

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К РИФАМПИЦИНУ, НА «ФИТНЕС» ШТАММОВ *M. TUBERCULOSIS*

С.Н. Андреевская, И.Ю. Андриевская, Е.А. Киселева, Е.Е. Ларионова, Т.Г. Смирнова, Л.Н. Черноусова, А.Э. Эргешов
ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва

THE IMPACT OF MUTATIONS CONNECTED WITH RIFAMPICIN RESISTANCE ON THE *M. TUBERCULOSIS* STRAINS «FITNESS»

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

Для оценки возможного влияния на «фитнес» штаммов *M. tuberculosis* (МБТ) мутаций, приводящих к устойчивости к рифампицину, с использованием набора «ТБ-БИОЧИП» («Биочип-ИМБ», Россия) проанализирован спектр однонуклеотидных полиморфизмов в геноме у МБТ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), выделенных от впервые выявленных (309 штаммов) и ранее леченных (324 штамма) больных туберкулезом. В группе штаммов МБТ, выделенных от ранее леченных больных, было представлено большее число мутантных вариантов по сравнению со штаммами МБТ, выделенными от впервые выявленных больных. Также для штаммов МБТ, выделенных от ранее леченных больных туберкулезом, были продемонстрированы компенсаторные механизмы, направленные на повышение ЛУ за счет возникновения дополнительных мутаций в анализируемом регионе *rpoB*. В обеих группах преобладали штаммы с заменой 531 Ser → Leu (87,4% и 71,3%, соответственно), что однозначно свидетельствует о сохранении «фитнеса» штаммов, несущих данную мутацию.

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

To estimate the potential impact of mutations leading to the RIF-resistance on the «fitness» of *M. tuberculosis* (MTB) we analyzed using TB-BIOCHIP («BIOCHIP IMB» Russia) the spectrum of single nucleotide polymorphisms (SNP) in *rpoB* gene in 309 MDR-MTB strains obtained from new-detected and 324 MDR-MTB strains obtained from previously treated TB-patients. It was found that in the group of MBT strains isolated from previously treated TB-patients was detected more mutant variants in comparison with MTB strains obtained from new-detected patients. Also MBT strains isolated from previously treated TB-patients had compensatory mechanisms aimed at severization of drug resistance due to additional mutations in the analyzed *rpoB* region. The strains with SNP 531 Ser → Leu prevailed in both groups (87,4% and 71,3%, respectively), that is clearly pointed to maintenance of «fitness» of strains with this SNP.

Keywords: *M. tuberculosis*, drug resistance, spectrum of mutations, biological microchips

Введение

Рифампицин является одним из ключевых препаратов при лечении туберкулеза. Он обладает бактерицидным действием как в отношении размножающихся *M. tuberculosis* (МБТ), так и МБТ с низкой метаболической активностью, благодаря этим свойствам удалось сократить курс химиотерапии туберкулеза. Рифампицин связывается с β -субъединицей РНК-полимеразы и блокирует элонгацию цепи РНК. Возникновение у МБТ спонтанных мутаций, приводящих к устойчивости к рифампицину, происходит с частотой 10^{-7} – 10^{-8} и в 96% случаев обусловлено мутациями на уровне гена *rrpV* в регионе длиной 81 пара оснований [12]. Геномные альтерации, приводя в итоге к изменению белкового продукта гена, могут оказывать неоднозначное влияние на «фитнес» МБТ – так называют способность возбудителя выживать в макроорганизме и передаваться в популяции [3, 4].

Для оценки возможного влияния на «фитнес» штаммов МБТ мутаций, приводящих к устойчивости к рифампицину, был проанализирован спектр однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) в гене *rrpV* у МБТ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), выделенных от впервые выявленных и ранее леченных больных туберкулезом.

Спектр мутаций МБТ, выделенных от впервые выявленных больных, будет характеризовать ОНП, которые не оказывают существенного негативного влияния на «фитнес» возбудителя, так как в случае первичного выявления МЛУ речь идет о заражении устойчивым клоном МБТ, что свидетельствует о сохранении его способности к передаче в популяции. Штаммы МБТ, выделенные от ранее леченных больных, могут служить моделью возникновения компенсаторных мутаций под действием химиотерапии или спонтанных мутаций, которые могли возникнуть и закрепиться из-за неадекватного курса лечения. Необходимо отметить, что в рамках представленного исследования из-за особенностей использованной тест-системы будут описаны только компенсаторные мутации, направленные на повышение уровня лекарственной устойчивости к рифампицину.

Материал и методы исследования

Бактериальные штаммы. Исследовано 633 культуры МБТ, из которых 309 были получены от впервые выявленных, а 324 – от ранее леченных больных туберкулезом из клинических отделений Центрального НИИ туберкулеза.

Получение культур МБТ на жидкой среде в системе BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson, США) было проведено согласно стандартному протоколу изготовителя [10]. Все положительные культуры подвергали контролю на видовую специфичность (принадлежность к микобактериям туберкулеза). Для определения кислотоустойчивости выросшей культуры проводили микроскопию мазков по Цилю–Нельсену

[1]. Если в «положительной» пробирке MGIT подтверждалось присутствие кислотоустойчивых бактерий, проводили иммунохроматографический экспресс-тест BD MGIT™ TBc ID для качественного определения антигена комплекса *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) MPT64. Тест проводили согласно инструкции изготовителя. При положительном результате теста делали вывод о присутствии в образце МБТ. При отрицательном результате теста и положительном результате микроскопии с окраской по Цилю–Нельсену делали вывод о наличии кислотоустойчивых бактерий, не относящихся к МБТ. Для контроля роста в системе BACTEC™ MGIT™ 960 неспецифической микрофлоры проводили посев культуры на кровяной агар. При наличии роста микроорганизмов на кровяном агаре через 24 часа инкубации при 37 °С делали вывод о контаминации исследуемого материала неспецифической микрофлорой.

Определение лекарственной чувствительности (ЛЧ) МБТ с использованием автоматизированной системы BACTEC™ MGIT™ 960 к противотуберкулезным препаратам (ПТП) первого ряда осуществляли согласно стандартному протоколу производителя [10].

Определение генотипической устойчивости к рифампицину проводили с использованием набора «ТБ-БИОЧИП» («Биочип-ИМБ», Россия) согласно инструкции изготовителя [2]. Выделение ДНК из культур МБТ проводили в роботизированной системе для автоматического раскапывания жидкостей EVO 150 (TECAN, Швеция) с набором реагентов «М-Сорб-Туб-Автомат» («Синтол», Россия) согласно инструкции изготовителя. Амплификацию ДНК осуществляли в термоциклере «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), инкубацию биочипов для осуществления гибридизации проводили в гибридизационной печи LabLine (LabLine, США), визуализацию результатов осуществляли с использованием Комплекса универсального аппаратно-программного (УАПК) для анализа биологических микрочипов.

Результаты исследования и обсуждение

Спектр мутаций в гене *rrpV* у МЛУ МБТ, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом. При анализе спектра мутаций в гене *rrpV* у МЛУ МБТ, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом, было показано, что практически во всех случаях (306 из 309 штаммов, 99,0%) регистрировали единичные замены в анализируемом регионе гена. У трех штаммов было выявлено сочетание одновременно двух мутаций в *rrpV*, в кодонах 511 (Leu → Pro) и 516 (Asp → Gly). Всего было выявлено 13 вариантов замен, затрагивающих четыре кодона (511 – один вариант замены, 516 – три варианта замен, 526 – семь вариантов замен, 531 – два варианта замен) (табл. 1).

Доминирующим вариантом была мутация в 531 кодоне, ведущая к замене Ser → Leu, ассоциированная с высоким уровнем

Таблица 1. Спектр мутаций в гене *groV* у МЛУ МБТ, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом

Кодон	Аминокислотная замена	Число штаммов с данной заменой (с учетом сочетанных мутаций) штаммов (<i>n</i> = 309)	
		абс.	%
511	Leu → Pro	7 *	2,3
516	Asp → Val	14	4,5
	Asp → Gly	3 **	1,0
	Asp → Tyr	1	0,3
526	His → Arg	2	0,7
	His → Asn	1	0,3
	His → Asp	3	1,0
	His → Cys	3	1,0
	His → Leu	3	1,0
	His → Pro	1	0,3
	His → Tyr	2	0,7
531	Ser → Leu	270	87,4
	Ser → Trp	2	0,7

Примечание:

* включая три штамма, несущих данную замену в сочетании с заменой 516 (Asp → Gly);

** только в виде сочетанных мутаций с 511 (Leu → Pro).

устойчивости к рифампицину, которая встретилась у 270 из 309 (87,4%) штаммов. Вторым по распространенности был вариант 516 (Asp → Val), также связанный с высоким уровнем устойчивости, который встретился у 14 (4,53%) штаммов. Мутация 516 (Asp → Gly), которая приводит к низкому уровню лекарственной устойчивости к рифампицину, встречалась только в сочетании с заменой 511 (Leu → Pro), которая также ассоциируется с низким

уровнем ЛУ к рифампицину [8, 9, 11]. Интересно отметить, что мутация 511 (Leu → Pro) встречалась приблизительно с равной частотой как в виде единичных мутаций (четыре штамма), так и в сочетании с 516 (Asp → Gly) (три штамма). Остальные варианты замен в изучаемом регионе *groV*, встречавшиеся самостоятельно, регистрировали у 1–3 штаммов МБТ анализируемой выборки.

Спектр мутаций в гене *groV* у МЛУ МБТ, выделенных от ранее леченных больных туберкулезом. В группе МЛУ МБТ, выделенных от ранее леченных больных туберкулезом, у 304 из 324 (93,8%) штаммов были выявлены единичные мутации, ведущие к устойчивости к рифампицину. У 20 штаммов (6,2%) было показано сочетание двух ОНП в анализируемом регионе гена. Всего в данной выборке штаммов было зарегистрировано 17 вариантов замен, затрагивающих семь кодонов (табл. 2).

Как и в группе штаммов, выделенных от впервые выявленных больных, у МБТ, выделенных от ранее леченных пациентов, доминировал вариант 531 (Ser → Leu), который встретился у 231 из 324 (71,3%) штаммов. Также достаточно часто встречался мутантный вариант 516 (Asp → Val) – у 21 (6,5%) штамма, включая один штамм, несущий данную мутацию в сочетании с редкой заменой в 531 кодоне Ser → Gln. Замены 511 (Leu → Pro) и 533 (Leu → Pro), ассоциированные с низким уровнем устойчивости к рифампицину [8, 9, 11], встречались, каждая, у 14 штаммов, часто в сочетании с другими вариантами ОНП в анализируемом регионе *groV* (у 5 из 14 и 6 из 14, соответственно). Два ОНП в 526-м кодоне, приводящие к замене His → Asp и His → Tyr, ассоциированные с высоким уровнем устойчивости к рифампицину [11], встречались суммарно у 20 штаммов, причем всегда в виде единичной мутации.

Таблица 2. Спектр мутаций в гене *groV* у МЛУ МБТ, выделенных от ранее леченных больных туберкулезом

Кодон	Аминокислотная замена	Число штаммов с данной заменой (<i>n</i> = 324):			
		единичная мутация	в сочетании с другими ОНП	всего	
				абс.	%
511	Leu → Pro	9	5	14	4,3
513	Gln → Leu	1	–	1	0,3
	Gln → Gly	–	2	2	0,6
515	Met → Ile	–	4	4	1,2
516	Asp → Val	20	1	21	6,5
	Asp → Gly	–	7	7	2,2
	Asp → Tyr	5	–	5	1,5
526	His → Asp	12	–	12	3,7
	His → Asn	4	3	7	2,2
	His → Arg	4	–	4	1,2
	His → Leu	4	–	4	1,2
	His → Pro	–	2	2	0,6
	His → Tyr	8	–	8	2,5
531	Ser → Leu	224	7	231	71,3
	Ser → Gln	1	2	3	0,9
	Ser → Tyr	–	1	1	0,3
	Ser → Trp	4	–	4	1,2
533	Leu → Pro	8	6	14	4,3

Закключение

Анализ спектра мутаций в *rpoB*, приводящих к устойчивости к рифампицину, показал, что в группе штаммов МБТ, выделенных от ранее леченных больных, было представлено большее число мутантных вариантов по сравнению со штаммами МБТ, выделенными от впервые выявленных больных. Также для штаммов МБТ, выделенных от ранее леченных больных туберкулезом, были продемонстрированы компенсаторные механизмы, направленные на повышение ЛУ за счет возникновения дополнительных мутаций в анализируемом регионе *rpoB*. Однако складывается впечатление, что штаммы МБТ, несущие двойные мутации на уровне *rpoB*, имеют сниженный «фитнес», так как в группе штаммов, выделенных от впервые выявленных больных, как правило, встречаются штаммы с единичными мутациями.

В обеих группах преобладали штаммы с заменой 531 Ser → Leu (87,38% и 71,30%, соответственно), что однозначно свидетельствует о сохранении «фитнеса» штаммов, несущих данную мутацию, и согласуется с данными литературы [5, 6, 11].

Сопоставление частоты встречаемости наиболее распространенных мутантных вариантов у штаммов МБТ, выделенных от впервые выявленных и ранее леченных больных, представлено в таблице 3.

Как следует из таблицы, у штаммов, несущих мутацию 516 (Asp → Val), «фитнес» сохраняется, так как их частота приблизительно одинакова в обеих группах. В отличие от них штаммы с мутациями в 526-м кодоне His → Asp и His → Tyr обладают сниженным «фитнесом», так как, являясь достаточно распространенными в группе штаммов от ранее леченных больных, крайне редко встречаются среди МБТ, выделенных от впервые выявленных больных. Штаммы, несущие мутацию 533

Таблица 3. Частота наиболее распространенных мутаций в *rpoB* у штаммов МБТ, выделенных от впервые выявленных и ранее леченных больных туберкулезом

Кодон	Замена	Число (%) штаммов в группе:			
		впервые выявленных больных (n = 309)		ранее леченных больных (n = 324)	
		абс.	%	абс.	%
516	Asp → Val	14	4,5	21	6,5
526	His → Asp	3	1,0	12	3,7
	His → Tyr	2	0,6	8	2,5
531	Ser → Leu	270	87,4	231	71,3
533	Leu → Pro	–	–	14	4,3

(Leu → Pro), характеризуются очень низким «фитнесом», так как в группе штаммов, выделенных от впервые выявленных больных, не было ни одного, несущего данный ОНП.

Моделирование динамики развития популяции МБТ в организме хозяина в процессе противотуберкулезной терапии показало, что «фитнес» штамма оказывает большое влияние на исход терапии, а также на вероятность активации латентного туберкулеза [7]. Знания о влиянии конкретных мутаций, ведущих к лекарственной устойчивости на «фитнес», крайне важны для прогнозирования долгосрочного исхода туберкулезного процесса и эпидемической значимости выделенного мутантного клона МБТ. Полученные в рамках проведенного исследования результаты показывают широкое распространение в популяции высоко-трансмиссивных штаммов МБТ с высоким уровнем устойчивости к рифампицину, что свидетельствует о неблагоприятной эпидемиологической ситуации, связанной с распространением туберкулеза с МЛУ МБТ в Российской Федерации.

Литература

1. О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации / Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 109 от 21.03.2003.
2. Руководство по применению набора реагентов для выявления микобактерий туберкулезного комплекса и определения их лекарственной чувствительности к рифампицину и изониазиду на биологических микрочипах «ТБ-БИОЧИП-1». Регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития России № ФСР2011/ 10088 от 03.02.2011 г.
3. Borrell S., Gagneux S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* – 2009. – Vol. 13. – P. 1456-1466.
4. Böttger E.C., Springer B. Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. // *Eur. J. Pediatr.* – 2008. – Vol. 167. – P. 141-148.
5. Fenner L., Egger M., Bodmer T. et al. Effect of mutation and genetic background on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2012. – Vol. 56. – P. 3047-3053.
6. Gagneux S., Long C., Small P. et al. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Science*. – 2006. – Vol. 312. – P. 1944-1946.
7. Lipsitch M., Levin B. Population dynamics of tuberculosis treatment: mathematical models of the roles of non-compliance and bacterial heterogeneity in the evolution of drug resistance. // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* – 1998. – Vol. 2. – P. 187-199.
8. Moghazeh S., Pan X., Arain T. et al. Comparative antimycobacterial activities of rifampin, rifapentine, and KRM-1648 against a collection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 1996. – Vol. 40. – P. 2655-2657.
9. Ohno H., Koga H., Kohno S. et al. Relationship between rifampin MICs and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 1996. – Vol. 40. – P. 1053-1056.
10. Siddiqi S., Rusch-Gerdes S. MGIT procedure manual for BACTEC MGIT 960TB System. 2006.

11. Zaczek A., Brzostek A., Augustynowicz-Kopeć E. et al. Genetic evaluation of relationship between mutations in *rpoB* and resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin. // BMC Microbiol. – 2009. – Vol. 9. – e10.
12. Zhang Y., Yew W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2009. – Vol. 13. – P. 1320-1330.

Сведения об авторах

Андреевская Софья Николаевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», кандидат медицинских наук

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-90-91

e-mail: andsofia@mail.ru

Андреевская Ирина Юрьевна – младший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-90-91

e-mail: andrievskaya.iri@mail.ru

Киселева Екатерина Андреевна – лаборант-исследователь отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-90-91

e-mail: ekaterinka_kiseleva@mail.ru

Ларионова Елена Евгеньевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», кандидат биологических наук

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-90-91

e-mail: larionova_lena@mail.ru

Смирнова Татьяна Геннадьевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», кандидат медицинских наук

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-90-91

e-mail: s_tatka@mail.ru

Черноусова Лариса Николаевна – руководитель отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», доктор биологических наук, профессор

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-90-91

e-mail: lchernousova@mail.ru

Эргешов Атаджан Эргешович – директор ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», доктор медицинских наук, профессор

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-90-91

e-mail: cniit@ramn.ru