Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК 577.21:579.873.21(574)(043) На правах рукописи

ТАКЕНОВ НУРЛАН КАЙРАТУЛЫ

Изучение генотипов возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* в Казахстане

8D05104 – Генетика

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант:
Жунусова Г.С., PhD,
ассоциированный профессор,
ведущий научный сотрудник
Института генетики и физиологии

Зарубежный научный консультант:
Йе Сю, PhD, ассоциированный
профессор школы наук о жизни,
Сямыньский университет (Сямынь,
Китай).

Республика Казахстан
Алматы, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ 5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ 6
ОПРЕДЕЛЕНИЯ 7
ВВЕДЕНИЕ 8
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 15
1.1. Глобальная эпидемиологическая ситуация по туберкулезу 15
1.1.1 Мировое бремя заболевания 15
1.1.2 Демографические и социальные факторы распространения 15
1.1.3 Глобальная проблема лекарственной устойчивости 16
1.2. Эпидемиология туберкулеза в Республике Казахстан 18
1.2.1 Динамика заболеваемости и смертности 18
1.2.2 Распространенность МЛУ/ШЛУ-ТБ 19
1.2.3 Региональные особенности эпидемиологии 19
1.3. Биологические и генетические особенности *Mycobacterium tuberculosis* 20
1.3.1 Таксономия комплекса *M. tuberculosis* 20
1.3.2 Геномная структура и особенности эволюции 21
1.3.3 Роль SNP-мутаций в адаптации и формировании лекарственной устойчивости 22
1.4. Генетическое разнообразие популяции *Mycobacterium tuberculosis* 23
1.4.1 Основные филогенетические линии *Mycobacterium tuberculosis* 23
1.4.2 Филогеография и глобальное распространение линий 24
1.4.3 Генетическая структура популяций микобактерий 25
1.5. Генотип Beijing и ее роль в распространении лекарственно-устойчивого туберкулеза 26
1.5.1 Происхождение и эволюция генотипа Beijing 26
1.5.2 Биологические особенности и эпидемиологический успех 27
1.5.3 Клональные комплексы генотипа Beijing (Central Asia Outbreak и др.) 28
1.6. Молекулярно-генетические методы анализа генетического разнообразия *Mycobacterium tuberculosis* 30
1.6.1 Классические методы генотипирования (Spoligotyping, MIRU-VNTR) 30
1.6.2 Полногеномное секвенирование в молекулярной эпидемиологии 31
1.6.3 Использование SNP-анализа для изучения трансмиссии туберкулеза 32
1.7. Современное состояние молекулярной эпидемиологии туберкулеза в Казахстане 33
1.7.1 Ранее проведенные генетические исследования 33
1.7.2 Доминирование генотипа Beijing 34
1.7.3 Ограничения существующих данных 34
1.8. Обоснование и актуальность настоящего исследования 34
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 36
2.1 Материалы исследования 36
2.1.1 Дизайн исследования и общая характеристика материала 36
2.1.2 Клинический материал и критерии отбора образцов 36
2.1.3 Критерии включения и исключения 37

2.1.4 Сбор клинико-эпидемиологических данных 37
2.2 Микробиологические методы 37
2.2.1 Обработка клинического материала 38
2.2.2 Микроскопическое исследование 38
2.2.3 Молекулярно-генетическая диагностика 39
2.2.4 Культивирование микобактерий 40
2.2.5 Получение чистых культур 41
2.3 Молекулярно-генетические методы 42
2.3.1 Выделение геномной ДНК 42
2.3.2 Оценка чистоты и концентрации ДНК 43
2.3.3 Подготовка ДНК-библиотек для секвенирования 43
2.3.4 Контроль качества библиотек 44
2.3.5 Полногеномное секвенирование 44
2.4 Биоинформационный анализ 45
2.4.1 Контроль качества секвенсов 45
2.4.2 Анализ филогенетической структуры и мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, на основе данных полногеномного секвенирования с использованием TB-Profiler 45
2.4.3 Выявление SNP и подготовка данных для филогенетического анализа 46
2.4.4 Филогенетический анализ 46
2.4.5 Расчет генетических расстояний и кластерный анализ 47
2.4.6 Геопространственный анализ и корреляция генетических расстояний 47
2.4.7 Статистический анализ и визуализация результатов 48
2.4.8 Этическое одобрение и информированное согласие 50
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ 51
3.1 Клинико-эпидемиологическая структура выборки 51
3.1.1 Социально-демографический профиль 54
3.1.2 Географическое распределение пациентов 57
3.1.3 Клиническая характеристика и анамнез заболевания 61
3.1.4 ВИЧ-статус пациентов 63
3.2 Первичная обработка и контроль качества данных полногеномного секвенирования (WGS) 66
3.3 Филогенетическая структура и генетическое разнообразие *M. tuberculosis* 67
3.3.1 Распределение клинических изолятов *M. tuberculosis* по филогенетическим линиям и сублиниям 67
3.3.2 Топология филогенетического дерева исследуемой популяции 69
3.3.3 Анализа генетического разнообразия изолятов *M. tuberculosis* методом PCoA 71
3.4 Молекулярно-генетический профиль лекарственной устойчивости 73
3.4.1 Диагностическая эффективность молекулярно-генетических методов определения лекарственной устойчивости 73
3.4.2 Профиль и структура лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* 75
3.4.3 Спектр мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью 77
3.4.4 Особенности распределения лекарственной устойчивости внутри основных генотипов 79

3.5 Геномная эпидемиология и трансмиссионный анализ 81
3.5.1 Сравнительный анализ внутригрупповой генетической вариабельности изолятов *M. tuberculosis* 81
3.5.2 Сравнительный анализ внутригрупповой генетической вариабельности в общей выборке и среди МЛУ-ТБ 84
3.5.3 Выявление кластеров недавней трансмиссии на основе SNP-расстояний 86
3.5.4 Пространственно-генетическая автокорреляция клинических изолятов *M. tuberculosis* (тест Мантеля) 88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 92
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 93
ПРИЛОЖЕНИЕ А – Этапы микробиологического и молекулярно-генетического исследования изолятов *M. tuberculosis* 121
ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Результаты контроля качества нуклеиновых кислот и параметры секвенирования 123
ПРИЛОЖЕНИЕ В – Эпидемиологические показатели и сравнительная характеристика исследуемой выборки 129
ПРИЛОЖЕНИЕ Г – Характеристика кластеров и результаты биоинформационного анализа генотипов 132
ПРИЛОЖЕНИЕ Д – Пространственно-статистический анализ распространения штаммов туберкулеза 134

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ РК 5.04.034-2011. Государственный общеобразовательный стандарт образования Республики Казахстан. Послевузовское образования. Докторантура. Основные положения (изменения от 23 августа 2012 г. №1080).

ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 7.32-2017. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчёт о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

BCG	–	БЦЖ (Bacillus Calmette-Guérin) – вакцинный штамм *Mycobacterium bovis*
H37Rv	–	лабораторный референсный штамм *Mycobacterium tuberculosis* (GenBank: NC_000962.3)
katG	–	ген, кодирующий каталазу-пероксидазу (мишень для изониазида)
L2	–	линия 2 (Lineage 2, Восточно-Азиатская линия, генотип Beijing)
L4	–	линия 4 (Lineage 4, Евро-Американская линия)
MIRU-VNTR	–	анализ числа тандемных повторов в локусах MIRU (метод генотипирования)
MTBC	–	комплекс *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis* complex)
NCBI	–	Национальный центр биотехнологической информации (США)
NGS	–	секвенирование следующего поколения (Next-Generation Sequencing)
rpoB	–	ген, кодирующий β-субъединицу РНК-полимеразы (мишень для рифампицина)
n	–	количество исследованных экземпляров
min	–	минимальное значение показателя
max	–	максимальное значение показателя
M	–	среднее значение показателя
ТБ или TB	–	Туберкулез (Tuberculosis)
Xpert MTB/RIF	–	технология ускоренной молекулярно-генетической диагностики (GeneXpert)
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция (PCR)
мкл	–	микролитр
об/мин.	–	оборотов в минуту

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяются следующие термины с соответствующими определениями:

Ген – дискретная функциональная единица генома, представляющая собой определенный участок молекулы ДНК, который содержит ORF и ассоциированные регуляторные области (промоторы, операторы, терминаторы), необходимые для транскрипции и последующего синтеза функционального продукта – полипептида (белка) либо молекулы некодирующей РНК (транспортной, рибосомальной или регуляторной).

Изолят *Mycobacterium tuberculosis* – культура возбудителя туберкулеза, выделенная из клинического материала пациента и представляющая собой генетически идентифицированный вариант бактерии.

Изониазид-резистентный туберкулез (HR-TB) – форма туберкулеза, характеризующаяся устойчивостью к изониазиду при сохраненной чувствительности к рифампицину.

Линия *M. tuberculosis* – крупная филогенетическая группа, отражающая эволюционное происхождение и глобальное распространение штаммов.

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ-ТБ, MDR-TB) – устойчивость *M. tuberculosis* как минимум к изониазиду и рифампицину.

Полногеномное секвенирование (WGS, whole genome sequencing) – метод определения полной нуклеотидной последовательности генома микроорганизма, используемый для генотипирования и филогенетического анализа.

Пре-широкая лекарственная устойчивость (пре-ШЛУ-ТБ, pre-XDR-TB) – форма туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью и дополнительной устойчивостью к фторхинолонам.

Пространственная автокорреляция – статистическая зависимость между генетическим сходством изолятов и их географическим расположением.

SNP (single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидная замена в геноме, используемая как маркер генетического различия между изолятами.

SNP-дистанция – количество различий по однонуклеотидным позициям между геномами двух изолятов, отражающее степень их генетического родства.

Сублиния (подлиния) – более узкая филогенетическая подгруппа внутри линии, характеризующаяся специфическими генетическими маркерами и региональными эпидемиологическими особенностями.

Трансмиссия туберкулеза – процесс передачи *M. tuberculosis* от одного человека к другому, подтверждаемый эпидемиологическими и/или генетическими данными.

Широкая лекарственная устойчивость (ШЛУ-ТБ, XDR-TB) – форма туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, дополнительно устойчивая к любому фторхинолону и как минимум еще одному препарату Группы А (бедаквилин и линезолид).

Штамм *M. tuberculosis* – генетически однородная совокупность изолятов, обладающих общими фенотипическими и генотипическими характеристиками.

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика диссертационного исследования. Диссертационная работа посвящена изучению генетической структуры возбудителя туберкулеза, *Mycobacterium tuberculosis*, в Казахстане. В исследовании использовались современные подходы и методы, такие как полногеномное секвенирование (WGS), биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей, филогенетическое моделирование, а также методы популяционной генетики и пространственной эпидемиологии.

Исследование направлено на выявление закономерностей генетического разнообразия возбудителя туберкулеза, определение структуры филогенетических линий, а также анализ путей распространения лекарственно-устойчивых форм на территории Казахстана.

Актуальность исследования. Туберкулез (ТБ) остается одной из ведущих причин смертности от инфекционных заболеваний в мире и представляет серьезную проблему общественного здравоохранения. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно регистрируются более 10 миллионов новых случаев заболевания, из которых около 390 тысяч приходится на лекарственно-устойчивые формы инфекции [1;2].

Особую угрозу представляет циркуляция штаммов *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ), что существенно снижает эффективность стандартных схем лечения, увеличивает сроки и стоимость лечения и затрудняет контроль эпидемического процесса. Согласно данным ВОЗ и статистике заболеваемости за 2024 год, Республика Казахстан относится к странам с высоким бременем лекарственно-устойчивого ТБ, где доля МЛУ-ТБ составляет около 27% среди впервые выявленных пациентов и 44% среди ранее леченных случаев ТБ [2;3]. Столь высокие показатели не позволяют однозначно определить ведущий механизм формирования лекарственной устойчивости – обусловлена ли она преимущественно первичной передачей уже резистентных штаммов (трансмиссивная устойчивость) либо развивается в процессе неэффективного или прерванного лечения (приобретенная устойчивость) [1].

Разграничение этих механизмов имеет принципиальное практическое значение: преобладание трансмиссивной устойчивости указывает на необходимость усиления мер инфекционного контроля и раннего выявления контактных лиц, тогда как преобладание приобретенной устойчивости – на необходимость пересмотра схем химиотерапии и контроля приверженности лечению. Установление ведущего механизма формирования устойчивости требует точной реконструкции путей передачи инфекции, что, в свою очередь, невозможно без детального изучения генетической структуры возбудителя, включая его филогенетические линии и сублинии.

Значимость такого подхода подтверждается современными исследованиями, демонстрирующими, что эпидемический процесс туберкулеза во многом определяется доминированием отдельных филогенетических линий *M. tuberculosis* [1-4]. В частности, особое значение придается генотипу Beijing,

которая характеризуется повышенной трансмиссивностью, вирулентностью и склонностью к развитию лекарственной устойчивости. Показано, что эволюционные изменения, происходящие в пределах линии Beijing, могут способствовать ее эпидемиологическому успеху и определять особенности передачи инфекции, которые не могут быть объяснены только факторами восприимчивости хозяина [3;4].

В странах Центральной Азии, включая Казахстан, доминируют филогенетические линии L2 (East Asian) и L4 (Euro-American) [5-7]. Однако их сублинии, а также соответствующая эволюционная динамика и вклад в циркуляцию лекарственно-устойчивых штаммов остаются малоизученными [8].

Характер эпидемического процесса туберкулеза определяется не только составом доминирующих филогенетических линий *M. tuberculosis*, но и их внутрилинейным генетическим разнообразием [5]. Сублинии могут существенно различаться по эпидемиологической успешности, способности к трансмиссии и ассоциации с лекарственной устойчивостью, что особенно значимо в условиях выраженных региональных различий, характерных для Центральной Азии [7]. Традиционные методы молекулярного генотипирования *M. tuberculosis*, такие как сполиготипирование и MIRU-VNTR, обладают низкой разрешающей способностью и не обеспечивают надежной идентификации сублиний, включая подветви генотип Beijing. Кроме того, их потенциала недостаточно для достоверной реконструкции цепочек недавней передачи инфекции [8;9]. Это ограничивает возможность комплексного анализа генетической структуры популяции возбудителя и требует применения подходов с более высоким разрешением.

Внедрение технологий полногеномного секвенирования (Whole Genome Sequencing, WGS) открыло новые возможности для изучения *M. tuberculosis*. Анализ однонуклеотидных полиморфизмов (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP), основанный на данных WGS, позволяет с высокой точностью реконструировать филогенетические взаимоотношения между изолятами, выявлять кластеры недавней передачи инфекции и исследовать эволюцию лекарственной устойчивости [1-4].

Несмотря на развитие современных геномных технологий, в Казахстане количество исследований, основанных на анализе полных геномов *M. tuberculosis*, остается ограниченным, что подтверждается небольшим числом публикаций в международных рецензируемых базах данных за последние годы. Это затрудняет всестороннюю оценку популяционной структуры возбудителя и масштабов его трансмиссии.

Таким образом, проведение комплексного исследования с использованием методов WGS в рамках данной диссертационной работы по образовательной программе «Генетика» является актуальной научной задачей. Работа направлена на углубление понимания генетической структуры циркулирующих изолятов возбудителя ТБ в Казахстане, включая определение их сублиний, характеристику профилей лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам и анализ географических особенностей распространения инфекции, с последующим использованием полученных

данных для совершенствования системы национального эпидемиологического надзора.

Цель исследования. Целью исследования является комплексный анализ генетической структуры и разнообразия штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории Республики Казахстан, на основе данных полногеномного секвенирования.

Задачи исследования. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Сформировать коллекцию клинических изолятов *M. tuberculosis* и систематизировать клинико-эпидемиологические данные пациентов для последующего генетического анализа.
2. Установить филогенетическую структуру циркулирующих изолятов *M. tuberculosis* с применением методов WGS и биоинформационной обработки данных.
3. Охарактеризовать внутрилинейное генетическое разнообразие популяции возбудителя с детализацией до уровня сублиний.
4. Определить молекулярный профиль лекарственной устойчивости изолятов на основе детекции SNP в таргетных генах согласно каталогу ВОЗ и сопоставить его с принадлежностью к конкретным генетическим сублиниям.
5. Оценить интенсивность недавней трансмиссии инфекции и долю эндогенной реактивации ТБ в популяции на основе SNP-кластерного анализа.
6. Выявить пространственно-эпидемиологические закономерности и локальные очаги передачи генотипов возбудителя в Алматинской области и городе Алматы с использованием геопространственного анализа.

Объекты исследования. Объектами исследования являлись 272 клинических изолята *M. tuberculosis*, выделенные из биологических образцов пациентов с лабораторно подтвержденным ТБ. Сбор и отбор материала проводился в период с января 2023 года по декабрь 2024 года.

Методы исследования. В работе применены микробиологические, молекулярно-генетические и биоинформационные методы исследования. Полногеномное секвенирование клинических изолятов *M. tuberculosis* проводилось с последующим анализом SNP и реконструкцией филогенетических деревьев. Биоинформационная обработка данных осуществлялась с использованием специализированных программных инструментов TB-Profiler, MTBseq, IQ-TREE 2, позволивших провести филогенетический анализ, оценить временную динамику эволюции и реконструировать цепочки передачи инфекции. Полногеномное секвенирование позволяет анализировать весь геном изолятов *M. tuberculosis* целиком, выявляя мельчайшие генетические различия между изолятами, которые могут выглядеть идентичными при использовании традиционных методов (MIRU-VNTR или сполиготипирования).

Статистическая обработка данных проводилась в среде статистического программирования R (v4.3.1). Анализ клинико-эпидемиологических характеристик включал методы дескриптивной статистики и непараметрические критерии оценки значимости различий (U-критерий Манна–Уитни, χ^2 Пирсона,

точный критерий Фишера). Оценка диагностической эффективности молекулярно-генетических методов (WGS и Xpert MTB/RIF) по отношению к фенотипическому тестированию проводилась путем расчета операционных характеристик (чувствительность, специфичность, общая согласованность). Пространственно-генетический анализ выполнялся с применением теста Мантеля на основе пермутационного подхода для оценки корреляции матриц генетических и географических расстояний, а геопространственный анализ проводился методами картографирования.

Научная новизна исследования. Научная новизна работы заключается в комплексном исследовании генетической структуры популяции *M. tuberculosis* в Казахстане с использованием высокоразрешающего полногеномного анализа на репрезентативной выборке из 272 клинических изолятов, отобранных из 446 случаев ТБ, положительных по Xpert MTB/RIF и посеву MGIT.

На основе данных WGS охарактеризована филогенетическая структура штаммов *M. tuberculosis*: установлено выраженное доминирование линии 2 Beijing (72,4%) при существенном представительстве линии 4 Euro-American (26,8%), при этом внутри генотип Beijing определено преобладание сублиний Central Asia (49,2%) и Central Asia Outbreak, CAO (44,2%) [6;7].

Определена выраженная неоднородность профиля лекарственной устойчивости внутри генотип Beijing в зависимости от принадлежности к конкретной сублинии: в группе CAO из 87 изолятов 60 (68,9%) классифицированы как МЛУ-ТБ, а суммарная доля пре-ШЛУ и ШЛУ составила 9,2% (8 случаев), тогда как в группе Central Asia, напротив, 75,3% изолятов (73 из 97) сохраняли лекарственную чувствительность. Наиболее неблагоприятный профиль установлен для сублинии Europe/Russian W148 Outbreak (B0/W148), где чувствительные формы полностью отсутствовали, а 7 из 9 изолятов классифицированы как МЛУ-ТБ. Этот генотип *M. tuberclosis* возникл в России, доминирует в России, и его штаммы попали в Европу относительно недавно На фоне этого линия 4 (Euro-American) в целом сохраняла высокую чувствительность к препаратам первого ряда, за исключением единичных случаев МЛУ-ТБ, преимущественно ассоциированных с сублинией или генотипом Ural. На уровне всей выборки охарактеризован молекулярный профиль резистентности: основным детерминантом устойчивости к рифампицину являлась мутация *rpoB* S450L (91,11%; 82/90), к изониазиду – *katG* S315T (99,21%; 126/127), что соответствует категории высокодостоверных мутаций согласно каталогу ВОЗ [1-5].

Применен интегрированный подход к оценке вклада недавней трансмиссии в эпидемический процесс ТБ, объединяющий результаты SNP-кластерного анализа (порог ≤12 SNP) с клинико-эпидемиологическим статусом пациентов. Из 272 изолятов 80 (29,41%) образовали геномные кластеры, подтверждающие связь между случаями заболевания; из них 61 (76,25%) приходился на новые случаи и 19 (23,75%) – на случаи повторного лечения. Среди 192 геномно-уникальных изолятов (70,59%) 172 (89,58%) относились к новым случаям ТБ, что, с учетом ограниченного охвата выборки относительно общего числа случаев ТБ в регионе, не позволяет исключить трансмиссионную

природу заражения при отсутствии в выборке соответствующего источника инфекции. Напротив, 20 геномно-уникальных изолятов (10,42% от уникальных) были получены от пациентов с историей повторного лечения, что более согласуется с реактивацией эндогенной инфекции, чем с новым эпизодом передачи. На этом основании впервые для Казахстана получена количественная оценка соотношения механизмов формирования заболевания: 252 изолята (92,65%) ассоциированы с трансмиссией ТБ, тогда как 20 изолятов (7,35%) – с реактивацией ранее перенесенной инфекции.

Проведена оценка взаимосвязи между генетическими и географическими расстояниями изолятов в Алматинской области и городе Алматы методом Мантеля. Глобальный тест на всей выборке (n = 144) не выявил статистически значимой корреляции (r = 0,062; p = 0,163), однако коррелограммный анализ показал статистически значимую, хотя и очень слабую по шкале Чеддока, локальную связь на коротких дистанциях до 8 км (r = 0,062; p = 0,048), что указывает на наличие локализованных очагов генетически родственных случаев на фоне в целом диффузного пространственного распределения генотипов возбудителя.

Сформирована интегрированная база геномных данных 272 клинических изолятов *M. tuberculosis*, объединенная с клинико-эпидемиологической информацией пациентов. Полные геномные последовательности всех изолятов размещены в международной базе данных NCBI (GenBank) под номером проекта PRJNA1277026.

Теоретическая значимость. Полученные результаты дополняют и расширяют современные представления о популяционной структуре и микроэволюции *M. tuberculosis* в условиях высокой распространенности лекарственно-устойчивых форм ТБ в Казахстане. Установленная внутрилинейная гетерогенность сублиний Beijing по профилю резистентности – от крайне неблагоприятного у CAO и Europe/Russian W148 Outbreak до сохранения чувствительности у Central Asia – вносит вклад в понимание механизмов дифференциального эпидемиологического успеха генетических сублиний возбудителя внутри одной филогенетической линии. Полученная оценка, согласно которой 92,65% изученных случаев ТБ ассоциированы с недавней трансмиссией, а не с реактивацией эндогенной инфекции, расширяет представления о роли активной передачи лекарственно-устойчивых штаммов в поддержании эпидемии МЛУ-ТБ в регионах с высоким бременем заболевания. Выявление статистически значимой, но выраженной лишь на коротких дистанциях пространственной структуры генетического родства штаммов вносит вклад в развитие методологии пространственно-генетического анализа в молекулярной эпидемиологии туберкулеза.

Практическая значимость. Результаты исследования могут быть использованы для совершенствования молекулярно-генетического мониторинга туберкулеза в Республике Казахстан. Установленное преобладание трансмиссионного механизма распространения заболевания (92,65% изолятов) обосновывает необходимость приоритетного усиления мер инфекционного контроля и расширения активного выявления контактных лиц как ключевой

стратегии сдерживания эпидемии МЛУ-ТБ. Выявленная концентрация тяжелых форм резистентности в сублиниях CAO и Europe/Russian W148 Outbreak позволяет рассматривать молекулярное типирование до уровня сублинии как дополнительный инструмент стратификации эпидемиологического риска и приоритизации очагов для расследования. Установленное доминирование мутаций *rpoB* S450L и *katG* S315T подтверждает надежность геномного подхода для интерпретации лекарственной устойчивости и обосновывает целесообразность внедрения таргетных молекулярных тест-систем на их основе. Локальный характер пространственной корреляции генетических и географических дистанций (значимый только на расстояниях до 8 км) указывает на целесообразность приоритетного эпидемиологического расследования контактов именно в пределах этого радиуса при выявлении кластеризованных случаев. Внедрение методов WGS и SNP-анализа в практику фтизиатрической службы позволяет повысить точность эпидемиологического надзора по сравнению с традиционными методами генотипирования. Сформированная база геномных данных, депонированная в NCBI (GenBank, проект PRJNA1277026), может использоваться как референсный ресурс для последующих молекулярно-эпидемиологических исследований в Казахстане и Центральной Азии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Популяция *Mycobacterium tuberculosis* в Казахстане характеризуется выраженным доминированием линии 2 Beijing (72,4%) при наличии линии 4 Euro-American (26,8%), что формирует основу генетической структуры циркулирующих изолятов.

2. Внутри генотипа Beijing преобладают сублинии Central Asia (49,2%) и Central Asia Outbreak (CAO) (44,2%), при этом CAO формирует клональные эпидемиологические кластеры с низкой SNP-дистанцией, отражающие активную циркуляцию возбудителя ТБ.

3. Генетический профиль лекарственной устойчивости характеризуется высокой частотой МЛУ-ТБ (29,0%) и преобладанием мутаций *rpoB* S450L (91,1%) и *katG* S315T (99,2%) среди изолятов, устойчивых соответственно к рифампицину и изониазиду – ключевым препаратам первого ряда.

4. Интегрированный анализ SNP-кластеризации (порог ≤12 SNP) и клинико-эпидемиологического статуса пациентов показал, что 252 изолята (92,65%) ассоциированы с недавней трансмиссией, тогда как 20 изолятов (7,35%) – с реактивацией ранее перенесенной инфекции, что подтверждает преимущественно трансмиссионный характер распространения туберкулеза и его лекарственно-устойчивых генотипов в популяции.

5. Генетико-географическая структура популяции возбудителя туберкулеза *M. tuberculosis* характеризуется отсутствием глобальной пространственной привязки ($r=0,06173$; $p=0,1628$) при одновременном сохранении локальных очагов клональной передачи инфекции в радиусе до 8 км ($r=0,0623$; $p=0,048$).

Личный вклад автора. Автором самостоятельно выполнены постановка задач исследования, формирование коллекции клинических изолятов, подготовка образцов к секвенированию и полный цикл биоинформационного

анализа. Автором также выполнены статистическая обработка результатов, интерпретация данных, подготовка научных публикаций и оформление диссертационной работы.

Связь работы с планом научных исследований. Диссертационная работа выполнена на базе Национального научного центра фтизиопульмонологии (г. Алматы) в рамках плана научно-исследовательских работ. Исследование проведено с использованием материально-технической базы центра. Реактивы и расходные материалы были обеспечены при поддержке Глобального фонда по борьбе со СПИДом, туберкулезом и малярией, а также за счет собственных средств научного центра. Тематика исследования соответствует приоритетному направлению развития науки Республики Казахстан «Наука о жизни и здоровье».

Апробация работы. Основные результаты исследования представлены и обсуждены на следующих научных мероприятиях:

- Международная конференция «The Union World Conference on Lung Health», Париж, Франция, 2023 г.;
- Международная конференция «The Union World Conference on Lung Health», Бали, Индонезия, 2024 г.;
- Международная конференция «The Union World Conference on Lung Health», Копенгаген, Дания, 2025 г.;
- Международная научно-практическая конференция «Генетика и физиология: прошлое, настоящее, будущее», Алматы, Казахстан, 2025 г.;

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе: 3 статьи в журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science; 2 статьи в изданиях, рекомендованных КОКСНВО МНВО Республики Казахстан; 7 тезисов в материалах международных научно-практических конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, заключение, список использованной литературы и приложения. Диссертация изложена на 136 страницах компьютерного текста, с соблюдением необходимых стандартов, включает 16 таблиц, 25 рисунков. Список использованной литературы содержит 282 источника.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Глобальная эпидемиологическая ситуация по туберкулезу

1.1.1 Мировое бремя заболевания

Туберкулез (ТБ) остается одной из наиболее значимых инфекционных болезней в мире и продолжает представлять серьезную угрозу для глобального общественного здравоохранения [1;2]. Возбудителем заболевания является бактерия *Mycobacterium tuberculosis*, передающаяся преимущественно аэрозольным путем при тесном контакте с инфицированным человеком. Несмотря на наличие эффективных методов диагностики и лечения, туберкулез продолжает входить в число ведущих причин смертности от инфекционных заболеваний [1;3].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно в мире регистрируется более 10 миллионов новых случаев заболевания туберкулезом [1;4]. При этом ежегодная смертность от заболевания превышает 1 миллион человек [1]. Исходя из этого, туберкулез остается одной из основных причин смерти от одного инфекционного агента среди взрослого населения [3]. Существенное влияние на эпидемиологическую ситуацию оказала пандемия COVID-19, которая привела к снижению выявляемости новых случаев заболевания и нарушению программ лечения в ряде стран [5;6].

Распространение туберкулеза характеризуется выраженной географической неоднородностью [7]. Наибольшее бремя заболевания сосредоточено в странах с низким и средним уровнем дохода, где дефицит ресурсов и неблагоприятная социальная среда создают значительную нагрузку на системы здравоохранения [8]. Основная доля новых случаев приходится на регионы Юго-Восточной Азии, Африки и Западной части Тихого океана [1]. В этих регионах распространению инфекции способствуют неблагоприятные социально-экономические условия, ограниченный доступ к медицинской помощи и высокая распространенность факторов риска [1].

Несмотря на реализацию международной стратегии ВОЗ «End TB», направленной на значительное снижение заболеваемости и смертности от туберкулеза, темпы уменьшения распространенности заболевания остаются недостаточными для достижения поставленных глобальных целей [9;10]. Поэтому туберкулез продолжает рассматриваться как одна из ключевых проблем современного здравоохранения [2;11].

1.1.2 Демографические и социальные факторы распространения

Распространение туберкулеза тесно связано с демографическими, социальными и экономическими факторами [12;13]. Заболевание чаще всего поражает взрослое население трудоспособного возраста, что приводит к значительным социально-экономическим потерям [14]. При этом во многих странах мира отмечается более высокая заболеваемость среди мужчин по сравнению с женщинами [15].

Существенную роль в формировании эпидемиологической ситуации играют условия жизни и уровень социального благополучия населения. К

основным факторам риска относятся бедность, скученность проживания, недоедание и ограниченный доступ к медицинской помощи [16-18]. Кроме того, значительное влияние оказывают процессы урбанизации и миграции населения, способствующие распространению инфекции между различными регионами и странами [19;20].

Особую группу риска составляют лица с ослабленной иммунной системой. В первую очередь это пациенты с ВИЧ-инфекцией, у которых вероятность развития активной формы туберкулеза значительно выше по сравнению с общей популяцией [21;22]. Коинфекция ВИЧ и туберкулеза является одной из наиболее сложных проблем современного здравоохранения, особенно в странах с высоким уровнем распространенности ВИЧ [23].

Дополнительными факторами, повышающими риск заболевания, являются хронические заболевания, такие как сахарный диабет [24], а также вредные привычки, включая курение [25] и злоупотребление алкоголем [26]. В совокупности данные факторы способствуют активному распространению *M. tuberculosis* и значительно затрудняют контроль над распространением инфекции.

1.1.3 Глобальная проблема лекарственной устойчивости

Одной из наиболее серьезных угроз для эффективного контроля туберкулеза является распространение лекарственно-устойчивых форм заболевания [27;28]. Лекарственная устойчивость *M. tuberculosis* возникает в результате накопления генетических мутаций, которые снижают чувствительность бактерии к противотуберкулезным препаратам [29]. В последние десятилетия во многих странах мира наблюдается рост числа случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) [1;29].

МЛУ-ТБ определяется как форма заболевания, при которой возбудитель устойчив по крайней мере к двум наиболее эффективным противотуберкулезным препаратам – изониазиду и рифампицину [30]. В современной классификации также выделяют более тяжелые формы лекарственной устойчивости, такие как пре-широкая лекарственная устойчивость (пре-ШЛУ-ТБ) и широкая лекарственная устойчивость (ШЛУ-ТБ). Согласно обновленным определениям ВОЗ, пре-ШЛУ-ТБ диагностируется в случаях, когда штаммы МЛУ-ТБ дополнительно обладают устойчивостью к любому препарату из группы фторхинолонов. В свою очередь, ШЛУ-ТБ характеризуется наличием устойчивости не только к фторхинолонам, но и как минимум к одному лекарству группы А, включающей наиболее эффективные резервные антибиотики – бедаквилин и линезолид [31]. Лечение таких форм заболевания требует длительной и дорогостоящей терапии, сопровождающейся значительным числом побочных эффектов и более низкой эффективностью лечения [1;31].

Распространенность МЛУ-ТБ значительно варьирует в зависимости от региона. Согласно оценкам ВОЗ, среди впервые выявленных пациентов показатели МЛУ-ТБ колеблются от менее чем 3 % в Африканском регионе и

Юго-Восточной Азии до 24 % в Европейском регионе. Среди ранее лечившихся пациентов этот показатель достигает 54 % в Европейском регионе, тогда как в других регионах он составляет около 8,4 % [1;32]. Наиболее критическая ситуация наблюдается в странах Восточной Европы и Центральной Азии (ВЕЦА), включая Казахстан, Беларусь, Кыргызстан, Молдову, Россию, Таджикистан, Туркменистан и Украину. В этом регионе доля случаев устойчивости к рифампицину среди новых пациентов стабильно превышает 20 %, что является одним из самых высоких показателей в мире [33;34].

Наряду с высокой распространенностью резистентных форм, серьезной проблемой остается эффективность терапии и охват ею пациентов. В 2019 году лишь 86 % пациентов в регионе с диагностированным МЛУ-ТБ фактически начали лечение [32;33]. При этом в когорте пациентов, приступивших к терапии в 2017 году, показатель успешного исхода (завершение курса или полное излечение) составил всего 57 % [32;33]. Столь низкая эффективность во многих странах ВЕЦА, вероятно, обусловлена отсутствием децентрализованных и амбулаторных моделей оказания медицинской помощи [35]. В сложившихся условиях критически важным становится не только внедрение современных схем лечения, но и широкое применение молекулярно-генетических технологий. Это позволит оперативно выявлять мутации устойчивости и осуществлять детальный мониторинг распространения МЛУ-ТБ, обеспечивая переход к более эффективным стратегиям борьбы с эпидемией [1;32;36].

Важной особенностью современной эпидемии является то, что распространение лекарственно-устойчивых форм туберкулеза происходит не только вследствие неадекватного лечения, но и в результате активной передачи уже резистентных штаммов между людьми [37-39]. Это приводит к увеличению доли первичной лекарственной устойчивости среди впервые выявленных пациентов.

Несмотря на значительный объем накопленных данных о распространении лекарственно-устойчивого туберкулеза, существующие оценки глобального бремени МЛУ-ТБ имеют ряд существенных ограничений. Во многих странах с высоким уровнем заболеваемости сохраняется недостаточная доступность качественной лабораторной диагностики, включая молекулярно-генетические методы, что приводит к недоучету случаев лекарственной устойчивости [40]. Кроме того, значительная часть данных основана на выборочных исследованиях или национальных регистрах, которые могут не полностью отражать реальную эпидемиологическую ситуацию. Следует также учитывать, что в ряде исследований недостаточно четко разграничиваются случаи приобретенной и первичной лекарственной устойчивости, что затрудняет интерпретацию механизмов распространения резистентных штаммов [41]. В последние годы все большее внимание уделяется роли прямой трансмиссии МЛУ-ТБ, однако количественная оценка вклада этого механизма остается предметом научной дискуссии [42;43]. Несмотря на достигнутый прогресс, вопросы, связанные с истинным масштабом распространения лекарственно-устойчивого туберкулеза и механизмами его формирования, требуют дальнейшего уточнения с

использованием высокоразрешающих методов, таких как полногеномное секвенирование (WGS) [44;45].

1.2. Эпидемиология туберкулеза в Республике Казахстан

1.2.1 Динамика заболеваемости и смертности

Туберкулез на протяжении многих лет остается одной из значимых медико-социальных проблем в Республике Казахстан (далее – Казахстан) [46;47]. После распада Советского Союза в 1990-е годы в стране наблюдался существенный рост заболеваемости и смертности от туберкулеза, что было связано с социально-экономическими изменениями, ухудшением условий жизни населения и ослаблением системы противотуберкулезной службы. В последующие годы благодаря реализации государственных программ по борьбе с туберкулезом и внедрению современных стратегий диагностики и лечения удалось добиться значительного улучшения эпидемиологической ситуации [48].

С 1998 года в рамках национальных программ борьбы с туберкулезом в Казахстане была внедрена стратегия DOTS (Directly Observed Treatment, Short-course), направленная на раннее выявление заболевания и контроль эффективности лечения [49;50]. Реализация данной стратегии, а также развитие лабораторной диагностики и расширение доступа к противотуберкулезной терапии позволили постепенно снизить уровень заболеваемости и смертности от туберкулеза в стране [51;52].

Согласно данным национальной статистики и международных отчетов, за последние два десятилетия в Казахстане отмечается устойчивая тенденция к снижению показателей заболеваемости и смертности (рисунок 1) [1;53;54]. Тем не менее, несмотря на достигнутые успехи, эпидемиологическая ситуация остается напряженной, а уровень заболеваемости по-прежнему превышает показатели, характерные для стран с низким бременем туберкулеза [54;55].

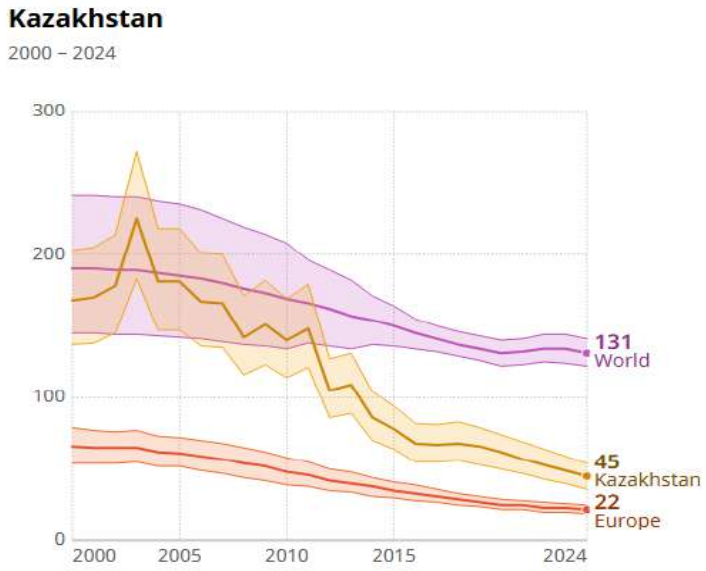


Рисунок 1 – Заболеваемость туберкулезом на 100 тыс. населения в Казахстане в 2000–2024 гг. в сравнении со среднемировыми и европейскими данными согласно ВОЗ [1]

Дополнительные трудности в последние годы были связаны с пандемией COVID-19, которая оказала влияние на системы здравоохранения во многих странах мира [56]. Ограничения доступа к медицинским услугам, снижение выявляемости новых случаев заболевания и временное перераспределение ресурсов здравоохранения привели к определенным колебаниям эпидемиологических показателей и подчеркнули необходимость дальнейшего совершенствования системы контроля туберкулеза. [57;58]

1.2.2 Распространенность МЛУ/ШЛУ-ТБ

Несмотря на положительную динамику снижения общей заболеваемости, одной из наиболее серьезных проблем эпидемиологии туберкулеза в Казахстане остается высокая распространенность лекарственно-устойчивых форм заболевания [55;59]. Казахстан входит в число стран с высоким бременем МЛУ-ТБ, что создает серьезные риски для эффективности программ лечения и контроля над инфекцией [1;60].

Особенностью эпидемиологической ситуации в Казахстане является высокая доля лекарственной устойчивости среди как ранее леченных пациентов, так и впервые выявленных случаев заболевания [61;62]. Наличие значительного числа случаев первичной лекарственной устойчивости свидетельствует о продолжающейся трансмиссии устойчивых штаммов *M tuberculosis* в популяции [63;64].

Для борьбы с распространением лекарственно-устойчивых форм заболевания в стране внедряются современные методы диагностики, включая молекулярно-генетические тесты, такие как GeneXpert MTB/RIF и Hain-тесты [65;66]. Они позволяют быстро выявлять генетические маркеры резистентности и своевременно назначать эффективную терапию [67]. Тем не менее, высокая распространенность МЛУ-ТБ остается одной из ключевых проблем национальной системы эпидемиологического контроля [59;68].

Несмотря на наличие официальной статистики, оценка распространенности лекарственно-устойчивого туберкулеза в Казахстане имеет определенные ограничения [69]. В частности, значительная часть информации базируется на данных рутинного лабораторного мониторинга, который может не охватывать все случаи, особенно в отдаленных регионах [70]. Различия в диагностических подходах и уровне оснащенности лабораторий обуславливают вариабельность региональных показателей. Существенным ограничением является ограниченность данных анализа полных геномов возбудителя, что затрудняет детальное изучение структуры популяции устойчивых штаммов и оценку роли недавней трансмиссии [71;72]. В связи с этим современные представления о распространении МЛУ-ТБ могут быть неполными и требуют уточнения в рамках молекулярно-эпидемиологических исследований.

1.2.3 Региональные особенности эпидемиологии

Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в Казахстане характеризуется значительной территориальной неоднородностью [53]. Уровни

заболеваемости и распространенности лекарственно-устойчивых форм заболевания могут существенно различаться между отдельными регионами страны. Такие различия обусловлены комплексом факторов, включая плотность населения, уровень урбанизации, социально-экономические условия, а также особенности миграционных процессов [53].

В крупных городах и индустриальных центрах наблюдается высокая концентрация населения, что может способствовать более активной передаче инфекции. В то же время в некоторых удаленных и сельских регионах определенные трудности могут возникать в обеспечении своевременного доступа к диагностике и лечению, что также влияет на эпидемиологические показатели [53].

Отдельное внимание уделяется анализу эпидемиологической ситуации в местах повышенного риска передачи инфекции, таких как медицинские учреждения противотуберкулезного профиля и учреждения уголовно-исполнительной системы [73]. Высокая плотность пациентов и наличие значительного числа больных с лекарственно-устойчивыми формами заболевания создают благоприятные условия для циркуляции и распространения наиболее вирулентных штаммов *M. tuberculosis* [42;74].

В связи с этим важное значение приобретает использование современных методов молекулярной эпидемиологии, позволяющих изучать генетическую структуру циркулирующих штаммов возбудителя, выявлять цепочки передачи инфекции и определять источники распространения заболевания [75]. Такие исследования позволяют более точно оценивать региональные особенности эпидемического процесса и разрабатывать эффективные меры по контролю над распространением туберкулеза [76].

1.3. Биологические и генетические особенности *Mycobacterium tuberculosis*

1.3.1 Таксономия комплекса *M. tuberculosis*

Возбудитель туберкулеза относится к типу *Actinomycetota* (ранее *Actinobacteria*) и входит в состав комплекса *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis* complex, MTBC). Данная таксономическая группа объединяет генетически близкородственные микобактерии, вызывающие заболевание у человека и животных [77;78]. Представители MTBC характеризуются высокой степенью гомологии генома и обладают уникальными биологическими свойствами, такими как замедленный рост, аэробный метаболизм и способность к длительной персистенции в организме хозяина [79].

В состав комплекса включено несколько видов микобактерий, среди которых ведущее эпидемиологическое значение для человека имеет *M. tuberculosis* [80]. Помимо основного патогена, к MTBC относятся такие виды, как *M. bovis, M. africanum, M. microti, M. caprae* и ряд других представителей, обладающих вариабельной патогенностью для различных хозяев [81;82]. Особое место в филогении комплекса занимает *M. canettii*, который является наиболее генетически разнообразным и эволюционно древним членом группы [83]. В

отличие от остальных представителей МТВС, *M. canettii* сохраняет признаки горизонтального переноса генов и считается наиболее близким к общему предку всего комплекса [83;84].

Несмотря на чрезвычайно высокую генетическую близость (свыше 99,9%), представители МТВС существенно различаются по спектру хозяев, вирулентности и географическому распространению [85;86]. В целом, комплекс *M. tuberculosis* представляет собой генетически консервативную группу микроорганизмов, высоко адаптированных к паразитированию в организме человека и обладающих значительным потенциалом к глобальному распространению [87].

1.3.2 Геномная структура и особенности эволюции

Геном *M. tuberculosis* представляет собой кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК размером около 4,4 миллиона пар оснований, содержащую более четырех тысяч генов, кодирующих различные структурные и функциональные белки [88;89]. Геном характеризуется высоким содержанием гуанина и цитозина (GC-содержание около 65 %), что является характерной особенностью представителей рода *Mycobacterium* [90].

Одной из ключевых особенностей *M. tuberculosis* является относительно низкий уровень генетической рекомбинации. В отличие от многих других бактериальных патогенов, эволюция данного микроорганизма происходит преимущественно клональным путем, без значительного участия горизонтального переноса генов [91;92]. Это приводит к формированию стабильной филогенетической структуры популяции, в которой различные генетические варианты формируются главным образом за счет накопления мутаций [93].

Эволюция *M. tuberculosis* тесно связана с процессами адаптации к организму человека как основному хозяину. В ходе длительной коэволюции с человеческой популяцией возбудитель выработал ряд механизмов, позволяющих эффективно избегать иммунного ответа и сохраняться в организме в латентной форме на протяжении длительного времени [94;95]. Такая способность к длительной персистенции является одной из ключевых особенностей патогенеза туберкулеза и играет важную роль в поддержании глобальной эпидемии заболевания [96].

Кроме того, геном *M. tuberculosis* характеризуется наличием различных генетических элементов, включая повторяющиеся последовательности, делеции и инсерции, которые способствуют генетической вариабельности патогена [97;98]. Эти изменения, наряду с точечными мутациями, формируют основу микроэволюции возбудителя и определяют его адаптационный потенциал в условиях изменяющейся среды [98].

1.3.3 Роль SNP-мутаций в адаптации и формировании лекарственной устойчивости

Одним из основных источников генетической изменчивости *M. tuberculosis* являются однонуклеотидные полиморфизмы (single nucleotide polymorphisms, SNP), представляющие собой точечные мутации в последовательности ДНК [99]. Поскольку горизонтальный перенос генов для данного микроорганизма практически не характерен, накопление SNP является ключевым механизмом эволюции и дивергенции различных генетических линий возбудителя [100;101].

Накопление мутаций в геноме *M. tuberculosis* происходит относительно медленно и подчиняется принципу так называемых «молекулярных часов». По современным оценкам, скорость накопления мутаций у данного возбудителя составляет в среднем около 0,04–2,2 SNP на геном в год, что позволяет использовать различия в числе SNP между изолятами для реконструкции эволюционных связей и анализа недавней передачи инфекции [102;103]. Различные филогенетические линии возбудителя (подробно описанные в разделе 1.4.1) характеризуются разной интенсивностью микроэволюционных процессов. Например, линия 1 (L1) демонстрирует скорость накопления мутаций, более чем вдвое превышающую аналогичный показатель у линии 4 (L4) [104]. Так, за десять лет дивергенции между двумя изолятами L1, имеющими общего предка, накапливается в среднем около 12 SNP, тогда как для изолятов L4 этот показатель составляет всего 5 SNP [104;105].

Вместе с тем использование SNP-анализа для реконструкции эволюционных связей имеет ряд методологических ограничений. В частности, в геноме *M. tuberculosis* могут наблюдаться явления конвергентной эволюции (гомоплазия), при которых одинаковые мутации возникают независимо в различных линиях [106]. Это может приводить к искажению филогенетических реконструкций и затруднять интерпретацию результатов. Кроме того, оценка скорости накопления мутаций не является универсальной и может варьировать в зависимости от линии возбудителя, условий инфекции и давления со стороны иммунной системы или лекарственной терапии [107;108]. Эти факторы необходимо учитывать при интерпретации данных SNP-анализа, особенно при реконструкции недавних цепочек передачи инфекции.

SNP-мутации играют важную роль в формировании адаптационных свойств *M. tuberculosis*. Некоторые из них могут влиять на экспрессию генов, кодирующих факторы вирулентности, метаболические ферменты и белки, участвующие во взаимодействии с иммунной системой хозяина [109;110]. В результате такие изменения способны повышать приспособленность отдельных штаммов к условиям внутри организма человека и способствовать их более успешному распространению [111].

Особое значение SNP-мутации имеют в формировании лекарственной устойчивости возбудителя. Резистентность к основным препаратам возникает вследствие мутаций в генах, кодирующих мишени действия лекарств или ферменты, участвующие в их активации [29;112]. Например, мутации в гене *rpoB* ассоциированы с устойчивостью к рифампицину, тогда как изменения в гене

katG или в промоторной области гена *inhA* приводят к формированию устойчивости к изониазиду [113-115].

Накопление мутаций устойчивости нередко сопровождается снижением биологической приспособленности бактерий [116]. Однако в некоторых случаях возникают компенсаторные мутации, которые частично или полностью восстанавливают жизнеспособность резистентных штаммов [117-119]. Наличие таких мутаций может способствовать эффективной передаче лекарственно-устойчивых штаммов между людьми и распространению МЛУ-ТБ [120;121].

1.4. Генетическое разнообразие популяции *Mycobacterium tuberculosis*

1.4.1 Основные филогенетические линии *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis характеризуется выраженной генетической структурой и подразделяется на несколько филогенетических линий, сформировавшихся в результате длительной эволюции возбудителя в человеческой популяции [79;122]. Несмотря на относительно высокую консервативность генома, накопление специфических SNP позволило классифицировать популяцию микроорганизма на ряд обособленных филогенетических ветвей [80;99].

Современная филогенетическая классификация *M. tuberculosis*, основанная на данных WGS анализа, выделяет в составе МТВС по меньшей мере семь основных генетических групп, обозначаемых как линии 1–7 (рисунок 2). При этом линии 1, 2, 3, 4 и 7 относятся непосредственно к виду *M. tuberculosis*, тогда как линии 5 и 6 представляют вид *M. africanum* [81;123]. Каждая из этих линий характеризуется определенными генетическими особенностями и имеет собственные филогенетические признаки, позволяющие дифференцировать их на основе анализа SNP и других молекулярных маркеров [82;124].

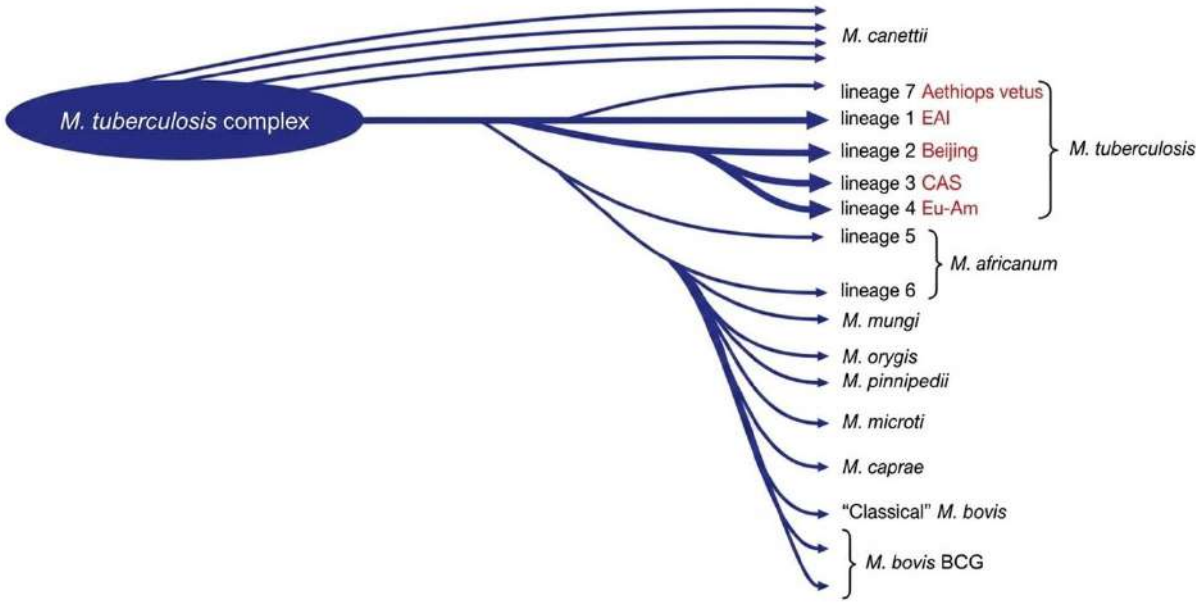


Рисунок 2 – Филогенетическая структура комплекса *Mycobacterium tuberculosis* [263]

Линия 1 (Indo-Oceanic) рассматривается как базальная ветвь по отношению к остальным основным линиям комплекса и распространена преимущественно в регионах Южной и Юго-Восточной Азии [104;125]. Линия 2 (East Asian), в значительной степени представленная генотипом Beijing, отличается высокой адаптивной способностью и преобладает в структуре заболеваемости в странах Восточной Азии, а также на постсоветском пространстве [126]. Линия 3 (East African–Indian) преимущественно циркулирует в странах Южной Азии и Восточной Африки [123]. Линия 4 (Euro-American) имеет наиболее широкое глобальное распространение и встречается в различных регионах мира [100;127].

Линии 5 и 6, входящие в группу вида *M. africanum,* имеют ограниченный ареал, охватывающий преимущественно страны Западной Африки [101]. Седьмая линия *M. tuberculosis* была выявлена сравнительно недавно и обнаружена в отдельных регионах Восточной Африки [81;128].

Результаты последних исследований предполагают существование дополнительных филогенетических ветвей – линий 8 и 9. Данные группы, выявленные в районе Африканского Рога (Джибути) и в Восточной Африке соответственно, рассматриваются как потенциально новые линии в составе *M. tuberculosis*, требующие дальнейшей глобальной верификации [129;130]. Такое филогенетическое разнообразие отражает длительную эволюционную историю возбудителя и его адаптацию к различным человеческим популяциям, подтверждая гипотезу об африканском происхождении МТВС [83;131].

1.4.2 Филогеография и глобальное распространение линий

Современное распространение филогенетических линий *M. tuberculosis* характеризуется выраженной структурой, которая сформировалась в результате тесного взаимодействия эволюции возбудителя и миграционных процессов человеческих популяций. Феномен филогеографии микобактерий подтверждает гипотезу о том, что различные ветви МТВС коэволюционировали и перемещались вместе с человеком на протяжении тысячелетий [87;92].

Глобальный ландшафт линий отражает исторические этапы расселения человека. Базальные линии, такие как L1, сохраняют приуроченность к регионам раннего расселения (Южная и Юго-Восточная Азия), что указывает на их глубокую адаптацию к коренному населению этих территорий [104;132]. Напротив, эволюционно «молодые» линии, в частности линии 2 и 4, демонстрируют значительно более высокую эпидемиологическую пластичность.

Особого внимания заслуживает экспансия линии 2 (East Asian), и, в частности, генотипа Beijing. Ее доминирование в Восточной и Центральной Азии, а также на постсоветском пространстве обусловлено не только историческими факторами, но и биологическими преимуществами: повышенной трансмиссивностью и способностью быстро приобретать множественную лекарственную устойчивость [126]. В то же время линия 4 (Euro-American) достигла практически повсеместного присутствия, что связывают с эпохой колонизации и последующим доминированием этой линии в Европе и обеих Америках [100;127].

В современных условиях географическое распределение линий подвергается трансформации под влиянием урбанизации и интенсивных миграционных потоков. Перемещение населения способствует смешению генетически удаленных линий, что создает предпосылки для формирования новых эпидемиологических паттернов и межштаммовой конкуренции в различных регионах мира [19;87].

1.4.3 Генетическая структура популяций микобактерий

Генетическая структура популяций *M. tuberculosis* формируется в результате длительного процесса микроэволюции, происходящего в условиях взаимодействия возбудителя с человеческой популяцией и внешней средой [79;133]. Как было отмечено в предыдущих разделах, для данного микроорганизма характерен преимущественно клональный тип эволюции, при котором новые генетические варианты формируются главным образом за счет накопления точечных мутаций [93;134].

В результате такого процесса внутри основных филогенетических линий формируются отдельные субкластеры и клональные комплексы, которые могут характеризоваться различной степенью эпидемиологической успешности [100;135]. Некоторые из этих генетических групп демонстрируют повышенную способность к передаче между людьми и могут играть ключевую роль в распространении туберкулеза в определенных регионах [136;137].

Особый интерес для молекулярной эпидемиологии представляют так называемые кластеры генетически близкородственных изолятов, которые могут отражать недавние цепочки передачи инфекции [99;138]. Анализ генетической дистанции между штаммами на основе SNP-полиморфизмов позволяет выявлять такие кластеры и оценивать масштабы текущей трансмиссии возбудителя [102;139].

Современные методы полногеномного секвенирования существенно расширили возможности изучения генетической структуры *M. tuberculosis*. Использование WGS позволяет с высокой точностью определять филогенетические связи между штаммами, выявлять мутации лекарственной устойчивости и анализировать динамику распространения различных генетических линий [38;45;140]. Такие подходы являются важным инструментом для молекулярно-эпидемиологического мониторинга туберкулеза и позволяют более точно оценивать роль недавней передачи инфекции в распространении заболевания [141;142].

В контексте стран Центральной Азии особое внимание уделяется изучению популяционной структуры штаммов *M. tuberculosis*, поскольку в данном регионе наблюдается высокая распространенность определенных генетических линий, ассоциированных с лекарственной устойчивостью и повышенной трансмиссивностью [52;143]. Исследование генетического разнообразия возбудителя в этих странах позволяет лучше понять механизмы распространения заболевания и разработать более эффективные меры по его контролю [59;144].

Важно подчеркнуть, что в настоящее время не существует единого универсального протокола для анализа данных секвенирования, и выбор биоинформационного подхода зачастую остается на усмотрение конкретной исследовательской группы [40;145]. Несмотря на огромный потенциал WGS, интерпретация данных о генетической структуре *M. tuberculosis* сталкивается с серьезными барьерами.

Одной из наиболее острых проблем является высокая стоимость и ресурсоемкость анализа. Обработка и хранение массивов данных WGS требуют значительных вычислительных мощностей и специализированной инфраструктуры [146]. Это создает ситуацию, при которой современные методы геномного мониторинга остаются труднодоступными именно для стран с высоким бременем туберкулеза, где потребность в них наиболее велика.

Более того, структура популяции *M. tuberculosis* формируется под влиянием как недавних цепочек трансмиссии, так и долгосрочных исторических процессов, что делает сугубо генетический анализ недостаточным. Для получения объективной картины необходим комплексный подход, интегрирующий крупномасштабные геномные данные с клиническими и эпидемиологическими сведениями [40].

1.5. Генотип Beijing и ее роль в распространении лекарственно-устойчивого туберкулеза

1.5.1 Происхождение и эволюция генотипа Beijing

Генотип Beijing относится к филогенетической линии 2 (East Asian lineage) *M. tuberculosis* и является одной из наиболее изученных и эпидемиологически значимых генетических групп возбудителя туберкулеза [126;137]. Данная линия получила свое название в связи с первоначальным выявлением характерного генотипа среди изолятов, циркулировавших в Китае, однако последующие исследования показали ее широкое распространение в различных регионах мира [147].

Филогенетические исследования свидетельствуют о том, что генотип Beijing имеет восточноазиатское происхождение и сформировалась несколько тысяч лет назад в популяциях, проживавших на территории Восточной Азии [131;148]. В дальнейшем, в результате миграционных процессов и исторических контактов между различными регионами, штаммы данной линии постепенно распространились за пределы первоначального ареала и стали циркулировать в странах Европы, России и Центральной Азии [149].

Современные геномные исследования позволили выделить внутри генотипа Beijing несколько сублиний, которые отличаются набором характерных SNP-мутаций и особенностями эволюционной истории [150]. Одним из важных этапов в эволюции данной линии стало разделение на древние и современные сублинии, различающиеся по ряду генетических маркеров [151;152]. Современные сублинии Beijing характеризуются более высокой эпидемиологической успешностью и в ряде регионов демонстрируют

повышенную ассоциацию с лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза [153;154].

Анализ полногеномных последовательностей показал, что эволюция генотипа Beijing происходит преимущественно клональным путем и сопровождается накоплением точечных мутаций, формирующих отдельные клональные группы и эпидемиологические кластеры [155]. Такие особенности эволюции делают данную линию удобной моделью для изучения процессов передачи и распространения туберкулеза на основе методов молекулярной эпидемиологии [156].

1.5.2 Биологические особенности и эпидемиологический успех

Генотип Beijing привлекает особое внимание исследователей в связи с ее высокой эпидемиологической успешностью и способностью эффективно распространяться в человеческой популяции [157]. Во многих регионах мира штаммы данной линии демонстрируют повышенную частоту выявления по сравнению с другими генетическими линиями *M. tuberculosis* [123;158].

Одной из причин эпидемиологического успеха генотипа Beijing считается совокупность биологических особенностей, которые могут обеспечивать преимущество в процессе инфицирования и передачи возбудителя [159]. Исследования показывают, что штаммы данной линии могут обладать повышенной вирулентностью, а также способностью более эффективно избегать иммунного ответа хозяина [160]. В частности, предполагается, что генетические особенности штаммов генотипа Beijing, включая мутации в регуляторных системах (PhoP/PhoR), повышенную экспрессию факторов вирулентности системы ESX-1 и изменения в составе липидов клеточной стенки, могут модифицировать взаимодействие микобактерий с клетками иммунной системы, способствуя подавлению противовоспалительного ответа и обеспечивая более длительную персистенцию возбудителя в организме человека [161;162].

Кроме того, данные молекулярно-эпидемиологических и популяционных исследований, а также систематических обзоров и метаанализов свидетельствуют о статистически значимой ассоциации распространения генотипа Beijing с формированием лекарственно-устойчивых форм туберкулеза [61;163]. В ряде стран, включая государства Восточной Европы и Центральной Азии, штаммы данной линии часто ассоциированы с МЛУ-ТБ [59;143]. Предполагается, что генетические особенности штаммов генотипа Beijing, включая изменения в системах репарации ДНК, повышенную мутационную вариабельность и наличие компенсаторных мутаций, снижающих фитнес-стоимость лекарственной устойчивости, могут способствовать более эффективному накоплению и сохранению мутаций, ассоциированных с устойчивостью к противотуберкулезным препаратам [117;164].

Еще одной важной характеристикой генотипа Beijing является ее способность эффективно распространяться даже в условиях активного противотуберкулезного контроля [121]. Высокая трансмиссивность отдельных клональных вариантов генотипа Beijing может способствовать формированию

крупных эпидемиологических кластеров, отражающих продолжающуюся передачу инфекции в популяции [137;165]. Эти особенности делают линию Beijing одним из ключевых объектов современных молекулярно-эпидемиологических исследований туберкулеза.

Важно подчеркнуть, что генотип Beijing представляет собой широкую филогенетическую группу, включающую значительное генетическое разнообразие штаммов, различающихся по своим биологическим и эпидемиологическим характеристикам. Не все представители данной линии в равной степени ассоциированы с лекарственной устойчивостью или повышенной трансмиссивностью. В связи с этим в современных исследованиях особое внимание уделяется анализу отдельных сублиний и клональных комплексов внутри Beijing, поскольку именно на этом уровне проявляются наиболее значимые эпидемиологические особенности [150;153]. В итоге рассмотрение генотипа Beijing как однородной группы может приводить к упрощению и искажению представлений о ее роли в распространении туберкулеза.

1.5.3 Клональные комплексы генотипа Beijing (Central Asia Outbreak и др.)

В отличие от генетически неоднородной линии 2 (East Asian), сублиния Central Asia Outbreak (CAO) представляет собой узко определенную филогенетическую группу, относящуюся к современной сублинии Beijing (L2.2), характеризующуюся низким уровнем генетического разнообразия, наличием специфических SNP-маркеров и признаками клонального распространения, что подтверждено данными полногеномного секвенирования [150;166]. Такой уровень детализации имеет принципиальное значение, поскольку эпидемиологически значимые свойства, включая высокую трансмиссивность и ассоциацию с лекарственной устойчивостью, чаще всего характерны не для всего генотипа Beijing в целом, а для отдельных ее клональных комплексов, таких как CAO [167].

Клональный комплекс CAO имеет особое эпидемиологическое значения для стран Центральной Азии, включая Казахстан. Свое название данный кластер получил в результате масштабных молекулярно-эпидемиологических исследований, зафиксировавших беспрецедентную по масштабу вспышку штаммов этой группы в центральноазиатском регионе [150;168]. На сегодняшний день кластер CAO является доминирующим в Казахстане и сопредельных государствах, что обусловлено его высокой трансмиссивностью и тесной связью с МЛУ-ТБ. Широкое распространение этой генетической группы ставит ее в центр стратегий по национальному эпидемиологическому надзору за туберкулезом в регионе [59;169]

Развитие методов WGS позволило существенно уточнить филогенетическую структуру комплекса CAO и выявить ряд специфических молекулярно-генетических маркеров, обеспечивающих его надежную идентификацию внутри сублинии L2.2.1. Согласно современной филогенетической классификации, комплекс CAO соответствует ветви

L2.2.M4.9.1 [82;170]. Для него описан характерный набор диагностических признаков, включающий синонимичную замену в гене *sigE*, ряд фиксированных однонуклеотидных полиморфизмов в различных геномных локусах, а также специфические структурные вариации, в частности уникальную инсерцию мобильного элемента IS6110 в межгенном регионе Rv1359–Rv1360 [150; 179]. Совокупность указанных маркеров рассматривается как надежный инструмент дифференциации CAO от филогенетически близких групп внутри генотипа Beijing [150;171; 179].

Высокая представленность штаммов комплекса CAO в структуре заболеваемости туберкулезом в странах Центральной Азии и Восточной Европы свидетельствует о значительной адаптационной способности (фитнесе) данной генетической группы. Эпидемиологический успех CAO связывают с сочетанием высокой трансмиссивности и эффективных механизмов адаптации к лекарственному давлению. Показано, что формирование множественной лекарственной устойчивости у штаммов данного комплекса нередко сопровождается возникновением компенсаторных мутаций в генах РНК-полимеразы, прежде всего в гене *rpoC*, которые частично нивелируют отрицательное влияние мутаций устойчивости в гене *rpoB* на репликативную способность возбудителя [117;172].

Помимо комплекса CAO, внутри генотипа Beijing выделяют и другие филогенетически и эпидемиологически значимые группы, такие как Central Asia, Asian-African 1, Asian-African 2 [126;173]. Необходимо различать широкую генетическую группу Central Asia и специфический клональный комплекс CAO. Если группа Central Asia представляет собой исторически сложившуюся популяционную основу *M. tuberculosis* в регионе, то комплекс CAO возник как результат недавней и чрезвычайно успешной эволюционной адаптации. Название «Central Asia Outbreak» (Центрально-Азиатская вспышка) было дано этой ветви именно из-за ее взрывного распространения и жесткой ассоциации с МЛУ-ТБ [150;174]. Наряду с ними, важнейшую роль в формировании структуры *M. tuberculosis* в Евразии играет клональный комплекс Beijing-B0/W148, успешный российский клон [175;176]. Его экспансия в России, Восточной Европе и Центральной Азии также тесно сопряжена с накоплением мутаций лекарственной устойчивости. Современная эпидемическая ситуация в регионе определяется конкуренцией и ко-циркуляцией этих клональных групп – CAO, Central Asia и Beijing-B0/W148, что требует детального генетического мониторинга на основе полногеномных данных [177].

Современные подходы молекулярной эпидемиологии, основанные на оценке геномных расстояний между изолятами и анализе распределения SNP-вариантов, позволяют не только устанавливать филогенетическую принадлежность штаммов к определенному клональному комплексу, но и выявлять очаги недавней передачи инфекции [99;120]. Для регионов с высокой распространенностью МЛУ-ТБ, включая Казахстан и другие страны Центральной Азии, мониторинг циркуляции данной генетической линии рассматривается как приоритетное направление эпидемиологического надзора и оценки эффективности противотуберкулезных мероприятий [178;179].

Результаты современных геномных исследований свидетельствуют о ключевой роли клонального комплекса CAO в формировании эпидемического процесса лекарственно-устойчивого туберкулеза в странах Центральной Азии, что определяет необходимость его дальнейшего углубленного изучения [180-183].

Таким образом, разграничение понятий «генотип Beijing» и «сублиния CAO» имеет принципиальное значение для корректной интерпретации молекулярно-эпидемиологических данных. В то время как генотип Beijing отражает высокий уровень филогенетической классификации, объединяющий разнообразные генетические варианты, комплекс CAO представляет собой конкретную эволюционную ветвь с четко определенными генетическими характеристиками и выраженной эпидемиологической значимостью. Игнорирование данного различия может приводить к переоценке роли всего генотипа Beijing в формировании лекарственно-устойчивого туберкулеза [182;183].

1.6. Молекулярно-генетические методы анализа генетического разнообразия *Mycobacterium tuberculosis*

1.6.1 Классические методы генотипирования (Spoligotyping, MIRU-VNTR)

Изучение популяционной структуры *M. tuberculosis* играет важную роль в понимании путей распространения туберкулеза и выявлении эпидемиологических связей между случаями заболевания. На протяжении последних десятилетий для этих целей широко применялись различные молекулярно-генетические методы генотипирования, позволяющие дифференцировать штаммы возбудителя и анализировать их филогенетические взаимоотношения [184;185].

Одним из наиболее распространенных методов является сполиготипирование (spoligotyping), основанный на анализе полиморфизма в области прямых повторов (Direct Repeat region) генома *M. tuberculosis* [186]. Данный метод позволяет определять наличие или отсутствие специфических спейсерных последовательностей, формирующих уникальный генетический профиль штамма [187]. Сполиготипирование получило признание благодаря быстроте выполнения и возможности предварительной классификации изолятов, особенно для идентификации семейства Beijing, характеризующегося отсутствием первых 34 спейсеров [149;188].

Другим широко используемым методом генотипирования *M. tuberculosis* является MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeats), основанный на анализе вариабельного числа тандемных повторов в стандартизированном наборе гипервариабельных локусов генома микобактерий, таких как MIRU02, MIRU04, MIRU10, MIRU16, MIRU26, MIRU40, а также ряде дополнительных VNTR-локусов (например, ETR-A, ETR-B, QUB11b и Mtub21) [189;190]. Сравнение числа повторов в панели из 12, 15 или 24 локусов позволяет формировать генетический профиль штамма и проводить сравнительный анализ между различными изолятами [190].

Комбинированное использование методов сполиготипирования и MIRU-VNTR на протяжении длительного времени являлось основным инструментом молекулярной эпидемиологии туберкулеза [189]. Эти методы позволили выявить глобальную структуру популяции *M. tuberculosis*, определить распространение различных генетических линий и выявить эпидемиологические кластеры [186;187;190]. Однако комбинированное использование этих методов имеет существенные ограничения. Главным из них является гомоплазия (конвергентная эволюция), при которой генетически удаленные штаммы могут случайно иметь одинаковые профили MIRU-VNTR, что приводит к ложному объединению их в эпидемиологические кластеры [193;194]. Кроме того, разрешающей способности MIRU-VNTR часто недостаточно для подтверждения недавней трансмиссии в популяциях с низким генетическим разнообразием, например, при доминировании клона CAO [150;195].

1.6.2 Полногеномное секвенирование в молекулярной эпидемиологии

Полногеномное секвенирование (Whole Genome Sequencing, WGS) в настоящее время рассматривается как «золотой стандарт» в молекулярной эпидемиологии туберкулеза, обеспечивающий максимально возможное разрешение при анализе генетического разнообразия *M. tuberculosis* (рисунок 3) [100;196]. В отличие от сполиготипирования и MIRU-VNTR, метод WGS позволяет анализировать более 90% генома возбудителя, включая как кодирующие, так и некодирующие регионы. Это обеспечивает формирование полного SNP-профиля каждого изолята и их высокоточное попарное сравнение [102;197].



Рисунок 3 – Запуск полногеномного секвенирования *M. tuberculosis* на NGS приборе Illumina Miseq

Ключевым преимуществом WGS является возможность детального определения филогенетической принадлежности штаммов на основе анализа SNP-маркеров, что позволяет дифференцировать даже крайне близкородственные изоляты [120;190]. Это имеет принципиальное значение для реконструкции путей передачи инфекции, поскольку небольшие различия (в пределах нескольких SNP) могут свидетельствовать о недавней трансмиссии между пациентами [120].

Кроме того, использование WGS позволяет проводить количественную оценку трансмиссии туберкулеза на основе анализа SNP-дистанций между изолятами. В ряде исследований предложены пороговые значения (например, 5–12 SNP), позволяющие выделять кластеры недавней передачи инфекции. Однако данные пороги не являются универсальными и могут варьировать в зависимости от популяции возбудителя и эпидемиологического контекста, что требует осторожности при интерпретации результатов [40;199].

Важным направлением применения WGS является анализ лекарственной устойчивости. В отличие от фенотипических методов, требующих длительного культивирования, WGS позволяет выявлять мутации, ассоциированные с резистентностью, непосредственно на уровне генома. Это обеспечивает возможность одновременного получения информации о филогенетической линии штамма и его профиле лекарственной устойчивости, что делает данный подход особенно ценным для клинической и эпидемиологической практики [67;200].

Существенным преимуществом WGS является возможность выявления клональных вспышек и отслеживания распространения отдельных генетических кластеров. Это позволяет реконструировать цепочки передачи инфекции, и оценивать вклад конкретных генетических вариантов в формирование эпидемического процесса [145; 200].

Вместе с тем, несмотря на высокую информативность, применение WGS сопряжено с рядом ограничений. К ним относятся высокая стоимость оборудования и реактивов, необходимость стандартизации биоинформационных подходов, включая выбор референсного генома, методы выравнивания и фильтрации SNP, а также интерпретацию генетических дистанций [202;203]. Кроме того, различия в аналитических протоколах могут приводить к несопоставимости результатов между исследованиями [145; 203].

Таким образом, WGS представляет собой ключевой инструмент современной молекулярной эпидемиологии туберкулеза, обеспечивающий глубокое понимание генетической структуры *M. tuberculosis* и механизмов распространения инфекции.

1.6.3 Использование SNP-анализа для изучения трансмиссии туберкулеза

Изучение SNP выступает основным инструментом анализа данных WGS, поскольку клональная природа эволюции *M. tuberculosis* предполагает накопление точечных мутаций как главный механизм генетической

изменчивости. Это позволяет использовать SNP для точной реконструкции эволюционной истории и структуры популяции возбудителя [93;204].

Сравнение SNP-профилей различных изолятов позволяет оценивать степень генетической близости между штаммами и реконструировать их филогенетические взаимоотношения [80;205]. Небольшое число различий по SNP между двумя изолятами может свидетельствовать о недавней передаче инфекции между пациентами или о принадлежности штаммов к одной эпидемиологической цепочке [102].

В молекулярной эпидемиологии туберкулеза широко применяется анализ SNP-дистанций между штаммами, позволяющий выделять кластеры генетически близкородственных изолятов [120]. Такие кластеры могут отражать продолжающуюся трансмиссию возбудителя и используются для оценки масштабов распространения инфекции [137;206].

Использование SNP-анализа в сочетании с эпидемиологическими и клиническими данными позволяет более точно изучать механизмы распространения туберкулеза и выявлять ключевые факторы, влияющие на динамику эпидемического процесса [40;207]. Данный подход является одним из наиболее перспективных направлений современной молекулярной эпидемиологии туберкулеза [207].

1.7. Современное состояние молекулярной эпидемиологии туберкулеза в Казахстане

1.7.1 Ранее проведенные генетические исследования

В последние годы в Казахстане было проведено несколько исследований, направленных на изучение генетической структуры популяции *M. tuberculosis* [143;169]. Большинство из них основывалось на применении классических методов генотипирования, таких как spoligotyping и MIRU-VNTR, которые позволили получить представление о распространении различных генетических линий возбудителя в стране [208].

Полученные результаты показали, что популяция *M. tuberculosis* в Казахстане характеризуется относительно ограниченным разнообразием и представлена несколькими основными генетическими линиями, что типично для постсоветского пространства [150;209]. Наиболее распространенной из них является линия 2, генотип Beijing, которая составляет от 70% до 90% всех изолятов, выделенных у пациентов с туберкулезом в различных регионах республики [143;210].

Ряд исследований также был направлен на изучение мутаций лекарственной устойчивости с помощью ПЦР в реальном времени и технологии линейных ДНК-зондов (GenoType MTBDRplus) [211;212]. Однако большинство таких работ ограничивалось анализом «hot-spot» регионов отдельных генов (*rpoB, katG, inhA*), что не дает полной картины полирезистентности и фитнес-компенсации штаммов [213].

1.7.2 Доминирование генотипа Beijing

Как показывают результаты многолетних наблюдений, генотип Beijing занимает доминирующее положение в структуре популяции в Казахстане [143]. Распространенность этой линии в стране соответствует общей эпидемиологической ситуации в Центральной Азии, где штаммы Beijing жестко ассоциированы с МЛУ и ШЛУ-ТБ [52;166].

Широкая распространенность данной линии обусловлена не только историческими факторами, но и селективным преимуществом современных сублиний (прежде всего CAO и W148) в условиях высокой лекарственной нагрузки [150]. Генетические особенности этих штаммов обеспечивают им повышенную трансмиссивность даже в условиях активного противотуберкулезного контроля [121]. Поэтому изучение генетической структуры данной линии и механизмов ее распространения представляет особый интерес для молекулярной эпидемиологии туберкулеза в Казахстане.

1.7.3 Ограничения существующих данных

Несмотря на накопленные данные, существующие данные по Казахстану остаются фрагментарными. Большинство работ выполнено с использованием MIRU-VNTR, который, как было показано ранее, склонен к гомоплазии и дает ложноположительные результаты при кластеризации штаммов генотипа Beijing [195;214].

Более того, в Казахстане до сих пор критически мало опубликованных исследований, использующих WGS для анализа общенациональной выборки штаммов. Это создает дефицит данных о реальных путях трансмиссии и эволюции локальных штаммов *M. tuberculosis* [169;214]. Недостаточная представленность данных WGS затрудняет выявление активных цепочек передачи и оценку вклада миграционных процессов в эпидемиологию ТБ [169].

В связи с этим, это исследование с применением полногеномного секвенирования и SNP-анализа является своевременным и необходимым для перехода от описательной эпидемиологии к прецизионному геномному надзору в Казахстане.

1.8. Обоснование и актуальность настоящего исследования

Несмотря на значительные успехи в изучении генетической структуры *M. tuberculosis* на глобальном уровне, данные о популяционной структуре возбудителя в странах Центральной Азии, включая Казахстан, остаются ограниченными [59;215]. Большинство ранее проведенных исследований основывалось на применении традиционных методов генотипирования, которые не позволяют в полной мере оценить генетическое разнообразие штаммов и выявить недавние цепочки передачи инфекции [195].

Современные методы полногеномного секвенирования открывают новые возможности для детального анализа популяционной структуры *M. tuberculosis*, выявления мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, и изучения механизмов распространения заболевания [102;216]. Однако число

исследований, использующих WGS для анализа штаммов *M. tuberculosis* в Казахстане, остается относительно небольшим [169;217].

Особое значение для молекулярной эпидемиологии туберкулеза имеет анализ SNP-дистанций между изолятами, позволяющий выявлять кластеры генетически близкородственных штаммов и оценивать уровень недавней трансмиссии инфекции [120;218;219]. Использование данного подхода дает возможность более точно определять масштабы распространения туберкулеза и выявлять ключевые факторы, влияющие на динамику эпидемического процесса.

Кроме того, изучение взаимосвязи между генетическими характеристиками возбудителя, его филогенетической принадлежностью и профилем лекарственной устойчивости имеет важное значение для понимания механизмов распространения устойчивых форм туберкулеза [150;220]. Сохраняется ряд нерешенных вопросов, касающихся фитнес-стоимости мутаций резистентности у локальных штаммов *M. tuberculosis* и роли компенсаторной эволюции в их эпидемиологическом успехе [30;117]. Особенно это актуально для стран Центральной Азии, где высокая распространенность МЛУ-ТБ сочетается с ограниченным числом исследований, основанных на данных полногеномного секвенирования.

Отсутствие высокоразрешающих геномных данных затрудняет выявление недавних цепочек передачи инфекции, оценку роли отдельных клональных комплексов, включая CAO, и анализ факторов, определяющих их эпидемиологический успех [221]. Это формирует существенный пробел в современных знаниях и определяет необходимость проведения масштабных исследований с использованием передовых геномных технологий и биоинформационных подходов [222-224].

Следовательно, проведение комплексного молекулярно-генетического исследования клинических изолятов *M. tuberculosis* с использованием методов полногеномного секвенирования и SNP-анализа представляет актуальную научную задачу для углубленного изучения генетической структуры популяции возбудителя и механизмов его распространения в Казахстане.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

2.1.1 Дизайн исследования и общая характеристика материала

Настоящее исследование посвящено молекулярно-генетическому анализу популяционной структуры *Mycobacterium tuberculosis* в Республике Казахстан. Основными задачами являлись идентификация филогенетических линий возбудителя туберкулеза, анализ мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, и реконструкция эволюционных связей между клиническими изолятами.

Объектом исследования служили клинические изоляты *M. tuberculosis*, полученные от пациентов с лабораторно подтвержденным туберкулезом легких. Сбор клинического материала осуществлялся на базе Национального научного центра фтизиопульмонологии Республики Казахстан в период с января 2023 по декабрь 2024 года.

Молекулярно-генетическое исследование изолятов проводилось с использованием метода полногеномного секвенирования (Whole Genome Sequencing, WGS), обеспечивающего высокую разрешающую способность при анализе генетического разнообразия возбудителя и широко применяемого для изучения его эволюции и распространения [99;196;225].

На основе данных WGS выполнялись идентификация филогенетических линий и сублиний *M. tuberculosis*, анализ однонуклеотидных полиморфизмов (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) для реконструкции филогенетических связей между изолятами, а также выявление мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью. Применение полногеномного секвенирования позволило провести детальный сравнительный анализ геномов изолятов и оценить особенности их генетического разнообразия и трансмиссии [67;141].

2.1.2 Клинический материал и критерии отбора образцов

Клинические изоляты *M. tuberculosis* были выделены из различного диагностического материала, полученного от пациентов с легочными и внелегочными формами туберкулеза. Основную долю в структуре биологических образцов составляли мокрота и бронхоальвеолярный лаваж. Кроме того, в микробиологическую лабораторию для диагностики туберкулеза направлялись другие виды биологического материала, включая экссудаты и секреты различной локализации (гнойное отделяемое), плевральную и параплевральную жидкости, спинномозговую жидкость (СМЖ), промывные воды бронхов, а также тканевые образцы (операционный материал), казеозные массы, биоптаты лимфатических узлов и биологические выделения (мочу и кал).

Забор биологического материала проводился обученным медицинским персоналом до начала противотуберкулезной терапии в соответствии с действующими национальными клиническими протоколами [226;227]. Все образцы помещались в стерильные одноразовые герметичные контейнеры. Доставка диагностического материала в микробиологическую лабораторию

осуществлялась в специализированных контейнерах с охлаждающим агентом при температурном режиме от +2 до +15 °C [228]. Первичная обработка поступивших образцов выполнялась в боксе биологической безопасности II класса непосредственно после их регистрации. При невозможности незамедлительного начала работ диагностический материал допускалось хранить при температуре от +2 до +8 °C в течение не более 24 часов [226;229].

2.1.3 Критерии включения и исключения

В исследование включались образцы, удовлетворяющие следующим критериям:

- подтвержденное присутствие комплекса *M. tuberculosis* методом молекулярно-генетической диагностики (Xpert MTB/RIF) [67];
- положительный рост культуры микобактерий на питательных средах.

Критериями исключения являлись контаминация образцов посторонней микрофлорой, а также недостаточная концентрация или низкое качество выделенной геномной ДНК для полногеномного секвенирования (концентрация <5 нг/мкл, A260/A280 <1.6, A260/A230 <1.5) [225;230].

2.1.4 Сбор клинико-эпидемиологических данных

Для каждого пациента собирались клинико-эпидемиологические данные из комплексной медицинской информационной системы Damumed и Национального регистра больных туберкулезом. Анализируемые параметры включали демографические характеристики (возраст, пол, регион проживания), клиническую форму туберкулеза, анамнез предшествующего противотуберкулезного лечения, результаты тестов лекарственной чувствительности, а также наличие сопутствующей патологии (ВИЧ-инфекция, сахарный диабет).

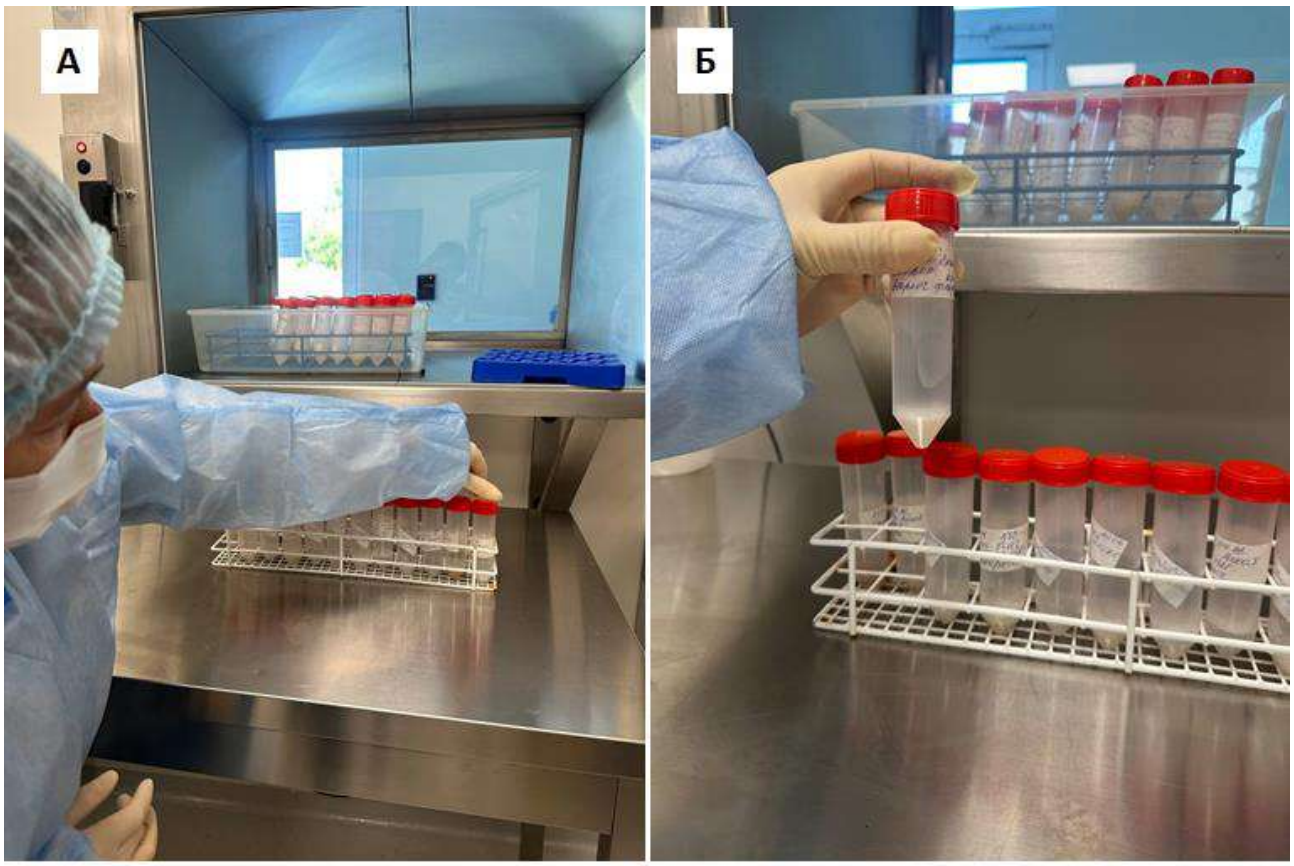
Сопоставление генетических характеристик изолятов с эпидемиологическими данными пациентов позволяет реконструировать популяционную структуру возбудителя и выявлять потенциальные пути передачи инфекции [46;207].

2.2 Микробиологические методы

Первичная обработка клинического материала, микроскопическое исследование, молекулярно-генетические методы диагностики, культивирование микобактерий и получение чистых культур выполнялись в микробиологической лаборатории противотуберкулезного центра в соответствии со стандартными протоколами и согласно алгоритму диагностики ТБ [226]. Ниже приведено краткое описание основных этапов работы с клиническим материалом.

2.2.1 Обработка клинического материала

Деконтаминацию и разжижение клинических образцов (рисунок 4) проводили стандартным методом с использованием N-ацетил-L-цистеина и 4% гидроксида натрия (NALC–NaOH). Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут, после чего реакцию нейтрализовали фосфатным буфером (pH 6.8). Далее образцы центрифугировали при 3000 ×g в течение 20 минут при температуре от +4 до +12 °C. Полученный осадок ресуспендировали в 1–2 мл стерильного физиологического раствора и использовали для последующих микроскопических, молекулярно-генетических и культуральных исследований [228;231].



А – штатив с пробирками с клиническими образцами; Б – маркированная пробирка с образцом мокроты

Рисунок 4 – Прием, первичная регистрация и подготовка клинических образцов в лаборатории

2.2.2 Микроскопическое исследование

Для микроскопического исследования из ресуспендированного осадка готовили мазки на предметных стеклах. Окрашивание выполняли по методу Циля–Нильсена для выявления кислотоустойчивых микобактерий (КУМ) [277]. Мазки фиксировали в пламени спиртовки, окрашивали 3% раствором карбол-фуксина Циля при подогревании до появления паров, обесцвечивали 3% солянокислым спиртом и докрашивали 0,1% раствором метиленового синего. Просмотр мазков осуществляли с помощью светового бинокулярного микроскопа с использованием иммерсионного объектива (×100) и окуляров (×10), обеспечивающих общее увеличение ×1000 (рисунок 5). Для микроскопии

применяли синтетическое иммерсионное масло с коэффициентом преломления $n \geq 1{,}515$.

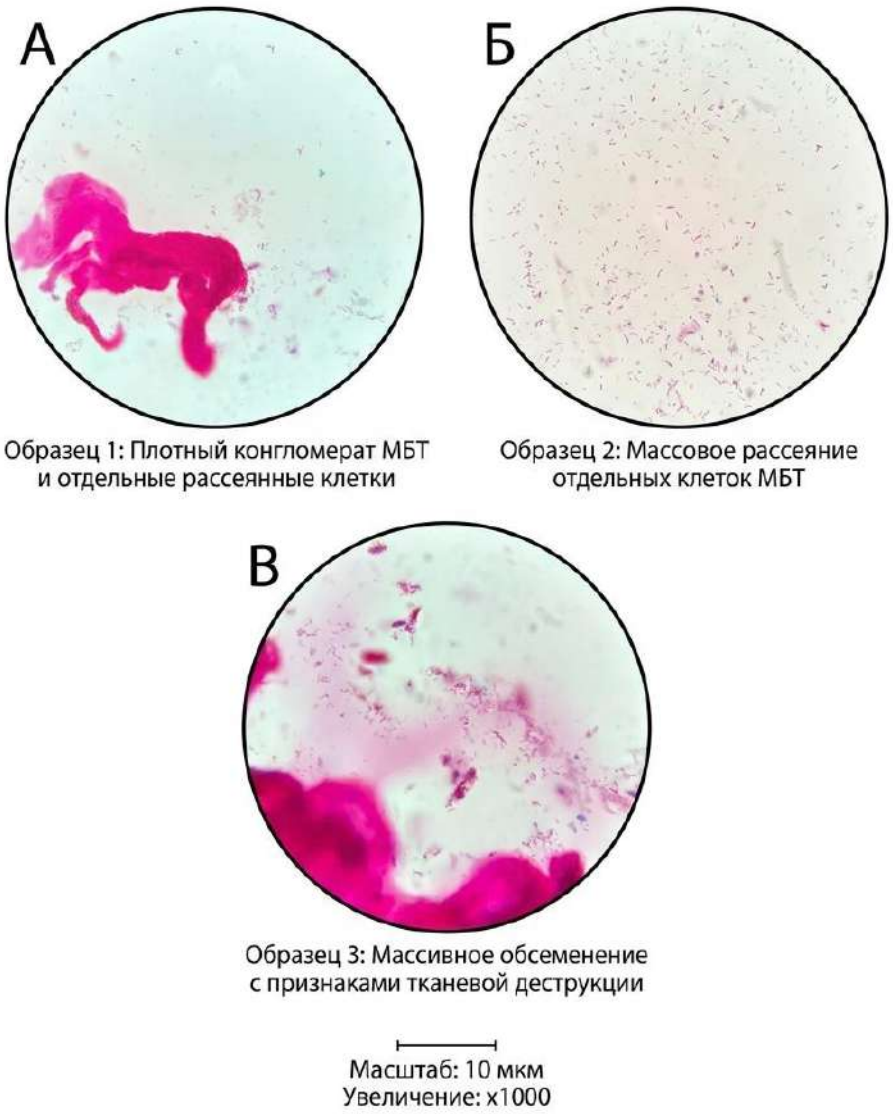


Рисунок 5 – Микроскопическое исследование *M. tuberculosis* в клинических образцах с окраской по Цилю-Нильсену

Результаты оценивали полуколичественно в соответствии со шкалой Международного союза борьбы с туберкулезом и болезнями легких (IUATLD) [231;233]: отрицательный результат – при отсутствии КУМ в 300 полях зрения; (+) – при обнаружении 1–9 КУМ в 100 полях зрения; (++) – при обнаружении 1–9 КУМ в 10 полях зрения; (+++) – при выявлении 1–9 КУМ в одном поле зрения; (++++) – при выявлении более 9 КУМ в одном поле зрения (Приложение А, рис. А.1).

2.2.3 Молекулярно-генетическая диагностика

Первичную идентификацию комплекса *M. tuberculosis* проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием автоматизированной системы GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, США),

позволяющей одновременно выявлять ДНК возбудителя и мутации в гене *rpoB*, ассоциированные с устойчивостью к рифампицину (рисунок 6) [234]. Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя.



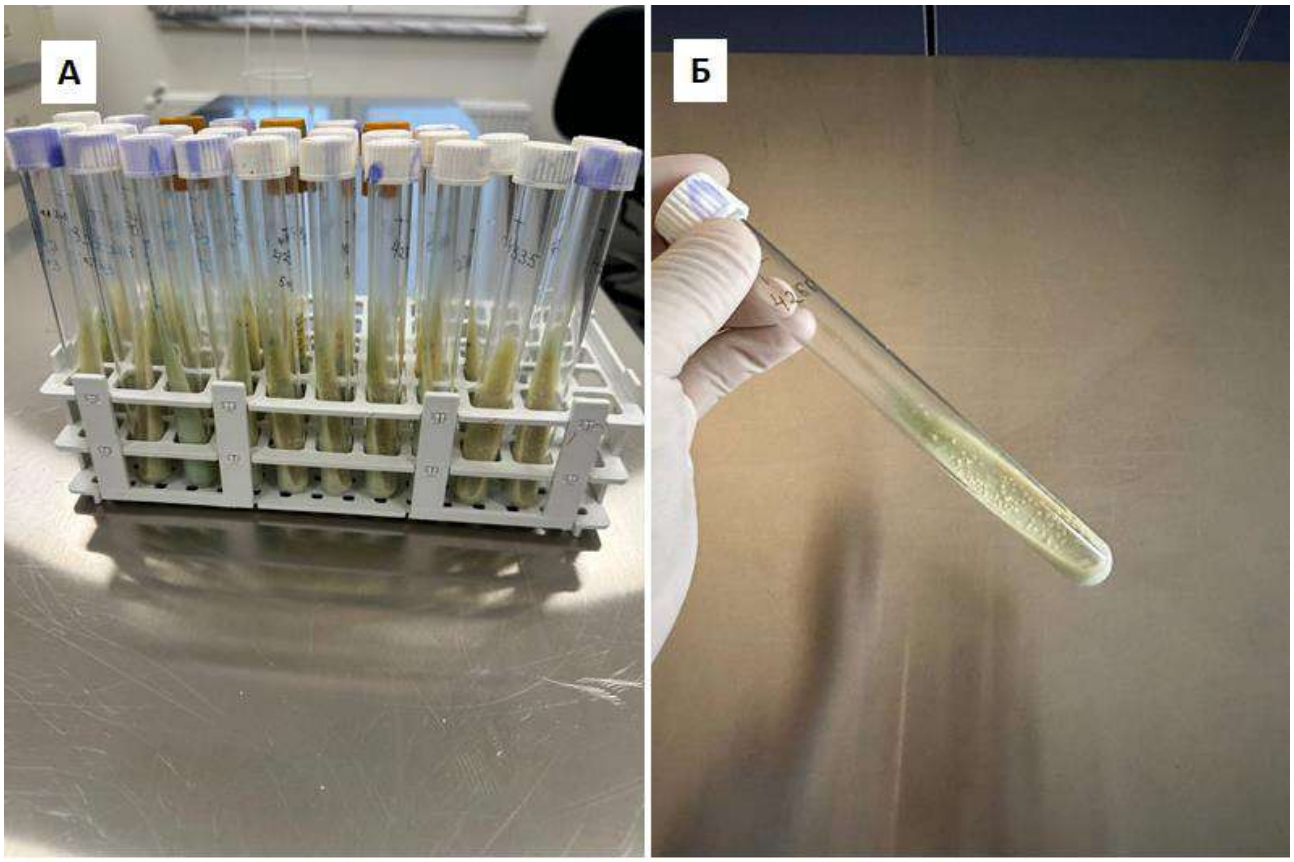
Рисунок 6 – Оборудование для детекции ДНК *M. tuberculosis* методом ПЦР в реальном времени: прибор Cepheid GeneXpert и используемый картридж

Для выявления мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, дополнительно применяли линейные зондовые анализы GenoType MTBDRplus v2.0 и GenoType MTBDRsl v2.0 (Hain Lifescience, Германия) [67;235]. Тест MTBDRplus позволяет выявлять мутации в генах *rpoB*, *katG* и *inhA*, ассоциированные с устойчивостью к рифампицину и изониазиду. Тест MTBDRsl используется для детекции мутаций в генах *gyrA*, *rrs* и *eis*, связанных с устойчивостью к фторхинолонам и инъекционным препаратам второго ряда [235;236].

2.2.4 Культивирование микобактерий

Культивирование *M. tuberculosis* проводили на плотной яичной среде Левенштейна–Йенсена (рисунок 7; Приложение А, рис. А.2) [185;237]. По 0,2 мл подготовленного осадка засевали в две пробирки со средой. Посевы

инкубировали в термостате при температуре 37 °С на срок до 8 недель с еженедельной визуальной регистрацией признаков роста.



А – штатив с посевами культур *M. tuberculosis*; Б – морфология колоний *M. tuberculosis* на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена

Рисунок 7 – Культивирование изолятов *M. tuberculosis* на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена

Рост *M. tuberculosis* характеризовался появлением шероховатых кремовых колоний R-формы (рисунок 7Б). В большинстве случаев рост наблюдался через 3–4 недели инкубации, однако при низкой бактериальной нагрузке появление колоний могло происходить через 6–8 недель [231;232].

2.2.5 Получение чистых культур

После появления роста проводили пересев колоний на свежую среду Левенштейна–Йенсена для получения чистых культур. Пересев выполняли стерильной бактериологической петлей с отбором типичных колоний из первичной культуры. Субкультуры инкубировали при 37 °С в течение 2–3 недель.

Чистоту культуры подтверждали микроскопией по Цилью-Нильсену и отсутствием роста неспецифической микрофлоры на 4% кровяном агаре [231;232;238]. Полученные биомассы чистых культур использовали для последующей экстракции геномной ДНК и проведения полногеномного секвенирования.

2.3 Молекулярно-генетические методы

2.3.1 Выделение геномной ДНК

Экстракцию геномной ДНК из чистых культур *M. tuberculosis* проводили с использованием набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя с модификациями, адаптированными для микобактерий (Приложение А, рис. А.4А) [225;239].

Протокол экстракции и очистки ДНК:

1. Бактериальные колонии объемом приблизительно 10 мкл (полная бактериологическая петля) переносили в пробирки, содержащие стеклянные бусины диаметром 0,1 мм, и гомогенизировали на вортексе до полного разрушения колоний.

2. Полученный материал суспендировали в 1 мл физиологического раствора и перемешивали на вортексе до однородного состояния.

3. 1 мл бактериальной суспензии переносили в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали при 5000 об/мин до получения осадка клеток.

4. Надосадочную жидкость удаляли, после чего проводили инактивацию бактерий при +80 °C в течение 30 мин.

5. Осадок ресуспендировали в 180 мкл лизирующего буфера, содержащего лизоцим (20 мг/мл), тщательно перемешивали и инкубировали при 37 °C в течение ночи.

6. Добавляли 20 мкл протеиназы K и 200 мкл буфера GL, перемешивали и инкубировали при 55 °C в течение 30 мин.

7. Затем добавляли 20 мкл RNase A, перемешивали пипетированием и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 мин.

8. Добавляли 200 мкл этанола (96–100 %), перемешивали на вортексе и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин.

9. 640 мкл полученного лизата переносили в спин-колонку, установленную в пробирку для сбора объемом 2 мл, и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 1 мин.

10. Спин-колонку переносили в новую пробирку для сбора объемом 2 мл, добавляли 500 мкл буфера WB1 и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 1 мин.

11. Спин-колонку вновь переносили в новую пробирку для сбора, добавляли 500 мкл буфера WB2 и центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 3 мин для удаления остаточного этанола.

12. Спин-колонку переносили в стерильную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5–2 мл, вносили 100 мкл буфера EB в центр мембраны, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 мин и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 1 мин для элюции ДНК.

Все процедуры выполнялись в соответствии с инструкциями, принятыми в микробиологической лаборатории Национального научного центра фтизиопульмонологии (г. Алматы, Казахстан) на основе приказа Министерства здравоохранения Республики Казахстан № 214 «Об утверждении правил проведения мероприятий по профилактике туберкулеза» [226].

2.3.2 Оценка чистоты и концентрации ДНК

Чистоту и концентрацию выделенной ДНК оценивали по соотношению оптической плотности при длинах волн 260 и 280 нм с использованием спектрофотометра Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, США) (Приложение Б, рис. Б.1) [230;240].

Точную концентрацию ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit 4.0 с использованием набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) (Приложение Б, рис. Б.2) [241;242].

Согласно протоколу производителя, в пробирки объемом 0,5 мл вносили 190 мкл рабочего раствора (Working Solution, WS) для стандартов и 198 мкл WS для образцов. Затем добавляли 10 мкл стандартного раствора или 2 мкл исследуемой ДНК соответственно. Смеси тщательно перемешивали на вортексе, инкубировали при комнатной температуре в течение 2 мин, после чего измеряли концентрацию ДНК на флуориметре. Полученные значения использовали для нормализации концентрации ДНК до 0,2 нг/мкл перед этапом подготовки ДНК-библиотек [243]

2.3.3 Подготовка ДНК-библиотек для секвенирования

Приготовление геномных ДНК-библиотек осуществляли с использованием набора Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, США) согласно протоколу производителя (Приложение А, рис. А.4Б). Данная технология основана на одновременной фрагментации геномной ДНК и присоединении адаптерных последовательностей в одной ферментативной реакции (тагментация, tagmentation) [244].

Протокол включал следующие этапы:

1. Тагментация. 5 мкл геномной ДНК (0,2 нг/мкл) смешивали с 10 мкл буфера TD и 5 мкл ферментного комплекса ATM (Amplicon Tagment Mix), после чего инкубировали при 55 °C в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 5 мкл буфера NT.

2. ПЦР-амплификация с добавлением индексов. К тагментированной ДНК добавляли 5 мкл каждого из индексных праймеров (i7 и i5) и 15 мкл мастер-микса NPM. Амплификацию проводили по следующей программе: 72 °C – 3 мин; 95 °C – 30 с; 12 циклов (95 °C – 10 с, 55 °C – 30 с, 72 °C – 30 с); 72 °C – 5 мин.

3. Очистка библиотек. Очистку амплифицированных библиотек выполняли с использованием магнитных частиц AMPure XP (Beckman Coulter, США). К 50 мкл амплифицированной библиотеки добавляли 25 мкл магнитных частиц, тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Пробирки помещали в магнитный штатив на 2 мин до полного осаждения магнитных частиц и просветления раствора, после чего надосадочную жидкость аккуратно удаляли, не затрагивая частицы. Промывку проводили добавлением 200 мкл 80 % этанола без извлечения пробирок из магнитного штатива с последующей инкубацией в течение 30 с. После этого этанол удаляли, не нарушая слой магнитных частиц. Промывку повторяли аналогичным образом. Затем проводили этап сушки частиц на магнитном

штативе в течение 5 минут при комнатной температуре. Элюцию ДНК выполняли в 32 мкл ресуспензионного буфера RSB.

2.3.4 Контроль качества библиотек

Длину фрагментов ДНК-библиотек определяли методом капиллярного электрофореза с использованием анализатора Agilent 5200 Fragment Analyzer (Agilent Technologies, США) и набора реактивов HS NGS Fragment Kit (1–6000 п.н.) (Приложение Б, рис. Б.3). Оценивали размерное распределение фрагментов ДНК; оптимальной считалась библиотека с пиком в диапазоне 300–800 п.н. и средним размером около 550 п.н. (Приложение Б, рис. Б.5-Б.7) [245].

Концентрацию библиотек определяли флуориметрическим методом с использованием набора Qubit dsDNA HS Assay Kit, как описано в разделе 2.3.2.

Для корректной нормализации и объединения библиотек перед секвенированием концентрацию пересчитывали в наномолярные единицы по формуле 1:

$$C(\text{нМ}) = \frac{C(\text{нг/мкл}) \times 10^6}{MW} \quad (1)$$

Где C(нМ) – молярная концентрация ДНК-библиотеки (наномоли). C(нг/мкл) – массовая концентрация ДНК, измеренная на флуориметре Qubit. 10^6 – коэффициент пересчета единиц измерения. MW – молекулярная масса библиотеки, рассчитываемая как произведение средней массы пары нуклеотидов (660 г/моль) на среднюю длину фрагментов (L). L – средний размер фрагментов в парах нуклеотидов (п.н.), где L = A + T + G + C.

Нормализацию библиотек проводили до концентрации 4 нМ. Объединение (pooling) индексированных библиотек осуществляли в эквимолярных количествах для мультиплексного секвенирования согласно протоколу Illumina Nextera XT [243].

2.3.5 Полногеномное секвенирование

Полногеномное секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq (Illumina, США) с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v3 (600 циклов), обеспечивающего парно-концевое секвенирование (paired-end) с длиной ридов 2 × 300 п.н. [243].

Перед загрузкой пул библиотек повергали химической денатурации 0,2 N раствором NaOH. Итоговую загрузочную концентрацию доводили до 8-10 пМ с помощью гибридизационного буфера HT1. Для калибровки сенсоров и оценки частоты ошибок (Error rate) в пул добавляли 5% PhiX Control v3 (Illumina, США) – готовую библиотеку генома вируса PhiX174 с фиксированным GC-составом [243]. Секвенирование выполняли в соответствии с протоколом производителя. Продолжительность запуска составляла около 56 часов (Приложение Б, рис. Б.4).

Целевая глубина покрытия генома составляла не менее 50×, необходимым для высокоточного SNP-анализа [99;196]. Для достижения указанной глубины

покрытия при размере генома 4,4 Мб *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3) и длине ридов 2 × 300 п.н. требовалось не менее 370 000 парных ридов на образец [225;246].

2.4 Биоинформационный анализ

2.4.1 Контроль качества секвенсов

После секвенирования были получены файлы формата FASTQ, содержащие исходные нуклеотидные последовательности (риды) и соответствующие показатели качества (Phred scores) для каждого нуклеотида (Приложение Б, рис. Б.8-Б.10). Контроль качества и предварительная обработка ридов осуществлялись в рамках пайплайна MTBseq (версия 1.0.3), который включает встроенные этапы фильтрации и очистки данных [243;247].

На этапе первичной обработки выполнялись:

- оценка качества нуклеотидных последовательностей;
- удаление низкокачественных участков ридов;
- фильтрация по длине и качеству;
- исключение потенциально артефактных и некорректно секвенированных фрагментов.

Алгоритмы, реализованные в MTBseq, обеспечивают функционально эквивалентные процедуры стандартным инструментам контроля качества, таким как FastQC и Trimmomatic, включая анализ распределения качества по позициям, оценку GC-содержания и удаление технических последовательностей [248;249]. После проведения автоматической фильтрации в последующий анализ включали только риды, удовлетворяющие установленным критериям качества, что обеспечивало надежность дальнейшего выявления SNP и филогенетического анализа.

2.4.2 Анализ филогенетической структуры и мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, на основе данных полногеномного секвенирования с использованием TB-Profiler

Анализ исходных парно-концевых ридов (FASTQ) проводили с использованием программного пакета TB-Profiler (версия 6.6.3) [202]. Перед запуском анализа выполняли стандартизацию имен файлов, включая удаление суффикса _001 из названий FASTQ-файлов. Список образцов формировали автоматически путем извлечения идентификаторов из файлов формата _R1.fastq.gz.

Для каждого образца анализ выполняли в параллельном режиме (до 4 потоков) с использованием команды:

```
tb-profiler profile -1 sample_R1.fastq.gz -2 sample_R2.fastq.gz -p sample
```

Результаты по всем образцам агрегированы с помощью команды:

```
tb-profiler collate
```

Пакет TB-Profiler осуществляет комплексный анализ, включающий:

- картирование ридов на референсный геном *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3);

- выявление однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и малых инделов;
- аннотацию мутаций с актуальной базой данных ВОЗ (Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance, 2nd ed) [250];
- предсказание лекарственной устойчивости;
- определение филогенетической линии и сублинии.

Классификация лекарственной устойчивости проводилась на основе встроенной базы данных мутаций, ассоциированных с резистентностью. Результаты включали определение устойчивости к основным противотуберкулезным препаратам первого и второго ряда, а также категоризацию штаммов (чувствительные, МЛУ, пре-ШЛУ, ШЛУ).

2.4.3 Выявление SNP и подготовка данных для филогенетического анализа

Для получения высококачественного набора SNP и построения множественного выравнивания использовали специализированный пайплайн MTBseq v1.0.3 [146;243].

Анализ выполняли в несколько этапов:

1. Полный анализ (TBfull): MTBseq --step Tbfull. На данном этапе осуществлялись: контроль качества ридов, картирование на референсный геном, выявление SNP, первичная фильтрация вариантов.
2. Объединение результатов (TBjoin): MTBseq --step TBjoin --samples samples.txt --continue MTBseq --step TBjoin --samples samples.txt --continue --threads 8 На этом этапе формировалось: объединенное множественное выравнивание SNP для всех образцов; финальный набор высококачественных вариантов с учетом встроенных фильтров MTBseq (coverage, allele frequency и качество картирования).

В результате был получен файл множественного выравнивания генома: NONE_joint_cf4_cr4_fr75_ph4_samples272_amended_u95_phylo.plainIDs.fasta, содержащий только информативные SNP позиции, общие для всех исследуемых изолятов. Этот файл послужил основой для последующего построения филогенетического дерева и анализа трансмиссии патогена [247;251].

2.4.4 Филогенетический анализ

Для повышения точности филогенетической реконструкции из множественного выравнивания извлекали только вариабельные позиции с использованием программы snp-sites [247]:

snp-sites -o output.varsites.fasta input.fasta

Филогенетическое дерево строили методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) в программе IQ-TREE 2 [252]:

iqtree2 -s output.varsites.fasta -m MFP+ASC -bb 1000 -bnni -nt AUTO

Используемые параметры:

- -m MFP+ASC – автоматический подбор модели замещения нуклеотидов с учетом коррекции по аскертированным сайтам (ascertainment bias correction);

- -bb 1000 – ультрабыстрый бутстреп (1000 репликаций);
- -bnni – оптимизация бутстреп-деревьев;
- -nt AUTO – автоматический выбор числа потоков.

Визуализацию и аннотирование филогенетического дерева (добавление данных о линии лекарственной устойчивости и кластеризации) проводили на платформе iTOL v6 (Interactive Tree Of Life) с применением метода midpoint-rooting для центрирования дерева [253;254].

2.4.5 Расчет генетических расстояний и кластерный анализ

Матрицы попарных SNP-дистанций были получены из выходных файлов MTBseq (директория *Groups*), включая:

- ..._samples272_..._w12.matrix – матрица расстояний;
- ..._samples165_..._w12_d12.groups – кластеризация на основе порога SNP.

Для выделения эпидемиологических кластеров использовали два общепринятых порога:

1. <=12 SNP: критерий принадлежности к единой цепи трансмиссии в долгосрочной перспективе [103].

2. <=5 SNP: критерий недавней (активной) передачи инфекции между пациентами [102;198].

Статистическую обработку матриц выполняли в программе R v4.3.1. Для дальнейшего анализа матрицы преобразовывали с использованием функций as.matrix() и as.dist(). Попарные сравнения формировали путем извлечения нижнего треугольника матрицы (уникальные пары образцов), что позволило исключить дублирование расстояний.

Для визуализации распределения SNP-дистанций применяли пакет ggplot2, используя:

- jitter-графики;
- логарифмическую шкалу (log10);
- пороговые значения 5 и 12 SNP, соответствующие критериям недавней трансмиссии.

Дополнительно проводили:

- внутригрупповой анализ (в пределах одной линии/сублинии);
- стратификацию по филогенетическим линиям *M. tuberculosis*.

2.4.6 Геопространственный анализ и корреляция генетических расстояний

Географические расстояния между местами проживания пациентов рассчитывали на основе матрицы угловых расстояний (в градусах) с последующим преобразованием в километры по формуле 2:

$$d = \theta \times (\pi / 180) \times R \quad (2)$$

Где d – расстояние между местами жительства пациентов (длина дуги по поверхности Земли). θ – угловое расстояние между точками в градусах (разница

координат). R – радиус Земли (среднее значение – 6371 км). π / 180 – коэффициент пересчета градусов в радианы для корректного расчета линейного расстояния. Данный расчет позволяет вычислить кратчайшее расстояние между точками проживания пациентов (длину дуги), учитывая их расположение на сферической поверхности планеты, а не на плоскости [255].

Генетические и географические матрицы синхронизировали по общим идентификаторам образцов. Для оценки связи между генетическими и географическими расстояниями использовали тест Мантеля (Mantel test) с применением пакета vegan [256]:

mantel(snp_matrix, geo_matrix, method = «pearson», permutations = 9999)

Дополнительно для выявление пространственной структуры на разных масштабах проводили тест коррелограммы Мантеля (Mantel correlogram), позволяющий определить, на каком расстоянии генетическое сходство изолятов становится статистически незначимым [257;258], mantel.correlog(...) с параметрами:

- до 70 дистанционных классов;
- 999 перестановок;
- поправка на множественные сравнения (Holm correction);
- использование коэффициентов Пирсона и Спирмена.

Визуализация результатов включала:

- scatter-плот зависимости SNP-дистанции от географического расстояния с линией линейной регрессии;
- коррелограммы Мантеля с выделением статистически значимых интервалов.

2.4.7 Статистический анализ и визуализация результатов

Все статистические расчеты и графическая визуализация выполнялись в среде статистического программирования R v4.3.1 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия) с использованием специализированной экосистемы пакетов Tidyverse [259]. Для импорта, предобработки, очистки и трансформации табличных данных, полученных из информационных систем Damumed и НРБТ, применялись пакеты dplyr и tidyr [259;261].

Анализ данных включал в себя следующие этапы и методы:

1. Дескриптивная статистика:
   - Количественные признаки: в связи с распределением признаков, отличным от нормального (проверялось визуально и аналитически), количественные данные (возраст) представлены в виде медианы (*Me*) и интерквартильного размаха – 25-го и 75-го процентилей (Q1–Q3).
   - Качественные признаки: номинальные и порядковые данные (пол, возрастные группы, клинические формы туберкулеза, профили лекарственной устойчивости) представлены в виде абсолютных частот (n) и относительных долей (процентов, %).
2. Сравнение количественных данных: для оценки различий количественных показателей (возраст) в двух независимых группах (мужчины и женщины)

применялся непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни с расчетом ранговых сумм и стандартизированного значения *Z*-критерия.

3. Анализ номинальных данных: Сравнение распределения частот качественных признаков (структура по полу, возрастным группам и клиническим формам ТБ в сравниваемых группах) проводили с помощью критерия согласия χ^2 (хи-квадрат) Пирсона с указанием числа степеней свободы (*df*). В случаях, когда абсолютные ожидаемые частоты хотя бы в одной ячейке таблицы сопряженности составляли менее 5, для обеспечения корректности расчетов применялся точный критерий Фишера. Для многопольных таблиц сопряженности (размерностью более 2×2) расчет уровня значимости (p-value) для точного критерия Фишера выполнялся с применением симуляции Монте-Карло на основе 10 000 итераций (репликаций).
4. Оценка диагностической эффективности: для оценки аналитической надежности и клинической валидности молекулярно-генетических методов (WGS и Xpert MTB/RIF) в качестве референсного («золотого») стандарта использовались результаты фенотипического тестирования на лекарственную чувствительность (ТЛЧ). Статистический анализ проводился на основе построения стандартных таблиц сопряженности 2×2. С учетом распределения истинноположительных, истинноотрицательных, ложноположительных и ложноотрицательных результатов рассчитывались следующие операционные характеристики:
   - Диагностическая чувствительность (Sensitivity) – доля правильно идентифицированных устойчивых штаммов среди всех изолятов, резистентных по данным фенотипического ТЛЧ;
   - Диагностическая специфичность (Specificity) – доля правильно определенных чувствительных штаммов среди всех изолятов, чувствительных по данным фенотипического ТЛЧ;
   - Общий уровень согласованности (Accuracy) – индекс совпадения, отражающий долю полностью совпавших результатов оцениваемого и референсного методов от общего числа исследованных образцов.
5. Молекулярно-генетический и пространственный анализ: Пакет vegan применялся для проведения пространственно-генетического анализа с использованием теста Мантеля [256]. Для оценки степени клональности доминирующих сублиний *M. tuberculosis* рассчитывались внутригрупповые SNP-дистанции [263].

Для всех видов статистического анализа критический уровень значимости при проверке нулевых гипотез принимался равным $p < 0{,}05$. Различия считались статистически значимыми, если расчетное значение p было меньше данного порога.

Все графические материалы (возрастно-половые пирамиды, скрипичные диаграммы, гистограммы распределения SNP-дистанций) построены с помощью пакета ggplot2 [260] и экспортированы в растровом формате PNG (разрешение 300 dpi), а также в векторном формате PDF.

2.4.8 Этическое одобрение и информированное согласие

Исследование с участием людей было одобрено локальным биоэтическим комитетом Национального научного центра фтизиопульмонологии Республики Казахстан (протокол ЕРМ № 2021-63 от 07.07.2021). Все процедуры проводились в соответствии с действующим законодательством Республики Казахстан и внутренними требованиями учреждения [226].

От всех участников исследования и/или их законных представителей было получено информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Персональные данные участников были обезличены на всех этапах исследования, что обеспечивало соблюдение принципов конфиденциальности и защиты частной информации.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Клинико-эпидемиологическая структура выборки

В исследование были включены пациенты с подтвержденным туберкулезом, у которых до начала лечения был получен клинический материал для последующего геномного анализа *Mycobacterium tuberculosis*. Отбор образцов проводился в течение двух лет – с января 2023 года по декабрь 2024 года – в соответствии с критериями включения и исключения, представленными в разделе «Материалы и методы».

Всего в итоговый анализ вошло 272 образца *M. tuberculosis*, полученных от 272 пациентов. Для всех пациентов были собраны клинико-демографические данные, включающие возраст, пол, место проживания, клиническую форму туберкулеза, ВИЧ-статус и анамнез заболевания (таблица 1).

Таблица 1 – Демографические данные и клинические характеристики пациентов, инфицированных туберкулезом

Характеристики	Всего (n=272) n (%)	Новый случай (n=217) n (%)	Повтор (n=39) n (%)
Пол			
Мужчины	156 (57,4)	120 (55,3)	22 (56,4)
Женщины	116 (42,6)	97 (44,7)	17 (43,6)
Возрастные группы			
<18	28 (10,3)	26 (12,0)	2 (5,1)
18-30	61 (22,4)	51 (23,5)	6 (15,4)
31-40	50 (18,4)	39 (18,0)	8 (20,5)
41-50	56 (20,6)	42 (19,4)	9 (23,1)
51-60	33 (12,1)	25 (11,5)	9 (23,1)
>60	44 (16,2)	34 (15,7)	5 (12,8)
Национальность			
Казахи	198 (72,8)	164 (75,6)	30 (76,9)
Другие нации*	74 (27,2)	53 (24,4)	9 (23,1)
Клиническая формы			
ТБ легких	228 (83,8)	178 (82,0)	36 (92,3)
Внелегочной ТБ	44 (16,2)	39 (18,0)	3 (7,7)

Продолжение таблицы 1

Сопутствующие заболевания			
ВИЧ	24 (8,8)	21 (9,7)	3 (7,7)

Примечания: *К категории «Другие нации» отнесены пациенты всех национальностей, кроме казахов;
Из таблицы исключены 16 случаев. У 2 пациентов зарегистрирована неудача предыдущего лечения (не подходящая под критерии нового случая или классического рецидива), а для 14 пациентов медицинские данные об истории заболевания отсутствовали.

На основании анамнестических данных пациенты были распределены по характеру течения туберкулезного процесса. Основную группу составили новые случаи – 217 (79,8%) человек (таблица 1). Рецидив заболевания был зарегистрирован у 39 (14,3%) пациентов, а возобновление лечения после прерывания или неэффективности предыдущей терапии – у 2 (0,7%) человек. У 14 (5,2%) пациентов сведения об истории заболевания отсутствовали вследствие недостаточности медицинской документации.

Среди клинических форм преобладал легочный туберкулез, диагностированный у 228 (83,8%) пациентов. Внелегочные формы были выявлены в 44 (16,2%) случаях (таблица 1). Все включенные случаи относились к активному туберкулезу, что соответствует целям исследования, направленного на анализ циркулирующих штаммов *M. tuberculosis*.

При детальном анализе структуры легочных форм (n = 228) установлено, что наибольшую долю занимал инфильтративный туберкулез легких (ИТЛ) – 147 (64,5%) случаев. Доля фиброзно-кавернозного туберкулеза (ФКТЛ) составила 10,1% (n = 23), диссеминированного (ДТЛ) – 5,7% (n = 13), очагового (ОТЛ) – 3,5% (n = 8). Прочие формы, включая генерализованный и милиарный туберкулез, казеозную пневмонию, туберкулому и поствакцинальные осложнения БЦЖ, в совокупности составили 16,2% (n = 37) (рисунок 8).

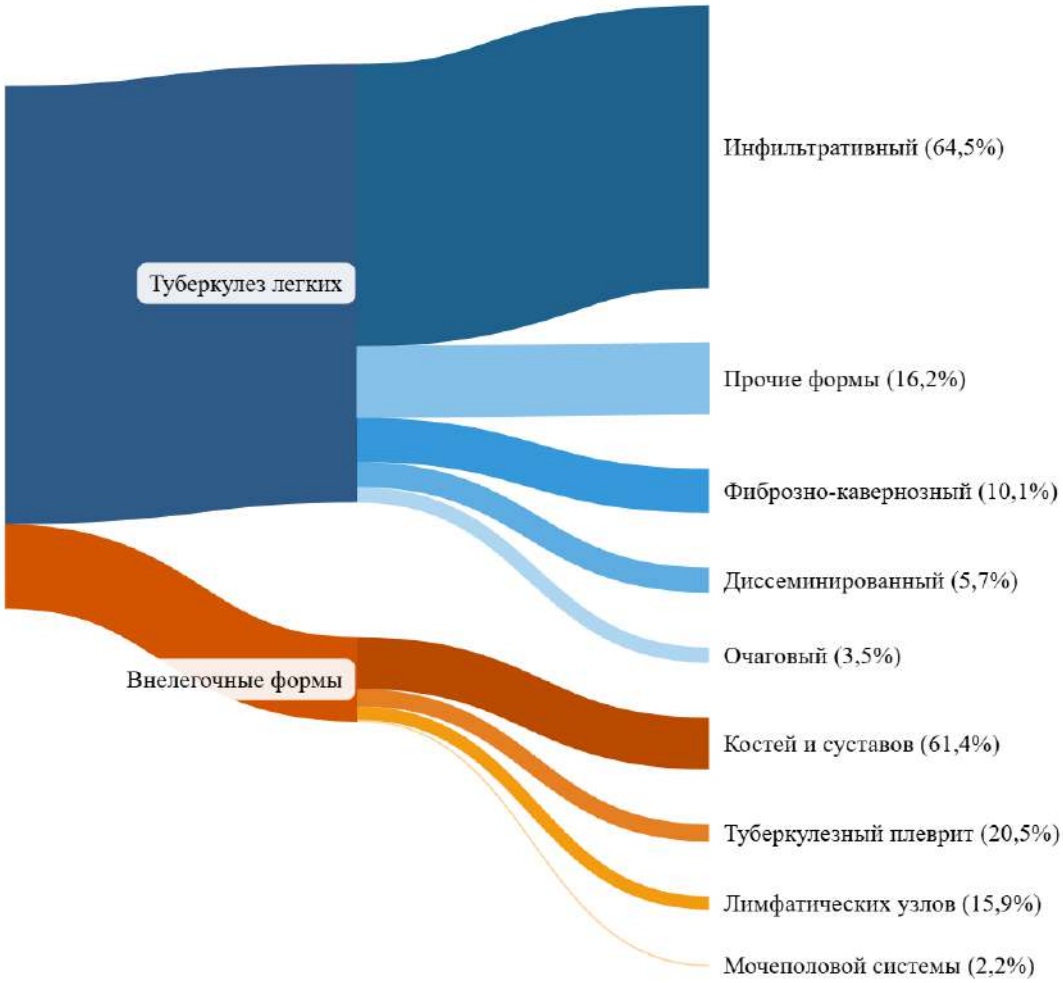


Рисунок 8 – Структура клинико-рентгенологических форм туберкулеза среди обследованных пациентов (n=272), включенных в исследуемую выборку

Сравнительный анализ полученных данных с глобальными и региональными показателями показывает, что структура клинических форм туберкулеза в исследуемой выборке в целом соответствует мировым тенденциям, однако имеет ряд особенностей. По данным Всемирной организации здравоохранения, легочные формы туберкулеза составляют около 80–85% всех случаев заболевания, что сопоставимо с результатами настоящего исследования (83,8%). Доля внелегочных форм в мире варьирует в пределах 15–20%, что также близко к полученному значению (16,2%) [224;264].

В то же время высокая доля инфильтративного туберкулеза легких (64,5%) отражает особенности структуры заболеваемости в странах с высоким бременем туберкулеза, включая государства Центральной Азии. Согласно данным региональных исследований, в Казахстане и соседних странах инфильтративная форма является доминирующей и может превышать 60% среди впервые выявленных случаев, что связано с активной трансмиссией возбудителя и поздней диагностикой заболевания [265].

Доля фиброзно-кавернозных форм (10,1%) также соответствует данным регионов с высоким уровнем лекарственной устойчивости, где хронические формы заболевания встречаются чаще вследствие неэффективного или прерванного лечения [265;266].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что структура клинических форм туберкулеза в исследуемой выборке отражает как глобальные закономерности, так и региональные эпидемиологические особенности, характерные для Казахстана.

3.1.1 Социально-демографический профиль

Анализ возрастных характеристик исследуемой группы (n = 272) выявил широкий возрастной диапазон у пациентов. Минимальный возраст на момент постановки диагноза составил 5 месяцев, максимальный – 87 лет. С учетом характера распределения данных в качестве основных дескриптивных показателей использовались медиана и межквартильный интервал (таблица 2).

Таблица 2 – Медианный возраст пациентов

Показатель	Единица измерения	M ± SD	Me	Q1-Q3	N	Min	Max
Возраст	Лет	40,6 ± 18,1	40	26 - 53	272	5 мес	87
Примечание: Минимальный возраст пациентов составил 5 месяцев, максимальный – 87 лет. M ± SD приведено для справки, медиана (Me) и квартильный размах (Q1–Q3) отражают распределение возрастов в выборке.							

Медианный возраст пациентов составил 40 [Q1–Q3: 26–53] лет, среднее значение (M ± SD) – 40,6 ± 18,1 лет. Наличие в выборке как детей первого года жизни, так и лиц пожилого и старческого возраста отражает ее неоднородность. При этом половина пациентов (межквартильный размах) сосредоточена в возрастном интервале 26–53 лет, что соответствует периоду наибольшей социальной и трудовой активности населения [1;224;264].

Сравнительный анализ возрастно-половых пирамид (рисунок 9) показывает, что структура исследуемой группы отличается от демографического профиля населения Казахстана. В выборке преобладают мужчины трудоспособного и пожилого возраста, особенно в интервалах 35–54 и 65–74 года, что соответствует известным эпидемиологическим особенностям туберкулеза [1;224;264].

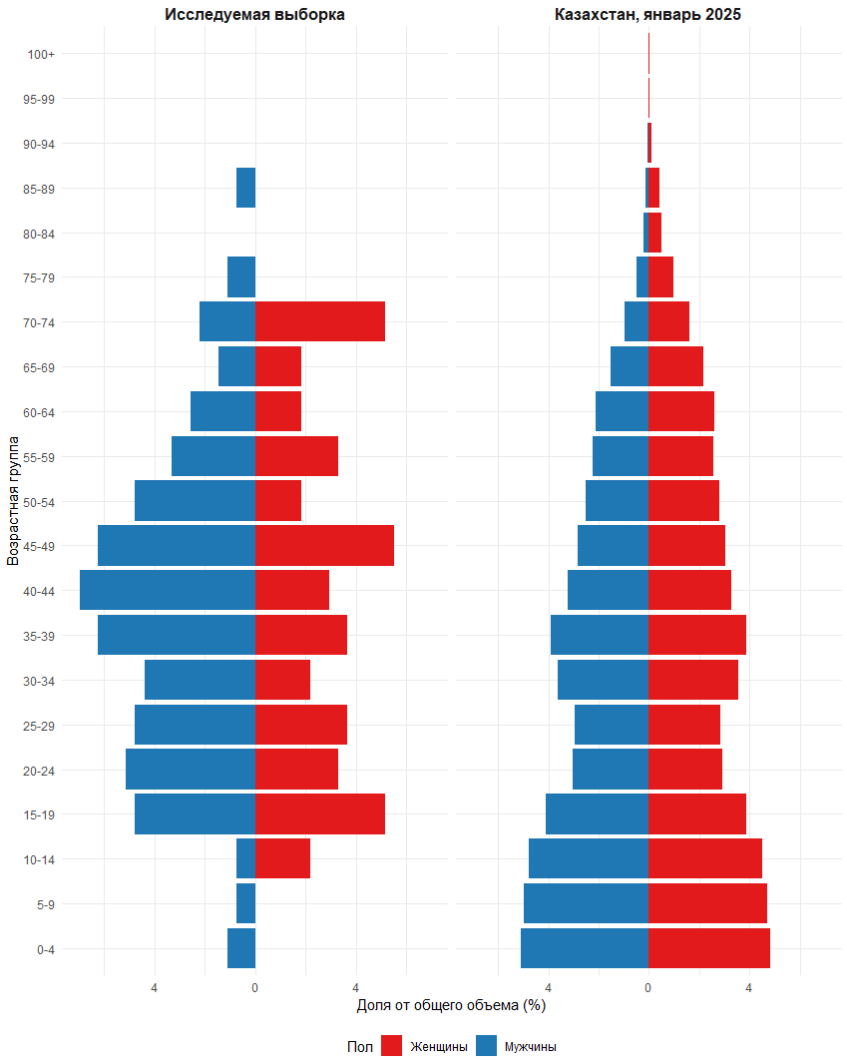


Рисунок 9 – Сравнение возрастно-половой структуры исследуемой выборки и населения Казахстана на январь 2025 года, в процентном выражении

Анализ полового состава выявил преобладание мужчин – 156 (57,4%) против 116 (42,6%) женщин. Соотношение мужчин и женщин составило 1,3:1, что соответствует данным о более высокой заболеваемости туберкулезом среди мужского населения [1;224;264].

Согласно данным таблицы 3, медианный возраст составил 40 [Q1–Q3: 26–51] лет у мужчин и 42 [Q1–Q3: 25–56] года у женщин. Визуализация распределения в виде возрастно-половой пирамиды (рисунок 9) подтверждает концентрацию случаев заболевания в группах трудоспособного возраста. Возраст пациентов сравнивался между мужчинами (n = 156) и женщинами (n = 116) с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Суммы рангов составили 20955 и 16173 соответственно. Рассчитанное значение U-критерия составило 8709, Z = −0,53. Статистически значимых различий по возрасту между группами не выявлено (p = 0,597) (таблица 3; рисунок 10).

Таблица 3 – Сравнительная характеристика возраста пациентов в зависимости от пола (среднее значение, стандартное отклонение, медиана и межквартильный размах)

Пол	Возраст, лет			*p*
	M ± SD	Me	Q1-Q3	
Мужчины	39,9 ± 17,6	40	26-51	0,597
Женщины	41,5 ± 18,7	42	25-56	
Примечание: M – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение; Me – медиана; Q1–Q3 – межквартильный размах; *p* – эмпирический уровень статистической значимости (рассчитан с помощью U-критерия Манна–Уитни). Критический уровень значимости принят равным 0,05 (различия признаются статистически значимыми при p<0,05).				

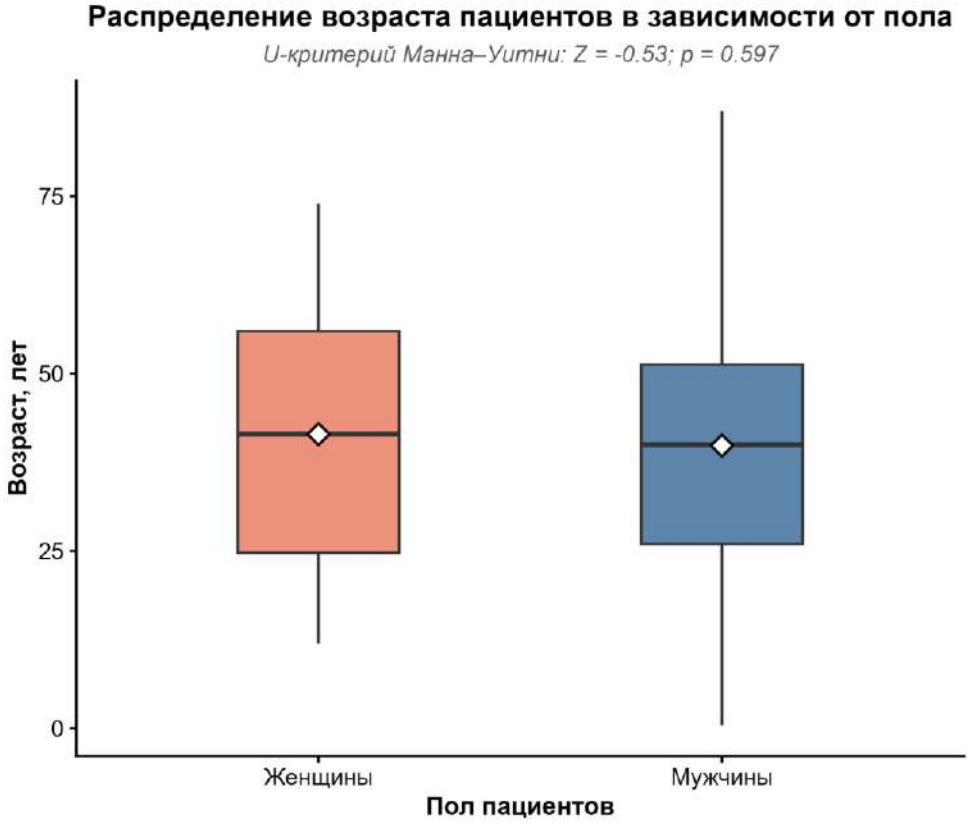


Рисунок 10 – Распределение возраста пациентов в зависимости от пола (диаграмма размаха / box plot)

Распределение пациентов по возрастным группам в зависимости от пола представлено в таблице 4. Выделение возрастных групп (0–17, 18–30, 31–40, 41–50, 51–60, ≥61 лет) основано на учете ключевых этапов жизненного цикла и связанных с ними социально-эпидемиологических различий, влияющих на риск инфицирования и течение туберкулеза. В обеих группах наибольшую долю составляют лица молодого возраста (18–30 лет): среди мужчин – 23,1% (n = 36), среди женщин – 21,6% (n = 25). Сравнительный анализ частот с использованием критерия χ^2 Пирсона не выявил статистически значимых различий между группами ($\chi^2 = 5,91$; df = 5; p = 0,315) (таблица 4).

Таблица 4 – Распределение пациентов по возрастным группам в зависимости от пола, абс. (%)

Пол	Число пациентов в возрастной группе, абс. (%)						*p*
	0-17	18-30	31-40	41-50	51-60	Старше 60	
Мужчины	13 (8,3)	36 (23,1)	33 (21,2)	34 (21,8)	20 (12,8)	20 (12,8)	0,315
Женщина	15 (12,9)	25 (21,6)	17 (14,7)	22 (18,9)	13 (11,2)	24 (20,7)	
Примечание: *p* – эмпирический уровень статистической значимости (рассчитан с помощью критерия χ^2 Пирсона). Критический уровень значимости принят равным 0,05 (различия признаются статистически значимыми при $p < 0,05$).							

Несмотря на визуальные различия в распределении, в частности, более высокая доля женщин старше 60 лет и мужчин в возрасте 31–50 лет, статистически значимых различий между группами не выявлено ($p>0,05$), что свидетельствует об однородности выборки по возрастному признаку.

3.1.2 Географическое распределение пациентов

Пациенты, включенные в исследование, представляли различные административно-территориальные единицы Республики Казахстан (рисунок 11). Несмотря на то, что сбор биологического материала осуществлялся на базе единого научного центра, география фактического проживания обследуемых охватывала практически всю территорию страны.

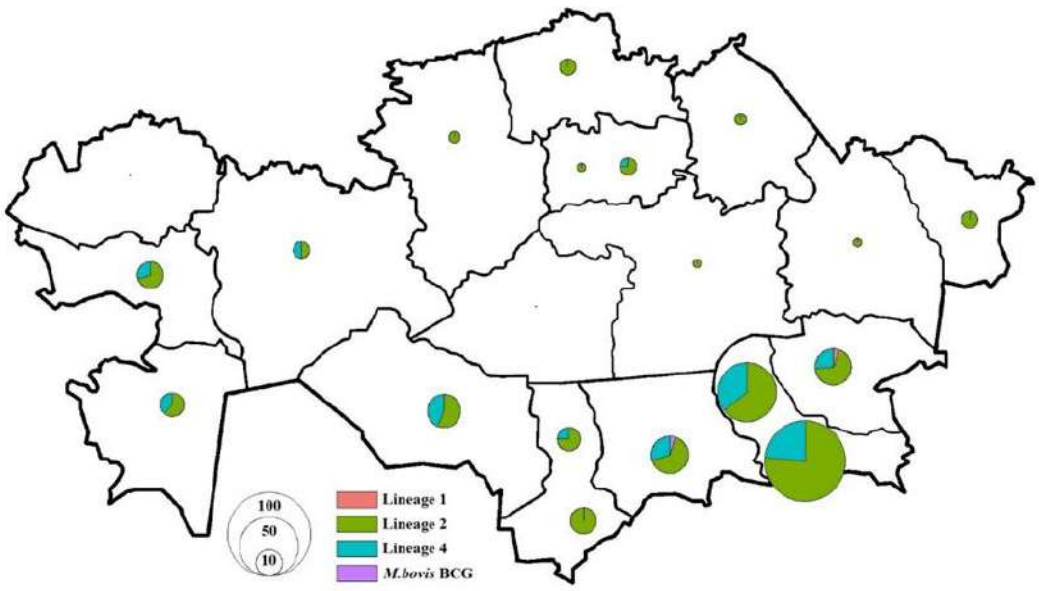


Рисунок 11 – Территориальное распределение обследованных пациентов по областям и городам республиканского значения Республики Казахстан, размер диаграмм пропорционален численности выборки. Размер круговых диаграмм пропорционален численности выборки, а цветовые сектора отражают принадлежность изолятов к филогенетическим линиям *M. tuberculosis*: Lineage

1 (красный), Lineage 2 (зеленый), Lineage 4 (голубой) и *M. bovis* BCG (фиолетовый)

Наибольшую долю составили жители Алматинского региона (г. Алматы и Алматинская область) – 53% от общего объема выборки. Преобладание данной группы обусловлено расположением клинической базы исследования, а также устойчивым потоком пациентов, направляемых из указанных регионов для уточнения диагноза и проведения специализированного лечения. Доля пациентов из других регионов Республики Казахстан составила 47%.

Распределение изученных изолятов *M. tuberculosis* на картограмме (рисунок 11) подтверждает, что в исследование были включены пациенты из западных, восточных, северных и южных регионов страны. Таким образом, концентрация пациентов в одном экспертном центре позволила провести анализ генетического разнообразия *M. tuberculosis* в масштабе всей республики.

Распределение пациентов по регионам постоянного проживания характеризуется широким территориальным охватом при выраженной концентрации в южных и юго-восточных регионах (таблица 5).

Таблица 5 – Географическая характеристика регионов Республики Казахстан, показатели заболеваемости туберкулезом и распределение изолятов *M. tuberculosis*

Регион	Внешняя граница	Площадь, тыс. км²	Население, тыс. чел. (на 01.01.2025)	Заболеваемость ТБ, на 100 тыс. (2024)	Изоляты *M. tuberculosis*, кол-во
г. Алматы	-	0,68	2337	21,4	94
Алматинская обл.	Китай, Киргизстан	105	1586	35,2	50
Жамбылская обл.	Киргизстан	144	1216	32,6	20
Жетысуская обл.	Китай	118	688,9	37,9	19
Кызылординская обл.	Узбекистан	226	845,8	45,1	16
г. Шымкент	-	1,16	1286	23,8	10
Атырауская обл.	Россия	118	714,2	44,5	10
Мангистауская обл.	Туркменистан, Узбекистан	165	815,9	36,0	8
Туркестанская обл.	Узбекистан	116	2148	24,0	8
г. Астана	-	0,79	1612	34,2	4

Продолжение таблицы 5

Актюбинская обл.	Россия, Узбекистан	300	954,4	36,3	4
Восточно-казахстанская обл.	Россия, Китай	97,8	720,1	40,9	4
Северо-казахстанская обл.	Россия	97,9	515,9	35,7	4
Костанайская обл.	Россия	196	822,3	39,1	2
Павлодарская обл.	Россия	124	746,6	39,3	2
Абайская обл.	Россия, Китай	185	597,2	37,0	1
Акмолинская обл.	-	146	788,6	34,4	1
Карагандинская обл.	-	239	1131	35,0	1
Пациенты без постоянного места жительства*					14
Общий итог		2724	20445	33,4	272
Примечание: * пациенты без постоянного места жительства (n=14) включены в общий итог, но не распределены по регионам.					

Южные и юго-восточные регионы составили основу выборки. Помимо Алматинского региона (г. Алматы и Алматинская область – 144 штамма), значительное представительство имели Жамбылская (n = 20), Жетысуская (n = 19), Туркестанская (n = 8) области, а также г. Шымкент (n = 10) и Кызылординская область (n = 16). В совокупности на долю указанных регионов приходится более 80% всех исследованных образцов, что может быть обусловлено как высокой плотностью населения, так и особенностями маршрутизации пациентов в противотуберкулезный центр [46;267].

Западный Казахстан представлен Атырауской (n = 10), Мангистауской (n = 8) и Актюбинской (n = 4) областями. Центральные, северные и восточные регионы страны (включая г. Астана, Павлодарскую, Костанайскую, Акмолинскую, Северо-Казахстанскую, Карагандинскую, Абайскую и Восточно-Казахстанскую области) характеризуются меньшим числом наблюдений – от 1 до 4 образцов на регион (Приложение В, таблица В.1).

В исследуемой выборке отсутствовали пациенты из Западно-Казахстанской и Улытауской областей. Отдельную категорию составили лица без определенного места жительства (n = 14; 5,1%), географическую принадлежность которых установить не представилось возможным.

Для оценки репрезентативности исследуемой выборки и сопоставления с общей эпидемиологической ситуацией по туберкулезу в Казахстане был

проведен сравнительный анализ основных показателей заболеваемости, распространенности и доли МЛУ-ТБ (таблица 6; Приложение В, таб. В.1).

Таблица 6 – Сравнение показателей исследуемой выборки и официальной статистики по туберкулезу в Республике Казахстан (2023–2024 годы) [268]

Регион	Период	Исследуемая выборка (n=272)		Статистические данные по стране	
		НС / Рецидив	из них МЛУ-ТБ	Заболеваемость (НС) / Распространенность (НС+Рецидив)	МЛУ-ТБ
Республика Казахстан	2023	143 / 22	49	6899 / 9354	1775
	2024	90 / 17	41	6740 / 8987	1606
	Всего	233 / 39	90	13639 / 18341	3381
Алматинская обл.	2023	31 / 2	7	581 / 694	144
	2024	14 / 3	9	543 / 659	141
	Всего	45 / 5	16	1124 / 1353	285
г. Алматы	2023	60 / 9	22	484 / 619	110
	2024	34 / 5	15	484 / 602	114
	Всего	94 / 14	37	968 / 1221	224
Примечание: В группу г. Алматы включены 14 пациентов без определенного места жительства, выявленных и проходивших лечение в научном центре. Дополнительно 16 пациентов (14 пациентов без постоянного места жительства и 2 пациента с неудачей лечения) включены в категорию новых случаев (НС) при расчете общих показателей.					

Полученные данные демонстрируют, что доля случаев МЛУ-ТБ в исследуемой выборке остается сопоставимой с общенациональными показателями, однако наблюдается определенная концентрация случаев в г. Алматы и Алматинской области. Это может отражать как особенности направления пациентов для диагностики в ННЦФ, так и возможную локальную активную передачу устойчивых штаммов в данном регионе.

Анализ представленных данных показывает, что, несмотря на количественное преобладание пациентов из южных регионов, в исследование включены штаммы из территорий, имеющих внешние границы с Российской Федерацией, Китаем, Узбекистаном, Кыргызстаном и Туркменистаном (таблица 5). Это позволяет рассматривать полученную выборку как условно репрезентативную для оценки популяционной структуры *M. tuberculosis* на национальном уровне.

Вместе с тем следует отметить, что исследуемая выборка характеризуется географической неравномерностью, обусловленной доступностью клинического

материала и логистическими особенностями проведения секвенирования. В связи с этим полученные результаты отражают распределение образцов в рамках данного исследования и не подлежат прямой экстраполяции на всю популяцию пациентов с туберкулезом в Республике Казахстан.

3.1.3 Клиническая характеристика и анамнез заболевания

Распределение пациентов по характеру течения специфического процесса основывалось на анализе их анамнестических данных. В структуре клинических проявлений ожидаемо превалировал туберкулез органов дыхания с локализацией процесса в легких – он был диагностирован в 83,8% случаев (n=228). На долю внелегочных поражений пришлось 16,2% (n=44) от общего числа обследованных. Важно подчеркнуть, что все включенные в анализ случаи относились к активным формам туберкулеза, что полностью соответствует критериям отбора для последующего геномного профилирования циркулирующих штаммов *M. tuberculosis*. Подробная дифференциация выявленных случаев с учетом нозологических и рентгенологических вариантов представлена на рисунке 11 и в таблице 7. Оценка структуры изолированных легочных поражений (n=228) продемонстрировала абсолютное доминирование инфильтративного туберкулеза (ИТЛ), доля которого составила 64,5% (147 случаев). На хронические деструктивные процессы, представленные фиброзно-кавернозной формой (ФКТЛ), пришлось 10,1% (n=23). Диссеминированный (ДТЛ) и очаговый (ОТЛ) туберкулез легких верифицировался существенно реже – в 5,7% (n=13) и 3,5% (n=8) наблюдений соответственно. Остальные клинические варианты, включая казеозную пневмонию, генерализованные процессы, туберкуломы и поствакцинальные осложнения БЦЖ, были объединены в группу «прочие», суммарный удельный вес которых составил 16,2% (n=37) (рисунок 8, таблица 7).

Таблица 7 – Распределение случаев туберкулеза по клинико-рентгенологическим формам и локализации поражения

Формы туберкулеза	Клиническая форма	Абс. число (%)
Легочные	Диссеминированный	13 (5,7)
	Очаговый	8 (3,5)
	Инфильтративный	147 (64,5)
	Фиброзно-кавернозный	23 (10,1)
	Прочие	37 (16,2)
Внелегочные	Плеврит	9 (20,5)
	Костно-суставной	27 (61,4)
	Лимфатические узлы	7 (15,9)

Продолжение таблицы 7

	Мочеполовой	1 (2,2)
Итого легочные формы туберкулеза		228 (83,8)
Итого внелегочные формы туберкулеза		44 (16,2)
Всего		272

При анализе структуры клинических форм туберкулеза в зависимости от возрастных групп выявлено наличие достоверной связи между возрастом пациентов и распределением клинических форм туберкулеза (точный критерий Фишера с симуляцией Монте-Карло, p = 0,009) (таблица 8). Дополнительно была изучена зависимость между возрастом и локализацией туберкулезного процесса (легочная vs внелегочная), где выявлена статистическая тенденция к зависимости (p = 0,058).

В структуре заболеваемости во всех возрастных группах преобладал инфильтративный туберкулез легких, на долю которого пришлось 147 случаев. Выявленные статистические показатели отражают важные клинические закономерности. Фиброзно-кавернозный туберкулез наиболее часто регистрировался в возрастной группе 41–50 лет (n = 8), что может указывать на преобладание процессов хронизации у лиц трудоспособного возраста [265;266].

В возрастной группе старше 60 лет наблюдалось увеличение доли внелегочных форм по сравнению с остальными возрастными группами. В частности, у пациентов данной когорты отмечалась относительно высокая частота костно-суставного туберкулеза (11 случаев). Этот факт, в сочетании с данными литературы о снижении иммунологической реактивности в пожилом возрасте [197;234], позволяет рассматривать возраст как фактор, способствующий диссеминации туберкулезного процесса.

У лиц моложе 30 лет несколько чаще встречались плевриты и другие редкие формы заболевания, однако данные различия следует рассматривать как описательные тенденции (таблица 8). Распределение других клинических форм носило неоднородный характер без выраженных различий между возрастными группами.

Таблица 8 – Распределение клинико-рентгенологических форм туберкулеза легких и внелегочных форм по возрастным группам пациентов

Возрастные группы	Легочные формы туберкулеза, абс. число					Внелегочные формы туберкулеза, абс. число			
	ДТЛ	ОТЛ	ИТЛ	ФКТЛ	Прочие	Плеврит	Костно-суставной	ЛУ	МП
0-17	0	1	19	0	4	3	2	0	0
18-30	2	4	31	3	10	3	4	3	0

Продолжение таблицы 8

31-40	4	0	33	5	3	0	4	0	1
41-50	5	1	27	8	10	1	4	0	0
51-60	1	2	13	4	8	1	2	2	0
Старше 60	1	0	24	3	2	1	11	2	0
Всего	13	8	147	23	37	9	27	7	1

Примечание: ДТЛ, ОТЛ, ИТЛ, ФКТЛ – формы туберкулеза легких; ЛУ – туберкулез лимфатических узлов; МП – туберкулез мочеполовых органов; Сравнение распределения клинических форм между возрастными группами проводилось с использованием точного критерия Фишера с симуляцией Монте-Карло (p = 0,009). Оценка связи локализации процесса (легочная vs внелегочная) с возрастом пациентов также выполнена с применением точного критерия Фишера с симуляцией Монте-Карло (p = 0,058).

Неоднородность клинической картины туберкулеза в различных возрастных группах, что указывает на необходимость дифференцированного подхода к диагностике, особенно у пациентов старших возрастных категорий [266;269]. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии выраженной зависимости клинической картины заболевания от возраста пациентов, при этом наблюдаемые различия носят описательный характер и могут требовать дополнительного изучения в более крупных выборках.

3.1.4 ВИЧ-статус пациентов

Информация о ВИЧ-статусе была доступна для 257 (94,5%) пациентов. ВИЧ-инфекция выявлена у 24 (9,3%) обследованных, тогда как у 233 (90,7%) пациентов ВИЧ-статус был отрицательным (таблица 9). Сравнительная характеристика пациентов в зависимости от ВИЧ-статуса представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Сравнительная характеристика клинико-эпидемиологических показателей у ВИЧ-негативных и ВИЧ-позитивных пациентов с туберкулезом

Показатель	Вич негативные (n=233)		ВИЧ-позитивные (n=24)		*p*
	Абс.	%	Абс.	%	
Пол					
Мужчины	126	54,1	17	70,8	0,116
Женщины	107	45,9	7	29,2	
Возрастные группы, лет					
0-17	28	12,0	0	0	0,025
18-30	54	23,2	2	8,3	

Продолжение таблицы 9

31-40	38	16,3	9	37,5	
41-50	46	19,7	8	33,4	
51-60	30	12,9	2	8,3	
Старше 60	37	15,9	3	12,5	
Клинические формы туберкулеза					
ДТЛ	8	3,4	5	20,8	0,0035
ОТЛ	6	2,6	2	8,3	
ИТЛ	125	53,7	10	41,7	
ФКТЛ	23	9,9	0	0	
Прочие формы ТБ легких	31	13,3	6	25,0	
Плеврит	9	3,8	0	0	
Костно-суставной	23	9,9	1	4,2	
Лимфатические узлы	7	3,0	0	0	
Мочеполовой	1	0,4	0	0	
Примечание: *p* – эмпирический уровень статистической значимости. Для показателя «Пол» расчет производился с помощью критерия χ^2 Пирсона. Для показателей «Возрастные группы» и «Клинические формы туберкулеза», в связи с невыполнением правила Кохрана, расчет *p* производился с использованием точного критерия Фишера. Критический уровень значимости принят равным 0,05 (различия признаются статистически значимыми при $p < 0,05$).					

При сравнительном анализе групп установлено, что распределение по полу не имело статистически значимых различий ($\chi^2 = 2,48$; $df = 1$; $p = 0,116$). Это указывает на сопоставимость групп по половому признаку.

Анализ возрастного состава показал наличие статистически значимых различий между группами (точный критерий Фишера с симуляцией Монте-Карло, $p = 0,0219$), что свидетельствует о неоднородности возрастной структуры сравниваемых групп. В группе ВИЧ-позитивных пациентов отсутствовали лица детского и подросткового возраста (0–17 лет). Наибольшая доля случаев коинфекции приходилась на возрастные категории 31–40 лет (37,5%; $n = 9$) и 41–50 лет (33,3%; $n = 8$), что соответствует наиболее социально активным возрастным группам [46;265;267]. В группе ВИЧ-негативных пациентов

возрастное распределение было более равномерным, с сохранением значительной доли лиц старших возрастных категорий и детей.

Наиболее выраженные различия выявлены при анализе структуры клинических форм туберкулеза (точный критерий Фишера с симуляцией Монте-Карло, p = 0,0117), что указывает на статистически значимую зависимость распределения клинических форм от сравниваемых групп. У ВИЧ-инфицированных пациентов отмечена более высокая частота диссеминированного туберкулеза легких (ДТЛ) – 20,8% (n = 5) по сравнению с 3,4% (n = 8) у ВИЧ-отрицательных лиц. В группе коинфекции отсутствовали случаи фиброзно-кавернозного туберкулеза, что может быть связано с быстрым прогрессированием заболевания на фоне иммунодефицита и преобладанием острых форм течения [270;271].

Доля инфильтративного туберкулеза легких у ВИЧ-позитивных пациентов составила 41,7% (n = 10), что ниже аналогичного показателя у ВИЧ-негативных лиц (53,6%; n = 125). Полученные данные согласуются с представлениями о влиянии ВИЧ-инфекции на клинические проявления туберкулеза, включая более частое развитие генерализованных и атипичных форм заболевания [270;271].

В рамках настоящего исследования наличие ВИЧ-инфекции рассматривалось как потенциальный фактор, влияющий на клиническое течение туберкулеза. При этом представленные данные носят описательный характер и не включают углубленного анализа причинно-следственных ассоциаций.

Таким образом, выявленные особенности указывают на различия клинического течения туберкулеза в зависимости от ВИЧ-статуса пациентов, что необходимо учитывать при интерпретации результатов и планировании лечебно-диагностических мероприятий.

В итоге исследуемая выборка характеризуется преобладанием пациентов трудоспособного возраста, мужского пола и лиц с легочными формами туберкулеза. Географическое распределение образцов демонстрирует доминирование Алматинского региона (г. Алматы и Алматинская область), что следует учитывать при интерпретации последующих результатов.

Полученные клинико-демографические характеристики формируют основу для дальнейшего анализа генетической структуры популяции M. tuberculosis, представленного в последующих разделах.

Полученные данные о преобладании мужчин (57,4%) и лиц трудоспособного возраста (медиана 40 лет) согласуются с официальной статистикой и глобальными эпидемиологическими тенденциями [1;224;264]. Высокая доля новых случаев (79,8%) может свидетельствовать о продолжающейся активной трансмиссии возбудителя в популяции, а не только о реактивации латентной инфекции [1;272].

Особого внимания заслуживает выявленная связь между возрастом и клинической формой заболевания (таблица 8). Увеличение частоты костно-суставных форм у лиц старше 60 лет может быть связано с возрастными изменениями иммунной системы и затрудненной диагностикой внелегочных форм туберкулеза в данной возрастной группе [273;274]. В связи с этим

адаптация программ скрининга с учетом возрастных особенностей может способствовать более раннему выявлению заболевания.

3.2 Первичная обработка и контроль качества данных полногеномного секвенирования (WGS)

Первоначально в анализ было включено 446 клинических образцов *M. tuberculosis*, полученных в ходе диагностики туберкулеза в 2023–2024 годах.

После проведения первичного контроля качества (quality control) из выборки были исключены 14 дублирующих изолятов, полученных от одних и тех же пациентов. Таким образом, для полногеномного секвенирования (WGS) было отобрано 432 репрезентативных изолята *M. tuberculosis*.

WGS было выполнено для 295 образцов, тогда как 137 изолятов не были секвенированы. Основными причинами исключения являлись отсутствие роста культуры на плотной питательной среде Левенштейна–Йенсена, вероятно связанное с деградацией клинического материала, слабым ростом микобактерий или контаминацией [275].

Дополнительно 23 образца были исключены из анализа вследствие недостаточной глубины покрытия генома (<50×) после WGS, что не обеспечивает надежного выявления однонуклеотидных полиморфизмов.

В результате в итоговый анализ были включены 272 (63,0%) клинических изолята *M. tuberculosis*, для которых были получены данные надлежащего качества (рисунок 12). Полные геномные последовательности всех клинических изолятов *M. tuberculosis*, использованных в исследовании, размещены в международной базе данных NCBI (GenBank) под номером проекта PRJNA1277026.

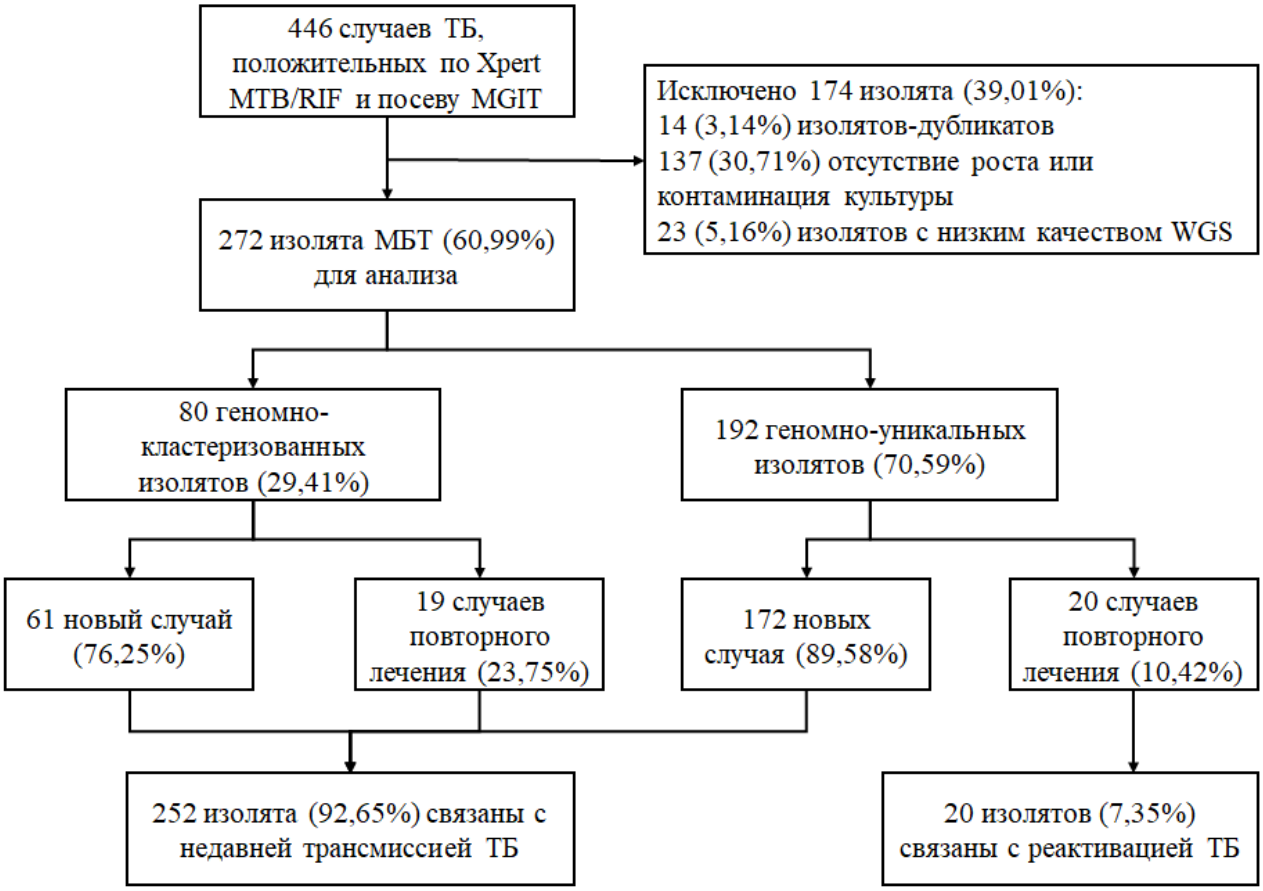


Рисунок 12 – Характеристика исследуемой группы изолятов *M. tuberculosis*: формирование выборки и дифференциация изолятов на основе данных полногеномного секвенирования (WGS)

Средняя медианная глубина прочтения для 272 образцов составила 93,7× (диапазон: 50–248×). Широта покрытия референсного генома *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3) в среднем составила 99,3%, что является достаточным уровнем для достоверного выявления однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и проведения последующего филогенетического анализа [103;201;276].

3.3 Филогенетическая структура и генетическое разнообразие *M. tuberculosis*

3.3.1 Распределение клинических изолятов *M. tuberculosis* по филогенетическим линиям и сублиниям

В результате полногеномного секвенирования (WGS) клинических изолятов *M. tuberculosis* была проведена оценка генетического разнообразия циркулирующих штаммов. Полученные данные позволили реконструировать филогенетическую структуру популяции возбудителя, идентифицировать доминирующие линии и сублинии, а также охарактеризовать их распределение в исследуемой выборке.

Установлено, что популяция *M. tuberculosis* характеризуется выраженной генетической гетерогенностью, что согласуется с данными международных исследований и отражает особенности молекулярной эпидемиологии туберкулеза в регионе [277].

Основную долю выборки составили штаммы линии 2 (East-Asian/Beijing) – 197 из 272 (72,4%), представленные преимущественно генотипом Beijing. Линия 4 (Euro-American) была представлена 73 изолятами (26,8%). Кроме того, в выборке выявлены единичные представители линии 1 (n = 1) и вакцинного штамма BCG (n = 1) (таблица 10).

Таблица 10 – Структура циркулирующих генетических линий и сублиний *Mycobacterium tuberculosis* в исследуемой выборке

Линия / Сублиния	Абс. число (n)	Уд. вес (%)
Линия 2, генотип Beijing	**197**	**72,4**
Central Asia	97	35,7
Central Asia outbreak	87	31,9
Europe/Russian W148 Outbreak	9	3,3
Asian/Africa 2	2	0,7
Pacific RD150	1	0,4
unknown	1	0,4
Линия 4 (Euro-American)	**73**	**26,8**
mainly T	29	10,6
LAM	16	5,9
Lineage 4.5	12	4,4
Ural	10	3,7
Haarlem	5	1,8
Cameroon	1	0,4
Линия 1 (Indo-Oceanic)	**1**	**0,4**
БЦЖ	**1**	**0,4**
Итого	**272**	**100,0**

Выявленные различия в распространенности филогенетических линий могут быть обусловлены как историко-демографическими факторами, так и биологическими особенностями генотипов, включая их трансмиссивность, вирулентность и склонность к формированию лекарственной устойчивости [127;135;152;153;155].

Доминирование линии 2 (Beijing) (более 70%) подтверждает высокую распространенность данного генотипа в Казахстане и странах постсоветского пространства. Эти результаты согласуются с данными ряда исследований,

указывающих на эпидемиологическое преимущество и «эволюционный успех» штаммов Beijing, обусловленный их высокой адаптационной способностью и эффективной передачей [52;148-155].

Относительно низкое генетическое разнообразие кластера Central Asia Outbreak, проявляющееся укороченными ветвями филогенетического дерева, в сочетании с высокой долей изолятов с множественной лекарственной устойчивостью, свидетельствует о его сравнительно недавнем и интенсивном распространении [127;135;147].

В отличие от линии 2, линия 4 (Euro-American) характеризуется большей генетической вариабельностью и преобладанием лекарственно-чувствительных форм. Таким образом, в условиях Казахстана генотип Beijing линии 2 может рассматриваться как основной фактор, определяющий распространение туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью [52;144].

3.3.2 Топология филогенетического дерева исследуемой популяции

Филогенетическая структура исследуемой популяции *M. tuberculosis* (n = 272), реконструированная методом максимального правдоподобия на основе конкатенированной последовательности 13844 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), подтвердила ранее установленную классификацию клинических изолятов по генетическим линиям.

Анализ филогенетического дерева (рисунок 13) в сочетании с данными фенотипической лекарственной чувствительности и геномного профилирования выявил выраженную неоднородность профилей устойчивости между различными филогенетическими кластерами.

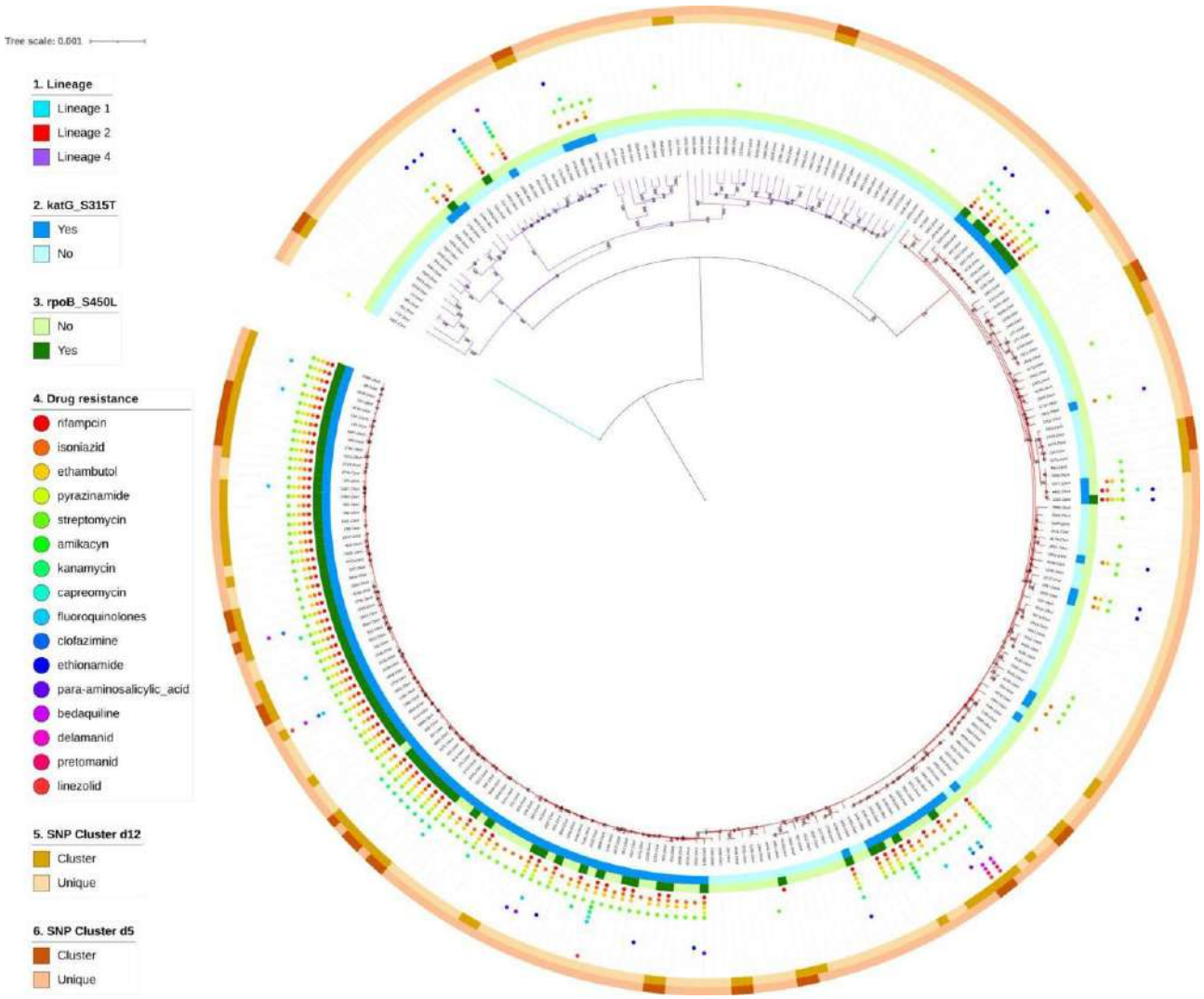


Рисунок 13 – Филогенетическое дерево изолятов *Mycobacterium tuberculosis* (n=272) с указанием профилей лекарственной устойчивости и SNP-кластеризации (ссылка на изображение с высоким разрешением: https://drive.google.com/file/d/1PTW4ZdAXsr4YttxT7dLBv1kKPDXWmBU1/view?usp=drive_link)

Линия 2 (East Asian), выделенная на дереве красным цветом ветвей, характеризуется высокой степенью кластеризации и короткими внутренними ветвями, что свидетельствует о недавней и интенсивной передаче данных штаммов в популяции. В пределах данной линии сублиния Central Asia Outbreak выступает в качестве основного резервуара лекарственной устойчивости: из 87 образцов 60 (69,0%) классифицированы как МЛУ-ТБ, а 8 изолятов соответствуют пре-ШЛУ и ШЛУ-профилям.

Это существенно контрастирует с генетически близкой группой Central Asia, в которой 73 из 97 изолятов сохраняют лекарственную чувствительность. Особого внимания заслуживает сублиния Europe/Russian W148 Outbreak, характеризующийся крайне высокой долей устойчивых форм: 7 из 9 образцов относятся к МЛУ-ТБ.

Линия 4 (Euro-American), обозначенная фиолетовым цветом, демонстрирует более разветвленную филогенетическую структуру и

представлена преимущественно лекарственно-чувствительными изолятами. Наибольшее число таких штаммов выявлено в сублиния mainly T (n = 29) и Euro-American (n = 12).

Случаи множественной лекарственной устойчивости в данной линии единичны и преимущественно связаны с сублинией Ural. В сублинии LAM преобладают чувствительные формы (10 из 16), при редком выявлении пре-ШЛУ (n = 2).

Редкие линии, включая представителей линии 1, а также отдельные изоляты сублиния Asian/Africa 2, Pacific RD150 и Cameroon, в исследуемой выборке представлены исключительно лекарственно-чувствительными штаммами, что может указывать на их ограниченное эпидемиологическое значение в данном регионе.

Анализ дополнительных слоев филогенетического дерева (кольца 2–6) позволил выявить взаимосвязь между генотипом, наличием мутаций и трансмиссионной активностью штаммов. Ключевые мутации в генах *katG* (S315T) и *rpoB* (S450L), отображенные во внутренних кольцах, практически полностью совпадают с кластерами высокой лекарственной устойчивости в линии 2. Это подтверждает их ведущую роль в формировании фенотипа множественной лекарственной устойчивости [127;135].

Внешние кольца, отражающие результаты кластерного анализа при пороговых значениях SNP ≤12 и ≤5, демонстрируют, что наиболее крупные трансмиссионные цепочки формируются преимущественно устойчивыми штаммами линии 2 (Beijing). Данный факт указывает на то, что высокая распространенность лекарственной устойчивости обусловлена не только возникновением мутаций, но и активной передачей уже резистентных штаммов [127;135;150].

Таким образом, топология филогенетического дерева подтверждает тесную связь между принадлежностью к определенным кластерам линии 2 (Beijing), накоплением мутаций лекарственной устойчивости и высокой трансмиссионной активностью. Указанные особенности позволяют рассматривать данные генотипы как группу повышенного эпидемиологического риска.

3.3.3 Анализа генетического разнообразия изолятов *M. tuberculosis* методом PCoA

Для визуализации генетического родства и оценки популяционной структуры исследуемых изолятов *M. tuberculosis* был дополнительно проведен анализ главных координат (PCoA) на основе матрицы SNP-дистанций (рисунок 14). Результаты общего анализа (рисунок 14A) демонстрируют четкую кластеризацию изолятов в соответствии с их принадлежностью к основным филогенетическим линиям. Наибольшее генетическое расстояние наблюдается между представителями линии 2 (Lineage 2/Beijing) и линии 4 (Lineage 4/Euro-American), которые формируют два обособленных массивных кластера в пространстве первых двух главных координат. Единичные изоляты линий 1 и

BCG занимают промежуточное или удаленное положение, что подтверждает значительную гетерогенность микобактериальной популяции в изучаемом регионе.

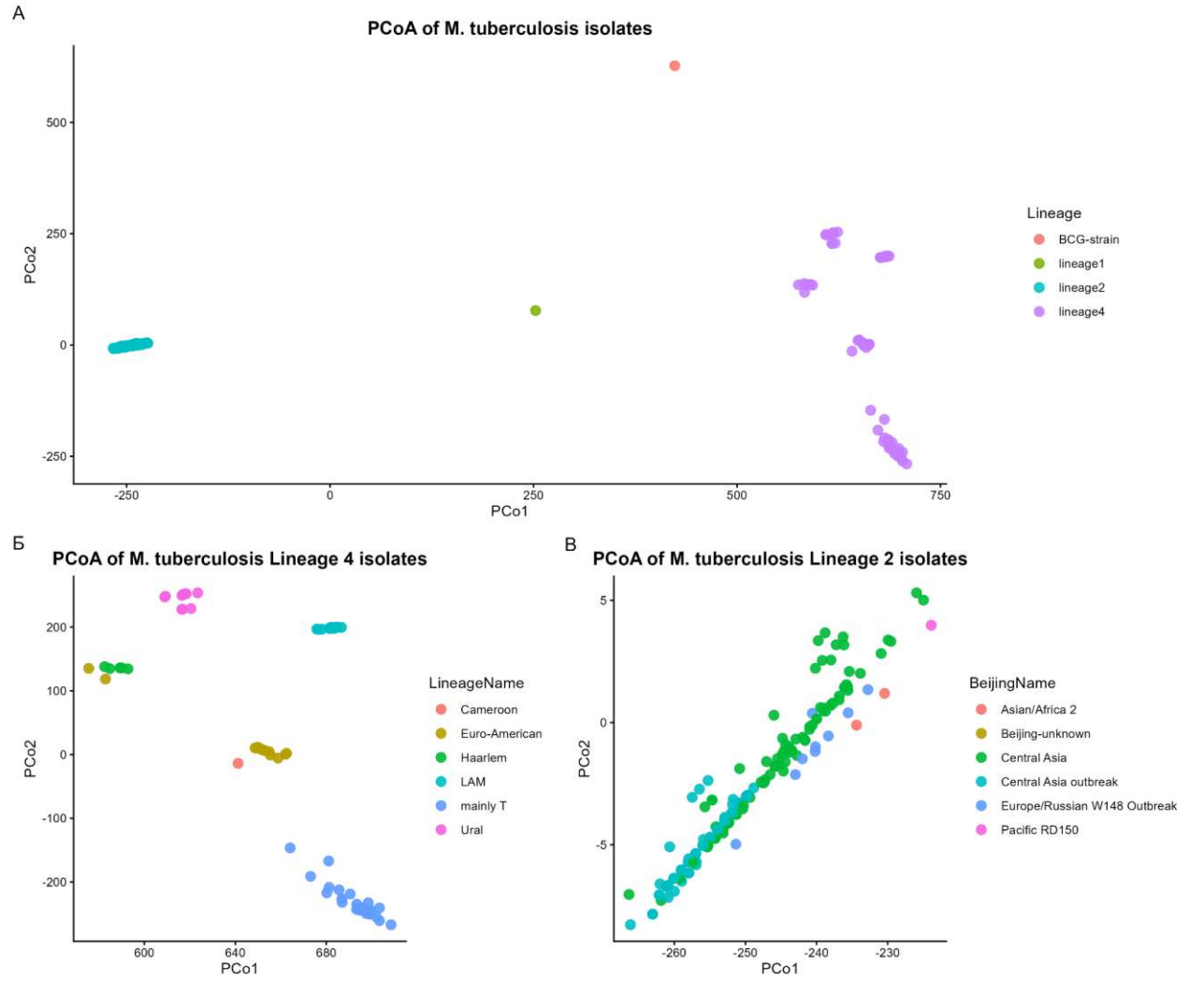


Рисунок 14 – Генетическая структура изолятов *M. tuberculosis* на основе анализа главных координат методом PCoA

Детальный анализ структуры линии 4 (рисунок 14Б) выявил существенное сублинейное разнообразие. В частности, четко дифференцируются группы, относящиеся к генотипам Ural, LAM и Haarlem. Примечательно, что изоляты сублиния Ural формируют плотный обособленный кластер в верхней части графика, что может указывать на их высокую генетическую однородность. Распределение изолятов группы «mainly T» и Euro-American свидетельствует о продолжающейся микроэволюции внутри четвертой линии и широком спектре циркулирующих генотипов, характерных для евразийского пространства.

В рамках линии 2 (рисунок 14В) основная масса изолятов представлена генотипом Beijing. На графике отчетливо визуализируется доминирование сублиний, ассоциированных с Центрально-Азиатским регионом (Central Asia и Central Asia Outbreak), а также кластеров, связанных с эпидемически значимыми вспышками, в частности, «Europe/Russian W148 Outbreak». Высокая плотность распределения изолятов сублинии Central Asia outbreak подтверждает активную

трансмиссию данных генетических вариантов. Полученные данные методом PCoA полностью согласуются с результатами филогенетического анализа и подтверждают эффективность использования полногеномного секвенирования для дифференциации изолятов *M. tuberculosis* на сублинейном уровне.

Детальный анализ мутационного профиля, ассоциированного с лекарственной устойчивостью, представлен в следующем разделе.

3.4 Молекулярно-генетический профиль лекарственной устойчивости

3.4.1 Диагностическая эффективность молекулярно-генетических методов определения лекарственной устойчивости

В ходе исследования была проведена комплексная оценка лекарственной устойчивости клинических изолятов *M. tuberculosis* на основе результатов фенотипического тестирования лекарственной чувствительности (ТЛЧ), дополненных анализом мутаций, ассоциированных с устойчивостью, согласно каталогу мутаций Всемирной организации здравоохранения [250].

При сравнении результатов определения лекарственной устойчивости к рифампицину методом WGS с фенотипическим ТЛЧ была выявлена высокая диагностическая точность. Чувствительность метода WGS составила 97,3%, специфичность – 95,8% (таблица 11). Аналогичный анализ для молекулярного теста Xpert MTB/RIF показал чувствительность 97,3% и специфичность 96,4%, что свидетельствует о высокой надежности данного метода.

Таблица 11 – Диагностическая эффективность определения лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* методом WGS в сравнении с фенотипическим ТЛЧ

Препарат	**Количество (n)**	**Чувствительность (%)**	**Специфичность (%)**
Рифампицин	205	97,3	95,8
Изониазид	209	88,4	88,6
Этамбутол	209	82,9	82,2
Пиразинамид	254	79,2	93,2
Моксифлоксацин	98	100	92,6
Левофлоксацин	248	71,4	97,1
Линезолид	248	71,4	97,1
Клофазимин	102	–	97,1
Бедаквилин	102	–	97,1
Деламанид	95	0	98,9
Примечание: Общее количество изолятов (n) варьирует в зависимости от наличия результатов фенотипического ТЛЧ для соответствующих препаратов. Чувствительность и специфичность рассчитывались относительно фенотипического ТЛЧ. Для препаратов, без результатов фенотипического ТЛЧ, чувствительность не определялась.			

Сравнение WGS и Xpert MTB/RIF продемонстрировало высокий уровень согласованности результатов (96,3%), что указывает на возможность использования в качестве взаимодополняющих методов в диагностике резистентности к рифампицину (таблица 12). Однако Xpert MTB/RIF основанный на методе ПЦР в реальном времени может определять лекарственную устойчивость только к рифампицину, тогда как метод WGS является единым тестом предоставляет данные для определения лекарственной устойчивости ко всем противотуберкулезным препаратам [66;179].

Таблица 12 – Согласованность результатов WGS и Xpert MTB/RIF при определении устойчивости к рифампицину

WGS/ Xpert MTB/RIF	**Устойчив (R)**	**Чувствителен (S)**	**Всего**
WGS R	86	4	90
WGS S	6	176	182
Всего	92	180	272
Согласованность	96,3%		

Фенотипическая устойчивость к моксифлоксацину оценивалась при двух критических концентрациях (0,5 и 1,0 мкг/мл). Для расчета диагностической точности был использован комбинированный критерий, при котором изолят считался резистентным при выявлении устойчивости хотя бы на одной из концентраций. Данный подход позволяет минимизировать риск ложночувствительных результатов, связанных с пограничными значениями минимальной подавляющей концентрации.

Анализ диагностической точности WGS при определении лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* показал высокую эффективность метода для ряда противотуберкулезных препаратов. Наиболее высокая чувствительность и специфичность отмечены для рифампицина (97,3% и 95,8% соответственно), а также для моксифлоксацина (100% и 92,6%), что свидетельствует о высокой надежности выявления резистентности к данным препаратам. Для изониазида и пиразинамида чувствительность метода составила 88,4% и 79,2% соответственно, при этом специфичность оставалась на уровне 88,6% и 93,2%. Наименьшая диагностическая эффективность отмечена для этамбутола (чувствительность 82,9%, специфичность 82,2%) и левофлоксацина (чувствительность 71,4%, специфичность 97,1%), что отражает сложность интерпретации генетических детерминант резистентности, включая широкий спектр мутаций с различным уровнем влияния на фенотипическую устойчивость, а также наличие мутаций с низким или пограничным эффектом для данных препаратов. Для бедаквилина и клофазимина чувствительность не могла быть рассчитана в связи с отсутствием резистентных изолятов в исследуемой выборке, при этом специфичность превышала 97%. В случае деламанида наблюдался единичный резистентный изолят, не выявленный

методом WGS, что не позволяет сделать достоверные выводы о диагностической эффективности метода для данного препарата.

Более низкие показатели чувствительности могут быть обусловлены не только генетическим разнообразием мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, но и ограничениями фенотипического ТЛЧ [37;113]. Известно, что результаты ТЛЧ, выполняемого в системе BACTEC MGIT 960, зависят от ряда факторов, включая концентрацию инокулюма, точность приготовления лекарственных растворов, стабильность препаратов, а также риск контаминации культуры (Приложение А, рис. А.3) [183;235]. Кроме того, воспроизводимость результатов может варьировать в зависимости от соблюдения протокола и квалификации лабораторного персонала [183;235;236]. Следует отметить, что для препаратов первого ряда применяются стандартизированные и валидированные производителем диагностические наборы Becton Dickinson, тогда как тестирование чувствительности к препаратам второго ряда часто осуществляется с использованием лабораторно-модифицированных протоколов [183;235;236]. Это повышает вероятность межлабораторной вариабельности и усиливает влияние человеческого фактора [183;235;236]. В связи с этим фенотипическое ТЛЧ, несмотря на его традиционное использование в качестве референсного метода, не может рассматриваться как абсолютно точный «золотой стандарт», особенно для препаратов второго ряда, что необходимо учитывать при интерпретации расхождений между фенотипическими и генотипическими методами диагностики.

В целом результаты свидетельствуют о высокой диагностической ценности WGS, особенно для препаратов первого ряда, при этом для ряда противотуберкулезных средств второго ряда требуется дальнейшее накопление данных и совершенствование интерпретации генетических маркеров устойчивости [40;61;71].

3.4.2 Профиль и структура лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*

По данным полногеномного секвенирования устойчивость выявлена к 16 противотуберкулезным препаратам. Наиболее высокие показатели резистентности зарегистрированы для препаратов первого ряда. Частота мутаций, ассоциированных с устойчивостью к стрептомицину, составила 50,0% (SM; 136/272), к изониазиду – 46,69% (INH; 127/272), к этамбутолу – 39,34% (EMB; 107/272) и к рифампицину – 33,09% (RIF; 90/272) (рисунок 15).

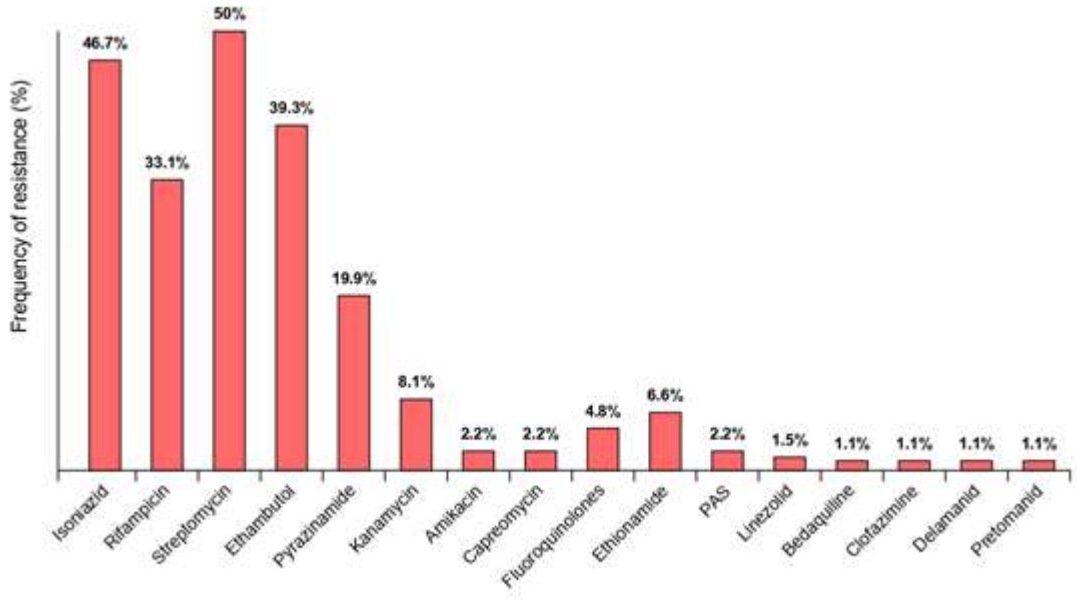


Рисунок 15 – Профиль лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* (n=272) к 16 противотуберкулезным препаратам

Резистентность к пиразинамиду выявлена у 19,85% (PZA; 54/272) изолятов. Устойчивость к препаратам второго ряда встречалась реже: к канамицину – 8,09% (KM; 22/272), к этионамиду – 6,62% (ETO; 18/272). Для остальных препаратов показатели не превышали 5%, включая фторхинолоны – 4,78% (FQs; 13/272), а также амикацин и капреомицин – по 2,21% (AM/CM; 6/272) для каждого препарата (рисунок 15).

Устойчивость к новым и перепрофилированным препаратам, таким как бедаквилин и деламанид, выявлена в 1,1% случаев (BDQ/DEL; 3/272). Ввиду ограниченной доступности фенотипического тестирования для данных препаратов оценка устойчивости проводилась на основании выявления мутаций, ассоциированных с резистентностью. Изолятов, устойчивых к циклосерину (Cs), не обнаружено.

Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения, структура лекарственной устойчивости в исследуемой популяции распределилась следующим образом: доля изолятов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) составила 29,04% (79/272), пре-ШЛУ – 3,31% (9/272), ШЛУ – 0,74% (2/272). Монорезистентность и иные формы устойчивости к изониазиду (HR-TB) выявлены в 13,97% (38/272) случаев (рисунок 16). При этом значительная часть выборки – 130 (47,8%) изолятов – сохраняла полную чувствительность к противотуберкулезным препаратам и не содержала известных мутаций резистентности (рисунок 16).

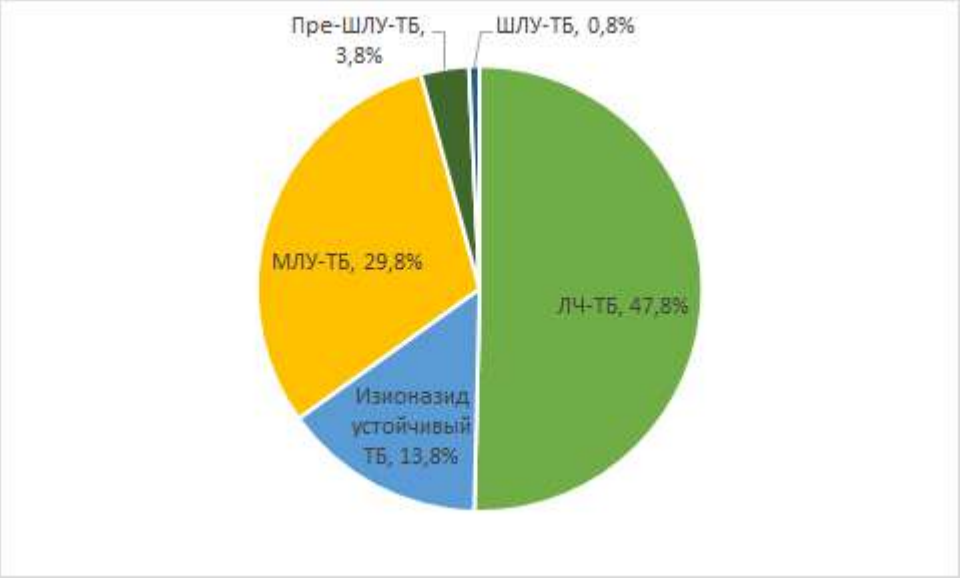


Рисунок 16 – Распределение категорий лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* в соответствии с классификацией ТБ по ВОЗ

Анализ распределения лекарственной устойчивости в зависимости от филогенетической принадлежности показал, что линия 2 (East Asian) характеризуется значительно более неблагоприятным профилем: частота МЛУ-ТБ составила 39,6% по сравнению с 1,4% у представителей линии 4 (Euro-American) (таблица 13). Полученные данные подтверждают, что генотип Beijing линии 2 играет ключевую роль в распространении лекарственно-устойчивых форм туберкулеза в исследуемой популяции и может рассматриваться как основной драйвер трансмиссии МЛУ-ТБ [52;127;144;149].

Таблица 13 – Распределение профилей лекарственной устойчивости среди изолятов основных филогенетических линий *M. tuberculosis*

Линия	Кол-во изолятов	Лекарственно-чувствительные n (%)	HR-TB (устойчивость к INH) n (%)	МЛУ-ТБ n (%)	пре-ШЛУ-ТБ n (%)	ШЛУ-ТБ n (%)	Прочая устойчивость[1] n (%)
Линия 2	197	69 (35,0)	32 (16,2)	78 (39,6)	7 (3,6)	2 (1,0)	9 (4,6)
Линия 4	73	59 (80,8)	6 (8,2)	1 (1,4)	2 (2,7)	0	5 (6,9)
Итого	270	128 (47,4)	38 (14,1)	79 (29,3)	9 (3,3)	2 (0,7)	14 (5,2)

Примечание: [1]В категорию «Прочая устойчивость (не МЛУ)» включены изоляты, устойчивые к одному или нескольким противотуберкулезным препаратам (например, к стрептомицину или этамбутолу), которые не соответствуют определениям ВОЗ для МЛУ, пре-ШЛУ или ШЛУ-ТБ.
Два образца (штамм *M. bovis* BCG и один изолят Линии 1) были исключены из данного анализа, так как оба являлись лекарственно чувствительными и не входили в группы для межлинейного сравнения.

3.4.3 Спектр мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью

Генетический анализ механизмов устойчивости выявил доминирование специфических мутаций в генах-мишенях. В изолятах, устойчивых к рифампицину, основным детерминантом являлась мутация S450L в гене *rpoB,*

обнаруженная в 91,11% (82/90) случаев. Резистентность к изониазиду практически во всех случаях была обусловлена заменой S315T в гене *katG* (99,21%; 126/127) (рисунок 17). Указанные мутации относятся к категории высокодостоверных (high-confidence) согласно каталогу мутаций ВОЗ и характеризуются высокой степенью согласованности с фенотипической устойчивостью, что подтверждает надежность геномного подхода к интерпретации лекарственной резистентности [250].

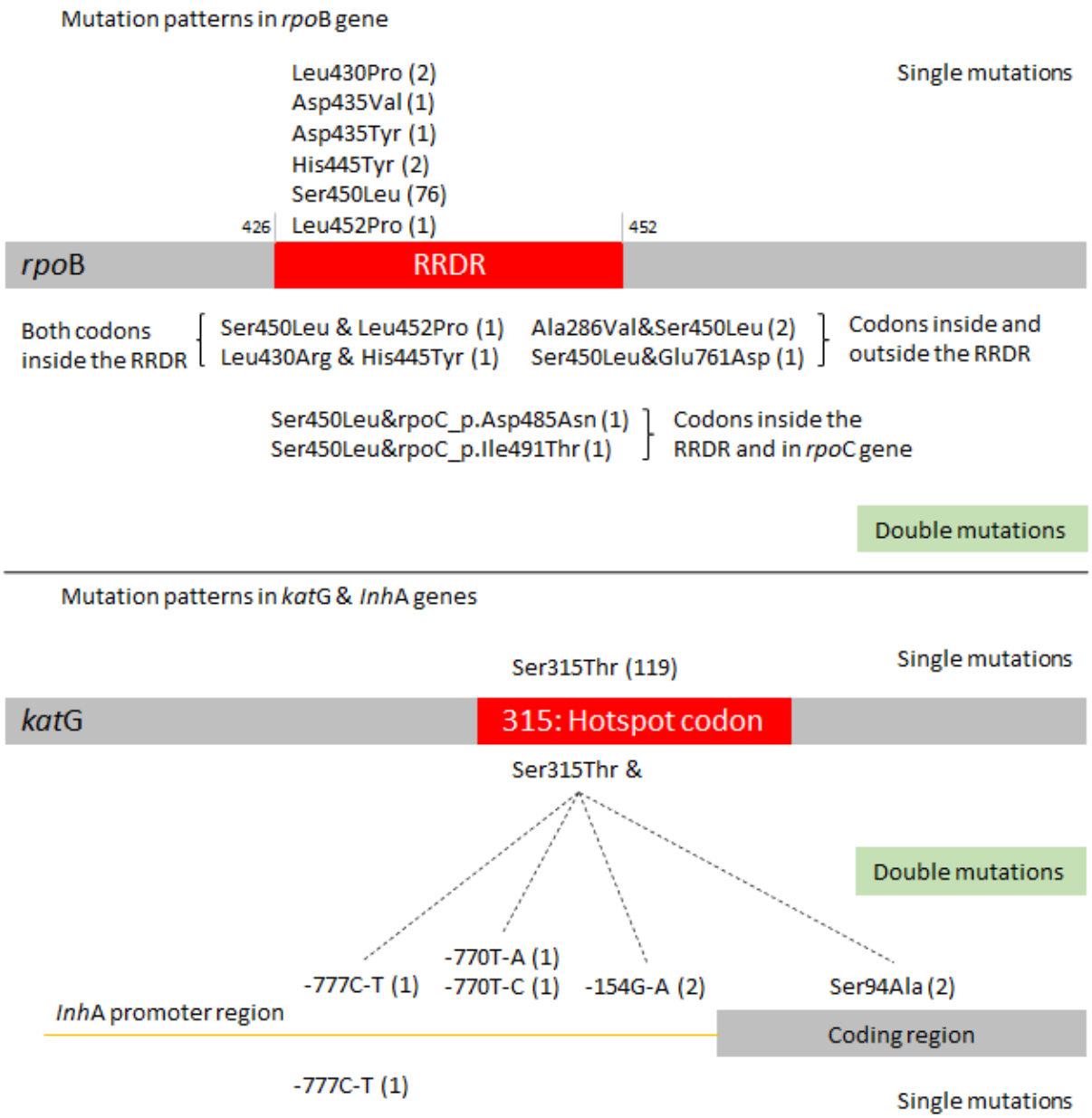


Рисунок 17 – Частота и комбинации мутаций в генах *rpoB*, *katG* и *inhA*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к рифампицину и изониазиду

Для препаратов нового поколения выявлены редкие генетические варианты. В изолятах, устойчивых к бедаквилину и клофазимину, у двух изолятов обнаружена мутация *mmpR5* c.139dupG, а у одного – *mmpR5* c.466dupC. Среди трех деламанид-резистентных изолятов идентифицированы уникальные

изменения, включая *ddn* c.223delG, *ddn* p.Glu118* и протяженную делецию *fbiC* c.2565_2566delC.

Обнаружение указанных редких мутаций может указывать на разнообразие генетических механизмов формирования лекарственной устойчивости в исследуемой популяции [278].

Высокая частота мутаций *katG* S315T (99,2%) и *rpoB* S450L (91,1%) соответствует характеристикам так называемых «успешных» клонов, поскольку данные замены обеспечивают высокий уровень устойчивости при минимальном снижении биологической приспособленности возбудителя [127;135;155].

Особого внимания требует выявление мутаций в генах *mmpR5* и *ddn* у пациентов, не получавших ранее терапию бедаквилином и деламанидом. Это может указывать на первичную трансмиссию штаммов с уже существующей устойчивостью к препаратам нового ряда, что представляет потенциальную угрозу для эффективности современных схем химиотерапии [250;278].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что формирование лекарственной устойчивости в исследуемой популяции *M. tuberculosis* определяется как высокой распространенностью ключевых мутаций, ассоциированных с резистентностью, так и их согласованностью с фенотипическими данными. Полученные результаты подчеркивают перспективность внедрения полногеномного секвенирования как ключевого инструмента для диагностики лекарственной устойчивости и эпидемиологического надзора за туберкулезом.

3.4.4 Особенности распределения лекарственной устойчивости внутри основных генотипов

Анализ структуры лекарственной устойчивости в зависимости от генотипа выявил выраженную неоднородность распределения фенотипов резистентности (таблица 14).

Таблица 14 – Распределение профилей лекарственной устойчивости в генетических сублиниях *M. tuberculosis*

Линия	Сублиния	Чувствительные	INH-устойчивые	МЛУ-ТБ	пре-ШЛУ-ТБ	ШЛУ-ТБ	Всего
Линия 2	Central Asia outbreak	1	18	60	6	2	87
	Central Asia	73	12	11	1	0	97
	Europe/Russian W148 Outbreak	0	2	7	0	0	9
	Asian/Africa 2	2	0	0	0	0	2
	Pacific RD150	1	0	0	0	0	1
	unknown	1	0	0	0	0	1

Продолжение таблицы 14

Линия 4	LAM	10	4	0	2	0	16
	Euro-American	12	0	0	0	0	12
	Cameroon	1	0	0	0	0	1
	Haarlem	5	0	0	0	0	5
	mainly T	29	0	0	0	0	29
	Ural	7	2	1	0	0	10

Генотип Beijing линии 2 характеризуется наиболее неблагоприятным эпидемиологическим профилем, поскольку на ее долю приходится основная часть случаев с тяжелыми формами лекарственной устойчивости. При этом внутри линии наблюдается четкая дифференциация в зависимости от принадлежности к конкретным сублиниям.

Наиболее высокая концентрация резистентных форм зафиксирована в группе Central Asia Outbreak: из 87 изолятов 60 (68,9%) классифицированы как МЛУ-ТБ, а суммарная доля пре-ШЛУ и ШЛУ составила 9,2% (8 случаев).

В группе Central Asia наблюдается противоположная картина: 75,3% (73 из 97) изолятов сохраняют лекарственную чувствительность, что свидетельствует о значительном генетическом разнообразии внутри данной линии [277].

Сублиния Europe/Russian W148 Outbreak характеризуется крайне неблагоприятным профилем, где чувствительные формы отсутствуют, а преобладающим типом является МЛУ-ТБ (7 из 9 изолятов), что подтверждает ее высокую эпидемиологическую значимость [150;168].

Линия 4 (Euro-American) демонстрирует принципиально иную структуру. Для ее представителей характерно сохранение высокой чувствительности к препаратам первого ряда. В сублинии mainly T и Euro-American число чувствительных изолятов составило 29 и 12 соответственно.

Случаи множественной лекарственной устойчивости в пределах линии 4 единичны и преимущественно связаны с сублинией Ural, при этом их доля статистически незначима. Сублиния LAM занимает промежуточное положение: из 16 изолятов 10 сохраняют чувствительность, в 2 случаях выявлен профиль пре-ШЛУ.

Таким образом, результаты генотипирования позволяют рассматривать принадлежность к линии 2 (*M. tuberculosis* Beijing), и в особенности к кластеру Central Asia Outbreak, как значимый предиктор развития множественной и широкой лекарственной устойчивости.

3.5 Геномная эпидемиология и трансмиссионный анализ

3.5.1 Сравнительный анализ внутригрупповой генетической вариабельности изолятов *M. tuberculosis*

С целью оценки генетической гетерогенности исследуемой популяции и уточнения границ филогенетического родства между клиническими изолятами *M. tuberculosis* был проведен расчет попарных генетических дистанций (SNP-dist) внутри выявленных филогенетических линий и сублиний. Использование SNP-полиморфизмов в качестве «молекулярных часов» позволяет с высокой точностью дифференцировать фоновое генетическое разнообразие от групп близкородственных изолятов, формирование которых связано с недавними событиями передачи возбудителя [71;103;201;214;276].

Анализ распределения попарных дистанций в общей выборке выявил принципиальные различия в популяционной структуре основных филогенетических линий (рисунок 18). Линия 4 (*Euro-American*, включая генотипы LAM, mainly T, Haarlem, Ural, Cameroon) характеризуется значительной генетической разобщенностью и широким диапазоном SNP-дистанций. Подобная структура свидетельствует о ее эндемичном характере в регионе и отражает накопление генетического разнообразия в результате длительной циркуляции. Вероятно, для данной линии преобладают случаи реактивации латентной инфекции или спорадической передачи [52;144;201;214].

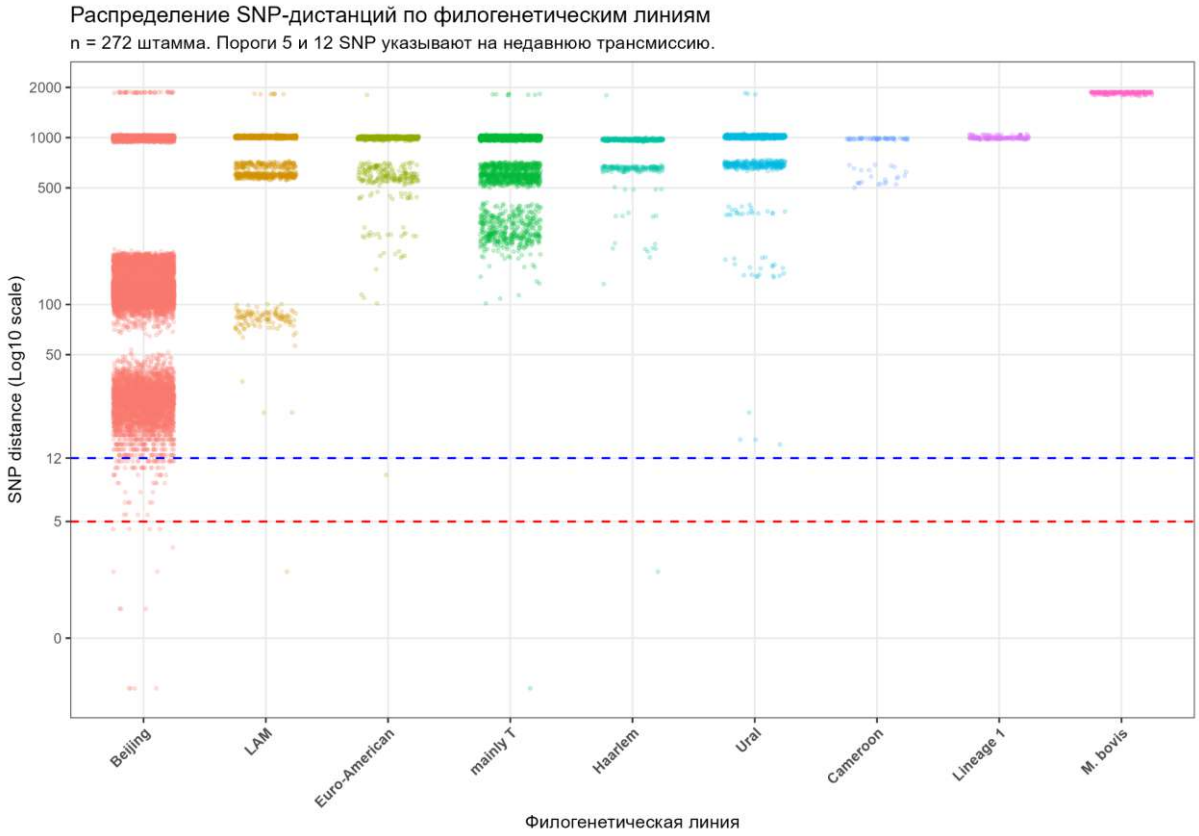


Рисунок 18 – Визуализация попарных SNP-дистанций между изолятами *M. tuberculosis* (n=272) для анализа генетической вариабельности линий

В отличие от этого, линия 2 демонстрирует выраженную генетическую консолидированность: основная масса попарных сравнений сосредоточена в

низком диапазоне SNP-дистанций. Такая «сжатость» распределения указывает на относительно недавнее происхождение циркулирующей популяции и ее высокий эпидемический потенциал. Данный паттерн соответствует явлению селективного замещения (selective sweep), при котором ограниченное число высокоадаптированных клонов быстро распространяется в популяции, вытесняя менее конкурентоспособные генотипы [135].

Для более детального анализа была применена иерархическая стратификация, позволившая оценить уровень внутригрупповой компактности сублиний в диапазоне до 400 SNP (рисунок 19). Полученные данные демонстрируют, что эпидемиологически значимые группы, включая Central Asia, Central Asia Outbreak и Europe/Russian W148 Outbreak, характеризуются минимальным разбросом генетических дистанций по сравнению с представителями линии 4.

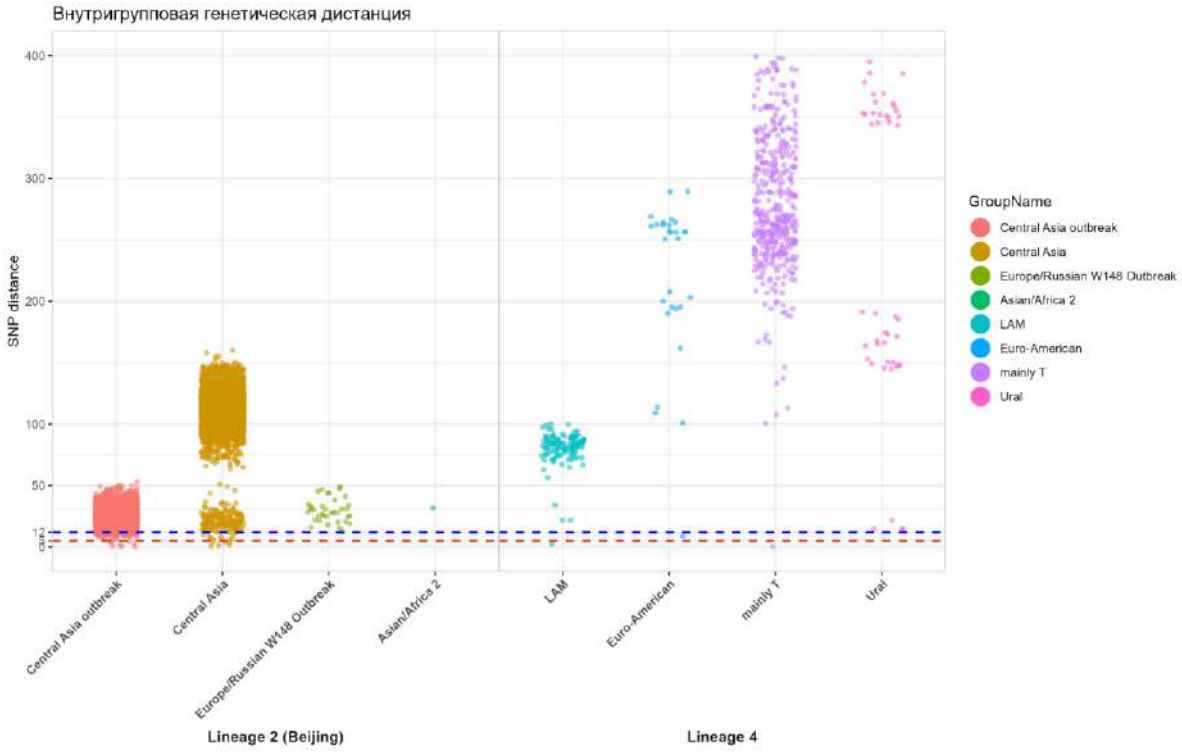


Рисунок 19 – Попарные SNP-дистанции и внутригрупповая генетическая вариабельность сублиний *M. tuberculosis* линий 2 и 4 (≤400 SNP)

Высокая степень генетической однородности указанных сублиний подтверждает их ведущую роль в формировании современной эпидемиологической ситуации в Казахстане [52;144]. В частности, сублиния W148 в ряде исследований описывается как высокоадаптированный клон, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью и способный к эффективному распространению без значимых потерь биологической приспособленности [150;168]. Данные наблюдения согласуются с результатами настоящего исследования.

В пределах линии 4 наибольшая генетическая однородность выявлена среди сублиний LAM и Ural, тогда как группа mainly T характеризуется

максимальной вариабельностью, что соответствует ее роли как источника преимущественно спорадических случаев заболевания [80-82].

С целью идентификации возможных цепей передачи был проведен детализированный анализ попарных дистанций в диапазоне 0–50 SNP (рисунок 20). Для интерпретации использованы общепринятые пороговые значения: ≤5 SNP – высокая вероятность недавней прямой трансмиссии, ≤12 SNP – наличие эпидемиологической связи в рамках одного очага [103;201].

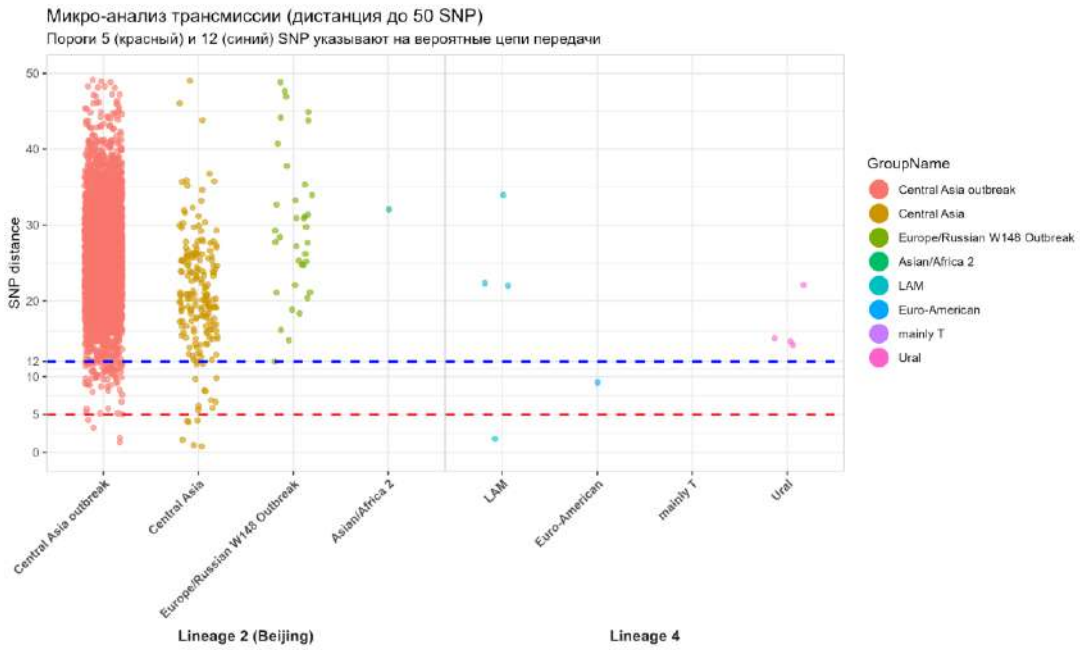


Рисунок 20 – Анализ трансмиссии *M. tuberculosis* на основе попарных SNP-дистанций (0–50 SNP) с порогами ≤5 SNP (прямая передача) и ≤12 SNP (эпидемиологическая связь)

Наибольшая плотность генетически близких изолятов (≤12 SNP) выявлена среди представителей линии 2 (Beijing), преимущественно в сублиниях Central Asia и Central Asia Outbreak. Формирование подобных кластеров с минимальными генетическими расстояниями свидетельствует о наличии активных очагов передачи инфекции.

Высокая частота генетической близости в данном диапазоне подтверждает, что распространение туберкулеза в исследуемой популяции в значительной степени обусловлено текущей трансмиссией, а не реактивацией латентной инфекции [103;135;201]. Это указывает на ведущую роль активно циркулирующих, в том числе лекарственно-устойчивых, клонов генотипа Beijing в поддержании эпидемического процесса.

Полученные результаты послужили основанием для проведения дальнейшего углубленного анализа кластеризации и сопоставления генетических данных с профилями лекарственной устойчивости, представленного в следующем разделе.

3.5.2 Сравнительный анализ внутригрупповой генетической вариабельности в общей выборке и среди МЛУ-ТБ

При анализе внутригрупповых дистанций в линии 2 (Beijing) выявлена высокая степень генетической гомогенности, особенно выраженная в сублинии Central Asia outbreak (рисунок 21). В данной сублинии наблюдается массивное «облако» попарных сравнений с дистанцией менее 12 SNP, причем значительная часть пар находится в диапазоне 0–5 SNP. Это свидетельствует о крайне высокой интенсивности недавней трансмиссии.

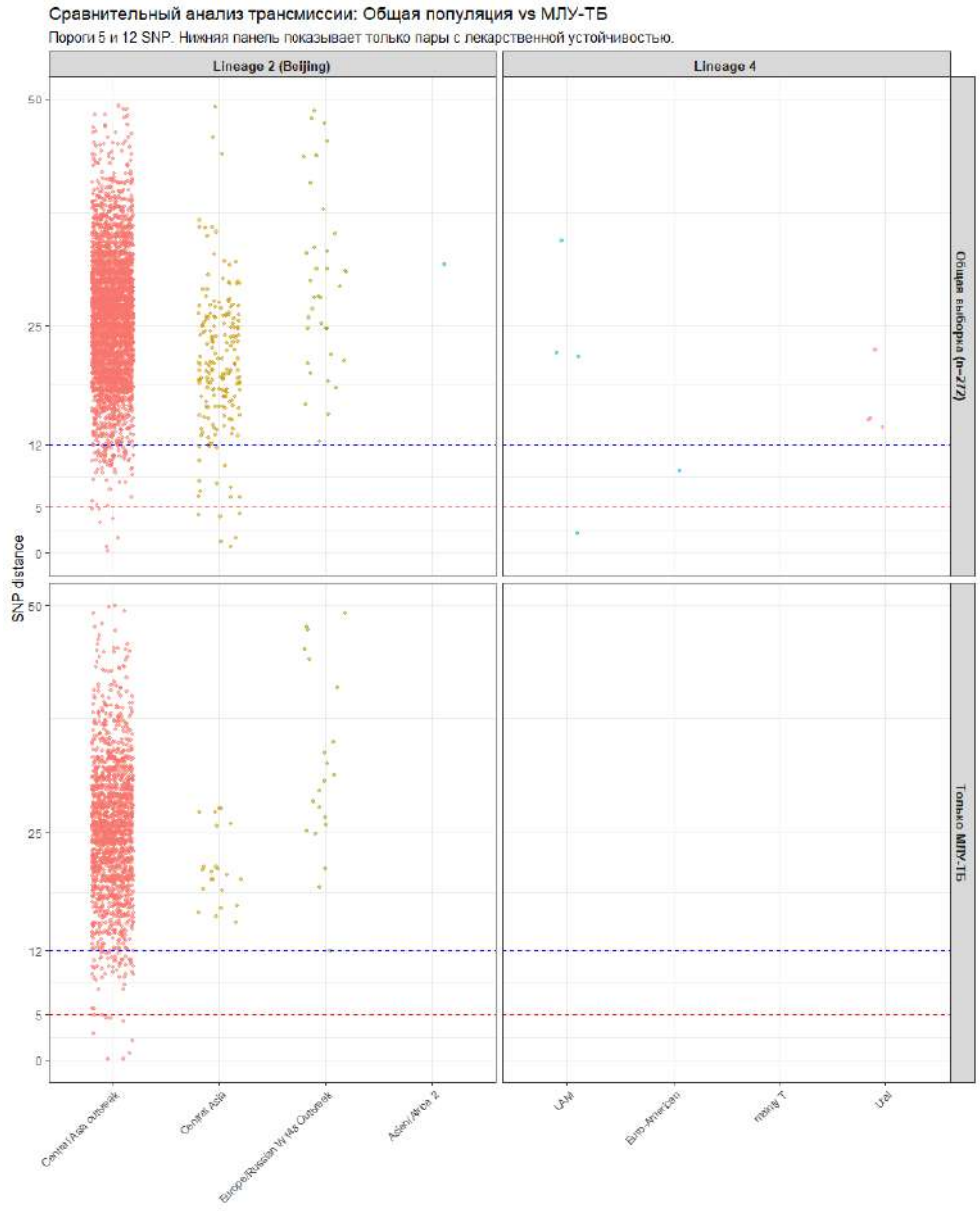


Рисунок 21 – Сравнительный анализ распределения попарных SNP-дистанций в общей выборке и среди изолятов МЛУ-ТБ по филогенетическим линиям 2 и 4

Сравнение верхней («Общая выборка») и нижней («Только МЛУ-ТБ») панелей графика демонстрирует, что структура вариабельности в сублинии Central Asia outbreak практически не меняется (рисунок 21). Это подтверждает, что эпидемический процесс в этой группе практически полностью детерминирован трансмиссией именно лекарственно-устойчивых клонов.

Генетическая вариабельность здесь минимальна, что характерно для недавних и активных вспышек. Сублиния Europe/Russian W148 Outbreak демонстрирует схожий паттерн, однако плотность кластеров ниже, что может указывать на меньшую долю этих штаммов в текущей структуре заболеваемости в исследуемом регионе или на более «разреженную» сеть контактов (рисунок 22).

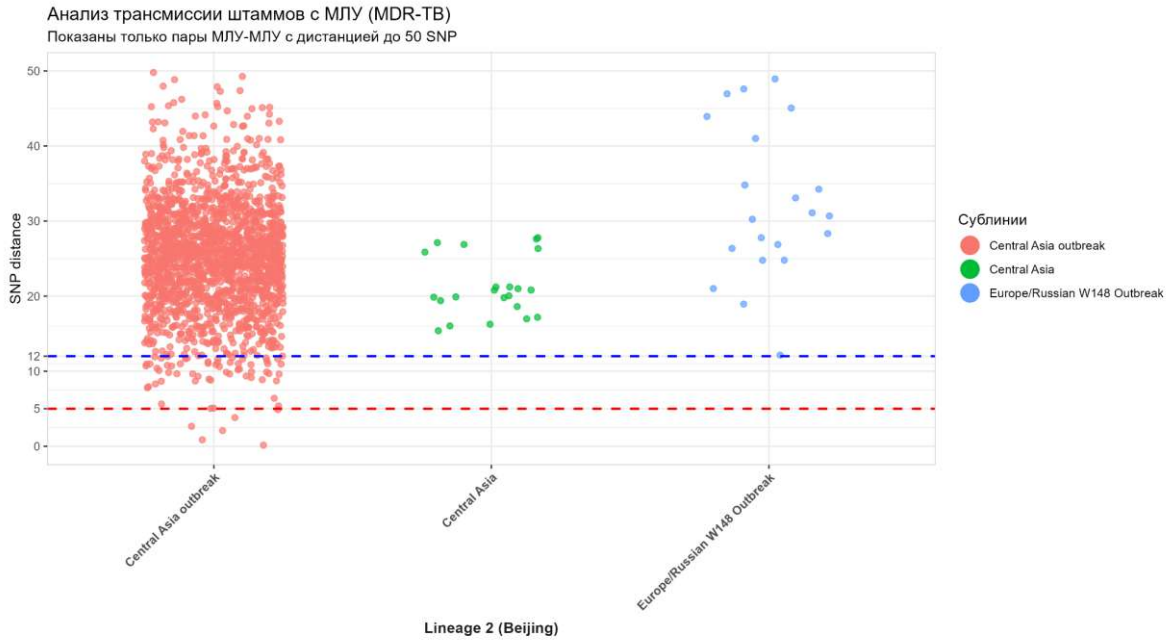


Рисунок 22 – Анализ трансмиссии изолятов МЛУ-ТБ линии 2 *Mycobacterium tuberculosis* и их распределение по сублиниям.

Внутригрупповая вариабельность изолятов линии 4 (генотипы LAM, Euro-American, Ural, mainly T) существенно отличается от линии 2 (Beijing), при этом дисперсия дистанций показывает, что подавляющее большинство попарных сравнений находится в диапазоне 25–50 SNP и выше. Это указывает на значительную генетическую дистанцию между изолятами и отсутствие тесных эпидемиологических связей внутри этой линии в данной выборке.Особенности МЛУ: В группе МЛУ-ТБ (рисунок 21, нижняя панель) для Lineage 4 практически полностью отсутствуют точки в зоне низкой дистанции (ниже 12 SNP). Это позволяет сделать вывод, что случаи МЛУ среди штаммов линии 4 носят преимущественно спорадический характер и, в отличие от генотипа Beijing, не склонны к формированию активных трансмиссионных цепочек.

Сравнительный анализ показывает, что генетическая структура популяции МЛУ-ТБ в исследуемом регионе неоднородна. Основной вклад в формирование кластеров с низкой вариабельностью вносит сублиния Central Asia outbreak. Важный выводом является тот факт, что распределение SNP-дистанций для МЛУ-изолятов в генотипе Beijing почти идентично распределению в общей выборке, указывает на то, что устойчивость к препаратам в этой популяции является не следствием ошибок лечения (приобретенная устойчивость), а результатом первичного инфицирования уже циркулирующими МЛУ-штаммами сублинии CAO.

3.5.3 Выявление кластеров недавней трансмиссии на основе SNP-расстояний

В общей сложности 80 изолятов *M. tuberculosis* были объединены в 22 кластера размером от 2 до 18 образцов, что свидетельствует о наличии активной недавней трансмиссии инфекции в исследуемой популяции. Уровень кластеризации, определяемый как доля изолятов, входящих в трансмиссионные кластеры при пороге ≤12 SNP, составил 29,41% (80/272).

Медианное значение SNP-дистанции внутри кластеров составило 8,5, что соответствует критериям эпидемиологической связанности. При этом 90% (72/80) кластеризованных изолятов относились к линии 2 (*Beijing*), и все лекарственно-устойчивые изоляты также принадлежали данной линии, что подчеркивает ее ведущую роль в распространении резистентных форм туберкулеза [103;201].

Структура кластеров характеризовалась преобладанием малых групп: в 32,5% случаев (26/80) кластеры включали по два изолята, что отражает наличие множественных независимых эпизодов передачи [103;198;201].

Сопоставление геномных данных с клинической информацией показало, что значительная доля случаев приходится на впервые выявленных пациентов. Учитывая установленную генетическую близость изолятов, это позволяет предположить, что до 87,87% (239/272) случаев заболевания обусловлены недавней передачей инфекции, а не реактивацией латентного процесса (рисунок 12).

Филогенетический анализ позволил идентифицировать 22 трансмиссионных кластера, включая крупнейший кластер C18, который охватывал весь период наблюдения (2023–2024 гг.), что указывает на его устойчивую циркуляцию во времени (таблица 15; Приложение Г, таб. Г.1).

Таблица 15 – Генетическая и эпидемиологическая характеристика крупнейших трансмиссионных кластеров изолятов *M. tuberculosis*

№ кластера	Линия / Сублиния	Кол-во изолятов	Медианное SNP-расстояние	Профиль лекарственной устойчивости	Особенности и динамики устойчивости
C4	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia outbreak	7	11	7-MDR-TB	Стабильный MDR
C6	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia outbreak	4	10	3-MDR-TB 1-XDR-TB	Приобретенная устойчивость
C8	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia	6	14	2-Sensitive 1-HR-TB 2-MDR-TB	Высокая гетерогенность ЛУ

Продолжение таблицы 15

				1-pre-XDR-TB	
C18	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia outbreak	18	13	15-MDR-TB 3-pre-XDR-TB	Крупнейший кластер (MDR)
C20	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia outbreak	7	11	6-MDR-TB 1-pre-XDR-TB	Расширение (PZA, FQ+)

В 22,73% кластеров (5/22) выявлено сочетание различных профилей лекарственной устойчивости. В отдельных случаях прослеживалась динамика расширения спектра резистентности: в кластере C7 наблюдалось увеличение доли изолятов с устойчивостью к рифампицину, а в кластере C20 – к пиразинамиду и фторхинолонам. Это может свидетельствовать о внутрикластерной эволюции возбудителя под селективным давлением терапии [31;201].

В крупнейшем кластере C18 все изоляты характеризовались идентичным профилем устойчивости (RIF, INH, PZA, EMB, STR), при этом только два образца содержали дополнительные мутации в генах-мишенях, что указывает на высокую стабильность данного клонального варианта.

Анализ географического распределения показал, что 18,2% кластеров (4/22) ограничены одним городом, 22,7% (5/22) включают пациентов из разных населенных пунктов одного региона, а большинство – 59,1% (13/22) – охватывают несколько регионов страны, что свидетельствует о межрегиональном распространении инфекции (рисунок 23).

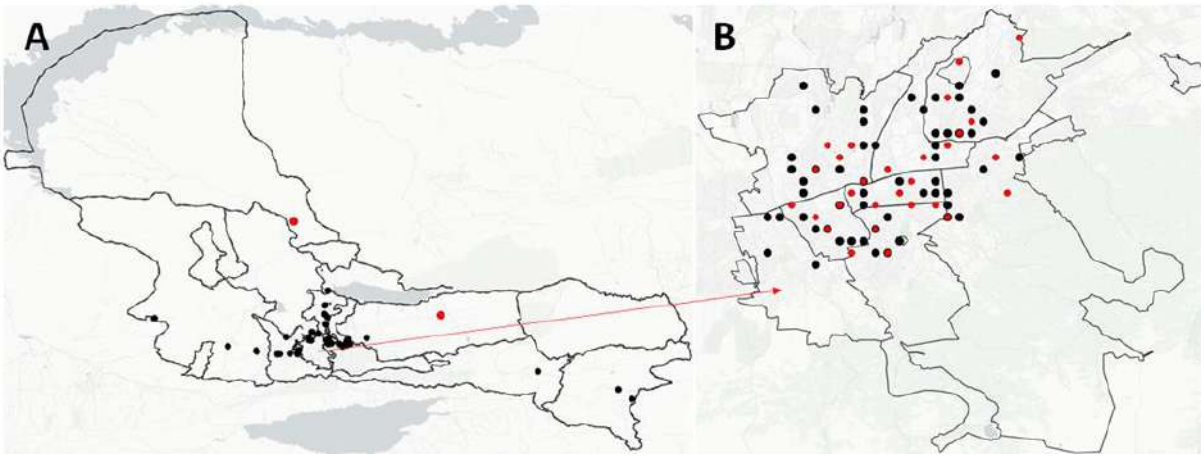


Рисунок 23 – Географическое распределение уникальных (черные точки) и кластеризованных (красные точки) изолятов *M. tuberculosis*: A – Алматинская область, B – город Алматы

В крупнейшем кластере C18 половина пациентов (9 из 18) проживала в г. Алматы, причем пятеро из них находились в радиусе до 5 км друг от друга

(рисунок 23В). Особый интерес представляет кластер С3, в котором все пациенты проживали в одном жилом доме, что является доказательством высокой вероятности передачи инфекции при тесном бытовом контакте [103;201].

В крупнейшем SNP-кластере С18 (n=18) выявлена выраженная пространственная концентрация случаев: 9 пациентов (50,0%) проживали в г. Алматы. При этом у 5 из них отмечалась дополнительная географическая близость – места проживания располагались в радиусе до 5 км друг от друга (рисунок 23В). Такая пространственная агрегация может свидетельствовать о наличии локальных цепочек передачи инфекции в пределах городской среды, включая возможные социальные и эпидемиологические связи между пациентами.

Особый интерес представляет кластер С3, в котором все пациенты проживали в одном жилом доме. Данный факт указывает на высокую вероятность внутридомовой передачи инфекции, обусловленной длительным и тесным бытовым контактом. Учитывая минимальные генетические различия между изолятами в пределах данного кластера (SNP ≤ 5), полученные результаты могут рассматриваться как прямое молекулярно-эпидемиологическое подтверждение недавней трансмиссии *M. tuberculosis* [103;201].

Таким образом, выявленные пространственные паттерны кластеризации могут указывать на существенной роли локальной передачи в формировании структуры заболеваемости и подчеркивают необходимость учета географических и социальных факторов при эпидемиологическом надзоре за туберкулезом.

3.5.4 Пространственно-генетическая автокорреляция клинических изолятов *M. tuberculosis* (тест Мантеля)

Для оценки взаимосвязи между географической близостью между пациентами и генетическим сходством изолятов *M. tuberculosis* был проведен анализ пространственной автокорреляции с использованием теста Мантеля на основе попарных SNP-дистанций.

Анализ был ограничен выборкой пациентов из г. Алматы и Алматинской области, на долю которых приходится более 50% всех наблюдений. Такое ограничение позволило повысить плотность данных и снизить влияние межрегиональной неоднородности эпидемиологических процессов (рисунок 24) [279;280].



Рисунок 24 – Геопространственная корреляция генетических (SNP) и географических дистанций изолятов *M. tuberculosis*

Несмотря на отсутствие статистически значимой глобальной корреляции между генетическими и географическими расстояниями (Mantel r = 0,06173; p = 0,1628), анализ выявил особенности на локальном уровне (таблица 16; Приложение Д, таб. Д.1).

Таблица 16 – Результаты анализа пространственной автокорреляции изолятов *M. tuberculosis* на основе общего и коррелограммного теста Мантеля

Дистанционный класс	Интервалы расстояний	Статистика Мантеля (r)	p-значение	Интерпретация
Общая выборка (Алматы и обл.)	144	0,06173	0,1628	Корреляция отсутствует (глобально)
D.cl. 1	0-8	0,0623	0,048	Очень слабая локальная связь (по шкале Чеддока)
D.cl. 2	8-16	0,0037	0,455	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 3	16-24	-0,0537	0,090	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 4	24-32	-0,0676	0,120	Пространственная связь не выявлена

Применение коррелограммы Мантеля позволило выявить значимую положительную корреляцию на малых пространственных масштабах. В первом дистанционном классе (0–8 км) выявлена статистически значимая локальная пространственная автокорреляция (Mantel r = 0,0623; p = 0,048). Однако согласно шкале Чеддока сила данной связи оценивается как очень слабая. Полученные результаты свидетельствуют о несколько повышенной вероятности генетического сходства изолятов у пациентов, проживающих в непосредственной географической близости, однако низкое значение коэффициента корреляции указывает на ограниченную силу данного эффекта и возможное влияние дополнительных эпидемиологических факторов, включая скрытые цепочки передачи и неоднородность выборки (рисунок 25) [279;280;281].

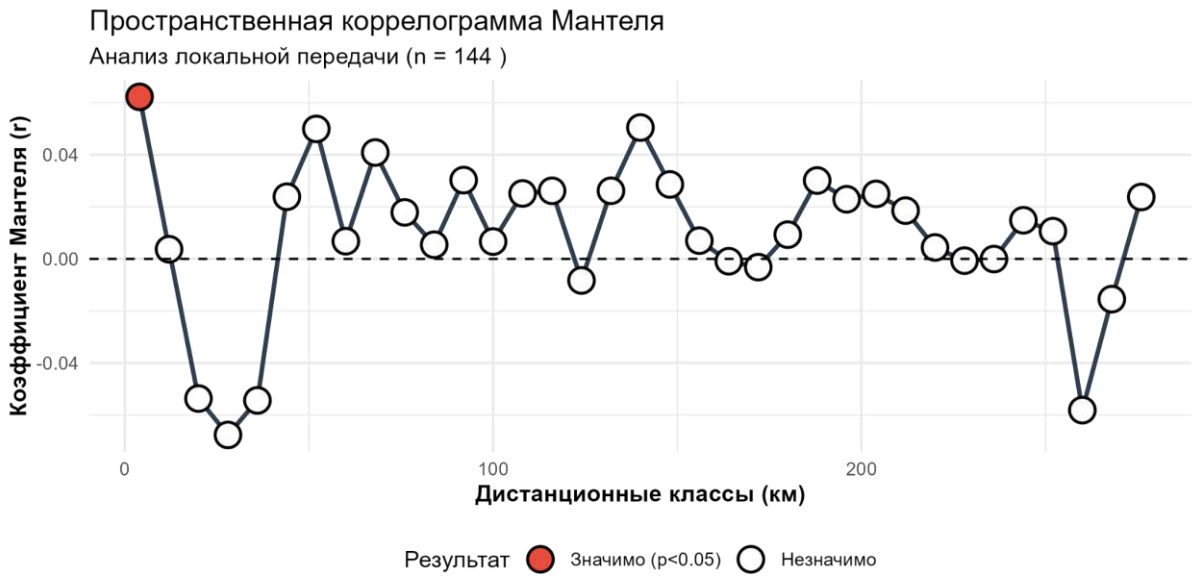


Рисунок 25 – Корреляция генетических и географических дистанций (*M. tuberculosis*) по Мантелю; красным выделен первый дистанционный класс (0–8 км, p <0,05)

В остальных дистанционных классах статистически значимых корреляций не выявлено (p>0,05), что указывает на отсутствие выраженной пространственной структуры генетического разнообразия на больших расстояниях и нивелировании пространственного эффекта по мере увеличения дистанции. Полученные результаты демонстрируют, что анализ всей совокупности данных без учета пространственной структуры может маскировать локальные закономерности трансмиссии. Применение пространственно-стратифицированного подхода позволило выявить наличие значимой связи исключительно на сверхкоротких дистанциях, что соответствует формированию локальных очагов инфекции.

Данные пространственного анализа согласуются с результатами кластеризации, включая выявленные случаи внутридомовой передачи, и подтверждают доминирующую роль локальной трансмиссии в структуре заболеваемости.

Показатель кластеризации (29,4%) свидетельствует о том, что значительная доля случаев туберкулеза в исследуемой выборке обусловлена недавним заражением, а не реактивацией латентной инфекции [71;103;201;214;276].

С практической точки зрения выявленная зависимость генетического сходства изолятов в радиусе до 8 км при отсутствии связи на больших расстояниях указывает на существование локальных «микроочагов» передачи. Это свидетельствует о том, что распространение *M. tuberculosis* в условиях мегаполиса происходит как в рамках тесных бытовых контактов, так и через контакты в пределах локальной инфраструктуры (жилые дома, подъезды, транспорт и др.) [282].

Таким образом, эффективный эпидемиологический надзор требует интеграции геномных данных с геопространственным анализом и перехода от традиционного подхода, основанного на выявлении контактных лиц, к картированию локальных очагов передачи инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного комплексного молекулярно-генетического и эпидемиологического анализа 272 клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* сделаны следующие выводы:

1. Установлено выраженное доминирование линии 2 Beijing, доля которой составила 72,4% от исследованных изолятов, при наличии линии 4 Euro-American в 26,8% случаев. Полученные данные подтверждают, что современная популяция возбудителя туберкулеза в Казахстане характеризуется преимущественной циркуляцией восточноазиатских генетических линий и сохраняет стабильную структуру с доминированием Beijing.

2. Определена внутривидовая структура генотипа Beijing. Установлено преобладание сублиний Central Asia (49,2%) и Central Asia Outbreak (CAO) (44,2%), которые формируют основную часть циркулирующего генетического пула возбудителя. Сублиния CAO характеризуется выраженной клональной структурой и формированием эпидемиологических кластеров с низкой SNP-дистанцией, что указывает на ее активное участие в современных процессах передачи туберкулезной инфекции.

3. Охарактеризирован генетический профиль лекарственной устойчивости циркулирующих изолятов *M. tuberculosis*. Установлено, что частота МЛУ-ТБ составляет 29,0%. Среди устойчивых изолятов выявлены основные мутационные маркеры: S450L в гене *rpoB*, связанная с устойчивостью к рифампицину (91,1%), и S315T в гене *katG*, ассоциированная с устойчивостью к изониазиду (99,2%). Высокая распространенность этих мутаций указывает на закрепление устойчивых вариантов и необходимость молекулярно-генетического мониторинга для контроля распространения МЛУ-ТБ.

4. На основании интегрированного анализа SNP-кластеризации и клинико-эпидемиологических данных установлено, что большинство изолятов связано с недавней передачей инфекции. При пороге генетической близости ≤ 12 SNP 252 изолята (92,65%) соответствовали вероятной недавней трансмиссии, тогда как 20 изолятов (7,35%) имеют признаки реактивации ранее перенесенной инфекции. Результаты предполагают трансмиссионный характер распространения лекарственно-устойчивых генотипов *M. tuberculosis* в исследуемой популяции.

5. Проведен анализ генетико-географической структуры изолятов Алматинского региона. Глобальный тест Мантеля не выявил значимой корреляции между ними (r = 0,06173; p = 0,1628), что указывает на диффузное распространение эпидемических клонов. Однако коррелограммный анализ выявил очень слабую локальную пространственную связь (по шкале Чеддока) связь на расстояниях до 8 км, свидетельствующую о возможной недавней передаче инфекции (r = 0,0623; p = 0,048).

Полученные результаты подтверждают значимость внедрения WGS в эпидемиологический надзор за туберкулезом в Казахстане. Метод позволяет выявлять генетические профили, маркеры устойчивости, цепочки передачи и эпидемиологически значимые клоны, включая сублинию CAO генотипа Beijing с высоким потенциалом распространения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Global tuberculosis report 2023. – Geneva: World Health Organization, 2023. – Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

2 Chakaya J., Khan M., Ntoumi F., Aklillu E., Fatima R., Mwaba P., Kapata N., Mfinanga S., Hasnain S.E., Katoto P.D.M.C., Bulabula A.N.H., Sam-Agudu N.A., Nachega J.B., Tiberi S., McHugh T.D., Abubakar I., Zumla A. Global Tuberculosis Report 2020 – Reflections on the global TB burden, treatment and prevention efforts // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 113, Suppl. 1. – P. S7–S12. – DOI: 10.1016/j.ijid.2021.02.107.

3 Pai M., Behr M., Dowdy D., Dheda K., Divangahi M., Boehme C.C., Ginsberg A., Swaminathan S., Spigelman M., Getahun H., Menzies D., Raviglione M., Zumla A. Tuberculosis // *Nature Reviews Disease Primers*. – 2016. – Vol. 2. – Art. 16076. – DOI: 10.1038/nrdp.2016.76.

4 Harding E. WHO global progress report on tuberculosis elimination // *The Lancet Respiratory Medicine*. – 2020. – Vol. 8. – № 1. – P. 19. – DOI: 10.1016/S2213-2600(19)30418-7.

5 McQuaid C.F., Vassall A., Cohen T., Fiekert K., White R.G. The impact of COVID-19 on TB: a review of the data // *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. – 2021. – Vol. 25. – № 6. – P. 436–446. – DOI: 10.5588/ijtld.21.0148.

6 Cilloni L., Fu H., Vesga J.F., Dowdy D., Pretorius C., Ahmedov S., Nair S.A., Mosneaga A., Masini E., Sahu S., Arinaminpathy N. The potential impact of the COVID-19 pandemic on the tuberculosis epidemic: a modelling analysis // *EClinicalMedicine*. – 2020. – Vol. 28. – Art. 100603. – DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100603.

7 Martinez L., Warren J.L., Harries A.D., Croda J., Espinal M.A., Olarte R.A.L., Avedillo P., Lienhardt C., Bhatia V., Liu Q., Chakaya J., Denholm J.T., Lin Y., Kawatsu L., Zhu L., Horsburgh C.R., Cohen T., Andrews J.R. Global, regional, and national estimates of tuberculosis incidence and case detection among incarcerated individuals from 2000 to 2019: a systematic analysis // *The Lancet Public Health*. – 2023. – Vol. 8. – № 7. – P. e511–e519. – DOI: 10.1016/S2468-2667(23)00097-X.

8 Reid M.J.A., Arinaminpathy N., Bloom A., Bloom B.R., Boehme C., Chaisson R., Chin D.P., Churchyard G., Cox H., Ditiu L., Dybul M., Farrar J., Fauci A.S., Fekadu E., Fujiwara P.I., Hallett T.B., Hanson C.L., Harrington M., Herbert N., Hopewell P.C., Goosby E.P. Building a tuberculosis-free world: The Lancet Commission on tuberculosis // *Lancet*. – 2019. – Vol. 393. – № 10178. – P. 1331–1384. – DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30024-8.

9 Uplekar M., Weil D., Lonnroth K., Jaramillo E., Lienhardt C., Dias H.M., Falzon D., Floyd K., Gargioni G., Getahun H., Gilpin C., Glaziou P., Grzemska M., Mirzayev F., Nakatani H., Raviglione M. WHO's new end TB strategy // *Lancet*. – 2015. – Vol. 385. – № 9979. – P. 1799–1801. – DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60570-0.

10 Floyd K., Glaziou P., Houben R.M.G.J., Sumner T., White R.G., Raviglione M. Global tuberculosis targets and milestones set for 2016–2035: definition and

rationale // *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. – 2018. – Vol. 22. – № 7. – P. 723–730. – DOI: 10.5588/ijtld.17.0835.

11 Dheda K., Gumbo T., Maartens G., Dooley K.E., McNerney R., Murray M., Furin J., Nardell E.A., London L., Lessem E., Theron G., van Helden P., Niemann S., Merker M., Dowdy D., Van Rie A., Siu G.K., Pasipanodya J.G., Rodrigues C., Clark T.G., Warren R.M. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis // *The Lancet Respiratory Medicine*. – 2017. – DOI: 10.1016/S2213-2600(17)30079-6.

12 Hargreaves J.R., Boccia D., Evans C.A., Adato M., Petticrew M., Porter J.D. The social determinants of tuberculosis: from evidence to action // *American Journal of Public Health*. – 2011. – Vol. 101. – № 4. – P. 654–662. – DOI: 10.2105/AJPH.2010.199505.

13 Saunders M.J., Montoya R., Quevedo L., Ramos E., Datta S., Evans C.A. The social determinants of tuberculosis: a case-control study characterising pathways to equitable intervention in Peru // *Infectious Diseases of Poverty*. – 2025. – Vol. 14. – № 1. – P. 53. – DOI: 10.1186/s40249-025-01324-6.

14 Tanimura T., Jaramillo E., Weil D., Raviglione M., Lönnroth K. Financial burden for tuberculosis patients in low- and middle-income countries: a systematic review // *European Respiratory Journal*. – 2014. – Vol. 43. – P. 1763–1775. – DOI: 10.1183/09031936.00193413.

15 Horton K.C., MacPherson P., Houben R.M., White R.G., Corbett E.L. Sex differences in tuberculosis burden and notifications in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis // *PLoS Medicine*. – 2016. – Vol. 13. – № 9. – Art. e1002119. – DOI: 10.1371/journal.pmed.1002119.

16 Kussainova A., Kassym L., Kussainov A., Orazalina A., Smail Y., Derbissalina G., Bekbergenova Z., Kozhakhmetova U., Aitenova E., Semenova Y. Impact of social determinants of health on the incidence of tuberculosis in Central Asia // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2026. – Vol. 23. – № 1. – Art. 68. – DOI: 10.3390/ijerph23010068.

17 Carter D.J., Glaziou P., Lönnroth K., Siroka A., Floyd K., Weil D., Raviglione M., Houben R.M.G.J., Boccia D. The impact of social protection and poverty elimination on global tuberculosis incidence: a statistical modelling analysis of Sustainable Development Goal 1 // *The Lancet Global Health*. – 2018. – Vol. 6. – № 5. – P. e514–e522. – DOI: 10.1016/S2214-109X(18)30195-5.

18 Saunders M.J., Cegielski J.P., Clark R.A., Houben R.M.G.J., McQuaid C.F. Body mass index and tuberculosis risk: an updated systematic literature review and dose-response meta-analysis // *International Journal of Epidemiology*. – 2025. – Vol. 54. – № 5. – Art. dyaf154. – DOI: 10.1093/ije/dyaf154.

19 Pareek M., Greenaway C., Noori T., Munoz J., Zenner D. The impact of migration on tuberculosis epidemiology and control in high-income countries: a review // *BMC Medicine*. – 2016. – Vol. 14. – Art. 48. – DOI: 10.1186/s12916-016-0595-5.

20 Wild V., Jaff D., Shah N.S., Frick M. Tuberculosis, human rights and ethics considerations along the route of a highly vulnerable migrant from sub-Saharan Africa

to Europe // *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. – 2017. – Vol. 21. – № 10. – P. 1075–1085. – DOI: 10.5588/ijtld.17.0324.

21 Bell L.C.K., Noursadeghi M. Pathogenesis of HIV-1 and *Mycobacterium tuberculosis* co-infection // *Nature Reviews Microbiology*. – 2018. – Vol. 16. – № 2. – P. 80–90. – DOI: 10.1038/nrmicro.2017.128.

22 Riou C., du Bruyn E., Stek C., Daroowala R., Goliath R.T., Abrahams F., Said-Hartley Q., Allwood B.W., Hsiao N.Y., Wilkinson K.A., Arlehamn C.S.L., Sette A., Wasserman S., Wilkinson R.J., HIATUS consortium. Relationship of SARS-CoV-2-specific CD4 response to COVID-19 severity and impact of HIV-1 and tuberculosis coinfection // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2021. – Vol. 131. – № 12. – Art. e149125. – DOI: 10.1172/JCI149125.

23 del Amo J., Moreno S., Bucher H.C., Furrer H., Logan R., Sterne J., Pérez-Hoyos S., Jarrín I., Phillips A., Lodi S., van Sighem A., de Wolf W., Sabin C., Bansi L., Justice A., Goulet J., Miró J.M., Ferrer E., Meyer L., Seng R., HIV-CAUSAL Collaboration. Impact of antiretroviral therapy on tuberculosis incidence among HIV-positive patients in high-income countries // *Clinical Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 54. – № 9. – P. 1364–1372. – DOI: 10.1093/cid/cis203.

24 Restrepo B.I. Diabetes and tuberculosis // *Microbiology Spectrum*. – 2016. – Vol. 4. – № 6. – Art. 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0023-2016. – DOI: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0023-2016.

25 Burusie A., Enquesilassie F., Addissie A., Dessalegn B., Lamaro T. Effect of smoking on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis // *PLOS ONE*. – 2020. – Vol. 15. – № 9. – Art. e0239333. – DOI: 10.1371/journal.pone.0239333.

26 Imtiaz S., Shield K.D., Roerecke M., Samokhvalov A.V., Lönnroth K., Rehm J. Alcohol consumption as a risk factor for tuberculosis: meta-analyses and burden of disease // *The European Respiratory Journal*. – 2017. – Vol. 50. – № 1. – Art. 1700216. – DOI: 10.1183/13993003.00216-2017.

27 Seung K.J., Keshavjee S., Rich M.L. Multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2015. – Vol. 5. – № 9. – Art. a017863. – DOI: 10.1101/cshperspect.a017863.

28 Lange C., Aarnoutse R.E., Alffenaar J.W.C., Bothamley G., Brinkmann F., Costa J., Chesov D., van Crevel R., Dedicoat M., Dominguez J., Duarte R., Grobbel H.P., Günther G., Guglielmetti L., Heyckendorf J., Kay A.W., Kirakosyan O., Kirk O., Koczulla R.A., Kudriashov G.G., Dheda K. Management of patients with multidrug-resistant tuberculosis // *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. – 2019. – Vol. 23. – № 6. – P. 645–662. – DOI: 10.5588/ijtld.18.0622.

29 Swain S.S., Sharma D., Hussain T., Pati S. Molecular mechanisms of underlying genetic factors and associated mutations for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Emerging Microbes & Infections*. – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 1651–1663. – DOI: 10.1080/22221751.2020.1785334.

30 Allué-Guardia A., García J.I., Torrelles J.B. Evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and their adaptation to the human lung

environment // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – Art. 612675. – DOI: 10.3389/fmicb.2021.612675.

31 WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-resistant tuberculosis treatment, 2022 update. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

32 European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2021 – 2019 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2021.

33 Matteelli A., Mkrtchyan Z., Masini T., Hovhannesyan A., Kuchukhidze G., Ahmedov S., Kerndt P., Rossi L., Yedilbayev A., Falzon D., Dadu A. TB prevention activities in the WHO European Region // *IJTLD Open*. – 2024. – Vol. 1. – № 8. – P. 349–354. – DOI: 10.5588/ijtldopen.24.0350.

34 Alene K.A., Viney K., McBryde E.S., Clements A.C. Spatial patterns of multidrug resistant tuberculosis and relationships to socio-economic, demographic and household factors in northwest Ethiopia // *PloS One*. – 2017. – Vol. 12. – № 2. – Art. e0171800. – DOI: 10.1371/journal.pone.0171800.

35 Yedilbayev A., Davtyan H., Korotych O., Dadu A. Operational research to tackle TB in Eastern Europe and Central Asia: Moving forward during the COVID-19 pandemic // *Journal of Infection in Developing Countries*. – 2021. – Vol. 15. – № 9.1. – P. 1S–2S. – DOI: 10.3855/jidc.15559.

36 Nurwidya F., Handayani D., Burhan E., Yunus F. Molecular diagnosis of tuberculosis // *Chonnam Medical Journal*. – 2018. – Vol. 54. – № 1. – P. 1–9. – DOI: 10.4068/cmj.2018.54.1.1.

37 Kendall E.A., Fofana M.O., Dowdy D.W. Burden of transmitted multidrug resistance in epidemics of tuberculosis: a transmission modelling analysis // *The Lancet. Respiratory Medicine*. – 2015. – Vol. 3. – № 12. – P. 963–972. – DOI: 10.1016/S2213-2600(15)00458-0.

38 Meehan C.J., Goig G.A., Kohl T.A., Verboven L., Dippenaar A., Ezewudo M., Farhat M.R., Guthrie J.L., Laukens K., Miotto P., Ofori-Anyinam B., Dreyer V., Supply P., Suresh A., Utpatel C., van Soolingen D., Zhou Y., Ashton P.M., Brites D., Cabibbe A.M., Van Rie A. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues // *Nature Reviews. Microbiology*. – 2019. – Vol. 17. – № 9. – P. 533–545. – DOI: 10.1038/s41579-019-0214-5.

39 Shah N.S., Auld S.C., Brust J.C., Mathema B., Ismail N., Moodley P., Mlisana K., Allana S., Campbell A., Mthiyane T., Morris N., Mpangase P., van der Meulen H., Omar S.V., Brown T.S., Narechania A., Shaskina E., Kapwata T., Kreiswirth B., Gandhi N.R. Transmission of extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa // *The New England Journal of Medicine*. – 2017. – Vol. 376. – № 3. – P. 243–253. – DOI: 10.1056/NEJMoa1604544.

40 Wang L., Yang J., Chen L., Wang W., Yu F., Xiong H. Whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for prediction of drug resistance // *Epidemiology and Infection*. – 2022. – Vol. 150. – P. e22. – DOI: 10.1017/S095026882100279X.

41 Dodd P.J., Sismanidis C., Seddon J.A. Global burden of drug-resistant tuberculosis in children: a mathematical modelling study // *The Lancet. Infectious*

Diseases. – 2016. – Vol. 16. – № 10. – P. 1193–1201. – DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30132-3.

42 Yang C., Luo T., Shen X., Wu J., Gan M., Xu P., Wu Z., Lin S., Tian J., Liu Q., Yuan Z., Mei J., DeRiemer K., Gao Q. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Shanghai, China: a retrospective observational study using whole-genome sequencing and epidemiological investigation // *The Lancet. Infectious Diseases*. – 2017. – Vol. 17. – № 3. – P. 275–284. – DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30418-2.

43 Han Z., Li J., Sun G., Gu K., Zhang Y., Yao H., Jiang Y. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis in Shimen community in Shanghai, China: a molecular epidemiology study // *BMC Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 1118. – DOI: 10.1186/s12879-021-06725-0.

44 Dlamini M.T., Lessells R., Iketleng T., de Oliveira T. Whole genome sequencing for drug-resistant tuberculosis management in South Africa: What gaps would this address and what are the challenges to implementation? // *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*. – 2019. – Vol. 16. – P. 100115. – DOI: 10.1016/j.jctube.2019.100115.

45 Dookie N., Naidoo K., Padayatchi N. Whole-genome sequencing to guide the selection of treatment for drug-resistant tuberculosis // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2018. – Vol. 62. – № 8. – P. e00574-18. – DOI: 10.1128/AAC.00574-18.

46 Sakko Y., Madikenova M., Kim A., Syssoyev D., Mussina K., Gusmanov A., Zhakhina G., Yerdessov S., Semenova Y., Crape B.L., Sarria-Santamera A., Gaipov A. Epidemiology of tuberculosis in Kazakhstan: data from the Unified National Electronic Healthcare System 2014–2019 // *BMJ Open*. – 2023. – Vol. 13. – № 10. – P. e074208. – DOI: 10.1136/bmjopen-2023-074208.

47 Kulmirzayeva D., Prabakaran I., Javaid M. Retrospective analysis of tuberculosis incidence in Kazakhstan for 2000–2023 // *Journal of Health Development*. – 2025. – Vol. 60. – № 1. – P. 17–23. – DOI: 10.32921/2663-1776-2025-60-1-17-23.

48 Lim L., Mukasheva A., Alegbe A. O., Emehel A. N., Aubakirova B., Semenova Y. Public Health Communication Challenges in Eastern Europe and Central Asia: A Scoping Review // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2026. – Vol. 23. – № 1. – P. 19. – DOI: 10.3390/ijerph23010019.

49 Out A. A. Is the directly observed therapy short course (DOTS) an effective strategy for tuberculosis control in a developing country? // *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. – 2013. – Vol. 3. – № 3. – P. 227–231. – DOI: 10.1016/S2222-1808(13)60045-6.

50 World Health Organization. Kazakhstan: country profile. – Geneva: World Health Organization, 2026. – URL: https://data.who.int/countries/398 (дата обращения: 02.04.2026).

51 Bartels J. G. E., Takenov N., Chingissova L., Rakisheva A., Eleusizova A., Bismilda V., Yeraliyeva L., Ben Amor Y. Comparative Analysis of 2 Diagnostic Devices for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Drug Resistance in Almaty, Kazakhstan, to Determine the Optimal Diagnostic for Local Needs // *Open Forum Infectious Diseases*. – 2025. – Vol. 12. – № 7. – ofaf342. – DOI: 10.1093/ofid/ofaf342.

52 Kozhamkulov U., Iglikova S., Rakisheva A., Almazan J. Multidrug-Resistant Tuberculosis in Central Asia and Predominant Beijing Lineage, Challenges in Diagnosis, Treatment Barriers, and Infection Control Strategies: An Integrative Review // *Antibiotics*. – 2025. – Vol. 14. – № 7. – P. 673. – DOI: 10.3390/antibiotics14070673.

53 Министерство здравоохранения Республики Казахстан, Национальный научный центр фтизиопульмонологии Республики Казахстан. Статистический обзор по туберкулёзу в Республике Казахстан. – Алматы: ННЦФ; 2019.

54 Ryskulov G., Adenov M., Zhaparkulova M., Bissembayev A., Rakhimbekova G., Tanabayeva D., Tanabayeva S., Fakhradiyev I., Shoranov M. Trends in Tuberculosis Incidence and Treatment Outcomes in Kazakhstan: A Decade of Observational Data // *Tropical Medicine and Infectious Disease*. – 2026. – Vol. 11. – № 3. – P. 75. – DOI: 10.3390/tropicalmed11030075.

55 Dahl V. N., Butova T., Rosenthal A., Grinev A., Gabrielian A., Vashakidze S., Shubladze N., Toxanbayeva B., Chingissova L., Crudu V., Chesov D., Kalmambetova G., Saparova G., Wejse C. M., Butov D., Ukraine TB-Portal Study Group. Drug-Resistant Tuberculosis, Georgia, Kazakhstan, Kyrgyzstan, Moldova, and Ukraine, 2017-2022 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 30. – № 4. – P. 831–833. – DOI: 10.3201/eid3004.231732.

56 Migliori G. B., Thong P. M., Alffenaar J. W., Denholm J., Tadolini M., Alyaquobi F., Blanc F. X., Buonsenso D., Cho J. G., Codecasa L. R., Danila E., Duarte R., García-García J. M., Gualano G., Rendon A., Silva D. R., Souleymane M. B., Tham S. M., Thomas T. A., Tiberi S., Global Tuberculosis Network. Gauging the impact of the COVID-19 pandemic on tuberculosis services: a global study // *The European Respiratory Journal*. – 2021. – Vol. 58. – № 5. – Art. 2101786. – DOI: 10.1183/13993003.01786-2021.

57 Nazhmiden A., Junussova A., Mussabekova G., Akhmedullin R., Zhakhina G., Tursynbayeva A., Gaipov A., Adenov M., Ismailov S. Impact of the COVID-19 pandemic on TB epidemiology // *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. – 2025. – Vol. 29. – № 7. – P. 331–333. – DOI: 10.5588/ijtld.24.0676.

58 Ballif M., Banholzer N., Perrig L., Avihingsanon A., Nsonde D. M., Obatsa S., Muula G., Komena E., Uemura H., Lelo P., Otaalo B., Huwa J., Gouéssé P., Kumarasamy N., Brazier E., Michael D., Rafael I., Ramdé R., Somia I. K. A., Yotebieng M., … Global IeDEA consortium. The long-term impact of the COVID-19 pandemic on tuberculosis care and infection control measures in anti-retroviral therapy (ART) clinics in low- and middle-income countries: a multiregional site survey in Asia and Africa // *BMJ Global Health*. – 2025. – Vol. 10. – № 3. – e017828. – DOI: 10.1136/bmjgh-2024-017828.

59 Idayat M., von der Lippe E., Kozhekenova N., Amartsengel O., Akhmetova K., Oshibayeva A., Nurgaliyeva Z., Glushkova N. Prevalence of Tuberculosis in Central Asia and Southern Caucasus: A Systematic Literature Review // *Diagnostics (Basel, Switzerland)*. – 2025. – Vol. 15. – № 18. – P. 2314. – DOI: 10.3390/diagnostics15182314.

60 Cheng B., Behr M. A., Howden B. P., Cohen T., Lee R. S. Reporting practices for genomic epidemiology of tuberculosis: a systematic review of the literature using

STROME-ID guidelines as a benchmark // *The Lancet. Microbe*. – 2021. – Vol. 2. – № 3. – P. e115–e129. – DOI: 10.1016/s2666-5247(20)30201-9.

61 Takenov N., Kaziyev A., Mukhamadi A., Chingissova L., Toxanbayeva B., Bismilda V., Adenov M., Eralieva L., Nakisbekov N., Zhunussova G. Genetic diversity, drug resistance, and transmission patterns of tuberculosis based on whole-genome sequencing in Almaty, Kazakhstan // *Frontiers in Microbiology*. – 2025. – Vol. 16. – 1649137. – DOI: 10.3389/fmicb.2025.1649137.

62 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 (Edinburgh, Scotland)*. – 2015. – Vol. 95. – № 5. – P. 538–546. – DOI: 10.1016/j.tube.2015.04.012.

63 Zhdanova S., Mokrousov I., Orlova E., Sinkov V., Ogarkov O. Transborder molecular analysis of drug-resistant tuberculosis in Mongolia and Eastern Siberia, Russia // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2022. – Vol. 69. – № 5. – P. e1800–e1814. – DOI: 10.1111/tbed.14515.

64 Liebenberg D., Gordhan B. G., Kana B. D. Drug resistant tuberculosis: Implications for transmission, diagnosis, and disease management // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2022. – Vol. 12. – Art. 943545. – DOI: 10.3389/fcimb.2022.943545.

65 Nandlal L., Perumal R., Naidoo K. Rapid Molecular Assays for the Diagnosis of Drug-Resistant Tuberculosis // *Infection and Drug Resistance*. – 2022. – Vol. 15. – P. 4971–4984. – DOI: 10.2147/IDR.S381643.

66 Такенов Н. К., Абекеева Ш. Ш., Бадуова Ж. О., Балтабаев М. М. Сравнительная оценка Xpert MTB/RIF Ultra для диагностики туберкулеза и определения резистентности к рифампицину // *Фтизиопульмонология* – 2026. – № 42. – С. 12–22. – DOI: 10.26212/2227-1937.2026.58.42.002.

67 WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis – rapid diagnostics for tuberculosis detection, third edition. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

68 Bartels J. G. E., Takenov N., Chingissova L., Rakisheva A., Eleusizova A., Bismilda V., Yeraliyeva L., Ben Amor Y. Rates and risk factors of monoresistance against isoniazid and multidrug-resistant tuberculosis in Almaty, Kazakhstan // *BMC Infectious Diseases*. – 2026. – Vol. 26. – № 1. – P. 437. – DOI: 10.1186/s12879-026-12629-8.

69 Cristea V., Ködmön C., Rosales-Klintz S., Pharris A., van der Werf M. J. Monitoring the progress achieved towards ending tuberculosis in the European Union/European Economic Area, 2018 to 2021 // *Euro Surveillance*. – 2023. – Vol. 28. – № 12. – Art. 2300154. – DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2023.28.12.2300154.

70 Кусаинова А. А., Адилжанов А. Б., Адильгожин М. С., Шалгумбаева Г. М., Дербисалина Г. А., Бекбергенова Ж. Б., Умбетжанова А. Т., Кожахметова Д. К., Жокебаева М. С., Шамшудинов Т. М., Касым Л. Т. Туберкулез: распространенность, факторы риска и устойчивость к препаратам первой линии // *Наука и здравоохранение*. – 2024. – Т. 26. – № 5. – С. 177–178. – DOI: 10.34689/SH.2024.26.5.021.

71 Liu D., Huang F., Zhang G., He W., Ou X., He P., Zhao B., Zhu B., Liu F., Li Z., Liu C., Xia H., Wang S., Zhou Y., Walker T. M., Liu L., Crook D. W., Zhao Y. Whole-genome sequencing for surveillance of tuberculosis drug resistance and determination of resistance level in China // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2022. – Vol. 28. – № 5. – P. 731.e9–731.e15. – DOI: 10.1016/j.cmi.2021.09.014.

72 van der Werf M. J., Ködmön C. Whole-Genome Sequencing as Tool for Investigating International Tuberculosis Outbreaks: A Systematic Review // *Frontiers in Public Health*. – 2019. – Vol. 7. – № 87. – DOI: 10.3389/fpubh.2019.00087.

73 Sharma K., Verma R., Advani J., Chatterjee O., Solanki H. S., Sharma A., Varma S., Modi M., Ray P., Mukherjee K. K., Sharma M., Dhillion M. S., Suar M., Chatterjee A., Pandey A., Prasad T. S. K., Gowda H. Whole Genome Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates From Extrapulmonary Sites // *Omics: A Journal of Integrative Biology*. – 2017. – Vol. 21. – № 7. – P. 413–425. – DOI: 10.1089/omi.2017.0070.

74 Droznin M., Johnson A., Johnson A. M. Multidrug resistant tuberculosis in prisons located in former Soviet countries: A systematic review // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – № 3. – Art. e0174373. – DOI: 10.1371/journal.pone.0174373.

75 Yang C., Luo T., Shen X., Wu J., Gan M., Xu P., Wu Z., Lin S., Tian J., Liu Q., Yuan Z., Mei J., DeRiemer K., Gao Q. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Shanghai, China: a retrospective observational study using whole-genome sequencing and epidemiological investigation // *The Lancet. Infectious Diseases*. – 2017. – Vol. 17. – № 3. – P. 275–284. – DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30418-2.

76 Daniyarov A., Molkenov A., Rakhimova S., Akhmetova A., Yerezhepov D., Chingissova L., Bismilda V., Toksanbayeva B., Rakisheva A., Akilzhanova A., Kozhamkulov U., Kairov U. Genomic Analysis of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains From Patients in Kazakhstan // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – Vol. 12. – 683515. – DOI: 10.3389/fgene.2021.683515.

77 Jagielski T., Minias A., van Ingen J., Rastogi N., Brzostek A., Żaczek A., Dziadek J. Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Mycobacteria // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2016. – Vol. 29. – № 2. – P. 239–290. – DOI: 10.1128/CMR.00055-15.

78 Gardy J. L., Loman N. J. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system // *Nature Reviews Genetics*. – 2018. – Vol. 19. – № 1. – P. 9–20. – DOI: 10.1038/nrg.2017.88.

79 Bespiatykh D., Bespyatykh J., Mokrousov I., Shitikov E. A Comprehensive Map of Mycobacterium tuberculosis Complex Regions of Difference // *mSphere*. – 2021. – Vol. 6. – № 4. – e0053521. – DOI: 10.1128/mSphere.00535-21.

80 Gupta R. S., Lo B., Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus Mycobacterium into an Emended Genus Mycobacterium and Four Novel Genera // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – 67. – DOI: 10.3389/fmicb.2018.00067.

81 Gagneux S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis // *Nature Reviews Microbiology*. – 2018. – Vol. 16. – № 4. – P. 202–213. – DOI: 10.1038/nrmicro.2018.8.

82 Brites D., Gagneux S. The Nature and Evolution of Genomic Diversity in the Mycobacterium tuberculosis Complex // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2017. – Vol. 1019. – P. 1–26. – DOI: 10.1007/978-3-319-64371-7_1.

83 Brites D., Loiseau C., Menardo F., Borrell S., Boniotti M. B., Warren R., Dippenaar A., Parsons S. D. C., Beisel C., Behr M. A., Fyfe J. A., Coscolla M., Gagneux S. A New Phylogenetic Framework for the Animal-Adapted Mycobacterium tuberculosis Complex // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – 2820. – DOI: 10.3389/fmicb.2018.02820.

84 Lee D. F., Stewart G. R., Chambers M. A. Modelling early events in Mycobacterium bovis infection using a co-culture model of the bovine alveolus // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – 18495. – DOI: 10.1038/s41598-020-75113-6.

85 Orgeur M., Sous C., Madacki J., Brosch R. Evolution and emergence of Mycobacterium tuberculosis // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2024. – Vol. 48. – № 2. – fuae006. – DOI: 10.1093/femsre/fuae006.

86 Borrell S., Trauner A., Brites D., Rigouts L., Loiseau C., Coscolla M., Niemann S., De Jong B., Yeboah-Manu D., Kato-Maeda M., Feldmann J., Reinhard M., Beisel C., Gagneux S. Reference set of Mycobacterium tuberculosis clinical strains: A tool for research and product development // *PLoS ONE*. – 2019. – Vol. 14. – № 3. – e0214088. – DOI: 10.1371/journal.pone.0214088.

87 Chiner-Oms Á., Berney M., Boinett C., González-Candelas F., Young D. B., Gagneux S., Jacobs W. R. Jr, Parkhill J., Cortes T., Comas I. Genome-wide mutational biases fuel transcriptional diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – 3994. – DOI: 10.1038/s41467-019-11948-6.

88 Comas I., Coscolla M., Luo T., Borrell S., Holt K. E., Kato-Maeda M., Parkhill J., Malla B., Berg S., Thwaites G., Yeboah-Manu D., Bothamley G., Mei J., Wei L., Bentley S., Harris S. R., Niemann S., Diel R., Aseffa A., Gao Q., Gagneux S. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans // *Nature Genetics*. – 2013. – Vol. 45. – № 10. – P. 1176–1182. – DOI: 10.1038/ng.2744.

89 Coscolla M. Biological and Epidemiological Consequences of MTBC Diversity // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2017. – Vol. 1019. – P. 95–116. – DOI: 10.1007/978-3-319-64371-7_5.

90 Cole S. T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S. V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C. E. 3rd, Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., … Barrell B. G. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence // *Nature*. – 1998. – Vol. 393, № 6685. – P. 537–544. – DOI: 10.1038/31159.

91 Camus J. C., Pryor M. J., Médigue C., Cole S. T. Re-annotation of the genome sequence of Mycobacterium tuberculosis H37Rv // *Microbiology (Reading, England)*. – 2002. – Vol. 148, Pt 10. – P. 2967–2973. – DOI: 10.1099/00221287-148-10-2967.

92 Oppong Y. E. A., Phelan J., Perdigão J., Machado D., Miranda A., Portugal I., Viveiros M., Clark T. G., Hibberd M. L. Genome-wide analysis of Mycobacterium tuberculosis polymorphisms reveals lineage-specific associations with drug resistance

// *BMC Genomics*. – 2019. – Vol. 20. – № 1. – 252. – DOI: 10.1186/s12864-019-5615-3.

93 Gagneux S., DeRiemer K., Van T., Kato-Maeda M., de Jong B. C., Narayanan S., Nicol M., Niemann S., Kremer K., Gutierrez M. C., Hilty M., Hopewell P. C., Small P. M. Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103. – № 8. – P. 2869–2873. – DOI: 10.1073/pnas.0511240103.

94 Brites D., Gagneux S. Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens // *Immunological Reviews*. – 2015. – Vol. 264. – № 1. – P. 6–24. – DOI: 10.1111/imr.12264.

95 Liu X., Gutacker M. M., Musser J. M., Fu Y. X. Evidence for recombination in Mycobacterium tuberculosis // *Journal of Bacteriology*. – 2006. – Vol. 188. – № 23. – P. 8169–8177. – DOI: 10.1128/JB.01062-06.

96 Yan W., Zheng Y., Dou C., Zhang G., Arnaout T., Cheng W. The pathogenic mechanism of Mycobacterium tuberculosis: implication for new drug development // *Molecular Biomedicine*. – 2022. – Vol. 3. – № 1. – 48. – DOI: 10.1186/s43556-022-00106-y.

97 Ehrt S., Rhee K. Mycobacterium tuberculosis metabolism and host interaction: mysteries and paradoxes // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2013. – Vol. 374. – P. 163–188. – DOI: 10.1007/82_2012_299.

98 Houben R. M., Dodd P. J. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling // *PLoS Medicine*. – 2016. – Vol. 13. – № 10. – e1002152. – DOI: 10.1371/journal.pmed.1002152.

99 Guan Q., Garbati M., Mfarrej S., AlMutairi T., Laval T., Singh A., Fagbo S., Smyth A., Browne J. A., urRahman M. A., Alruwaili A., Hoosen A., Meehan C. J., Nakajima C., Suzuki Y., Demangel C., Bhatt A., Gordon S. V., AlAsmari F., Pain A. Insights into the ancestry evolution of the Mycobacterium tuberculosis complex from analysis of Mycobacterium riyadhense // NAR Genomics and Bioinformatics. – 2021. – Vol. 3. – № 3. – lqab070. – DOI: 10.1093/nargab/lqab070.

100 Brosch R., Gordon S. V., Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K., Garnier T., Gutierrez C., Hewinson G., Kremer K., Parsons L. M., Pym A. S., Samper S., van Soolingen D., Cole S. T. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. – Vol. 99. – № 6. – P. 3684–3689. – DOI: 10.1073/pnas.052548299.

101 Couvin D., Allaguy A. S., Ez-Zari A., Jagielski T., Rastogi N. Molecular typing of Mycobacterium tuberculosis: a review of current methods, databases, softwares, and analytical tools // *FEMS microbiology reviews*. – 2025. – Vol. 49. – fuaf017. – DOI: 10.1093/femsre/fuaf017.

102 Stucki D., Brites D., Jeljeli L., Coscolla M., Liu Q., Trauner A., Fenner L., Rutaihwa L., Borrell S., Luo T., Gao Q., Kato-Maeda M., Ballif M., Egger M., Macedo R., Mardassi H., Moreno M., Tudo Vilanova G., Fyfe J., Globan M., … Gagneux S. Mycobacterium tuberculosis lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages // *Nature genetics*. – 2016. – Vol. 48. – № 12. – P. 1535–1543. – DOI: 10.1038/ng.3704.

103 Coscolla M., Gagneux S. Consequences of genomic diversity in Mycobacterium tuberculosis // *Seminars in immunology*. – 2014. – Vol. 26. – № 6. – P. 431–444. – DOI: 10.1016/j.smim.2014.09.012.

104 Walker T. M., Ip C. L., Harrell R. H., Evans J. T., Kapatai G., Dedicoat M. J., Eyre D. W., Wilson D. J., Hawkey P. M., Crook D. W., Parkhill J., Harris D., Walker A. S., Bowden R., Monk P., Smith E. G., Peto T. E. Whole-genome sequencing to delineate Mycobacterium tuberculosis outbreaks: a retrospective observational study // *The Lancet. Infectious diseases*. – 2013. – Vol. 13. – № 2. – P. 137–146. – DOI: 10.1016/S1473-3099(12)70277-3.

105 Roetzer A., Diel R., Kohl T. A., Rückert C., Nübel U., Blom J., Wirth T., Jaenicke S., Schuback S., Rüsch-Gerdes S., Supply P., Kalinowski J., Niemann S. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a Mycobacterium tuberculosis outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study // *PLoS medicine*. – 2013. – Vol. 10. – № 2. – e1001387. – DOI: 10.1371/journal.pmed.1001387.

106 Rojas V. M. R., Zwyer M., Bouaouina S., Brites D., Borrell S., Gagneux S. Mycobacterium tuberculosis complex Lineage 1: A neglected cause of tuberculosis // *PLoS neglected tropical diseases*. – 2025. – Vol. 19. – № 10. – e0013513. – DOI: 10.1371/journal.pntd.0013513.

107 Menardo F., Duchêne S., Brites D., Gagneux S. The molecular clock of Mycobacterium tuberculosis // *PLoS pathogens*. – 2019. – Vol. 15. – № 9. – e1008067. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1008067.

108 Farhat M. R., Shapiro B. J., Kieser K. J., Sultana R., Jacobson K. R., Victor T. C., Warren R. M., Streicher E. M., Calver A., Sloutsky A., Kaur D., Posey J. E., Plikaytis B., Oggioni M. R., Gardy J. L., Johnston J. C., Rodrigues M., Tang P. K., Kato-Maeda M., Borowsky M. L., … Murray M. Genomic analysis identifies targets of convergent positive selection in drug-resistant Mycobacterium tuberculosis // *Nature genetics*. – 2013. – Vol. 45. – № 10. – P. 1183–1189. – DOI: 10.1038/ng.2747.

109 Wang J. L., Chen Y. L., Guan C. P., Yu K., Wang M. S. Clinical Mycobacterium tuberculosis isolates exhibit a molecular clock rate below 1 SNP per genome per year // *Frontiers in microbiology*. – 2025. – Vol. 16. – P. 1591792. – DOI: 10.3389/fmicb.2025.1591792.

110 Pepperell C. S., Casto A. M., Kitchen A., Granka J. M., Cornejo O. E., Holmes E. C., Birren B., Galagan J., Feldman M. W. The role of selection in shaping diversity of natural M. tuberculosis populations // *PLoS pathogens*. – 2013. – Vol. 9, № 8. – P. e1003543. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1003543.

111 Chiner-Oms Á., González-Candelas F., Comas I. Gene expression models based on a reference laboratory strain are poor predictors of Mycobacterium tuberculosis complex transcriptional diversity // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – P. 3813. – DOI: 10.1038/s41598-018-22237-5.

112 Bohada-Lizarazo D. P., Bravo-Sanabria K. D., Cárdenas-Malpica P., Rodríguez R. Comparative Genomic Analysis of Mycobacterium tuberculosis Isolates Circulating in North Santander, Colombia // *Tropical Medicine and Infectious Disease*. – 2024. – Vol. 9, № 9. – P. 197. – DOI: 10.3390/tropicalmed9090197.

113 Ramon-Luing L. A., Palacios Y., Ruiz A., Téllez-Navarrete N. A., Chavez-Galan L. Virulence Factors of Mycobacterium tuberculosis as Modulators of Cell Death Mechanisms // *Pathogens (Basel, Switzerland)*. – 2023. – Vol. 12, № 6. – P. 839. – DOI: 10.3390/pathogens12060839.

114 Zhang Y., Yew W. W. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis // *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. – 2009. – Vol. 13, № 11. – P. 1320–1330.

115 Dokrungkoon T., Tulyaprawat O., Suwannakarn K., Ngamskulrungroj P. In vitro modeling of isoniazid resistance mechanisms in Mycobacterium tuberculosis H37Rv // Frontiers in microbiology. – 2023. – Vol. 14. – Article 1171861. – DOI: 10.3389/fmicb.2023.1171861

116 Georghiou S. B., Tukvadze N., Rodrigues C., Omar S. V., Cabibbe A. M., Seifert M., Uplekar S., Ismail N., Ruhwald M., Suresh A., Colman R. E. Targeted next-generation sequencing for drug-resistant tuberculosis diagnosis: implementation considerations for bacterial load, regimen selection and diagnostic algorithm placement // *BMJ Global Health*. – 2025. – Vol. 10. – № 11. – e019135. – DOI: 10.1136/bmjgh-2025-019135.

117 Gagneux S., Long C. D., Small P. M., Van T., Schoolnik G. K., Bohannan B. J. The competitive cost of antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis // *Science (New York, N.Y.)*. – 2006. – Vol. 312. – № 5782. – P. 1944–1946. – DOI: 10.1126/science.1124410.

118 Andersson D. I., Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? // *Nature reviews. Microbiology*. – 2010. – Vol. 8. – № 4. – P. 260–271. – DOI: 10.1038/nrmicro2319.

119 Comas I., Borrell S., Roetzer A., Rose G., Malla B., Kato-Maeda M., Galagan J., Niemann S., Gagneux S. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes // *Nature genetics*. – 2011. – Vol. 44. – № 1. – P. 106–110. – DOI: 10.1038/ng.1038.

120 Che Y., Li X., Zhang D., Sang G., Gao J., Gao J., Lu Y., Liu Z. Characteristics of compensatory mutations in rifampicin-resistant tuberculosis and their association with compensated transmission in Ningbo, China // *BMC microbiology*. – 2025. – Vol. 25. – № 1. – P. 634. – DOI: 10.1186/s12866-025-04390-w.

121 Merker M., Barbier M., Cox H., Rasigade J. P., Feuerriegel S., Kohl T. A., Diel R., Borrell S., Gagneux S., Nikolayevskyy V., Andres S., Nübel U., Supply P., Wirth T., Niemann S. Compensatory evolution drives multidrug-resistant tuberculosis in Central Asia // *eLife*. – 2018. – Vol. 7. – e38200. – DOI: 10.7554/eLife.38200.

122 Borrell S., Gagneux S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. – 2009. – Vol. 13, № 12. – P. 1456–1466.

123 Liu Q., Zuo T., Xu P., Jiang Q., Wu J., Gan M., Yang C., Prakash R., Zhu G., Takiff H. E., Gao Q. Have compensatory mutations facilitated the current epidemic

of multidrug-resistant tuberculosis? // Emerging microbes & infections. – 2018. – Vol. 7, № 1. – P. 98. – DOI: 10.1038/s41426-018-0101-6.

124 Gagneux S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis // Nature Reviews Microbiology. – 2018. – Vol. 16, № 4. – P. 202–213. – DOI: 10.1038/nrmicro.2018.8.

125 Freschi L., Vargas R., Husain A., et al. Population structure, biogeography and transmissibility of Mycobacterium tuberculosis // Nature Communications. – 2021. – Vol. 12. – Article 6099. – DOI: 10.1038/s41467-021-26248-1.

126 Brites D., Loiseau C., Menardo F., Borrell S., Boniotti M. B., Warren R., Dippenaar A., Parsons S. D. C., Beisel C., Behr M. A., Fyfe J. A., Coscolla M., Gagneux S. A New Phylogenetic Framework for the Animal-Adapted Mycobacterium tuberculosis Complex // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol. 9. – Article 2820. – DOI: 10.3389/fmicb.2018.02820.

127 Coll F., McNerney R., Guerra-Assunção J. A., Glynn J. R., Perdigão J., Viveiros M., Portugal I., Pain A., Martin N., Clark T. G. A robust SNP barcode for typing Mycobacterium tuberculosis complex strains // Nature Communications. – 2014. – Vol. 5. – Article 4812. – DOI: 10.1038/ncomms5812.

128 Ei P. W., Aung W. W., Lee J. S., Choi G. E., Chang C. L. Molecular Strain Typing of Mycobacterium tuberculosis: a Review of Frequently Used Methods // Journal of Korean Medical Science. – 2016. – Vol. 31, № 11. – P. 1673–1683. – DOI: 10.3346/jkms.2016.31.11.1673.

129 Ashton P. M., Cha J., Anscombe C., Thuong N. T. T., Thwaites G. E., Walker T. M. Distribution and origins of Mycobacterium tuberculosis L4 in Southeast Asia // Microbial Genomics. – 2023. – Vol. 9, № 2. – mgen000955. – DOI: 10.1099/mgen.0.000955.

130 Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg N., Lecher S., Willery E., Blum M. G., Rüsch-Gerdes S., Mokrousov I., Aleksic E., Allix-Béguec C., Antierens A., Augustynowicz-Kopeć E., Ballif M., Barletta F., Beck H. P., Barry C. E., 3rd, Bonnet M., Borroni E., Campos-Herrero I., … Wirth T. Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage // Nature Genetics. – 2015. – Vol. 47, № 3. – P. 242–249. – DOI: 10.1038/ng.

131 Stucki D., Brites D., Jeljeli L., Coscolla M., Liu Q., Trauner A., Fenner L., Rutaihwa L., Borrell S., Luo T., Gao Q., Kato-Maeda M., Ballif M., Egger M., Macedo R., Mardassi H., Moreno M., Tudo Vilanova G., Fyfe J., Globan M., … Gagneux S. Mycobacterium tuberculosis lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages // Nature Genetics. – 2016. – Vol. 48, № 12. – P. 1535–1543. – DOI: 10.1038/ng.3704.

132 Asare P., Asante-Poku A., Prah D. A., Borrell S., Osei-Wusu S., Otchere I. D., Forson A., Adjapong G., Koram K. A., Gagneux S., Yeboah-Manu D. Reduced transmission of Mycobacterium africanum compared to Mycobacterium tuberculosis in urban West Africa // International Journal of Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 73. – P. 30–42. – DOI: 10.1016/j.ijid.2018.05.014.

133 Yimer S. A., Norheim G., Namouchi A., Zegeye E. D., Kinander W., Tønjum T., Bekele S., Mannsåker T., Bjune G., Aseffa A., Holm-Hansen C. Mycobacterium tuberculosis lineage 7 strains are associated with prolonged patient

delay in seeking treatment for pulmonary tuberculosis in Amhara Region, Ethiopia // Journal of Clinical Microbiology. – 2015. – Vol. 53, № 4. – P. 1301–1309. – DOI: 10.1128/JCM.03566-14.

134 Ngabonziza J. C. S., Loiseau C., Marceau M., Jouet A., Menardo F., Tzfadia O., Antoine R., Niyigena E. B., Mulders W., Fissette K., Diels M., Gaudin C., Duthoy S., Ssengooba W., André E., Kaswa M. K., Habimana Y. M., Brites D., Affolabi D., Mazarati J. B., Supply P. A sister lineage of the Mycobacterium tuberculosis complex discovered in the African Great Lakes region // Nature Communications. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 2917. – DOI: 10.1038/s41467-020-16626-6.

135 Coscolla M., Gagneux S., Menardo F., Loiseau C., Ruiz-Rodriguez P., Borrell S., Otchere I. D., Asante-Poku A., Asare P., Sánchez-Busó L., Gehre F., Sanoussi C. N., Antonio M., Affolabi D., Fyfe J., Beckert P., Niemann S., Alabi A. S., Grobusch M. P., Kobbe R., … Brites D. Phylogenomics of Mycobacterium africanum reveals a new lineage and a complex evolutionary history // Microbial Genomics. – 2021. – Vol. 7, № 2. – P. 000477. – DOI: 10.1099/mgen.0.000477.

136 Comas I., Coscolla M., Luo T., Borrell S., Holt K. E., Kato-Maeda M., Parkhill J., Malla B., Berg S., Thwaites G., Yeboah-Manu D., Bothamley G., Mei J., Wei L., Bentley S., Harris S. R., Niemann S., Diel R., Aseffa A., Gao Q., … Gagneux S. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans // Nature Genetics. – 2013. – Vol. 45, № 10. – P. 1176–1182. – DOI: 10.1038/ng.2744.

137 Gagneux S., Small P. M. Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development // The Lancet Infectious Diseases. – 2007. – Vol. 7, № 5. – P. 328–337. – DOI: 10.1016/S1473-3099(07)70108-1.

138 Atavliyeva S., Auganova D., Tarlykov P. Genetic diversity, evolution and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 2 // *Frontiers in Microbiology*. – 2024. – Vol. 15. – Article 1384791. – DOI: 10.3389/fmicb.2024.1384791.

139 Mvubu N. E., Jacoby K. Mycobacterium tuberculosis complex molecular networks and their regulation: Implications of strain heterogeneity on epigenetic diversity and transcriptome regulation // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 9, № 12. – e22611. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e22611.

140 Srilohasin P., Prammananan T., Faksri K., Phelan J. E., Suriyaphol P., Kamolwat P., Smithtikarn S., Disratthakit A., Regmi S. M., Leechawengwongs M., Twee-Hee Ong R., Teo Y. Y., Tongsima S., Clark T. G., Chaiprasert A. Genomic evidence supporting the clonal expansion of extensively drug-resistant tuberculosis bacteria belonging to a rare proto-Beijing genotype // *Emerging Microbes & Infections*. – 2020. – Vol. 9, № 1. – P. 2632–2641. – DOI: 10.1080/22221751.2020.1852891.

141 Orgeur M., Brosch R. Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex // *Current Opinion in Microbiology*. – 2018. – Vol. 41. – P. 68–75. – DOI: 10.1016/j.mib.2017.11.021.

142 Lan Y., Rancu I., Chitwood M. H., Sobkowiak B., Nyhan K., Lin H. H., Wu C. Y., Mathema B., Brown T. S., Colijn C., Warren J. L., Cohen T. Integrating genomic and spatial analyses to describe tuberculosis transmission: a scoping review // *The*

Lancet Microbe. – 2025. – Vol. 6, № 8. – 101094. – DOI: 10.1016/j.lanmic.2025.101094

143 Yang T., Wang Y., Liu Q., Jiang Q., Hong C., Wu L., Li S., Zhu C., Takiff H., Yu W., Tan W., Gao Q. A population-based genomic epidemiological study of the source of tuberculosis infections in an emerging city: Shenzhen, China // *The Lancet Regional Health – Western Pacific*. – 2021. – Vol. 8. – 100106. – DOI: 10.1016/j.lanwpc.2021.100106

144 Meehan C. J., Moris P., Kohl T. A., Pečerska J., Akter S., Merker M., Utpatel C., Beckert P., Gehre F., Lempens P., Stadler T., Kaswa M. K., Kühnert D., Niemann S., de Jong B. C. The relationship between transmission time and clustering methods in *Mycobacterium tuberculosis* epidemiology // *EBioMedicine*. – 2018. – Vol. 37. – P. 410–416. – DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.10.013.

145 Tagliani E., Anthony R., Kohl T. A., de Neeling A., Nikolayevskyy V., Ködmön C., Maurer F. P., Niemann S., van Soolingen D., van der Werf M. J., Cirillo D. M., ECDC molecular surveillance project participants. Use of a whole genome sequencing-based approach for *Mycobacterium tuberculosis* surveillance in Europe in 2017-2019: an ECDC pilot study // *The European respiratory journal*. – 2021. – Vol. 57, № 1. – DOI: 10.1183/13993003.02272-2020

146 Advani J., Verma R., Chatterjee O., Pachouri P. K., Upadhyay P., Singh R., Yadav J., Naaz F., Ravikumar R., Buggi S., Suar M., Gupta U. D., Pandey A., Chauhan D. S., Tripathy S. P., Gowda H., Prasad T. S. K. Whole Genome Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates From India Reveals Genetic Heterogeneity and Region-Specific Variations That Might Affect Drug Susceptibility // *Frontiers in microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – DOI: 10.3389/fmicb.2019.00309.

147 Asare P., Asante-Poku A., Osei-Wusu S., Otchere I. D., Yeboah-Manu D. The Relevance of Genomic Epidemiology for Control of Tuberculosis in West Africa // *Frontiers in public health*. – 2021. – Vol. 9. – DOI: 10.3389/fpubh.2021.706651.

148 Witney A. A., Gould K. A., Arnold A., Coleman D., Delgado R., Dhillon J., Pond M. J., Pope C. F., Planche T. D., Stoker N. G., Cosgrove C. A., Butcher P. D., Harrison T. S., Hinds J. Clinical application of whole-genome sequencing to inform treatment for multidrug-resistant tuberculosis cases // *Journal of clinical microbiology*. – 2015. – Vol. 53, № 5. – P. 1473–1483. – DOI: 10.1128/JCM.02993-14.

149 Auganova D., Atavliyeva S., Amirgazin A., Akisheva A., Tsepke A., Tarlykov P. Genomic Characterization of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis L2/Beijing Isolates from Astana, Kazakhstan // *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. – 2023. – Vol. 12, № 10. – P. 1523. – DOI: 10.3390/antibiotics12101523.

150 Shah Y., Poudel A., Maharjan B., Thapa J., Yamaguchi T., Diab H. M., Pandey B. D., Solo E., Isoda N., Suzuki Y., Nakajima C. Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis Central Asian Strain isolates from Nepal and comparison with neighboring countries // *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. – 2019. – Vol. 113, № 4. – P. 203–211. – DOI: 10.1093/trstmh/try136.

151 Spies R., Crook D. W., Peto T. E. A., Fowler P. W., Turner R., Thai H., Watson J. A., Walker T. M. Evaluating 12 automated, whole-genome sequencing analysis pipelines for Mycobacterium tuberculosis complex: a comparative study // *The*

Lancet. Microbe. – 2025. – Vol. 6, № 12. – P. 101210. – DOI: 10.1016/j.lanmic.2025.101210.

152 Wang L., Yang J., Chen L., Wang W., Yu F., Xiong H. Whole-genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis for prediction of drug resistance // *Epidemiology and infection*. – 2022. – Vol. 150. – P. e22. – DOI: 10.1017/S095026882100279X.

153 Lan Y., Rancu I., Chitwood M. H., Sobkowiak B., Nyhan K., Lin H. H., Wu C. Y., Mathema B., Brown T. S., Colijn C., Warren J. L., Cohen T. Integrating genomic and spatial analyses to describe tuberculosis transmission: a scoping review // *The Lancet. Microbe*. – 2025. – Vol. 6, № 8. – P. 101094. – DOI: 10.1016/j.lanmic.2025.101094.

154 Parwati I., van Crevel R., van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains // *The Lancet. Infectious diseases*. – 2010. – Vol. 10, № 2. – P. 103–111. – DOI: 10.1016/S1473-3099(09)70330-5.

155 Liu Q., Wang D., Martinez L., Lu P., Zhu L., Lu W., Wang J. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains and unfavourable treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis // *Clinical microbiology and infection*. – 2020. – Vol. 26, № 2. – P. 180–188. – DOI: 10.1016/j.cmi.2019.07.016.

156 Luo T., Comas I., Luo D., Lu B., Wu J., Wei L., Yang C., Liu Q., Gan M., Sun G., Shen X., Liu F., Gagneux S., Mei J., Lan R., Wan K., Gao Q. Southern East Asian origin and coexpansion of Mycobacterium tuberculosis Beijing family with Han Chinese // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – Vol. 112, № 26. – P. 8136–8141. – DOI: 10.1073/pnas.1424063112.

157 Vyazovaya A., Gerasimova A., Mudarisova R., Terentieva D., Solovieva N., Zhuravlev V., Mokrousov I. Genetic Diversity and Primary Drug Resistance of Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype Strains in Northwestern Russia // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11, № 2. – P. 255. – DOI: 10.3390/microorganisms11020255.

158 Yin Qq., Liu Hc., Jiao Ww. et al. Evolutionary History and Ongoing Transmission of Phylogenetic Sublineages of Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype in China // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 34353. – DOI: 10.1038/srep34353.

159 Мокроусов И.В., Вязовая А.А., Бадлеева М.В., Герасимова А.А., Белопольская О.Б., Машарский А.Э., Костюкова И.В., Жданова С.Н., Мударисова Р.С., Авадэний И., Соловьева Н.С., Найзабаева Д.А., Скиба Ю.А., Журавлев В.Ю., Пасечник О.А., Огарков О.Б. Молекулярная детекция и филогеография гипервирулентного субтипа *Mycobacterium tuberculosis* Beijing 14717-15 // Инфекция и иммунитет. - 2023. - Т. 13. - №1. - С. 91-99. DOI: 10.15789/2220-7619-MDA-2082.

160 Ajawatanawong P., Yanai H., Smittipat N. et al. A novel Ancestral Beijing sublineage of Mycobacterium tuberculosis suggests the transition site to Modern Beijing sublineages // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – P. 13718. – DOI: 10.1038/s41598-019-50078-3.

161 Tong J., Meng L., Bei C., Liu Q., Wang M., Yang T., Takiff H. E., Zhang S., Gao Q., Wang C., Yan B. Modern Beijing sublineage of Mycobacterium tuberculosis shift macrophage into a hyperinflammatory status // *Emerging Microbes & Infections*. – 2022. – Vol. 11, № 1. – P. 715–724. – DOI: 10.1080/22221751.2022.2037395.

162 Zhu C., Yang T., Yin J., Jiang H., Takiff H. E., Gao Q., Liu Q., Li W. The Global Success of Mycobacterium tuberculosis Modern Beijing Family Is Driven by a Few Recently Emerged Strains // *Microbiology Spectrum*. – 2023. – Vol. 11, № 4. – e0333922. – DOI: 10.1128/spectrum.03339-22.

163 Lin D., Wang J., Cui Z., Ou J., Huang L., Wang Y. A genome epidemiological study of Mycobacterium tuberculosis in subpopulations with high and low incidence rate in Guangxi, South China // *BMC Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 21, № 1. – 840. – DOI: 10.1186/s12879-021-06385-0.

164 Holt K. E., McAdam P., Thai P. V. K., Thuong N. T. T., Ha D. T. M., Lan N. N., Lan N. H., Nhu N. T. Q., Hai H. T., Ha V. T. N., Thwaites G., Edwards D. J., Nath A. P., Pham K., Ascher D. B., Farrar J., Khor C. C., Teo Y. Y., Inouye M., Caws M., … Dunstan S. J. Frequent transmission of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage and positive selection for the EsxW Beijing variant in Vietnam // *Nature Genetics*. – 2018. – Vol. 50, № 6. – P. 849–856. – DOI: 10.1038/s41588-018-0117-9.

165 Zhu C., Yang T., Yin J., Jiang H., Takiff H. E., Gao Q., Liu Q., Li W. The Global Success of Mycobacterium tuberculosis Modern Beijing Family Is Driven by a Few Recently Emerged Strains // *Microbiology Spectrum*. – 2023. – Vol. 11, № 4. – e0333922. – DOI: 10.1128/spectrum.03339-22.

166 Luo D., Yu S., Huang Y., Zhan J., Chen Q., Yan L., Chen K. Recent Transmission and Prevalent Characterization of the Beijing Family Mycobacterium tuberculosis in Jiangxi, China // *Polish Journal of Microbiology*. – 2022. – Vol. 71, № 3. – P. 371–380. – DOI: 10.33073/pjm-2022-033.

167 Rutaihwa L.K., Menardo F., Stucki D., Gygli S.M., Ley S.D., Malla B., Feldmann J., Borrell S., Beisel C., Middelkoop K., Carter E.J., Diero L., Ballif M., Jugheli L., Reither K., Fenner L., Brites D., Gagneux S. Multiple Introductions of Mycobacterium tuberculosis Lineage 2–Beijing Into Africa Over Centuries // *Frontiers in Ecology and Evolution*. – 2019. – Vol. 7. – P. 112. – DOI: 10.3389/fevo.2019.00112.

168 Caws M., Thwaites G., Dunstan S., Hawn T.R., Lan N.T., Thuong N.T., Stepniewska K., Huyen M.N., Bang N.D., Loc T.H., Gagneux S., van Soolingen D., Kremer K., van der Sande M., Small P., Anh P.T., Chinh N.T., Quy H.T., Duyen N.T., Tho D.Q., Farrar J. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with Mycobacterium tuberculosis // *PLoS pathogens*. – 2008. – Vol. 4, № 3. – e1000034. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1000034.

169 Reed M.B., Domenech P., Manca C., Su H., Barczak A.K., Kreiswirth B.N., Kaplan G., Barry C.E., 3rd. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response // *Nature*. – 2004. – Vol. 431, № 7004. – P. 84–87. – DOI: 10.1038/nature02837.

170 Wong K.W. The Role of ESX-1 in Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis // *Microbiology spectrum*. – 2017. – Vol. 5, № 3. – DOI: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0001-2015.

171 Silcocks M., Chang X., Thuong Thuong N.T., Qin Y., Minh Ha D.T., Khac Thai P.V., Vijay S., Anh Thu D.D., Ngoc Ha V.T., Ngoc Nhung H., Huu Lan N., Quynh Nhu N.T., Edwards D., Nath A., Pham K., Duc Bang N., Hong Chau T.T., Thwaites G., Heemskerk A.D., Chuen Khor C., … Dunstan S.J. Evolution and transmission of antibiotic resistance is driven by Beijing lineage Mycobacterium tuberculosis in Vietnam // *Microbiology spectrum*. – 2023. – Vol. 11, № 6. – DOI: 10.1128/spectrum.02562-23.

172 Shi Y.-Z., Huang H.-H., Wang X.-H., Song B., Jiang T.-J., Yu M.-R., Wang Z.-R., Li R.-T., Jiao Y.-M., Su X., Wang F.-S. Retrospective Study on Genetic Diversity and Drug Resistance among People Living with HIV at an AIDS Clinic in Beijing // *Pharmaceuticals*. – 2024. – Vol. 17, № 1. – DOI: 10.3390/ph17010115.

173 He W., Tan Y., Song Z., Liu B., Xia H., Zheng H., Liu D., Liu C., He P., Wang Y., Zhao Z., Ou X., Wang S., Guo J., Zhao Y. Transmission dynamics of tuberculosis in a high-burden area of China: An 8-year population-based study using whole genome sequencing // *International journal of infectious diseases : IJID*. – 2024. – Vol. 147. – DOI: 10.1016/j.ijid.2024.107210.

174 Merker M., Kohl T. A., Roetzer A., Truebe L., Richter E., Rüsch-Gerdes S., Fattorini L., Oggioni M. R., Cox H., Varaine F., Niemann S. Whole genome sequencing reveals complex evolution patterns of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis Beijing strains in patients // *PloS one*. – 2013. – Vol. 8, № 12. – DOI: 10.1371/journal.pone.0082551.

175 Mokrousov I. Genetic geography of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: a multifacet mirror of human history? // *Infection, genetics and evolution*. – 2008. – Vol. 8, № 6. – P. 777–785. – DOI: 10.1016/j.meegid.2008.07.003.

176 Casali N., Nikolayevskyy V., Balabanova Y., Harris S. R., Ignatyeva O., Kontsevaya I., Corander J., Bryant J., Parkhill J., Nejentsev S., Horstmann R. D., Brown T., Drobniewski F. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population // *Nature genetics*. – 2014. – Vol. 46, № 3. – P. 279–286. – DOI: 10.1038/ng.2878.

177 Skiba Y., Mokrousov I., Nabirova D., Toksanbayeva B., Maltseva E., Ismagulova G., Naizabaeva D., Bissenbay A., Yurkevich N., Bismilda V., Chingissova L., Sapiyeva Z., Ismailov S., Moffett D., Adenov M. MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF TUBERCULOSIS IN KAZAKHSTAN, 2006–2018 // *Инфекция и иммунитет*. - 2018. - Т. 8. - №4. - С. 580. doi: 10.15789/2220-7619-2018-4-6.46.

178 Tientcheu L., Faal F., Top N., Jobe O., Colley S. M., Ayorinde A., Mendy A., Sarr-Kuyateh B., Donkor S., Antonio M., de Jong B., Rachow A., Kampmann B., Sutherland J. S., Li H., Blundell T., Campino S., Kohl T., Dreyer V., Niemann S., Phelan J. Genome-wide analyses of Mycobacterium tuberculosis complex isolates reveal insights into circulating lineages and drug resistance mutations in The Gambia // *Research square*. – 2025. – rs.3.rs-5913893. – DOI: 10.21203/rs.3.rs-5913893/v1.

179 Shitikov E., Vyazovaya A., Malakhova M., Guliaev A., Bespyatykh J., Proshina E., Pasechnik O., Mokrousov I. Simple Assay for Detection of the Central Asia Outbreak Clade of the Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2019. – 57(7): e00215-19. – DOI: 10.1128/JCM.00215-19.

180 Conkle-Gutierrez D., Ramirez-Busby S. M., Gorman B. M., Elghraoui A., Hoffner S., Elmaraachli W., Valafar F. Novel and reported compensatory mutations in rpoABC genes found in drug resistant tuberculosis outbreaks // *Frontiers in Microbiology*. – 2024. – 14: 1265390. – DOI: 10.3389/fmicb.2023.1265390.

181 Li H., Zhang G., Ma Z., Guo H., Shang Y., Yao C., Li S., Pang Y., Pan J. Impact of sublineage diversity on intrinsic susceptibility of Beijing genotype Mycobacterium tuberculosis // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. – 2025. – 24(1): 37. – DOI: 10.1186/s12941-025-00807-6.

182 Chakraborty P., Kulkarni S., Rajan R., Sainis K. Mycobacterium tuberculosis strains from ancient and modern lineages induce distinct patterns of immune responses // *Journal of Infection in Developing Countries*. – 2018. – 11(12): 904–911. – DOI: 10.3855/jidc.8596.

183 Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Otten T., Jiao W. W., Gomes L. L., Suffys P. N., Shen A. D., Vishnevsky B. Russian "successful" clone B0/W148 of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: a multiplex PCR assay for rapid detection and global screening // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2012. – 50(11): 3757–3759. – DOI: 10.1128/JCM.02001-12.

184 Хромова П.А., Савилов Е.Д., Шугаева С.Н., Синьков В.В., Жданова С.Н., Огарков О.Б. Влияние распространения генотипа Beijing *M. tuberculosis* и его субтипа B0/W148 на заболеваемость туберкулёзом населения европейской и азиатской частей России // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2024. – 9(4): 230–236. – DOI: 10.29413/ABS.2024-9.4.25.

185 Merker M., Barbier M., Cox H., Rasigade J., Feuerriegel S., Kohl T.A., Diel R., Borrell S., Gagneux S., Nikolayevskyy V., Andres S., Nübel U., Supply P., Wirth T., Niemann S. Compensatory evolution drives multidrug-resistant tuberculosis in Central Asia // *eLife*. – 2018. – 7. – DOI: 10.7554/eLife.38200.

186 Xiao Y.-X., Chan T.-H., Liu K.-H., Jou R. Define SNP thresholds for delineation of tuberculosis transmissions using whole-genome sequencing // *Microbiol. Spectr.* – 2024. – 12(8). – DOI: 10.1128/spectrum.00418-24.

187 Такенов Н.К., Чингисова Л.Т., Бисмилда В.Л., Казиев А.А., Шамурова З.М. Анализ штаммов *Mycobacterium tuberculosis* методом полногеномного секвенирования // *Фтизиопульмонология* – 2025. – 01. – С. 207-214. – DOI: 10.26212/2227-1937.2025.25.63.024.

188 Yerezhepov D., Gabdulkayum A., Akhmetova A., Kozhamkulov U., Rakhimova S., Kairov U., Zhunussova G., Kalendar R., Akilzhanova A. Pulmonary tuberculosis epidemiology and genetics in Kazakhstan // *Frontiers in Public Health* – 2024. – 12. – DOI: 10.3389/fpubh.2024.1340673.

189 Mencarini J., Spinicci M., Zammarchi L., Bartoloni A. Tuberculosis in the European Region // *Current Tropical Medicine Reports* – 2023. – P. 1–6. – DOI: 10.1007/s40475-023-00287-8.

190 Pontali E., Raviglione M. Updated treatment guidelines for drug-resistant TB: how safe are clofazimine-based regimens? // *IJTLD Open* – 2024. – P. 486–489. – DOI: 10.5588/ijtldopen.24.0490.

191 Maleki M. Genetic Analysis of Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Against Four Major First-Line Anti-Tuberculosis

Drugs (Isoniazid, Rifampin, Ethambutol, and Pyrazinamide) // *Infection and Drug Resistance* – 2025. – P. 4901–4915. – DOI: 10.2147/IDR.S542287.

192 Manson A. L., Cohen K. A., Abeel T., Desjardins C. A., Armstrong D. T., Barry C. E., 3rd, Brand J., TBResist Global Genome Consortium, Chapman S. B., Cho S. N., Gabrielian A., Gomez J., Jodals A. M., Joloba M., Jureen P., Lee J. S., Malinga L., Maiga M., Nordenberg D., Noroc E., … Earl A. M. Genomic analysis of globally diverse Mycobacterium tuberculosis strains provides insights into the emergence and spread of multidrug resistance // *Nature Genetics* – 2017. – P. 395–402. – DOI: 10.1038/ng.3767.

193 Ghazvini K., Khoshbakht R., Tadayon K., Mosavari N., BahramiTaghanaki H. R., Mohammadi G. R., Rashti Baf M., Nourian K., Samiei A., Ghavidel M. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from humans and animals in northeastern Iran // *Scientific Reports*. – 2023. – Vol. 13, № 1. – 6746. – DOI: 10.1038/s41598-023-33740-9.

194 Jagielski T., van Ingen J., Rastogi N., Dziadek J., Mazur P. K., Bielecki J. Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria // *BioMed Research International*. – 2014. – 2014. – 645802. – DOI: 10.1155/2014/645802.

195 Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1997. – 35(4). – P. 907–914. – DOI: 10.1128/jcm.35.4.907-914.1997.

196 Bakuła Z., Dziurzyński M., Decewicz P., Bakonytė D., Vasiliauskaitė L., Nakčerienė B., Krenke R., Stakėnas P., Jagielski T. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* - Comparing in vitro and in silico approaches // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2023. – 115. – P. 105508. – DOI: 10.1016/j.meegid.2023.105508.

197 Bogale T., Mohammed T., Zewude A., Khalifa H. O., Ameni G. Spoligotyping-based molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from Metahara sugar factory workers in Central Ethiopia // *Frontiers in Medicine*. – 2025. – 12. – P. 1641535. – DOI: 10.3389/fmed.2025.1641535.

198 Supply P., Lesjean S., Savine E., Kremer K., van Soolingen D., Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2001. – 39(10). – P. 3563–3571. – DOI: 10.1128/JCM.39.10.3563-3571.2001.

199 Teeter L. D., Kammerer J. S., Ghosh S., Nguyen D. T. M., Vempaty P., Tapia J., Miramontes R., Cronin W. A., Graviss E. A., Tuberculosis Epidemiologic Studies Consortium. Evaluation of 24-locus MIRU-VNTR genotyping in *Mycobacterium tuberculosis* cluster investigations in four jurisdictions in the United States, 2006–2010 // *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. – 2017. – 106. – P. 9–15. – DOI: 10.1016/j.tube.2017.05.003.

200 Homolka S., Projahn M., Feuerriegel S., Ubben T., Diel R., Nübel U., Niemann S. High resolution discrimination of clinical *Mycobacterium tuberculosis*

complex strains based on single nucleotide polymorphisms // *PloS One*. – 2012. – 7(7). – e39855. – DOI: 10.1371/journal.pone.0039855.

201 Kargarpour Kamakoli M., Hadifar S., Khanipour S., Farmanfarmaei G., Fateh A., Siadat S. D., Vaziri F. Comparison of MIRU-VNTR genotyping between old and fresh clinical samples in tuberculosis // *Infectious Diseases (London, England)*. – 2019. – 51(9). – 659–667. – DOI: 10.1080/23744235.2019.1638963.

202 Belakehal F., Barth S. A., Menge C., Mossadak H. T., Malek N., Moser I. Evaluation of the discriminatory power of spoligotyping and 19-locus mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat analysis (MIRU-VNTR) of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle in Algeria // *PLoS One*. – 2022. – 17(1). – e0262390. – DOI: 10.1371/journal.pone.0262390.

203 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. – (316-317). – P. 129–135. – DOI: 10.13140/RG.2.2.34682.52162.

204 The use of next-generation sequencing for the surveillance of drug-resistant tuberculosis: an implementation manual. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

205 Gardy J. L., Johnston J. C., Ho Sui S. J., Cook V. J., Shah L., Brodkin E., Rempel S., Moore R., Zhao Y., Holt R., Varhol R., Birol I., Lem M., Sharma M. K., Elwood K., Jones S. J., Brinkman F. S., Brunham R. C., Tang P. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak // *The New England Journal of Medicine*. – 2011. – 364(8). – P. 730–739. – DOI: 10.1056/NEJMoa1003176.

206 Stimson J., Gardy J., Mathema B., Crudu V., Cohen T., Colijn C. Beyond the SNP Threshold: Identifying Outbreak Clusters Using Inferred Transmissions // *Molecular Biology and Evolution*. – 2019. – 36(3). – P. 587–603. – DOI: 10.1093/molbev/msy242.

207 Billard-Pomares T., Marin J., Quagliaro P., Méchaï F., Walewski V., Dziri S., Carbonnelle E. Use of Whole-Genome Sequencing to Explore *Mycobacterium tuberculosis* Complex Circulating in a Hotspot Department in France // *Microorganisms*. – 2022. – 10(8). – P. 1586. – DOI: 10.3390/microorganisms10081586.

208 Nieto Ramirez L. M., Quintero Vargas K., Diaz G. Whole Genome Sequencing for the Analysis of Drug Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review for Bedaquiline and Delamanid // *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. – 2020. – 9(3). – P. 133. – DOI: 10.3390/antibiotics9030133.

209 Walker T. M., Merker M., Kohl T. A., Crook D. W., Niemann S., Peto T. E. Whole genome sequencing for M/XDR tuberculosis surveillance and for resistance testing // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2017. – 23(3). – P. 161–166. – DOI: 10.1016/j.cmi.2016.10.014.

210 Phelan J. E., O'Sullivan D. M., Machado D., Ramos J., Oppong Y. E. A., Campino S., O'Grady J., McNerney R., Hibberd M. L., Viveiros M., Huggett J. F., Clark T. G. Integrating informatics tools and portable sequencing technology for rapid

detection of resistance to anti-tuberculous drugs // *Genome Medicine*. – 2019. – 11(1). – P. 41. – DOI: 10.1186/s13073-019-0650-x.

211 Hunt M., Bradley P., Lapierre S. G., Heys S., Thomsit M., Hall M. B., Malone K. M., Wintringer P., Walker T. M., Cirillo D. M., Comas I., Farhat M. R., Fowler P., Gardy J., Ismail N., Kohl T. A., Mathys V., Merker M., Niemann S., Omar S. V., Iqbal Z. Antibiotic resistance prediction for *Mycobacterium tuberculosis* from genome sequence data with Mykrobe // *Wellcome Open Research*. – 2019. – 4. – P. 191. – DOI: 10.12688/wellcomeopenres.15603.1.

212 Yassine E., Galiwango R., Ssengooba W., Ashaba F., Joloba M. L., Zalwango S., Whalen C. C., Quinn F. Assessing a transmission network of *Mycobacterium tuberculosis* in an African city using single nucleotide polymorphism threshold analysis // *MicrobiologyOpen*. – 2021. – 10(3). – P. e1211. – DOI: 10.1002/mbo3.1211.

213 Didelot X., Fraser C., Gardy J., Colijn C. Genomic infectious disease epidemiology in partially sampled and ongoing outbreaks // *Molecular Biology and Evolution*. – 2017. – 34(4). – P. 997–1007. – DOI: 10.1093/molbev/msw275.

214 Dixit A., Freschi L., Vargas R., et al. Whole genome sequencing identifies bacterial factors affecting transmission of multidrug-resistant tuberculosis in a high-prevalence setting // *Scientific Reports*. – 2019. – 9. – Article 5602. – DOI: 10.1038/s41598-019-41967-8.

215 Bjorn-Mortensen K., Soborg B., Koch A., Ladefoged K., Merker M., Lillebaek T., Andersen A. B., Niemann S., Kohl T. A. Tracing *Mycobacterium tuberculosis* transmission by whole genome sequencing in a high incidence setting: a retrospective population-based study in East Greenland // *Scientific Reports*. – 2016. – 6. – Article 33180. – DOI: 10.1038/srep33180.

216 Ауганова Д. Н., Атавлиева С. Ш., Амиргазин А. О., Акишева А. С., Абельденов С. К., Цепке А. Б., Тарлыков П. В. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в г. Астана // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. – 2024. – № 3. – DOI: 10.11134/btp.3.2024.10.

217 Синьков В. В., Огарков О. Б. Популяционная структура субтипа B0/W148 *Mycobacterium tuberculosis*: филогенетический анализ и особенности генотипической лекарственной устойчивости // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2024. – 9(4). – С. 248–259. – DOI: 10.29413/ABS.2024-9.4.27.

218 Жданова С.Н., Вязовая А.А., Лебедева И.Б., Синьков В.В., Кондратов И.Г., Шварц Я.Ш., Рычкова Л.В., Брусина Е.Б., Мокроусов И.В., Огарков О.Б. Циркуляция штаммов Mycobacterium tuberculosis Beijing Central Asian Outbreak в Кемеровской области — Кузбассе в 2018–2022 годах // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2024. - Т. 101. - №5. - С. 628-640. DOI: 10.36233/0372-9311-571.

219 Abilova Zh., Akhmetova A., Kadenova T., Satvaldina N., Daniyarov A., Kairov U., Akilzhanova A., Almazan J., Kozhamkulov U. Association of multi drug resistant tuberculosis with the Beijing family of *M. tuberculosis* in Kazakhstan // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. – 2025. – № 3S. – Life Sciences Today 2025, 17–19 September 2025, Astana, Kazakhstan.

220 Lin M., Chen Y. W., Li Y. R., Long L. J., Qi L. Y., Cui T. T., Wu S. Y., Lin J. Y., Wu T., Yang Y. C., Yuan W. H., Wu G. Y., Lan Q. W., Liu J. Q., Li Y. P., Yu Z. Y., Guo X. G. Systematic evaluation of line probe assays for the diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. – 2022. – 533. – P. 183–218. – DOI: 10.1016/j.cca.2022.06.020.

221 Prikhodchenko O., Arbuzova Y., Serikbayeva K., Zhakhina G., Rakisheva A., Mussabekova G., Akhmedullin R., Tursynbayeva A., Gaipov A., Adenov M., Ismailov S. Epidemiology, detection, diagnosis and treatment of TB in children in Kazakhstan // *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: the Official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. – 2025. – 29(3). – P. 135–140. – DOI: 10.5588/ijtld.24.0536.

222 Wyllie D. H., Davidson J. A., Grace Smith E., Rathod P., Crook D. W., Peto T. E. A., Robinson E., Walker T., Campbell C. A Quantitative Evaluation of MIRU-VNTR Typing Against Whole-Genome Sequencing for Identifying Mycobacterium tuberculosis Transmission: A Prospective Observational Cohort Study // *EBioMedicine*. – 2018. – 34. – P. 122–130. – DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.07.019.

223 Beviere M., Reissier S., Penven M., Dejoies L., Guerin F., Cattoir V., Piau C. The Role of Next-Generation Sequencing (NGS) in the Management of Tuberculosis: Practical Review for Implementation in Routine // *Pathogens (Basel, Switzerland)*. – 2023. – 12(8). – P. 978. – DOI: 10.3390/pathogens12080978.

224 Mogashoa T., Melamu P., Ley S. D., Streicher E. M., Iketleng T., Kelentse N., Mupfumi L., Mokomane M., Kgwaadira B., Novitsky V., Kasvosve I., Moyo S., Warren R. M., Gaseitsiwe S. Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis strains circulating in Botswana // *PloS One*. – 2019. – 14(5). – P. e0216306. – DOI: 10.1371/journal.pone.0216306.

225 Napier G., Campino S., Phelan J. E., Clark T. G. Large-scale genomic analysis of Mycobacterium tuberculosis reveals extent of target and compensatory mutations linked to multi-drug resistant tuberculosis // *Scientific Reports*. – 2023. – 13(1). – P. 623. – DOI: 10.1038/s41598-023-27516-4.

226 Li Y. F., Kong X. L., Song W. M., Li Y. M., Li Y. Y., Fang W. W., Yang J. Y., Yu C. B., Li H. C., Liu Y. Genomic analysis of lineage-specific transmission of multidrug resistance tuberculosis in China // *Emerging Microbes & Infections*. – 2024. – 13(1). – P. 2294858. – DOI: 10.1080/22221751.2023.2294858.

227 Smith J. P., Gandhi N. R., Silk B. J., Cohen T., Lopman B., Raz K., Winglee K., Kammerer S., Benkeser D., Kramer M. R., Hill A. N. A cluster-based method to quantify individual heterogeneity in tuberculosis transmission // *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*. – 2022. – 33(2). – P. 217–227. – DOI: 10.1097/EDE.0000000000001452.

228 Wang X., Zhang H., Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer // *Cancer Drug Resistance (Alhambra, Calif.)*. – 2019. – 2(2). – P. 141–160. – DOI: 10.20517/cdr.2019.10.

229 Allué-Guardia A., García J. I., Torrelles J. B. Evolution of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains and their adaptation to the human lung

environment // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – 12. – P. 612675. – DOI: 10.3389/fmicb.2021.612675.

230 Lienhardt C., Kraigsley A. M., Sizemore C. F. Driving the way to tuberculosis elimination: the essential role of fundamental research // *Clinical Infectious Diseases*. – 2016. – 63(3). – P. 370–375. – DOI: 10.1093/cid/ciw250.

231 Thorpe J., Sawaengdee W., Ward D., Campos M., Wichukchinda N., Chaiyasirinroje B., Thanraka A., Chumpol J., Phelan J. E., Campino S., Mahasirimongkol S., Clark T. G. Multi-platform whole genome sequencing for tuberculosis clinical and surveillance applications // *Scientific Reports*. – 2024. – 14(1). – P. 5201. – DOI: 10.1038/s41598-024-55865-1.

232 Bendre A. D., Peters P. J., Kumar J. Tuberculosis: Past, present and future of the treatment and drug discovery research // *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*. – 2021. – 2. – P. 100037. – DOI: 10.1016/j.crphar.2021.100037.

233 Global tuberculosis report 2025. Geneva: World Health Organization; 2025. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

234 Horne D. J., Zifodya J. S., Shapiro A. E., Church E. C., Kreniske J. S., Kay A. W., Scandrett K., Steingart K. R., Takwoingi Y. Xpert MTB/RIF Ultra assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults and adolescents // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2025. – 7(7). – CD009593. – DOI: 10.1002/14651858.CD009593.pub6.

235 Liu Q., Li G. L., Chen C., Wang J. M., Martinez L., Lu W., Zhu L. M. Diagnostic Performance of the GenoType MTBDRplus and MTBDRsl Assays to Identify Tuberculosis Drug Resistance in Eastern China // Chinese Medical Journal. – 2017. – 130(13). – P. 1521–1528. – DOI: 10.4103/0366-6999.208248.

236 European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2026. Stockholm: ECDC; 2026.

237 Lee J. H., Garg T., Lee J., McGrath S., Rosman L., Schumacher S. G., Benedetti A., Qin Z. Z., Gore G., Pai M., Sohn H. Impact of molecular diagnostic tests on diagnostic and treatment delays in tuberculosis: a systematic review and meta-analysis // BMC Infectious Diseases. – 2022. – 22(1). – 940. – DOI: 10.1186/s12879-022-07855-9.

238 Ларионова Е. Е., Андреевская С. Н., Смирнова Т. Г., Севастьянова Э. В., Черноусова Л. Н. Методы идентификации микобактерий // Вестник ЦНИИТ. – 2021. – № 1. – С. 87–98. – DOI: 10.7868/S2587667821010106.

239 Thermo Fisher Scientific. PureLink Genomic DNA Mini Kit: User Guide. Pub. No. MAN0000601, Rev. 2.0. URL: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf (дата обращения: 06.04.2026)

240 García-Alegría A. M., Anduro-Corona I., Pérez-Martínez C. J., Guadalupe Corella-Madueño M. A., Rascón-Durán M. L., Astiazaran-Garcia H. Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA // International Journal of Analytical Chemistry. – 2020. – 2020. – 8896738. – DOI: 10.1155/2020/8896738.

241 Thermo Fisher Scientific. Qubit 4 Fluorometer: User Guide. — Publication No. MAN0017209. URL: https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017209_Qubit_4_Fluorometer_UG.pdf (дата обращения: 06.04.2026)

242 Paul P., Rajput S., Joshi P., Naithani M., Chowdhury N., Rao S., Pai M. O. Comparison of Fluorometric and UV Spectrophotometric Findings for DNA Isolated From Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Blocks, Fine Needle Aspiration Cytology Smears, and Blood // Cureus. – 2021. – 13(11). – e19583. – DOI: 10.7759/cureus.19583.

243 Illumina. Nextera XT Library Prep: Tips and Troubleshooting. Technical Support Note: Sequencing. URL: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/nextera-xt-troubleshooting-technical-note.pdf (дата обращения: 06.04.2026)

244 Handžić N., Pećar D., Durgut S., Mulahuseinović N., Čeko I., Ašić A., Izmirlija M., Šegalo S., Salihefendić L., Konjhodžić R. Optimization of Illumina® Nextera™ XT library preparation for the mitochondrial genome sequencing and confirmatory Sanger sequencing // Medicinski Glasnik. – 2025. – 22(2). – P. 191–194. – DOI: 10.17392/1950-22-02.

245 Agilent Technologies. 5200, 5300, and 5400 Fragment Analyzer: System Manual. — Document No. D0002110. URL: https://www.biolabtech.com.ua/wp-content/uploads/2024/11/1-Fragment-Analyzer-manual.pdf (дата обращения: 06.04.2026)

246 Sims D., Sudbery I., Ilott N. E., Heger A., Ponting C. P. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses // Nature Reviews Genetics. – 2014. – 15(2). – P. 121–132. – DOI: 10.1038/nrg3642.

247 Kohl T. A., Utpatel C., Schleusener V., De Filippo M. R., Beckert P., Cirillo D. M., Niemann S. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of Mycobacterium tuberculosis complex isolates // PeerJ. – 2018. – 6. – e5895. – DOI: 10.7717/peerj.5895.

248 Leggett R. M., Ramirez-Gonzalez R. H., Clavijo B. J., Waite D., Davey R. P. Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics // Frontiers in Genetics. – 2013. – 4. – 288. – DOI: 10.3389/fgene.2013.00288.

249 Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. – 2014. – 30(15). – P. 2114–2120. – DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.

250 Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance, second edition. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

251 Van Soolingen D., Jajou R., Mulder A., de Neeling H. Whole genome sequencing as the ultimate tool to diagnose tuberculosis // International Journal of Mycobacteriology. – 2016. – 5 Suppl 1. – S60–S61. – DOI: 10.1016/j.ijmyco.2016.10.036.

252 Minh B. Q., Schmidt H. A., Chernomor O., Schrempf D., Woodhams M. D., von Haeseler A., Lanfear R. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for

Phylogenetic Inference in the Genomic Era // Molecular Biology and Evolution. – 2020. – 37(5). – P. 1530–1534. – DOI: 10.1093/molbev/msaa015.

253 Letunic I., Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool // Nucleic Acids Research. – 2024. – 52(W1). – W78–W82. – DOI: 10.1093/nar/gkae268.

254 Sobkowiak B., Romanowski K., Sekirov I., Gardy J. L., Johnston J. C. Comparing Mycobacterium tuberculosis transmission reconstruction models from whole genome sequence data // Epidemiology and Infection. – 2023. – 151. – e105. – DOI: 10.1017/S0950268823000900.

255 Robusto C. C. The Cosine-Haversine Formula // The American Mathematical Monthly. – 1957. – 64(1). – P. 38–40. – DOI: 10.2307/2309088.

256 Oksanen J., Simpson G., Blanchet F., Kindt R., Legendre P., Minchin P., O'Hara R., Solymos P., Stevens M., Szoecs E., Wagner H. Vegan: Community Ecology Package. – R package version 2.6-4. – 2022. – URL: https://CRAN.R-project.org/package=vegan.

257 Legendre P., Legendre L. Interpretation of ecological structures // Numerical Ecology. – 3rd ed. – Elsevier. – 2012. – Chapter 10. – P. 491–624.

258 Harmon L. J., Glor R. E. Poor statistical performance of the Mantel test in phylogenetic comparative analyses // Evolution. – 2010. – 64(7). – P. 2173–2178. – DOI: 10.1111/j.1558-5646.2010.00973.x.

259 Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L. D., François R., Grolemund G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T. L., Miller E., Bache S. M., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D. P., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K., Yutani H. Welcome to the Tidyverse // Journal of Open Source Software. – 2019. – 4(43). – 1686. – DOI: 10.21105/joss.01686.

260 Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. — Springer Science+Business Media, LLC. — 2009. — 213 p. — DOI: 10.1007/978-0-387-98141-3.

261 Wickham H., François R., Henry L., Müller K. dplyr: A Grammar of Data Manipulation. – R package version 0.4.3. – 2015. – URL: http://CRAN.R-project.org/package=dplyr.

262 Biau D. J., Kernéis S., Porcher R. Statistics in brief: the importance of sample size in the planning and interpretation of medical research // Clinical Orthopaedics and Related Research. – 2008. – 466(9). – P. 2282–2288. – DOI: 10.1007/s11999-008-0346-9.

263 Goig G. A., Windels E. M., Loiseau C., Stritt C., Biru L., Borrell S., Brites D., Gagneux S. Ecology, global diversity and evolutionary mechanisms in the Mycobacterium tuberculosis complex // Nature Reviews Microbiology. – 2025. – 23(9). – P. 602–614. – DOI: 10.1038/s41579-025-01159-w.

264 Global tuberculosis report 2024. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

265 Бородулина Е. А. Инфильтративный туберкулез легких и внебольничная пневмония в первичном звене здравоохранения // Врач. – 2023. – Т. 34, № 4. – С. 18–22. – DOI: 10.29296/25877305-2023-04-03.

266 Marshall G. B., Babar J. L., Müller N. L. Postprimary tuberculosis // CMAJ: Canadian Medical Association Journal. – 2007. – 177(2). – P. 148. – DOI: 10.1503/cmaj.070051.

267 Yerezhepov D., Gabdulkayum A., Akhmetova A., Abilova Z., Rakhimova S., Kairov U., Akilzhanova A., Kozhamkulov U. Epidemiological and genetic aspects of pulmonary tuberculosis in Kazakhstan // Journal of Infection and Public Health. – 2024. – 17(10). – P. 102540. – DOI: 10.1016/j.jiph.2024.102540.

268 Арбузова Е. В., Приходченко О. Г., Нажмиден А. Р., Раимова Г. Д., Исмаилов Ш. Ш., Аденов М. М. Анализ регистрации случаев туберкулеза среди иностранных граждан в Республике Казахстан за 2018–2024 годы // Фтизиопульмонология. – 2025. – № 1(46). – С. 59–70. – DOI: 10.26212/2227-1937.2025.79.17.006.

269 Gaillard F., Sharma R., Silverstone L., et al. Tuberculosis (pulmonary manifestations) // Radiopaedia.org. – 2026. – DOI: 10.53347/rID-8631. – (Accessed: 15.04.2026).

270 Mathur M., Badhan R. K., Kumari S., Kaur N., Gupta S. Radiological Manifestations of Pulmonary Tuberculosis - A Comparative Study between Immunocompromised and Immunocompetent Patients // Journal of Clinical and Diagnostic Research. – 2017. – 11(9). – P. TC06–TC09. – DOI: 10.7860/JCDR/2017/28183.10535.

271 Kosack C. S., Spijker S., Halton J., Bonnet M., Nicholas S., Chetcuti K., Mesic A., Brant W. E., Joekes E., Andronikou S. Evaluation of a chest radiograph reading and recording system for tuberculosis in a HIV-positive cohort // Clinical Radiology. – 2017. – 72(6). – P. 519.e1–519.e9. – DOI: 10.1016/j.crad.2017.01.008.

272 Smith J. P., Cohen T., Dowdy D., Shrestha S., Gandhi N. R., Hill A. N. Quantifying Mycobacterium tuberculosis Transmission Dynamics Across Global Settings: A Systematic Analysis // American Journal of Epidemiology. – 2023. – 192(1). – P. 133–145. – DOI: 10.1093/aje/kwac181.

273 Kgagudi M. P., Hlapolosa T., Jingo M., Ramokgopa M. T., Van Den Berg E. Osteoarticular TB specimen yield rates. Large joint analysis at a single centre // Orthopedic Reviews. – 2024. – 16. – P. 115601. – DOI: 10.52965/001c.115601.

274 Kamal A. F., Oktari P. R., Kurniawan A., Kodrat E., Mumpuni N. A. Clinical Outcomes of Delayed Osteoarticular Tuberculosis: A Review of 30 Cases // Orthopedic Research and Reviews. – 2022. – 14. – P. 351–363. – DOI: 10.2147/ORR.S366294.

275 Faburay A. K., Mendy F. S., Otu J. K., Faal-Jawara T. I., Gehre F., Secka O. Performance comparison of a pair of Lowenstein-Jensen media supplemented with pyruvate or glycerol, and the combination of both supplements in a single Lowenstein-Jensen medium for the growth support of the Mycobacterium Tuberculosis complex // International Journal of Mycobacteriology. – 2016. – 5 Suppl 1. – P. S169. – DOI: 10.1016/j.ijmyco.2016.09.019.

276 Walker T. M., Kohl T. A., Omar S. V., Hedge J., Del Ojo Elias C., Bradley P., Iqbal Z., Feuerriegel S., Niehaus K. E., Wilson D. J., Clifton D. A., Kapatai G., Ip C. L. C., Bowden R., Drobniewski F. A., Allix-Béguec C., Gaudin C., Parkhill J., Diel R., Supply P., … Modernizing Medical Microbiology (MMM) Informatics Group.

Whole-genome sequencing for prediction of Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study // The Lancet Infectious Diseases. – 2015. – 15(10). – P. 1193–1202. – DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00062-6.

277 Cadena A. M., Fortune S. M., Flynn J. L. Heterogeneity in tuberculosis // Nature Reviews Immunology. – 2017. – 17(11). – P. 691–702. – DOI: 10.1038/nri.2017.69.

278 Kadura S., King N., Nakhoul M., Zhu H., Theron G., Köser C. U., Farhat M. Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed Mycobacterium tuberculosis drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid // The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2020. – 75(8). – P. 2031–2043. – DOI: 10.1093/jac/dkaa136.

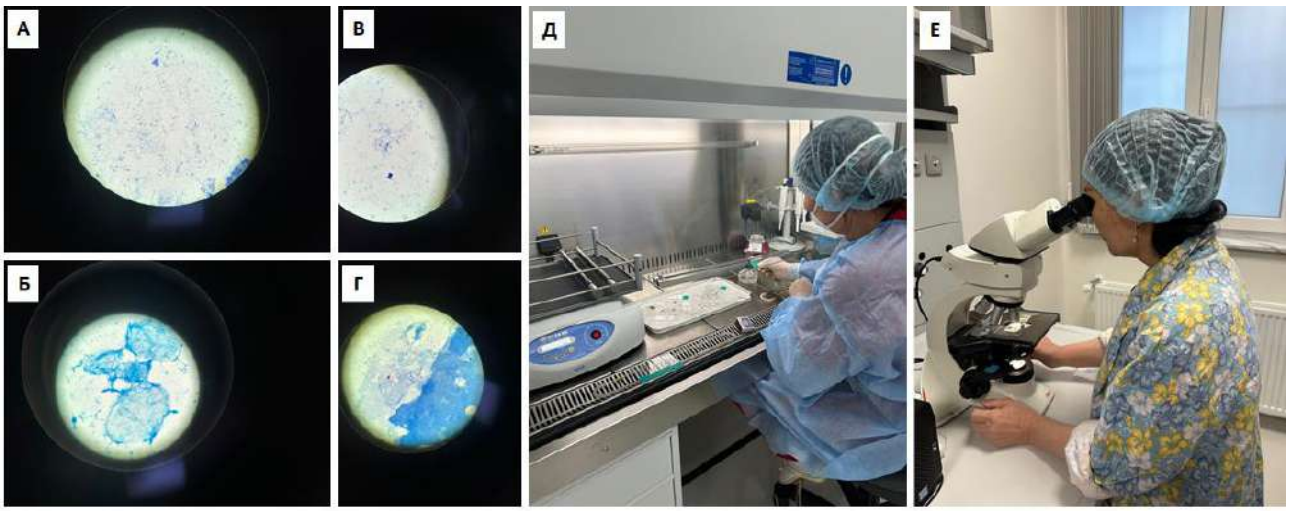
279 Legendre P., Fortin M.-J., Borcard D. Should the Mantel test be used in spatial analysis? // Methods in Ecology and Evolution. – 2015. – 6(11). – P. 1239–1247. – DOI: 10.1111/2041-210X.12425.

280 Diniz-Filho J. A., Soares T. N., Lima J. S., Dobrovolski R., Landeiro V. L., de Campos Telles M. P., Rangel T. F., Bini L. M. Mantel test in population genetics // Genetics and Molecular Biology. – 2013. – 36(4). – P. 475–485. – DOI: 10.1590/S1415-47572013000400002.

281 Zhang X., Suster C., Sim E. et al. Spatio-temporal patterns of tuberculosis revealed by routine Mycobacterium tuberculosis sequencing in Australia: an extended patient cohort analysis (2017–2023) // The Lancet Regional Health – Western Pacific. – 2026. – 66. – 101344. – DOI: 10.1016/j.lanwpc.2025.101344.

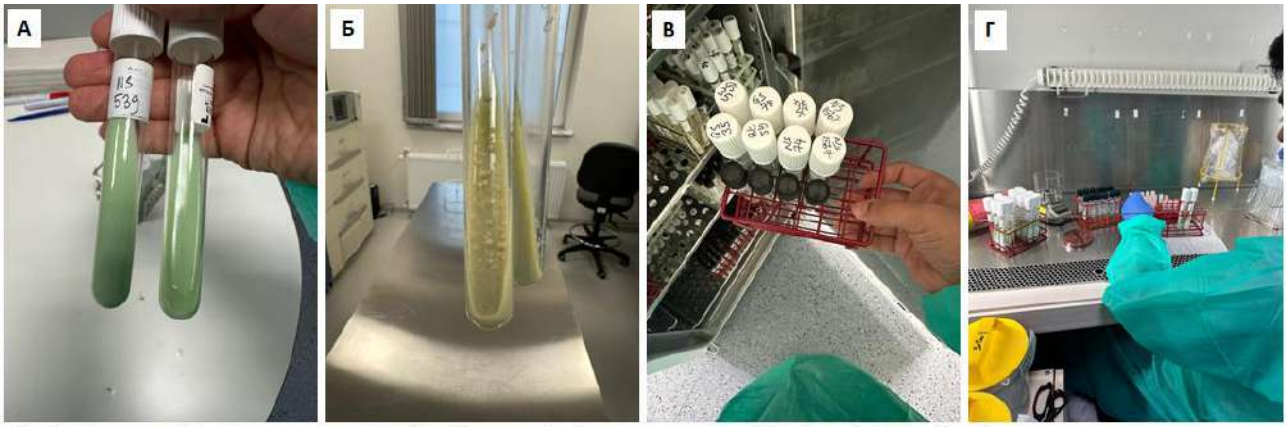
282 Yang X., Ru H., Chen T., Chen L., Ni Q., Yan S., Yang R., Chen J., Xu L. Transmission characteristics of tuberculosis in the high-TB-burden region of Southwest China // Frontiers in Public Health. – 2025. – 13. – 1670514. – DOI: 10.3389/fpubh.2025.1670514.

ПРИЛОЖЕНИЕ А – Этапы микробиологического и молекулярно-генетического исследования изолятов *M. tuberculosis*



А, Б, В, Г – Фотографии мазков культуры *M. tuberculosis* при увеличении х1000, окраска по Цилю-Нильсену; Д – этап фиксации мазков в стерильных условиях внутри ламинарного бокса; Е – процесс микроскопии и визуализации мазков мокроты

Рисунок А.1 – Этапы проведения микроскопического исследования и морфология клинических образцов *M. tuberculosis*



А – Плотная питательная среда Левенштейна-Йенсена; Б – Колонии изолятов *M. tuberculosis*; В – Инкубация инокулированных изолятов при температуре 37 °С; Г – процесс посева культур *M. tuberculosis* на питательную среду Левенштейна-Йенсена

Рисунок А.2 – Культивирование *M. tuberculosis* на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена

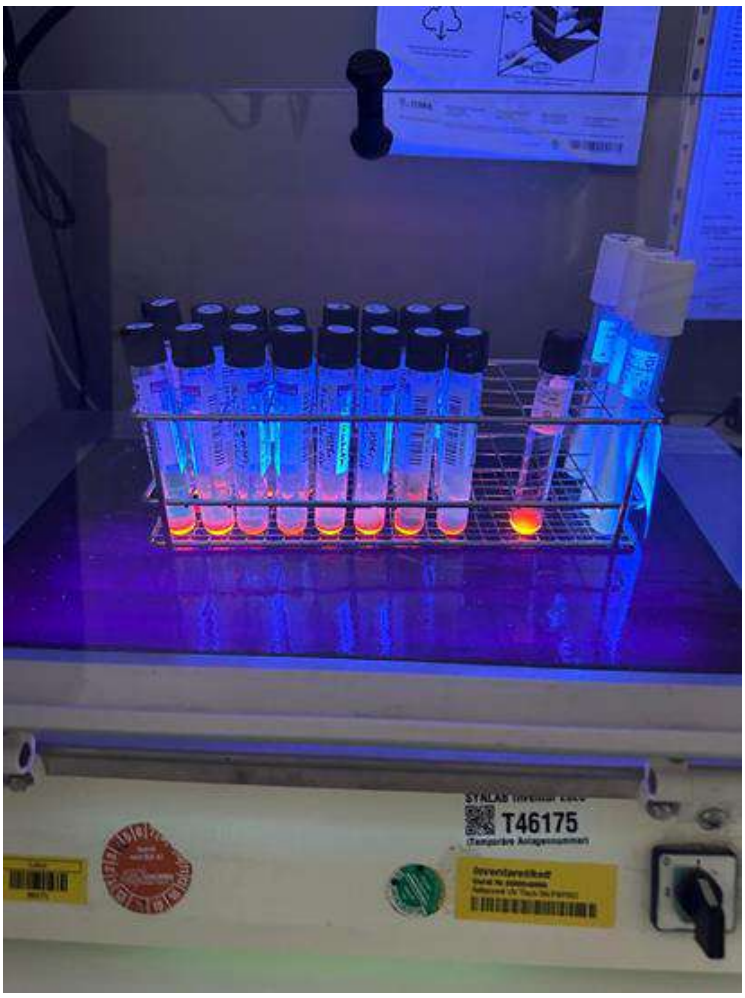


Рисунок А.3 – Учет интенсивности флуоресценции при культивировании изолятов *M. tuberculosis* в жидкой питательной среде в системе BACTEC MGIT



А – набор для выделения и очистки ДНК PureLink (ThermoFisher); Б – набор реактивов для приготовления ДНК библиотек к полногеномному секвенированию; В – процесс выделения и очистки ДНК изолятов *M. tuberculosis*

Рисунок А.4 – Основные этапы выделения ДНК и подготовки ДНК-библиотек для полногеномного секвенирования изолятов *M. tuberculosis*

ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Результаты контроля качества нуклеиновых кислот и параметры секвенирования



Рисунок Б.1 – Измерение концентрации ДНК образцов *M. tuberculosis* на спектрофотометре NanoDrop One



Рисунок Б.2 – Измерение концентрации ДНК образцов *M. tuberculosis* на флуориметре Qubit 3.0 с использованием набора рективов Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher)



Рисунок Б.3 – Фрагментный анализатор Agilent Fragment Analyzer 5200 на основе капиллярного электрофореза для определения длины фрагментов ДНК-библиотек с целью их нормализации

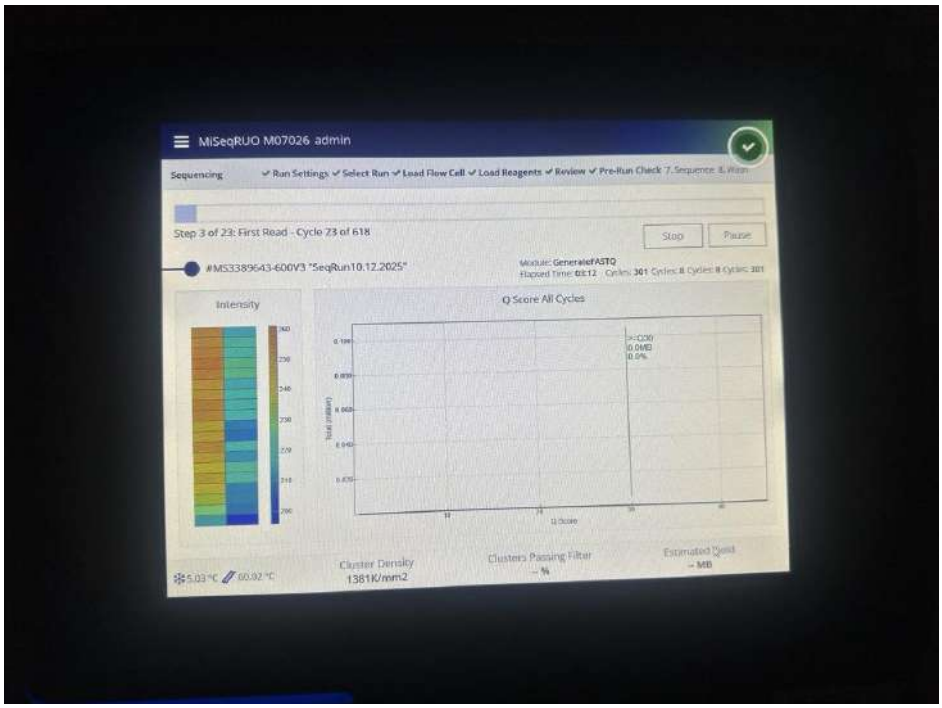
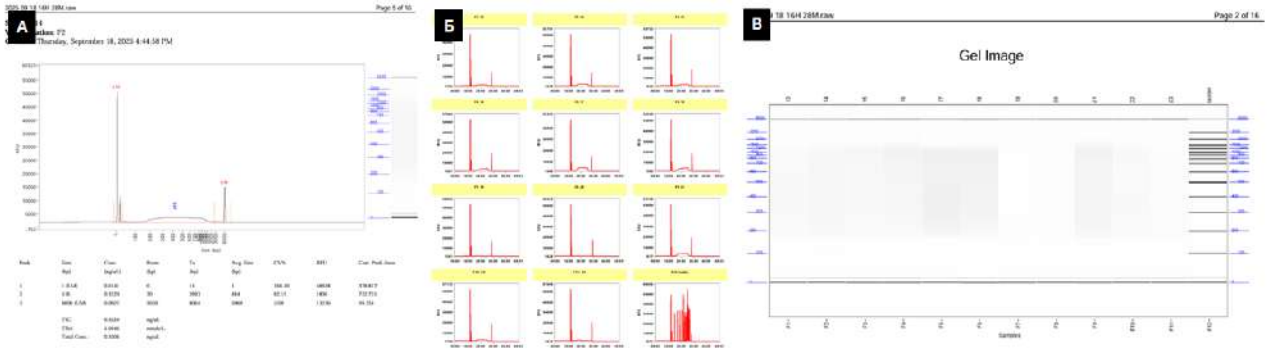
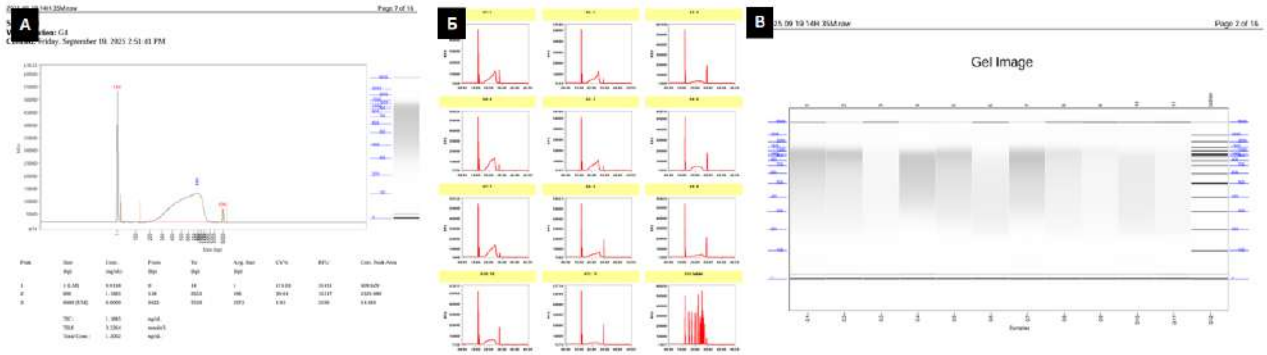


Рисунок Б.4 – Интерфейс управления системы MiSeq (Illumina) в процессе проведения полногеномного секвенирования изолятов *M. tuberculosis*



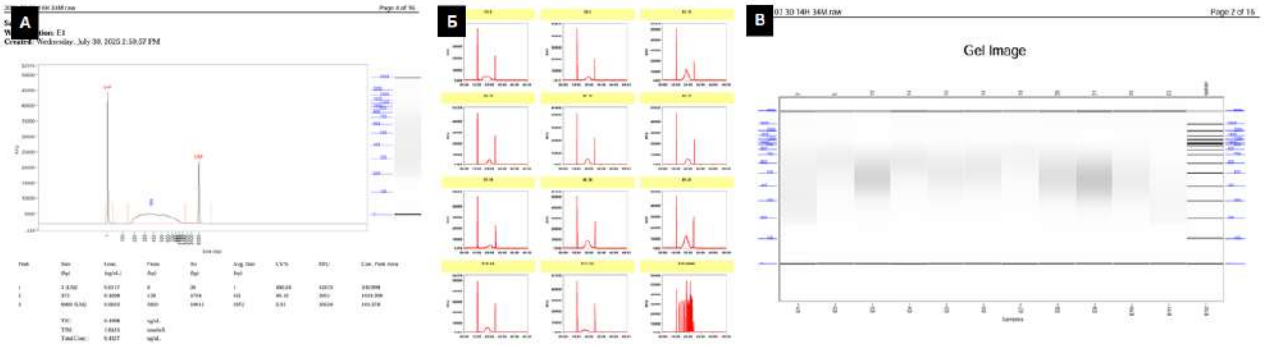
А – электрофореграмма изолята 35-23 с выраженным пиком в целевой области длин фрагментов; Б – индивидуальные профили распределения фрагментов ДНК для 11 изолятов, подтверждающие воспроизводимость этапа подготовки; В – визуализация результатов в формате цифрового геля («Gel Image»), демонстрирующая чистоту полученных ДНК-библиотек и отсутствие нецелевых продуктов (димеров адаптеров)

Рисунок Б.5 – Оценка качества и распределения длин фрагментов ДНК-библиотек изолятов *M. tuberculosis* №35-23 методом капиллярного электрофореза



А – электрофореграмма изолята 43-24 с выраженным пиком в целевой области длин фрагментов; Б – индивидуальные профили распределения фрагментов ДНК для 11 изолятов, подтверждающие воспроизводимость этапа подготовки; В – визуализация результатов в формате цифрового геля («Gel Image»), демонстрирующая чистоту полученных ДНК-библиотек и отсутствие нецелевых продуктов (димеров адаптеров)

Рисунок Б.6 – Оценка качества и распределения длин фрагментов ДНК-библиотек изолятов *M. tuberculosis* №43-24 методом капиллярного электрофореза



А – электрофореграмма 5745-23 изолята с выраженным пиком в целевой области длин фрагментов; Б – индивидуальные профили распределения фрагментов ДНК для 11 изолятов, подтверждающие воспроизводимость этапа подготовки; В – визуализация результатов в формате цифрового геля («Gel Image»), демонстрирующая чистоту полученных ДНК-библиотек и отсутствие нецелевых продуктов (димеров адаптеров)

Рисунок Б.7 – Оценка качества и распределения длин фрагментов ДНК-библиотек изолятов *M. tuberculosis* №5745-23 методом капиллярного электрофореза



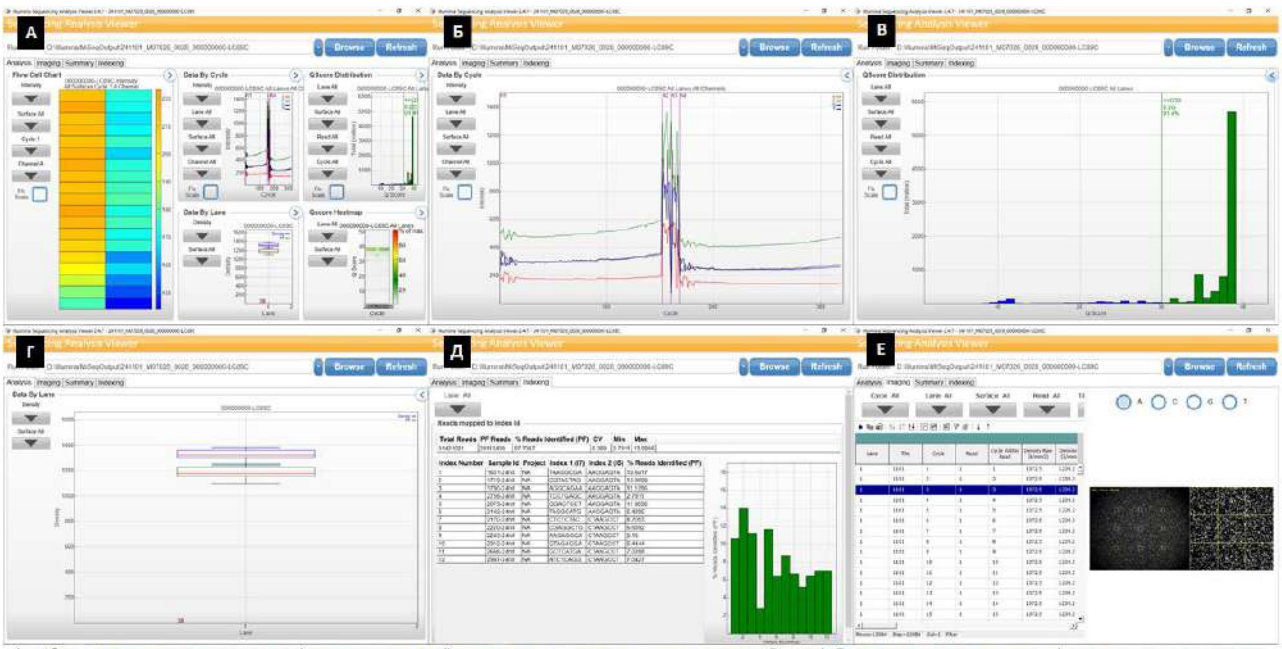
А – общая сводка параметров запуска (тепловая карта ячейки, плотность кластеров и распределение Q-score); Б – динамика интенсивности флуоресценции нуклеотидов по циклам (Data by Cycle); В – гистограмма распределения показателя качества чтений (Q-score), демонстрирующая преобладание значений >Q30; Г – распределение плотности кластеров по дорожкам ячейки (Data by Lane); Д – анализ качества индексирования (Indexing QC) и равномерность распределения чтений между изолятами в запуске; Е – детальная визуализация первичных данных и параметров интенсивности сигналов

Рисунок Б.8 Мониторинг параметров качества 1-го запуска полногеномного секвенирования (WGS) в системе Illumina Miseq



А – общая сводка параметров запуска (тепловая карта ячейки, плотность кластеров и распределение Q-score); Б – динамика интенсивности флуоресценции нуклеотидов по циклам (Data by Cycle); В – гистограмма распределения показателя качества чтений (Q-score), демонстрирующая преобладание значений >Q30; Г – распределение плотности кластеров по дорожкам ячейки (Data by Lane); Д – анализ качества индексирования (Indexing QC) и равномерность распределения чтений между изолятами в запуске; Е – детальная визуализация первичных данных и параметров интенсивности сигналов

Рисунок Б.9 Мониторинг параметров качества 2-го запуска полногеномного секвенирования (WGS) в системе Illumina Miseq



А – общая сводка параметров запуска (тепловая карта ячейки, плотность кластеров и распределение Q-score); Б – динамика интенсивности флуоресценции нуклеотидов по циклам (Data by Cycle); В – гистограмма распределения показателя качества чтений (Q-score), демонстрирующая преобладание значений >Q30; Г – распределение плотности кластеров по дорожкам ячейки (Data by Lane); Д – анализ качества индексирования (Indexing QC) и равномерность распределения чтений между изолятами в запуске; Е – детальная визуализация первичных данных и параметров интенсивности сигналов

Рисунок Б.10 Мониторинг параметров качества 3-го запуска полногеномного секвенирования (WGS) в системе Illumina Miseq

ПРИЛОЖЕНИЕ В – Эпидемиологические показатели и сравнительная характеристика исследуемой выборки

Таблица В.1 – Сравнительная характеристика исследуемой выборки изолятов и официальных статистических показателей заболеваемости туберкулезом в Республике Казахстан за 2023–2024 гг.

Наименование области	Период	Исследуемая выборка (n=272)		Статистические данные по стране	
		НС / Рецидив	из них МЛУ-ТБ	Заболеваемость (НС) / Распространенность (НС+Р)	МЛУ-ТБ
Республика Казахстан	2023	143 / 22	49	6899 / 9354	1775
	2024	90 / 17	41	6740 / 8987	1606
	Всего	233 / 39	90	13639 / 18341	3381
Алматинская	2023	31 / 2	7	581 / 694	144
	2024	14 / 3	9	543 / 659	141
	Всего	45 / 5	16	1124 / 1353	285
г. Алматы	2023	60 / 9	22	484 / 619	110
	2024	34 / 5	15	484 / 602	114
	Всего	94 / 14	37	968 / 1221	224
Абай	2023	0 / 1	1	242 / 316	69
	2024	0 / 0	0	224 / 287	52
	Всего	0 / 1	1	466 / 603	121
Акмолинская	2023	1 / 0	0	305 / 411	70
	2024	0 / 0	0	271 / 371	57
	Всего	1 / 0	0	576 / 782	127
Актюбинская	2023	1 / 1	0	348 / 543	93
	2024	2 / 0	2	343 / 510	76
	Всего	3 / 1	2	691 / 1053	169
Атырауская	2023	6 / 1	2	318 / 462	100
	2024	2 / 1	0	315 / 446	68
	Всего	8 / 2	2	633 / 908	168
Западно-Казахстанская	2023	0 / 0	0	305 / 436	83

Продолжение таблицы В.1

	2024	0 / 0	0	302 / 424	65
	Всего	0 / 0	0	607 / 860	148
Жамбылская	2023	13 / 2	5	417 / 556	103
	2024	4 / 1	3	399 / 520	88
	Всего	17 / 3	8	816 / 1076	191
Жетысу	2023	6 / 1	3	268 / 340	51
	2024	9 / 3	3	264 / 320	43
	Всего	15 / 4	6	532 / 660	94
Карагандинская	2023	1 / 0	0	425 / 538	125
	2024	0 / 0	0	397 / 524	107
	Всего	1 / 0	0	822 / 1062	232
Костанайская	2023	1 / 0	0	336 / 564	90
	2024	1 / 0	0	324 / 507	94
	Всего	2 / 0	0	660 / 1071	184
Кызылординская	2023	5 / 2	1	401 / 659	96
	2024	7 / 2	4	381 / 631	75
	Всего	12 / 4	5	782 / 1290	171
Мангистауская	2023	3 / 0	0	247 / 341	54
	2024	5 / 0	1	286 / 384	73
	Всего	8 / 0	1	533 / 725	127
Павлодарская	2023	1 / 0	1	297 / 413	77
	2024	1 / 0	1	296 / 404	58
	Всего	2 / 0	2	593 / 817	135
Северо-Казахстанская	2023	2 / 0	1	216 / 301	55
	2024	1 / 1	0	188 / 256	45
	Всего	3 / 1	1	404 / 557	100
Туркестанская	2023	5 / 0	2	519 / 612	126
	2024	2 / 1	0	516 / 606	85
	Всего	7 / 1	2	1035 / 1218	211

Продолжение таблицы В.1

Улытау	2023	0 / 0	0	83 / 123	22
	2024	0 / 0	0	111 / 156	13
	Всего	0 / 0	0	194 / 279	35
Восточно-Казахстанская	2023	4 / 0	0	311 / 406	102
	2024	0 / 0	0	297 / 371	86
	Всего	4 / 0	0	608 / 777	188
г. Астана	2023	2 / 0	1	486 / 655	120
	2024	2 / 0	1	504 / 639	96
	Всего	4 / 0	2	990 / 1294	216
г. Шымкент	2023	1 / 3	3	310 / 365	85
	2024	6 / 0	2	295 / 370	43
	Всего	7 / 3	5	605 / 735	128
Примечание: В группу г. Алматы включены 14 пациентов без определенного места жительства, выявленных и проходивших лечение в профильных стационарах города					

ПРИЛОЖЕНИЕ Г – Характеристика кластеров и результаты биоинформационного анализа генотипов

Таблица Г.1 – Характеристика выявленных геномных кластеров *M. tuberculosis* на основе SNP-дистанции и профиля лекарственной устойчивости изолятов

№ кластера	Линия / Сублиния	Кол-во изолятов	Медианное SNP-расстояние	Профиль лекарственной устойчивости	Особенности динамики устойчивости
C1	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia	2	0	2-Sensitive	Стабильный (чувствительные)
C2	Lineage 4 / LAM	2	2	2-Sensitive	Стабильный
C3	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia	2	2	2-HR-TB	Бытовой контакт (один дом)
C4	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia outbreak	7	11	7-MDR-TB	Стабильный MDR
C5	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia	3	4	3-Sensitive	Стабильный
C6	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia outbreak	4	10	3-MDR-TB 1-XDR-TB	Приобретенная устойчивость
C7	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia	3	4	2-Sensitive 1-MDR-TB	Расширение профиля (RIF+)
C8	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia	6	14	2-Sensitive 1-HR-TB 2-MDR-TB 1-pre-XDR-TB	Высокая гетерогенность ЛУ
C9	Lineage 4 / mainly T	2	0	2-Sensitive	Стабильный
C10	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia	3	8	3-Sensitive	Стабильный
C11	Lineage 4 / Euro-American	2	9	2-Sensitive	Стабильный

Продолжение таблицы Г.1

C12	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia outbreak	3	12	3-MDR-TB	Стабильный MDR
C13	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia	2	10	2-Sensitive	Стабильный
C14	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia outbreak	2	10	2-HR-TB	Стабильный
C15	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia	2	12	2-Sensitive	Стабильный
C16	Lineage 2 (Beijing) / Europe/Russian W148 Outbreak	2	12	2-MDR-TB	Эпидемическая сублиния
C17	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia outbreak	2	0	2-MDR-TB	Идентичные изоляты
C18	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia outbreak	18	13	15-MDR-TB 3-pre-XDR-TB	Крупнейший кластер (MDR)
C19	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia	2	1	2-Sensitive	Стабильный
C20	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia outbreak	7	11	6-MDR-TB 1-pre-XDR-TB	Расширение (PZA, FQ+)
C21	Lineage 2 (Beijing) / Central Asia	2	1	2-Sensitive	Стабильный
C22	Lineage 4/ Haarlem	2	2	2-Sensitive	Стабильный

ПРИЛОЖЕНИЕ Д – Пространственно-статистический анализ распространения штаммов туберкулеза

Таблица Д.1 – Оценка пространственной автокорреляции генетических дистанций изолятов *M. tuberculosis* в г. Алматы и Алматинской области

Дистанционный класс	Интервалы расстояний, км	Статистика Мантеля (r)	p-значение	Интерпретация
Общая выборка (Алматы и обл.)	0-563	0,06173	0,1628	Корреляция отсутствует (глобально)
D.cl. 1	0-8	0,0623	0,048	Значимая локальная автокорреляция
D.cl. 2	8-16	0,0037	0,455	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 3	16-24	-0,0537	0,090	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 4	24-32	-0,0676	0,120	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 5	32-40	-0,0544	0,150	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 6	40-48	0,0239	0,516	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 7	48-56	0,0499	0,210	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 8	56-64	0,0068	0,910	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 9	64-72	0,0409	0,288	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 10	72-80	0,0179	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 11	80-88	0,0054	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 12	88-96	0,0303	0,348	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 13	96-104	0,0064	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 14	104-112	0,0252	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 15	112-120	0,0262	1,000	Пространственная связь

Продолжение таблицы Д.1

				не выявлена
D.cl. 16	120-128	-0,0083	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 17	128-136	0,0262	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 18	136-144	0,0505	0,144	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 19	144-152	0,0286	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 20	152-160	0,0070	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 21	160-168	-0,0009	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 22	168-176	-0,0032	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 23	176-184	0,0093	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 24	184-192	0,0301	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 25	192-200	0,0229	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 26	200-208	0,0250	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 27	208-216	0,0186	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 28	216-224	0,0044	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 29	224-232	-0,0006	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 30	232-240	-0,0001	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 31	240-248	0,0148	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 32	248-256	0,0107	1,000	Пространственная связь не выявлена

Продолжение таблицы Д.1

D.cl. 33	256-264	-0,0581	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 34	264-272	-0,0155	1,000	Пространственная связь не выявлена
D.cl. 35	272-563	0,0238	1,000	Пространственная связь не выявлена