

УДК 616.24-002.5:615.03:575.2

ИЗУЧЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *mmpR* И *atpE*, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ УСТОЙЧИВОСТИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* К БЕДАКВИЛИНУ

И.В. Перетокина¹, Л.Ю. Крылова¹, Г.Е. Фрейман¹, Е.Н. Носова¹, Д.В. Зименков²

¹ ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», г. Москва

² ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук», г. Москва

В ходе проведенного исследования получены и проанализированы результаты изучения развития устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к новому противотуберкулезному препарату бедаквилину. Путем полногеномного секвенирования 16 штаммов, выделенных от 16 больных туберкулезом легких после окончания лечения данным препаратом, выявлены 20 мутаций в гене *mmpR* и 6 мутаций в гене-мишени *atpE*, ассоциированные с устойчивостью к бедаквилину *in vitro*. Установлено, что значения МИК препарата при обнаружении мутаций в гене *atpE* штаммов значительно выше, чем при выявлении мутаций в гене *mmpR*.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, бедаквилин, лекарственная устойчивость, мутации

Для цитирования: Перетокина И.В., Крылова Л.Ю., Фрейман Г.Е., Носова Е.Н., Зименков Д.В. Изучение мутаций в генах *mmpR* и *atpE*, ассоциированных с развитием устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к бедаквилину // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2024. – Т. 12, № 1. – С. 4–8. <http://doi.org/10.54921/2413-0346-2024-12-1-4-8>

STUDY OF MUTATIONS IN THE *mmpR* AND *atpE* GENES ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* RESISTANCE TO BEDAQUILINE

I.V. Peretokina¹, L.Yu. Krylova¹, G.E. Freiman¹, E. Yu. Nosova¹, D.V. Zimenkov²

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution «Central Scientific Research Institute of Tuberculosis», Moscow

² Engelhardt Institute of Molecular Biology (EIMB)

In the study we obtained and analyzed the results of the development of resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to the novel antitubercular drug bedaquiline. We investigate 16 strains isolated from 16 patients with pulmonary TB after bedaquiline therapy. With the help of whole-genome sequencing we detected 20 mutations in the *mmpR* gene and 6 mutations in the target gene *atpE* associated with bedaquiline resistance *in vitro*. It was found, that MIC values of bedaquiline were significantly higher for strains with mutations in the *atpE* gene than for MTB strains with mutations in the *mmpR* gene.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, bedaquiline, drug resistance, mutations

For citations: Peretokina I.V., Krylova L.Yu., Freiman G.E., Nosova E. Yu., Zimenkov D.V. Study of mutations in the *mmpR* and *atpE* genes associated with the development of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to bedaquiline. *Tuberculosis and socially significant diseases*, 2024, vol. 12, no. 1, pp. 4–8. (In Russ.) <http://doi.org/10.54921/2413-0346-2024-12-1-4-8>

Несмотря на снижение заболеваемости туберкулезом, в Российской Федерации наблюдается рост распространения возбудителя с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), а в последнее время и с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) [1]. Для решения этой проблемы разрабатываются и применяются новые эффективные противотуберкулезные препараты (ПТП) с оригинальным механизмом действия,

одним из которых является бедаквилин – основной препарат для лечения туберкулеза с МЛУ, применяемый для короткого перорального режима лечения [12].

Широкое использование новых ПТП и отсутствие стандартизированных тестов для определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) *M. tuberculosis* к ним может привести к развитию лекарственной устойчивости (ЛУ) возбудителя. Одним

из важных вопросов в предотвращении распространения лекарственно-устойчивых форм *M. tuberculosis* является изучение формирования ЛУ на фоне лечения больных новыми ПТП [3]. В клинических рекомендациях 2022 года говорится о важности использования в этиологической диагностике туберкулеза как традиционных культуральных методов тестирования ЛЧ *M. tuberculosis*, так и молекулярно-генетических методов для выявления мутаций в ДНК микобактерий, ассоциированных с ЛУ [2].

Бедаквилин применяется в схемах лечения туберкулеза с МЛУ возбудителя относительно недавно. Механизмом действия препарата является ингибирование микобактериальной АТФ-синтазы, что препятствует образованию АТФ в клетке и приводит к нарушению внутриклеточного метаболизма. Описано два вероятных механизма устойчивости *M. tuberculosis* к бедаквилину. Первый механизм связан с появлением мутаций в гене-мишени *atpE*, кодирующем трансмембранную С-субъединицу АТФ-синтазы. Другой механизм связан с формированием приобретенной ЛУ *M. tuberculosis* за счет появления мутаций в гене-репрессора *mmpR* (*Rv0678*), что приводит к повышению транскрипции оперона *mmpS5-L5* и неизбежному увеличению продукции мембранного белка *MmpL5*, ответственного за эффлюкс препарата [4]. Известно, что мутации в гене *atpE* встречаются реже, чем в *mmpR*, однако их появление приводит к высокому уровню устойчивости микобактерий к бедаквилину [6].

Таким образом, для мониторинга формирования устойчивости *M. tuberculosis* к бедаквилину и дальнейшего распространения туберкулеза с МЛУ и ШЛУ возбудителя необходимо проводить исследования по определению ЛЧ с использованием генотипических и культуральных методов.

Цель исследования

Изучить генетические мутации *mmpR* и *atpE*, ассоциированные с развитием устойчивости к бедаквилину, и сопоставить с результатами тестирования чувствительности *M. tuberculosis* к данному препарату культуральными методами.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на базе Централизованной бактериологической лаборатории в ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» (МНПЦБТ). Изучена чувствительность к бедаквилину в отношении 16 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от 16 больных туберкулезом легких, находящихся на лечении в клиниках и филиалах МНПЦБТ и сохранивших бактериовыделение после курса лечения, включающего данный препарат.

Определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) бедаквилина *in vitro* у штаммов *M. tuberculosis* проводили

методом серийных разведений с двойным шагом снижения концентрации на агаровой среде Middlebrook 7H11 (М7Н11) и в жидкой среде Middlebrook 7H9 (М7Н9), с использованием автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 [4, 6, 7, 8, 9]. Для определения значений МИК был выбран диапазон концентраций бедаквилина от 0,06 до 16,0 мкг/мл.

Геномное секвенирование ДНК локусов *mmpR* (*Rv0678*) и *atpE* 16 клинических штаммов *M. tuberculosis* проведено на базе ФГБУН «Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук» [11].

Результаты исследования

В результате проведенного исследования в отношении 16 клинических штаммов *M. tuberculosis* выявлены как единичные, так и смешанные мутации в генах *mmpR* и *atpE*. Результаты секвенирования генов и тестирования МИК бедаквилина в отношении 16 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от 16 больных, сохранивших бактериовыделение после окончания лечения данным препаратом, представлены в таблице 1.

Как показано в таблице 1, в гене *mmpR* у двух штаммов *M. tuberculosis* при одиночных мутациях *c176t*(A59V) и *t359tg*, а также у одного штамма со смешанной мутацией в разных кодонах [*cg15c*][*t141tc*][*g175gcg*][*cg192c*] на агаровой среде М7Н11 получено значение МИК бедаквилина 0,12 мкг/мл, в жидкой среде М7Н9 с помощью BACTEC MGIT 960 – 0,5 мкг/мл.

В отношении двух штаммов со смешанными мутациями в гене *mmpR* в нескольких кодонах [*g106a*(A36T)][*c192cg*] и [*c192cg*][*c291ca*] на среде М7Н11 установлено значение МИК, равное 0,12 мкг/мл, в среде М7Н9 – 1,0 мкг/мл.

Для двух штаммов *M. tuberculosis* с единичными мутациями *t141tc*, *c418cg* и у двух штаммов со смешанными мутациями в нескольких кодонах [*t136c*(C46R)][*g133gtg*][*t119c*(L40S)], [*g337a*(E113K)][*at434a*] в гене *mmpR* на агаровой среде определена МИК препарата 0,25 мкг/мл, в жидкой среде – 0,5 мкг/мл.

При смешанной мутации [*t138tg*][*t341c*(L114P)] в *mmpR* у одного штамма на среде М7Н11 установлено значение МИК, равное 0,25 мкг/мл, в системе BACTEC MGIT 960 – 1,0 мкг/мл.

В отношении еще одного штамма *M. tuberculosis* обнаружены мутации одновременно в двух генах: одиночная *t274ta* в гене *mmpR* и смешанные мутации в нескольких кодонах [*g73a*(G25S)][*a83g*(D28G)] в *atpE*; значение МИК бедаквилина на среде М7Н11 составило 0,25 мкг/мл, на среде М7Н9 – 1,0 мкг/мл.

Для штамма *M. tuberculosis* с одиночной мутацией *g193a*(G65R) в гене *mmpR* значения МИК препарата составили 0,25 мкг/мл на агаровой среде и 2,0 мкг/мл – в жидкой среде.

В отношении двух штаммов со смешанными мутациями в гене *atpE* в разных кодонах [*g82a*(D28N)][*b*][*g183t*(E61D)] на среде М7Н11 установлено значение МИК, равное 0,25 мкг/мл, на среде М7Н9 с помощью BACTEC MGIT 960 – 4,0 мкг/мл.

Таблица 1. Результаты секвенирования генов и тестирования МИК бедаквилина в отношении 16 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от 16 больных, сохранивших бактериовыделение после окончания лечения данным препаратом

Table 1. Results of gene sequencing and testing of MIC bedaquiline against 16 strains of *M. tuberculosis* isolated from 16 patients who retained bacterial excretion after the end of treatment with this drug

Количество штаммов Number of strains (n = 16)	Результаты секвенирования генов Gene sequencing results	Результаты определения значений МИК Bdq, мкг/мл The results of determining the values MIC Bdq, µg/mL	
		на агаровой среде M7H11 in a agar environment M7H11	в жидкой среде M7H9 in a liquid environment M7H9 (BACTEC MGIT 960)
1	<i>mmpR</i> t425g(L142R) <i>atpE</i> c188t(A63V)	1,0	16,0
2	<i>mmpR</i> [c192cg][c291ca]	0,12	1,0
3	<i>mmpR</i> [t138tg][t341c(L114P)]	0,25	1,0
4	<i>mmpR</i> [g337a(E113K)][at434a]	0,25	0,5
5	<i>mmpR</i> gc288g, <i>atpE</i> g187c(A63P)	0,5	2,0
6	<i>atpE</i> [g82a(D28N)]b[g183t(E61D)]	0,25	4,0
7	<i>mmpR</i> t359tg	0,12	0,5
8	<i>mmpR</i> t141tc	0,25	0,5
9	<i>mmpR</i> c418cg	0,25	0,5
10	<i>mmpR</i> g193a(G65R)	0,25	2,0
11	<i>mmpR</i> [g106a(A36T)][c192cg]	0,12	1,0
12	<i>mmpR</i> c176t(A59V)	0,12	0,5
13	<i>mmpR</i> [cg15c][t141tc][g175gcg][cg192c]	0,12	0,5
14	<i>mmpR</i> t274ta, <i>atpE</i> [g73a(G25S)][a83g(D28G)]	0,25	1,0
15	<i>mmpR</i> [t141tc], <i>atpE</i> g187c(A63P)	2,0	16,0
16	<i>mmpR</i> [t136c(C46R)][g133gtg][t119c(L40S)]	0,25	0,5

Самые высокие значения МИК бедаквилина, полученные двумя методами, установлены для трех штаммов *M. tuberculosis*. При выявленных мутациях в двух генах gc288g (*mmpR*) и g187c(A63P) (*atpE*) на агаровой среде получены значения МИК препарата 0,5 мкг/мл, в жидкой среде – 2,0 мкг/мл. Для штамма с мутациями одновременно в двух генах t425g(L142R) (*mmpR*) и c188t(A63V) (*atpE*) на среде M7H11 установлено значение МИК, равное 1,0 мкг/мл, в системе BACTEC MGIT 960 – 16,0 мкг/мл. При мутациях в гене *mmpR* [t141tc] и в *atpE* c188t(A63V) на агаровой среде определено значение МИК 2,0 мкг/мл, в жидкой среде – 16,0 мкг/мл.

Результаты проведенного исследования показали, что в отношении 15 клинических штаммов *M. tuberculosis* в гене *mmpR* выявлено 20 вариантов мутаций: 14 мутаций со сдвигом рамки считывания между положениями кодонов 15 и 434 (15, 133, 138, 141, 175, 176, 192, 274, 288, 291, 337, 359, 418, 434) и 6 мутаций с нуклеотидными заменами между кодоном 106 и 425 (106, 119, 136, 193, 341, 425).

В отношении 3 штаммов *M. tuberculosis* выявлены единичные мутации со сдвигом рамки считывания в гене *mmpR* в 141-м, 359-м и 418-м кодонах. Для двух штаммов обнаружены единичные мутации с нуклеотидными заменами в *mmpR* в 176-м и 193-м кодонах. У двух штаммов установлены смешанные мутации со сдвигом рамки считывания в нескольких кодонах у одного в 192-м, 291-м и второго – в 15-м, 141-м, 175-м, 192-м. Для одного штамма в гене *mmpR* выявлены одновременно смешанные мутации со сдвигом рамки считывания в 138-м кодоне и нуклеотидными заменами в 341-м кодоне. Два штамма имели смешанные мутации в *mmpR* в разных кодонах с нуклеотидными заменами и со сдвигом рамки считывания: у одного в 106-м и 192-м кодонах соответственно; у второго – в 337-м и 434-м кодонах соответственно. У одного штамма в гене *mmpR* выявлены смешанные мутации в нескольких кодонах: в 136-м кодоне – с нуклеотидной заменой, в 133-м – со сдвигом рамки считывания и в 119-м – с нуклеотидной заменой. При обнаружении данных мутаций в гене *mmpR* для 11

вышеперечисленных штаммов *M. tuberculosis* получен диапазон значений МИК бедаквилина на среде М7Н11 от 0,12 мкг/мл до 0,25 мкг/мл, в среде М7Н9 – от 0,5 мкг/мл до 2,0 мкг/мл.

У 5 штаммов *M. tuberculosis* выявлены 6 мутаций в гене *atpE* с нуклеотидными заменами между положениями кодонов 73 и 188 (73, 82, 83, 183, 187, 188). Для одного штамма в *atpE* определена смешанная мутация в двух кодонах – 82, 183; на среде М7Н11 получено значение МИК, равное 0,25 мкг/мл, на среде М7Н9 – 4,0 мкг/мл.

В отношении 4 штаммов *M. tuberculosis* обнаружены смешанные мутации одновременно в двух генах *mmpR* и *atpE*. Для одного штамма выявлены смешанные мутации в *mmpR* (со сдвигом рамки считывания в 141-м кодоне) и в гене *atpE* (с нуклеотидной заменой в 187 кодоне). У второго штамма установлены смешанные мутации со сдвигом рамки считывания в 274-м кодоне в гене *mmpR*, а также с нуклеотидными заменами в двух кодонах (73-м и 83-м) в *atpE*. Для третьего штамма обнаружены смешанные мутации: в кодоне 288 со сдвигом рамки считывания в *mmpR* и в 187-м кодоне с нуклеотидной заменой в гене *atpE*. У четвертого штамма также выявлены смешанные мутации с нуклеотидными заменами в двух генах: в 425-м кодоне – в гене *mmpR* и в 188-м кодоне – в *atpE*. При выявлении данных мутаций одновременно в генах *mmpR* и *atpE* получены диапазоны значений МИК бедаквилина на среде М7Н11 от 0,25 мкг/мл до 2,0 мкг/мл, в среде М7Н9 – от 1,0 мкг/мл до 16,0 мкг/мл.

Таким образом, выявлены мутации в генах *mmpR* и *atpE*, ассоциированные с устойчивостью к бедаквилину *in vitro*. Установлено, что значения МИК при обнаружении мутаций в гене *atpE* штаммов *M. tuberculosis* значительно выше, чем при выявлении мутаций только в гене *mmpR*.

Закключение

В настоящем исследовании обнаружено большое разнообразие вариантов генетических детерминант устойчивости микобактерий к бедаквилину. У 16 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом после окончания лечения бедаквилином, выявлены 20 мутаций в репрессоре эффлюксной помпы гена *mmpR*, которые широко распространены между 15-м и 434-м кодонами (15, 106, 119, 133, 136, 138, 141, 175, 176, 192, 193, 274, 288, 291, 337, 341, 359, 418, 425, 434), и 6 мутаций в гене-мишени *atpE* в 73-м, 82-м, 83-м, 183-м, 187-м, 188-м кодонах, ассоциированных с устойчивостью к данному препарату *in vitro*.

В результате исследования установлено, что выявленное разнообразие мутаций в гене *mmpR*, замен в *atpE*, а также двойных мутаций (*mmpR*, *atpE*) у штаммов *M. tuberculosis*, выделенных после окончания лечения бедаквилином, приводит к повышению значений МИК препарата от 0,12 мкг/мл на агаровой среде Middlebrook 7Н11 и от 0,5 мкг/мл в жидкой среде Middlebrook 7Н9. Это свидетельствует о формировании приобретенной лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза под воздействием препарата в процессе химиотерапии пациента.

Проведение комплексных исследований как молекулярно-генетических, так и культуральных, характеризующих не только лекарственную чувствительность/устойчивость, но и механизмы резистентности к ПТП, оказывает потенциальное влияние на диагностику и эффективность лечения туберкулеза.

Литература

1. Васильева И.А., Тестов В.В., Стерликов С.А. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в годы пандемии COVID-19 – 2020–2021 гг. // Туберкулез и болезни легких. – 2022. – Т. 100. – № 3. – С. 6-12.
2. Туберкулез у взрослых: клинические рекомендации. 2022–2023–2024 / Утв. Минздравом России от 04.03.2022. – [Электронный ресурс] http://disuria.ru/_id/11/1173_kr22A15A19MZ.pdf.
3. Литвинов В.И., Макарова М.В., Носова Е.Ю., Сафонова С.Г. Изучение лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2016. – №4. – С. 45-55.
4. Andries K., Villellas C., Coeck N., Thys K., Gevers T., Vranckx L., Lounis N., de Jong B.C., Koul A. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 7. – P. e102135.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes / CLSI document M24-A2. Approved standard. – 2nd ed. - Wayne, PA, 2011. – 61 p.
6. 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). – 2020. – Vol. 9, № 3. – P. 133.
7. Rodrigues C., Jani J., Shenai S., Thakkar P., Siddiqi S., Mehta A. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against second-line drugs using the Bactec MGIT 960 system // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2008. – Vol. 12, № 12. – P. 1449-1455.
8. Rüsche-Gerdes S., Pfyffer G.E., Casal M., Chadwick M., Siddiqi S. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 3. – P. 688-692.

9. Siddiqi S.H., Rusch-Gerdes S. MGIT procedure manual for BACTEC™ MGIT 960™ system. – Foundation for Innovative New Diagnostics, 2006. – 74 p. [Электронный ресурс] https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf.
10. Torrea G., Coeck N., Desmaretz C., Parre T.V.D., Poucke T.V., Lounis N., de Jong B.C., Rigouts L. Bedaquiline susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in an automated liquid culture system // J. Antimicrob. Chemother. – 2015. – Vol. 70, № 8. – P. 2300-2305.
11. Zimenkov D.V., Nosova E.Y., Kulagina E.V., Antonova O.V., Arslanbaeva L.R., Isakova A.I., Krylova L.Y., Peretokina I.V., Makarova M.V., Safonova S.G., Borisov S.E., Gryadunov D.A. Examination of bedaquiline – and linezolid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from the Moscow region // J. Antimicrobial. Chemotherapy. – 2017. – Vol. 72, № 7. – P. 1901-1906.
12. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment: drug-resistant tuberculosis treatment. – Geneva: WHO, 2020. [Электронный ресурс] <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240007048>.

Об авторах

Перетокина Ирина Витальевна – врач-бактериолог Централизованной бактериологической лаборатории ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Строминка, д. 10, стр. 1

Тел. + 7 (499) 268-70-33

e-mail: iraperetokina@yandex.ru

Крылова Людмила Юрьевна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Строминка, д. 10, стр. 1

Тел. + 7 (499) 268-70-33

e-mail: luda.yurievna2017@yandex.ru

Фрейман Георгий Ефимович – заведующий Централизованной бактериологической лабораторией ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Строминка, д. 10, стр. 1

Тел. + 7 (499) 268-70-33

e-mail: g.freiman@mail.ru

Носова Елена Юрьевна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Строминка, д. 10, стр. 1

Тел. + 7 (495) 603-30-33

e-mail: rna68@rambler.ru

Зименков Данила Вадимович – ведущий научный сотрудник лаборатории технологий молекулярной диагностики Центра высокоточного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук», кандидат биологических наук

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32, стр. 1

Тел. + 7 (499) 135-14-05

e-mail: z@biochip.ru