

<https://doi.org/10.25208/vdv1292>

Генетические детерминанты резистентности *Mycobacterium leprae* к антимикробным препаратам

© Вербенко Д.А.*, Соломка В.С., Козлова И.В., Кубанов А.А.

Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии
107076, Россия, г. Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6

Обзор посвящен развитию устойчивости возбудителя лепры — бактерии *Mycobacterium leprae* к терапии антимикробными препаратами (АМП), в первую очередь рекомендованными Всемирной организацией здравоохранения. Особенностью лекарственной устойчивости лепры является сложность выявления, поскольку возбудитель заболевания не культивируется на искусственных средах, а используемые в настоящее время методы диагностики лекарственной устойчивости требуют длительного времени либо специального оснащения лабораторий и высокой квалификации персонала. Лекарственная устойчивость штамма *Mycobacterium leprae* даже к отдельным компонентам комбинированной лекарственной терапии приводит к развитию симптоматики заболевания, несмотря на применение противолепрозной терапии, что в свою очередь может стать причиной инвалидизации больного. В настоящее время в Российской Федерации не существует ни одного разрешенного к применению теста, выявляющего ДНК *Mycobacterium leprae*, а определение генетических детерминант резистентности проводится путем прямого секвенирования небольших участков генов *gyrA*, *folP* и *rpoB*. В то же время современные исследования выявляют рост числа резистентных к отдельным компонентам комбинированной лекарственной терапии штаммов *Mycobacterium leprae*. Использование технологий секвенирования нового поколения позволило выявить дополнительные генетические детерминанты резистентности лепры к компонентам комбинированной лекарственной терапии. Сложившаяся ситуация представляет актуальным использование систем быстрой идентификации для мониторинга наиболее распространенных генетических детерминант резистентности *Mycobacterium leprae*. Поиск литературы осуществлялся по ключевым словам в базах данных Scopus, PubMed и РИНЦ.

Ключевые слова: лепра, антимикробные препараты, генетические детерминанты резистентности, лекарственная устойчивость, обзор.

Конфликт интересов: авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Источник финансирования: исследования выполнены при финансовой поддержке Минздрава России в рамках выполнения государственного задания № 053-03-2021-124 на 2021 г.

Для цитирования: Вербенко Д.А., Соломка В.С., Козлова И.В., Кубанов А.А. Генетические детерминанты резистентности *Mycobacterium leprae* к антимикробным препаратам. Вестник дерматологии и венерологии. 2021;97(6):54–62. doi: <https://doi.org/10.25208/vdv1292>



The genetic determinants of *Mycobacterium leprae* resistance to antimicrobial drugs

© Dmitry A. Verbenko*, Victoria S. Solomka, Irina V. Kozlova, Alexey A. Kubanov

State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology
Korolenko str., 3, bldg 6, 107076, Moscow, Russia

The review is devoted to the appearance of resistance of a slowly developing disease — leprosy — to antimicrobial therapy (AMP), primarily recommended by the World Health Organization. The main danger of drug resistant leprosy is in the difficulty of identifying, since the causative agent of the disease is not cultivated on artificial media, and the methods for diagnosing drug resistance that are currently used take a long time. The drug resistance of the *Mycobacterium leprae* strain even to individual components of combination drug therapy result to the development of symptoms of the disease despite undergo anti-leprosy therapy, which in turn can cause the patient to become disabled. Currently, in the Russian Federation, there is no approved test for detecting *Mycobacterium leprae* DNA, and the determination of genetic determinants of resistance is carried out by sequencing genome regions determined by WHO recommendations: small *gyrA*, *folP* and *rpoB* genes loci. At the same time, modern studies in endemic regions reveal an increased level of *Mycobacterium leprae* strains resistant to individual components of combined drug therapy. The use of next generation sequencing (NGS) has made it possible to identify additional genetic determinants of leprosy resistance to the components of combination drug therapy. The current situation is relevant to antimicrobial drug resistance surveillance by using of quick identification systems for most frequent genetic resistance determinants of *Mycobacterium leprae*. The literature search was carried out using keywords in the Scopus, PubMed and RSCI databases.

Keywords: anti-leprosy drug, leprosy, *Mycobacterium leprae*, genetic determinants of resistance, drug resistance, review.

Conflict of interest: the authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of funding: the research was carried out with the financial support of the Russian Ministry of Health under state assignment № 053-03-2021-124.

For citation: Verbenko DA, Solomka VS, Kozlova IV, Kubanov AA. A clinical case of borderline leprosy. Vestnik Dermatologii i Venerologii. 2021;97(6):54–62. doi: <https://doi.org/10.25208/vdv1292>



Введение

Распространение устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к антимикробным препаратам (АМП) является одной из десяти стоящих перед человечеством глобальных угроз здоровью населения [1]. Всемирная организация здравоохранения считает борьбу с антибиотикорезистентностью одной из важнейших проблем современного здравоохранения, документально обозначив ее еще в 2001 г. при разработке «Глобальной стратегии ВОЗ по сдерживанию резистентности к противомикробным препаратам» [2].

Устойчивость к АМП развивается в результате генетических мутаций и закрепляется в популяции микроорганизмов под влиянием отбора. Именно поэтому стратегия борьбы с распространением антибиотикорезистентности предполагает комплексный подход: мониторинг резистентности микроорганизмов к АМП, применение различных АМП в терапии инфекционных заболеваний, а также разработку новых АМП. Видовое разнообразие микроорганизмов обширно: скорость приобретения генетически обусловленной антибиотикорезистентности для различных патогенных микроорганизмов может отличаться на порядки. Основное внимание научных исследований посвящено изучению патогенных микроорганизмов, способных к быстрому развитию устойчивости к АМП, — как правило, обладающих высокой скоростью размножения, способностью к горизонтальному распространению резистентности в популяции и т. п. [3, 4]. Однако длительное применение АМП способствует появлению резистентных штаммов микроорганизмов даже в случае медленно развивающихся заболеваний, таких как лепра [5–7].

Лепра — хроническое инфекционное заболевание, вызываемое *Mycobacterium leprae*, при котором поражаются кожа, периферическая нервная система и слизистые оболочки верхнего респираторного тракта [8]. Заболевание распространено в тропических странах, особенно в Индии, Филиппинах и Бразилии: на эти три страны в совокупности приходится чуть более 80% случаев заболевания во всем мире. В 2019 г. выявлено 202 256 новых случаев заболевания в 118 странах [1]. В Российской Федерации наблюдаются единичные случаи нового возникновения лепры, выявляемые в основном при трансграничном переносе из эндемичных стран [9]; в частности, специалистами ФГБУ «ГНЦДК» описаны особенности спорадических случаев заболевания лепрой [10, 11].

M. leprae — облигатный внутриклеточный организм, реплицирующийся достаточно медленно (один раз за две недели), развивающийся только при температуре от 27 до 33 °С, требующий для размножения использования ресурсов организма хозяина [12]. До настоящего времени не найден надежный способ культивирования *M. leprae* в искусственных средах [13]. Проявление клинических симптомов может наступить через 5–20 лет после инфицирования, в зависимости от типа заболевания, определяемого индивидуальной реакцией иммунной системы хозяина [14]. В течение этого периода бактерии размножаются в пораженных участках и разрушают структуры периферической нервной системы, что может привести к снижению или потере чувствительности и разрушению частей конечностей из-за повторных травм и незамеченных ран [8].

Иммуногистопатологическая классификация лепры описана Ridley и Jopling [15] и классифицирует заболе-

вание на 2 полярные группы: туберкулезная проказа (ТТ) и лепроматозная проказа (ЛЛ), с 3 промежуточными стадиями. В 1998 г. ВОЗ предложила классифицировать пациентов с лепрой на группы по количеству поражений кожи, бациллярному индексу и поражению нервов. Классификация затем была пересмотрена, и в настоящее время случаи олигобациллярной лепры определяются следующим образом: количество элементов поражения кожи от одного до пяти, без подтверждения присутствия бактерий в биоптате кожи, случаи мультибациллярной лепры: количество элементов поражения кожи более пяти; имеются поражения нервов (чистый неврит или любое количество поражений кожи и неврит); или подтверждается присутствие бактерий в биоптате кожи, независимо от количества элементов поражения кожи [1].

Геном *M. leprae* среди микобактерий имеет самый небольшой размер (3,3 МБ), содержит 1614 генов, кодирующих белки, и 1300 псевдогенов и некодирующих участков [16]. В ходе эволюции *M. leprae* утратила около 2000 генов из своего генома, в том числе те, продукты которых участвуют в жизненно важных метаболических путях, что может объяснить невозможность культивирования *M. leprae* в лабораторных условиях. Показано, что бактерии *M. leprae* способны к размножению не только в теле человека, но и у животных с пониженной температурой тела, таких как девятипоясные броненосцы, а также в подушечках лап мышей с ослабленным иммунитетом [12, 17]. Геном *M. leprae* высококонсервативен: между отдаленными родственными штаммами наблюдается менее 300 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и только несколько SNP между близкими родственниками [18]. Сложная и уникальная клеточная стенка *M. leprae* состоит из ковалентно связанных пептидогликана, арабиногалактана и миколиновой кислоты, которые трудно разрушить, что объясняет сложность терапии и может являться одной из причин чрезвычайно низкой скорости репликации [19].

Фармакотерапия лепры

Моментом начала химиотерапии лепры, несмотря на низкую эффективность лечения и многочисленные нежелательные эффекты для пациента, можно считать применение сульфонов [20]. Монотерапию лепры бактериостатическим препаратом дапсон (4, 4'-диаминодифенилсульфон) проводили с момента его открытия в 1935 г. Известно, что мишенью дапсона является дигидроптероатсинтаза, ключевой фермент в биосинтезе фолиевой кислоты у бактерий, включая *M. leprae* [21, 22]. Особенностью метаболизма микобактерий является эндогенный синтез фолиевой кислоты, в то время как организм человека может усваивать фолиевую кислоту, поступающую извне. Дапсон является аналогом бактериального прекурсора парааминобензойной кислоты, которая конкурентно ингибирует биосинтез бактериальной фолиевой кислоты, воздействуя на дигидроптероатсинтазу [23].

Клофазимин, представляющий собой риминофеназиновое производное, был разработан в 50-х годах для лечения туберкулеза, однако в целях терапии лепры его использование начато с 1962 г. [24]. Клофазимин липофилен очень медленно выводится из организма и обладает антимикробным (бактериостатическим), иммуномодулирующим и противовоспалительным действием. Механизм антимикробного действия клофазими-

мина недостаточно изучен, и вероятно, плейотропен [19, 25], что может объяснить отсутствие резистентности микобактерий. Среди путей действия препарата предполагается блокирование транскрипции за счет прямого связывания с ДНК микобактерий, нарушения структуры и функции мембран (как напрямую, так и через лизосомальные фосфолипиды) и ингибирования транспорта ионов калия, повышения фагоцитарной активности макрофагов и синтеза лизосомальных ферментов. Клоfazимин обладает также противовоспалительным и иммуносупрессивным действием в отношении Т-хелперов I типа. Клоfazимин успешно используется при терапии штаммов микобактерий лепры, устойчивых к дапсону [26]. При исследованиях противотуберкулезной активности выявлен сильный аддитивный эффект препарата при сочетании с рядом антибиотиков: например, при сочетании клоfazимина с моксифлоксацином эффективность применения против резистентных культур *Mycobacterium tuberculosis* достигла 97% [25]. Препарат обладает выраженным побочным эффектом изменения цвета кожи и выделений, вызывает сухость кожи, диарею, боли в области живота; кроме того, в настоящее время клоfazимин не зарегистрирован в качестве лекарственного препарата, разрешенного к применению в Российской Федерации.

Открытие противолепрозной активности АМП рифампицина, а затем офлоксацина позволило расширить спектр применяемых фармакологических препаратов терапии лепры. Рифампицин связывается с бета-субъединицей ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактерий, препятствуя ее присоединению к ДНК, и ингибирует транскрипцию РНК. Механизм действия фторхинолонов, к которым относится офлоксацин, основан на блокировке активности фермента ДНК-гиразы, которая играет решающую роль в репликации и транскрипции ДНК. ДНК-гираза — тетрамерный фермент, состоящий из двух субъединиц А (GyrA) и двух субъединиц В (GyrB). Высокая эффективность применения рифампицина и офлоксацина обеспечила выбор этих АМП в качестве препаратов выбора в составе комбинированной лекарственной терапии.

В 1981 г. для предотвращения распространения устойчивых к антимикробным препаратам штаммов *M. leprae* Всемирная организация здравоохранения разработала комбинированную лекарственную терапию (multidrug therapy, КЛТ) для лечения лепры, включающую сочетанное применение рифампицина, дапсона и клоfazимина [1]. В настоящее время именно этот вариант терапии лепры является общепринятым золотым стандартом терапии лепры. По данным ВОЗ, на 2018 г. длительность применения КЛТ в зависимости от типа заболевания составляет: для олигобациллярной лепры — 6, а для мультибациллярной — 12 месяцев. Другая схема КЛТ, рекомендованная Национальной программой борьбы с болезнью Гансена [27], предполагает более длительную продолжительность терапии и исключает клоfazимин в лечении олигобациллярной лепры. Частота рецидивов для этой схемы чрезвычайно низка. Альтернативные схемы КЛТ, предложенные Национальной программой борьбы с болезнью Гансена, могут включать миноциклин вместо дапсона, кларитромицин как заменитель любого из лекарств или офлоксацин вместо клоfazимина [13].

Поскольку осуществление терапии лепры по рекомендованной ВОЗ схеме требует длительного времени,

а применяемые соединения обладают высокой токсичностью и вызывают нежелательные явления в отношении внутренних органов, проводится разработка новых подходов терапии и более эффективных схем с участием новых АМП с минимальным токсическим действием. Предприняты попытки разработки новых схем химиотерапии лепры с использованием комбинаций новых модифицированных АМП — миноциклина, оксифлоксацина, монофлоксацина и пр. [26, 28].

Методы выявления устойчивости *Mycobacterium leprae* к антимикробным препаратам

Выявление штаммов лепры с лекарственной устойчивостью осложнено невозможностью культивирования *M. leprae* на искусственных питательных средах [12, 29]. Долгое время единственным методом выявления лекарственной устойчивости оставался метод Шепарда: сравнение количества микобактерий в подушечках лап мышей до начала и после проведения терапии [17]. Этот метод дорогой, трудоемкий и требует не менее 6–12 месяцев для получения результата. С развитием технологий полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования ДНК были идентифицированы детерминанты антибиотикорезистентности *M. leprae* для рифампицина, дапсона и офлоксацина. Использование таких технологий позволило существенно увеличить чувствительность определения генетических детерминант устойчивости, что, в конечном итоге, позволило получать результаты в течение суток с использованием смешанных образцов ДНК *M. leprae* и пациента. Установлено, что лекарственная устойчивость развивается при возникновении мутаций в участках, определяющих возникновение резистентности (drug resistance-determining region) в определенных геномных локусах: *folP1* для дапсона, *groV* для рифампицина и *gyrA* для офлоксацина [30]. Для клоfazимина аналогичные детерминанты до сих пор не выявлены [31]. На основании анализа наиболее распространенных генетических детерминант устойчивости французскими специалистами разработан тест, сочетающий в себе ПЦР-амплификацию генетического материала *M. leprae* и аллель-специфичную гибридизацию. Тест позволяет выявлять устойчивость лепры к комбинированной лекарственной терапии и рекомендован к применению в случаях рецидива заболевания [32].

Развитие устойчивости микобактерий лепры к антимикробной терапии

На сегодняшний день устойчивость к дапсону является серьезной проблемой в терапии лепры наряду с переносимостью длительной терапии [19, 21, 23]. Мишень воздействия дапсона — дигидроптероатсинтаза, кодируется геном *folP1*. Механизм устойчивости к дапсону обусловлен мутациями в небольшой области этого гена: участке, определяющем возникновение резистентности. Устойчивые к дапсону изоляты *M. leprae* обычно содержат точечные мутации в *folP1*, наличие которых приводит к изменениям аминокислотной последовательности продукта гена в положении кодона 53 (Thr53Ala либо Thr53Ile) или 55 (Pro55Leu). Самая распространенная мутация — это С/Т транзигция (CCC→CTC) в 55 положении кодона, приводящее к замене лейцин→пролин (Leu→Pro), которая снижает эффективность терапии дапсоном [33] (таблица). Также обнаружена замена Val→Ile в 39 аминокислотной пози-

ции дигидроптероатсинтазы, возникающая в результате трансверсии T/A (GTC→GAC) [22].

Разработка и внедрение в терапевтическую практику эффективных АМП рифампицина и фторхинолонов постепенно привело к развитию лекарственной устойчивости лепры не только к дапсону (с 1964 г.), но и к рифампицину (1976), а также к офлоксацину (1996) [19, 29]. Мутации небольшого локуса гена *groB*, кодирующего β-субъединицу РНК-полимеразы (участка, определяющего возникновение резистентности), приводят к развитию устойчивости к рифампицину у нескольких видов микобактерий, включая *M. leprae*. Наиболее часто встречается замена Ser→Leu в положении 456, однако обнаруживаются замены кодонов и в других участках белка: 438 (Gln→Val), 441 (Asp→Tyr (Asn)), 451 (His→Tyr (Asp)), 458 (His→Val (Pro)) [30]. Компенсаторные мутации *groA* и *groC*, кодирующих альфа- и бета-прим субъединицы РНК-полимеразы, обнаруживают у рифампицин-резистентных штаммов *M. tuberculosis*: в резистентных штаммах лепры обнаружена замена Thr→Pro в 187 кодоне гена *groA* и несинонимичные замены отдельных нуклеотидов гена *groC* [5, 34].

Бактерии *M. leprae* могут развить устойчивость к фторхинолонам путем появления мутации, приводящей к замене аминокислот в областях белка ДНК-гиразы, определяющих устойчивость к таким препаратам. В случае устойчивых к офлоксацину штаммов *M. leprae* происходит замена Gly→Cys в положении 89 либо Ala→Val в положении 91 белка *GyrA* (см. таблицу). Кроме того, экспериментально доказано, что аминокислотная замена Asp→Gly в положении 95 белка *GyrA*, которая часто встречается у устойчивых к фторхинолонам штаммов *M. tuberculosis*, также способствует устойчивости у *M. leprae* [5, 7].

Генетические детерминанты резистентности и распространение устойчивых штаммов микобактерий лепры в эндемичных регионах

Одно из первых исследований устойчивости лепры к АМП дапсону, рифампицину и офлоксацину, мониторинг которых рекомендован ВОЗ, проведено в 2001 г. на выборке 88 клинических изолятов *M. leprae*, полученных из биоптатов пациентов с последующим культивированием микобактерий лепры методом Шепарда: из Японии, Гаити, Индонезии, Пакистана и Филиппин [29]. Дизайн исследований такого типа, как правило, включает создание случайной выборки пациентов из разных регионов, получение генетического материала от больных с последующим выявлением устойчивых к лекарственной терапии штаммов лепры и дальнейшим поиском генетических детерминант резистентности в областях генома, которые связаны с развитием резистентности. Среди устойчивых к дапсону штаммов *M. leprae* в гене *folP1* мутации обнаружены у 19 изолятов. В одном из изолятов обнаружили две мутации: в положениях 157 и 164, что соответствовало изменениям в 53 и 55 положении аминокислот в дигидроптероатсинтазе. В девяти изолятах присутствовала мутация A/G в кодоне 157, в трех — C/T мутация в кодоне 158, что соответствует Thr→Ala и Thr→Ile изменениям в 53 аминокислотной позиции белка DHPS соответственно. Восемь изолятов содержали C/T мутации (Pro→Leu) в кодоне 164 (55 аминокислотная позиция белка DHPS). Среди штаммов *M. leprae*, устойчивых к офлоксацину, в гене *gyrA* в пяти изолятах была обнаружена мутация

Ala→Val в положении 91 и в одном изоляте — мутация Gly→Cys в положении 89. Обнаружено 26 устойчивых к рифампицину изолятов *M. leprae*: два с мутацией, приводящей к замене Asp→Asn в положении 441 (используется номенклатура согласно [7]; в работе [29] положение указано по старой системе номенклатуры — 516, далее в скобках приведена номенклатура оригинальной работы), 11 изолятов с мутацией, приводящей к замене His→Tyr в положении 451 (526), и 13 штаммов с мутацией, приводящей к замене Ser→Leu (или Trp) в положении 456 (531). Лишь один из устойчивых к рифампицину изолятов содержал две мутации (Asp→Asn в положении 441 (516) и Leu→Pro в положении 458 (533) (см. таблицу). Важным открытием исследования стало то, что один штамм *M. leprae* часто содержит более двух мутаций, что свидетельствует о множественной лекарственной устойчивости в рассмотренной выборке пациентов, не ответивших на лечение. У одиннадцати изолятов обнаружили мутации, приводящие к устойчивости к двум препаратам (у 9 — дапсон и рифампицин, 1 — дапсон и офлоксацин, 1 — рифампицин и офлоксацин), а два штамма показали мутации во всех трех генах *folP1*, *groB* и *gyrA* (дапсон, рифампицин и офлоксацин) [29].

Исследование резистентности мультибациллярной лепры в глобальном масштабе к рекомендованной ВОЗ антимикробной терапии, проведенное в рамках мониторинга резистентности ВОЗ, опубликовано впервые в 2018 г. [31]. Анализ проводили путем секвенирования участков, определяющих возникновение резистентности, расположенных в генах *M. leprae folP1*, *groB* и *gyrA*. Исследовано 1932 клинических изолята из 19 стран, собранных в период 2009–2015 гг., при этом у 8% (154) штаммов микобактерий лепры найдены мутации, определяющие резистентность к антимикробной терапии (из них у 40% (74) к рифампицину, у 48% (87) к дапсону и у 11,5% (21) к офлоксацину). При этом обнаружено 16 штаммов, устойчивых к двум АМП: рифампицин и дапсон (12) либо офлоксацин и дапсон (4). Авторы отмечают, что 8% порог устойчивых штаммов является низким, но требует продолжения мониторинга устойчивости к АМП [31].

Ученые из Китая проанализировали 290 случаев лепры из четырех эндемичных провинций (Гуйчжоу, Хунань, Сычуань и Юньнань) на наличие мутаций в расширенных участках, определяющих возникновение резистентности в области генов, отвечающих за устойчивость к АМП дапсону, рифампицину и офлоксацину: *folP1*, *groB* и *gyrA* [Chokkakulaetal., 2019]. В работах по исследованию генома устойчивых штаммов лепры помимо мутаций в генах *folP1*, *groB* и *gyrA* сообщалось о компенсаторных мутациях в других участках: *nth* (репарация ДНК), *groA* и *groC* (рифампицин), *gyrB* (офлоксацин) и 23S рРНК (кларитромицин), которые также проанализированы в работе. Среди 290 штаммов *M. leprae* только для 11 выявлено наличие лекарственной устойчивости к АМП, при этом обнаружены мутации в генах *folP1*, *groB* и *gyrA*: 8 штаммов оказались устойчивых к одному препарату (7 к дапсону и 1 к офлоксацину), а 3 штамма — одновременно к двум препаратам (дапсон и офлоксацин, рифампицин и офлоксацин, офлоксацин и кларитромицин). Также в 3 разных штаммах обнаружены мутации в каждом из генов *groC*, *gyrB* и 23S рРНК [34]. Наиболее распространенными оказались мутации Thr→Arg, Thr→Ile в 53 аминокислотной позиции и Pro→Ser, Pro→Arg в 55 кодоне гена *folP1*; Asp→Tyr в 410 кодоне *groB*, Ala→Val в 91 кодоне *gyrA*

(см. таблицу). Обнаружены также новые генетические детерминанты резистентности *M. leprae* к рифампицину Asp→Thr в 698 кодоне *rpoC*; к офлоксацину Gly→Asp в 362 кодоне *gyrA* и Val→Gly в 214 кодоне *gyrB*; к кларитромицину нуклеотидные замены A2142C, A2143C в гене 23S рРНК. Однако авторы считают, что влияние таких мутаций на фенотип *M. leprae* в отношении устойчивости к АМП должно быть исследовано более подробно [34].

Развитие методов секвенирования нового поколения (NGS) позволило осуществить широкомасштабные исследования генетических детерминант резистентности микобактерий лепры к рекомендованным ВОЗ препаратам АМП. В 2018 г. Venjak и соавт. удалось разработать метод, позволяющий проводить полногеномное секвенирование лепры из образцов ДНК, полученных напрямую из биопсии больных лепрой, без предварительного культивирования по методу Шепарда [5]. Проанализировано 154 штамма *M. leprae* (147 от человека, 6 от рыжих белок и 1 от броненосца), полученные из 25 стран. Исследователям удалось полностью расшифровать геном каждого штамма. Показано, что успешное секвенирование генома возможно при прямой обработке биоптата только в случае высокого уровня бактериальной нагрузки (БИН более 3). Однонуклеотидные генетические детерминанты резистентности обнаружены в участках, определяющих возникновение резистентности: в 24 штаммах в гене *folP1*, в 11 штаммах в участке *rpoB* и в двух штаммах в гене *gyrA*. Наиболее распространенные мутации в участках, определяющих возникновение резистентности, приводящие к развитию устойчивости лепры к АМП, представлены в таблице. В резистентных к терапии АМП штаммах *M. leprae* в генах *rpoB*, *gyrA*, *gyrB*, *fadD9*, *ribD*, *ethA*, *pkx4*, *nth* выявлены дополнительные мутации (миссенс-мутации, несинонимичные и синонимичные замены), роль которых в развитии резистентности лепры к АМП в настоящее время еще не определена окончательно [5].

Филогенетический анализ изученных геномов выявил восемь штаммов с наибольшим количеством мутаций, компьютерный анализ которых обнаружил их общую уникальную особенность, а именно мутации в гене эндонуклеазы III *nth* (ML2301), приводящие к образованию стоп-кодона или сдвигу рамки считывания [5]. Эндонуклеаза III представляет собой центральный фермент системы репарации ДНК, дополненный ферментом семейства эндонуклеаз VIII, у микобактерий. Однако редуцированный геном лепры не имеет гена *fpg/nei* эндонуклеазы VIII, и стабильность генома определяется только геном *nth*. По мнению авторов, вредоносные

стентности обнаружены в участках, определяющих возникновение резистентности: в 24 штаммах в гене *folP1*, в 11 штаммах в участке *rpoB* и в двух штаммах в гене *gyrA*. Наиболее распространенные мутации в участках, определяющих возникновение резистентности, приводящие к развитию устойчивости лепры к АМП, представлены в таблице. В резистентных к терапии АМП штаммах *M. leprae* в генах *rpoB*, *gyrA*, *gyrB*, *fadD9*, *ribD*, *ethA*, *pkx4*, *nth* выявлены дополнительные мутации (миссенс-мутации, несинонимичные и синонимичные замены), роль которых в развитии резистентности лепры к АМП в настоящее время еще не определена окончательно [5].

Таблица. Наиболее распространенные генетические детерминанты развития устойчивости *M. leprae* к антимикробным препаратам
Table. The most common genetic antibiotic resistance determinants of *Mycobacterium leprae*

Препарат антимикробной терапии	Мишень препарата	Изменение аминокислотной последовательности продукта гена	Нуклеотидные замены, приводящие к замене кодона	Литература
Дапсон	Дигидроптеорат- синтетаза (кодируется геном <i>folP1</i>)	DHPS T531 (A) P55R (L) V39I	ACC→AUC (GCC) CCC→CGC (CTC) GTC→GAC	[5, 31, 34]
Рифампицин	РНК-полимераза (кодируется генами <i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i>)	RpoB D410Y Q438V D441Y (N) H451Y (D) S456L (M, F, W) H458V (P) RpoC D698T	GAT→TAT CAG→GTG GAT→TAT (AAT) CAC→GAC (TAC) TCG→TTG (ATG, TTC, TGG) CTG→GTG (CCG) AAC→ACC	[5, 31, 34]
Фторхинолоны (офлоксацин)	ДНК-гираза (кодируется генами <i>GyrA</i> и <i>GyrB</i>)	GyrA G89C (A) A91V (P, T) S92A D95G (N) L97P G362D GyrB V214G D464N (A) N502D (K, T) T503I (P, N)	GGC→TGC (GCC) GCA→GTA (CCA, ACA) TCG→GCG GAT→GGT (AAT) CTG→CCG GGA→GAT GTG→GGG GAT→AAT, GCT AAT→GAT (AAG, ACT) ACA→ATA (CCA, AAT)	[5, 7, 31, 34]
Кларитромицин	Субъединица 23 рибосомной РНК (кодируется геном <i>23SrRNA</i>) Рибосом-метилаза (плазмидный ген <i>erm</i>)		A2142C A2143C	[26, 34]

Жирным выделены самые распространенные мутации, возникающие в продукте генов при наличии генетических детерминант резистентности лепры к антимикробным препаратам.

The most frequent amino acid changes in translated proteins appear due to genetic antibiotic resistance determinants are in bold.

мутации в гене *nth* приводят к увеличению изменчивости генома *M. leprae* [5], что способствует появлению генетических детерминант резистентности к АМП.

Анализ устойчивых к офлоксацину штаммов лепры, проведенный французскими учеными, выявил несоответствие номенклатуры мутаций, приведенной в различных исследованиях. В связи с этим авторы провели не только поиск возможных генетических детерминант резистентности лепры к офлоксацину в генах *gyrA* и *gyrB*, но и выравнивание позиций определения мутаций в геноме лепры. Оказалось, что из 25 исследований, включающих 2884 изолята *M. leprae*, 3,8% (110) содержат мутации гена *gyrA*, подавляющее большинство которых относится к 91 кодону (68%); и лишь у 0,8% изолятов найдены мутации гена *gyrB* [7].

Обсуждение

Большинство авторов работ по анализу генома лепры обращают внимание на важность мониторинга резистентности лепры к АМП, связанную с высоким уровнем выявляемой в эндемичных странах резистентности к АМП, который приближается к критическому. Стоит отметить, что с учетом вероятности возникновения непереносимости терапии как дополнительного фактора резистентности лепры к АМП итоговый уровень резистентности должен быть дополнительно увеличен. Анализируя представленные в источниках данные (см. таблицу), можно сделать вывод о возникновении резистентности в основном в результате точковых мутаций, поиск которых в настоящее время осуществляется по рекомендации ВОЗ методом прямого секвенирования участков, определяющих возникновение резистентности либо при полногеномном анализе (NGS) штаммов. Наблюдается тенденция расширения перечня таких мутаций, поскольку уже сейчас при анализе штаммов лепры, устойчивых к антимикробным препаратам, показано возникновение ряда синонимичных мутаций, в том числе приводящих к развитию устойчивости у микобактерий туберкулеза, роль которых в возникновении резистентности штаммов микобактерий лепры активно изучается в настоящее время. Накапливаются данные о новых механиз-

мах возникновения лекарственной устойчивости: так, показано, что инактивация продукта гена *nth* в случае мутаций приводит к нестабильности генома с последующим увеличением способностей *M. leprae* к адаптации под влиянием АМП [5].

Одним из подходов мониторинга возникновения устойчивости лепры к АМП может стать использование систем выявления наиболее распространенных в эндемичных странах мутаций. При этом для анализа можно использовать не только аллель-специфичную гибридизацию, но и другие методы современной молекулярной диагностики, например метод минисеквенирования или масс-спектрометрической идентификации SNP, что позволит в случае необходимости расширить систему мониторинга генетических детерминант включением в нее дополнительных однонуклеотидных маркеров, которые могут быть выявлены в качестве детерминант антибиотикорезистентности лепры в будущем. Стоит подчеркнуть, что такие методы обладают достаточной чувствительностью и специфичностью для прямой идентификации мутаций в образце ДНК, выделенной из биоптата кожи пациента, без дополнительного культивирования лепры в лапках мышей или броненосцев и без применения сложных процедур подготовки библиотек полногеномного секвенирования. Использование систем быстрой идентификации устойчивых к терапии АМП штаммов позволит избежать развития тяжелых последствий заболевания.

Заключение

Анализ работ, посвященных возникновению лекарственной устойчивости *M. leprae* к антимикробным препаратам дапсон, рифампицин, офлоксацин и кларитромицин, показывает наиболее распространенные в эндемичных странах мутации генома лепры, приводящие к возникновению устойчивости, и уровень распространенности устойчивых к терапии штаммов. Наблюдаемый в эндемичных странах рост уровня устойчивых к лекарственной терапии штаммов *M. leprae* определяет необходимость анализа генетических детерминант резистентности у всех пациентов, выявляемых на территории Российской Федерации. ■

Литература/References

1. World Health Organization. Towards zero leprosy. Global leprosy (Hansen's Disease) strategy 2021–2030. 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789290228509> (Accessed at 25 Oct 2021).
2. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам. [Global'naya strategiya VOZ po sderzhivaniyu ustojchivosti k protivomikrobnym preparatam. (In Russ.)] https://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_Russian.pdf. (Accessed at 25 Oct 2021).
3. Bottery MJ, Pitchford JW, Friman VP. Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. ISME J. 2021;15(4):939–948. doi: 10.1038/s41396-020-00832-7
4. Peterson E, Kaur P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. Front Microbiol. 2018;9:2928. doi: 10.3389/fmicb.2018.02928
5. Benjak A, Avanzi C, Singh P, Loiseau C, Girma S, Busso P, Fontes ANB, et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. Nat Commun. 2018;9(1):352. doi: 10.1038/s41467-017-02576-z
6. Lavania M, Darlong J, Singh I, Ahuja M, Turankar RP, Pathak VK, et al. Analysis of bacteriological Index between fixed multidrug therapy and new WHO recommended alternative regimen with ofloxacin, minocycline and clofazimine of rifampicin resistant cases from the hospitals of The Leprosy Mission, India. J Glob Antimicrob Resist. 2020;23:275–277. doi: 10.1016/j.jgar.2020.09.021
7. Chauffour A, Morel F, Reibel F, Petrella S, Mayer C, Cambau E, et al. A systematic review of *Mycobacterium leprae* DNA gyrase mutations and their impact on fluoroquinolone resistance. Clin Microbiol Infect. 2021 Nov;27(11):1601–1612. doi: 10.1016/j.cmi.2021.07.007

8. M. Fischer. Leprosy – an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2017;15(8):801–827. doi: 10.1111/ddg.13301
9. Образцова О.А., Вербенко Д.А., Карамова А.Э., Семенова В.Г., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г. Совершенствование ПЦР-диагностики лепры путем амплификации видоспецифичного повторяющегося фрагмента генома *Mycobacterium leprae*. Клиническая лабораторная диагностика, 2018;63(8):511–516. [Образцова ОА, Verbenko DA, Karamova AE, Semenovna VG, Kubanov AA, Deryabin DG. Sovershenstvovanie PCR-diagnostiki lepry putem amplifikatsii vidospecifichnogo povtoryayushchegosya fragmenta genoma *Mycobacterium leprae*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, 2018;63(8):511–516 (In Russ.)] doi: 10.18821/0869-2084-2018-63-8-511-516
10. Кубанов А.А., Карамова А.Э., Семенова В.Г., Смольяникова В.А., Неведова М.А. Рецидив лепры, развившийся после прекращения противолепрозной терапии. Вестник дерматологии и венерологии, 2016;6:66–72. [Kubanov AA, Karamova AE, Semenova VG, Smol'yannikova VA, Nefedova MA. Recidiv lepry, razvivshijysya posle prekrashcheniya protivoleproznoj terapii. *Vestnik dermatologii i venerologii*, 2016;6:66–72 (In Russ.)] doi: 10.25208/0042-4609-2016-0-6-3-18
11. Семенова В.Г., Карамова А.Э., Неведова М.А. Лепра под «маской» туберкулеза кожи — трудности диагностики. Вестник дерматологии и венерологии, 2017;(6):91–99. [Semyonova VG, Karamova AE, Nefyodova MA. Leprosy in the Guise of Skin Tuberculosis — Complexities of Diagnostics. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. 2017;(6):91–99 (In Russ.)]
12. Shepard CC. Growth characteristics of *Mycobacterium leprae*. *Acta Leprol.* 1984;2(2-4):277–9.
13. Maymone MBC, Venkatesh S, Laughter M, Abdat R, Hugh J, Dacso MM, et al. Leprosy: Treatment and management of complications. *J Am Acad Dermatol.* 2020;83(1):17–30. doi: 10.1016/j.jaad.2019.10.138
14. Fonseca AB, Simon MD, Cazzaniga RA, de Moura TR, de Almeida RP, Duthie MS, et al. The influence of innate and adaptive immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. *Infect Dis Poverty.* 2017;6(1):5. doi: 10.1186/s40249-016-0229-3.
15. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966;34(3):255–273.
16. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001;22;409(6823):1007–1011.
17. Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *J Exp Med.* 1960;112(3):445–454. doi: 10.1084/jem.112.3.445
18. Tortoli E, Fedrizzi T, Meehan CJ, Trovato A, Grottole A, Giacobazzi E, et al. The new phylogeny of the genus *Mycobacterium*: The old and the news. *Infect Genet Evol.* 2017 Dec;56:19–25. doi: 10.1016/j.meegid.2017.10.013
19. George J. Metabolism and interactions of antileprosy drugs. *Biochem Pharmacol.* 2020;177:113993. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113993
20. Bennett BH, Parker DL, Robson M. Leprosy: steps along the journey of eradication. *Public Health Rep.* 2008;123(2):198–205. doi: 10.1177/003335490812300212.
21. Ghaoui N, Hanna E, Abbas O, Kibbi AG, Kurban M. Update on the use of dapsone in dermatology. *Int J Dermatol.* 2020;59(7):787–795. doi: 10.1111/ijd.14761
22. Maladan Y, Krismawati H, Hutapea HML, Oktavian A, Fatimah R, Widodo. A new *Mycobacterium leprae* dihydropteroate synthase variant (V39I) from Papua, Indonesia. *Heliyon.* 2019;5(3):e01279. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01279
23. Swain SS, Paidesetty SK, Dehury B, Das M, Vedithi SC, Padhy RN. Computer-aided synthesis of dapsone-phytochemical conjugates against dapsone-resistant *Mycobacterium leprae*. *Sci Rep.* 2020;10(1):6839. doi: 10.1038/s41598-020-63913-9
24. Holdiness MR. Clinical pharmacokinetics of clofazimine: a review. *Clin. Pharmacokinet.* 1989;19:74–85.
25. Можокина Г.Н., Самойлова А.Г. Клофазимин: история и перспективы. Туберкулез и болезни легких. 2021;99(5):64–70 [Mozhokina GN, Samoylova AG. Clofazimine: history and perspectives. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2021;99(5):64–70 (In Russ.)]
26. Кубанов А.А., Карамова А.Э., Воронцова А.А., Калинина П.А. Фармакотерапия лепры. Вестник дерматологии и венерологии 2016;92(4):12–19. [Kubanov AA, Karamova AE, Voroncova AA, Kalinina PA. Farmakoterapiya lepry. *Vestnik dermatologii i venerologii* 2016;92(4):12–19 (In Russ.)] doi: 10.25208/0042-4609-2016-92-4-12-19
27. The National Hansen's Disease (Leprosy) Program. [https://www.hrsa.gov/hansens-disease/index.html#:~:text=The%20National%20Hansen's%20Disease%20Program,and%20makes%20referrals%20for%20treatment.\(Accessed at 25 Oct 2021\).](https://www.hrsa.gov/hansens-disease/index.html#:~:text=The%20National%20Hansen's%20Disease%20Program,and%20makes%20referrals%20for%20treatment.(Accessed%20at%2025%20Oct%202021).)
28. Lazo-Porras M, Prutsky GJ, Barrionuevo P, Tapia JC, Ugartegi C, Ponce OJ, et al. World Health Organization (WHO) antibiotic regimen against other regimens for the treatment of leprosy: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):62. doi: 10.1186/s12879-019-4665-0
29. Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, Kai M, Maeda Y, Hashimoto K, et al. Resistant *Mycobacterium leprae* from Patients with Leprosy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(12):3635–3639. doi: 10.1128/AAC.45.12.3635-3639.2001
30. A guide for surveillance of antimicrobial resistance in leprosy: 2017 update. New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia; 2017.
31. Cambau E, Saunderson P, Matsuoka M, Cole ST, Kay M, Suffys P, et al. Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009–15. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(12):1305–1310. doi: 10.1016/j.cmi.2018.02.022
32. Cambau E, Chauffour-Nevejans A, Tejmar-Kolar L, Matsuoka M, Jarlier V. Detection of antibiotic resistance in leprosy using GenoType *LepraeDR*, a novel ready-to-use molecular test. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(7):e1739. doi: 10.1371/journal.pntd.0001739
33. Williams DL, Araujo S, Stryjewska BM, Scollard D. Dapsone Resistance in Leprosy Patients Originally from American Samoa, United States, 2010–2012. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(8):1584–1585. doi: 10.3201/eid2408.180033
34. Chokkakula S, Chen Z, Wang L, Jiang H, Chen Y, Shi Y, et al. Molecular surveillance of antimicrobial resistance and transmission pattern of *Mycobacterium leprae* in Chinese leprosy patients. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):1479–1489. doi: 10.1080/22221751.2019.1677177

УЧАСТИЕ АВТОРОВ: анализ и подбор литературных материалов, подготовка текста рукописи, корректировка согласно комментариям рецензентов — Д.А. Вербенко; редактирование рукописи — В.С. Соломка; поиск литературы в базах данных, подготовка черновика рукописи — И.В. Козлова; общее руководство подготовкой обзора, окончательное редактирование — А.А. Кубанов.

Authors' participation: study design: the searching, the choice and analysis of literature sources, manuscript text drafting and finishing, the reviewer comments explanation and manuscript correction — Dmitry A. Verbenko; editing — Victoria S. Solomka; search for literature sources in databases, preparation of manuscript draft — Irina V. Kozlova; general guidance on preparing the manuscript, final editing — Alexey A. Kubanov.

Информация об авторах

***Вербенко Дмитрий Анатольевич** — к.б.н.; адрес: Россия, 107076, г. Москва, улица Короленко, д. 3, стр. 6; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-1104-7694>; eLibrary SPIN: 8261-6561; e-mail: verbenko@gmail.com

Соломка Виктория Сергеевна — д.б.н.; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6841-8599>, eLibrary SPIN: 1486-3284; e-mail: solomka@cnikvi.ru

Козлова Ирина Вячеславовна — ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6328-363X>, eLibrary SPIN: 3574-4048; email: ikozlova_work@inbox.ru

Кубанов Алексей Алексеевич — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-7625-0503>; eLibrary SPIN: 8771-4990; e-mail: alex@cnikvi.ru

Information about the authors

***Dmitry A. Verbenko** — Cand. Sci. (Biol.); 3 bldg 6 Korolenko street, 107076, Moscow, Russia; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-1104-7694>; eLibrary SPIN: 8261-6561; e-mail: verbenko@gmail.com

Victoria S. Solomka — Dr. Sci. (Biol.); ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6841-8599>, eLibrary SPIN: 1486-3284; e-mail: solomka@cnikvi.ru

Irina V. Kozlova — ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6328-363X>, eLibrary SPIN: 3574-4048; e-mail: ikozlova_work@inbox.ru

Alexey A. Kubanov — MD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-7625-0503>; eLibrary SPIN: 8771-4990; e-mail: alex@cnikvi.ru

Статья поступила в редакцию: 12.11.2021

Принята к публикации: 25.11.2021

Дата публикации: 15.12.2021

Submitted: 12.11.2021

Accepted: 25.11.2021

Published: 15.12.2021