

Снижение уровня устойчивости к изониазиду у MDR/XDR штаммов *Mycobacterium tuberculosis*

Б.И. Вишнеvский, О.А. Маничева, М.З. Догонадзе,
О.Н. Куликова, Л.Н. Стеклова

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии

Decline of the resistance level to isoniazid in MDR/XDR *Mycobacterium tuberculosis* strains

B. Vishnevskiy, O. Manicheva, M. Dogonadze, O. Kulikova, L. Steklova

St. Petersburg Scientific Research Institute of Phthisiopulmonology

© Коллектив авторов, 2018 г.

Резюме

Продолжающийся рост множественной (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) возбудителя туберкулеза на фоне снижения эпидемиологической напряженности поднимает вопрос о том, не повышается ли при этом уровень устойчивости к изониазиду. Сравнивали частоту резистентности к высокой концентрации изониазида (10 мкг/мл) 942 штаммов *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) с полирезистентностью (ПР), МЛУ и ШЛУ, выделенных от больных туберкулезом органов дыхания в течение трех периодов: I — 2004–2006 гг. (период, близкий к пику заболеваемости туберкулезом в России), II — 2007–2011 гг. (промежуточный период), III — 2012–2017 гг. (период стабильного снижения заболеваемости). Методом REMA оценивали минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) изониазида для 41 изониазид-резистентного штамма Mtb, изолированных в течение 2014–2017 гг. Доля штаммов с высоким уровнем устойчивости к изониазиду (10 мкг/мл) имела тенденцию к снижению от I периода к III: 27,1% — 24,3% — 18,6%. Значимых отличий в частоте изолятов, устойчивых к изониазиду (10 мкг/мл) между ПР, МЛУ и ШЛУ штаммами Mtb в пределах каждого из периодов и среди ПР и МЛУ по периодам не обнаружено. В течение III периода в сравнении с первым значимо реже выявляли ШЛУ штаммы с высоким уровнем устойчивости к изониазиду — 20,4% против 36,4% ($\chi^2=3,883$; $p=0,049$). Определение МИК

изониазида для 41-го ПР, МЛУ, ШЛУ-изолята обнаружило значительный разброс уровня устойчивости к препарату — от 1,6 до 100 мкг/мл. Значимой разницы в доле штаммов с одинаковыми значениями МИК не было. 52,5% штаммов были резистентными к изониазиду в концентрациях менее 12,5 мкг/мл. Предполагается, что при внутривенном введении изониазида возможно достичь концентрации, превышающей пороговую для данного штамма, что может обеспечить повышение эффективности терапии МЛУ/ШЛУ туберкулеза, учитывая избирательность действия этого препарата.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, клинические штаммы, *in vitro*, лекарственная устойчивость, изониазид, периоды заболеваемости туберкулезом

Summary

The growth of multiple (MDR) and extensively drug resistance (XDR) of the tuberculosis causative agent continues on the background of epidemiological tension decrease. The question about change of the Mtb resistance level to isoniazid (H) is needed in reply. The frequency of the Mtb resistance to the H high concentrations (10 $\mu\text{g/ml}$) has been compared in the 3 periods: 1st — 2004–2006 (period near to the peak incidence of tuberculosis in Russia), 2nd — 2007–2011 (interim period), 3rd — 2012–2017 (period of stable decline in incidence). We have examined

942 poly-drug-resistant (PDR), MDR and XDR Mtb strains isolated from patients with pulmonary tuberculosis during these periods. Minimal inhibitory concentration (MIC) of H against 41 Mtb strains was tested by REMA. This H-resistant strains were isolated in 2014–2017. The proportion of strains resistant to H 10 µg/ml has been decreased slightly from 1st period to the third: 27.1% — 24.3% — 18.6%. Inside each of the periods significant differences in the frequency of isolates resistant to H 10 µg/ml between PDR, MDR and XDR-strains of Mtb were not revealed. Comparison of the frequency of high-resistant PDR- and MDR-strains between periods had not revealed differences. In the 3rd period XDR strains with a high level of resistance to H has been detected less frequently than in the first period — 20.4% versus 36.4% ($\chi^2=3.883$,

$p=0.049$). The detection of H MIC against 41 PDR, MDR, XDR isolates has been revealed a significant variability in the drug resistance level — up 1.6 to 100 µg/ml. It were no significant differences in the proportion of strains with the same MIC values. A resistance to H in concentrations of less than 12.5 µg/ml has been detected in 52.5% the strains. By intravenous medication of H it may be possible to achieve a concentration exceeding the threshold for the concrete strain, which can provide an increase in the effectiveness of therapy for MDR/XDR tuberculosis taking into consideration the selectivity of isoniazid action.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; clinical strains; in vitro; drug resistance; isoniazid, periods of tuberculosis incidence

Введение

Несмотря на отчетливое снижение заболеваемости, туберкулез остается одной из 10 ведущих причин смерти в мире. В 2016 г. туберкулезом заболели 10,4 млн человек, и 1,7 млн человек (в том числе 0,4 млн человек с ВИЧ) умерли от этой болезни. Основной проблемой является постоянное нарастание лекарственной резистентности *Mycobacterium tuberculosis*, особенно множественной (МЛУ) и широкой (ШЛУ) лекарственной устойчивости, которые обозначены как глобальная мировая угроза [1].

В работе П.К. Яблонского и соавт. [2] показано, что лекарственная резистентность *M. tuberculosis* с сопутствующим утяжелением ее структуры за счет МЛУ и ШЛУ неуклонно возрастает при всех локализациях туберкулеза.

МЛУ (MDR, multidrug-resistance) — это резистентность одновременно по крайней мере к изониазиду и рифампицину. **ШЛУ** (XDR, extremely drug-resistance) — это МЛУ плюс резистентность к любому из фторхинолонов и к любому из инъекционных противотуберкулезных препаратов (ППП) резервного ряда (канамицин, амикацин, капреомицин).

Для лечения МЛУ/ШЛУ туберкулеза в настоящее время из ППП первого ряда, где основными и непревзойденными по эффективности уже более 60 лет являются изониазид и рифампицин, рекомендуется применять только пиперазид и этамбутол [3, 4]. Особое место среди основных ППП занимает изониазид (H, от англ. Hydrazide of isonicotinic acid), поскольку, в отличие от рифампицина, он не является антибиотиком широкого спектра действия, не подавляет сопутствующую микрофлору, не применяется при неспецифических воспалительных заболеваниях (что чревато развитием устойчивости *M. tuberculosis* к ри-

фампицину) и избирательно действует только на микобактерии [4].

Многообещающим способом борьбы с множественной лекарственной устойчивостью является лекарственное восстановление чувствительности к антибиотикам. Однако недостаток знаний о механизмах реверсии лекарственной устойчивости затрудняет использование этого подхода в медикаментозной терапии [5]. Проведенное в этой работе секвенирование геномов показало, что реверсия лекарственной устойчивости может быть связана с общим увеличением генетической гетерогенности популяции *M. tuberculosis*.

Первые сведения о возвращении лекарственной чувствительности резистентных к изониазиду *M. tuberculosis* появились еще в 50–60-х годах прошлого века, но генетические механизмы реверсии тогда были неизвестны [6, 7].

В настоящее время хорошо известны мутации, ассоциированные с резистентностью к изониазиду, — это мутации в генах *katG*, *inhA*, *ahpC*. Мутации на уровне *inhA*, как правило, ассоциируются с низкой устойчивостью и наблюдаются реже, чем мутации в гене *katG*. Сочетание мутаций в генах *katG* и *inhA* приводит к повышению уровня устойчивости к изониазиду [8].

В работе E.T. Richardson и соавт. [9] генотипирование и тестирование на восприимчивость к лекарственным средствам показали, что изогенный штамм *M. tuberculosis* вернулся от изониазид-резистентного к чувствительному фенотипу в отсутствие терапии изониазидом. Генетическая основа этой реверсии была соотнесена с кодоном 300 гена *katG*, в результате того, что кодон GGG (глицин, G) возвращался в кодон дикого типа, TGG (триптофан, W). Это исследование подтверждает, что при отсутствии селекционного давления изониазида некоторые устойчивые к изониазиду

мутанты могут возвращаться к лекарственно-чувствительным фенотипам. Данный вывод может иметь более широкие последствия для оценки штаммов, устойчивых к изониазиду, и возможного применения его в клинической практике даже при наличии лекарственной резистентности [9].

Продолжающийся рост множественной и широкой лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза на фоне снижения эпидемиологической напряженности делает актуальным вопрос о частоте высокой степени лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* к изониазиду в последние годы.

Цель исследования

Сравнить частоту резистентности к высокой концентрации изониазида штаммов *M. tuberculosis* с МЛУ и ШЛУ, выделенных на высоте и при снижении заболеваемости туберкулезом, оценить минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) изониазида для резистентных к нему штаммов.

Материалы и методы исследования

Стандартным методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна–Йенсена определяли резистентность к изониазиду в критической (1 мкг/мл) и высокой (10 мкг/мл) концентрации. Исследовали 942 штамма *M. tuberculosis* с полирезистентностью (ПР, устойчивость к двум и более ПТП за исключением одновременной устойчивости к изониазиду и рифампицину), МЛУ и ШЛУ, выделенных от пациентов с туберкулезом органов дыхания (ТОД) в периоды 2004–2006 гг. (I — период близкий к пику заболеваемости туберкулезом в России), 2007–2011 гг. (II — промежуточный

период), 2012–2017 гг. (III — период стабильного снижения заболеваемости), соответственно 314, 526 и 102 штамма. Для оценки различий частоты штаммов, устойчивых к изониазиду в разных концентрациях, использовали критерий χ^2 .

Кроме этого, методом REMA (resazurin microplate assay) [10] *M. tuberculosis* в нашей модификации определяли МИК изониазида для 41 штамма *M. tuberculosis*, резистентных к изониазиду, выделенных в 2014–2017 гг. от больных ТОД. Конечные концентрации изониазида в лунках планшета 0,4–0,8–1,6–3,1–6,2–12,5–25–50–100 мкг/мл, среда — бульон Миддлбука 7Н9 с 10% OADC, объем среды в лунках 100 мкл. Суспензию штамма доводили до 1 ед. McFarland с помощью денситометра «Dencilametr», разводили питательной средой в 20 раз и вносили в лунки планшета по 100 мкл. После инкубации в течение 7 сут во все лунки планшета вносили по 30 мкл 0,01% водного раствора резазурина. Через сутки измеряли флуоресценцию резорурфина, который образуется при воздействии ферментов микобактерий на индикатор роста резазурин. Измерения проводили с помощью флюориметра FLUOstarOptima (длина волны возбуждения — 520 нм, излучения — 590 нм). По усредненным данным флуоресценции (в 8 лунках с каждым из разведений изониазида) строили график с помощью программы MS Excel. Точкой ингибиции роста *M. tuberculosis* считали точку выхода кривой на плато.

Результаты исследования

В табл. 1 представлены результаты тестирования резистентности *M. tuberculosis* к 10 мкг/мл изониазида по трем периодам.

Таблица 1

Чувствительность/устойчивость клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* к 10 мкг/мл изониазида в различные периоды заболеваемости туберкулезом

Тип резистентности	Число штаммов, абс. (%)								
	2004–2006			2007–2011			2012–2017		
	всего	чувствительные	устойчивые	всего	чувствительные	устойчивые	всего	чувствительные	устойчивые
Полирезистентные	35 (100,0)	29 (82,9)	6 (17,1)	44 (100,0)	36 (81,8)	8 (18,2)	7	7	0
МЛУ	212 (100,0)	159 (75,0)	53 (25,0)	245 (100,0)	191 (78,0)	54 (22,0)	41 (100,0)	33 (80,5)	8 (19,5)
ШЛУ	77 (100,0)	49 (63,6)	28* (36,4)	237 (100,0)	171 (72,2)	66 (27,8)	54 (100,0)	43 (79,6)	11* (20,4)
Всего	324 (100,0)	237 (73,1)	87 (26,9)	526 (100,0)	398 (75,7)	128 (24,3)	102 (100,0)	83 (81,4)	19 (18,6)

Примечания. Чувствительность/устойчивость по отношению к изониазиду в концентрации 10 мкг/мл в среде Левенштейна–Йенсена.
* $\chi^2=3,883$, $p=0,049$.

Таблица 2

Минимальная ингибирующая концентрация изониазида для лекарственно-устойчивых клинических штаммов *M. tuberculosis*

Штаммы <i>M. tuberculosis</i>	Число штаммов, абс. (%) с устойчивостью к изониазиду в концентрации, мкг/мл								
	0,4	0,8	1,6	3,1	6,2	12,5	25	50	100
Полирезистентные, абс.	0	0	0	0	1	0	0	0	0
МЛУ (n=12), абс. (%)	0	0	3 (25,0)	4 (33,3)	1 (8,3)	1 (8,3)	1 (8,3)	2 (16,7)	0
ШЛУ (n=28), абс. (%)	0	0	6 (21,4)	6 (21,4)	1 (3,6)	9 (32,1)	4 (14,3)	1 (3,6)	1 (3,6)

Из таблицы видно, что наблюдается отчетливая тенденция некоторого снижения доли штаммов с устойчивостью к изониазиду 10 мкг/мл от I периода к III: 26,9% — 24,3% — 18,6%, хотя значимой разницы между первым и последним периодами не выявлено ($\chi^2=2,927$; $p=0,087$). Значимых отличий в частоте штаммов *M. tuberculosis*, устойчивых к изониазиду 10 мкг/мл, между ПР, МЛУ и ШЛУ в пределах каждого из периодов также не обнаружено. I период: ПР — 27,1%, МЛУ — 25,0%, ШЛУ — 36,4% ($\chi^2=3,345$; $p=0,067$); II — соответственно 18,2, 22,0 и 27,8%; III — 0% (определена устойчивость на плотной среде только 7 ПР штаммов, все чувствительны к И в концентрации 10 мкг/мл), 19,5 и 20,4%. Сравнение частоты высокоустойчивых штаммов среди ПР и МЛУ по периодам разницы не выявило. Но при ШЛУ в течение III периода в сравнении с первым значимо реже выявляли штаммы с высоким уровнем устойчивости к изониазиду — 20,4% против 36,4% ($\chi^2=3,883$; $p=0,049$).

Данные определения МИК изониазида в жидкой питательной среде для 41 изониазид-резистентного изолята *M. tuberculosis* (в составе ПР, МЛУ, ШЛУ) представлены в табл. 2.

Проведенное исследование обнаружило значительный разброс уровня устойчивости к изониазиду — от 1,6 до 100 мкг/мл. МИК изониазида полирезистентного штамма, взятого для сравнения, была равна 6,2. Среди МЛУ штаммов (n=12) МИК препарата колебалась от 1,6 до 50 мкг/мл, среди ШЛУ — от 1,6 до 100 мкг/мл, однако значимой разницы в доле штаммов с одинаковым значением МИК не было. Но следует отметить, что суммарно (19 из 40) исследованных МЛУ и ШЛУ штаммов оказались устойчивыми только к высоким концентрациям изониазида (от 12,5 до 100 мкг/мл).

Заключение

Частота штаммов *M. tuberculosis* с высоким уровнем устойчивости к изониазиду (10 мкг/мл), опре-

деленным на плотной среде Левенштейна–Йенсена методом абсолютных концентраций, имеет тенденцию к снижению от периода 2004–2006 гг. (период, близкий к пику заболеваемости туберкулезом в России) к периоду 2012–2017 гг. (стабильное снижение показателей) на 8,4% при неуклонном росте МЛУ и ШЛУ. Значимые различия в частоте высокорезистентных изолятов выявлены в III периоде в сравнении с первым для штаммов с ШЛУ: этот параметр значимо снизился на 16,0% ($p=0,049$). На жидкой среде значения МИК изониазида для штаммов, выделенных в 2014–2017 гг., колебались в широких пределах (1,6–100 мкг/мл), значимой разницы в распределении уровней МИК между МЛУ и ШЛУ изолятами не выявлено. Но более половины (52,5%) из исследованных МЛУ/ШЛУ штаммов *M. tuberculosis* оказались резистентными только к низким концентрациям изониазида — менее 12,5 мкг/мл. Это доказывает необходимость тестирования лекарственной чувствительности изониазида не только к критической концентрации (1 мкг/мл), но и к высокой — 10 мкг/мл. Как показала клиническая практика СПбНИИФ, внутривенное введение изониазида позволяет достичь в крови больного концентрацию препарата, превышающую критическую, и повысить эффективность лечения [11]. Изониазид в настоящее время не применяется для лечения МЛУ/ШЛУ туберкулеза, и полученные данные о снижении количества штаммов с высокой резистентностью к этому препарату могут быть свидетельством реверсии устойчивости к изониазиду. Для более убедительного обоснования применения изониазида в индивидуализированной химиотерапии неоценимую помощь может оказать БАК-проба (определение бактериостатической активности крови), или, более корректно, туберкулостатическая проба [12]. Обнаружение молекулярно-генетическими методами только мутации в гене *inhA* также может свидетельствовать о резистентности к изониазиду в низких концентрациях.

Список литературы

1. Туберкулез. Информационный бюллетень ВОЗ. Октябрь 2017 г. [Tuberculosis. Fact sheet. October 2017. Tuberkulez. Informacionnyj byulleten' VOZ. Oktyabr' 2017 g. Tuberculosis. Fact sheet. October 2017 (In Russ.)]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>
2. Яблонский П.К., Вишневецкий Б.И., Соловьева Н.С. и др. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза при различных локализациях заболевания // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 2. С. 133–140. [Yablonskiy P.K., Vishnevskiy B.I., Solov'eva N.S. i dr. Lekarstvennaya ustojchivost' mikobakterij tuberkuleza pri razlichnyh lokalizacijah zabolevanija // Infekcija i immunitet. 2016. T. 6, N 2. S. 133–140 (In Russ.)]. doi: 10.15789/2220-7619-2016-2-133-140.
3. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. 3-е изд. М.: РОФ, 2015. 68 с. [Federal'nye klinicheskie rekomendacii po diagnostike i lecheniju tuberkuleza organov dyhanija s mnozhestvennoj i shirokoj lekarstvennoj ustojchivost'ju vozбудitelja. 3-e izdanie. Moscow: Izdatel'stvo ROF, 2015. 68 s. (In Russ.)]. http://roftb.ru/netcat_files/doks2015/rec2.pdf
4. Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации / под ред. П.К. Яблонского. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. С. 112–143. [Ftiziatrija. Nacional'nye klinicheskie rekomendacii / pod red. P.K. Yablonskogo. Moscow: Izdatel'stvo GEOTAR-Media, 2015. S. 112–143 (In Russ.)]. <http://www.spbniif.ru/tmpaa2f.pdf>.
5. Ilin A.I., Kulmanov M.E., Korotetskiy I.S. et al. Genomic Insight into Mechanisms of Reversion of Antibiotic Resistance in Multidrug Resistant Mycobacterium tuberculosis Induced by a Nanomolecular Iodine-Containing Complex FS-1 // Front. Cell Infect. Microbiol. 2017. Vol. 8, N 7. P. 151. doi: 10.3389/fcimb.2017.00151.
6. Ishikawa T. Clinical observation on reversion of isoniazid resistance // Kekkaku. 1955. Vol. 30, N 4. P. 183–189.
7. Stewart S.M. Reversion to drug sensitivity in tubercle bacilli // Tubercle. 1966. Vol. 47, N 2. P. 190–197.
8. Zhang Y., Yew W.W. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2009. Vol. 13, N 11. P. 1320–1330.
9. Richardson E.T., Lin S.Y., Pinsky B.A. et al. First documentation of isoniazid reversion in Mycobacterium tuberculosis // Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2009. Vol. 13, N 11. P. 1347–1354.
10. Palomino J., Martin A., Camacho M. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis // Antimicrobail Agents and Chemotherapy. 2002. Vol. 46, N 8. P. 2720–2722. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720>.
11. Репин Ю.М. Лекарственно-устойчивый туберкулез легких. Хирургическое лечение. СПб.: Гиппократ, 2007. 230 с. [Repin Ju.M. Lekarstvenno-ustojchivij tuberkulez legkih. Hirurgicheskoe lechenie. Saint Petersburg: Izdatel'stvo Gippokrat, 2007. 230 s. (In Russ.)].
12. Маничева О.А., Павлова М.В., Сапожникова Н.В. и др. Контроль химиотерапии больных туберкулезом органов дыхания с помощью БАК-пробы // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2008. Т. 86, № 5. С. 14–17. [Manicheva O.A., Pavlova M.V., Sapozhnikova N.V. i dr. Kontrol' himioterapii bol'nyh tuberkulezom organov dyhanija s pomoshh'ju BAK-proby // Problemy tuberkuleza i boleznej legkih. 2008. T. 86, N 5. S. 14–17 (In Russ.)].

Поступила в редакцию 29.08.2018 г.

Сведения об авторах:

Вишневецкий Борис Израилевич — доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; e-mail: bivish@rambler.ru;

Маничева Ольга Алексеевна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; e-mail: olgamanicheva@rambler.ru;

Догонадзе Марине Зауриевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; e-mail: marine-md@mail.ru;

Куликова Олеся Николаевна — врач-бактериолог Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; e-mail: O.ZUBRIY.N@yandex.ru;

Стеклова Лидия Николаевна — врач-бактериолог Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; e-mail: list-26-10@mail.ru.