

ИЗОНИАЗИД-РЕЗИСТЕНТНЫЕ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ, СПЕКТРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ УСТОЙЧИВОСТИ

С. Н. Андреевская ✉, Т. Г. Смирнова, Е. Е. Ларионова, И. Ю. Андриевская, Л. Н. Черноусова, А. Эргешов

Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

Отсутствие ускоренной диагностики туберкулеза с устойчивостью возбудителя к изониазиду с сохраненной чувствительностью к рифампицину (ИР-ТБ) может быть причиной низкой эффективности терапии и приводить к амплификации лекарственной резистентности, в том числе к формированию множественной лекарственной устойчивости. Целью работы было определить частоту встречаемости ИР-ТБ в современной популяции, охарактеризовать фенотипическую чувствительность и генетические детерминанты устойчивости к изониазиду представителей этой группы *M. tuberculosis* на репрезентативном материале. Анализировали результаты определения лекарственной чувствительности, полученные при исследовании молекулярно-генетическими и/или культуральными методами изолятов *M. tuberculosis* / ДНК *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких из клинических отделений Центрального научно-исследовательского института туберкулеза за период 2011–2018 гг. Частота ИР-ТБ составила 12% от всех выявленных случаев туберкулеза. *M. tuberculosis* с ИР были как монорезистентными к изониазиду (45%), так и полирезистентными (устойчивыми к 2–6 противотуберкулезным препаратам), а устойчивость к изониазиду была обусловлена мутациями в гене *katG*, приводящими к высокому уровню резистентности. На основании анализа литературных данных и собственных наблюдений подчеркивается важность разработки и внедрения новых простых молекулярных тестов для определения устойчивости одновременно к рифампицину и изониазиду.

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, изониазид-резистентность, лекарственная чувствительность, молекулярная диагностика, однонуклеотидный полиморфизм, туберкулез

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», соглашение № 05.586.21.0065 (уникальный идентификатор соглашения RFMEF158619X0065).

Вклад авторов: А. Эргешов, Л. Н. Черноусова — разработка дизайна исследования; Е. Е. Ларионова, И. Ю. Андриевская — получение данных для анализа; Т. Г. Смирнова — анализ полученных данных; С. Н. Андреевская — написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи; все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Соблюдение этических стандартов: был проведен ретроспективный анализ результатов, полученных при выполнении рутинных лабораторных исследований для пациентов, проходящих лечение в Центральном НИИ туберкулеза; все пациенты подписали добровольное информированное согласие на проведение исследования.

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

Статья получена: 11.12.2019 **Статья принята к печати:** 07.01.2020 **Опубликована онлайн:** 12.01.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.001

ISONIAZID-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: PREVALENCE, RESISTANCE SPECTRUM AND GENETIC DETERMINANTS OF RESISTANCE

Andreevskaya SN ✉, Smirnova TG, Larionova EE, Andrievskaya IYu, Chernousova LN, Ergeshov A

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

The lack of simple, rapid diagnostic tests for isoniazid-resistant rifampicin-susceptible tuberculosis infection (Hr-TB) can result in low treatment efficacy and further amplification of drug resistance. Based on the clinical data, this study sought to estimate the prevalence of Hr-TB in the general population and characterize the phenotypic susceptibility and genetic determinants of isoniazid resistance in *M. tuberculosis* strains. Molecular-genetic and culture-based drug susceptibility tests were performed on *M. tuberculosis* isolates and *M. tuberculosis* DNA obtained from the patients with pulmonary TB undergoing treatment at the Central Tuberculosis Research Institute between 2011 and 2018. The tests revealed that Hr-TB accounted for 12% of all TB cases in the studied sample. Hr-TB strains were either resistant to isoniazid only (45%) or had multiple resistance to 2–6 anti-TB agents. Resistance to isoniazid was caused by mutations in the *katG* gene. Based on the literature analysis and our own observations, we emphasize the importance of developing simple molecular drug susceptibility tests capable of detecting simultaneous resistance to rifampicin and isoniazid and the necessity of their translation into clinical practice.

Keywords: *M. tuberculosis*, isoniazid resistance, drug susceptibility, molecular diagnostics, single nucleotide polymorphism, tuberculosis

Funding: this study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and carried out under the Federal Targeted Program for Research and Development in Priority Areas of Development of the Russian Scientific and Technological Complex for 2014–2020, Project № 05.586.21.0065 (Project ID RFMEF158619X0065).

Author contribution: Ergeshov A, Chernousova LN — study design; Larionova EE, Andrievskaya IYu — data acquisition; Smirnova TG — data analysis; Andreevskaya SN — manuscript preparation, literature analysis. All authors have equally contributed to the discussion of the obtained results.

Compliance with ethical standards: we retrospectively analyzed the results of routine laboratory tests performed on the patients undergoing treatment for tuberculosis at the Central Tuberculosis Research Institute. All patients gave informed consent.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sofya N. Andreevskaya
Yauzskaya alley, 2, Moscow, 107564; andsofia@mail.ru

Received: 11.12.2019 **Accepted:** 07.01.2020 **Published online:** 12.01.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.001

Лекарственно-устойчивый туберкулез (ТБ) представляет собой серьезную проблему для здравоохранения. Основное внимание в настоящее время сосредоточено на борьбе с

туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ), т. е. туберкулезом такой формы, при которой возбудитель устойчив одновременно к двум наиболее

эффективным противотуберкулезным препаратам (ПТП) — изониазиду и рифампицину [1]. Россия занимает третье место в мире по распространенности МЛУ ТБ [2]. В 2018 г. показатели заболеваемости и распространенности МЛУ ТБ в РФ стабилизировались и составили соответственно 5,6 и 23,6 на 100 000 человек населения. При этом доля пациентов с МЛУ ТБ среди бактериовыделителей увеличилась (с 27,4% в 2017 г. до 29,3% в 2018 г. среди новых случаев ТБ и с 54,0% в 2017 г. до 55,3% в 2018 г. среди всех пациентов с ТБ органов дыхания, выделяющих микобактерии туберкулеза) [3].

На этом фоне другим формам резистентности уделяют недостаточное внимание. Одной из таких форм, выделяемых ВОЗ в отдельную группу, является туберкулез, резистентный к изониазиду (Hr-TB, ИР-ТБ), который характеризуется устойчивостью возбудителя к изониазиду и чувствительностью к рифампицину [4]. Изониазид — ПТП 1-го ряда, высокоэффективный для лечения активного туберкулеза, оказывающий бактерицидное воздействие на *M. tuberculosis*. Фенотипическая резистентность к изониазиду ассоциирована с мутациями в ряде генов (*katG*, *inhA*, *ahpC* и др.), продукты которых вовлечены в фармакокинетику и фармакодинамику изониазида в бактериальной клетке [5, 6].

Неадекватная терапия ИР-ТБ создает высокие риски для формирования приобретенной лекарственной устойчивости к другим противотуберкулезным препаратам, в том числе к рифампицину, приводя к развитию МЛУ [7]. По данным ВОЗ, распространенность ИР-ТБ составляет 5–11% в зависимости от региона [8]. Сведений о распространенности ИР-ТБ в России недостаточно.

Цель исследования: охарактеризовать частоту встречаемости ИР *M. tuberculosis*, выделенных у больных туберкулезом легких из клинических отделений ФГБНУ «ЦНИИТ» за период 2011–2018 гг., дать расширенную характеристику фенотипической чувствительности и описать генетические детерминанты устойчивости к изониазиду этой группы *M. tuberculosis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Исследовали клинические изоляты *M. tuberculosis* и/или ДНК *M. tuberculosis*, выделенные из диагностического материала, полученного от каждого пациента, поступившего в консультационное и клинические отделения ФГБНУ «ЦНИИТ» (за период 2011–2018 гг.). Все виды микробиологических исследований проводили из одной порции диагностического материала.

Культуральная диагностика

Выявление *M. tuberculosis* проводили на жидкой среде Middlebrook 7H9 в системе BACTEC MGIT 960 (BD; USA) согласно стандартному протоколу изготовителя [9]. Фенотипическую лекарственную чувствительность определяли модифицированным методом пропорций в системе BACTEC MGIT 960 (BD; США) к восьми противотуберкулезным препаратам в критических концентрациях: изониазид (И, 0,1 мкг/мл), рифампицин (R, 1,0 мкг/мл), этамбутол (Е, 5,0 мкг/мл), пипразинамид (Z, 100,0 мкг/мл), этионамид (Ето, 5,0 мкг/мл), амикацин (Ам, 1,0 мкг/мл), капреомицин (См 2,5 мкг/мл) и левофлоксацин (Lfx 1,0 мкг/мл) согласно стандартным процедурам [9, 10].

Выделение ДНК

ДНК выделяли из диагностического материала набором реагентов «Амплитуб-РВ» для выделения, обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР в реальном времени, комплект № 1 («Синтол»; Россия), согласно инструкции производителя.

ДНК *M. tuberculosis* определяли с использованием набора реагентов «Амплитуб-РВ» для выделения, обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР в реальном времени, комплект № 2 («Синтол»; Россия), согласно инструкции производителя. Амплификацию проводили в термоциклере с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad; США).

Определение генотипической ЛУ к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам проводили или с использованием микрочиповой технологии с наборами «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» («БИОЧИП-ИМБ»; Россия), или с использованием наборов «Амплитуб-МЛУ-РВ» и «Амплитуб-FQ-РВ» («Синтол»; Россия). Процедуры осуществляли согласно инструкциям производителей.

Статистическая обработка результатов

При оценке результатов исследования использовали описательную статистику: количество наблюдений, частота, доля (в %), 95%-й доверительный интервал (95% ДИ). Весь анализ проводили с использованием MS Excel (Microsoft; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были проведены культуральные и молекулярно-генетические исследования диагностического материала от 4056 больных туберкулезом легких. В 71 случае ни ДНК *M. tuberculosis*, ни культура *M. tuberculosis* не были выделены; эти случаи были исключены из исследования. Из оставшихся 3985 образцов диагностического материала были выделены ДНК и/или культуры *M. tuberculosis* и определена фенотипическая/генотипическая чувствительность к ПТП. При получении результатов для клинических изолятов *M. tuberculosis* и культуральным, и молекулярно-генетическим методом (МГМ), в случае их несовпадения, приоритет отдавался данным, полученным культурально (табл. 1). Так, 38 штаммов, для которых при исследовании культуральным методом была определена устойчивость одновременно к изониазиду и рифампицину, но не были определены мутации в *groV*, обуславливающей устойчивость к рифампицину, были отнесены к категории МЛУ, так как использованные нами тесты для молекулярно-генетического определения ЛУ фиксируют только ограниченное число мутаций, поэтому генетические детерминанты устойчивости к рифампицину в этих случаях могли быть не выявлены. И наоборот, 29 штаммов с выявленными мутациями в *groV*, которые не имели фенотипического проявления в виде формирования устойчивости к рифампицину, были отнесены к категории ИР.

Среди устойчивых штаммов доминировали штаммы с МЛУ (см. табл. 1), однако штаммы с устойчивостью к изониазиду при сохраненной чувствительности к рифампицину также были достаточно широко представлены (502/3985; 12,60%).

Исследование динамики выявления *M. tuberculosis* с ИР за период 2011–2018 гг. показало, что в 2011–2012 и 2017–2018 гг. частота выявления ИР-ТБ среди всех исследованных за год случаев туберкулеза составила около 14%. В 2013–2016 гг. частота выявления этой формы ТБ была ниже (на уровне 10–11%). Линейный тренд показателя с достаточной степенью надежности описать не удалось (табл. 2).

Так как культуральные методы диагностики туберкулеза обладают меньшей чувствительностью, чем молекулярно-генетические, часть образцов не дали рост культуры *M. tuberculosis* на питательных средах. Поэтому фенотипическая чувствительность к ПТП была определена только для 260 изолятов *M. tuberculosis* с ИР (табл. 3). При классификации по характеру лекарственной резистентности изолятов *M. tuberculosis* с ИР опирались на следующие определения [1]: монорезистентность — устойчивость микобактерий туберкулеза только к одному из ПТП; полирезистентность — устойчивость микобактерий туберкулеза к двум и более противотуберкулезным препаратам, но не к сочетанию изониазида и рифампицина.

Изоляты с моноустойчивостью к изониазиду выделяли в 117/260 (45%) случаев. Остальные 143 (55%) образца относились к полирезистентным и были устойчивы к 2–6 препаратам. Среди полирезистентных изолятов приблизительно в равных долях обнаружены *M. tuberculosis* с устойчивостью к изониазиду в комбинации только с ПТП 1-го ряда (42/143; 29,37%) и в комбинации только с ПТП 2-го ряда (38/143; 26,57%), причем во втором случае почти всегда регистрировали устойчивость к этионамиду (31/38; 81,58%). Наибольшее число полирезистентных изолятов было устойчиво одновременно к препаратам 1-го и 2-го рядов (63/143; 44,06%). Из них устойчивость

одновременно к изониазиду, этамбутолу и этионамиду (HEEtO), в том числе в сочетании с другими ПТП 2-го ряда, была выявлена в 20/63 (31,75%) случаев; устойчивость к изониазиду, пиразинамиду и этионамиду (HZEto), в том числе в сочетании с другими ПТП 2-го ряда, встречалась реже — в 9/63 (14,29%) случаев; и устойчивость к HEZEto — в 15/63 (23,81%) случаев. У 19/63 (30,16%) изолятов в спектрах резистентности были представлены другие сочетания препаратов (12 спектров резистентности, включающих от 3 до 5 ПТП).

Данные о мутациях в генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, были получены для 451 изолята *M. tuberculosis* с ИР (табл. 4). Чаще всего выявляли единичные однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) в одном из генов, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, — в 386/451 (85,59%) случаев; реже ОНП обнаруживали в двух генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, — в 65/451 (14,41%) случаев. Доминировали мутации в 315-м кодоне *katG* — 413/451 (91,57%), причем только в этом гене — в 348/413 (84,26%) случаев, реже в сочетании с ОНП в *inhA* — в 62/413 (15,01%) случаев, в единичных образцах — в сочетании с ОНП в *ahpC*.

Достаточно часто (94/451; 20,84%) регистрировали замену *inhA15_C->T*, которая в виде единичной мутации встречалась в 33/94 (35,11%) образцов, в остальных случаях эта мутация была сочетанной с ОНП в 315 кодоне *katG*.

Для 209 изолятов *M. tuberculosis* с ИР, устойчивость к изониазиду была подтверждена фенотипически, получили подобное распределение мутантных вариантов: 152/209 (72,73%) имели единичную мутацию *katG315_Ser->Thr(1)*; 32/209 (15,31%) — сочетанные мутации

Таблица 1. Исследованные изоляты *M. tuberculosis* и методы установления лекарственной чувствительности

Характер лекарственной устойчивости	Число изолятов, для которых получены данные о лекарственной чувствительности методами (абс.)			Суммарное число изолятов <i>M. tuberculosis</i> , отнесенное к каждой категории на основании МГМ и культуральных методов	
	МГМ и культуральным	Только культуральным	Только МГМ	абс.	% (95% ДИ)
Чувствительные	478	207	673 ¹⁾	1358	34,08 (32,62–35,56)
МЛУ	1179 ²⁾	256	613	2048	51,39 (49,84–52,94)
ИР	209 ³⁾	51	242	502	12,60 (11,60–13,66)
Другие варианты ⁴⁾	42	23	12	77	1,93 (1,55–2,41)
Всего	1908	537	1540	3985	100

Примечание: ¹⁾ — включены случаи, для которых не выявлены мутации в генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам; ²⁾ — включая 38 изолятов *M. tuberculosis*, для которых не были выявлены мутации в *groV* (см. текст); ³⁾ — включая 29 изолятов *M. tuberculosis*, имеющих мутации в *groV* без фенотипического проявления в виде формирования устойчивости; ⁴⁾ — моноустойчивость к противотуберкулезным препаратам, кроме изониазида, или полирезистентность к противотуберкулезным препаратам, не включающая изониазид.

Таблица 2. Частота выявления *M. tuberculosis* с ИР за период 2011–2018 г.

Год	Число изолятов <i>M. tuberculosis</i>	
	Всего исследовано за год (абс.)	с ИР
		абс. % (95% ДИ)
2011	458	67 14,63 (11,69–18,16)
2012	355	52 14,65 (11,35–18,70)
2013	530	54 10,19 (7,89–13,06)
2014	554	65 11,73 (9,31–14,68)
2015	569	65 11,42 (9,06–14,30)
2016	502	56 11,16 (8,69–14,21)
2017	557	76 13,64 (11,04–16,75)
2018	460	67 14,57 (11,64–18,08)

katG315_Ser->Thr(1) + inhA15_C->T; 17/209 (8,13%) — единичную *inhA15_C->T*. Оставшиеся 8 (3,83%) изолятов с подтвержденной фенотипической ИР несли мутации в других регионах генов, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду (единичные в *ahpC10_C->T*, *katG315_Ser->Asn*; сочетанные *katG315_Ser->Gly + inhA15_C->T*, *katG315_Ser->Thr(1) + inhA8_T->G*; *katG315_Ser->Thr(1) + ahpC10_C->T*).

Таким образом, среди *M. tuberculosis* с ИР доминирующей мутацией была единичная мутация *katG315_Ser->Thr(1)*, которая соответствует нуклеотидной замене AGC->ACC (333/451; 73,84%), далее по убыванию выявлены сочетанные мутации *katG315_Ser->Thr(1) + inhA15_C->T* (60/451; 13,30%) и единичная мутация *inhA15_C->T* (33/451; 7,32%). В целом, на долю этих трех мутантных вариантов приходилось 426/451 (94,46%) *M. tuberculosis* с ИР.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучена частота встречаемости устойчивости к изониазиду с сохраненной чувствительностью к рифампицину у *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких из клинических отделений ФГБНУ «ЦНИИТ» за период 2011–2018 гг.

Частота встречаемости этой формы ТБ и динамика распространения популяции в разных регионах мира имеют свою специфику. Так, при анализе данных по лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза, представленных в ВОЗ за период 1994–2009 гг. из 131-го противотуберкулезного учреждения со всего мира, наибольшая частота встречаемости ИР-ТБ была зарегистрирована в Восточной Европе (15%), меньше — в Западной и Центральной Европе (11%), а в остальных регионах ВОЗ не превышала 8% [11]. Для ряда регионов этими авторами была показана тенденция к снижению распространенности данной формы туберкулеза, для других, напротив, повышение, но в большинстве регионов не было установлено четкой линейной динамики показателя. Описанная нами частота встречаемости ИР *M. tuberculosis* (12%) сходна с показателями, характерными для Восточной Европы, а динамика показателя, также как в большинстве регионов, была нелинейной.

В систематическом обзоре, посвященном связи первичной резистентности к изониазиду с приобретением резистентности к другим ПТП [12], было сделано заключение, что приобретенная устойчивость к любому ПТП (не только переход в МЛУ) у моноустойчивых к изониазиду штаммов возникает в 5,1 раз чаще по сравнению с лекарственно-чувствительными штаммами. Показанная в нашем исследовании высокая частота встречаемости полирезистентных штаммов (55% от всех ИР), устойчивых кроме изониазида дополнительно к 1–5 ПТП, подтверждает возможность амплификации лекарственной устойчивости у *M. tuberculosis* с ИР.

Так как стандартный курс химиотерапии по I режиму, часто назначаемый эмпирически при новых случаях туберкулеза, включает в себя ПТП 1-го ряда — этамбутол и пипразинамид, логично было ожидать выявление высокой доли устойчивости *M. tuberculosis* с ИР именно к этим препаратам. Действительно, устойчивость к этамбутолу была выявлена почти у половины полирезистентных *M. tuberculosis* (70/143, 48,95%; 95% ДИ: 40,89–57,06%) и чуть реже регистрировали устойчивость к пипразинамиду (57/143, 39,86%; 95% ДИ: 32,20–48,05%).

Однако еще чаще у полирезистентных *M. tuberculosis* определяли устойчивость к препарату 2-го ряда этионамиду (80/143, 55,94%; 95% ДИ: 47,76–63,82%). Полученный результат можно объяснить тем, что этионамид является структурным аналогом изониазида и также угнетает синтез миколовых кислот, нарушая построение клеточной стенки микобактерий, поэтому эти два препарата могут иметь общие мишени и генетические детерминанты устойчивости [5, 13].

Таблица 3. Спектры резистентности штаммов *M. tuberculosis*, принадлежащих к категории ИР

Спектр резистентности	Число штаммов <i>M. tuberculosis</i>	
	абс.	% (95% ДИ)
Монорезистентность (H)	117	45,00 (39,07–51,08)
Полирезистентность (H + другие ПТП, кроме R):	143	55,00 (48,95–61,05)
К двум ПТП:	71	27,31 (22,25–33,02)
HE	17	
HZ	16	
H Eto	31	
H Am	3	
H Cp	1	
H Lfx	3	
К трем ПТП:	36	13,85 (10,17–18,57)
HEZ	9	
HE Eto	13	
HE Lfx	1	
HZ Cp	1	
HZ Eto	7	
H AmCp	2	
H EtoAm	3	
К четырем ПТП:	21	8,08 (5,34–12,03)
HEZ Eto	6	
HEZ Am	1	
HEZ Lfx	3	
HE AmCp	2	
HE EtoAm	4	
HE EtoLfx	2	
HZ EtoCp	1	
H EtoAmCp	1	
H AmCpLfx	1	
К пяти ПТП:	12	4,62 (2,66–7,89)
HEZ EtoAm	2	
HEZ EtoLfx	4	
HEZ AmCp	2	
HE EtoAmLfx	1	
HZ AmCpLfx	1	
HZ EtoAmLfx	1	
H EtoAmCpLfx	1	
К шести ПТП:	3	1,15 (0,39–3,34)
HEZ EtoAmCp	2	
HEZ EtoAmLfx	1	
Всего	260	100

Примечание: при перечислении препаратов в спектрах резистентности препараты 1-го и 2-го рядов разделены пробелом.

Таблица 4. Изоляты *M. tuberculosis* с ИР с различными сочетаниями мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду

Мутации в <i>katG</i>			Не выявлены	В 315-м кодоне с заменой Ser на					Всего
				Arg	Asn	Gly	Thr(1)*	Thr(2)*	
Не выявлены мутации в <i>ahpC</i> и <i>inhA</i>			–	4 (0,89; 0,35–2,26)	7 (1,55; 0,75–3,17)	3 (0,67; 0,23–1,94)	333 (73,84; 69,59–77,68)	1 (0,22; 0,04–)	348 (77,16; 73,07–80,80)
В <i>ahpC</i> с заменой нуклеотида в позиции	6	G→A	–	–	–	–	1 (0,22; 0,04–1,25)	–	1 (0,22; 0,04–1,25)
	10	C→A	1 (0,22; 0,04–1,25)	–	–	–	–	–	1 (0,22; 0,04–1,25)
		C→T	1 (0,22; 0,04–1,25)	–	–	–	1 (0,22; 0,04–1,25)	–	2 (0,44; 0,12–1,60)
	12	C→T	–	–	–	–	1 (0,22; 0,04–1,25)	–	1 (0,22; 0,04–1,25)
В <i>inhA</i> с заменой нуклеотида в позиции	8	T→A	2 (0,44; 0,12–1,60)	–	–	–	–	–	2 (0,44; 0,12–1,60)
		T→G	–	–	–	–	1 (0,22; 0,04–1,25)	–	1 (0,22; 0,04–1,25)
	15	C→G	1 (0,22; 0,04–1,25)	–	–	–	–	–	1 (0,22; 0,04–1,25)
		C→T	33 (7,32; 5,26–10,10)	–	–	1 (0,22; 0,04–1,25)	60 (13,30; 10,48–16,75)	–	94 (20,84; 17,35–24,83)
Всего			38 (8,43; 6,20–11,35)	4 (0,89; 0,35–2,26)	7 (1,55; 0,75–3,17)	4 (0,89; 0,35–2,26)	397 (88,03; 84,70–90,71)	1 (0,22; 0,04–1,25)	451 (100)

Примечание: серым цветом выделены ячейки с ОНП только в одном гене, ассоциированном с устойчивостью к изониазиду, в других ячейках — сочетанные мутации. * Thr(1) соответствует замене AGC→ACC, Ser→Thr(2) соответствует замене AGC→ACA.

В целом, терапия ИР форм ТБ препаратами 1-го ряда по стандартной схеме приводит к неоптимальным результатам терапии (неэффективное лечение, рецидивы, приобретенная МЛУ). Кроме того, стандартизованное эмпирическое лечение ИР-ТБ может в значительной степени способствовать развитию эпидемии ТБ с МЛУ, особенно в тех регионах, где часто встречается ИР-ТБ [7]. В то же время своевременная коррекция терапии при получении данных о наличии устойчивости к изониазиду и применение модифицированных схем гарантировали успех лечения и не приводили к рецидивам [14–16].

В связи с этим следует упомянуть два клинических исследования, задачей которых было установить зависимость от мутаций в геноме возбудителя эффективности терапии высокими дозами изониазида ИР формы ТБ [17, 18]. Известно, что мутации в *katG* (доминировали в нашем исследовании) приводят к высокому уровню резистентности к изониазиду, а мутации только в *inhA* — к низкому уровню резистентности [5]. По итогам клинических исследований, терапия изониазидом была эффективна в том случае, если у возбудителя выявляли мутации на уровне *inhA*, а неблагоприятные исходы лечения были при мутациях на уровне *katG* [17, 18].

Все вышесказанное свидетельствует о том, что необходима отработка эффективных схем терапии ИР-ТБ [8, 19]. Кроме того, важно уделять внимание ускоренной диагностике ЛУ к изониазиду. Быструю специфичную и чувствительную диагностику ЛУ *M. tuberculosis* могут обеспечить только молекулярно-генетические методы (1–2 дня по сравнению с несколькими неделями культуральной диагностики), которые также дают возможность получить информацию о мутации и об уровне резистентности к изониазиду возбудителя [1]. Это делает МГМ наиболее востребованными в диагностике туберкулеза и определении лекарственной устойчивости возбудителя. Применяемые в крупных диагностических центрах фтизиатрического профиля тесты, основанные на аллель-специфичной ПЦР, биочипах или ДНК-стрипах,

позволяют провести диагностику в кратчайшие сроки, но предъявляют высокие требования к квалификации персонала и инфраструктуре лабораторий.

В настоящее время единственным молекулярным тестом, который можно применять в лабораториях всех уровней, является Xpert MTB/RIF на платформе GeneXpert [20]. Но так как диагностика сегодня сосредоточена на выявлении МЛУ, маркером которой служит устойчивость к рифампицину, этот тест диагностирует только генотипическую устойчивость к рифампицину. Следовательно, устойчивость только к изониазиду без устойчивости к рифампицину (12% в нашем случае) не будет определена с использованием этого метода диагностики, а при невозможности применения дополнительных диагностических тестов никогда не будет установлена и, следовательно, из-за неадекватной химиотерапии может способствовать появлению новых случаев МЛУ. Поэтому актуальна разработка простого молекулярно-генетического теста, который может быть внедрен повсеместно и по удобству использования будет подобен Xpert MTB/RIF.

Выводы

Туберкулез с ИР возбудителя можно рассматривать как потенциального предшественника туберкулеза с МЛУ. Поэтому важно контролировать распространение первичной устойчивости к изониазиду и предотвращать амплификацию устойчивости. Анализ частоты встречаемости устойчивости к изониазиду с сохраненной чувствительностью к рифампицину у *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких, показал достаточно высокий уровень встречаемости ИР-ТБ (более 12% от всех проанализированных случаев) — как правило с мутациями, приводящими к высокому уровню резистентности к изониазиду. Полученные данные подчеркивают важность ускоренного определения молекулярно-генетическими методами лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* одновременно к рифампицину и изониазиду в лабораториях

всех уровней. Для обеспечения этой возможности необходима разработка новых простых тестов в формате

point-of-care, не предъявляющих высоких требований к инфраструктуре лаборатории.

Литература

1. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2014 № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».
2. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. (WHO/CDS/TB/2018.20).
3. Нецаева О. Б. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России. Туберкулез и болезни легких. 2018; 96 (8): 15–24.
4. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization; 2019 (WHO/CDS/TB/2019.33).
5. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2009; (13): 1320–30.
6. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. PLoS Med. 2009; 6 (2): e2.
7. Gegia M, Winters N, Benedetti A, van Soolingen D, Menzies D. Treatment of isoniazid-resistant tuberculosis with first-line drugs: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2017; 17 (2): 223–34.
8. World Health Organization. WHO treatment guidelines for isoniazid-resistant tuberculosis: Supplement to the WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO/CDS/TB/2018.7).
9. Siddiqi SH, Rusch-Gerdes S. MGIT procedure manual for BACTEC MGIT 960 TB System. 2006.
10. Черноусова Л. Н., Смирнова Т. Г., Ларионова Е. Е., и др. Стандартные операционные процедуры. Определение чувствительности микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам второго ряда с использованием системы BACTEC MGIT 960/320. Москва, 2015.
11. Jenkins HE, Zignol M, Cohen T. Quantifying the Burden and Trends of Isoniazid Resistant Tuberculosis, 1994–2009. PLoS ONE. 2011; 6 (7): e22927.
12. Menzies D, Benedetti A, Paydar A, Martin I, Royce S, Pai M, et al. Effect of duration and intermittency of rifampin on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis. PLoS Med. 2009; 6 (9): e1000146.
13. Jeon CY, Hwang SH, Min JH, Prevots DR, Goldfeder LC, Lee H, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis in South Korea: risk factors and treatment outcomes among patients at a tertiary referral hospital. Clin Infect Dis. 2008; (46): 42–9.
14. Bang D, Andersen PH, Andersen AB, Thomsen VØ. Isoniazid-resistant tuberculosis in Denmark: mutations, transmission and treatment outcome. J Infect. 2010; 60 (6): 452–7.
15. Salindri AD, Sales RF, DiMiceli L, Schechter MC, Kempker RR, Magee MJ. Isoniazid monoresistance and rate of culture conversion among patients in the state of Georgia with confirmed tuberculosis, 2009–2014. Ann Am Thorac Soc. 2018; 15 (3): 331–40.
16. Cattamanchi A, Dantes RB, Metcalfe JZ, Jarlsberg LG, Grinsdale J, Kawamura LM, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with isoniazid-monoresistant tuberculosis. Clin Infect Dis. 2009; 48 (2): 179–85.
17. Tolani MP, D'souza DT, Mistry NF. Drug resistance mutations and heteroresistance detected using the GenoType MTBDRplus assay and their implication for treatment outcomes in patients from Mumbai, India. BMC Infect Dis. 2012; (12): 9.
18. Huyen MN, Cobelens FG, Buu TN, Lan NT, Dung NH, Kremer K, et al. Epidemiology of isoniazid resistance mutations and their effect on tuberculosis treatment outcomes. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57 (8): 3620–7.
19. Stagg HR, Harris RJ, Hatherell HA, Obach D, Zhao H, Tsuchiya N, et al. What are the most efficacious treatment regimens for isoniazid-resistant tuberculosis? A systematic review and network meta-analysis. Thorax. 2016; 71 (10): 940–9.
20. World Health Organization. WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF. Geneva: World Health Organization; 2017. WHO/HTM/TB/2017.04. Available from: <https://www.who.int/tb/publications/2017/XpertUltra/en/>. Accessed: 18 May 2019.

References

1. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of 9 December 2014 «Ob utverzhdenii metodicheskikh rekomendatsiy po sovershenstvovaniyu diagnostiki i lecheniya tuberkuleza organov dykhaniya». Russian.
2. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. (WHO/CDS/TB/2018.20).
3. Nechaeva OB. TB situation Russia. Tuberculosis and Lung Diseases. 2018; 96 (8): 15–24. Russian.
4. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization; 2019 (WHO/CDS/TB/2019.33).
5. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2009; (13): 1320–30.
6. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. PLoS Med. 2009; 6 (2): e2.
7. Gegia M, Winters N, Benedetti A, van Soolingen D, Menzies D. Treatment of isoniazid-resistant tuberculosis with first-line drugs: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2017; 17 (2): 223–34.
8. World Health Organization. WHO treatment guidelines for isoniazid-resistant tuberculosis: Supplement to the WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO/CDS/TB/2018.7).
9. Siddiqi SH, Rusch-Gerdes S. MGIT procedure manual for BACTEC MGIT 960 TB System. 2006.
10. Chernousova LN, Smirnova TG, Larionova EE, i dr. Standartnyye operatsionnyye protsedury. Opredeleniye chuvstvitel'nosti mikobakteriy tuberkuleza k protivotuberkuleznym preparatam vtorogo ryada s ispol'zovaniyem sistemy BACTEC MGIT 960/320. Moscow, 2015. Russian.
11. Jenkins HE, Zignol M, Cohen T. Quantifying the Burden and Trends of Isoniazid Resistant Tuberculosis, 1994–2009. PLoS ONE. 2011; 6 (7): e22927.
12. Menzies D, Benedetti A, Paydar A, Martin I, Royce S, Pai M, et al. Effect of duration and intermittency of rifampin on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis. PLoS Med. 2009; 6 (9): e1000146.
13. Jeon CY, Hwang SH, Min JH, Prevots DR, Goldfeder LC, Lee H, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis in South Korea: risk factors and treatment outcomes among patients at a tertiary referral hospital. Clin Infect Dis. 2008; (46): 42–9.
14. Bang D, Andersen PH, Andersen AB, Thomsen VØ. Isoniazid-resistant tuberculosis in Denmark: mutations, transmission and treatment outcome. J Infect. 2010; 60 (6): 452–7.
15. Salindri AD, Sales RF, DiMiceli L, Schechter MC, Kempker RR, Magee MJ. Isoniazid monoresistance and rate of culture

- conversion among patients in the state of Georgia with confirmed tuberculosis, 2009–2014. *Ann Am Thorac Soc.* 2018; 15 (3): 331–40.
16. Cattamanchi A, Dantes RB, Metcalfe JZ, Jarlsberg LG, Grinsdale J, Kawamura LM, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with isoniazid-monoresistant tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2009; 48 (2): 179–85.
 17. Tolani MP, D'souza DT, Mistry NF. Drug resistance mutations and heteroresistance detected using the GenoType MTBDRplus assay and their implication for treatment outcomes in patients from Mumbai, India. *BMC Infect Dis.* 2012; (12): 9.
 18. Huyen MN, Cobelens FG, Buu TN, Lan NT, Dung NH, Kremer K, et al. Epidemiology of isoniazid resistance mutations and their effect on tuberculosis treatment outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57 (8): 3620–7.
 19. Stagg HR, Harris RJ, Hatherell HA, Obach D, Zhao H, Tsuchiya N, et al. What are the most efficacious treatment regimens for isoniazid-resistant tuberculosis? A systematic review and network meta-analysis. *Thorax.* 2016; 71 (10): 940–9.
 20. World Health Organization. WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF. Geneva: World Health Organization; 2017. WHO/HTM/TB/2017.04. Available from: <https://www.who.int/tb/publications/2017/XpertUltra/en/>. Accessed: 18 May 2019.