



Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273)
Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
info@cmac-journal.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование
Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2023.

Содержание

Болезни и возбудители

- Эйдельштейн И.А.
332 *Mycoplasma pneumoniae* – современные данные о строении, молекулярной биологии и эпидемиологии возбудителя
- Зырянов С.К., Бутранова О.И., Абрамова А.А.
350 Профиль госпитализированных пациентов с летальным исходом вследствие COVID-19
- Долгополов И.С., Зайцева А.В., Хамцова Ж.В., Иванова А.В., Цветкова Е.О.
358 Диссеминированная инфекция *Mycobacterium genavense* у ранее здорового ребенка: описание клинического случая и обзор литературы

Антимикробные препараты

- Резолюция совета экспертов
366 Цефподоксима проксетил – новые возможности антибактериальной терапии респираторных инфекций
- Козлов Р.С., Иванчик Н.В., Скленова Е.Ю., Микотина А.В., Азизов И.С., Трушин И.В., Дехнич А.В.
372 *In vitro* активность цефподоксима в отношении клинических изолятов *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes*
- Веселов А.В.
379 Клиническая фармакология и практические аспекты применения изавуконазола
- Гомон Ю.М., Колбин А.С., Арепьева М.А., Каляпин А.А., Балыкина Ю.Е., Курылев А.А., Кузьменков А.Ю., Козлов Р.С.
395 Потребление антимикробных препаратов в РФ в 2008–2022 гг.: фармакоэпидемиологическое исследование

Антибиотикорезистентность

- Бочарова Ю.А., Савинова Т.А., Маянский Н.А., Чеботарь И.В.
401 Новые мутации в генах, связанных с устойчивостью к цефидероколу, у клинического изолята *Pseudomonas aeruginosa*

Опыт работы

- Коробова А.Г., Мещурова С.Ю., Трушина Е.Е., Самоходская Л.М.
408 Опыт использования автоматического анализатора для диагностики инфекций мочевыводящих путей
- Каражас Н.В., Пульнова Н.Л., Рыбалкина Т.Н., Бошняк Р.Е., Корниенко М.Н., Аветисян Л.Р., Черешнева Е.В., Иванова М.Ю., Кабикова О.Ф., Габриэлян Н.И.
415 Значение герпесвирусных инфекций в этиологии бронхолегочных осложнений у пациентов, перенесших трансплантацию сердца
- Лавренчук Л.С., Миногина Т.В., Вахрушева Д.В., Скорняков С.Н.
421 Лекарственная устойчивость клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных из резектатов костной ткани пациентов с туберкулезными спондилитами
- Сароянц Л.В., Арнаудова К.Ш., Башкина О.А., Наумов В.З.
428 Роль персонализированной медицины в оценке эффективности лечения лепры

Лекарственная устойчивость клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных из резектатов костной ткани пациентов с туберкулезными спондилитами

Лавренчук Л.С., Миногина Т.В., Вахрушева Д.В., Скорняков С.Н.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Контактный адрес:

Леонид Сергеевич Лавренчук
Эл. почта: leon5d@list.ru

Ключевые слова: туберкулез, микобактерии, туберкулезный спондилит, множественная лекарственная устойчивость, широкая лекарственная устойчивость.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Провести сравнительную оценку результатов фенотипических и молекулярно-генетических методов тестирования лекарственной устойчивости микобактерий, выделенных из резектатов костной ткани пациентов с туберкулезными спондилитами.

Материалы и методы. Было проведено ретроспективное когортное исследование по историям болезни 217 пациентов с диагнозом «туберкулезный спондилит», прошедших оперативный этап лечения в УНИИФ в период с 2016 по 2021 г. Основной исследуемый диагностический материал – костный операционный. Было проведено тестирование лекарственной чувствительности МБТ, выделенных из этого материала, фенотипическими и молекулярно-генетическими методами.

Результаты. Подавляющее большинство клинических изолятов микобактерий-возбудителей туберкулезного спондилита обладали, как минимум, множественной лекарственной устойчивостью (92 выделенные культуры (88,5%) по данным культуральных методов, 192 образца ДНК МБТ (70%) по данным молекулярно-генетических методов). Для рифампицина, изониазида и офлоксацина совпадение результатов тестирования лекарственной устойчивости двумя методами составило 92,7%, 97,9% и 92,6%, соответственно; для левофлоксацина, моксифлоксацина и канамицина – 78,3%, 77,1% и 73,1%; для амикацина и капреомицина – только 52,2% и 57,7%, соответственно.

Для рифампицина и изониазида можно выделить доминирующие мутации, ассоциированные с устойчивостью МБТ к этим препаратам: замена серина на лейцин в 531 кодоне гена *groV* для рифампицина и замена серина на треонин в 315 кодоне гена *katG* для изониазида.

Выводы. Данные о наличии мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину (ген *groV*), изониазиду (ген *katG*) и аминогликозидам/капреомицину (ген *rrs*) можно использовать при назначении режима химиотерапии, не дожидаясь результатов фенотипического определения лекарственной чувствительности. Наличие мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к фторхинолонам и аминогликозидам/капреомицину (ген *eis*), не всегда сопровождается фенотипическим проявлением устойчивости. Для этих препаратов необходимо подтверждать устойчивость фенотипическими методами.

Original Article

Antimicrobial resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from patients with tuberculous spondylitis

Lavrenchuk L.S., Minogina T.V., Vakhrusheva D.V., Skornyakov S.N.

National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Yekaterinburg, Russia

Contacts:

Leonid S. Lavrenchuk
E-mail: leon5d@list.ru

Key words: tuberculosis, mycobacterium, spinal tuberculosis, multidrug-resistant, extensively drug-resistant tuberculosis.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. To conduct a comparative evaluation of the results of phenotypic and molecular genetic methods for testing drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from bone biopsies of patients with tuberculous spondylitis.

Materials and methods. A retrospective cohort study was conducted on the case histories of patients diagnosed with tuberculous spondylitis who underwent surgical treatment in the period from 2016 to 2021. The main study subject was surgical material. Antimicrobial resistance patterns of MBT isolates was performed using phenotypic and molecular genetic methods.

Results. The vast majority of *Mycobacterium tuberculosis* isolates possess at least multidrug-resistance (MDR): 92 of 104 isolates (88.5%) according to phenotypic methods, and 192 of 274 DNA samples (70.1%) according to molecular methods. For rifampicin, isoniazid and ofloxacin the results of phenotypic and molecular methods matched in 92.7%, 97.9%, and 92.6% of cases, respectively; for levofloxacin,

moxifloxacin and kanamycin – in 78.3%, 77.1%, and 73.1% of cases; , for amikacin and capreomycin – only – in 52.2% and 57.7% of cases, respectively.

For rifampicin and isoniazid, the dominant mutations associated with resistance were: serine replacement for leucine in the 531 codon of the *rpoB* gene for rifampicin and serine replacement for threonine in the 315 codon of the *katG* gene for isoniazid.

Conclusions. Data on the presence of mutations associated with resistance to rifampicin (*rpoB* gene), isoniazid (*katG* gene) and aminoglycosides/capreomycin (*rrs* gene) can be used when prescribing chemotherapy regimens. The presence of mutations associated with MBT resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides/capreomycin (*eis* gene) is not always accompanied by phenotypic manifestation of resistance. For these antimicrobials it is necessary to confirm resistance by phenotypic methods.

Введение

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в мире в 2021 г. от туберкулеза умерли около 1,6 млн человек (включая 187 тыс. ВИЧ положительных). Туберкулез лёгких – самая распространенная локализация туберкулезной инфекции, на долю внелегочного туберкулеза приходится от 5,7 до 42% [1–3]. При этом, до 45% случаев всех внелегочных форм туберкулеза может приходиться на долю костно-суставного туберкулеза. Встречаемость туберкулезного спондилита (ТС) среди случаев костно-суставного туберкулеза составляет около 40–50% [4]. ТС – заболевание, при котором происходит разрушение позвонков и деформация позвоночника. ТС может оказать значительное влияние на качество жизни пациентов, особенно при несвоевременной постановке диагноза и лечении. Симптомы заболевания, такие как боли в спине, нарушение движений и чувствительности, мышечная слабость, могут привести к существенным ограничениям жизнедеятельности и инвалидности.

Одним из главных методов борьбы с туберкулезом является ранняя диагностика и своевременное начало адекватного лечения. В случае ТС диагностика осложняется трудностями получения биоматериала – костный материал можно получить только при инвазивном вмешательстве (биопсии, резекции). В некоторой степени альтернативой костному операционному материалу могут служить пунктаты натечных абсцессов и лимфоузлов, отделяемое ран и свищей, но эти биоматериалы можно получить, как правило, только при запущенных, осложненных формах поражений позвоночника. Кроме того, даже из костного операционного материала не всегда можно получить культуру *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) и, соответственно, данные о ее устойчивости. Поэтому необходимо уделять большое внимание разработке и совершенствованию методов диагностики ТС. Один из основных принципов современной фтизиатрии в условиях распространения лекарственной устойчивости (ЛУ) МБТ к широкому спектру противотуберкулезных препаратов (ППП) – выбор режимов химиотерапии по результатам микробиологического исследования возбудителя. Этот принцип особенно актуален для лечения пациентов с ТС, и задача лабораторного звена фтизиатрической службы – точно и своевременно установить ЛУ микобактерий у таких пациентов.

Во фтизиатрической практике выделяют несколько категорий устойчивости МБТ к ПТП: монорезистентность, полирезистентность, множественную ЛУ (МЛУ), преширокую и широкую ЛУ (преШЛУ и ШЛУ) [5].

- Монорезистентность — это устойчивость МБТ только к одному (любому) противотуберкулезному препарату.
- Полирезистентность – это устойчивость МБТ к двум и более ПТП, кроме одновременной устойчивости к изониазиду и рифампицину.
- МБТ с МЛУ характеризуются устойчивостью к изониазиду и рифампицину вне зависимости от чувствительности к другим ПТП.
- Под МБТ с преШЛУ подразумевают микобактерии, устойчивые к рифампицину и изониазиду, а также хотя бы к одному из аминогликозидов либо фторхинолонов.
- Под МБТ с ШЛУ подразумевают микобактерии, устойчивые к рифампицину и изониазиду, а также хотя бы к одному из аминогликозидов и фторхинолонов.

В 2022 г. дефиниции ЛУ МБТ изменились. С 2022 г. под МБТ с преШЛУ стали подразумевать МБТ с устойчивостью к рифампицину с устойчивостью к изониазиду или без нее, в сочетании с устойчивостью к любому фторхинолону. А под МБТ с ШЛУ стали подразумевать микобактерии с устойчивостью к рифампицину и устойчивостью к изониазиду или без нее, в сочетании с устойчивостью к любому фторхинолону и, по крайней мере, к линезолиду или бедаквилину. В Таблице 1 приведено сравнение дефиниций МЛУ и ШЛУ туберкулеза.

Поскольку обсуждаемые данные были получены с 2016 по 2021 г., то в настоящей работе использованы дефиниции преШЛУ и ШЛУ МБТ, принятые на тот период времени.

Рифампицин – ПТП, ингибирующий работу бактериальной РНК-полимеразы. Устойчивость МБТ к рифампицину генетически обусловлена мутациями в гене *proV*, особенно в кодонах 531, 526 и 516 [6, 7], механизм действия данного препарата заключается в связывании с β -субъединицей РНК-полимеразы, что приводит к ингибированию синтеза мРНК [8].

Изониазид по своему механизму действия является пролекарством и начинает действовать на размножаю-

Таблица 1. Дефиниции МЛУ и ШЛУ туберкулеза

Федеральные клинические рекомендации «Туберкулез у взрослых», версия 2020 г.	Клинические рекомендации «Туберкулез у взрослых», версия 2022 г.
МЛУ/MDR (множественная лекарственная устойчивость)	
Устойчивость МБТ к изониазиду и рифампицину, независимо от устойчивости к другим антибактериальным препаратам	Устойчивость МБТ одновременно к изониазиду и рифампицину независимо от устойчивости к другим антибактериальным препаратам
преШЛУ/pre-XDR (преширокая лекарственная устойчивость)	
Устойчивость МБТ к изониазиду, рифампицину и аминогликозидам/полипептидам или фторхинолонам	Устойчивость МБТ к рифампицину с устойчивостью к изониазиду или без нее, в сочетании с устойчивостью к любому фторхинолону
ШЛУ/XDR (широкая лекарственная устойчивость)	
Устойчивость МБТ к изониазиду, рифампицину, аминогликозидам/полипептидам, фторхинолонам	Устойчивость МБТ к рифампицину с устойчивостью к изониазиду или без нее, в сочетании с устойчивостью к любому фторхинолону и, по крайней мере, к линезолиду или бедаквилину

щиеся МБТ после взаимодействия с каталазой-пероксидазой МБТ, кодируемой геном *katG* [9]. Соответственно, наличие мутаций в гене *katG*, преимущественно в локусах 315, 328 и 335, приводит к устойчивости МБТ к изониазиду. Одна из таких мутаций – генетический дефект в 315-м кодоне (S315T), который приводит к подавлению пероксидазной и каталазной функций экспрессируемого белка [10].

Фторхинолоны широко применяются в лечении туберкулеза. Механизм их действия заключается в ингибировании ДНК-гиразы, участвующей в устранении сверхспирализации ДНК во время репликации. Этот фермент кодируется генами *gyrA* и *gyrB*. Генетические изменения в данных генах ведут к появлению устойчивости МБТ к фторхинолонам [8].

Амикацин и канамицин ингибируют биосинтез белка, модифицируя рибосому в области 16S рРНК. Устойчивость к канамицину и амикацину связана с мутациями в гене *rrs*, кодирующем белки в области 16S рРНК. Капреомицин с химической точки зрения относится к полипептидам, а не к аминогликозидам, но механизм действия на МБТ у них схожий. Исключительно с устойчивостью к капреомицину ассоциированы мутации в гене *tlyA*, кодирующем рРНК-метилтрансферазу, которая участвует в модификации нуклеотидов в 23S рРНК [11]. Кроме этого, устойчивость к аминогликозидам может появляться вследствие модификации аминогликозидов ацетилтрансферазой, кодируемой геном *eis*. Таким образом, в группе аминогликозидов и капреомицина прослеживается сложная перекрестная устойчивость в зависимости от наличия мутаций в генах *rrs*, *tlyA* и *eis*.

При установлении ЛУ микобактерий существует два принципиально разных подхода в лабораторной диагностике – определение лекарственной чувствительности МБТ фенотипическими методами и обнаружение мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к ПТП в геноме микобактерий.

Из-за специфики физиологии МБТ (медленные темпы размножения – для получения культуры МБТ необходимо от нескольких недель до двух месяцев) в лабораторной диагностике туберкулеза не применим стандарт-

ный диско-диффузионный метод определения ЛУ. Для тестирования чувствительности МБТ к ПТП используют метод абсолютных концентраций и метод пропорций.

Суть метода абсолютных концентраций заключается в оценке способности МБТ расти на питательных средах, содержащих ПТП в критической концентрации. Критические концентрации препаратов указаны в приказе Минздрава России 2003 года «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» [12], а также – в клинических рекомендациях «Туберкулез у взрослых» (2022 г.) [5]. Культура МБТ считается чувствительной к данному ПТП, если наблюдается 20 и менее колоний на среде с препаратом в критической концентрации при обильном росте в контрольной пробирке. Культура МБТ считается устойчивой данному ПТП, если наблюдается рост более 20 колоний на среде с препаратом при обильном росте в контрольной пробирке.

Метод пропорций является основным методом ТЛЧ микобактерий, рекомендованным ВОЗ. Принцип метода состоит в определении процента клеток МБТ в культуре, устойчивых к определенному ПТП в критической концентрации. Для этого суспензию микобактерий высевают на среду с препаратом в критической концентрации и на среду без него. Культура МБТ считается устойчивой к данному ПТП, если на среде с препаратом вырастают колонии, составляющие более 1% от числа колоний, выросших на среде без препарата. Метод пропорций обладает большей чувствительностью, однако более трудоемок и затратен. Этот метод можно проводить и на жидких средах, например, с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT.

Для поиска мутаций, ассоциированных с устойчивостью микобактерий к ПТП, также есть несколько методов. Во-первых, аллель-специфичная ПЦР в реальном времени, а во-вторых, методики, основанные на гибридизации ДНК – стрипы и биочипы.

Спектры ЛУ МБТ, полученные фенотипическими и молекулярно-генетическими методами, не всегда совпадают, что создает определенные трудности в клинической интерпретации результатов, и этот вопрос требует дополнительного изучения.

Цель исследования – провести сравнительную оценку результатов фенотипических и молекулярно-генетических методов тестирования ЛУ микобактерий-возбудителей ТС.

Материалы и методы

В УНИИФ – филиале ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России было проведено ретроспективное когортное исследование по историям болезни пациентов в период с 2016 г. по 2021 г., посвященное анализу результатов исследования операционного материала 217 пациентов с диагнозом «туберкулезный спондилит».

Критерии включения в исследование: микробиологическое и/или морфологическое подтверждение диагноза «туберкулезный спондилит» в установленном порядке [5]; госпитализация в УНИИФ и оперативное вмешательство в период с 2016 по 2021 г.; наличие положительного результата посева и тестирования лекарственной чувствительности (ТЛЧ) операционного материала и/или наличие положительного результата ПЦР с выявлением мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к ПТП, в операционном материале. От некоторых пациентов было получено более одного образца операционного материала вследствие проведения у них повторных оперативных вмешательств.

Из операционного костного материала 217 пациентов с диагнозом «туберкулезный спондилит» было получено 104 культуры *Mycobacterium tuberculosis*. Для всех культур было проведено ТЛЧ методом абсолютных концентраций к изониазиду (H), рифампицину (Rif), этамбутолу (E), офлоксацину (Of), канамицину (K), капреомицину (Cap), циклосерину (Cs), этионамиду (Eto), парааминосалициловой кислоте (ПАСК). ТЛЧ к моксифлоксацину (Mfx), левофлоксацину (Lfx), амикацину (Am), бедаквилину (Bdq), линезолиду (Lnz) и деламаиду (Dlm) проводили усовершенствованным методом пропорций на жидких питательных средах с использованием технологии ВАСТЕС MGIT (Becton Dickinson, США).

Из операционного костного материала тех же 217 пациентов с диагнозом «туберкулезный спондилит» было получено 274 образца ДНК МБТ. В зависимости от количества ДНК в образце спектр мутаций определяли либо с использованием набора реагентов ТБ-ТЕСТ (ООО «Биочип-ИМБ», Россия), либо Амплитуб-МЛУ-РВ и Амплитуб-Fq-РВ (Синтол, Россия). В первом случае выявляли мутации, ассоциированные с устойчивостью МБТ к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам (FQ) и аминокликозидам (Ag), а также к этамбутолу, и идентифицировали генотип возбудителя. В случае, если ДНК для этой методики в образце было недостаточно, мутации выявляли с помощью наборов реагентов для определения ЛУ МБТ к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам методом ПЦР-РВ (Амплитуб-МЛУ-РВ и Амплитуб-Fq-РВ, Синтол, Россия).

Получить данные об устойчивости МБТ, выделенных из операционного материала, обоими методами (и фенотипическим, и молекулярным) удалось в 96 образ-

цах, полученных от 83 пациентов (38,2% от числа обследованных).

Результаты

Устойчивость МБТ по результатам культуральных методов

Как видно из Таблицы 2, подавляющее большинство культур МБТ, выделенных из костного операционного материала больных ТС, имели ЛУ: 24 культуры (23,08%; 16,03–32,05%) имели МЛУ; 34 культуры – преШЛУ (32,7%; 24,43–42,18%), 34 культуры имели ШЛУ (32,7%; 24,43–42,18%).

Устойчивость МБТ по результатам молекулярно-генетических методов

Мутации, ассоциированные с устойчивостью МБТ к рифампицину, были обнаружены в 193 образцах (70,4%, 95%ДИ: 64,56–76,32); к изониазиду – в 215 образцах (78,47%, 95% ДИ: 72,56–84,38); к фторхинолонам – в 80 образцах (30,9%, 95% ДИ: 27,19–34,6); к аминокликозидам – в 93 образцах (50,27%, 95% ДИ: 45–55,53). Результаты представлены в Таблице 3.

Далее нами была проанализирована частота встречаемости мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к различным ПТП. В случае с рифампицином и изониазидом можно выделить доминирующие мутации: замена серина на лейцин в 531 кодоне гена *rpoB* для рифампицина и замена серина на треонин в 315 кодоне гена *katG* для изониазида. Такие мутации встречались в 168 (61,31%, 95%ДИ: 55,83–66,79) и в 208 (75,01%, 95%ДИ: 75,52–79,3) образцах ДНК соответственно. В случае с фторхинолонами выделить наиболее распространенную мутацию не представилось возможным, однако большинство мутаций находилось в гене *gyrA*. В случае с аминокликозидами также не удалось выделить какую-либо доминирующую мутацию.

Генотип был определен у 174 образцов ДНК МБТ, выделенных из операционного материала. 165 (94,83%) образцов МБТ были отнесены к генотипу Beijing, 61 (35%) из них были отнесены к кластеру Beijing B0. Генотип Ural был обнаружен у 6 образцов, а генотип LAM – у трех.

Устойчивость МБТ по результатам двух методов

Получить данные о ЛУ МБТ, выделенных из костного операционного материала, обоими методами (и фенотипическим, и молекулярным) удалось для 96 образцов от 83 пациентов. Как видно из Таблицы 4, в большинстве случаев данные, полученные разными методами, совпадали. Наибольший процент совпадений наблюдался для рифампицина (92,71%, 95%ДИ: 87,61–97,81), изониазида (97,92%, 95%ДИ: 95,12–100) и офлоксацина (92,63%, 95%ДИ: 87,5–97,76). Для левофлоксацина, моксифлоксацина и канамицина процент совпадений находился в пределах 70–80%. Наименьший процент совпадений данных, полученных двумя методами, наблюдался для амикацина и капреомицина.

Таблица 2. Спектр лекарственной чувствительности культур МБТ, выделенных из операционного костного материала (данные, полученные культуральным методом)

Лекарственная чувствительность / устойчивость к препарату		Количество культур МБТ		
		Абс.	Отн.	95% ДИ
Чувствительные		6	5,77%	2,67–12,02
Устойчивые H		6	5,77%	2,67–12,02
МЛУ	Устойчивые Rif + H	8	7,69%	3,95–14,45
	Устойчивые Rif + H + E	16	15,38%	9,7–23,54
преШЛУ	Устойчивые Rif + H + Of / Lfx / Mfx	19	18,27%	12,02–26,78
	Устойчивые Rif + H + K / Cap / Am	15	14,42%	8,94–22,44
ШЛУ	Устойчивые Rif + H + Oflo / Lfx / Mfx + K / Cap / Am	33	31,7%	23,57–41,19
	Устойчивые Rif + H + Of / Lfx / Mfx + K / Cap / Am + Bdq	1	0,95%	
Устойчивые Lnz		0		
Устойчивые Dlm		0		
Всего		104		

МБТ – *Mycobacterium tuberculosis*; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; преШЛУ – преширокая лекарственная устойчивость; ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость; H – изониазид, Rif – рифампицин, E – этамбутол, Of – офлоксацин, K – канамицин, Cap – капреомидин, Mfx – моксифлоксацин, Lfx – левофлоксацин, Am – амикацин, Bdq – бедаквилин, Lnz – линезолид; Dlm – деламаид.

Таблица 3. Спектр мутаций, ассоциированных с ЛУ, в ДНК МБТ, выделенных из операционного костного материала

Спектр мутаций, ассоциированных с ЛУ		Количество образцов ДНК		
		Абс.	Отн.	(95% ДИ %-%)
Отсутствие мутаций		58	21,17%	16,75–26,39
Моноустойчивость	H	22	8,03%	5,36–11,86
	Rif	1	0,36%	0,06–2,04
H + FQ		1	0,36%	0,06–2,04
МЛУ	H + Rif	66	24,09%	19,41–29,49
преШЛУ	H + Rif + FQ	36	13,14%	9,64–17,65
	H + Rif + Ag	46	16,79%	12,83–21,67
ШЛУ	H + Rif + FQ + Ag	44	16,06%	12,19–20,87
Всего		274		

H – изониазид; Rif – рифампицин; FQ – фторхинолоны; Ag – аминогликозиды.

Таблица 4. Процент совпадений данных об устойчивости МБТ к ПТП, полученных фенотипическими и генотипическими методами

ПТП	R R	S S	R S	S R	Всего культур	% совпадений	95%ДИ
Рифампицин	82	7	5	2	96	92,71	87,61–97,81
Изониазид	88	6	1	1	96	97,92	95,12–100
Офлоксацин	45	43	2	5	95	92,63	87,5–97,76
Левофлоксацин	21	26	12	1	60	78,33	77,29–79,83
Моксифлоксацин	20	17	10	1	48	77,08	75,89–78,27
Канамицин	30	27	17	4	78	73,08	63,23–82,93
Амикацин	3	9	9	2	23	52,17	50,13–54,22
Капреомидин	15	30	32	1	78	57,69	56,59–58,79

R R – устойчивость по результатам обоих методов; S S – чувствительность по результатам обоих методов; R S – были найдены мутации в геноме, но фенотипически изолят оказался чувствительным; S R – мутаций в геноме обнаружено не было, но фенотипически изолят оказался устойчивым.

Лавренчук Л.С. и соавт.

Таблица 5. Сравнение данных об устойчивости МБТ к аминогликозидам/капреомицину, полученных двумя методами

ПТП	S S	S R	Мутации в гене <i>rrs</i> + R фТЛЧ	Мутации в гене <i>rrs</i> + S фТЛЧ	Мутации в гене <i>eis</i> + R фТЛЧ	Мутации в гене <i>eis</i> + S фТЛЧ
Канамицин	27	4	12	0	18	17
Амикацин	9	1	1	0	4	5
Капреомицин	30	2	10	2	5	30

фТЛЧ – фенотипическое тестирование лекарственной чувствительности; S S – чувствительность по результатам обоих методов; S R – мутаций в геноме обнаружено не было, но фенотипически изолят оказался устойчивым.

Такая слабая корреляция между данными об устойчивости МБТ к аминогликозидам и капреомицину, полученными разными методами, представляет особый интерес, поэтому эту группу препаратов было решено рассмотреть подробнее. В Таблице 5 представлены данные о соотношении данных двух методов с учетом мутаций в различных генах.

Обсуждение

С помощью молекулярно-генетических методов невозможно дифференцировать устойчивость к препаратам внутри группы фторхинолонов, так как нет статистически значимой связи между наличием конкретных мутаций и устойчивостью к разным поколениям фторхинолонов (Mfx и Lfx). Та же ситуация с мутациями, ассоциированными с устойчивостью к аминогликозидам. Тем не менее, сравнивая фенотипические и генотипические данные об устойчивости одних и тех же культур МБТ к разным ПТП, можно понять, насколько наличие тех или иных мутаций коррелирует с наличием фенотипической устойчивости к препарату.

Случаи, при которых изолят был фенотипически расценен как устойчивый, но мутаций в геноме найдено не было, можно объяснить несовершенством применявшихся коммерческих наборов по выявлению мутаций. То есть, устойчивость могла быть ассоциирована с редкой мутацией, которая не включена в состав тест-системы.

Случаи, когда мутации, ассоциированные с ЛУ, были найдены, но изолят фенотипически оказался чувствительным, можно объяснить различной зависимостью между наличием мутации в определенном гене и степенью фенотипической устойчивости. Особенно это заметно на примере разных поколений фторхинолонов: в случае с офлоксацином мутации в 95,7% случаев (45 из 47) сопровождалась фенотипической устойчивостью микобактерий, в случае с левофлоксацином – в 44,7% (21 из 47), а в случае с моксифлоксацином – в 54,1% (20 из 37). По-видимому, некоторые мутации обуславливают минимальную ингибирующую концентрацию (МИК), близкую или равную критической концентрации препарата, поэтому, результат фенотипического ТЛЧ может оказаться ложночувствительным.

В случае с аминогликозидами необходимо учитывать, в каком именно гене были найдены мутации: при наличии мутации в гене *rrs* фенотипическая устойчивость к канамицину и амикацину была выражена в 100% случаев, а к капреомицину – в 83,3%. При наличии мутаций в гене *eis* чувствительность к канамицину была со-

хранена в 58,6% случаев, к амикацину – в 55,6%, а к капреомицину – в 85,7%.

Таким образом, согласно полученным нами результатам, данные о наличии мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к ПТП, можно использовать для назначения режима химиотерапии без проведения фенотипического тестирования в следующих случаях:

- наличие мутаций в гене *groB* во всех случаях приводит к устойчивости к рифампицину;
- наличие мутаций в гене *katG* во всех случаях приводит к устойчивости к изониазиду;
- наличие мутаций в генах *gyrA* и *gyrB* тесно ассоциировано с устойчивостью к офлоксацину;
- наличие мутаций в гене *rrs* тесно ассоциировано с устойчивостью к канамицину и амикацину.

Заключение

И фенотипические, и молекулярно-генетические методы показали, что подавляющее большинство изолятов *M. tuberculosis*, выделенных от пациентов с туберкулезным спондилитом, обладают как минимум МЛУ: 88,5% по данным культуральных методов, 70% по данным молекулярно-генетических методов.

Для рифампицина и изониазида можно выделить доминирующие мутации, ассоциированные с устойчивостью МБТ к этим препаратам: замена серина на лейцин в 531 кодоне гена *groB* для рифампицина и замена серина на треонин в 315 кодоне гена *katG* для изониазида.

Рифампицин, изониазид, офлоксацин, а также канамицин и амикацин (в случае мутаций в гене *rrs*) можно отнести к группе препаратов с высокой вероятностью совпадения данных о ЛУ, полученных фенотипическими и молекулярно-генетическими методами. В их случае не обязательно дополнительно фенотипически подтверждать информацию о ЛУ МБТ, полученную молекулярно-генетическими методами.

При обнаружении мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к фторхинолонам, необходимо уточнять фенотипическую устойчивость МБТ к левофлоксацину и моксифлоксацину. Также это необходимо делать для всех аминогликозидов и капреомицина в случае наличия мутаций в гене *eis*.

Благодарность

Авторы выражают благодарность директору УНИИФ – Красноборовой С.Ю., коллективу отделения микробиологии и ПЦР диагностики, а также коллективу отделения костно-суставного туберкулеза УНИИФ.

Литература

1. Korzeniewska-Koseta M. Tuberculosis in Poland in 2013. *Przegl Epidemiol.* 2015;69(2):277-393. PMID: 26233087.
2. Didilescu C., Tănăsescu M. Proportion and site distribution of extrapulmonary tuberculosis in 2007-2010 in Romania. *Pneumologia.* 2012;61(1):10-14. PMID: 22545482.
3. Sanches I., Carvalho A., Duarte R. Who are the patients with extrapulmonary tuberculosis? *Rev Port Pneumol.* 2015;21(2):90-93. DOI: 10.1016/j.rppnen.2014.06.010
4. Esteves S., Catarino I., Lopes D.S., Sousa C. Spinal tuberculosis: rethinking an old disease. *J Spine.* 2017;6:1-11. DOI: 10.4172/2165-7939.1000358
5. Clinical guidelines. Tuberculosis in adults, 2022. Available at: <https://edu.nmrc.ru/wp-content/uploads/2023/07/%D0%9A%D0%A016.pdf> Accessed December 05, 2023. Russian. (Клинические рекомендации. Туберкулез у взрослых, 2022. Доступно по адресу: <https://edu.nmrc.ru/wp-content/uploads/2023/07/%D0%9A%D0%A016.pdf> Ссылка активна на 05.12.2023 г.)
6. Ocheretina O., Escuyer V.E., Mabou M.M., Royal-Mardi G., Collins S., Vilbrun S.C., et al. Correlation between genotypic and phenotypic testing for resistance to rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Haiti: investigation of cases with discrepant susceptibility results. *PLoS One.* 2014;9(3):e90569. DOI: 10.1371/journal.pone.0090569
7. Thirumurugan R., Kathirvel M., Vallayyachari K., Surendar K., Samrot A.V., Muthaiah M. Molecular analysis of *rpoB* gene mutations in rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by multiple allele specific polymerase chain reaction in Puducherry, South India. *J Infect Public Health.* 2015;8(6):619-625. DOI: 10.1016/j.jiph.2015.05.003
8. Palomino J.C., Martin A. Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics (Basel).* 2014;3(3):317-340. DOI: 10.3390/antibiotics3030317
9. Zhang Y., Yew W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2015;19(11):1276-1289. DOI: 10.5588/ijtld.15.0389
10. Hameed H.M.A., Islam M.M., Chhotaray C., Wang C., Liu Y., Tan Y., et al. Molecular targets related drug resistance mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-*Mycobacterium tuberculosis* strains. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:114. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00114
11. Maus C.E., Plikaytis B.B., Shinnick T.M. Mutation of *tlyA* confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):571-577. DOI: 10.1128/AAC.49.2.571-577.2005
12. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 109 of March 21, 2003 «On Improvement of Anti-Tuberculosis Measures in the Russian Federation». Russian. (Приказ Министерства Здравоохранения Российской Федерации от 21 марта 2003 г. №109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».)