

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. Перетокина<sup>1</sup>, Л.Ю. Крылова<sup>1</sup>, Г.Е. Фрейман<sup>1</sup>, Е.Н. Носова<sup>1</sup>, Д.В. Зименков<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> 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.Ю., 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/>

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

I.V. Peretokina<sup>1</sup>, L.Yu. Krylova<sup>1</sup>, G.E. Freiman<sup>1</sup>, E. Yu. Nosova<sup>1</sup>, D.V. Zimenkov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Scientific Institution «Central Scientific Research Institute of Tuberculosis», Moscow

<sup>2</sup> 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. – V. 12, № 1. – P. 4–8. (In Russ.)

<http://doi.org/>

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 [11].

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. 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 *MmpI5*, ответственного за эффлюкс препарата [3]. Известно, что мутации в гене *atpE* встречаются реже, чем в *mmpR*, однако их появление приводит к высокому уровню устойчивости микобактерий к бедаквилину [5].

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 (M7H11) и в жидкой среде Middlebrook 7H9 (M7H9), с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС 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» [10].

### 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*][*g175g*][*cg192c*] на агаровой среде M7H11 получено значение МИК бедаквилина 0,12 мкг/мл, в жидкой среде M7H9 с помощью ВАСТЕС 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 M7H11 установлено значение МИК, равное 0,12 мкг/мл, в среде M7H9 – 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 M7H11 установлено значение МИК, равное 0,25 мкг/мл, в системе ВАСТЕС 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 M7H11 составило 0,25 мкг/мл, на среде M7H9 – 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 M7H11 установлено значение МИК, равное 0,25 мкг/мл, на среде M7H9 с помощью ВАСТЕС 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> gс288g, <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 gс288g (*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 кодонами 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*.

### Заключение

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](http://disuria.ru/_id/11/1173_kr22A15A19MZ.pdf).
3. Andries K., Vilellas 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.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes / CLSI document M24-A2. Approved standard. – 2<sup>nd</sup> ed. - Wayne, PA, 2011. – 61 p.
5. 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.
6. Rodrigues C., Jani J., Shenai S., Thakkar P., Siddiqi S., Mehta A. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against second-lane drugs using the Bactec MGIT 960 system // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2008. – Vol. 12, № 12. – P. 1449-1455.
7. Rüscher-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.
8. 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](https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf).

9. 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.
10. 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.
11. 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. Стромынка, 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. Стромынка, 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. Стромынка, 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. Стромынка, 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