

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ *M. TUBERCULOSIS* У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ Г. АСТАНА

Майя Александровна ДЫМОВА¹, Алмагуль Рахимберлиевна КУШУГУЛОВА²,
Сауле Есламовна РАХИМОВА², Ерлан Мирхайдарович РАМАНКУЛОВ²,
Роза Жапаровна ЖУСУПОВА³, Евгений Александрович ХРАПОВ¹,
Максим Леонидович ФИЛИПЕНКО¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8

²Национальный центр биотехнологии
010000, г. Астана, ул. Ч. Валиханова, 13/1

³ГУ Противотуберкулезный диспансер
010000, г. Астана, ул. Махтумкули, 14

Впервые проведено молекулярно-генетическое исследование методом VNTR-типирования изолятов микобактерий туберкулеза, выделенных от 46 больных туберкулезом легких, проживающих в г. Астана (Казахстан). Идентифицировано 23 различных генетических профиля. Преобладали изоляты семейства Beijing, составившие 70 % (32 изолята). Кластер изолятов, принадлежащий семейству Beijing, обладал значительной генетической гомогенностью, что свидетельствует о повышенной трансмиссивности и вирулентности данного семейства на исследуемой территории. Статистически значимых различий между количеством изолятов данного генотипа в группе первично и вторично выявленного туберкулеза не обнаружено ($\chi^2 = 0,360$, $P = 0,5487$). Не выявлено наличие ассоциации между принадлежностью к семейству Beijing и множественной лекарственной устойчивости изолятов ($R = 0,00$, $p = 1,0000$). Кроме того, нами был выявлен значительный процент изолятов (26 %), относящийся к неидентифицированным пока семействам *M. tuberculosis* и имеющий индивидуальные некластризующиеся генотипы.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, лекарственная устойчивость, мутации, семейство Beijing.

После развала Советского Союза туберкулез в Казахстане представляет серьезную проблему. Уровень заболеваемости туберкулезом принял характер пандемии и, по данным от 2002 г., составил 165,1 на 100 000 населения, а в некоторых областях этот показатель доходит до 268 на 100 000 [1]. На сегодняшний день более 60 тысяч граждан Казахстана больны туберкулезом. По статистическим данным, наиболее неблагоприятным районом в республике является Западный Казахстан, а именно Актюбинская, Атырауская, Западно-Казахстанская, Кызылординская и Мангистауская области [2]. Ситуация осложняется увеличением числа изолятов *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью, а также штаммов с повышенной способностью к трансмиссивности, таких как штаммы семейства Beijing *M. tuberculosis* [3]. В связи с этим, а также наличием большой

территории Российской Федерации, граничащей с Казахстаном, и значительными миграционными потоками между ними нам представляется актуальным изучение молекулярно-генетических особенностей изолятов, циркулирующих на данной территории, с помощью современных молекулярных методов типирования и определения лекарственной устойчивости. Известно, что резистентность к изониазиду вызывается мутациями и делециями в генах *inhA*, *katG*, в межгенном регионе *oxyR-ahpC*. Резистентность к рифампицину чаще всего вызывается различными мутациями и делециями в «коровом» регионе, размером в 81 п.н., участке гена *rpoB*, кодирующего β -субъединицу ДНК-зависимой РНК-полимеразы [4, 5].

В настоящей работе мы впервые провели молекулярно-генетическое типирование изолятов, циркулирующих на территории г. Астана, Казах-

Дымова М.А. — м.н.с., e-mail: maya.a.rot@gmail.com

Кушугулова А.Р. — к.м.н., зав. лабораторией коллекции микроорганизмов, e-mail: lgene@biocenter.kz

Рахимова С.Е. — н.с. национальной научной лаборатории коллективного пользования,
e-mail: rahimova_sauile@mail.ru

Раманкулов Е.М. — д-р философии в области биохимии и молекулярной биологии, генеральный директор,
e-mail: ramanculov@biocenter.kz

Жусупова Р.Ж. — главный врач, e-mail: tubdisp_astana@mail.ru

Храпов Е.А. — м.н.с., e-mail: Khrap_off@ngs.ru

Филипенко М.Л. — к.б.н., руководитель группы фармакогеномики, e-mail: max@niboch.nsc.ru

стан, с помощью методов VNTR-типирования. Также были изучены мутации в генах, ассоциированных с возникновением устойчивости к рифампицину и изониазиду, определены их частоты, найдены корреляции между наличием той или иной мутации и принадлежностью к определенному генотипу микобактерий.

Материал и методы

В работе были использованы 46 изолятов *M. tuberculosis*, отобранные случайным образом, выделенные в течение 2004 г. от больных, проживающих в различных районах г. Астана, Казахстан (средний возраст — 40 лет). В выборку входили пациенты как женского (13 больных), так и мужского пола (33 больных). Преобладали больные с диагнозом «инфильтративный туберкулез легких» — 39 человек (85 %); с фиброзно-кавернозным туберкулезом было 7 человек (15 %), с диссеминированным туберкулезом легких — 7 (15 %), с казеозной пневмонией — 1. Изоляты микобактерий туберкулеза выращивали в течение 4 недель на среде Левенштейна — Йенсена, они были протестированы на чувствительность к изониазиду, этамбутолу, рифампицину, стрептомицину методом минимальных ингибирующих концентраций. В данном исследовании были соблюдены все биоэтические нормы, получено одобрение локального комитета по медицинской этике. Выделение ДНК из культуры *M. tuberculosis* проводилось согласно методике Dick van Soolingen [6]. VNTR-типирование выполняли по ранее описанной методике [7]. Для VNTR-типирования локусов ETR A, B, C, MIRU2, MIRU4, MIRU10, MIRU16, MIRU20, MIRU23, MIRU24, MIRU26, MIRU27, MIRU31, MIRU39, MIRU40 проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в конечном объеме 20 мкл, содержащем 65 мМ трис-HCl (pH 8,9), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 1,8 мМ MgCl₂, 0,05 % Твин 20, 0,2 мМ дНТФ, 1 мкМ соответствующих олигонуклеотидных праймеров, 1 единицу активности Taq-ДНК-полимеразы, 1–10 нг геномной ДНК *M. tuberculosis*. Структуры олигонуклеотидных праймеров приведены в **таблице**. Реакцию выполняли на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, США) с начальной денатурацией при 96 °C (3 мин), далее в течение 33 циклов с денатурацией при 95 °C (5 с), отжигом при 60 °C (10 с) и элонгацией при 72 °C (20 с) [6, 8]. Число копий tandemного повтора рассчитывали в зависимости от размера ПЦР-фрагмента и фланкирующей области. Структуру и число копий повторов выборочно верифицировали прямым секвенированием амплифицированных фрагментов ДНК. Генотип каждого изолята отображали как набор из 15 цифр, где каждая цифра 15-значного номера показывала число копий соответствующего tandemного повтора. Статистическую обработку проводили с использованием программного пакета Statistica 6.0 (Statsoft Inc.). Кластерный анализ с построением дендрограммы

Таблица

Нуклеотидные последовательности праймеров, используемые в работе

Название праймера	Нуклеотидная структура
ETRA1 ETRA2	5'-GATTGAGGGGATCGTGATTGG-3' 5'-CAGCTAGGCACTCCTGAGATTCC-3'
ETRB1 ETRB2	5'-BGC GAACACCAGGACAGCATCATG 5'-GGCATGCCGGTGATCGAGTGG
ETRC1 ETRC2	5'-CCTTATGCTTTGCCTGTTTGACC-3' 5'-TGTTCCGGGTGAGAAGATCG-3'
MIRU02U MIRU02R	5'-CAGGACACGGGTTCTACTG-3' 5'-GGACTAGGTGCGAGGTTGTGTC-3'
MIRU04U MIRU04R	5'-CAGGTCACAACGAGAGGAAGAGC 5'-GCGGATCGGCCAGCGACTCCTC
MIRU10U MIRU10R	5'-GACTTCCAACAGCACCGTCTTATC-3' 5'-TCGCACCGATCACGCTACG-3'
MIRU16U MIRU16R	5'-GTTGGAAACGGCGGTTATTGAC-3' 5'-CGGAGTCGTCCAGCAAGACC-3'
MIRU20U MIRU20R	5'-TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG -3' 5'-TCACGGTCTCCGCACTAACG-3'
MIRU23U MIRU23R	5'-CTCACCAGGATCGCCAAACC-3' 5'-TCTGACTCATGGTGTCCAACC-3'
MIRU24U MIRU24R	5'-GCTTGTGCGGGAAGGCTA-3' 5'-CGATCGCGGATCTTTGCT-3'
MIRU26U MIRU26R	5'-CCAGCAGTTGAGCACAGTTTCG-3' 5'-GGATAGGTCCGAGTTCGATTTCC-3'
MIRU27U MIRU27R	5'-CGGTGACCAACGTCAGATTC-3' 5'-ACGTGACGGGGCATCTTC-3'
MIRU31U MIRU31R	5'-CCTTATGCTTTGCCTGTTTGACC-3' 5'-TGTTCCGGGTGAGAAGATCG-3'
MIRU39U MIRU39R	5'-GTCAACAGACCACTAGACAAGCC-3' 5'-GCAGCGTCCGTACTTCCG-3'
MIRU40U MIRU40R	5'-GCAAGAGCAAGAGCACCAAGC-3' 5'-TGTCTAATCAGGTCTTTCTCTCACGC-3'
MSPA MSPB	5'-CGATCTGGTCGGCCCCGAAC-3' 5'-TTCGTGCGGGGTGTTTCGTCCA-3'
MUT531U MUT531R	5'-AAACCACAAGCGCCGAATGTC-3' 5'-TCTGATCGGCTCGCTGTC-3'
RPOB1	5'-AACCGCCGCCTGCGTACGGT-3'

выполняли с использованием критерия UPGMA (unweighted pair-group average) и метода Neighbor Joining (метод объединения ближайших соседей). Для определения мутаций в 315-м кодоне гена KatG и в 531-м кодоне гена rpoB амплифицировали фрагмент, содержащий 315-м кодон гена *katG*, и фрагмент, содержащего 531-й кодон гена *rpoB*. Далее продукты амплификации подвергали гидролизу эндонуклеазами рестрикции *MspI* (C[^]CGG) и

*Bst*PAI (GACNN[^]NNGTC) соответственно («Сиб-энзим», г. Новосибирск).

Мутацию в 315-м кодоне гена *katG* определяли, проводя гидролиз 10 мкл продукта амплификации с помощью фермента *Msp*I. Общий объем смеси составлял 15 мкл. Одну единицу активности фермента добавляли дважды, с интервалом 1 ч, и инкубировали при 37 °С. Далее рестрикционную смесь анализировали в 8%-ном ПААГ. Фрагменты длиной 72, 57 и 6 п.н. соответствовали аллелю «дикого типа» гена *katG*, фрагменты размером 72, 36, 21 и 6 п.н. — мутации в 315-м кодоне гена *katG*.

Для определения мутации в 531-м кодоне гена *groV* продукт амплификации подвергали гидролизу эндонуклеазой рестрикции *Bst*PAI. Для этого в один из олигонуклеотидных праймеров была внесена замена для создания сайта узнавания данной эндонуклеазы в случае присутствия аллеля «дикого типа» в амплифицированном фрагменте ДНК. Гидролиз проводили 2 ч в 25 мкл с использованием 20 мкл амплификационной смеси, содержащей фрагмент 153 п.н. На каждую реакцию брали по 2 единицы активности эндонуклеазы рестрикции *Bst*PAI и инкубировали при 65 °С. Далее продукты рестрикции анализировали в 8%-ном ПААГ с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием. Фрагменты длиной 153 п.н. соответствовали аллелю «мутантного типа», фрагменты длиной 135 и 18 п.н. — аллелю «дикого типа». Прямое секвенирование «коровой» области гена *groV* было выполнено на автоматическом секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора Big dye 3.1.

Результаты и обсуждение

При VNTR-типировании с использованием 15 полиморфных локусов 46 образцов ДНК *M. tuberculosis* было идентифицировано 23 генетических типа. По результатам типирования 26 изолятов входили в кластеры различного размера (с коэффициентом различия < 0,1), остальные 20 изолятов имели уникальный для данной выборки аллельный профиль. На основе результатов VNTR-типирования была построена дендрограмма кластеризации изолятов *M. tuberculosis* (рис.). Индекс дискриминации Гюнтера — Хадсона (HGDI) данного метода составил 0,848, процент кластеризации — 54 %. На данной дендрограмме видно одну большую ветвь, состоящую из изолятов *M. tuberculosis* семейства Beijing, и несколько мелких, которые включают в себя уникальные по аллельному профилю изоляты. Мы получили, что 32 изолята (70 %) принадлежат семейству Beijing. Кластер, содержащий данные изоляты, был гомогенным, что говорит об их недавней трансмиссии. Полученные результаты совпадают с литературными данными: так, при генотипировании изолятов, циркулирующих в Казахстане, 70,4 % составляли изоляты, принадлежащие к семейству Beijing, причем их кластеризация составила 81 %, что также подтверждает высокую степень трансмиссивности изучаемых изолятов [2]. Стоит отметить, что, несмотря на гомогенный кластер генотипа Beijing и его преобладание в исследуемой выборке, профиль резистентности данных изолятов был разный. Причиной тому могут быть и различные источники заражения, и погрешности в противо-

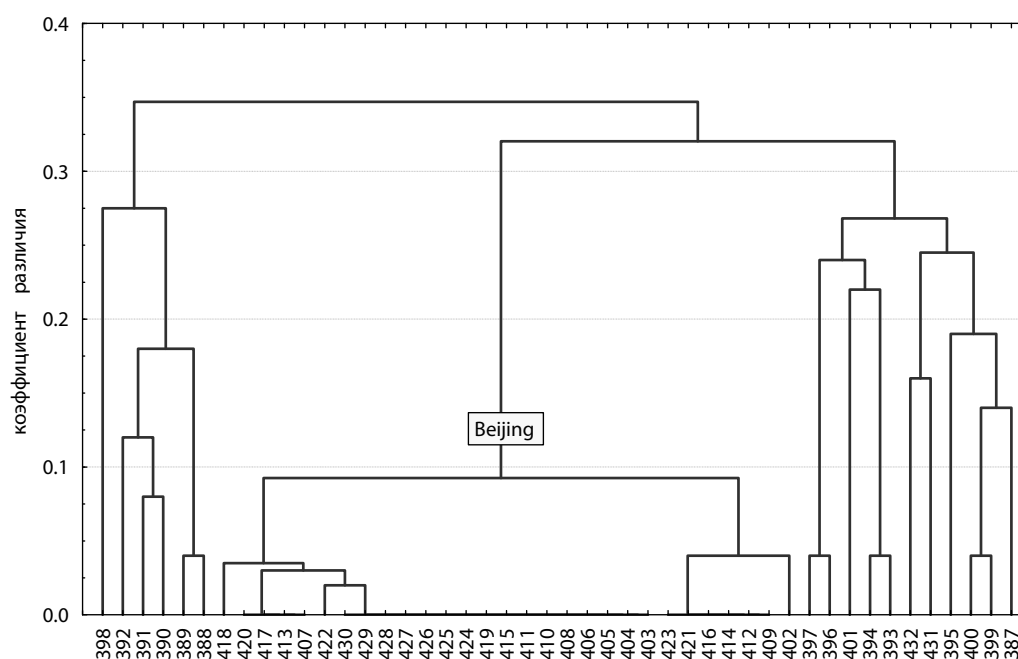


Рис. Дендрограмма кластеризации 46 изолятов *M. tuberculosis*, выделенных от пациентов, проживающих в г. Астана, Казахстан, построенная по результатам VNTR-типирования с использованием 15 полиморфных локусов. Ось абсцисс — коэффициент различия изолятов, ось ординат — номера изолятов

туберкулезной терапии у этих пациентов. Аллельный профиль по используемым VNTR-локусам 233325153533424 имели 16 изолятов семейства Beijing, 233315153533424 — 6 изолятов, 233325173533424 — 4 изолята, у остальных трех изолятов был уникальный для данной выборки генетический профиль. Изоляты с генетическим профилем 233325153533424 и 233325173533424 в данной выборке составили 23 %, по литературным данным они относятся к типам M2 и M11 соответственно [9]. Данные изоляты составляют около 88 % всех изолятов семейства Beijing, циркулирующих на территории азиатской части РФ [10], и 77 % — в европейской части РФ [11]. В соседней с Казахстаном Киргизии штаммы типа M2 составили 50 %, а M11 — 2 % [12]. По литературным данным, эти изоляты обладают повышенной относительной приспособленностью и ростом в макрофагальных клетках ТНР-1, высокой способностью индуцировать непротективный синтез цитокинов и некроз макрофагов [9]. Данные биологические характеристики микобактерий способствуют повышенной трансмиссивности и вирулентности, поэтому выявление таких штаммов с помощью молекулярно-генетических методов будет способствовать как более эффективному применению лекарственной терапии, так и решению стандартных молекулярно-эпидемиологических задач.

У пациентов с впервые выявленным туберкулезом наибольшее распространение имели изоляты семейства Beijing — 11 изолятов (79 %). В группе вторично выявленного туберкулеза изоляты семейства Beijing составили 65 % (21 изолят). Таким образом, статистически значимых различий между количеством изолятов данного генотипа в группе первично и вторично выявленного туберкулеза нет ($\chi^2 = 0,360$, $P = 0,5487$), что может быть связано с особенностями эпидемиологической ситуации в данном регионе или организацией сбора материала. Аналогичные данные были получены в работе Kubica и соавт., где при типировании изолятов *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории Казахстана, изоляты семейства Beijing преобладали в группе и первично, и вторично выявленного туберкулеза [2].

2 изолята принадлежало к семейству LAM, с генетическими профилями 134323153224222 и 134314152224222, отличающимися друг от друга одной копией в локусах MIRU20 и MIRU27. Остальные 12 изолятов (26 %) мы не смогли отнести ни к одному известному ранее семейству.

Изоляты были протестированы с помощью метода минимальных ингибирующих концентраций на устойчивость к изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу. Устойчивость к изониазиду была обнаружена у 32 изолятов (69 %), к рифампицину — у 24 (52 %), к стрептомицину — у 36 (78 %), к этамбутолу — у 18 (39 %). 37 изолятов (80 %) были устойчивы по крайней мере к одному

препарату. 23 изолята (50 %) имели множественную лекарственную устойчивость, т. е. сразу к двум препаратам — изониазиду и рифампицину.

Выборка была исследована на наличие мутации в 315-м кодоне гена *katG*, ответственной за возникновение устойчивости к изониазиду. С помощью генотипического теста было выявлено, что среди изониазид-устойчивых изолятов 27 (84 %) имели замену Ser315Thr гена *katG*. При этом из них 21 изолят (68 %) принадлежал семейству Beijing. В России их удельный вес значительно выше — 96,8 % изолятов семейства Beijing имеют мутацию в 315-м кодоне гена *katG* [13]. Остальные 6 изолятов принадлежали к другим семействам. У 5 изониазид-устойчивых изолятов не было обнаружено замены в 315-м кодоне гена *katG*. Мы протестировали данные изоляты на наличие мутации в гене *ahpC* и обнаружили в двух случаях замену G→A в 46-й позиции гена, что также obligatно ведет к возникновению устойчивости к изониазиду. В остальных трех случаях мутаций в гене *ahpC* обнаружено не было, что может говорить о нахождении мутаций в других генах или о погрешностях фенотипического теста. Чувствительность и специфичность данного теста составили 100 и 79 % соответственно.

Среди 24 рифампицин-устойчивых изолятов только 12 (50 %) имели замену в 531-м кодоне гена *rpoB*. Похожие результаты были получены в Китае и в Индии, где мутации в 531-м кодоне гена *rpoB* были зафиксированы в 59,2 и 54,5 % случаев соответственно [14, 15]. Образцы, устойчивые к рифампицину, но не имеющие мутации в 531-м кодоне гена *rpoB*, были секвенированы. В 4 случаях (16,6 %) нашли замену в 526-м кодоне, из них в двух случаях CAC→TAC, и в двух случаях CAC→CTG. У одного изолята (4 %) замены были в двух кодонах — в 511 CTG→CCG и в 515 ATG→ATA, и в одном случае (4 %) — в 516-м кодоне GAC→GTC. Мутации в 511-м, 515-м, 516-м, 526-м кодонах также ассоциированы с возникновением устойчивости к рифампицину, однако частота их возникновения меньше, чем в 531-м кодоне. Это связано с пониженной относительной приспособленностью изолятов, несущих данные мутации в гене *rpoB*, в сравнении с аллелем «дикого типа» [16]. В 6 случаях (25%) из 24 рифампицин-устойчивых изолятов, мы не нашли мутаций в «коровом» регионе гена *rpoB*, что может говорить о погрешностях фенотипического теста или о существовании иных механизмов возникновения лекарственной устойчивости мутаций в других генах. Чувствительность и специфичность данного анализа составили 95 и 78 % соответственно.

Только 10 изолятов семейства Beijing (31 %) имели мутацию в 531-м кодоне гена *rpoB*, однако из литературных данных известно, что она встречается в 77,3 % случаев в данном семействе [13]. Ранее в работе Hillemann и соавт. при типиро-

вании изолятов, циркулирующих на территории Казахстана, было показано статистически достоверное ($p = 0,027$) увеличение частоты мутации в 531-м кодоне гена *rpoB* среди изолятов семейства Beijing (71,2 %) по сравнению с изолятами, принадлежащими к семейству non-Beijing (46,2 %) [3]. В исследуемой выборке изоляты семейства Beijing не обладают ассоциацией с множественной лекарственной устойчивостью ($R = 0,00$, $p = 1,0000$), а также с наличием мутаций в 531-м и 315-м кодонах в генах *rpoB* и *katG* ($R = 0,205293$, $p = 0,171100$, $R = 0,12766$, $p = 0,155709$ соответственно), это отражает конкретную эпидемиологическую ситуацию на данной территории, где циркулируют микобактерии туберкулеза с определенным профилем резистентности. Отсутствие корреляции между данным генотипом и наличием вышеуказанных мутаций также зафиксировано в Китае, Японии, Корее и Тайване [17]. Таким образом, ассоциации генотипа Beijing с мутациями, связанными с возникновением устойчивости, зависят от исследуемого региона. Возможными причинами этого являются различные курсы лечения, выбор антибиотика, индивидуальные особенности пациентов.

Заключение

В данном исследовании впервые охарактеризовали генетическое разнообразие изолятов *M. tuberculosis*, выделенных от пациентов, проживающих в г. Астана. Были определены частоты встречаемости мажорных мутаций, ассоциированных с возникновением устойчивости к изониазиду и рифампицину. Выявлено преобладание изолятов семейства Beijing, показана большая гомогенность этого кластера, что еще раз подтверждает его повышенную трансмиссивность. В данной выборке встречались как устойчивые, так и чувствительные к противотуберкулезным препаратам изоляты семейства Beijing, и нами не было показано ассоциации данного семейства с лекарственной устойчивостью, что говорит об индивидуальных особенностях данных изолятов, циркулирующих на конкретной территории. В дальнейшем выявление основных филогенетических семейств микобактерий туберкулеза и описание их свойств, особенно лекарственной резистентности, будет способствовать выбору более эффективных превентивных мер в борьбе с туберкулезом в условиях сложной эпидемической ситуации на территории Казахстана.

Список литературы

1. Bumburidi E., Ajeilat S., Dadu A. et al. Progress toward tuberculosis control and determinants of treatment outcomes — Kazakhstan, 2000–2002 // MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. 2006. 55 (Suppl 1). 11–15.
2. Kubica T., Agzamova R., Wright A. et al. The Beijing genotype is a major cause of drug-resistant tuberculosis in Kazakhstan // Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2005. 9 (6). 646–653.

3. Hillemann D., Kubica T., Agzamova R. et al. Rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Kazakhstan // Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2005. 9 (10). 1161–1167.
4. Воронина Е.Н., Вухрова М.А., Храпов Е.А., Киншт В.Н. Мутация Ser315Thr гена *katG* — основная причина устойчивости к изониазиду у изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, распространенных в Новосибирской и Кемеровской областях // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 2004. 3. 8–10.
5. Voronina E.N., Vikhrova M.A., Khrapov E.A., Kinsht V.N. KatG Ser315Thr mutation as the main reason of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolated in the Novosibirsk and Kemerovo Regions // Mol. genetika, mikrobiologiya i virusologiya. 2004. 3. 8–11.
6. Ramaswamy S. and Musser J.M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update // Tuberc. Lung Dis. 1998. 79 (1). 3–29.
7. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements // J. Intern. Med. 2001. 249 (1). 1–26.
8. Frothingham R., Meeker-O'Connell W.A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats // Microbiology. 1998. 144 (Pt 5). 1189–1196.
9. Supply P., Allix C., Lesjean S. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Clin. Microbiol. 2006. 44 (12). 4498–4510.
10. Lasunskaja E., Ribeiro S.C., Manicheva O. et al. Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence // Microbes Infect. 2010. 12. 467–475.
11. Drobniowski F., Balabanova Y., Nikolayevsky V. et al. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia // JAMA. 2005. 293. 22. 2726–2731.
12. Mokrousov I., Narvskaya O., Limeschenko E. et al. Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations // J. Clin. Microbiol. 2004. 42 (6). 2438–2444.
13. Mokrousov I., Valcheva V., Sovhozova N. et al. Penitentiary population of *Mycobacterium tuberculosis* in Kyrgyzstan: exceptionally high prevalence of the Beijing genotype and its Russia-specific subtype // Infect. Genet. Evol. 2009. 9 (6). 1400–1405.
14. Mokrousov I., Otten T., Vyazovaya A. et al. PCR-based methodology for detecting multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing

- family circulating in Russia // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2003. 22 (6). 342–348.
14. Jiao W.W., Mokrousov I., Sun G.Z. et al. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China // Chin. Med. J. (Engl). 2007. 120 (9). 814–819.
15. Mokrousov I., Bhanu N.V., Suffys P.N. et al. Multicenter evaluation of reverse line blot assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates // J. Microbiol. Methods. 2004. 57 (3). 323–335.
16. Billington O.J., McHugh T.D., Gillespie S.H. Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis* // Antimicrob. Agents Chemother. 1999. 43 (8). 1866–1869.
17. Qian L., Abe C., Lin T.P. et al. rpoB genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from East Asian countries // J. Clin. Microbiol. 2002. 40 (3). 1091–1094.

MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTIC OF *M. TUBERCULOSIS* STRAINS OF PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS FROM ASTANA

Maya Aleksandrovna DYMOVA¹, Almagul Rakhimberlievna KUSHUGULOVA²,
Saule Eslamovna RAKHIMOVA², Erlan Mirkhaidarovich RAMANKULOV²,
Rosa Zhaparovna ZHUSUPOVA³, Evgeniy Aleksandrovich KHRAPOV¹,
Maksim Leonidovich FILIPENKO¹

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS
630090, Novosibirsk, Lavrentjev av., 8

²National Center of Biotechnology
010000, Astana, Ch. Valikhanov, str. 13/1

³TB dispensary
010000, Astana, Makhtumkuli str., 14

Using VNTR-typing for the first time we carried out molecular-genetic investigation of *M. tuberculosis* isolates, obtained from 46 patients with pulmonary tuberculosis living in Astana (Kazakhstan). 23 different genetic profiles have been identified. The isolates of Beijing family were dominating and consisted of 70 % (32 isolates). The cluster of Beijing family possessed considerable genetic homogeneity that is an evidence of increased transmissibility and virulence of this family in the investigated territory. Statistically significant differences between the number of isolates of the first time and the second time detected tuberculosis were not revealed ($\chi^2 = 0.360$, $P = 0.5487$). The association between Beijing family and multidrug resistance was not revealed ($R = 0.00$, $p = 1.0000$). In addition, we identified a significant percentage of isolates (26 %), referring to yet unidentified families of *M. tuberculosis* and having individual non clustered genotypes.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, mutations, Beijing family.

Dymova M.A. — junior researcher, e-mail: maya.a.rot@gmail.com

Kushugulova A.R. — candidate of medical sciences, head of laboratory of microorganism collection,
e-mail: lgene@biocenter.kz

Rakhimova S.E. — researcher of the shared national science laboratory, e-mail: rahimova_saule@mail.ru

Ramankulov E.M. — PhD in biochemistry and molecular biology, general director, e-mail: ramankulov@biocenter.kz

Zhusupova R.Zh. — chief physician of Astana TB dispensary, e-mail: tubdisp_astana@mail.ru

Khrapov E.A. — junior researcher, e-mail: Khrap_off@ngs.ru

Filipenko M.L. — candidate of biological sciences, head of the group for pharmacogenomics,
e-mail: max@niboch.nsc.ru