

## ШТАММЫ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* С МУТАЦИЯМИ В *gyrA* РАЗЛИЧАЮТСЯ ПО УРОВНЮ КОНКУРЕНТНОГО ФИТНЕСА

С. Н. Андреевская<sup>1</sup>✉, Т. Г. Смирнова<sup>1</sup>, Л. Н. Черноусова<sup>1</sup>, Е. Е. Ларионова<sup>1</sup>, Э. В. Севастьянова<sup>1</sup>, В. В. Устинова<sup>1</sup>, Е. А. Киселева<sup>1</sup>, А. Эргешов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова, Москва, Россия

В процессе формирования устойчивости *M. tuberculosis* к фторхинолонам в организме хозяина могут одновременно сосуществовать пулы *M. tuberculosis*, чувствительные к препаратам этой группы, и пулы *M. tuberculosis* с различными детерминантами устойчивости. Целью исследования было изучить особенности роста *in vitro* штаммов *M. tuberculosis*, отличающихся генетическими детерминантами устойчивости к фторхинолонам, в условиях конкуренции за питательные вещества. Исследование проведено на пяти клинических штаммах *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью, различающихся структурой *gyrA*. Штаммы культивировали попарно и индивидуально в оптимальных условиях (среда Middlebrook 7H9) и в условиях мультистресса (50% среда Middlebrook 7H9, 2 мМ KNO<sub>3</sub>, 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Время эксперимента составило 21 сутки. Число клеток каждого из совместно культивируемых штаммов оценивали по калибровочным кривым зависимости порогового цикла полимеразной цепной реакции по целевому для мутации каналу от концентрации клеток *M. tuberculosis*. По числу клеток каждого штамма при совместном культивировании вычисляли величину конкурентного фитнеса и удельную скорость роста. Было установлено, что штаммы *M. tuberculosis* с мутациями в *gyrA* уступали в скорости роста штамму с диким типом *gyrA*, что было особенно сильно выражено в условиях мультистресса. Штамм с наиболее распространенной мутацией *gyrA*\_D94G имел наименьшую скорость роста из всех исследованных штаммов. Была высказана гипотеза, что медленный рост *M. tuberculosis* с этой мутацией может приводить к толерантности к противотуберкулезным препаратам и в результате этого штамм получает преимущество в условиях химиотерапии по сравнению с другими мутантными по *gyrA* вариантами.

**Ключевые слова:** *Mycobacterium tuberculosis*, *gyrA*, фторхинолоны, конкурентный фитнес, устойчивость, гетерорезистентность

**Финансирование:** исследование проведено в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФГБНУ "ЦНИИТ" № НИОКТР 122041100246-3 «Межвидовой и внутривидовой полиморфизм микобактерий у больных туберкулезом и микобактериозом на фоне специфической терапии».

**Вклад авторов:** Л. Н. Черноусова, А. Эргешов — разработка дизайна исследования; В. В. Устинова, Е. А. Киселева — проведение эксперимента; Т. Г. Смирнова — проведение эксперимента, анализ полученных данных; Е. Е. Ларионова — анализ полученных данных; Э. В. Севастьянова — обзор публикаций по теме исследования; С. Н. Андреевская — анализ полученных данных, написание рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Софья Николаевна Андреевская  
Яузская аллея, д. 2 стр. 1А, г. Москва, 107564, Россия; andsofia@mail.ru

**Статья получена:** 05.11.2024 **Статья принята к печати:** 29.11.2024 **Опубликована онлайн:** 19.12.2024

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2024.058

## STRAINS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* WITH MUTATIONS IN *gyrA* DIFFER IN THEIR LEVEL OF COMPETITIVE FITNESS

Andreevskaya SN<sup>1</sup>✉, Smirnova TG<sup>1</sup>, Chernousova LN<sup>1</sup>, Larionova EE<sup>1</sup>, Sevastyanova EV<sup>1</sup>, Ustinova VV<sup>1</sup>, Kiselyova EA<sup>1</sup>, Ergeshov A<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

As *M. tuberculosis* strains develop resistance to fluoroquinolones, pools of *M. tuberculosis* sensitive to drugs of this group and pools of *M. tuberculosis* with different resistance determinants can simultaneously coexist in the host organism. The goal of this research was to run an *in vitro* investigation of growth characteristics of *M. tuberculosis* strains which have different genetic determinants of resistance to fluoroquinolones, in the setting of competition for nutrients. The research used five clinical strains of multidrug-resistant *M. tuberculosis* differing in *gyrA* structure. Strains were cultured in pairs and individually under optimal conditions (Middlebrook 7H9 medium) and under conditions of multistress (50% Middlebrook 7H9 medium, 2 mM KNO<sub>3</sub>, 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The experiment took 21 days. The number of cells of each co-cultured strain was estimated from calibration curves. These curves showed the dependence of the threshold cycle of the polymerase chain reaction — respective to the channel targeted by the mutation — on the concentration of *M. tuberculosis* cells. The competitive fitness value and specific growth rate were calculated from the number of cells of each strain when co-cultured. *M. tuberculosis* strains with mutations in *gyrA* were found to be inferior in growth rate to the wild-type *gyrA* strain, which was particularly pronounced under multistress conditions. The strain with the most common *gyrA*\_D94G mutation had the lowest growth rate of all strains examined. It has been hypothesised that the slow growth of *M. tuberculosis* with this mutation may lead to tolerance to anti-tuberculosis drugs, and as a result, the strain gains an advantage under chemotherapy conditions compared to other *gyrA* mutant variants.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, *gyrA*, fluoroquinolones, competitive fitness, resistance, heteroresistance

**Funding:** the study was conducted under the State assignment of FGBNU 'CNIIIT' No. NIOCTR 122041100246-3 'Interspecies and intraspecies polymorphism of mycobacteria in patients with tuberculosis and mycobacteriosis in the presence of specific therapy'.

**Author contribution:** Chernousova LN, Ergeshov A — development of the research design; Ustinova VV, Kiseleva EA — conducting the experiment; Smirnova TG — conducting the experiment, analyzing the obtained data; Larionova EE — analyzing the obtained data; Sevastyanova EV — review of publications on the topic of the research; Andreevskaya SN — analyzing the obtained data, writing the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sophia Nikolayevna Andreevskaya  
Yauzskaya Alley, 2 p. 1A, Moscow, 107564, Russia; andsofia@mail.ru

**Received:** 05.11.2024 **Accepted:** 29.11.2024 **Published online:** 19.12.2024

**DOI:** 10.24075/brsmu.2024.058

Микобактерии туберкулезного комплекса — генетически гомогенная группа бактерий с низкой, по сравнению с другими бактериями, частотой мутагенеза [1]. Несмотря на то что частота возникновения мутаций у *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) низкая, необходимо учитывать, что заболевание туберкулезом длится от нескольких месяцев до нескольких лет и размер бактериальной популяции в организме хозяина в это время может достигать более 1 млрд КОЕ, повышается вероятность возникновения спонтанных мутаций, в том числе в генах, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, вследствие чего могут появляться клоны с новыми генотипами [2, 3].

Существование лекарственно-чувствительных и лекарственно-устойчивых пулов МБТ в одном организме называют бактериальной гетерорезистентностью [4, 5]. Состояние гетерорезистентности может возникать не только в случае микроэволюции одного клона, как описано выше (моноклональная гетерорезистентность), но и в результате смешанной инфекции, когда человек инфицирован несколькими штаммами МБТ с разной лекарственной устойчивостью (поликлональная гетерорезистентность) [6–8]. Моноклональная гетерорезистентность считается одним из основных этапов развития лекарственной устойчивости у бактериальных изолятов [5, 9]. В ряде исследований была установлена связь между наличием гетерорезистентности и неудачей лечения туберкулеза [10, 11].

В настоящее время во всем мире отмечается рост туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ ТБ), когда возбудитель устойчив одновременно к двум основным препаратам первого ряда — рифампицину и изониазиду [12]. Наиболее эффективны для терапии МЛУ ТБ препараты группы фторхинолонов [13–15]. По данным разных авторов, частота гетерорезистентности МБТ к фторхинолонам колеблется в зависимости от изучаемого региона от 1 до 35% [16–20].

Описанные выше предпосылки: формирование лекарственной устойчивости через этап гетерорезистентности, неудачи терапии туберкулеза при наличии гетерорезистентности возбудителя, важность фторхинолонов как наиболее эффективных препаратов при МЛУ ТБ, делают актуальными исследования, направленные на понимание механизмов гетерорезистентности МБТ к фторхинолонам, а также эволюционных перспектив МБТ с различными генетическими детерминантами устойчивости к препаратам этой группы.

Цель исследования — изучить особенности роста *in vitro* штаммов МБТ, различающихся генетическими детерминантами устойчивости к фторхинолонам, в условиях конкуренции за питательные вещества.

Таблица 1. Характеристика штаммов МБТ

Код штамма	Фенотипическая устойчивость	Мутации в генах			SIT
		<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>gyrA</i>	
90V	HREZEthLfx	S531L	S315T	A90V	SIT1
94Y	HREZLfx	S531L	S315T	D94Y	SIT1
94G	HREZEthLfx	S531L	S315T	D94G	SIT1
94A	HREZEthLfx	S531L	S315T	D94A	SIT1
WT	HREZEth	S531L	S315T	WT	SIT1

Примечание: код штамма присвоен по мутации в гене *gyrA* (кодон и аминокислотная замена); WT — штамм МБТ с диким типом *gyrA*; H — изониазид; R — рифампицин; E — этамбутол; Z — пипразинамид; Eth — этионамид; Lfx — левофлоксацин; SIT (Spoligotype International Type) — международный код сполиготипа по номенклатуре базы данных SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/>).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Объект исследования

Исследование проводили на пяти клинических штаммах МБТ, максимально сходных по фенотипической устойчивости, имеющих идентичный МЛУ-генотип (*rpoB*\_S531L + *katG*\_S315T) и относящихся к сполиговарианту SIT1 Пекинской сублинии, но различающихся генетическими детерминантами устойчивости к фторхинолонам (четыре штамма с различными мутациями в гене *gyrA* и один штамм с *gyrA* дикого типа; табл. 1).

### Культивирование штаммов МБТ

Штаммы МБТ культивировали попарно и индивидуально на жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 и в условиях мультистресса (50% среда Middlebrook 7H9, 2мМ KNO<sub>2</sub>, 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Время эксперимента составило 21 сутки.

### Определение числа клеток МБТ в образце

Для определения числа клеток каждого штамма в образце применяли подход, использующий результаты мультиплексной ПЦР с использованием набора «Амплитуб-FQ-PB» («Синтол», Россия), который выявляет основные мутации, ассоциированные с устойчивостью к фторхинолонам. Для этого были приготовлены серийные разведения каждого из штаммов МБТ от 10<sup>2</sup> до 10<sup>8</sup> КОЕ/мл и построены калибровочные кривые зависимости порогового цикла амплификации по целевому для мутации каналу от концентрации клеток МБТ в образце. Согласно калибровочным кривым, по значению порогового цикла определяли концентрацию каждого из совместно культивируемых мутантов. Все исследования выполняли в трипликате.

### Конкурентный фитнес

Конкурентный фитнес (W) штаммов МБТ, отражающий общий прирост культуры каждого штамма за время эксперимента при парном культивировании, определяли по формуле [21]:

$$W = \frac{\ln \frac{S1(f)}{S1(i)}}{\ln \frac{S2(f)}{S2(i)}}$$

где W — уровень конкурентного фитнеса;  
S1(i) — начальная концентрация штамма 1;  
S1(f) — финальная концентрация штамма 1;  
S2(i) — начальная концентрация штамма 2;  
S2(f) — начальная концентрация штамма 2.

Таблица 2. Конкурентный фитнес (W) штаммов МБТ с различными генетическими детерминантами устойчивости к ФХ, определенный на 21 сутки эксперимента

Совместно культивируемые штаммы	Оптимальные условия		Мультистресс	
	W	интерпретация	W	интерпретация
WT + 90V	1,34	WT > 90V	2,07	WT > 90V
WT + 94A	1,32	WT > 94A	1,42	WT > 94A
WT + 94G	1,13	WT > 94G	1,58	WT > 94G
WT + 94Y	0,87	WT < 94Y	1,28	WT > 94Y
94Y + 90V	1,29	94Y > 90V	0,96	94Y < 90V
94Y + 94A	1,16	94Y > 94A	0,86	94Y < 94A
94Y + 94G	1,3	94Y > 94G	1,05	94Y > 94G
94G + 90V	0,93	94G < 90V	0,93	94G < 90V
94G + 94A	0,99	94G = 94A	0,65	94G < 94A
94A + 90V	0,92	94A < 90V	1,01	94A = 90Va
Ранжирование штаммов в порядке возрастания конкурентного фитнеса				
Оптимальные условия		94A, 94G → 90V → WT → 94Y		
Мультистресс		94G → 94Y → 90V, 94A → WT		

**Примечание:** знаки «меньше» (<) и «больше» (>) указывают на то, какой штамм обладает меньшим/большим фитнесом при совместном культивировании; знак «равно» (=) обозначает, что уровень конкурентного фитнеса пары штаммов сходный

При  $W > 1$  конкурентный фитнес штамма 1 больше, чем штамма 2;

При  $W < 1$  конкурентный фитнес штамма 1 меньше, чем штамма 2;

При  $W = 1$  штаммы 1 и 2 имеют сходный конкурентный фитнес.

Для сравнения роста культуры штаммов МБТ, культивируемых парно, с индивидуальным ростом на среде, определяли удельную скорость роста культуры ( $\mu$ ) — накопление бактериальной массы в единицу времени во время экспоненциальной фазы роста, по формуле [22]:

$$\mu = \frac{\ln 2}{g},$$

где  $g$  — время генерации, определяемое как:

$$g = \frac{t_2 - t_1}{n},$$

где  $t_1$  и  $t_2$  — время оценки параметра в процессе экспоненциальной фазы роста;  $n$  — число генераций, определяемое как:

$$n = \frac{\log_{10} N_2 - \log_{10} N_1}{\log_{10} 2},$$

где  $N_1$  и  $N_2$  — число КОЕ в моменты времени  $t_1$  и  $t_2$  соответственно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уровень конкурентного фитнеса был определен для 10 пар штаммов МБТ с разными детерминантами устойчивости к фторхинолонам (табл. 2). Было показано, что в условиях конкуренции за питательные вещества при росте в оптимальных условиях штаммы МБТ с *gyrA* дикого типа более интенсивно накапливали биомассу по сравнению со штаммами 90V, 94A и 94G. Штамм 94Y при культивировании в оптимальных условиях обладал наибольшим конкурентным фитнесом из всех исследованных штаммов, включая штамм WT. Наименьший конкурентный фитнес в оптимальных условиях культивирования был у штаммов МБТ 94A и 94G.

В условиях мультистресса на обедненной питательной среде Middlebrook 7H9 в присутствии активных форм кислорода и азота способность исследованных штаммов МБТ конкурировать за питательные вещества

отличалась от оптимальных условий культивирования. При мультистрессе штамм с диким типом *gyrA* был более конкурентоспособен по сравнению со штаммами МБТ с мутациями в *gyrA*. Конкурентный фитнес штамма 94Y в условиях мультистресса резко снизился, а штамма 94A, напротив, улучшился по сравнению с оптимальными условиями культивирования. Конкурентный фитнес штамма 94G в условиях мультистресса, так же как и в оптимальных условиях, был наименьшим среди всех исследованных штаммов.

Удельная скорость роста культуры МБТ с различными генетическими детерминантами устойчивости к фторхинолонам тоже зависела от условий культивирования (табл. 3). При индивидуальном культивировании в оптимальных условиях штаммы *gyrA* дикого типа и мутанты 94Y и 90V имели сходную удельную скорость роста. Удельная скорость роста мутантов 94G и 94A была более низкой.

При парном культивировании в оптимальных условиях удельная скорость роста штаммов МБТ, как правило, была такой же, как и при индивидуальном культивировании. Более низкое значение удельной скорости роста при парном культивировании, по сравнению с индивидуальным, было отмечено только для штамма WT при совместном культивировании со штаммом 94A и для 94G при культивировании со штаммом WT и со штаммом 94A.

В условиях мультистресса при индивидуальном культивировании удельная скорость роста штаммов МБТ WT и 90V была на том же уровне, что и в оптимальных условиях, а у штамма 94A повышалась. Удельная скорость роста штаммов 94G и 94Y в условиях мультистресса при индивидуальном культивировании была ниже, чем в оптимальных условиях.

При совместном культивировании штаммов в условиях мультистресса удельная скорость роста штаммов WT, 90V, 94A и 94Y практически не отличалась от удельной скорости культивирования в оптимальных условиях, или, в некоторых сочетаниях, была выше. Удельная скорость роста штамма 94G при культивировании с другими штаммами или не менялась, по сравнению с оптимальными условиями, оставаясь на таком же низком уровне, или еще сильнее снижалась по сравнению с оптимальными условиями.

Величины удельной скорости роста штаммов при индивидуальном культивировании и при культивировании

Таблица 3. Удельная скорость роста ( $\mu$ ) штаммов МБТ с различными генетическими детерминантами устойчивости к ФХ

Штамм	Совместное культивирование с	$\mu$ (час <sup>-1</sup> )	
		оптимальные условия	мультистресс
WT	–	0,021	0,024
	94Y	0,021	0,024
	94G	0,021	0,024
	94A	0,018*	0,029**
	90V	0,021	0,022
94Y	–	0,024	0,015
	WT	0,023	0,018**
	94G	0,024	0,017
	94A	0,024	0,015
	90V	0,024	0,019**
94G	–	0,016	0,012
	WT	0,012*	0,008*
	94Y	0,016	0,014**
	94A	0,012*	0,007*
	90V	0,016	0,014**
94A	–	0,017	0,022
	WT	0,016	0,015*
	94Y	0,015	0,026**
	94G	0,017	0,02
	90V	0,015	0,025**
90V	–	0,018	0,016
	WT	0,016	0,019**
	94Y	0,019	0,017
	94G	0,018	0,02**
	94A	0,02	0,02**

Примечание: \* —  $\mu$  ниже, чем при индивидуальном культивировании более чем на 10%; \*\* —  $\mu$  выше, чем при индивидуальном культивировании более чем на 10%

в условиях мультистресса, как правило, различались. У штамма 94G при совместном культивировании со штаммами WT и 94A и у штамма 94A при совместном культивировании со штаммом WT удельная скорость была более чем на 10% ниже, чем при индивидуальном культивировании. Но чаще при совместном культивировании штаммов в условиях мультистресса удельная скорость была выше, чем при индивидуальном культивировании (штамм WT при совместном культивировании с 94A; штамм 90V — с WT, 94G и 94A, штамм 94A — с 94Y и 90V; штамм 94G — с 90V и 94Y и штамм 94Y — с 90V и WT).

Было также установлено, что штаммы МБТ с мутациями в *gyrA* различались по способности реплицироваться при совместном культивировании, и этот параметр для большинства штаммов менялся в зависимости от условий культивирования.

Так, в оптимальных условиях штамм МБТ 94Y размножался более интенсивно, чем штаммы 94A и 94G, в то время как в условиях мультистресса лучшие показатели роста в паре продемонстрировал штамм 94A, а интенсивность деления штаммов 94Y и 94G при парном культивировании была идентичной. Аналогичным образом условия культивирования повлияли на уровень конкурентного фитнеса в парах 94G + 90V, 94G + 94A и 94A + 90V. Исключение составила только пара штаммов 94Y + 90V, в которой и в оптимальных условиях, и в условиях мультистресса большая интенсивность роста культуры была у штамма 94Y.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Были изучены характеристики роста культуры пяти штаммов МБТ, отличающихся генетическими детерминантами устойчивости к фторхинолонам, при индивидуальном и парном культивировании. Исследованные мутантные по *gyrA* варианты МБТ представлены в популяции с разной частотой: наиболее распространены штаммы с мутацией в *gyrA* D94G (40%), второе место по распространенности — у штаммов с мутацией A90V (20%), далее следуют штаммы с мутацией D94A (15%) и D94Y (5%) [20]. Существуют и другие мутантные по *gyrA* варианты МБТ, но они очень редко выделяются от больных, что не позволило нам включить эти штаммы в исследование.

Гетерорезистентность популяции МБТ в организме хозяина можно рассматривать как частный случай внутривидовой конкуренции, так как имеется конкуренция за ограниченный ресурс между представителями одного вида, имеющего незначительные различия (в нашем случае — разная структура альфа-субъединиц ДНК-гиразы, кодируемых геном *gyrA*). Итогом такой конкуренции может стать исчезновение наименее приспособленного пула МБТ и распространение в популяции наиболее приспособленного пула. Поскольку предстояло изучить конкурентоспособность мутантных вариантов МБТ, одним из оцениваемых нами параметров был конкурентный фитнес штаммов МБТ при совместном культивировании. Традиционно конкурентный фитнес МБТ определяют, культивируя

устойчивый штамм совместно с чувствительным штаммом с последующим пересевом смеси штаммов на среду с противотуберкулезным препаратом, определяя тем самым число КОЕ устойчивого штамма в смеси [23]. Но такой подход не позволяет сравнивать конкурентоспособность двух устойчивых штаммов, поэтому для определения конкурентного фитнеса нами впервые был использован метод мультиплексной ПЦР, позволяющий количественно оценить число КОЕ каждого мутантного варианта в образце. Так как исследование проводили в динамике, а не по конечной точке, примененный нами подход позволил также оценить удельную скорость роста каждого мутанта при совместном культивировании.

Кроме того, мы изучали рост совместно культивируемых штаммов не только в оптимальных условиях, но и в модели мультистресса, которая позволяет *in vitro* частично воссоздать условия, с которыми возбудитель сталкивается в макроорганизме: недостаток питательных веществ и вырабатываемые макрофагами в качестве бактерицидных агентов активные формы азота и кислорода [24].

Нами было показано, что конкурентный фитнес штаммов МБТ с мутациями в *gyrA* ниже, чем у штаммов с диким типом *gyrA*. Исключение при культивировании в оптимальных условиях составил только штамм 94Y с редко встречающейся мутацией, но в условиях, максимально приближенных к естественным, на модели мультистресса, скорость его деления существенно снизилась.

Низкая скорость деления мутантных по *gyrA* штаммов МБТ в целом была предсказуема, так как указанный ген кодирует альфа-субъединицу ДНК-гиразы [25]. Изменение структуры этого фермента вследствие мутаций в *gyrA* может негативно сказаться на процессах репликации и транскрипции ДНК в клетке МБТ и привести к снижению скорости роста возбудителя.

Ассоциацию между частотой встречаемости в популяции мутантных по *gyrA* вариантов МБТ и уровнем конкурентного фитнеса можно проследить на модели культивирования в условиях мультистресса: штамм с часто встречаемой мутацией *gyrA*\_A90V имел высокие показатели конкурентного фитнеса, штамм с редкой мутацией *gyrA*\_D94Y — низкие. Фитнес штамма с мутацией *gyrA*\_D94A в модели мультистресса был сравним со штаммом 90V, однако в популяции встречался реже, возможно вследствие того, что мутация *gyrA*\_D94A не строго ассоциирована с устойчивостью к фторхинолонам и, следовательно, пул МБТ, несущих эту мутацию, мог быть элиминирован в процессе химиотерапии [20, 26, 27].

Вызывает удивление, что штамм с наиболее распространенной мутацией *gyrA*\_D94G имел наименьший уровень конкурентного фитнеса и наименьшую удельную

скорость роста из всех исследованных штаммов. Однако снижение скорости деления в естественных условиях не всегда является недостатком, особенно под давлением отбора вследствие химиотерапии. Большинство противотуберкулезных препаратов эффективны в отношении активно делящихся МБТ, а медленно делящиеся пулы представляют собой серьезную проблему в плане эффективности химиотерапии [28, 29].

Следовательно, можно предположить, что широкая распространенность устойчивых к фторхинолонам МБТ с мутацией *gyrA*\_D94G связана с низкой скоростью деления таких штаммов, что позволяет им избегать воздействия противотуберкулезных препаратов.

При обобщении результатов проведенного исследования представляется, что эволюционный успех наиболее распространенного мутантного по *gyrA* варианта МБТ заключается в толерантности к противотуберкулезным препаратам вследствие медленного роста. Встречающиеся в два раза реже МБТ с мутацией *gyrA*\_A90V обладают хорошими ростовыми свойствами и получили свое преимущество за счет этой особенности. Штаммы с мутацией *gyrA*\_D94A встречаются еще реже, так как, имея высокий уровень конкурентного фитнеса, не всегда устойчивы к фторхинолонам. МБТ с мутацией *gyrA*\_D94Y обладают наименьшим фитнесом в условиях мультистресса и редко встречаются в популяции.

В заключение следует отметить, что в статье приведены данные пилотного исследования на ограниченной группе штаммов, следовательно, полученные выводы можно пока расценивать как предварительные и не делать на этом этапе обобщение на всю популяцию устойчивых к фторхинолонам МБТ. Для подтверждения полученных результатов запланировано полномасштабное исследование на большой выборке штаммов.

## ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования было установлено, что штаммы МБТ с мутациями в *gyrA* различаются по способности адаптироваться к условиям конкуренции за питательные вещества *in vitro*. На уровень конкурентного фитнеса штаммов МБТ с различными генетическими детерминантами устойчивости к фторхинолонам оказывают влияние условия культивирования штаммов. Для большинства штаммов МБТ показана прямая ассоциация между уровнем конкурентного фитнеса в условиях мультистресса и частотой встречаемости в популяции. Мутации в *gyrA* снижают скорость роста МБТ, возможно, это помогает выжить возбудителю в условиях химиотерапии.

## Литература

1. Eldholm V, Balloux F. Antimicrobial Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: The Odd One Out. *Trends Microbiol.* 2016; 24 (8): 637–48.
2. O'Neill MB, Mortimer TD, Pepperell CS. Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* across Evolutionary Scales. *PLoS Pathog.* 2015; 11 (11): e1005257.
3. Vargas R, Freschi L, Marin M, Epperson LE, Smith M, Oussenko I, et al. In-host population dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* complex during active disease. *Elife.* 2021; 10: e61805.
4. McIvor A, Koornhof H, Kana BD. Relapse, re-infection and mixed infections in tuberculosis disease. *Pathog Dis.* 2017; 75 (3).
5. Ye M, Yuan W, Molaeipour L, Azizian K, Ahmadi A, Kouhsari E. Antibiotic heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2021; 20 (1): 73.
6. Zetola NM, Shin SS, Tumedji KA, Moeti K, Ncube R, Nicol M et al. Mixed *Mycobacterium tuberculosis* complex infections and false-negative results for rifampin resistance by GeneXpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes. *J Clin Microbiol.* 2014; 52 (7): 2422–9.
7. Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nat Rev Microbiol.* 2019;

- 17 (8): 479–96.
8. Ford C, Yusim K, Ioerger T, Feng S, Chase M, Greene M, et al. *Mycobacterium tuberculosis*–heterogeneity revealed through whole genome sequencing. *Tuberculosis (Edinb)*. 2012; 92 (3): 194–201.
  9. Chen J, Huang F, Yin X, Gu D. Assessments of Different Methods for Testing Heteroresistance to Rifampicin in Tubercle Bacillus. *J Nanosci Nanotechnol*. 2018; 18 (12): 8414–8.
  10. Chen L, Zhang J, Zhang H. Heteroresistance of *Mycobacterium tuberculosis* Strains May Be Associated More Strongly With Poor Treatment Outcomes Than Within-Host Heterogeneity of *M. tuberculosis* Infection. *J Infect Dis*. 2016; 214 (8): 1286–7.
  11. Rigouts L, Miotto P, Schats M, Lempens P, Cabibbe AM, Galbiati S, et al. Fluoroquinolone heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*: detection by genotypic and phenotypic assays in experimentally mixed populations. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 11760.
  12. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization, 2023; 75 p.
  13. Huo F, Ma Y, Li S, Xue Y, Shang Y, Dong L, et al. Specific *gyrA* gene mutations correlate with high prevalence of discordant levofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Beijing, China. *J Mol Diagn*. 2020; 22 (9): 1199–204.
  14. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization, 2019; 104 p.
  15. Nahid P, Mase SR, Migliori GB, Sotgiu G, Bothamley GH, Brozek JL, et al. Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. An Official ATS/CDC/ERS/IDSA Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200 (10): e93–e142.
  16. Jouet A, Gaudin C, Badalato N, Allix-Béguet C, Duthoy S, Ferré A, et al. Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. *Eur Respir J*. 2021; 57 (3): 2002338.
  17. Zhang X, Zhao B, Liu L, Zhu Y, Zhao Y, Jin Q. Subpopulation analysis of heteroresistance to fluoroquinolone in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Beijing, China. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (4): 1471–4.
  18. Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55 (5): 2032–41.
  19. Baffoe-Bonnie A, Houpt ER, Turner L, Dodge D, Heysell SK. Drug-Susceptible and Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a Single Patient. *Emerg Infect Dis*. 2019; 25 (11): 2120–1.
  20. Андреевская С. Н., Смирнова Т. Г., Черноусова Л. Н., Ларионова Е. Е., Киселева Е. А., Эргешов А. Особенности генотипической резистентности к фторхинолонам у *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Российской Федерации. *Вестник РГМУ*. 2022; (5): 23–31.
  21. Kodio O, Georges Togo AC, Sadio Sarro YD, Fane B, Diallo F, Somboro A, et al. Competitive fitness of *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. *Int J Mycobacteriol*. 2019; 8 (3): 287–91.
  22. Алешина Е. С., Дроздова Е. А., Романенко Н. А. Культивирование микроорганизмов как основа биотехнологического процесса: учебное пособие. Оренбург: ООО ИПК «Университет», 2017; 191 с.
  23. Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohannan BJ. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2006; 312 (5782): 1944–6.
  24. Peddireddy V, Doddam SN, Ahmed N. Mycobacterial Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis. *Front Immunol*. 2017; 8: 84.
  25. An Q, Lin R, Yang Q, Wang C, Wang D. Evaluation of genetic mutations associated with phenotypic resistance to fluoroquinolones, bedaquiline, and linezolid in clinical *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist*. 2023; 34: 214–26.
  26. Chan RC, Hui M, Chan EW, Au TK, Chin ML, Yip CK, et al. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59 (5): 866–73.
  27. Casali N, Nikolayevskiy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet*. 2014; 46 (3): 279–86.
  28. Gomez JE, McKinney JD. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis (Edinb)*. 2004; 84 (1–2): 29–44.
  29. Mitchison DA, Coates AR. Predictive in vitro models of the sterilizing activity of anti-tuberculosis drugs. *Curr Pharm Des*. 2004; 10 (26): 3285–95.

## References

1. Eldholm V, Balloux F. Antimicrobial Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: The Odd One Out. *Trends Microbiol*. 2016; 24 (8): 637–48.
2. O'Neill MB, Mortimer TD, Pepperell CS. Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* across Evolutionary Scales. *PLoS Pathog*. 2015; 11 (11): e1005257.
3. Vargas R, Freschi L, Marin M, Epperson LE, Smith M, Oussenko I, et al. In-host population dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* complex during active disease. *Elife*. 2021; 10: e61805.
4. Mclvor A, Koornhof H, Kana BD. Relapse, re-infection and mixed infections in tuberculosis disease. *Pathog Dis*. 2017; 75 (3).
5. Ye M, Yuan W, Molaeipour L, Azizian K, Ahmadi A, Kouhsari E. Antibiotic heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021; 20 (1): 73.
6. Zetola NM, Shin SS, Tumedi KA, Moeti K, Ncube R, Nicol M et al. Mixed *Mycobacterium tuberculosis* complex infections and false-negative results for rifampin resistance by GeneXpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes. *J Clin Microbiol*. 2014; 52 (7): 2422–9.
7. Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nat Rev Microbiol*. 2019; 17 (8): 479–96.
8. Ford C, Yusim K, Ioerger T, Feng S, Chase M, Greene M, et al. *Mycobacterium tuberculosis*–heterogeneity revealed through whole genome sequencing. *Tuberculosis (Edinb)*. 2012; 92 (3): 194–201.
9. Chen J, Huang F, Yin X, Gu D. Assessments of Different Methods for Testing Heteroresistance to Rifampicin in Tubercle Bacillus. *J Nanosci Nanotechnol*. 2018; 18 (12): 8414–8.
10. Chen L, Zhang J, Zhang H. Heteroresistance of *Mycobacterium tuberculosis* Strains May Be Associated More Strongly With Poor Treatment Outcomes Than Within-Host Heterogeneity of *M. tuberculosis* Infection. *J Infect Dis*. 2016; 214 (8): 1286–7.
11. Rigouts L, Miotto P, Schats M, Lempens P, Cabibbe AM, Galbiati S, et al. Fluoroquinolone heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*: detection by genotypic and phenotypic assays in experimentally mixed populations. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 11760.
12. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization, 2023; 75 p.
13. Huo F, Ma Y, Li S, Xue Y, Shang Y, Dong L, et al. Specific *gyrA* gene mutations correlate with high prevalence of discordant levofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Beijing, China. *J Mol Diagn*. 2020; 22 (9): 1199–204.
14. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization, 2019; 104 p.
15. Nahid P, Mase SR, Migliori GB, Sotgiu G, Bothamley GH, Brozek JL, et al. Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. An Official ATS/CDC/ERS/IDSA Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200 (10): e93–e142.
16. Jouet A, Gaudin C, Badalato N, Allix-Béguet C, Duthoy S, Ferré A, et al. Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. *Eur Respir J*. 2021; 57 (3): 2002338.
17. Zhang X, Zhao B, Liu L, Zhu Y, Zhao Y, Jin Q. Subpopulation analysis of heteroresistance to fluoroquinolone in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Beijing, China. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (4): 1471–4.

18. Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55 (5): 2032–41.
19. Baffoe-Bonnie A, Houghton ER, Turner L, Dodge D, Heysell SK. Drug-Susceptible and Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a Single Patient. *Emerg Infect Dis*. 2019; 25 (11): 2120–1.
20. Andreevskaya SN, Smirnova TG, Chemousova LN, Larionova EE, Kiseleva EA, Ergeshov A. The nature of genotypic resistance to fluoroquinolones in *Mycobacterium tuberculosis* circulating in Russian Federation. *Bulletin of RSMU*. 2022; (5): 15–22.
21. Kodio O, Georges Togo AC, Sadio Sarro YD, Fane B, Diallo F, Somboro A. et al. Competitive fitness of *Mycobacterium tuberculosis* *in vitro*. *Int J Mycobacteriol*. 2019; 8 (3): 287–91.
22. Aleshina ES, Drozdova EA, Romanenko NA. Kul'tivirovanie mikroorganizmov kak osnova biotekhnologicheskogo processa: uchebnoe posobie. Orenburg: OOO IPK «Universitet», 2017; 191 s. Russian.
23. Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohannan BJ. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2006; 312 (5782): 1944–6.
24. Peddireddy V, Doddam SN, Ahmed N. Mycobacterial Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis. *Front Immunol*. 2017; 8: 84.
25. An Q, Lin R, Yang Q, Wang C, Wang D. Evaluation of genetic mutations associated with phenotypic resistance to fluoroquinolones, bedaquiline, and linezolid in clinical *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist*. 2023; 34: 214–26.
26. Chan RC, Hui M, Chan EW, Au TK, Chin ML, Yip CK, et al. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59 (5): 866–73.
27. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet*. 2014; 46 (3): 279–86.
28. Gomez JE, McKinney JD. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis (Edinb)*. 2004; 84 (1–2): 29–44.
29. Mitchison DA, Coates AR. Predictive *in vitro* models of the sterilizing activity of anti-tuberculosis drugs. *Curr Pharm Des*. 2004; 10 (26): 3285–95.