith V.P., Arends F.P.M., Cox H.S., Smith G., Archer J.A.C. Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints // PLoS ONE. – 2009. – V.4(10). e7407– P1-7. DOI: 10.1371/journal.pone.0007407
- 6 Ioerger T.R., Koo S., No E-G., Chen X.H., Larsen M.H., Michelle H., Jacobs W.R., Pillay M., Sturm A.W., Sacchettini J.C. Genome analysis of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis from KwaZulu-Natal, South Africa // PLoS ONE. – 2009. – V.4(11). e7778. – P1-9. DOI: 10.1371/journal.pone.0007778
- 7 Gardy J.L., Johnston J.C., Sui S.J.H., Sui S.J.H., Cook V.J., Shah L.N., Brodtkin E., Rempel S., Moore R., Zhao Y.J., Holt R., Varhol R., Birol I., Lem M., Sharma M.K., Elwood K., Jones S.J.M., Brinkman F.S.L., Brunham R.C., Tang P. Whole-genome sequencing and social network analysis of a tuberculosis outbreak // N Engl J Med/ – 2011. – V.364(8). – P.730e9. DOI: 10.1056/NEJMoa1003176
- 8 Ford C.B., Lin P.L., Chase M.R., Shah R.R., Iartchouk O., Galagan J., Mohaideen N., Ioerger T.R., Sacchettini J.C., Lipsitch M., Flynn J.L., Fortune S.M. Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection // Nat Genet. – 2011. – V.43(5), – P.482e6. DOI: 10.1038/ng.811
- 9 Fleischmann R. D., Alland D., Eisen J. A., Carpenter L., White O., Peterson J., DeBoy R., Dodson R., Gwinn M., Haft D., Hickey E., Kolonay J.F., Nelson W.C., Umayam L.A., Ermolaeva M., Salzberg S.L., Delcher A., Utterback T., Weidman J., Khouri

- H., Gill J., Mikula A., Bishai W., Jacobs W.R., Venter J.C., Fraser C.M. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains // J. Bacteriol. – 2002. – V.184. – P.5479–5490. DOI: 10.1128/JB.184.19.5479-5490.2002
- 10 Tsolaki A.G., Hirsh A.E., DeRiemer K., Enciso J.A., Wong M.Z., Hannan M., de la Salmoniere Y.O.L., Aman K., Kato-Maeda M., Small P.M. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004. – V.101. – P.4865–4870. DOI: 10.1073/pnas.0305634101
- 11 Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K. E., Connell N.D., Kreiswirth B.N., Whittam T.S. and Musser J.M. Restricted structural gene polymorphism in the *M. tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -1997. –V. 94.– P.9869–9874.
- 12 Kozhamkulov U., Akhmetova A., Rakhimova S., Belova E., Alenova A., Bismilda V., Chingissova L., Ismailov Sh., Ramanculov E., Momynaliev K. Molecular characterization of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Kazakhstan // Japanese Journal of Infectious Disease. -2011.- V.64.- P.253-255.
- 13 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. International Journal Tuberculosis and Lung Diseases 2015 Feb;19(2):179-84. DOI: 10.5588/ijtld.14.0305.
- 14 Ibrayeva, U. Kozhamkulov, D. Raiymbek, A. Alenova, S. Igilikova, E. Zholdybayeva, T. Abildaev, K. Momynaliev. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in the penitentiary system of Kazakhstan // International Journal Tuberculosis and Lung Diseases. 2014 Mar; 18(3):298-301. DOI: 10.5588/ijtld.13.0558.
- 15 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 (Edinb). 2015 Sep;95(5):538-46. DOI 10.1016/j.tube.2015.04.012.
- 16 Ulykbek Kairov, Ulan Kozhamkulov, Askhat Molkenov, Saule Rakhimova et al. Draft Genome Sequences of Two Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Sputum of Kazakh Patients // May/June 2015.- Volume 3 Issue 3 e00466-15. DOI:10.1128/genomeA.00466-15
- 17 Van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* // Methods Enzymol. 1994; 235.P.196–205.
- 18 Banu S., Honore N., Saint-Joanis B., Philpott D., Prevost M.C., Cole S.T. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? // Molecular microbiology. -2002. -Vol. 44, № 1. – P. 9-19. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02813.x
- 19 Mukhopadhyay S., Balaji K.N. The PE and PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis* // Tuberculosis. -2011. -Vol. 91, № 5. – P. 441-447. DOI: 10.1016/j.tube.2011.04.004
- 20 Adindla S., Guruprasad L. Sequence analysis corresponding to the PPE and PE proteins in *Mycobacterium tuberculosis* and other genomes // Journal of biosciences. -2003. -Vol. 28, № 2. – P. 169-179. DOI: 10.1007/BF02706216

## References

- 1 World Health Organisation. Global tuberculosis report (2015) 20<sup>th</sup> edition, World Health Organisation, Geneva, Switzerland ISBN 978-92-4-156505-9
- 2 Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, Palu G (2011) Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology, Int J Mol Sci, 12:7861-7884. DOI: 10.3390/ijms12117861
- 3 Koser CU, Ellington MJ, Cartwright EJP, Gillespie SH, Brown NM, Farrington M, Holden MTG, Dougan G, Bentley SD, Parkhill J, Peacock SJ (2012) Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology, PLoS Pathogen, 8 (8):1–9. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002824
- 4 Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, Roach JC, Kremer K, Petrov DA, Feldman MW, Gagneux S (2008) High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography, Plos Biol, 6(12): e311, 2658-2671. DOI: 10.1371/journal.pbio.0060311
- 5 Niemann S, Köser CU, Gagneux S, Plinke C, Homolka S, Bignell H, Carter RJ, Cheetham RK, Cox A, Gormley NA, Kokko-Gonzales P, Murray LJ, Rigatti R, Smith VP, Arends FPM, Cox HS, Smith G, Archer JAC (2009) Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints, PLoS ONE, 4(10): e7407, 1-7. DOI: 10.1371/journal.pone.0007407
- 6 Ioerger TR, Koo S, No E-G, Chen XH, Larsen MH, Michelle H, Jacobs WR, Pillay M, Sturm AW, Sacchettini JC (2009) Genome analysis of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis from KwaZulu-Natal, South Africa, PLoS ONE, 4(11): e7778, 1-9. DOI: 10.1371/journal.pone.0007778
- 7 Gardy JL, Johnston JC, Sui SJH, Sui SJH, Cook VJ, Shah LN, Brodtkin E, Rempel S, Moore R, Zhao YJ, Holt R, Varhol R, Birol I, Lem M, Sharma MK, Elwood K, Jones SJM, Brinkman FSL, Brunham RC, Tang P (2011) Whole-genome sequencing and social network analysis of a tuberculosis outbreak, N Engl J Med, 364(8):730e9. DOI: 10.1056/NEJMoa1003176
- 8 Ford CB, Lin PL, Chase MR, Shah RR, Iartchouk O, Galagan J, Mohaideen N, Ioerger TR, Sacchettini JC, Lipsitch M, Flynn JL, Fortune SM (2011) Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection, Nat Genet, 43(5): 482e6. DOI: 10.1038/ng.811
- 9 Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, DeBoy R, Dodson R, Gwinn M, Haft D, Hickey E, Kolonay JF, Nelson WC, Umayam LA, Ermolaeva M, Salzberg SL, Delcher A, Utterback T, Weidman J, Khouri H, Gill J, Mikula A, Bishai W, Jacobs WR, Venter JC, Fraser CM (2002) Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains, J Bacteriol, 184:5479–5490. DOI: 10.1128/JB.184.19.5479-5490.2002

- 10 Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, Enciso JA, Wong MZ, Hannan M, de la Salmoniere YOL, Aman K, Kato-Maeda M, Small PM (2004) Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains, Proc Natl Acad Sci USA, 101:4865–4870. DOI: 10.1073/pnas.0305634101
- 11 Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS and Musser JM(1997) Restricted structural gene polymorphism in the *M. tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination, Proc Natl Acad Sci USA,94:9869–9874.
- 12 Kozhamkulov U, Akhmetova A, Rakhimova S, Belova E, Alenova A, Bismilda V, Chingissova L, Ismailov Sh, Ramanculov E, Momynaliev K (2011) Molecular characterization of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Kazakhstan, Japanese Journal of Infectious Disease, 64:253-255.
- 13 Akhmetova A, Kozhamkulov U, Bismilda V, Chingissova L, Abildaev T, Dymova M, Filipenko M, Ramanculov E (2015) Mutations in the *pncA* and *rpsA* genes among 77 *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kazakhstan. International Journal Tuberculosis and Lung Diseases, 19(2):179-84. DOI: 10.5588/ijtld.14.0305
- 14 Ibrayeva A, KozhamkulovU, RaiymbekD, AlenovaA, IgilikovaS, ZholdybayevaE, AbildaevT, MomynalievK (2014) Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in the penitentiary system of Kazakhstan, International Journal Tuberculosis and Lung Diseases, 18(3):298-301.DOI: 10.5588/ijtld.13.0558
- 15 Skiba Y, Mokrousov I, Ismagulova G, Maltseva E, Yurkevich N, Bismilda V, Chingissova L, Abildaev T, Aitkhozhina N (2015) Molecular snapshot of *Mycobacterium tuberculosis* population in Kazakhstan: A country-wide study Tuberculosis, 95(5):538-46. DOI 10.1016/j.tube.2015.04.012
- 16 KairovU, KozhamkulovU, MolkenovA, Rakhimova S, et al. (2015) Draft Genome Sequences of Two Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Sputum of Kazakh Patients, 3 (3): e00466-15.DOI:10.1128/genomeA.00466-15
- 17 Van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD (1994) DNA fingerprinting of *Mycobacteriumtuberculosis*, Methods Enzymol, 235:196–205
- 18 Banu S, Honore N, Saint-Joanis B, Philpott D, Prevost MC, Cole ST (2002) Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? // Molecular microbiology, 44(1):9-19.DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02813.x
- 19 Mukhopadhyay S, Balaji KN (2011) The PE and PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis, 91(5):441-447. DOI: 10.1016/j.tube.2011.04.004
- 20 Adindla S, Guruprasad L (2003) Sequence analysis corresponding to the PPE and PE proteins in *Mycobacterium tuberculo-*sis and other genomes, Journal of biosciences, 28(2):169-179. DOI: 10.1007/BF02706216