

УДК 616-002.5-085.281.873.21.015.8

Лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам в Новосибирской области: результаты популяционного исследования

Я.Р. Батыршина, Т.И. Петренко, П.Н. Филимонов

ФГБУ «Новосибирский НИИ туберкулеза» Минздрава России, Новосибирск, Россия

Цель. Изучение уровня и динамики распространения первичной лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам в Новосибирской области и определение вклада фторхинолонов в селекцию резистентности в популяции микобактерий туберкулеза.

Материалы и методы. Исследована чувствительность к фторхинолонам 344 клинических изолятов *M. tuberculosis* (МБТ), выделенных от больных с впервые диагностированным туберкулезом в периоды 2000–2002 и 2006–2010 гг. В исследование включены: 141 изолят, чувствительный к противотуберкулезным препаратам I ряда, 83 изолята с резистентностью к изониазиду и рифампицину (*множественная лекарственная устойчивость* – МЛУ) и 120 изолятов с моно- и полирезистентностью без МЛУ. *Минимальные подавляющие концентрации* (МПК) офлоксацина определяли методом разведений в жидкой питательной среде. Изоляты с фенотипической устойчивостью тестировали на наличие мутаций в *gyrA* гене.

Результаты. Повышение МПК офлоксацина (до 16,0–32,0 мкг/мл) обнаружено только в

группе изолятов с МЛУ и только среди изолятов МБТ, выделенных в 2006–2010 гг., доли устойчивых к фторхинолонам изолятов МБТ составили 7,2% (95%ДИ: 3,4–14,9%) и 3,4% (95%ДИ: 1,5–7,1%) соответственно. У всех 6 изолятов с выявленной фенотипической устойчивостью к офлоксацину (МПК>4,0 мкг/мл) обнаружены мутации в QRDR области *gyrA* гена, ассоциированные с резистентностью к фторхинолонам. Доля первичной резистентности МБТ к фторхинолонам в Новосибирской области составила 6,4% (95%ДИ: 2,9–13,2%).

Выводы. Полученные данные позволяют утверждать, что формирование фторхинолонорезистентности в популяции *M. tuberculosis* происходит в большей степени в результате использования этих препаратов в химиотерапии туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя, чем в результате применения их при лечении других инфекций, представляя угрозу долгосрочной клинической эффективности.

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, антибиотикорезистентность, фторхинолоны.

Fluoroquinolone Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Novosibirsk Region: Results of Population-Based Study

Ya.R. Batirshina, T.I. Petrenko, P.N. Filimonov

Novosibirsk Research Institute of Tuberculosis, Novosibirsk, Russia

Objectives. To study incidence and changes of fluoroquinolone resistance among *Mycobacterium tuberculosis* in Novosibirsk region, and to determine fluoroquinolone contribution to drug resistance selection in *M. tuberculosis* population.

Materials and Methods. A total of 344 clinical isolates of *M. tuberculosis* obtained from patients with newly diagnosed tuberculosis during the periods of 2000–2002 and 2006–2010 were tested for susceptibility to fluoroquinolones. This study included 141 isolates susceptible to first-line drugs and 83 isolates resistant to isoniazid and rifampicin (*multi-drug resistance* [MDR]), and 120 isolates resistant to one or more anti-TB drugs, but without MDR. *Minimal inhibitory concentrations* (MICs) for ofloxacin were determined using broth dilution method. Isolates demonstrating phenotypic resistance were tested for *gyrA* gene mutations.

Results. Increased MICs of ofloxacin (16–32 mg/L) were observed only in MDR isolates and isolates obtained

during the 2006–2010; proportion of fluoroquinolone-resistant isolates were 7.2% (95% CI: 3.4%, 14.9%) and 3.4% (95% CI: 1.5%, 7.1%), respectively. All 6 isolates showing phenotypic resistance to ofloxacin (MIC >4.0 mg/L) had mutations in QRDR region of *gyrA* gene conferring fluoroquinolone resistance. Proportion of *M. tuberculosis* strains showing primary fluoroquinolone resistance in Novosibirsk region was 6.4% (95% CI 2.9%, 13.2%).

Conclusions. Results from this study suggest that emergence of fluoroquinolones resistance in *M. tuberculosis* population is due to the use of fluoroquinolones in the treatment of tuberculosis caused by MDR strains, rather than their use in the treatment of non-mycobacterial infections, which is a threat to long-term clinical efficacy of this antimicrobial class.

Key words: *M. tuberculosis*, antimicrobial resistance, fluoroquinolones.

Введение

По данным ВОЗ, Российская Федерация занимает третье место в списке стран с наибольшим числом больных туберкулезом с МЛУ МБТ (38000, ДИ 30000–45000). Частота МЛУ оценивается в 15,8% среди новых случаев туберкулеза и в 42,4% – для случаев повторного лечения [1, 2]. В Новосибирской области доля МЛУ среди впервые выявленных больных туберкулезом еще выше – 25,5% (2010 г.), а распространенность МЛУ МБТ на 100 тыс. населения составляет 57,4, что в 2,8 раза превышает аналогичный показатель по РФ и в 1,5 раза – по Сибирскому федеральному округу (СФО) [3].

Лечение больных туберкулезом с МЛУ возбудителя требует длительного применения противотуберкулезных препаратов второго ряда, среди которых наибольший потенциал имеют фторхинолоны благодаря своей высокой антимикобактериальной активности и относительно низкой токсичности [4, 5]. Вместе с тем, нарастающая резистентность *M. tuberculosis* к этим препаратам может представлять угрозу их долгосрочной клинической эффективности [6, 7], во многом из-за широкого использования в стационарах и амбулаторной практике, а также фактически безрецептурной продажи [8, 9].

В Новосибирской области фторхинолоны стали широко использоваться при стандартной полихимиотерапии МЛУ МБТ с 2003 года. В настоящее время нет данных о распространенности лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* к этим препаратам на территории региона. Кроме того, остается неуточненным вопрос о влиянии широкого использования фторхинолонов в клинике инфекционных заболеваний на формирование устойчивости к ним в популяции микобактерий туберкулеза.

По мнению некоторых авторов, высокий уровень первичной устойчивости МБТ к фторхинолонам может наблюдаться на тех территориях, где они интенсивно применяются [10]. В ряде проведенных ранее исследований показана возможность формирования резистентности *M. tuberculosis* к фторхинолонам у пациентов с впервые диагностированным туберкулезом, получавших курсы антибактериальной терапии фторхинолонами по поводу другой инфекционной патологии в период, предшествовавший заболеванию туберкулезом [11–13].

Эти аспекты рассматриваются в исследовании, проведенном нами с использованием популяционного подхода, результаты которого представлены в данной статье. В качестве нулевой гипотезы принимается положение о том, что нет взаимосвязи между широким использованием фторхинолонов

при нетуберкулезной инфекционной патологии и формированием резистентной к ним прослойки популяции микобактерий туберкулеза.

Материалы и методы

Дизайн исследования. Проведено популяционное ретроспективно-проспективное микробиологическое исследование, целью которого было изучение частоты и динамики распространения первичной устойчивости *M. tuberculosis* к фторхинолонам на территории Новосибирской области, а также выявление закономерностей и особенностей формирования фторхинолонорезистентности в популяции микобактерий туберкулеза. Исследована активность офлоксацина *in vitro* в отношении 344 клинических изолятов *M. tuberculosis*, выделенных от больных с впервые диагностированным туберкулезом в 2000–2002 и 2006–2010 гг.

Характеристика пациентов. В исследование было включено 344 пациента всех возрастных групп, жителей города Новосибирска и Новосибирской области с впервые установленным диагнозом туберкулеза органов дыхания и туберкулезом других органов и систем с бактериовыделением, подтвержденным культуральным методом.

Микобактериальные изоляты. На чувствительность к офлоксацину методом разведений в жидкой питательной среде исследовали изоляты *M. tuberculosis*, выделенные из клинических образцов, полученных от каждого пациента, включенного в выборку. Культуры МБТ периода 2000–2002 гг. ($n=165$) были получены из хранящейся в Новосибирском НИИ туберкулеза коллекции микобактериальных изолятов, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом в соответствующий временной период. Отбор изолятов для настоящего исследования осуществляли случайной выборкой. Изоляты МБТ периода 2006–2010 гг. ($n=179$) были протестированы проспективно. Далее все исследованные изоляты подразделили на 3 группы в соответствии с профилем чувствительности к противотуберкулезным препаратам первого ряда (стрептомицин, изониазид, рифампицин, этамбутол). В первую группу включили 141 (40,9%) изолят МБТ, чувствительных ко всем препаратам первого ряда, во вторую группу – 83 (24,1%) изолята с множественной лекарственной устойчивостью (как минимум к изониазиду и рифампицину) и 120 (34,9%) изолятов МБТ с различными профилями моно- и полирезистентности без МЛУ. У изолятов МБТ с выявленной фенотипической устойчивостью к офлоксацину (МПК > 4 мкг/мл) определяли мутации в *gyrA* гене, ассоциированные с резистентностью к фторхинолонам.

Антибактериальные препараты. Чистые субстанции офлоксацина (Sigma-Aldrich Co.LLC., St.Louis, США) использовали для определения МПК, чистые субстанции стрептомицина, изониазида, рифампицина, этамбутола (Sigma-Aldrich Co.LLC., St.Louis, США) использовали для определения чувствительности *M. tuberculosis* методом абсолютных концентраций.

Выделение, идентификация, определение лекарственной чувствительности *M. tuberculosis*. Для выделения *M. tuberculosis* проводили посев биологического материала на плотные питательные среды Левенштейна–Йенсена, Финн-2 и жидкие питательные среды Middlbrook 7H9 с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960 (Becton Dickinson and Company, США). Предпосевную обработку материала, процедуру инокуляции, инкубацию, детекцию роста и идентификацию микобактерий осуществляли в соответствии с Приложением 11 к Приказу МЗ РФ №109 от 21.03.2003 и инструкциями производителя.

Определение чувствительности *M. tuberculosis* к стрептомицину, изониазиду, рифампицину и этамбутолу проводили методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна–Йенсена, содержащей 10,0, 1,0, 40,0 и 2,0 мкг/мл антибиотиков соответственно с использованием стандартных методик. Определение чувствительности культур МБТ, выделенных на жидких питательных средах в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960 осуществляли соответственно протоколу, разработанному для данной системы. Использовали следующие концентрации: стрептомицина – 1,0 мкг/мл, изониазида – 0,1 мкг/мл, рифампицина – 1,0 мкг/мл, этамбутола – 5,0 мкг/мл.

Культуры *M. tuberculosis* периода 2000–2002 гг. непосредственно после их выделения, идентификации и тестирования чувствительности собирали для хранения во внутрилабораторном банке микобактериальных изолятов. Каждый изолят был паспортизирован с регистрацией идентификационного лабораторного номера, даты и места выделения, типа клинического материала, культуральных характеристик, данных о чувствительности. Регистрируемые персональные и демографические данные пациентов включали пол, возраст, район проживания, клинический диагноз, анамнестические сведения о длительности приема противотуберкулезных препаратов, о неспецифической антибактериальной терапии и о наличии контакта с больным туберкулезом. Хранение изолятов осуществляли при температуре -70°C в микропробирках с жидкой питательной средой Middlbrook 7H9

(Sigma-Aldrich Co.LLC., St.Louis, США), в которую помещали выросшие на плотных питательных средах колонии *M. tuberculosis*. Перед выполнением теста на чувствительность к офлоксацину коллекционные культуры были разморожены и субкультивированы на среде Левенштейна–Йенсена в течение 4–5 недель или на среде Middlbrook 7H9 в течение 10–14 дней до достижения стационарной фазы роста.

Определение МПК офлоксацина

Препарат. Для приготовления стокового раствора офлоксацина 64 мг чистой субстанции препарата растворяли в 2,0 мл 0,1н. NaOH, затем раствор разбавляли стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:4 до получения концентрации офлоксацина 6400 мкг/мл. Аликвоты стокового раствора в объеме 1 мл хранили при температуре –70 °С не более 6 месяцев до использования.

Подготовка инокулюма. Колонии *M. tuberculosis*, выделенные на плотных питательных средах, переносили в пробирку со стерильным 0,9% раствором NaCl и встряхивали на шейкере Vortex в течение 2–3 мин. Полученную суспензию отстаивали 10 мин. для осаждения крупных конгломератов микобактериальных клеток, затем надосадочную жидкость переносили в пустую пробирку. Мутность суспензии выравнивали до соответствия стандарту мутности по МакФарланду № 0,5. Инокулюм из бульонных культур стандартизовали аналогичным способом.

Метод разведений. Основу жидкой питательной среды Middlbrook 7H9 готовили в соответствии с инструкциями производителя. Состав среды для непосредственного использования был модифицирован путем замены обогащающей добавки Middlbrook OADC Growth Supplement на лошадиную сыворотку или сыворотку крупного рогатого скота с целью стимуляции роста *M. tuberculosis* и удешевления методики. Вышеуказанные препараты добавляли в соотношении 1:10 непосредственно перед постановкой теста. Стоковый раствор офлоксацина разбавляли и добавляли в готовую среду так, чтобы его концентрация составила 64 мкг/мл. Далее готовили ряды последовательных двукратных разведений. Итоговые концентрации офлоксацина составляли от 0,03 мкг/мл до 64 мкг/мл. Пробирки со средой, содержащей препарат, и контрольную пробирку со средой без препарата засеивали подготовленной суспензией микобактериальных клеток в соотношении 0,1 мл суспензии/1,9 мл питательной среды, так что, конечная засеиваемая доза составила $\sim 1,5 \times 10^7$ микробных клеток на 1 мл. Инкубацию проводили при температуре 37 °С в течение 14 дней. Наличие роста микобактерий

определяли по хлопьевидному помутнению среды при визуальной оценке. За *минимальную подавляющую концентрацию* (МПК) офлоксацина принимали наименьшую концентрацию препарата в пробирке с отсутствием роста микобактерий.

Определение мутаций. Определение мутаций, ассоциированных с резистентностью к фторхинолонам, проводили методом гибридизации с флуоресцентным изображением на биологическом микрочипе с использованием набора реагентов «ТБ-БИОЧИП-2» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва). Метод имеет государственную регистрацию в Федеральной службе РФ по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (ФС № 0101 2006/3527-06 от 08.08.06). Тест-система позволяет определять 9 типов мутаций QRDR-области (quinolone resistance determining region) *gyrA* гена *M. tuberculosis*, содержащей пять полиморфных кодонов – позиции 88, 90, 91, 94 и 95.

Экстракция ДНК. 5,0–10,0 мг биомассы колоний *M. tuberculosis*, выделенных на плотных питательных средах, суспензировали в 1,0 мл стерильного 0,9% раствора NaCl в микропробирках объемом 1,5 мл. Пробирки центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли, оставляя ~ 100 мкл (осадок+жидкая фракция) для последующей экстракции ДНК. Выделение ДНК проводили с использованием комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот «ПРОБА-НК» (ДНК-технология, Москва) согласно прилагаемому протоколу.

ПЦР и гибридизация. Гибридизации на биочипах предшествовала двухстадийная мультиплексная ПЦР для получения преимущественно одноцепочечных флуоресцентно-меченных фрагментов с использованием праймеров, специфичных к участкам гена *gyrA* и IS6110. Подготовку реакционных смесей, амплификацию на обоих этапах ПЦР и процедуру гибридизации проводили в соответствии с протоколами к набору «ТБ-БИОЧИП-2». Учет результатов гибридизации осуществляли с помощью универсального аппаратно-програмного комплекса для анализа биочипов (УАПК, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН) с соответствующим программным обеспечением ImaGeWare ver. 2.38.29.5.2.

Методы статистического анализа. Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения SPSS для Windows версия 15.0.0 и STATISTICA 7.0. При оценке данных о резистентности МБТ к офлоксацину использовали описательную статистику: количество наблюдений, частота, доля (в %),

Таблица 1. Демографические и клинические характеристики пациентов

Показатель	n (%)
Пол:	
мужчины	239 (69,5)
женщины	105 (30,5)
Возраст, лет:	
0–14	9 (2,6)
15–29	156 (45,3)
30–44	108 (31,4)
45–59	59 (17,2)
60–74	10 (2,9)
≥75	2 (0,6)
Место жительства:	
город Новосибирск	224 (65,1)
Новосибирская область	120 (34,9)
Клинический диагноз:	
очаговый ТЛ	9 (2,6)
инфильтративный ТЛ	266 (77,3)
диссеминированный ТЛ	48 (14,0)
казеозная пневмония	6 (1,7)
фиброзно-кавернозный ТЛ	3 (0,9)
туберкулезный плеврит	2 (0,6)
первичный туберкулезный комплекс	1 (0,3)
туберкулез мочеполовых органов	4 (1,2)
Лечение фторхинолонами до диагноза ТБ:	
не лечились	177 (51,5)
лечились	6 (1,7)
нет данных	161 (46,8)
Чувствительность МБТ:	
чувствительные к ПТП 1-го ряда	141 (41,0)
МЛУ	83 (24,1)
моно- и полирезистентность без МЛУ	120 (34,9)

95% доверительный интервал. Меру связи между признаками оценивали путем расчета отношения шансов по методу Рето. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Основные демографические, клинические и микробиологические характеристики пациентов представлены в табл. 1. Средний возраст пациентов составил $32,9 \pm 12,8$ года с диапазоном от 5 месяцев до 77 лет.

Прием фторхинолонов в период, непосредственно предшествовавший диагностике туберку-

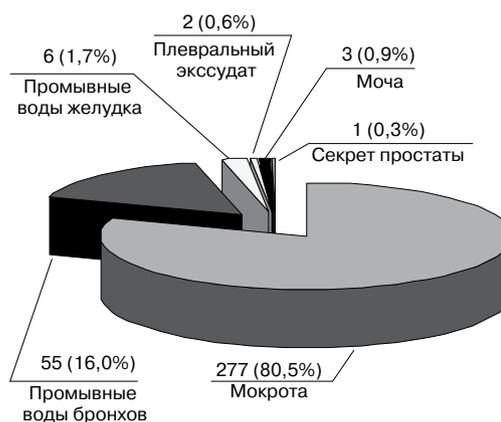


Рис. 1. Клинический материал, из которого были выделены *M. tuberculosis*.

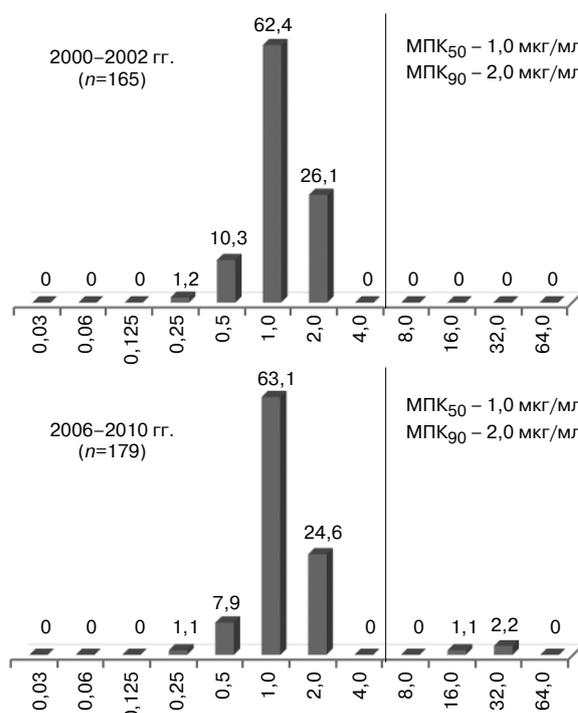


Рис. 2. Распределение МПК офлоксацина в отношении *M. tuberculosis*, выделенных в 2000–2002 и 2006–2010 гг. (в %).

леза, документально зарегистрирован у 6 пациентов (2,9% от числа пациентов, по которым информация известна). Сроки лечения составили от 5 до 10 дней. МБТ, выделенные от этих пациентов, были чувствительны к офлоксацину.

Структура клинического материала, из которого выделены *M. tuberculosis*, продемонстрирована на рис. 1.

Чувствительность к офлоксацину. Распределение полученных значений МПК офлоксацина в периоды 2000–2002 гг. и 2006–2010 гг. и по группам

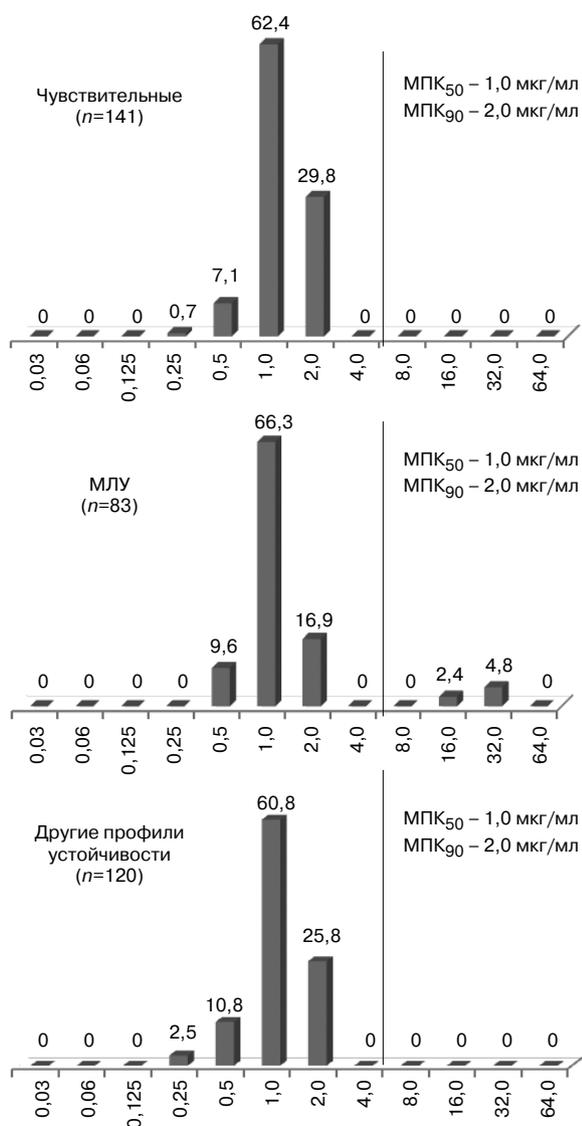


Рис. 3. Распределение МПК офлоксацина в зависимости от профиля резистентности *M. tuberculosis*.

соответственно профилю лекарственной чувствительности к ПТП 1-го ряда представлены на рис. 2. и 3.

Из 344 протестированных изолятов МБТ устойчивость к офлоксацину (МПК >4,0 мкг/мл) обнаружена у 6, один из которых был выделен в 2008 г., 3 – в 2009 г. и 2 – в 2010 г. Все изоляты с выявленной устойчивостью к офлоксацину принадлежали группе изолятов с МЛУ. Ни один из шести пациентов с обнаруженной фторхинолоно-резистентностью МБТ в период, непосредственно предшествовавший диагностике туберкулеза, фторхинолоны не принимал. Один из пациентов получил курс терапии левофлоксацином в комбинации с β-лактамами по поводу внебольничной пневмонии за 8 месяцев до выявления туберкулеза. У 3 из 6 пациентов в анамнезе имелся семейный контакт с больным *туберкулезом органов дыхания* (ТОД), у двоих из которых было указание на контакт с МЛУ туберкулезом.

Значения МПК офлоксацина в отношении устойчивых изолятов составили 16,0 мкг/мл для двух и 32,0 мкг/мл для четырех из них. При этом значения МПК₅₀ и МПК₉₀ составили 1,0 мкг/мл и 2,0 мкг/мл соответственно и не отличались по периодам и группам исследования. Доли офлоксацинорезистентных изолятов в группах исследования представлены в табл. 2.

Таким образом, резистентность к фторхинолонам ассоциирована с МЛУ МБТ и их выявлением в период 2006–2010 гг. Значимых различий между фторхинолонорезистентностью и другими изученными параметрами не выявлено.

Мутации в *gyrA* гене. У всех 6 изолятов *M. tuberculosis* с фенотипической устойчивостью к офлоксацину обнаружены мутации в QRDR-области гена *gyrA*. Каждый из этих изолятов, помимо обнаруженного естественно обусловленного Ser95Thr полиморфизма, не приводящего к устойчивости к фторхинолонам, имел мутации в 94 (у 5 изолятов) либо в 90 (у 1 изолята) кодонах, ассоциированные с фторхинолонорезистентностью. Результаты выявления мутаций *gyrA* гена приведены в табл. 3.

Таблица 2. Распределение МБТ в зависимости от чувствительности к офлоксацину

Группы исследования	n	Устойчивые к офлоксацину, n (%)	95% ДИ	Peto ОШ (95% ДИ)
Выделенные в 2000–2002 гг.	165	0 (0,0)	0,0–2,3	7,0 (1,4–35,3)
2006–2010 гг.	179	6 (3,4)	1,5–7,1	
Чувствительные	141	0 (0,0)	0,0–2,6	15,8 (2,9–84,5)*
МЛУ	83	6 (7,2)	3,4–14,9	
Другие профили устойчивости	120	0 (0,0)	0,0–3,1	

Примечание. * рассчитано по отношению к группе чувствительных изолятов.

Таблица 3. Мутации в *gyrA* гене у изолятов *M. tuberculosis* с фенотипической резистентностью к офлоксацину

Изолят	Профиль устойчивости к ПТП 1-го ряда	МПК офлоксацина, мкг/мл	Мутации в <i>gyrA</i> гене
583-08	SHR	16,0	Asp94Gly
2062-09	SHR	16,0	Asp94Tyr
6973-09	HR	32,0	Asp94Asn
119-09	SHR	32,0	Ala90Val
6026-10	SHR	32,0	Asp94Tyr
124-10	SHRE	32,0	Asp94Gly

Примечание. S – стрептомицин, H – изониазид, R – рифампицин, E – этамбутол.

Обсуждение результатов

Обнаружение устойчивых к офлоксацину изолятов *M. tuberculosis* только среди выделенных в 2006-2010 гг., т.е. именно в тот период, когда эти препараты вошли в широкую фтизиатрическую практику, и только в группе множественноустойчивых штаммов МБТ, и учитывая многократно подтвержденный исследованиями [14, 15] факт наличия перекрестной устойчивости микроорганизмов внутри класса фторхинолонов, позволяет сделать следующее предположение. Появление и распространение фторхинолонорезистентных особей в популяции *M. tuberculosis*, циркулирующих на данной территории, происходит в результате применения этих препаратов в лечении туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. Выявленные различия в частоте распределения признака устойчивости МБТ к ФХ позволяют принять нулевую гипотезу об отсутствии взаимосвязи между использованием фторхинолонов при инфекционных болезнях немикобактериальной природы и формированием резистентной к ним прослойки в популяции МБТ.

Следует отметить, что подтверждение либо опровержение этого положения требует проведения дальнейших исследований. Это обусловлено, во-первых, важностью роли, которую играют фторхинолоны в лечении МЛУ туберкулеза на современном этапе [16, 17]. Во-вторых, примененный в данном исследовании методологический подход – выявление признака фторхинолонорезистентности в популяции возбудителя – основан на косвенном выявлении причинно-следственной связи. В данном исследовании не планировалось выявить связь между приемом фторхинолонов и наличием устойчивости к этим препаратам у *M. tuberculosis*, выделенных у пациентов, не получавших ранее противотуберкулезной терапии. Однако имеется ряд исследований, посвященных рассматриваемой проблеме, в которых выявлен риск обнаружения

фторхинолонорезистентных МБТ в результате предшествовавшей терапии, не относящейся к заболеванию туберкулезом [12, 18].

В ряде других наблюдений устойчивые к ФХ *M. tuberculosis* чаще обнаруживали среди изолятов с МЛУ, чем среди чувствительных к ПТП 1-го ряда или с различными комбинациями устойчивости, но без МЛУ [19, 20]. Показана также связь между обнаружением резистентности к фторхинолонам и наличием в анамнезе предварительного лечения туберкулеза [21, 22]. Эти находки свидетельствуют в пользу гипотезы, что появление фторхинолонорезистентных, а также МЛУ-форм МБТ в популяции впервые выявленных больных происходит, с большей вероятностью, в результате их заражения микобактериями с приобретенной в ходе нерациональной полихимиотерапии вторичной устойчивостью. Селекции фторхинолонорезистентности МБТ способствуют длительные сроки лечения туберкулеза, в десятки раз превышающие режимы неспецифической антибактериальной терапии, что сопровождается риском неадекватного применения антибактериальных препаратов (АБП).

Изучая воздействие селективного давления АБП на формирование резистентной к ним прослойки в популяции возбудителей, необходимо учитывать региональные особенности потребления населением АБП как одного из главных факторов развития этой резистентности, а также особенности эпидемиологического процесса. В Новосибирской области, по данным ОГУ «Новосибоблфарм», среднее ежегодное потребление фторхинолонов в ЛПУ области в рассматриваемый период составляло 160 460 установленных суточных доз (DDD). Амбулаторное потребление фторхинолонов в Новосибирской области (НСО) не поддается количественной оценке ввиду его неконтролируемости. По данным единичных фармакоэпидемиологических исследований, на долю фторхинолонов в структуре амбулаторного потребления АБП в НСО приходится 20%.

Традиционно объемы потребления АБП в амбулаторных условиях в 2 раза больше, чем в стационарах, доля необоснованного применения варьирует от 20 до 50% [9]. Не вызывает сомнений, что приведение розничного рынка фармацевтических препаратов на территории области в соответствие с действующим законодательством, не разрешающим безрецептурную продажу антибактериальных препаратов для системного применения, является непременным условием снижения их селективного давления на популяции возбудителей.

Уровень устойчивости к фторхинолонам среди исследованных изолятов МБТ в период 2008–2010 гг. составил 6,4% (95%ДИ: 2,9–13,2%). Следует отметить, что эти данные ограничены методологией выборочного исследования, так как в этот период не проводилась регистрация резистентности МБТ к фторхинолонам и не учитывалась МЛУ в масштабах области. По результатам аналогичных исследований, частота первичной устойчивости МБТ к фторхинолонам колеблется от 0,16 до 19% в разных регионах [23–27]. Данные о распространенности фторхинолонорезистентности МБТ, особенно первичной, в России скудны и разрозненны [28, 29].

В течение 2001–2010 гг. уровень МЛУ МБТ в НСО возрос с 4,9 до 25,5% среди впервые выявленных больных ТОД и с 8,7 до 47,7% среди больных, состоящих на учете по ТОД с бактериовыделением [30]. При сохранении этой тенденции, обнаруженная связь между МЛУ и фторхинолонорезистентностью позволяет прогнозировать рост устойчивости МБТ к ФХ на территории области. Отсутствие различий в значениях МПК₅₀ и МПК₉₀ у изолятов в представленных группах свидетельствует, что в настоящее время имеет место начальный этап формирования на территории области резистентной к фторхинолонам популяции МБТ. Динамика этого процесса будет зависеть от многих факторов, в их числе: интенсивность эпидемического процесса и факторы, на нее влияющие – социально-демографические, экономические, медико-биологические; результативность противотуберкулезной деятельности, особенно эффективность лечения МЛУ туберкулеза. Как благоприятный следует отметить тот факт, что мутации в геноме микобактериальной клетки, ассоциированные с резистентностью к фторхинолонам, имеют стационарную хромосомную локализацию. Хотя показано существование плазмид-опосредованного механизма распространения устойчивости к фторхинолонам на примере грамотрицательных бактерий, проведенные ранее исследования не показали наличия плазмид у *M. tuberculosis* [31]. Таким образом, быстрого распространения резистентности в популяциях МБТ

может не происходить. По наиболее консервативным оценкам, скорость прироста устойчивости МБТ к ФХ составляет 0,33% в год. Построение простой линейной регрессии, основанное на выделении двух временных периодов: до 2007 г. и 2008–2010 гг. с долей устойчивых к офлоксацину МБТ 0 и 3,35% соответственно, позволяет прогнозировать превышение 30% уровня первичной устойчивости МБТ к ФХ в течение 25 лет (рис. 4).

В условиях ограниченного выбора антибактериальных средств для лечения туберкулеза, усугубляющегося ростом лекарственной устойчивости МБТ, сохранение клинической эффективности фторхинолонов представляется важным. Решению проблемы «продления срока жизни» фторхинолонов может способствовать, во-первых, мониторинг распространенности резистентности в отдельных территориях, во-вторых, обязательное определение устойчивости к ПТП 2-го ряда у больных МЛУ туберкулезом перед началом антибактериальной терапии с использованием ускоренных методов лабораторной диагностики, в т.ч. молекулярно-генетических. К.С. Chang с соавт. в систематическом обзоре и метаанализе показали, что генотипические методы обнаружения мутаций в *gyrA* гене не отличаются по чувствительности (88% vs 94%, $p=0,08$) и менее специфичны (96% vs 99%, $p=0,03$), чем ускоренные методы фенотипической диагностики. Кроме того, изолированное типирование *gyrA* гена по чувствительности (88% vs 93%, $p=0,36$) и специфичности (96% vs 91%, $p=0,48$) не отличается от типирования и *gyrA*, и *gyrB* [32]. Чувствительность и специфичность метода гибридизации с использованием тест-системы «БИОЧИП-2», по результатам выборочных исследований, составила 94 и 100% соответственно [33].

В-третьих, в многочисленных экспериментах *in vitro* и *in vivo* показана значительно более высо-

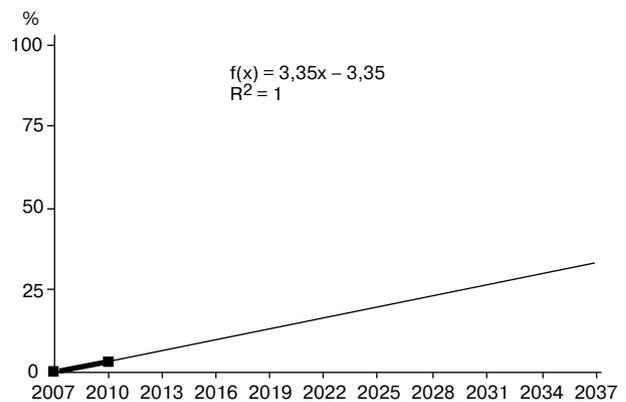


Рис. 4. Динамика развития резистентности МБТ к фторхинолонам в Новосибирской области (прогноз).

кая антиминобактериальная активность фторхинолонов последних поколений – левофлоксацина, моксифлоксацина и гатифлоксацина – в сравнении с офлоксацином [34, 35]. Это обусловило то, что, несмотря на перекрестную устойчивость, фторхинолоны последних поколений были эффективны в лечении МЛУ туберкулеза [36]. Вместе с тем, согласно выдвинутой К. Drlica и соавт. концепции об «окне селекции» резистентности, воздействие на микробную популяцию антибактериальных препаратов в концентрациях, значительно превышающих МПК, приводит к гибели всей популяции, в т.ч. особей, имеющих гены антибиотикорезистентности. Эти концентрации получили название концентраций, предупреждающих мутации (mutant prevention concentration – МРС, или ПМК) [37]. Благодаря более высокой активности, ПМК «новых» фторхи-

нолонов в отношении *M. tuberculosis* может быть сопоставима с концентрациями, достигаемыми в крови и тканях больного при приеме терапевтических доз препарата, не влияя отрицательно на переносимость. Подтверждение и детализация этих положений может быть предметом дальнейших исследований.

В настоящее время фторхинолоны поздних поколений рекомендованы ВОЗ для лечения МЛУ ТБ в случае резистентности к офлоксацину [38]. По нашему мнению, и в случае отсутствия первичной устойчивости МБТ к офлоксацину, в режимах химиотерапии МЛУ туберкулеза целесообразно использовать фторхинолоны последних поколений как препараты с возможно более низким потенциалом селекции устойчивости.

Литература

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: WHO report 2010. Geneva: World Health Organization; 2010.
2. World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. Geneva: World Health Organization; 2010.
3. Туберкулез в Российской Федерации. 2009 г. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу, используемых в Российской Федерации. - М., 2010. - 224 с.
4. Rodriguez J.C., Ruiz M., Lopez M., Royo G. *In vitro* activity of moxifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin and linezolid against *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Antimicrob Agents 2002; 20(6):464-7.
5. Aminimanizani A., Beringer P., Jelliffe R. Comparative Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the newer fluoroquinolone antibacterials. Clin Pharmacokinet 2001; 40(3):169-87.
6. Agrawal D., Udawadia Z.F., Rodriguez C., Mehta A. Increasing incidence of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mumbai, India. Int J Tuberc Lung Dis 2009; 13(1):79-83.
7. Jabeen K., Shakoor S., Chishti S., Ayaz A., Hasan R. Fluoroquinolone-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Pakistan, 2005–2009. Emerging Infectious Diseases. 2011; 17(3): 564-7. DOI: 10.3201/eid1703.101468.
8. Дьяченко С.В. Фармакоэпидемиологические основы антибактериальной терапии распространенных заболеваний. Изд. центр ГОУ ВПО ДВГМУ, 2010. 402 с.
9. Рачина С.А., Фокин А.А., Ишмухаметов А.А., Денисова М.Н. Анализ амбулаторного потребления антиминобактериальных препаратов для системного применения в различных регионах РФ. Клин микробиол антимикроб химиотер 2008; 10(1):59-69.
10. Low D. E. Fluoroquinolones for treatment of community-acquired pneumonia and tuberculosis: putting the risk of resistance into perspective. Clin Infect Dis 2009; 48:1361-3.
11. Ginsburg A.S., Hooper N., Parrish N., et al. Fluoroquinolone resistance in patients with newly diagnosed tuberculosis. Clin Infect Diseases 2003; 37:1448-52.
12. Devasia R.A., Blackman A., Gebretsadik T., et al. Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: The Effect of duration and timing of fluoroquinolone exposure. Am J Respir Crit Care Med 2009; 180:365-70.
13. Chen T.C., Lu P.L., Lin C.Y., Lin W.R., Chen Y.H. Fluoroquinolones are associated with delayed treatment and resistance in tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. Int J Infect Dis 2011; 15(3):e211-6.
14. Alangaden G.J., Manavathu E.K., Vakulenko S.B., Zvonok N.M., Lerner S.A. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutant strains of *Mycobacterium tuberculosis* selected in the laboratory and isolated from patients. Antimicrob Agents Chemother 2000; 39(8):1700-3.
15. Devasia R.A., Blackman A., May C., et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: an assessment of MGIT 960, MODS and nitrate reductase assay and fluoroquinolone cross-resistance. J Antimicrob Chemother 2009; 63:1173-8.
16. Nuermberger E.L., Spigelman M.K., Yew W.W., Current development and future prospects in chemotherapy of tuberculosis. Respirology 2010; 15:764-78.
17. Manika K., Kioumis I. The role of fluoroquinolones in the treatment of tuberculosis. Pneumon 2008; 21(4):395-401.
18. Long R., Chong H., Hoepfner V., et al. Empirical treatment of community-acquired pneumonia and the development of fluoroquinolone-resistant tuberculosis. Clin Infect Dis 2009; 48:1354-60.
19. Huang T.S., Kunin C.M., Lee S.J., Chen Y.S., Tu H.Z., Liu Y.C. Trends in fluoroquinolone resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a Taiwanese medical centre: 1995-2003. J Antimicrob Chemother 2005; 56:1058-62.

20. Sahly H.E., Teeter L.D., Jost Jr K.C., Dunbar D., Lew J., Graviss E. A. Incidence of moxifloxacin resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Houston, Texas. *J Clin Microbiol* 2011; 49(8):2942-5.
21. Xu P., Li X., Zhao M., et al. Prevalence of fluoroquinolone resistance among tuberculosis patients in Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(7):3170-2.
22. Balaji V., Daley P., Anand A.A., et al. Risk Factors for MDR and XDR-TB in a Tertiary Referral Hospital in India. *PLoS One*. 2010; 5(3):e9527.
23. Umubyeyi A.N., Rigouts L., Shamputa I.C., et al. Limited fluoroquinolone resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Rwanda: results of a national survey. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:1031-3.
24. Van den Boogaard J., Semvua H.H., van Ingen J., et al. Low rate of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northern Tanzania. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(8):1810-4.
25. Singh M., Chauhan D.S., Gupta P., et al. *In vitro* effect of fluoroquinolones against *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Agra & Kanpur region of north India. *Indian J Med Res* 2009; 129:542-7.
26. Rafiq Y., Jabeen K., Hasan R., et al. Fluoroquinolone resistance among *Mycobacterium tuberculosis* strains from Karachi, Pakistan: data from community-based field clinics. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(2):929-30.
27. Ramachandran R., Nalini S., Chandrasekar V., et al. Surveillance of drug-resistant tuberculosis in the state of Gujarat, India. *Int J Tuberc Lung Dis* 13(9):1154-60.
28. Toungousova O.S., Mariandyshv A.O., Bjune G., Caugant D.A., Sandven P. Resistance of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from the Archangel oblast, Russia, to second-line anti-tuberculosis drugs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24(3):202-6.
29. Mokrousov I., Otten T., Manicheva O., et al. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(8):2937-9.
30. Погожева Л.М., Мурашкина Г.С., Алексеева Т.В., Новикова Н.М., Силайкина С.Т. Основные показатели противотуберкулезной деятельности в Сибирском и Дальневосточном Федеральных округах. Новосибирск: ФГУ «ННИИТ» Минздравсоцразвития России; 2002-2011 гг.
31. Vijaya S. The genetics of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Genet* 1998; 77:123-8.
32. Chang K.C., Yew W.W., Chan R.C.Y. Rapid assays for fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1551-61.
33. Антонова О.В., Грядунов Д.А., Лапа С.А., и соавт. Выявление мутаций в геноме *Mycobacterium tuberculosis*, приводящих к устойчивости к фторхинолонам, методом гибридизации на биологических микрочипах. *Бюлл эксперим биол и медицины*, 2008; 145(1):115-120.
34. Hu Y., Coates A.R.M., Mitchison D.A. Sterilizing activities of fluoroquinolones against rifampin-tolerant populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(2):653-7.
35. Alvarez-Freites E.J., Carter J.L., Cynamon M.H. *In vitro* and *in vivo* activities of gatifloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(4):1022-5.
36. Jacobson K.R., Tierney D.B., Jeon C.Y., Mitnick C.D., Murray M.B. Treatment outcomes among patients with extensively drug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2010; 51(1):6-14.
37. Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 11-17.
38. World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2008.