

Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е.,
Андреевская И.Ю., Севастьянова Э.В., Черноусова Л.Н., Эргешов А.Э.

Мутации в геноме *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированные с генотипической МЛУ: доминирующие варианты в современной (2011-2018 гг) популяции Российских штаммов и метаанализ мировых данных

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза", г. Москва

Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Larionova E.E., Andrievskaya I.Yu., Sevastyanova E.V., Chernousova L.N., Ergeshov A.E.

Mutations in the *Mycobacterium tuberculosis* genome associated with genotypic MDR: dominant variants in the current (2011-2018) population of Russian strains and meta-analysis of world data

Резюме

Изучены мутации, ассоциированные с устойчивостью к рифампицину и изониазиду, в геноме *M. tuberculosis*, выделенных от 3144 больных туберкулезом легких из клинических и консультационного отделений ЦНИИТ, за период 2011 - май 2018 г.г. Проведено сравнение полученных результатов со спектром мутаций, описанных для общемировой популяции резистентных *M. tuberculosis* по данным TBDRaMDB. Показана уникальность мировых популяций *M. tuberculosis* по специфическим генетическим маркерам резистентности. Для Российской популяции штаммов *M. tuberculosis* выявлено доминирование штаммов с сочетанием мутаций, приводящих к высокому уровню резистентности к рифампицину (*rpoB* 531 Ser->Leu) и изониазиду (*katG* 315 Ser->Thr(1)), не оказывающих отрицательного влияния на трансмиссивность возбудителя. Распространенность этих мутантных вариантов была выше, чем в других регионах мира. Полученные результаты позволяют сделать вывод о неблагоприятной эпидемиологической ситуации, связанной с распространением МЛУ туберкулеза в РФ.

Ключевые слова: Микобактерии туберкулеза, лекарственная устойчивость, спектр мутаций, биологические микрочипы

Summary

The mutations associated with resistance to rifampicin and isoniazid studied in the genome of *M. tuberculosis* isolated from 3,144 patients with pulmonary tuberculosis from the clinical and consulting departments of the Central TB Research Institute for the period 2011 - May 2018. The obtained results compared with the spectrum of mutations described for the worldwide population of resistant *M. tuberculosis* according to TBDRaMDB. The uniqueness of the world population of *M. tuberculosis* was shown on the specific genetic markers of resistance. The prevalence of MTB strains with the combination of mutations leading to a high level of resistance to rifampicin (*rpoB* 531 Ser-> Leu) and isoniazid (*katG* 315 Ser-> Thr(1)) were shown for Russian population of *M. tuberculosis*. These mutations did not adversely affect the transmissibility of the pathogen. The prevalence of these mutant variants was higher than in other regions of the world. The obtained results allow to make a conclusion about the unfavorable epidemiological situation related to the spread of MDR tuberculosis in the Russian Federation.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, mutations spectrum, biochips

Введение

Туберкулез является серьезной проблемой глобального здравоохранения и входит в первую десятку заболеваний, являющихся причиной смертности населения. Озабоченность вызывает широкое распространение лекарственно-устойчивого туберкулеза (ЛУ ТБ), особенно с множественной и широкой лекарственной устой-

чивостью [1]. В России за последние 10 лет отмечен рост доли туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), то есть устойчивых к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП) - изониазиду и рифампицину, с 23,4% (в 2008 г.) до 54% (в 2017 г.) [2].

В основе формирования МЛУ лежит возникновение спонтанных мутаций в ряде структурных генов

M.tuberculosis (МБТ), продукты которых так или иначе вовлечены в механизм действия ПТП. Устойчивость к рифампицину возникает вследствие появления мутаций в гене *groV*, который кодирует β -субъединицы РНК-полимеразы, являющейся мишенью для препарата. Устойчивость к изониазиду может формироваться несколькими путями, поэтому устойчивость к этому препарату ассоциирована с мутациями в ряде генов. Основным путем формирования ЛУ является блокирование перевода изониазида, представляющего собой пролекарство, а активную форму. Активация изониазида происходит под действием фермента микобактерий - каталазы-пероксидазы, кодируемого геном *katG*. Возможен и вариант формирования устойчивости к изониазиду за счет изменения структуры микобактериального белка - мишени препарата - фермента *еноил-АПБ-редуктазы*, кодируемого геном *inhA*. Еще одним механизмом, приводящим к устойчивости микобактерий к изониазиду, является мутация в промоторе гена *ahpC*, кодирующего редуктазу алкилгидропероксида [3].

Анализ спектра мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к ПТП, может стать одним из инструментов оценки их биологического значения. Известно, что разные типы мутаций могут приводить или к высокому, или к низкому уровню резистентности к конкретному ПТП, а частота распространения мутантных штаммов МБТ у впервые выявленных больных ТБ является отражением влияния мутаций на трансмиссивность штаммов [4,5,6].

Международная база данных TB Drug Resistance Mutation Database (TBDRaMDB) содержит информацию о мутациях, ассоциированных с устойчивостью к различным ПТП, обнаруженных у МБТ, выделенных в различных регионах мира. Высоко достоверными для формирования устойчивости к рифампицину признаны 18 вариантов мутаций в гене *groV* (511-574 кодоны). Устойчивость к изониазиду в основном ассоциируется с мутациями в гене *katG*. Описано 273 варианта мутаций, затрагивающих 1 – 735 кодоны *katG*, из них 15 вариантов (17-593 кодоны) являются высоко достоверными для формирования резистентности. Мутации в генах *inhA* и *ahpC* и их промоторах не признаны высоко достоверной для формирования устойчивости к изониазиду [7].

Целью данного исследования было изучение спектра мутаций, приводящих к устойчивости к рифампицину и изониазиду, у штаммов МБТ, выделенных от больных клинических и консультационного отделений ЦНИИТ, за период 2011 - май 2018 г.г. и сравнение его со спектром мутаций МБТ, выделенных в различных регионах мира, по данным TBDRaMDB.

Материалы и методы

Исследован диагностический материал, выделенный от 3144 больных туберкулезом легких из клинических и консультационного отделения ЦНИИТ, за период 2011- май 2018 г.г.

Спектр мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду, опреде-

ляли с использованием тест-системы “ТБ-БИОЧИП-1” (“БИОЧИП-ИМБ”, Россия), ДНК выделяли, используя набор “М-Сорб-Туб” (“СИНТОЛ”, Россия), согласно инструкциям производителей.

Для сравнения полученных результатов со спектром мутаций, описанных для общемировой популяции резистентных МБТ, использовали данные, представленные в TBDRaMDB. В базе данных доступна информация по следующим регионам:

- для мутаций, с высокой достоверностью приводящих к устойчивости к рифампицину: Россия (1997-2005) – 709 штаммов, устойчивых к рифампицину, Италия (2002-2005) – 142 устойчивых штамма, Германия (2001) – 103 устойчивых штамма, Китай (2005-2006) – 214 устойчивых штаммов, Гонконг (1994-2004) – 437 устойчивых штаммов, Тайвань (1998-2008) – 472 устойчивых штамма, Корея – 115 устойчивых штаммов, Индия (2001-2003) – 149 устойчивых штаммов, Тайланд (2003-2005) – 154 устойчивых штамма, Вьетнам (2005) – 104 устойчивых штамма;

- для мутаций, с высокой достоверностью приводящих к устойчивости к изониазиду: Россия (1997-2005) – 217 штаммов, устойчивых к изониазиду, Казахстан (2004) – 142 устойчивых штамма, Великобритания (1998) – 202 устойчивых штамма, Италия (2002-2005) – 176 устойчивых штаммов, Германия (2001) - 103 устойчивых штамма, Китай (1999-2004) – 106 устойчивых штаммов, Гонконг (1994-2004) – 241 устойчивый штамм, Корея – 119 устойчивых штаммов, США (1999-2004) – 147 устойчивых штаммов.

Результаты и обсуждение

Мутации, ассоциированные с устойчивостью к рифампицину

Из изученных 3144 образцов ДНК МБТ, выделенных от 3144 больных туберкулезом легких, в 1653 (52,58%) случаях были определены мутации в *groV*: 19 вариантов мутаций в 8 кодонах; причем в 22 случаях мутации в *groV* были сочетанными (табл. 1).

Большинство из выявленных мутаций, кроме замены 516 Asp->Gly (4/1653, 0,24%), относились к высоко достоверным для формирования ЛУ к рифампицину. Были выявлены редкие мутации в кодонах 513 с заменой Gln->Gly (1/1653, 0,06%) и 522 с заменой Ser->Leu (2/1653, 0,12%), встречаемость которых, по данным TBDRaMDB, составляла 0-0,9% в РФ и 0-1,9% - в других географических регионах.

Мутация 511 Leu->Pro встречалась с частотой 0,6%, что было существенно ниже, чем ранее в РФ (1997-2005 г.) - 4,77%. И если раньше встречаемость этого мутантного варианта в РФ была выше, чем в мире (0-1,4%), то в популяции современных штаммов МБТ доля таких штаммов сходна с общемировой.

Значимые замены в 516 кодоне, Asp->Val и Asp->Tyr, встречались суммарно у 5,38% устойчивых к рифампицину штаммов, выделенных в РФ в 2011-2018 г. Замена Asp->Val встречалась чаще (3,57%), чем Asp->Tyr (1,81%), частота встречаемости в РФ, по сравнению с

Таблица 1. Спектр мутаций в гене *rpoB* *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких из ЦНИИТ в 2011 - 2018 гг

Кодов <i>rpoB</i>	Аминокислотная замена	Число мутантных вариантов	
		абс.	%
511	Leu->Pro, из них	10	0,60
	в сочетании с: <i>rpoB515</i> Met->Ile	1	
	<i>rpoB526</i> His->Asn	1	
513	<i>rpoB516</i> Asp->Gly	4	
	Gln->Gly*	1	0,06
515	Met->Ile, из них	9	0,54
	в сочетании с: <i>rpoB531</i> Ser->Leu	3	
	<i>rpoB511</i> Leu->Pro	1	
516	Asp->Gly*	4	0,24
	Asp->Tyr	30	1,81
	Asp->Val, из них	59	3,57
	в сочетании с: <i>rpoB533</i> Leu->Pro	1	
522	Ser->Leu	2	0,12
526	His->Arg	13	0,79
	His->Asn, из них	12	0,73
	в сочетании с: <i>rpoB511</i> Leu->Pro	1	
	<i>rpoB533</i> Leu->Pro	1	
	His->Asp	14	0,85
	His->Cys	1	0,06
	His->Gln	2	0,12
	His->Leu	17	1,03
	His->Pro, из них	3	0,18
	в сочетании с: <i>rpoB531</i> Ser->Leu	1	
	His->Tyr	29	1,75
531	Ser->Gln, из них	5	0,30
	в сочетании с: <i>rpoB533</i> Leu->Pro	3	
	<i>rpoB513</i> Gln->Gly	1	
	Ser->Leu, из них	1401	84,75
	в сочетании с: <i>rpoB515</i> Met->Ile	3	
533	<i>rpoB533</i> Leu->Pro	6	
	<i>rpoB526</i> His->Pro	1	
	Ser->Trp	18	1,09
	Leu->Pro, из них	45	2,72
	в сочетании с: <i>rpoB531</i> Ser->Gln	3	
	<i>rpoB531</i> Ser->Leu	6	
	<i>rpoB516</i> Asp->Val	1	
	<i>rpoB526</i> His->Asn	1	
Всего штаммов с RIF-резистентным генотипом		1653	100

Примечание: * - всегда в сочетании с *rpoB531* Ser->Gln;

** - всегда в сочетании с *rpoB511* Leu->Pro

1997-2005 г., осталась практически на том же уровне. В мировой популяции доля штаммов с мутациями Asp->Val варьирует от 0,7 до 8,7%, а Asp->Tyr - 0-4%, т.е. для РФ характерны средние показатели встречаемости этих вариантов мутаций.

В 526 кодоне было описано 8 вариантов замен у 91/1653 (5,51%) штаммов. Пять из них были высоко достоверными для формирования фенотипической ЛУ и суммарно составляли 5,14% от исследованной популяции МБТ. Распространенность рифампицин-резистентных штаммов с альтерациями в *rpoB*, приводящими к замене His на Asn, Asp, Leu или Arg, не изменилась по сравнению с РФ 1997-2005 гг, а варианта 526 His->Tyr - снизилась (1,75% в 2011-2018 против 4,07% в 1997-2005).

Суммарно встречаемость штаммов с мутациями в 526 кодоне в РФ была подобна Европейским странам (Италия - 11,90%, Германия - 12,60%). У МБТ, выделенных в странах Азии, мутации в этом кодоне встречались чаще (16,50 – 39,70%).

Замена 531 Ser->Leu доминировала у штаммов, выделенных в РФ в 2011-2018 гг., и доля штаммов с этой заменой была выше, чем в 1997-2005 гг (84,75% и 62,80%, соответственно). В большинстве географических регионов, представленных в TBDRaMDB, встречаемость этой мутации была на уровне 50-60%. Отдельно стоит упомянуть Китай, где этот мутантный вариант встречался реже, всего у 35,75% устойчивых к рифампицину штаммов.

Мутантный вариант 531 Ser->Trp в исследуемой популяции встречался редко (1,09%). В мировой популяции данный мутантный вариант описан только среди устойчивых к рифампицину штаммов, выделенных в Китае (6,7%).

Мутации, ассоциированные с устойчивостью к изониазиду

Из 3144 проанализированных образцов ДНК МБТ у 2025 (64,41%) были выявлены мутации, по крайней мере, в одном из генов, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду (табл. 2). Всего в TBDRaMDB описано 5

Таблица 2 - Спектр мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, у *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких из ЦНИИТ в 2011 - 2018 гг

Ген	Кодон / № нуклеотид позиции	Аминокислотные замены / нуклеотидные замены	Число мутантных вариантов	
			абс.	%
<i>katG</i>	315	Ser->Arg	16	0,79
		Ser->Asn	14	0,69
		Ser->Gly, из них	19	0,94
		в сочетании с: <i>inhA15</i> C->T	9	
		Ser->Thr(1)*, из них	1889	93,28
		в сочетании с: <i>inhA15</i> C->T	312	16,52
		<i>inhA8</i> T->A/C	43	2,28
		<i>inhA8</i> T->G	12	0,64
		<i>ahpC10</i> C->T	2	0,11
		<i>ahpC12</i> C->T	1	0,05
		<i>ahpC12</i> C->T	2	0,11
	без сопутствующих мутаций в <i>inhA</i> и <i>ahpC</i>	1517	80,31	
315+335	Ser->Thr(2)**	9	0,44	
	Ser->Thr(1); Ile->Val	4	0,20	
	Всего с мутациями в <i>katG</i>	1951	96,35	
<i>inhA</i>	15	C->G	2	0,10
		C->T, из них	388	19,16
		в сочетании с: <i>katG315</i> Ser->Gly	9	2,32
		<i>katG315</i> Ser->Thr(1)	312	80,41
		без сопутствующих мутаций в <i>katG</i>	67	17,27
	8	T->A/C, из них	45	2,22
		в сочетании с: <i>katG315</i> Ser->Thr(1)	43	
		T->G***	12	0,59
	Всего с мутациями в <i>inhA</i>	447	22,07	
<i>ahpC</i>	6	G->A***	2	0,10
	9	G->A	2	0,10
	10	C->T, из них	3	0,15
		в сочетании с: <i>katG315</i> Ser->Thr(1)	2	
	12	C->T***	1	0,05
	Всего с мутациями в <i>ahpC</i>	8	0,40	

Примечание: * - замена AGC->ACC, ** - замена AGC->ACA

*** - только в сочетании с *katG315_Ser->Thr(1)*

вариантов мутаций в *katG*, считающихся высоко достоверными для возникновения устойчивости к изониазиду.

Мутации в 279 кодоне *katG*, приводящие к замене Gly->Asp, встречались только в Китае и составляли 13,2% от числа штаммов, устойчивых к изониазиду. В других географических регионах, в том числе и в РФ, этот мутантный вариант не встречался.

В данном исследовании почти всегда (1951/2025, 96,35%) генотипическая устойчивость к изониазиду была обусловлена мутациями на уровне 315 кодона *katG*, часто в сочетании с мутациями в *inhA* (376/1951, 19,27%).

Замены в 315 кодоне *katG* Ser->Asn и Ser->Arg встречались очень редко. Частота встречаемости замены Ser->Asn варьировала от 0,5% (РФ, Казахстан, Великобритания) до 4,2% (Корея). Замена Ser->Arg встречалась приблизительно в таком же проценте случаев.

Замена в 315 кодоне *katG* Ser->Thr была наиболее распространенной и могла формироваться вследствие одонуклеотидной замены AGC->ACC (Thr(1)) - 1889/2025 (93,28%), или замены двух нуклеотидов AGC->ACA (Thr(2)) - 9/2025 (0,44%). Первый вариант замены (Thr(1)) преобладал у штаммов МБТ с ЛУ к изониазиду во всех популяциях, но максимальное распространение штаммов с этим мутантным вариантом было в РФ и Казахстане

(более 90%). В Германии распространенность этого варианта составила 84,5%. В других Европейских странах устойчивые к изониазиду штаммы с этим мутантным вариантом встречались реже: Великобритания - 58,4%, Италия - 64,8%. В Азиатских странах только половина или меньше устойчивых к изониазиду штаммов имели замену *katG* 315 Ser->Thr(1): 31,1% - Корея, 45,2% - Гонконг, 56,6% - Китай.

В США частота встречаемости замены в 315 кодоне, приводящей к замене Ser на Thr(1), также была невысокой и составила 42,2%. При этом замена Thr(2) встречалась в 20,4% случаев. В остальных географических регионах частота встречаемости мутантного варианта *katG* 315 Ser->Thr(2) не превышала 2%.

Еще одна особенность была выявлена у штаммов, устойчивых к изониазиду, выделенных в Великобритании: у 23,8% устойчивых к изониазиду штаммов мутации встречались в промоторной области *ahpC* -46(G->A). В других регионах эта мутация или не выявлялась, или выявлялась в единичных случаях.

Заключение

Анализ мутаций, ассоциированных с МЛУ, в современной популяции штаммов МБТ, выделенных в РФ,

в сравнении со штаммами МБТ, выделенными в РФ в предыдущее 10-летие и с мировой популяцией штаммов МБТ, показал, что сформировались уникальные региональные популяции МБТ, несущие специфические генетические маркеры резистентности.

Так, для штаммов, выделенных в Азии было характерно достаточно высокое число штаммов с мутациями в 526 кодоне groV, в то время, как число штаммов с мутациями в 531 кодоне было ниже, чем в РФ. Особенно это утверждение справедливо в отношении штаммов, выделенных в Китае. Популяция штаммов, циркулирующих на этой территории, в целом очень сильно отличается от МБТ других географических регионов. Во-первых, для МБТ из Китая была характерна наибольшая частота встречаемости штаммов с мутациями в 526 кодоне (суммарно 39,70%) и наименьшая из всех регионов – в 531 кодоне (42,45%). Во-вторых, достаточно часто встречалась редкая замена в groV 531 Ser->Trp (6,7%). Кроме того, в популяции устойчивых к изониазиду МБТ, выделенных в Китае, была обнаружена замена katG 279 Gly->Asp (13,2%), которая больше нигде не встречалась.

Для популяции МБТ, выделенных в Великобритании и США, также были описаны варианты мутаций, эндемичные для этих регионов. У штаммов, выделенных в Великобритании, устойчивость к изониазиду более, чем в 20% случаев, была обусловлена мутациями в ahpC -46 (G/A). В США более 20% штаммов, устойчивых к изониазиду, имели редкую замену Ser->Thr(2).

Для Российской популяции показано доминирование штаммов с сочетанием мутаций, приводящих к вы-

сокому уровню резистентности к рифампицину (groV 531 Ser->Leu) и изониазиду (katG 315 Ser->Thr(1)), не оказывающих отрицательного влияния на трансмиссивность МБТ [4,5,6]. Распространенность этих мутантных вариантов была выше, чем в других регионах мира. Полученные результаты позволяют сделать вывод о неблагоприятной эпидемиологической ситуации, связанной с распространением МЛУ туберкулеза в РФ. ■

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2, Андреевская Софья Николаевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии, кандидат медицинских наук, Смирнова Татьяна Геннадьевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии, кандидат медицинских наук, Ларионова Елена Евгеньевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии, кандидат биологических наук, Андриевская Ирина Юрьевна – младший научный сотрудник отдела микробиологии, Севастьянова Элина Викторовна – ведущий научный сотрудник отдела микробиологии, доктор биологических наук, Черноусова Лариса Николаевна – руководитель отдела микробиологии, доктор биологических наук, профессор, Эргешов Атаджан Эргешевич – директор ФГБНУ "ЦНИИТ", доктор медицинских наук, профессор, Автор, ответственный за переписку - Андреевская Софья Николаевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии, кандидат медицинских наук, Тел.: +7 (499) 785-90-91, E-mail: andsofia@mail.ru

Литература:

1. *Global tuberculosis report 2017. Geneva: World Health Organization. 2017.*
2. *Нечаева О.Б. Основные показатели по туберкулезу в Российской Федерации. Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения. Федеральный Центр мониторинга противодействия распространению туберкулеза. URL: <http://mednet.ru/images/stories/ib2017.pdf>.*
3. *Zhang Y., Yew W.W. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2009; 13: 1320-30.*
4. *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. 2006; 312: 1944-6.*
5. *Эргешов А., Андреевская С.Н., Ларионова, Е.Е., Смирнова Т.Г., Черноусова Л.Н. Спектр мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, у клинических штаммов Mycobacterium tuberculosis отражает трансмиссивность мутантных клонов. Молекулярная биология. 2017; 51 (4): 595-602.*
6. *Андреевская С.Н., Андриевская И.Ю., Киселева Е.А., Ларионова Е.Е., Смирнова Т.Г., Черноусова Л.Н., Эргешов А.Э. Влияние мутаций, связанных с устойчивостью к рифампицину, на «фитнес» штаммов M.tuberculosis. Туберкулез и социально-значимые заболевания. 2016; 2: 33-8.*
7. *Sandgren A., Strong M., Muthukrishnan P., Weiner B.K., Church G.M., Murray M.B. Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database. PLoS Med. 2009; 6(2): e1000002.*