

О. А. Журило, А. І. Барбова, Л. Б. Скоклюк, О. В. Чернов
ГЕНОТИПІЧНА ТА ФЕНОТИПІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТІЙКОСТІ
ДО АНТИМІКОБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ 8 ШТАМІВ M. TUBERCULOSIS,
ВИДІЛЕНИХ ВІД ХВОРИХ З ВПЕРШЕ ДІАГНОСТОВАНИМ
ТУБЕРКУЛЬОЗОМ ЛЕГЕНЬ

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»
 Міжнародна організація PANTH в Україні

ГЕНОТИПІЧНА ТА ФЕНОТИПІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТІЙКОСТІ
ДО АНТИМІКОБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ 8 ШТАМІВ M.
TUBERCULOSIS, ВИДІЛЕНИХ ВІД ХВОРИХ З ВПЕРШЕ
ДІАГНОСТОВАНИМ ТУБЕРКУЛЬОЗОМ ЛЕГЕНЬ

О. А. Журило, А. І. Барбова, Л. Б. Скоклюк, О. В. Чернов

Резюме

У статті наведено досвід повногеномного секвенування штамів M. tuberculosis (МБТ).

Матеріали та методи. Проведено дослідження 8 ізолятів МБТ. Штами були отримані від хворих на ВДТБ. Критичні концентрації АМБП: H; R; E; Z; Lfx; Mfx; Am; Cm; Lzd; Bdq; Dlm та Cfz визначали за допомогою системи BACTEC MGIT. Секвенування штамів МБТ виконано на обладнанні Illumina MiSeq у лабораторії мікробіології та біохімії НІФП. Отримані повногеномні послідовності штамів МБТ були депоновані у fastq файли та проаналізовані за допомогою програми PhyResSE (<https://bioinf.fz-borstel.de/mchips/phyresse/>) з біоаналітичним пакетом рішення. Панель цього пакета включає генні мішені, задіяні у виникненні у МБТ ЛС до АМБП. Філонетична інформація та певний споліготип дозволяють отримати нейтральні поодинокі нуклеотидні поліморфізми. Генетичний профіль ЛС проводили за каталогом мутацій ВООЗ (<https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>).

Результати. Домінуючий в Україні генотип Beijing представлений 7 штамами. До групи non-beijing входив 1 штам: Ural. 7 штамів МБТ мали приналежність до сімейства Beijing, філогенетичної лінії Lineage 2 з однаковими індексами споліготипів. Аналіз мутацій згідно з «Каталогом мутацій комплексу M. tuberculosis та їх асоціація з резистентністю до лікарських препаратів», ВООЗ, 2021 р., дозволив усі виявлені мутації розподілити за категоріями — асоційовані з резистентністю, асоційовані з резистентністю — проміжні, не асоційовані з резистентністю, з невизначеною значущістю. Зіставлення профілю стійкості з відповідним генотипом показало, що ізоляти, що належать генотипу Beijing, зазвичай несли мутації МЛС/пре-ШЛС.

Зіставлення профілю стійкості з відповідним генотипом показало, що ізоляти, що належать генотипу Beijing, зазвичай несли мутації МЛС/пре-ШЛС.

У всіх штамів МБТ з резистентністю до R були мутації, які виявлені в rpoB гені. Канонічна амінокислотна заміна rpoB S450L, пов'язана з високим рівнем стійкості до R при несуттєвому зниженні життєздатності штамів, була ідентифікована у 6 ізолятах. Інша клінічно значуща мутація в rpoB (S435Y) виявлена у 2-х випадках і лише у представників сімейства Beijing. Мутації категорій: не асоційовані з резистентністю (rpoC (E1092D)) і з невизначеною значущістю: rpoC (I491V), rpoB (H674N), rpoB (V496A), були виявлені тільки в поєднанні зі «строго асоційованими» позиціями у фенотипно-резистентних ізолятах генотипу Beijing. Канонічна одиночна амінокислотна заміна katG S315T була виявлена у всіх відібраних для секвенування ізолятів. Усі 8 штамів стійких до H показали мутації у генах, пов'язаних з резистентністю до препарату. Мутації у ключових генах стійкості до Bdq — atrE та mmpR — не було виявлено в жодному геномі. У 1 штамі МБТ у гені rplC виявлено мутацію C154R асоційовану зі стійкістю до Lzd. Так само в 1 штамі МБТ виявлена мутація в ddn (D30S0) з поки що з невизначеною значущістю асоціювання зі стійкістю до Dlm.

Висновки. Дослідження дає інформацію про генетичну різноманітність сучасних ізолятів МБТ у хворих на ТБ. Превалювання генотипу Beijing свідчить про стабільну популяційну структуру збудника ТБ та

GENOTYPE AND PHENOTYPE CHARACTERISTICS OF RESISTANCE
TO ANTIMYCOBACTERIAL DRUGS OF 8 M. TUBERCULOSIS STRAINS,
ISOLATED FROM PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED PULMONARY
TUBERCULOSIS

O. A. Zhurilo, A. I. Barbova, L.B. Skokluk, O. V. Chernov

Abstract

The article presents the experience of whole-genome sequencing of M. tuberculosis (MBT) strains.

Materials and methods. 8 MBT isolates were tested. The strains were obtained from patients with newly detected pulmonary tuberculosis (NDPTB). Critical concentrations of anti-mycobacterial drugs (AMBD): H; R; E; Z; Lfx; Mfx; Am; cm; Lzd; Bdq; Dlm and Cfz were determined using the BACTEC MGIT system. Sequencing of MBT strains was performed on Illumina MiSeq equipment at the laboratory of microbiology and biochemistry of the National Institute of phthisiology and pulmonology (NIPP). The obtained whole-genome sequences of MBT strains were deposited in fastq files and analyzed using the PhyResSE program (<https://bioinf.fz-borstel.de/mchips/phyresse/>) with the bioanalytical solution package. The panel of this package includes gene targets involved in the development of MBT to AMBP. Phylogenetic information and a certain spoligotype make it possible to obtain neutral single nucleotide polymorphisms. The genetic profile of the drug was performed according to the WHO mutation catalog (<https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>).

The results. The dominant in Ukraine Beijing genotype was represented by 7 strains. The non-beijing group included 1 strain: Ural. 7 MBT strains belonged to the Beijing family, Lineage 2 phylogenetic line with the same spoligotype indices. The analysis of mutations according to the "Catalogue of mutations of the M. tuberculosis complex and their association with drug resistance", WHO, 2021, allowed all detected mutations to be divided into categories - associated with resistance, associated with resistance - intermediate, not associated with resistance, with uncertain significance. Comparison of the resistance profile with the corresponding genotype showed that isolates, belonging to the Beijing genotype, usually carried MDR/pre-XDR mutations.

Comparison of the resistance profile with the corresponding genotype showed that isolates belonging to the Beijing genotype usually carried MDR/pre-XDR mutations.

All MBT strains with resistance to R had mutations found in the rpoB gene. The canonical amino acid substitution of rpoB S450L, associated with a high level of resistance to R with a non-significant decrease in the viability of the strains, was identified in 6 isolates. Another clinically significant mutation in rpoB (S435Y) was found in 2 cases and only in representatives of the Beijing family. Mutations of the categories: not associated with resistance (rpoC (E1092D)) and of uncertain significance: rpoC (I491V), rpoB (H674N), rpoB (V496A), were detected only in combination with "strictly associated" positions in phenotypic-resistant isolates of the genotype Beijing. The canonical single amino acid substitution katG S315T was detected in all isolates selected for sequencing. All 8 strains resistant to H showed mutations in genes associated with resistance to the drug. Mutations in the key Bdq resistance genes - atrE and mmpR - were not detected in any genome. In 1 strain of MBT, a C154R mutation associated with Lzd resistance was detected in the rplC gene. Similarly, in 1 strain of MBT, a mutation in ddn (D30S0) was detected with an as yet undetermined significance of association with resistance to Dlm.

збереження тенденцій високих рівнів поширення ЛС форм інфекції на території країни.

Об'єднання фенотипних та молекулярно-генетичних даних дозволило дати більш повну оцінку ЛС ізолятам. Велика частка МЛС була обумовлена мутаціями, що не надають негативного впливу на життєздатність та трансмісивність збудника, що також свідчить про великий епідемічний резервуар штамів МБТ з МЛС/пре-ШЛС.

Високотрансмісивні штамів Beijing несуть найчастіше поодинокі некомбіновані мутації R та H, які пов'язані з високим рівнем резистентності.

Ключові слова: генетична діагностика, секвенування, туберкульоз легень.

Укр. пульмонол. журнал. 2023;31(4):22–30.

Журило Олександр Анатолійович
ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології
ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»
Завідувач лабораторії мікробіології і біохімії
Д. мед. наук, професор
10, вул. М. Амосова, Київ, 03038, Україна
Тел/факс: 38044 275-54-30, microbio@ifp.kiev.ua

Conclusions. The study provided information on the genetic diversity of modern MBT isolates in TB patients. The predominance of the Beijing genotype testified to the stable population structure of the TB pathogen and the preservation of trends of high levels of the spread of TB forms of infection on the territory of the country.

The combination of phenotype and molecular genetic data made it possible to give a more complete assessment of DR isolates. A large share of MDR was caused by mutations that did not have a negative effect on the viability and transmissibility of the pathogen, indicating a large epidemic reservoir of MBT strains with MDR/pre-XDR.

The highly transmissible strains of Beijing carried mostly single uncombined R and H mutations, which were associated with a high level of resistance.

Key words: genetic diagnostics, sequencing, pulmonary tuberculosis.

Ukr. Pulmonol. J. 2022;31(4):22–30.

Oleksandr A. Zhurilo
SO "National institute of phthisiology and pulmonology
named after F.G. Yanovsky NAMS of Ukraine"
Head of the Laboratory of Microbiology Biohimia
Doctor of medicine, professor
10, M. Amosova str., Kyiv, 03038, Ukraine
Тел/факс: 38044 275-54-30, microbio@ifp.kiev.ua

Однією з серйозних проблем світової охорони здоров'я є формування та глобальне поширення туберкульозної інфекції, стійкої до антимікобактеріальних препаратів (АМБП) I-го та II-го ряду, а саме розвиток множинної та широкої лікарської стійкості (МЛС та ШЛС). МЛС-ТБ — туберкульоз (ТБ) з множинною лікарською стійкістю (раніше використовувався термін МРТБ): стійкість, як мінімум до ізоніазиду (H) та рифампіцину (R). ШЛС-ТБ — ТБ з широкою лікарською стійкістю (раніше використовувався термін «туберкульоз з розширеною медикаментозною стійкістю» (PP-ТБ): стійкість до будь-якого фторхінолону та як мінімум до одного з додаткових препаратів групи А (бедаквілін та/або лінезолід) у доповнення до множинної лікарської стійкості або рифампіцин-резистентного ТБ.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), серед 10 млн осіб, хворих на ТБ, близько 500 тис. мають штамів *M. tuberculosis*, стійкі до R, з яких 78,0 % також стійкі до H, тобто є штамми з МЛС. У 2021 р. ВООЗ змінила визначення ШЛС ТБ, а також вперше дала визначення ТБ з пре-ШЛС, наголосивши на серйозності таких форм захворювання. Відповідно до останніх змін ТБ з пре-ШЛС описують як МЛС-ТБ з додатковою стійкістю до одного з фторхінолонів. Первинним механізмом придбання резистентності у *M. tuberculosis* є накопичення однонуклеотидних замін (single nucleotide polymorphism, SNP) у генах, що кодують білки, що є мішенями АМБП, або в ферментах, що утилізують ці антибіотики [1].

Однією з причин розвитку лікарської стійкості (ЛУ) є селективний відбір носіїв мутації при неадекватному лікуванні ТБ [2], а також передача штаму збудника ТБ, що мутував, від людини до людини [3]. Математична модель передачі збудника [3] свідчить про те, що передача ЛС штамів від хворих людей здоровим може відігравати ключову роль у процесі глобального виникнення стійких форм ТБ, оскільки такі випадки передачі трапляються в різних країнах, і їх частота коливається від 40,0 до 90,0 %. В Україні високий відсоток МЛС/ШЛС ТБ [4, 5]

вказує на важливу роль передачі МЛС/ШЛС штамів від хворих до здорових та насамперед від дорослих до дітей. За нашими даними, більшість ізолятів *M. tuberculosis*, асоційованих з МЛС/ШЛС, належить генотипам Beijing (50,2 %) та Євро-Американському сімейству (16,8 %) [4–6].

Молекулярна діагностика вважається найбільш перспективним шляхом до швидкого універсального тестування лікарської чутливості (ЛЧ) збудника ТБ. У 2021 р. під егідою ВООЗ було опубліковано найповніший каталог SNP [7], асоційованих із стійкістю до АМБП, на основі результатів фенотипового аналізу та повногеномного секвенування 41 137 ізолятів збудника *M. tuberculosis* з 45 країн, у тому числі 1550 штамів (3,8 %), зібраних лабораторією мікробіології та біохімії НІФП (м. Київ). Використання цього каталогу надає доступ до найбільш повної та стандартизованої генотипової характеристики ЛС, яка і була застосована у цьому дослідженні для унікальної колекції даних повногеномного секвенування штамів *M. tuberculosis* від хворих на ВДТБ.

Метою дослідження було провести порівняльний аналіз фенотипового та генотипового профілів лікарської стійкості штамів *M. tuberculosis*, отриманих від хворих із вперше діагностованим туберкульозом легень; визначити мутації, які можливо відповідають за фенотипову стійкість до нових АМБП 2-го ряду (бедаквілін, деламаїд, лінезолід та клофазимін).

Матеріали та методи

Проведено дослідження 8 клінічних ізолятів *M. tuberculosis* у лабораторії мікробіології та біохімії НІФП. Штами були отримані від хворих на ВДТБ. Критичні концентрації АМБП: H — 0,1 мкг/мл; R — 0,5 мкг/мл; етамбутол (E) — 5,0 мкг/мл; піразинамід (Z) — 100 мкг/мл; левофлоксацин (Lfx) — 1,0 мг/л; моксифлоксацин (Mfx) — 0,25 та 1,0 мкг/мл; амікацин (Am) — 1,0 мкг/мл; капреоміцин (Cm) — 2,5 мкг/мл; лінезолід (Lzd) — 1,0 мкг/мл, а також бедаквілін (Bdq) — 1,0 мкг/мл; деламаїд (Dlm) — 0,06

Типи мутацій, які визначені в дослідженні у штамів *M. tuberculosis* (№№ 90-2, 1, 102-1463) відповідно до «Каталогу мутацій комплексу *M. tuberculosis* та їх асоціація з резистентністю до лікарських препаратів», ВООЗ, 2021 р.

Препарати	Мутації <i>M. tuberculosis</i> № 90-2, які:			Мутації <i>M. tuberculosis</i> № 1, які:			Мутації <i>M. tuberculosis</i> № 102-1463, які:		
	асоційовані з резистентністю	не асоційовані з резистентністю	з невизначеною значущістю	асоційовані з резистентністю	не асоційовані з резистентністю	з невизначеною значущістю	асоційовані з резистентністю	не асоційовані з резистентністю	з невизначеною значущістю
H	katG (S315T)	mshA (A187V), Rv1258c (frameshift), katG (R463L)	-	katG (S315T)	mshA (A187V), Rv1258c (frameshift), katG (R463L)	-	inhA _{prom} (c-777)t, katG (S315T)	mshA (A187V), Rv1258c (frameshift), katG (R463L)	katG _{prom} (g(-507)c)
R	rpoB (S450L)	-	rpoB (V496A)	rpoB (S450L)	rpoC (E1092D)	-	rpoB (S435V)	rpoC (E1092D)	rpoB (H674N)
Lfx	-	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	-	-	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	-	gyrB (E501D)	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	-
Mfx	-	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	-	-	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	-	gyrB (E501D)	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	-
Am	-	ccsA (I245M), rrs _{prom} (c(-187)t), afbB(D397G), whiB6 (T51P), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)	-	-	ccsA (I245M), rrs _{prom} (c(-187)t), afbB(D397G), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)	-	rrs (a (1401)g)	ccsA (I245M), rrs _{prom} (c(-187)t), afbB(D397G), whiB6 (T51P), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)	-
Cm	-	ccsA (I245M), rrs _{prom} (c(-187)t), afbB(D397G), whiB6 (T51P), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)	-	-	ccsA (I245M), rrs _{prom} (c(-187)t), afbB(D397G), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)	-	rrs (a (1401)g)	ccsA (I245M), rrs _{prom} (c(-187)t), afbB(D397G), whiB6 (T51P), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)	-
Km	-	rrs _{prom} (c(-187)t)	-	-	rrs _{prom} (c(-187)t)	-	rrs (a (1401)g)	rrs _{prom} (c(-187)t)	-
S	rpsL (K43R)	rpsL _{prom} (t(-165)c), Rv1258c (frameshift), rrs _{prom} (c(-187)t), whiB6 _{prom} (gc(-74)g), gid(E92D)	whiB6 (T51P)	rpsL (K43R)	rpsL _{prom} (t(-165)c), Rv1258c (frameshift), rrs _{prom} (c(-187)t), whiB6 _{prom} (gc(-74)g), gid(E92D)	-	rpsL (K43R)	rpsL _{prom} (t(-165)c), Rv1258c (frameshift), rrs _{prom} (c(-187)t), whiB6 _{prom} (gc(-74)g), gid(E92D)	rrs (a(1401)g)
Eto	ethA (frameshift)	-	mshA (A187V)	-	-	mshA (A187V)	inhA _{prom} (c(-777)t)	-	mshA (A187V)
Z	-	Rv1258c (frameshift), PPE35 (L896S), Rv3236c (T102A)	-	prnA (Q141P)	Rv1258c (frameshift), PPE35 (L896S), Rv3236c (T102A)	-	-	Rv1258c (frameshift), PPE35 (L896S), Rv3236c (T102A)	-
Bdq	-	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5(D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	-	-	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5(D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	-	-	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5(D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	-
Dim	-	-	-	-	-	ddh (R30S)	-	-	-
E	embB(M306I)	-	-	embB(M306V)	-	embC _{prom} (c(-1188)t)	-	-	embC _{prom} (c(-1188)t), embB(L402V)
Cfz	-	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5(D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	-	-	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5(D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	-	-	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5(D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	-
Lzd	-	rrs _{prom} (c(-187)t)	-	-	rrs _{prom} (c(-187)t)	-	-	rrs _{prom} (c(-187)t)	-

Типи мутацій, які визначені в дослідженні у штамів *M. tuberculosis* (№№ 988, 1017, 1070), відповідно до «Каталогу мутацій комплексу *M. tuberculosis* та їх асоціація з резистентністю до лікарських препаратів», ВООЗ, 2021 р.

Препарати	Мутації <i>M. tuberculosis</i> № 988, які:			Мутації <i>M. tuberculosis</i> № 1017, які:			Мутації <i>M. tuberculosis</i> № 1070, які:		
	асоційовані з резистентністю	не асоційовані з резистентністю	з невизначеною значущістю	асоційовані з резистентністю	не асоційовані з резистентністю	з невизначеною значущістю	асоційовані з резистентністю	не асоційовані з резистентністю	з невизначеною значущістю
H	katG (S315T)	mshA (A187V), Rv1258c (frameshift), katG(R463L)	-	katG (S315T)	mshA (A187V), Rv1258c (frameshift), katG(R463L)	-	inhA _{prom} (c(-777)t), katG (S315T)	mshA (A187V), Rv1258c (frameshift), katG(R463L)	-
R	groB (S450L)	-	-	groB (S450L)	groC (E1092D)	-	groB (S435Y)	groC (E1092D)	groC (I491V)
Lfx	-	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	-	-	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	-	gyrA (D94G)	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	-
Mfx	-	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	-	-	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	-	gyrA (D94G)	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	-
Am	-	ccsA (I245M), rrs _{prom} (c(-187)t), aftB(D397G), whiB6(T51P), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)*	whiB6 _{prom} (ag(-73a)), whiB6 _{prom} (ct(-75)c)*	-	ccsA (I245M), rrs _{prom} (c(-187)t), aftB(D397G), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)*	eis _{prom} (c(-10)t)	rrs (a(1401)g)	ccsA (I245M), rrs _{prom} (c(-187)t), aftB(D397G), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)	whiB6 _{prom} (ag(-73a))
Cm	-	ccsA (I245M), rrs _{prom} (c(-187)t), aftB(D397G), whiB6 (T51P), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)*	whiB6 _{prom} (ag(-73a)), whiB6 _{prom} (ct(-75)c)*	-	ccsA (I245M), rrs _{prom} (c(-187)t), aftB(D397G), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)*	-	rrs (a(1401)g)	ccsA (I245M), rrs _{prom} (c(-187)t), aftB(D397G), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)	whiB6 _{prom} (ag(-73a))
Km	-	rrs _{prom} (c(-187)t)	-	eis _{prom} (c(-10)t)	rrs _{prom} (c(-187)t)	-	rrs (a(1401)g)	rrs _{prom} (c(-187)t)	-
S	rpsL (K43R)	rpsL _{prom} (t(-165)c), Rv1258c (frameshift), rrs _{prom} (c(-187)t), whiB6 _{prom} (gc(-74)g), gid(E92D)	whiB6 (T51P), whiB6 _{prom} (ag(-73)a), whiB6 _{prom} (ct(-75)c)*	rpsL (K43R)	Rv1258c(frameshift), rrs _{prom} (c(-187)t), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)*, gid (E92D)	-	rpsL (K43R)	rpsL _{prom} (t(-165)c), Rv1258c (frameshift), rrs _{prom} (c(-187)t), whiB6 _{prom} (gc(-74)g), gid(E92D)	rrs (a(1401)g), whiB6 _{prom} (ag(-73a))
Eto	ethA (P378L)	-	mshA (A187V)	ethA (R207G)	-	mshA (A187V)	inhA _{prom} (c(-777)t)	-	mshA (A187V)
Z	-	Rv1258c (frameshift), PPE35 (L896S), Rv3236c (T102A)	-	-	Rv1258c (frameshift), PPE35 (L896S), Rv3236c (T102A)	-	pncA (GAYSG101G)	Rv1258c (frameshift), PPE35 (L896S), Rv3236c (T102A)	-
Bdq	-	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5 (D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	-	-	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5 (D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	-	-	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5 (D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	-
Dim	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	embB (M306V)	-	embA _{prom} (c(-11)t)	embB (G406D)	-	embC (c(-1188)t)	-	-	embC _{prom} (c(-1188)t), embA _{prom} (c(-8)a)
Cfz	-	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5 (D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	-	-	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5 (D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	-	-	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5 (D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	-
Lzd	-	rrs _{prom} (c(-187)t)	-	-	rrs _{prom} (c(-187)t)	-	-	rrs _{prom} (c(-187)t)	-

Таблиця 4

Типи мутацій, які визначені в дослідженні у штамів *M. tuberculosis* (№№ 117-1039-2, 2213-3) відповідно до «Каталогу мутацій комплексу *M. tuberculosis* та їх асоціація з резистентністю до лікарських препаратів», ВООЗ, 2021 р.

Препарати	Мутації <i>M. tuberculosis</i> № 117-1039-2, які:			Мутації <i>M. tuberculosis</i> № , 2213-3 які:		
	асоційовані з резистентністю	не асоційовані з резистентністю	з невизначеною значущістю	асоційовані з резистентністю	не асоційовані з резистентністю	з невизначеною значущістю
H	katG (S315T)	–	–	inhA _{prom} (c(-777)t), katG (S315T)	mshA (A187V), Rv1258c (frameshift), katG(R463L)	katG _{prom} (g(-507)c)
R	rpoB (S450L)	–	–	rpoB (S450L)	rpoC (E1092D)	–
Lfx	–	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	–	gyrA (A90V)	gyrA (E21Q), gyrA (S95T) *, gyrA (G668D)	–
Mfx	–	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	–	gyrA (A90V)	gyrA (E21Q), gyrA (S95T) *, gyrA (G668D)	–
Am	–	ccsA (I27I), rrs _{prom} (c(-187)t), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)	–	rrs (a(1401)g)	ccsA (I245M), rrs _{prom} (c(-187)t), aftB(D397G), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)	whiB6 _{prom} (ag(-73)a)
Cm	–	ccsA (I27I), rrs _{prom} (c(-187)t), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)	–	rrs (a(1401)g)	ccsA (I245M), rrs _{prom} (c(-187)t), aftB(D397G), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)	whiB6 _{prom} (ag(-73)a)
Km	–	rrs _{prom} (c(-187)t)	–	rrs (a(1401)g)	rrs _{prom} (c(-187)t)	–
S	rpsL (K88M)	rpsL _{prom} (t(-165)c), rrs _{prom} (c(-187)t), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)	–	rpsL (K88R)	rpsL _{prom} (t(-165)c), Rv1258c (frameshift), rrs _{prom} (c(-187)t), whiB6 _{prom} (gc(-74)g), gid(E92D)	rrs (a(1401)g), whiB6 _{prom} (ag(-73)a)
Eto	–	–	ethA (D58G)	inhA _{prom} (c(-777)t)	–	mshA (A187V)
Z	–	–	–	pncA (V128G)	Rv1258c (frameshift), PPE35 (L896S), Rv3236c (T102A)	–
Bdq	–	mmpL5 (I948V), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	–	–	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5(D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	Rv0678 (frameshift)
Dlm	–	–	–	–	–	–
E	embB (G406D)	–	–	embA _{prom} (c(-12)t)	–	embC _{prom} (c(-1188)t), embB(Y334H)
Cfz	–	mmpL5 (I948V), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	–	–	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5(D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	Rv0678 (frameshift)
Lzd	–	rrs _{prom} (c(-187)t)	–	rpIC (C154R)	rrs _{prom} (c(-187)t)	–

Зіставлення профілю стійкості (МЛС/пре-ШЛС) з відповідним генотипом було виявлено, що ізоляти, що належать генотипу Beijing, зазвичай несли мутації МЛС/пре-ШЛС.

Спектр основних мутацій, одержаних при повногеномному секвенуванні штамів *M. tuberculosis*, представлений у табл. 2–5.

У всіх штамів з резистентністю до R були мутації, виявлені в rpoB гені. Канонічна амінокислотна заміна rpoB S450L, пов'язана з високим рівнем стійкості до R при несуттєвому зниженні життєздатності штамів, була ідентифікована у 6 ізолятів. Інша клінічно значуща мутація в rpoB (S435Y) виявлена в 2-х випадках і тільки у представників сімейства Beijing (штам № 102-1463 та штам № 1070). Мутації категорій: не асоційовані з резистентністю (rpoC (E1092D)) та з невизначеною значущістю (rpoC (I491V), rpoB (H674N), rpoB (V496A)), тобто не мають високої клінічної значимості, були виявлені тільки в поєднанні з «строго асоційованими» («Association with resistance») позиціями у фенотипно-резистентних ізолятів генотипу Beijing.

Канонічна одиночна амінокислотна заміна katG S315T була виявлена у всіх відібраних для секвенування ізолятів. У 3-х штамів визначалася подвійна заміна (katG S315T + inhA c-777t), тобто практично у половини вивчених штамів. Комбінацію мутацій було

виявлено у штамів групи Beijing (№№ 102-1463, 1070, 2213-3). Усі 8 штамів стійких до H ізолятів показали мутації у генах, пов'язаних із резистентністю до цього препарату.

8 штамів мали фенотипічну стійкість до E. Заміни в кодні 306 гена embB виявлені у 5 штамів *M. tuberculosis*. Особливістю була наявність подвійних і потрійних мутантних генів, що несуть мутації embB і embA, і замінами embC (c-1188t), які окремо не мають клінічної значущості. Таке поєднання мутацій може деяким чином відображати зв'язки між фенотипічною стійкістю до E і генотипом.

Відповідно до каталогу мутацій, ми вивчили можливі варіанти нуклеотидних замін гена rpsA, асоційовані з ЛС. В одного зі штамів, з відомою фенотиповою стійкістю до Z, була мутація Q141P rpsA, у другого мутація GAYSG1016 rpsA, у третього мутація V1286 rpsA. В інших ізолятах виявлено широкий спектр мутацій у кожному окремому положенні гена rpsA (включаючи вищу промоторну область) і поодинокі випадки PPE 35 і Rv3236. Замін у генах, що рідко зустрічаються, пов'язаних зі стійкістю до Z (panD, clpC), виявлено не було.

Фенотипічну резистентність до фторхінолонів (Lfx, Mfx) мали 3 ізоляти (№№ 102-1463, 1070, 2213-3). У штамі № 102-1463 мутація, асоційована з резистентністю, мала місце в кодні gyrB (E501D), у штамі № 1070 мутація, асо-

Таблиця 5

Типи мутацій, які визначені в дослідженні у 8 штамів *M. tuberculosis* відповідно до «Каталогу мутацій комплексу *M. tuberculosis* та їх асоціація з резистентністю до лікарських препаратів», ВООЗ, 2021 р.

Препарати	Мутації			
	асоційовані з резистентністю	асоційовані з резистентністю — проміжні	не асоційовані з резистентністю	з невизначеною значущістю
I ряд				
H	inhA _{prom} (c(-777)t), katG (S315T)	–	mshA (A187V), Rv1258c (frameshift), katG(R463L)	katG _{prom} (g(-507)c)
R	rpoB (S450L), rpoB (S435Y)	–	rpoC (E1092D)	rpoC (I491V), rpoB (H674N), rpoB (V496A)
II ряд (група А)				
Lfx	gyrA (D94G), gyrA (A90V)	gyrB (E501D)	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	–
Mfx	gyrB (E501D), gyrA (D94G), gyrA (A90V)	–	gyrA (E21Q), gyrA (S95T), gyrA (G668D)	–
II ряд (група В)				
Am	rrs (a(1401)g)	–	ccsA (I245M), ccsA (I271), rrs _{prom} (c(-187)t), aftB(D397G), whiB6 _{prom} (gc(-74)g), whiB6 (T51P)	whiB6 _{prom} (ag(-73)a), whiB6 _{prom} (ct(-75)c), eis _{prom} (c(-10)t)
Cm	rrs (a(1401)g)	–	ccsA (I245M), ccsA (I271), rrs _{prom} (c(-187)t), aftB(D397G), whiB6 _{prom} (gc(-74)g)	whiB6 _{prom} (ag(-73)a), whiB6 _{prom} (ct(-75)c)
Km	rrs (a(1401)g), eis _{prom} (c(-10)t)	–	rrs _{prom} (c(-187)t)	–
S	rpsL (K43R), rpsL (K88M)	–	rpsL _{prom} (t(-165)c), Rv1258c (frameshift), rrs _{prom} (c(-187)t), whiB6 _{prom} (gc(-74)g), gid(E92D)	whiB6 (T51P), rrs (a(1401)g), whiB6 _{prom} (ag(-73)a), whiB6 _{prom} (ct(-75)c)
II ряд (група С)				
Eto	inhA _{prom} (c(-777)t), ethA (P378L), ethA (R207G)	ethA (frameshift)	–	mshA (A187V), ethA (D58G)
II ряд (група D)				
Z	pncA (Q141P), pncA (V128G)	pncA(GAYSG101G)	Rv1258c (frameshift), PPE35 (L896S), Rv3236c (T102A)	–
інші				
Bdq	–	–	mmpL5 (I948V), mmpL5 (T794I), mmpL5(D767N), Rv1979c _{prom} (t(-129)c)	Rv0678 (frameshift)
Dlm	–	–	–	ddn (R30S)
E	–	–	–	embC _{prom} (c(-1188)t), embB(L402V), embA _{prom} (c(-11)t), embA _{prom} (c(-8)a), embB(Y334H)
Cfm	embB(M306V), embB (G406D), embA _{prom} (c(-12)t)	–	–	–
Lzd	rplC (C154R)	–	rrs _{prom} (c(-187)t)	–

ційована з резистентністю, мала місце в 94-му кодоні gyrA (D94G), тоді як у штамі № 2213-3 в gyrA в кодонах E21Q, S95T, G668D. Сстійкі ізоляти мали мутації або в гені gyrB, або в гені gyrA.

Мутацій у ключових генах стійкості до Bdq — atpE та mmpR — не було виявлено у жодному геномі.

У штамі № 2213-3 у гені rplC виявлено мутацію C154R асоційовану зі стійкістю до Lzd. У штамі № 1 виявлено мутацію в ddn (D3050) з поки з невизначеною значущістю, що закономірно при вкрай низькій ймовірності застосування цих антибіотиків для лікування в цих випадках. Інші заміни, описані для цих препаратів, виявлені у поодиноких штаммах (табл. 2–5).

До Eto виявлено мутації ЛС у 8 штамів, відповідність до результатів тесту лікарської чутливості була повною. Це зрозуміло наявністю часткової перехресної стійкості з H через мутації гена inhA, які впливають на активність редуктази InhA та її зв'язувальні властивості з токсичними адуктами. Більшість виявлених мутантних генів мали зміни в локусі ethA, що характеризуються втратою рамки зчитування та наявністю нонсенсу мутацій.

Сстійкість до S у будь-якій комбінації мали всі ізоляти, відповідно несли фенотипічну стійкість. При цьому найчастішими мутаціями були rpsL K43R та rpsL K88M.

Резистентні до аміноглікозидів та Cm ізоляти переважно мали заміни у rrs a(1401)g. Серед стійких до трьох цих ПТП характерною була лише одинична мутація в rrs a1401g. Така мутація в рибосомальному гені призводить до перехресної стійкості до всіх трьох вищезгаданих препаратів. Строго асоційована мутація eis g-10a була виявлена в штамі зі стійкістю тільки до Km. Це також узгоджується з даними, що мутації в промоторі гена eis, що підсилюють його транскрипцію, призводять до низькорівневої монорезистентності до Km. Мутації в області whiB7, які виявляються при стійкості до ін'єкційних ПТП, у цьому аналізі не виявлено.

Висновки

1. Дослідження дає інформацію про генотипічну різноманітність сучасних клінічних ізолятів *M. tuberculosis* у хворих на ТБ. Превалювання генотипу Beijing свідчить про стабільну популяційну структуру збудника ТБ та збереження тенденцій високих рівнів поширення ЛС форм інфекції на території країни.

2. Об'єднання фенотипних та молекулярно-генетичних даних дозволило дати більш повну оцінку ЛС ізолятам. Більша частка МЛС була обумовлена мутаціями, які не надають негативного впливу на життєздатність і трансмісивність збудника (rpoB_S450L + katG_S315T), що

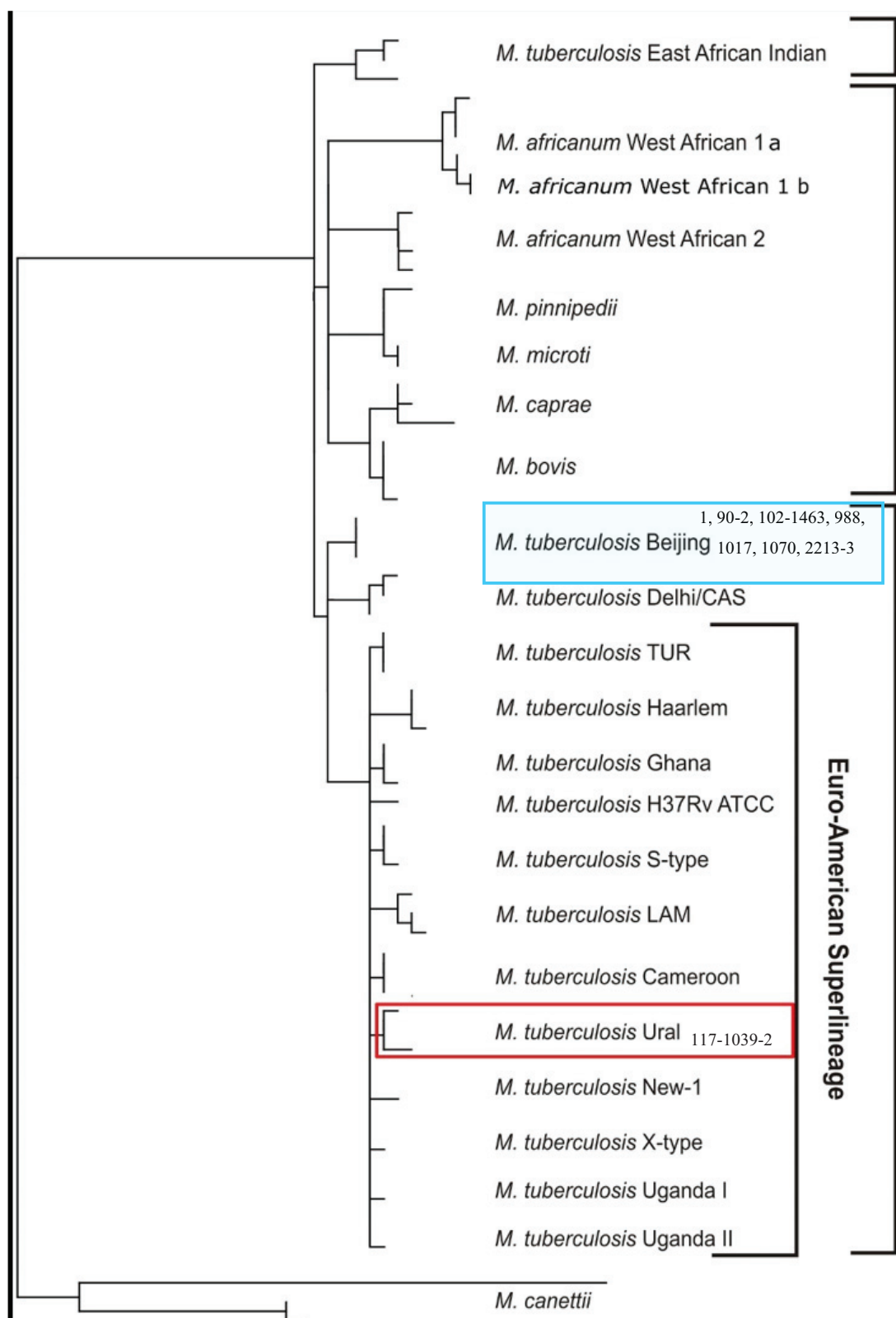


Рис. 1. Філогенетичне дерево 8 геномів штамів *M. tuberculosis* виділених від хворих на туберкульоз.

також свідчить про великий епідемічний резервуар штамів *M. tuberculosis* з МЛС/пре-ШЛС, які здатні активно передаватися в популяції.

3. Високотрансмісивні штами Beijing несуть найчастіше поодинокі некомбіновані мутації R і H, пов'язані з високим рівнем резистентності. Накопичення відомих

компенсаторних мутацій у МЛС штамів, передбачуваних за таких високих рівнів МЛС-ТБ в Україні, не мали широкого прояву. Це може свідчити про глибоко зашедші еволюційні процеси, викликані неадекватною хіміотерапією, які, ймовірно, сформували невідомі компенсаторні механізми в популяції штамів збудника ТБ.

ЛІТЕРАТУРА

1. WHO. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis. Geneva: WHO. 2020. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338776>
2. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: Update 2015. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2015;19(11):1276–1289. DOI: 10.5588/ijtld.15.0389.
3. Kendall EA, Fofana MO, Dowdy DW. Burden of transmitted multidrug resistance in epidemics of tuberculosis: A transmission modelling analysis. *Lancet Respir. Med.* 2015;3(12):963–972. DOI: 10.1016/S2213-2600(15)00458-0.
4. Фещенко ЮІ, Журило ОА, Барбова АІ. Визначення профілю резистентності до протитуберкульозних препаратів в штаммах *M. tuberculosis*, виділених в межах проекту щодо розповсюдження хіміорезистентних мікобактерій туберкульозу в Україні. *Укр. пульмонол. журн.* 2019;(1):33–40.
5. Freschi L, et al. Population structure, biogeography and transmissibility of Mycobacterium tuberculosis. *Nature Communications.* 2021. URL: <https://doi.org/10.1101/2020.09.29.293274>
6. Battaglia S, et al. Characterization of genomic variants associated with resistance to bedaquiline and delamanid in naive Mycobacterium tuberculosis clinical strains. *J. of Clin. Microbiol.* 2020;58(11):e01304-20. URL: <https://doi.org/10.1128/JCM.01304-20>
7. WHO. Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance: supplementary document. Geneva: WHO. 2021. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/341906>

REFERENCES

1. WHO. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis. Geneva: WHO. 2020. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338776>
2. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: Update 2015. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2015;19(11):1276–1289. DOI: 10.5588/ijtld.15.0389.
3. Kendall EA, Fofana MO, Dowdy DW. Burden of transmitted multidrug resistance in epidemics of tuberculosis: A transmission modelling analysis. *Lancet Respir. Med.* 2015;3(12):963–972. DOI: 10.1016/S2213-2600(15)00458-0.
4. Feshchenko YI, Zhurilo OA, Barbova AI. Vyznachennya profilyu rezystentnosti do protytuberculoznykh preparativ v shtammach *M. tuberculosis*, vydilyenykh v mezhakh proektu shchodo rospovsudzhennya chimiorezistentnykh micobacteriy tuberculozu v Ukraini (Determination of the profile of resistance to antituberculosis drugs in *M. tuberculosis* strains isolated within the project on the spread of chemoresistant tuberculosis mycobacteria in Ukraine). *Ukr. Pulmonol. Zhurn.* 2019;(1):33–40.
5. Freschi L, et al. Population structure, biogeography and transmissibility of Mycobacterium tuberculosis. *Nature Communications.* 2021. URL: <https://doi.org/10.1101/2020.09.29.293274>
6. Battaglia S, et al. Characterization of genomic variants associated with resistance to bedaquiline and delamanid in naive Mycobacterium tuberculosis clinical strains. *J. of Clin. Microbiol.* 2020;58(11):e01304-20. URL: <https://doi.org/10.1128/JCM.01304-20>
7. WHO. Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance: supplementary document. Geneva: WHO. 2021. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/341906>