

СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ НА ТЕРРИТОРИИ МОСКВЫ

А.А. Хахалина, М.А. Краснова, Е.М. Белиловский, И.В. Перетокина, Е.Ю. Носова, С.Г. Сафонова
ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом
Департамента здравоохранения города Москвы»

POPULATION STRUCTURE OF MULTIDRUG RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* SPREADING IN MOSCOW

A.A. Khakhalina, M.A. Krasnova, E.M. Belilovsky, I.V. Peretokina, E.Yu. Nosova, S.G. Safonova

В статье представлены результаты ретроспективного исследования культур *M. tuberculosis* (МБТ), полученных от больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью, зарегистрированных или уже состоящих на диспансерном учете в 2014 году в городе Москве. С помощью сполиготипирования и молекулярных тестов для выявления мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью (ЛУ) к изониазиду, рифампицину, фторхинолонам, аминогликозидам/попептиду, была определена принадлежность 274 культур МЛУ МБТ к генетическим группам Beijing и non-Beijing, а также детерминанты ЛУ, что позволило провести анализ и сравнить генетическую структуру штаммов. Изученные культуры чаще всего (81%) относились к семейству Beijing, их ЛУ обусловлена мутациями, которые, по данным литературы, связаны с высоким уровнем устойчивости возбудителя к противотуберкулезным препаратам, формируя тем самым высоко трансмиссивный, эпидемиологически опасный и трудно поддающийся лечению штамм МБТ.

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, сполиготипирование, генетические семейства, лекарственная чувствительность

The article presents the results of a retrospective study of multidrug-resistant *M. tuberculosis* (MTB) strains obtained from patients with pulmonary tuberculosis who were under regular medical check-up in 2014 in Moscow. We determined of belonging of 274 MDR MTB strains to Beijing and non-Beijing lineages as well as determinants of drug resistance by spoligotyping and molecular DST for isoniazid, rifampicin, fluoroquinolones, aminoglycosides/polypeptides, and performed the comparative analysis of the genetic structure of the strains. 81% of the studied MTB were detected as highly transmissible, epidemiologically dangerous and difficult to treat Beijing strains with mutations, which, according to the literature, are associated with a high level of pathogen resistance to antitubercular drugs.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, spoligotyping, genetic family, drug sensitivity

Введение

Показатели заболеваемости туберкулезом характеризуются не только увеличением лекарственной устойчивости (ЛУ) *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) к препаратам основного и резервного ряда, но и появлением штаммов с тотальной ЛУ ко всем противотуберкулезным препаратам (ПТП) [18].

В Российской Федерации доля больных туберкулезом, микобактерий с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ и ШЛУ) неуклонно растет год от года. Начиная с регистрации этого показателя в 1999 г., у впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания он увеличился с 6,7 до 20,4% (2014 г.), а у больных, стоящих на учете, – с 10,5 до 43,9%

(2014 г.). Эпидемическая обстановка в г. Москве также остается непростой. Доля больных туберкулезом с МЛУ МБТ среди впервые выявленных больных туберкулезом легких составляла от 12,8 (2012 г.) до 15,9% (2014 г.), а среди контингентов – от 30,0 (2012 г.) до 29,3% (2014 г.) [5, 8, 9].

Известно, что различные формы туберкулеза и исходы его лечения связаны с генетической предрасположенностью, иммунным ответом человека и факторами окружающей среды. В то же время значение бактериальных факторов, в первую очередь генетических, ответственных за вирулентность и трансмиссивность штамма, может дополнить и прояснить патогенез и закономерности распространения туберкулезной инфекции.

Так как *M. tuberculosis* свойственна клональная неоднородность, то эпидемию (пандемию) туберкулеза можно расценивать как сеть, узлами которой являются вспышки заболевания (очаги), вызванные определенными клонами МБТ. Изучение штамм-специфического разнообразия и его влияния на клиническую картину заболевания представляет важный малоизученный аспект как микобактериологии, так и фтизиатрии в целом. Для решения этой задачи применяют различные методы молекулярной эпидемиологии, включающие прежде всего генотипирование. В настоящее время «золотым стандартом» молекулярно-эпидемиологических исследований является полногеномное секвенирование ДНК МБТ, которое позволяет установить 100% нуклеотидную последовательность ДНК МБТ конкретного штамма. Одним из ограничений этого метода является требование высокой концентрации ДНК, а соответственно, и микобактериальной массы в исследуемой пробе. В то же время метод сполиготипирования, представленный этапами ПЦР и гибридизации, преодолевает эти ограничения [19]. Основой методики является оценка присутствия (или отсутствия) 43 уникальных последовательностей – спейсеров, находящихся между прямыми повторами ДНК МБТ (DR-повторы).

В настоящее время выделяют более 36 генетических семейств МБТ. Наиболее распространенными являются штаммы генотипа *Beijing* [2, 30, 33]. По данным ряда авторов, МБТ семейства *Beijing* чаще всего характеризуются ЛУ к препаратам основного ряда (изониазиду и рифампицину), которые способны вызывать тяжелые формы туберкулеза легких с высоким уровнем смертности [1, 3]. Распространение штаммов МБТ данного семейства выявлена и на территории России, что представляет серьезную эпидемическую опасность [7].

Ускоренная молекулярно-генетическая диагностика лекарственной чувствительности (ЛЧ) и молекулярно-эпидемиологическое генотипирование штаммов МБТ необходимы не только для назначения персонализированного лечения наиболее сложных случаев заболевания, но, что еще очень важно, для изучения распространения различных генотипов штамма МБТ и их мутаций среди населения определенного региона.

Последнее позволит определять пути трансмиссии, а значит, и снижения возможности заражения населения штаммами МБТ с МЛУ и с ШЛУ.

Цель исследования

Изучить спектр мутаций, ассоциированных с множественной и широкой лекарственной устойчивостью, среди штаммов *M. tuberculosis*, относящихся к различным молекулярно-генетическим семействам, на основе эпидемиологически значимой выборки больных туберкулезом, состоящих на учете в городе Москве.

Материалы и методы исследования

В ретроспективное исследование были взяты все культуры, выделенные в Централизованной бактериологической лаборатории ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» от больных туберкулезом легких с МЛУ МБТ, зарегистрированных или уже состоявших на диспансерном учете в 2014 г. в городе Москве. Эти пациенты составили почти 40% больных туберкулезом, состоявших на учете (191 пациент из постоянного населения при 487 больных туберкулезом с МЛУ МБТ). В то же время 82 впервые выявленных больных туберкулезом, входящих в исследование, составили более половины (53%) данной группы пациентов, взятых в когорты лечения туберкулеза с МЛУ МБТ в 2014 г. Таким образом, полученные в данном исследовании результаты могут с достаточной достоверностью отражать распространение выявленных генотипов и мутаций среди населения города.

Было исследовано 274 пробы ДНК МБТ, выделенные из культур 274 впервые выявленных больных туберкулезом легких и больных, взятых на повторные курсы лечения, включая пациентов с хроническим течением процесса. Критерием отбора исследуемых штаммов было наличие в ДНК МБТ генетических детерминант лекарственной устойчивости к изониазиду и рифампицину.

Микробиологическое исследование чувствительности *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам основного и резервного ряда проводили в жидкой среде *Middlebrook 7H9* в системе ВАСТЕС™ MGIT™ 960 согласно стандартным протоколам [13, 32].

Для молекулярного анализа использовали тест-систему «ТБ-БИОЧИП» (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия) для определения мутаций в гене *rpoB* (устойчивость к рифампицину) и в генах *katG*, *ihnA* и *ahpC* (устойчивость к изониазиду). Для определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к фторхинолонам в гене *gyrA* использовали тест-систему «ТБ-БИОЧИП-2» (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия).

Определение мутаций в гене *rrs*, ответственных за устойчивость к аминогликозидам и полипептиду, проводили с помощью тест-системы GenoType® MTBDRsl (HainLifescience, Германия).

Сполиготипирование *M. tuberculosis* выполняли с помощью тест-системы «СПОЛИГО-БИОЧИП» (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия).

Результаты исследования

1. Распределение штаммов МЛУ МБТ по основным филогенетическим семействам.

С помощью тест-системы «СПОЛИГО-БИОЧИП» была определена принадлежность 274 культур *M. tuberculosis* к генетическим группам *Beijing* и *non-Beijing*, которые составили 222 (81%) и 52 (19%) штамма соответственно (рисунок).

Из 222 (81,0%, 95%ДИ 75,9–85,5%) штаммов семейства *Beijing* шесть (2,7%, 95%ДИ 1,0–5,8%) относились к подсемейству *Beijing-like*. Как известно, семейство *Beijing* широко распространено на территории Евразии и связано с повышенной вирулентностью и ЛУ. В России такие штаммы занимают первое место по выявлению среди всех генотипов [4].

В свою очередь, 52 (19,0%, 95%ДИ 14,5–24,1%) штамма относились к группе *non-Beijing*. Из группы генетических семейств *non-Beijing* наиболее встречаемыми были семейства/подсемейства *LAM9* – 26,9% (95%ДИ 15,5–41,0%), *Ural* – 23,1% (95%ДИ 12,5–36,8%) и *T1* – 21,2% (95%ДИ 11,1–34,7%). Подсемейство *LAM9* (семейство *LAM*) относится к одному из наиболее распространенных генотипов МБТ как за рубежом, так и в России и странах СНГ. Циркулирующие на территории России штаммы *LAM* также чаще всего ассоциированы с ЛУ [21, 26, 31]. Несмотря на то что это семейство представлено множеством подсемейств, все 14 исследованных штаммов, принадлежащих *LAM*, относились только к одному из них – *LAM9*.

Генотип *Ural*, полученный у 12 больных (4,4% 95%ДИ 2,3–7% от всех штаммов или 23,1% в группе *non-Beijing*), был выделен в отдельное семейство С.Ю. Ковалевым и соавт. (2005 г.) на основании результатов генотипирования методом MIRU-VNTR штаммов, полученных от пациентов, зарегистрированных на территории центрального Урала [22]. Позже было установлено, что семейство *Ural* широко распространено на территории Евразии и включает в себя два подсемейства: *Ural1* (встречается преимущественно в Европе) и *Ural2* (встречается преимущественно в Азии). В нашем исследовании все штаммы МБТ относились к подсемейству *Ural1*. Считается, что фенотипически штаммы *Ural* низковирулентные и не ассоциированы с ЛУ [24]. В среднем частота выявления генотипа *Ural* колеблется от 5 до 19% от всех изученных штаммов в зависимости от региона. Для Северо-Западного, Западного и Центрального федеральных округов России этот показатель, по данным разных авторов, составляет 5–7%. [22, 24, 27].

Подсемейство *T1*, выделенное у 11 пациентов (4,0% 95%ДИ 2,0–7,1% или 21,2% в группе *non-Beijing*), представитель древнего малоизученного семейства *T*. В семейство *T* также входят генотипы *T1_RUS2*, *T5_RUS1*, в нашем исследовании им соответствовали один и два штамма МБТ с МЛУ соответственно

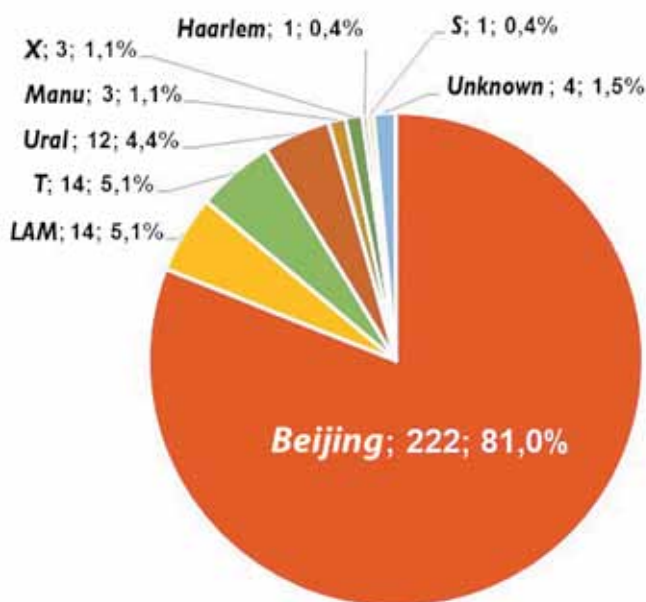


Рисунок. Распределение 274 штаммов МБТ с МЛУ по основным филогенетическим семействам

(1,9% и 3,8% в группе *non-Beijing*). Необходимо отметить, что, по данным российских и зарубежных исследователей, результаты сполитипирования для *T*-семейства неоднозначны и требуют дальнейшего уточнения [25, 34]. Представители других семейств – *X1*, *Manu2*, *H1*, *S1* представлены единичными штаммами (3, 3, 1 и 1 штамм соответственно) и составили 2,9% (95%ДИ 1,3–5,7%) или 15,4% в группе *non-Beijing*.

2. Генетическая неоднородность штаммов МЛУ МБТ.

Представляло интерес изучить генетическую неоднородность исследуемых штаммов МЛУ МБТ по DR-локусу хромосомы МБТ. В результате сполитипирования 274 штаммов МБТ определено 33 профиля гибридизации (табл. 1).

Результаты сполитипирования (табл. 2) показали, что практически каждое «мегасемейство» в нашем исследовании неоднородно и представлено подсемействами и вариациями сполитипов, являющихся наиболее индивидуальной характеристикой конкретного штамма. В соответствии с представленными данными на разных уровнях дифференциации каждого штамма частоты их встречаемости будут разные. Так, среди выделенных в Москве штаммов наиболее часто встречались штаммы: «мегасемейств» *Beijing* – 222, *LAM* – 14, *T* – 14, *Ural* – 12, подсемейств *Beijing* – 216, *LAM9* – 14, *Ural* – 12, *T1* – 11, сполитипов различных семейств/подсемейств (SIT) *Beijing* *SIT1* – 214, *Ural1* *SIT262* – 9, *LAM9* *SIT252* – 7, *LAM9* *SIT42* – 5, *Beijing-like* *SIT269* – 5.

3. Спектр мутаций, ассоциированных с фенотипической устойчивостью, в штаммах с различным генотипом.

С помощью молекулярно-генетических тестов «ТБ-БИОЧИП», «ТБ-БИОЧИП-2», GenoType® MTBDRsl был определен спектр мутаций в генах *katG*, *ihnA*, *ahpC*, *rpoB*, *gyrA*, *rrs* и сопоставлен с

Таблица 2. Результаты сполиготипирования штаммов МБТ с МЛУ (n = 274)

Генетическая линия/семейство Количество / доля (%)	Генетическое семейство/подсемейство Количество / доля (%)	Тип штамма (SIT)	Количество штаммов	
Beijing 222 / 81,0	Beijing 216 / 78,8	1	214	
		255	1	
		256	1	
	Beijing-like 6 / 2,2	269	5	
		250	1	
LAM 14 / 5,1	LAM9 14 / 5,1	252	7	
		42	5	
		509	1	
		731	1	
T 14 / 5,1	T1 11 / 4,0	266	3	
		263	2	
		65	1	
		144	1	
		230	1	
		253	1	
		264	1	
		500	1	
	T1_RUS2 1 / 0,4	T5_RUS1 2 / 0,7	1173	1
			254	2
Ural 12 / 4,4	Ural1 12 / 4,4	262	9	
		35	1	
		762	1	
		1134	1	
Manu 3 / 1,1	Manu2 3 / 1,1	1247	2	
		54	1	
X 3 / 1,1	X1 3 / 1,1	708	1	
		1564	2	
Haarlem 1 / 0,4	H1 1 / 0,4	47	1	
S 1 / 0,4	S1 1 / 0,4	1253	1	
Неклассифицируемые (Unknown) 4 / 1,5	Unknown 4 / 1,5	237	1	
		560	1	
		1050	1	
		1115	1	

(4,5%, 95%ДИ 2,2–8,1%) были выявлены мутации с одиночными заменами в 526-м кодоне (His526Tyr, His526Arg, His526Leu, His526Pro, и His526Asp), у четырех – в 516-м кодоне (1,8%, 95%ДИ 0,5–4,5%), а также штаммы с двойными мутациями – в восьми случаях. Остальные генетические замены обнаружены в единичных случаях (табл. 4).

Все штаммы МБТ с МЛУ семейства *Beijing* были проанализированы на наличие мутаций, которые обуславливают ЛУ МБТ

к ПТП резервного ряда (фторхинолонам, аминогликозидам и полипептиду) (табл. 5).

Анализ мутаций в гене *gurA*, ответственных за фенотипическую устойчивость к фторхинолонам, который проводили с помощью тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2», показал, что из 222 штаммов МБТ у 123 (55,4%, 95%ДИ 48,6–62,1%) выявлена полиморфная замена, которая не приводит к ЛУ. Среди 99 штаммов, имеющих фенотипическую устойчивость к фторхинолонам,

Таблица 3. Спектр мутаций в генах *katG*, *ihnA* штаммов *M. tuberculosis* семейства *Beijing*, ответственных за лекарственную устойчивость к изониазиду

Количество штаммов	Мутации в генах						Всего
	<i>katG</i>			<i>katG/ihnA</i>		<i>ihnA</i>	
	Ser315Thr1	Ser315Thr Ile335Val	Ser315Arg	Ser315Thr/T15	Ser315Thr/A8	T15	
абс.	171	11	1	31	2	6	222
%	77,0	5,0	0,5	14,0	0,9	2,7	100,0

преобладали мутации в 94-м кодоне, выявленные в 73 (32,9%, 95%ДИ 26,7–39,5%) культурах. По частоте встречаемости замены распределились в следующей последовательности – Asp94Gly (45,4%), Asp94Ala и Ala90Val (по 16,2%), Ser91Pro (9,1%), Asp94Asn (6,1%), Asp94Tyr (5,0%) и Asp94His (1,0%). В одном случае была выявлена двойная мутация Ala90Val/Asp94Ala (1,0%).

Анализ мутаций в гене *rrs*, ответственных за фенотипическую устойчивость к **аминогликозидам** и **полипептиду**, который проводили с помощью GenoType® MTBDRsl, показал, что у 168 (75,7%, 95%ДИ 69,5–81,2%) штаммов в указанном гене мутации отсутствовали, то есть преобладали чувствительные штаммы дикого типа. Среди 54 культур (24,3% от всех штаммов семейства *Beijing*, 95%ДИ 18,8–30,5%), фенотипически устойчивых к указанным ПТП, практически во всех случаях определена замена a1401g, выявленная у 98,1% (95% ДИ 90,1–99,96%) штаммов, остальные мутации обнаружены в единичных случаях.

3.2. Штаммы группы non-Beijing

В 52 культурах МБТ группы *non-Beijing* из мутаций, ответственных за фенотипическую устойчивость к **изониазиду**, наиболее часто определяли одиночную замену Ser315Thr в гене *katG* и Ser315Thr в сочетании с T15 в *ihnA*, которые были выявлены у одинакового числа штаммов – по 23 (44,2%, 95%ДИ 30,5–58,7%) (табл. 6). В целом замена Ser315Thr наблюдалась в 92,3% (95%ДИ 81,4–97,9%) штаммов. Отметим, что замена T15 в гене *ihnA* в генотипах группы *non-Beijing* встречалась досто-

Таблица 4. Спектр мутаций в гене *rpoB* штаммов *M. tuberculosis* семейства *Beijing*, ответственных за лекарственную устойчивость к рифампицину (n = 222)

Мутации в гене <i>rpoB</i>	Количество штаммов	
	абс.	%
Ser531Leu	194	87,4
His526Tyr	5	2,3
His526Arg	2	1,0
His526Leu	1	0,5
His526Pro	1	0,5
His526Asp	1	0,5
Asp516Tyr	2	1,0
Asp516Gly	1	0,5
Asp516Val	1	0,5
Leu511Pro	3	1,4
Leu533Pro	2	1,0
Met515Ile	1	0,5
Leu511Pro Asp516Gly	3	1,4
Leu511Pro His526Asn	2	1,0
Leu511Arg Asp516Val	2	1,0
Ser531Trp Asp516Gly	1	0,5

верно чаще, чем в группе *Beijing*: 48,1% (95%ДИ 34,0–62,4%) и 16,7% (95%ДИ 12,0–22,2%) соответственно, $p < 0,01$. Также в данной группе не были обнаружены мутации Ile335Val в гене *katG*,

Таблица 5. Спектр мутаций в генах *gyrA* и *rrs* среди 222 штаммов *M. tuberculosis* семейства *Beijing*, ответственных за лекарственную устойчивость к фторхинолонам (а), аминогликозидам и полипептиду (б)

Количество штаммов	а) Мутации в гене <i>gyrA</i>									Всего
	Ser-95Thr*	Asp94Gly	Asp94Ala	Ala90Val	Ser91Pro	Asp94Asn	Asp94Tyr	Asp94His	Ala90Val/Asp94Ala	
абс.	123	45	16	16	9	6	5	1	1	222
%	55,4	20,3	7,2	7,2	4,1	2,7	2,3	0,5	0,5	100,0
Количество штаммов	б) Мутации в гене <i>rrs</i>					Всего				
	wt**	A1401G	G1484T	a1401g g1484t						
абс.	168	52	1	1		222				
%	75,7	23,4	0,5	0,5		100,0				

Примечание: *Ser95Thr – естественный полиморфизм, не приводящий к лекарственной устойчивости к фторхинолонам, **wt (wild type) – дикий тип (чувствительный к ПТП).

Таблица 6. Спектр мутаций в генах *katG*, *ihnA*, *ahpC* штаммов *M. tuberculosis* группы *non-Beijing*, ответственных за лекарственную устойчивость к изониазиду

Мутации в генах		Генетическое семейство										Всего штаммов	
		LAM9	Ural	T1	X1	Manu2	T5_RUS1	T1_RUS2	H1	S1	Unknown	абс.	%
<i>katG</i>	Ser315Thr1	2	5	6	1	3	1	1	–	1	3	23	44,2
	Ser315Thr2	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	1	1,9
<i>katG/ihnA</i>	Ser315Thr/T15	12	5	4	1	–	1	–	–	–	–	23	44,2
<i>ihnA</i>	T15	–	1	–	1	–	–	–	–	–	–	2	3,8
<i>ahpC</i>	A9	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	1	1,9
	T10	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1,9
<i>katG/ahpC</i>	Ser315Thr/A9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1	1,9
Всего		14	12	11	3	3	2	1	1	1	4	52	100,0

Таблица 7. Спектр мутаций в гене *groV* штаммов *M. tuberculosis* группы *non-Beijing*, ответственных за лекарственную устойчивость к рифампицину

Мутации в гене <i>groV</i>	Генетическое семейство										Всего штаммов (n = 52)	
	LAM9	Ural*	T1	X1	Manu2	T5_RUS1	T1_RUS2	H1	S1	Unknown	абс.	%
Ser531Leu											29	55,8
Asp516Val	4	–	–	1	–	–	–	–	–	1	6	11,5
His526Leu	–	1	1	–	–	–	–	–	1	–	3	5,8
His526Asn	–	–	1	–	–	1	1	–	–	–	3	5,8
Asp516Tyr	–	2	1	–	–	–	–	–	–	–	3	5,8
His526Arg)	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	3,8
His526Asp	–	–	2	–	–	–	–	–	–	–	2	3,8
His526Tyr	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1,9
Ser531Trp	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	1	1,9
Leu511Arg / Asp516Val	1	–	–	1	–	–	–	–	–	–	2	3,8
Всего	14	12	11	3	3	2	1	1	1	4	52	100,0

Примечание: *Согласно И.В. Мокроусову (2012) [24].

Таблица 8. Спектр мутаций в гене *gyrA* штаммов *M. tuberculosis* группы *non-Beijing*, ответственных за лекарственную устойчивость к фторхинолонам

Мутации в гене <i>gyrA</i>	Генетическое семейство										Всего штаммов	
	LAM9	Ural	T1	X1	Manu2	T5_RUS1	T1_RUS2	H1	S1	Unknown	абс.	%
Ser95Thr	6	6	10	2	–	1	1	–	–	3	29	55,8
Ala90Val	4	2	–	–	–	–	–	–	–	–	6	11,5
Asp94Gly	–	1	–	–	1	1	–	–	1	–	4	7,7
Asp94Tyr	1	2	–	1	–	–	–	–	–	–	4	7,7
Asp94Asn	1	–	–	–	–	–	–	1	–	1	3	5,8
Asp94Ala	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	1	1,9
Asp94His	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1,9
Gly88Cys	–	1	1	–	–	–	–	–	–	–	2	3,8
Ser91Pro	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1,9
Ser91Pro Asp94Ala	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	1	1,9
Всего	14	12	11	3	3	2	1	1	1	4	52	100,0

Таблица 9. Спектр мутаций в гене *rrs* штаммов *M. tuberculosis* группы *non-Beijing*, ответственных за лекарственную устойчивость к аминогликозидам и полипептиду

Мутации в гене <i>rrs</i>	Генетическое семейство										Всего штаммов (n = 52)	
	LAM9	Ural	T1	X1	Manu2	T5_RUS1	T1_RUS2	H1	S1	Unknown	абс.	%
Wt*	5	12	10	–	2	1	1	1	1	3	36	69,3
a1401g	9	–	1	3	1	1	–	–	–	1	16	30,7
Всего	14	12	11	3	3	2	1	1	1	4	52	100,0

Примечание: *wt (wild type) – дикий тип (чувствительный к ПТП)

которые были выявлены у 11 штаммов группы *Beijing* (5,0%, табл. 3).

Заметим, что в культурах подсемейства LAM9 самой распространенной была двойная замена в двух генах Ser315Thr и T15 – у 12 из 14 штаммов МБТ (85,7%, 95%ДИ 57,2–98,2%) и у всех 14 штаммов наблюдали замену Ser315Thr. Из 12 штаммов МБТ, принадлежащих семейству Ural, 10 имели замену Ser315Thr (83,3%, 95%ДИ 51,6–97,9%), причем в половине из них она шла в сочетании с T15. Мутация Ser315Thr в *katG* также преобладала среди сполигосемейств T1, выявленная у 10 из 11 штаммов МБТ (90,9%, 95%ДИ 58,7–99,8%), причем у четырех из них – в сочетании с T15, и во всех трех культурах Manu2.

Среди мутаций, ответственных за фенотипическую устойчивость к рифампицину, преобладала мутация Ser531Leu в гене *groV* (55,8%, 95%ДИ 41,3–69,5%), причем наибольшее количество мутантных штаммов было выявлено в сполигосемействах Ural (восемь из 12 штаммов, 66,7%), LAM9 (семь из 14, 50,0%), T1 (пять из 11, 45,5%) и Manu2 (все три штамма) (табл. 7).

Среди 52 штаммов МБТ с МЛУ группы *non-Beijing* генетические детерминанты, связанные с ЛУ к фторхинолонам, не были обнаружены у 29 (55,8%, 95%ДИ 41,3–69,5%) (штаммы имели полиморфную замену Ser95Thr в гене *gyrA*), а связанные с устойчивостью к аминогликозидам и полипептиду отсутствовали у 36 (69,2%) (в культурах не выявлены мутации в гене *rrs*) (табл. 8 и 9).

Из 14 штаммов подсемейства *LAM9*, шесть (42,9%, 95%ДИ 17,7–71,1%) были чувствительными к фторхинолонам (не имели мутаций, ассоциированных с устойчивостью к этим препаратам), а восемь (57,1%, 95%ДИ 28,8–85,5%) были устойчивыми. Среди последних – у четырех была выявлена мутация Ala90Val, а у трех – замены в 94-м кодоне (Asp94Asn, Asp94Tyr, Asp94His).

Среди штаммов семейства *Ural* шесть (50,0%, 95%ДИ 21,1–78,9%) были чувствительными, а другие шесть – устойчивыми: были выявлены мутации в 90-м и 94-м кодонах и в одной культуре – редко определяемая мутация Gly88Cys. Из 11 штаммов семейства *T1* – 10 (90,9%, 95%ДИ 58,7–99,8%) были чувствительными к фторхинолонам, только в одном случае была выявлена замена в 88-м кодоне (Gly88Cys).

Среди мутаций в гене *rrs*, ответственных за фенотипическую устойчивость к аминогликозидам и полипептиду, для 52 штаммов группы *non-Beijing* был определен только один тип мутации a1401g, выделенный у 16 больных туберкулезом с МЛУ МБТ (30,8%, 95%ДИ 18,7–45,1%) (табл. 9). При этом наибольшее количество штаммов относились к сполигосемействам *LAM9* (девять штаммов) и *X1* (три штамма).

Штаммы МБТ с ШЛУ групп *Beijing* и *non-Beijing*

Известно, что штаммы МБТ с МЛУ являются предшественниками штаммов с ШЛУ. У таких МБТ, помимо имеющейся ЛУ к рифампицину и изониазиду, присоединяется устойчивость к фторхинолонам, инъекционным аминогликозидам и/или полипептиду. В последние годы наблюдается тенденция увеличения доли штаммов МБТ с ШЛУ среди штаммов МБТ с МЛУ [5, 6].

По результатам фенотипического метода определения ЛЧ 274 штаммов МБТ с МЛУ, к МБТ с ШЛУ было отнесено 103 (37,6%) культуры. При определении ШЛУ молекулярно-генетическими методами этот показатель был в 2,3 раза меньше (16,1%, или 44 штамма), что связано с малым охватом генетических мише-

ней ЛУ в использованных тест-системах. При распределении штаммов в зависимости от генотипа к группе *Beijing* отнесено 79 из них (76,7%, 95%ДИ 67,3–84,5%), а остальные, почти четверть штаммов МБТ с ШЛУ – к *non-Beijing* (24 штамма), которые, по данным литературы, не ассоциируются с ЛУ [26, 23]. Более того, ШЛУ МБТ в группе *non-Beijing* встречалась даже чаще, чем в группе *Beijing*, – 46,2% против 35,6% штаммов, хотя различия и не были статистически достоверными.

Исходя из вышеизложенного, представляло интерес оценить количество штаммов МБТ с ШЛУ среди различных генотипических семейств, вошедших в группы *Beijing* и *non-Beijing* (табл. 10). Практически половина исследованных *non-Beijing* штаммов МБТ с МЛУ (46,2%) имела ШЛУ, при этом доля МБТ с ШЛУ в этой группе выше ($p = 0,16$), по сравнению со штаммами *Beijing*, по данным литературы – 35,6% [26, 30, 35]. Треть МБТ с ШЛУ была представлена генотипами *LAM9* (26,9% от всех) и еще треть – генотипами *Ural* и *T1*. При этом мутации в гене *rrs*, приводящие к ЛУ к аминогликозидам и полипептидам, были выявлены у всех МБТ с ШЛУ генотипа *LAM9*, в одном случае – у *T1* и не выявлены ни разу у штаммов *Ural*. Как говорилось ранее, охват мутаций, определяемых МГМ-тестами, в нашем исследовании недостаточен. Видимо, в случае штаммов *T1* и *Ural* устойчивость к аминогликозидам была обусловлена другими мутациями или механизмами.

Обсуждение

Результаты, полученные в исследовании, позволили провести анализ ЛУ и сравнить генотипическую структуру штаммов МБТ с МЛУ для семейств *Beijing* и *non-Beijing*.

Среди исследуемых штаммов МБТ с МЛУ семейства *Beijing* преобладало сочетание мутаций Ser315Thr в гене *katG* и Ser531Leu в гене *rpoB* – 96,8% и 87,3% соответственно. Среди

Таблица 10. Доля МБТ с ШЛУ от штаммов МБТ с МЛУ различных генотипов

Генетическое семейство/подсемейство	Количество МБТ с МЛУ (%)		Из них МБТ с ШЛУ	
	абс.	%	абс.	% (от числа штаммов семейства/подсемейства)
Штаммы <i>Beijing</i>, всего	222	100,0	79	35,6
из них:				
<i>Beijing</i>	216	97,3	76	35,2
<i>Beijing-like</i>	6	2,7	3	50,0
Штаммы <i>non-Beijing</i>, всего	52	100,0	24	46,2
из них:				
<i>LAM9</i>	14	26,9	8	57,1
<i>Ural</i>	12	23,0	4	33,3
<i>T1</i>	11	21,2	4	36,4
<i>X1</i>	3	5,8	2	66,6
<i>Manu2</i>	3	5,8	2	66,6
<i>T5_RUS1</i>	2	3,8	1	50,0
<i>T1_RUS2</i>	1	1,9	–	50,0
<i>H1</i>	1	1,9	1	50,0
<i>S1</i>	1	1,9	1	50,0
Неклассифицируемые (<i>Unknown</i>)	4	7,7	1	25,0

Таблица 11. Обобщенные результаты исследования лекарственной чувствительности штаммов МБТ Beijing и non-Beijing

Штаммы МБТ с МЛУ (n = 274)	
Группа Beijing (n = 222)	Группа non-Beijing (n = 52)
Изониазид	
Шесть типов мутаций (три двойные)	Семь типов мутаций (две двойные)
Мутации в 315-м кодоне <i>katG</i> – 97,3%	Мутации в 315-м кодоне <i>katG</i> – 92,3%
Преобладающая мутация Ser315Thr (<i>katG</i>) – 96,8%	Преобладающая мутация Ser315Thr (<i>katG</i>) – 92,3%
Рифампицин	
16 типов мутаций (четыре двойные)	10 типов мутаций (одна двойная)
Мутации в 531-м кодоне <i>rpoB</i> – 87,8%	Мутации в 531-м кодоне <i>rpoB</i> – 57,7%
Преобладающая мутация Ser531Leu (<i>rpoB</i>) – 87,4%	Преобладающая мутация Ser531Leu (<i>rpoB</i>) – 55,8%
Двойные мутации в сочетании с 511-м кодоном <i>rpoB</i>	Двойная мутация в сочетании с 511-м кодоном <i>rpoB</i>
Фторхинолоны	
Мутации в <i>gyrA</i> выявлены у 44,6% штаммов	Мутации в <i>gyrA</i> выявлены у 44,2% штаммов
Семь типов мутаций (одна двойная)	Два типа мутаций (одна двойная)
Мутации в 94-м кодоне <i>gyrA</i> – 85%	Мутации в 94-м кодоне <i>gyrA</i> – 61,0%
Преобладающая мутация Asp94Gly (<i>gyrA</i>) 52%	Преобладающая мутация Ala90Val (<i>gyrA</i>) – 26,0%
Расхождение результатов ЛУ для одного штамма (другие мутации или механизмы ЛУ)	Расхождение результатов ЛУ для четырех штаммов (другие мутации или механизмы ЛУ)
Аминогликозиды и полипептиды	
Мутации в <i>rrs</i> выявлены 24,3% штаммов	Мутации в <i>rrs</i> выявлены у 30,8% штаммов
Два типа мутаций (одна двойная)	Один тип мутаций
Преобладающая мутация a1401g (<i>rrs</i>) – 96,3%	Преобладающая мутация a1401g (<i>rrs</i>) – 100%
Расхождение результатов ЛУ для 90 штаммов (другие мутации или механизмы ЛУ)	Расхождение результатов ЛУ для 17 штаммов (другие мутации или механизмы ЛУ)

штаммов МБТ, имеющих фенотипическую устойчивость к фторхинолонам, наиболее часто встречалась замена в 94-м кодоне Asp94Gly (45,4%), а среди устойчивых к аминогликозидам – в кодоне a1401g (98,1%). Похожее распределение мутаций также встречалось в Уральском и других регионах России [10]. По данным литературы, указанные выше мутации связаны с высоким уровнем устойчивости МБТ к основным противотуберкулезным препаратам первого и резервного ряда. Более того, эти мутации не влияют на физиологические показатели МБТ, такие как жизнеспособность и вирулентность [13, 16, 28, 29]. Выявлено также, что замена T15 в гене *ihnA* в генотипах группы *non-Beijing* встречалась достоверно чаще, чем в группе *Beijing* (48,1% и 16,7% соответственно, $p < 0,01$). Также в семействе *non-Beijing* не были обнаружены мутации Ile335Val в гене *katG*, которые были выявлены у 11 штаммов группы *Beijing*.

В семействе *non-Beijing* мутацию Ser531Leu в *rpoB* чаще определяли у штаммов семейств *Ural*, *LAM9*, *T1* и *Manu2*, в свою очередь Ser315Thr в *katG* – среди *T1* и *Manu2*, а в сочетании с мутацией T15 (*ihnA*) – в штаммах подсемейств *LAM9* и *Ural*.

В гене *rrs* среди штаммов *non-Beijing* определен только один тип мутаций a1401g. Среди штаммов *Beijing* наблюдали также редкие случаи мутации g1484t (всего два).

Обобщенные результаты ЛЧ исследуемых штаммов, принадлежащих группам *Beijing* и *non-Beijing*, представлены в таблице 11.

Заключение

На основе эпидемиологически значимой выборки больных туберкулезом, состоявших на учете в г. Москве в 2014 г., с помощью сполиготипирования и молекулярно-генетических тест-систем были изучены штаммы МБТ с МЛУ, циркулирующие на территории Москвы. Исследование показало их неоднородность по DR-локусу хромосомы, что являлось индивидуальной характеристикой каждого штамма. Лекарственная устойчивость наиболее значимых «мегасемейств», таких как *Beijing*, была обусловлена мутациями, которые связаны с высоким уровнем устойчивости возбудителя к противотуберкулезным препаратам, формируя тем самым высоко трансмиссивные, эпидемиологически опасные и трудно поддающиеся химиотерапии штаммы МБТ. Однако отмечено смещение частоты распределения МБТ с ШЛУ (нарастание ЛУ) в сторону генотипов *non-Beijing*.

Литература

1. Балабанова Я.М., Николаевский В.В., Радди М. и др. Преобладание штаммов *Mycobacterium tuberculosis* семейства *Beijing* и факторы риска их трансмиссии в Самарской области // *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. – 2006. – № 2. – С. 31-37.
2. Василенко Н.В., Будрицкий А.М. Современные взгляды на генетические семейства *M. tuberculosis* // *Вестник ВГМУ*. – 2014. – Т. 13. – № 5. – С. 16-22.

3. Воронкова О.В., Уразова О.И., Хасанова Р.Р. и др. Генетическая характеристика *M. tuberculosis* – возбудителей остропрогрессирующего деструктивного туберкулеза легких // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 1. – С. 12-18.
4. Мокроусов И.В., Вязова А.А., Старкова Д.А. и др. Высокоразрешающее типирование штаммов геномина Beijing российской популяции *Mycobacterium tuberculosis* // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2012. – № 7. – С. 46-53.
5. Противотуберкулезная работа в городе Москве. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу за 2014 год / Под. ред. Е.М. Богородской и В.И. Литвинова. – М.: МНПЦБТ, 2015. – 168 с.
6. Противотуберкулезная работа в городе Москве. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу за 2017 год / Под. ред. Е.М. Богородской, В.И. Литвинова, Е.М. Белиловского. – М.: МНПЦБТ, 2018. – 188 с.
7. Сапожникова Н.В., Скворцова Л.А., Павлова М.В. и др. Туберкулез легких, вызванный *Mycobacterium tuberculosis* различных генотипов // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2003. – № 10. – С. 13-15.
8. Туберкулез в Российской Федерации, 2010 г. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации. – М., 2011. – 280 с.
9. Туберкулез в Российской Федерации, 2012/2013/2014 гг. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. – М., 2015. – 312 с.
10. Умпелева Т.В., Кравченко М.А., Еремеева Н.И. и др. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Уральского региона России // Инфекции и иммунитет. – 2013. – № 1 – С. 21-28.
11. Brossier F., Veziris N., Truffot-Pernot C. et al. Performance of the genotype MTBDR line probe assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of *Mycobacterium tuberculosis* with low – and high-level resistance // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44. – N. 10. – P. 3659-64.
12. Brudey K., Driscoll J., Rigouts L. et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology // *BMC Microbiol.* – 2006. – N. 6:23. DOI:10.1186/1471-2180-6-23.
13. Canadian multicentre laboratory study for standardized second-line antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – N. 10. – P. 1128-1150.
14. Crudu V., Merker M., Lange C. et al. Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2015. – Vol. 19. – P. 1520-1523.
15. Crudu V., Romanceno E., Noroc E. et al. Beijing and H4/Ural genotypes of *M. tuberculosis* are predominant among M&XDR patients in Moldova // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2014. – Vol. 18. – P. 157 p.
16. Du Q., Dai G., Long Q. et al. *Mycobacterium tuberculosis* rrs A1401G mutation correlates with high-level resistance to kanamycin, amikacin, and capreomycin in clinical isolates from mainland China // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 77. – P. 138-142.
17. Dubiley S., Ignatova A., Mukhina T. et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Tula area, Central Russia, before the introduction of the directly observed therapy strategy // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2010. – Vol. 16. – P. 1421-1426.
18. Global tuberculosis report 2013. – Geneva: WHO, 2013. [Электронный ресурс]. URL: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html. (Дата обращения 01.04.2019).
19. Gori A., Bandera A., Marchetti G. et al. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis* // *Emerg. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 11. – N. 8. – P. 1242-1248.
20. Huang W., Chi T., Wo M. et al. Performance assessment of the GenoType® MTBDRsl test and DNA sequencing for the detection of second-line and ethambutol drug resistance among patients with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2011. – Vol. 49. – P. 2502-2508.
21. Ignatova A., Dubiley S., Stepanshina V. et al. Predominance of multi-drug-resistant LAM and Beijing family strains among *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from prison inmates in Tula Region, Russia // *Journal of Medical Microbiology.* – 2006. – V.55. – P. 1413-1418.
22. Kovalev S.Y., Kataev E.Y., Kravchenko M.A. et al. Genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU-VNTR genotyping // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2005. – Vol. 9. – P. 746-752.
23. Mokrousov I. Molecular structure of *Mycobacterium tuberculosis* population in Russia and its interaction with neighboring countries // *Int. J. Mycobacteriol.* – 2015. – Vol. 4. – P. 56-57.
24. Mokrousov I. The quiet and controversial: Ural family of *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect. Genet. Evol.* – 2012. – Vol. 12. – P. 619-629.
25. Mokrousov I., Vyazovaya A., Narvskaya O. *Mycobacterium tuberculosis* Latin American-Mediterranean family and its sublineages in the light of robust evolutionary marker // *Journal of Bacteriology.* – 2014. – Vol. 196. – N. 10. – P. 1833-1841.
26. Mokrousov I., Vyazovaya A., Otten T. et al. *Mycobacterium tuberculosis* population in northwestern Russia: an update from Russian-EU/Latvian border region // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7: e41318.
27. Mokrousov I., Vyazovaya A., Solovieva N. et al. Trends in molecular epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Republic of Karelia, Russian Federation // *BMC Microbiol.* – 2015. – Vol. 279. – N. 15. – P. 1-10.
28. Nosova E., Bukatina A., Isaeva Y. et al. Analysis of mutation in the *gyrA* and *gyrB* genes and their association with the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to levofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin // *J. Med. Microbiol.* – 2013. – Vol. 62. – P. 108-113.
29. Pang Y., Lu J., Wang Y. et al. Study of the rifampin monoresistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57. – N. 2. – P. 893-900.
30. Ramazanzadeh R., Sayhemiri K. Prevalence of Beijing family in *Mycobacterium tuberculosis* in world population: Systematic review and meta-analysis // *Int. J. Mycobacteriol.* – 2014. – Vol. 3. – P. 41-45.

31. Reynaud Y., Millet J., Rastogi N. Genetic structuration, demography and evolutionary history of *Mycobacterium tuberculosis* LAM9 sublineage in the Americas as two distinct subpopulations revealed by bayesian analyses // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10. – P. 1-15.
32. Rusch-Gerdes S., Pfyffer G.E., Casal M. et al. 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. – N. 3. – P. 688-692.
33. Sola C., Filliol I., Gutierrez M. et al. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives // *Emerg. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 7. – N. 3. – P. 390-396.
34. Vasconcellos S., Acosta C., Gomes L. et al. Strain classification of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Brazil based on genotypes obtained by spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive unit typing and the presence of large sequence and single nucleotide polymorphism // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9: e107747.
35. Vyazovaya A, Mokrousov I, Solovieva N. et al. Tuberculous spondylitis in Russia and prominent role of multidrugresistant clone *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. – Vol. 59. – P. 2349-57.

Сведения об авторах

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

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. 8 (495) 603-30-33

e-mail: nastec@bk.ru

Краснова Мария Александровна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. 8 (495) 603-30-33

e-mail: dna77@mail.ru

Белиловский Евгений Михайлович – заведующий отделом эпидемиологического мониторинга туберкулеза ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Барболина, д. 3, корп. 3

Тел. +7 (915) 190-90-10

e-mail: belilo5@mail.ru

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

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. 8 (499) 268-70-33

e-mail: iraperetokina@yandex.ru

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

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. 8 (495) 603-30-33

e-mail: rna68@rambler.ru

Сафонова Светлана Григорьевна – заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. 8 (499) 268-08-76

e-mail: safonova.s.g@inbox.ru