АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктора философии (PhD)
по образовательной программе «8D05104 – Генетика»

ТАКЕНОВА НУРЛАНА КАЙРАТУЛЫ

на тему «**Изучение генотипов возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* в Казахстане**»

Общая характеристика диссертационного исследования. Диссертационная работа посвящена комплексному изучению генетической структуры и филогенетического разнообразия возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* в Казахстане с использованием методов полногеномного секвенирования и популяционной генетики для выявления молекулярных механизмов лекарственной устойчивости и закономерностей распространения инфекции.

Актуальность исследования. Туберкулез (ТБ) остается серьезной глобальной угрозой: ежегодно ВОЗ регистрирует более 10 млн новых случаев, из которых около 390 тыс. приходятся на лекарственно-устойчивые формы. Особую опасность представляет ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ), существенно снижающий эффективность терапии. Казахстан относится к странам с высоким бременем: в 2024 году доля МЛУ-ТБ составила около 27% среди впервые выявленных и 44% среди ранее леченных пациентов. Эти показатели требуют точного выяснения ведущего механизма устойчивости: обусловлена ли она первичной передачей (трансмиссивная) или развилась в ходе лечения (приобретенная). Разграничение этих путей критически важно для коррекции мер инфекционного контроля и схем лечения.

Реконструкция путей передачи невозможна без глубокого анализа генетической структуры возбудителя. Эпидемический процесс во многом определяется доминированием конкретных филогенетических линий, в частности генотипа Beijing, обладающего высокой трансмиссивностью и склонностью к резистентности. В Казахстане преобладают линии L2 (East Asian) и L4 (Euro-American), однако генетическое разнообразие их сублиний и вклад в циркуляцию МЛУ-ТБ остаются малоизученными.

Традиционные методы генотипирования (сполиготипирование, MIRU-VNTR) обладают низкой разрешающей способностью и не позволяют достоверно выявлять цепочки недавней передачи. Надежным решением является полногеномное секвенирование (WGS): анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) обеспечивает высокую точность реконструкции филогении и кластеров трансмиссии. Несмотря на это, в Казахстане исследования полных геномов *M. tuberculosis* остаются единичными.

Таким образом, проведение комплексного WGS-исследования в рамках образовательной программы «Генетика» является высокоактуальной задачей. Работа направлена на детализацию генетической структуры циркулирующих изолятов ТБ в Казахстане до уровня сублиний, характеристику профилей резистентности и анализ географического распространения инфекции для совершенствования системы национального эпидемиологического надзора.

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 на базе Национального научного центра фтизиопульмонологии МЗ РК.

Цель исследования. Комплексное изучение генетической структуры, молекулярная характеристика филогенетического разнообразия, определение профилей лекарственной устойчивости и оценка путей недавней трансмиссии клинических изолятов *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории Республики Казахстан, на основе полногеномного секвенирования.

Задачи исследования:

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.

Методы исследования. В работе применены микробиологические, молекулярно-генетические и биоинформационные методы. WGS клинических изолятов *M. tuberculosis* с последующим SNP-анализом, реконструкцией филогенетических деревьев и оценкой эволюционной динамики проводилось с использованием инструментов TB-Profiler, MTBseq и IQ-TREE 2. Статистическая обработка выполнялась в среде R (v4.3.1) с применением дескриптивной статистики и непараметрических критериев (U-критерий Манна–Уитни, χ^2 Пирсона, точный критерий Фишера). Диагностическая эффективность молекулярных методов оценивалась расчетом чувствительности и специфичности, а пространственно-генетический анализ проводился с применением теста Мантеля и методов картографирования.

Научная новизна исследования. В рамках выполнения диссертационного исследования получены комплексные данные, характеризующие популяционно-генетическую структуру, филогенетическое разнообразие, профили лекарственной устойчивости и пути распространения *Mycobacterium tuberculosis* в Республике Казахстан на основе высокоразрешающего WGS.

На выборке клинических изолятов с детализацией до уровня сублиний охарактеризована филогенетическая структура возбудителя в регионе:

установлено доминирование линии 2 Beijing (72,4%) и линии 4 Euro-American (26,8%), при этом внутри генотипа Beijing доказано преобладание сублиний Central Asia и Central Asia Outbreak (CAO).

Впервые установлена выраженная неоднородность профиля лекарственной устойчивости внутри генотипа Beijing в зависимости от принадлежности к конкретной сублинии: показана высокая ассоциация сублиний CAO и Europe/Russian W148 Outbreak с МЛУ-ТБ, в то время как сублиния Central Asia преимущественно сохраняет лекарственную чувствительность.

Впервые на уровне полногеномных данных для исследуемого региона охарактеризован молекулярный профиль резистентности, подтверждающий, что основными детерминантами устойчивости к рифампицину и изониазиду выступают высокодостоверные мутации *rpoB* S450L (91,1%) и *katG* S315T (99,2%).

Впервые для Казахстана применена интегрированная оценка трансмиссии туберкулеза (объединение SNP-кластерного анализа с порогом ≤12 SNP и эпидемиологических данных), позволившая количественно разграничить механизмы развития заболевания: доказано, что 92,65% случаев ассоциированы с активной передачей инфекции, а 7,35% – с эндогенной реактивацией.

Впервые с применением теста Мантеля проведена оценка пространственно-генетической структуры популяции возбудителя в Алматинской агломерации, выявившая статистически значимые локальные очаги клональной передачи инфекции на коротких дистанциях (до 8 км) на фоне общего диффузного распределения генотипов.

На основе полученных результатов сформирована интегрированная база клинико-эпидемиологических и геномных данных 272 клинических изолятов *M. tuberculosis*, а их полные геномные последовательности успешно депонированы в международную базу данных NCBI (GenBank) под номером проекта PRJNA1277026, что расширяет возможности для дальнейших молекулярно-эпидемиологических исследований.

Практическая значимость. Обоснована эффективность внедрения методов WGS и SNP-анализа в практику фтизиатрической службы Республики Казахстан для повышения точности молекулярно-эпидемиологического надзора. Полученные данные о преобладании трансмиссионного механизма передачи заболевания (92,65%) и локальной пространственной кластеризации (в радиусе до 8 км) могут быть использованы при планировании мер инфекционного контроля и определении приоритетных зон для эпидемиологического расследования контактов. Выявленная концентрация тяжелых форм резистентности в сублиниях CAO и Europe/Russian W148 Outbreak позволяет применять молекулярное типирование в качестве дополнительного инструмента для стратификации эпидемиологического риска очагов ТБ. Подтвержденное доминирование мутаций *rpoB* S450L и *katG* S315T создает экспериментальную основу для разработки и внедрения таргетных молекулярных тест-систем экспресс-диагностики лекарственной устойчивости. Сформированная и депонированная в базу NCBI (GenBank, проект PRJNA1277026) база геномных

данных выступает в качестве референсного ресурса, который может быть использован для проведения последующих молекулярно-эпидемиологических исследований в Казахстане и Центральной Азии.

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.

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 ($r=0,0623$; $p=0,048$).

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».

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.

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.