



Б.Л.Медников

Лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis*

Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом

B.L. Mednikov

Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*

Терапия противотуберкулезными препаратами и развитие к ним устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* — процессы противоположной направленности. Их регулирование требует знания механизмов развития лекарственной устойчивости (ЛУ), совершенствования методов ее диагностики, мониторинга, оптимизации противотуберкулезной терапии.

ЛУ — одно из проявлений изменчивости возбудителя, а лекарственноустойчивый туберкулез — это случай туберкулеза легких (ТЛ) с выделением *M. tuberculosis*, устойчивых к одному и более противотуберкулезным препаратам [1]. ЛУ у больных, не получавших противотуберкулезных препаратов (первичная) и лечившихся более 1 мес. (приобретенная), является комбинированной. Термин "начальная" ЛУ используется, если невозможно установить факт применения противотуберкулезных препаратов. *M. tuberculosis* могут обладать различной степенью ЛУ, иметь прямой и перекрестный характер. Истинная ЛУ — когда все *M. tuberculosis* устойчивы к тем или иным препаратам, смешанная — когда одни устойчивы к одному, другие — к другому препарату и т. д. Использовать эти понятия в реальной практике весьма трудно из-за большой степени неопределенности событий.

ЛУ возникает в результате точечных мутаций в геноме возбудителя [2]. Устойчивость к рифамицинам в большинстве случаев связана с мутациями в небольшом участке β -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы (ген *rpoB*). При мутациях в кодонах 526 и 531 наблюдается высокий, а в кодонах 511, 516, 518, 522 — низкий уровень устойчивости к рифамицинам. Весьма редко устойчивость к рифамицинам обусловлена мутациями в других участках гена *rpoB*. У половины устойчивых к изониазиду штаммов выявляются мутации в гене *katG*, снижающие активность каталазы-пероксидазы. К устойчивости к изониазиду приводит также повышенная продукция белков-мишеней, участвующих в транспорте предшественников миколовой кислоты и в ее биосинтезе (гены *inhA*, *ahpC*, *kasA*). У $2/3$ штаммов, устойчивых к стрептомицину, выявляются мутации нуклеотидной последовательности гена *rpsL*, кодирующего белок малой рибосомной субъединицы S12. Петли молеку-

лы 16S рибосомной РНК (*grs* — 16Sp РНК), взаимодействуя с белком S12, образуют сайты вторичных мутаций. У остальной $1/3$ — механизмы, приводящие к ЛУ, остаются невыясненными. С изменениями рибосомальных структур возбудителя связывают перекрестную ЛУ к другим аминогликозидам. Устойчивость к этамбутолу, который подавляет биосинтез компонентов клеточной стенки арабиногалактана и липоарабиноманнана, связана с мутациями в гене *embB* [3, 4]. Мутации в гене *rpsA*, кодирующем пиразинамидазу [5], вызывают устойчивость к пиразинамиду. Потенциальной мишенью для пиразинамида могут быть также метаболические пути с участием никотинамидаденин динуклеотида. Перекрестная устойчивость к производным изоникотиновой кислоты и изониазиду развивается при мутациях в гене *inhA*. Механизмы устойчивости возбудителя к циклосерину и ПАСК не изучены. В формировании ЛУ к фторхинолонам участвуют ДНК-гираза (миссенс-мутация гена *gyrA*, кодирующего А-субъединицу ДНК-гиразы) и белки клеточной мембраны [6–8], регулирующие поступление и выведение препарата из клетки (мутации в гене *lfrA*).

Нарушение баланса в пользу спонтанных мутантов происходит в процессе лечения противотуберкулезными препаратами, как правило, при нерациональном их применении и (или) нарушениях режима терапии [9]. Наряду с мутациями в генах, кодирующих мишени для противотуберкулезных препаратов [10, 11], происходят "компенсаторные мутации", в результате которых скорость роста ЛУ *M. tuberculosis* и их вирулентность могут достигать скорости роста и вирулентности чувствительных штаммов.

ЛУ определяют бактериологическими и молекулярно-генетическими методами. Выявление ЛУ с предварительным культивированием *M. tuberculosis* на твердых и (или) на жидких средах (непрямой метод) оправдано при проведении скрининга и мониторинга ЛУ. Непосредственный посев материала на среды, содержащие химиопрепараты (прямой метод) используется для того, чтобы получить информацию наиболее быстро. Целесообразно вначале определять ЛУ к критическим концентрациям рифампицина, изониазида, стрептомицина, этамбутола прямым

методом на автоматизированных системах (*BACTER* 960, MB / VacT). Если ЛУ не выявляется, то дальнейшее исследование не проводится. При выявлении ЛУ может быть продолжено тестирование устойчивости штаммов к высоким концентрациям этих препаратов. При необходимости определяется устойчивость к другим препаратам [12]. В настоящее время все большее внимание уделяется молекулярно-генетическим методам определения ЛУ: конформационный полиморфизм одноцепочечных фрагментов (*SSCP — Single Strand Conformation Polymorphism*); гетеродуплексный анализ (*Heteroduplex analysis*); дидезоксифингерпринтинг (*ddF-метод*); обратная гибридизация с олигонуклеотидными зондами; полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (*PCR-RELF*) и др. [13]. Перспективным считается метод биологических микрочипов [12]. Следует отметить необходимость дальнейшей конкретизации клинической, эпидемиологической информативности, экономической целесообразности использования тех или иных методов определения ЛУ [14].

ЛУ обычно выражают вероятностью, или отношением числа больных с ЛУ *M. tuberculosis* к численности больных ТЛ, среди которых она выявляется. В зависимости от постановки вопроса изучаются те или иные ее показатели. При диагностике и скрининге определяется доля больных с ЛУ *M. tuberculosis* в определенный момент времени (распространенность) для прогнозирования событий — частота выявленных больных с ЛУ *M. tuberculosis* в течение установленного срока. Приводимые данные о ЛУ, как правило, получены в "смешенных" [15] выборках относительно всей популяции больных ТЛ [16–18]. При хорошо организованном процессе диагностики и лечения ТЛ первичная ЛУ, как минимум к рифампицину и изониазиду, составляет < 1 %, при плохо организованном — > 7,5 % [19]. В России (в период с 1994 по 1997 гг.) предполагаемая распространенность комбинированной ЛУ к этим препаратам составляла > 15 % [19]. Пересматривается [20] представление о том, что первичная ЛУ является менее тяжелой, по сравнению с приобретенной [19]. Данные о ЛУ среди 358 впервые выявленных больных ТЛ,

лечившихся в противотуберкулезных учреждениях Москвы в 1998–1999 гг., представлены в табл. 1. По отбору больных и методам оценки выборка была максимально приближена к популяции впервые выявленных больных ТЛ в Москве в этот период.

ЛУ чаще встречалась при кавернозном ТЛ, затем — при казеозной пневмонии и при диссеминированном туберкулезе (табл. 2). При очаговом и инфильтративном ТЛ ЛУ выявлялась в основном в процессе лечения противотуберкулезными препаратами.

Наиболее информативные данные в отношении многолетней динамики ЛУ получены в США [9]. В период с 1968 по 1996 гг. отмечен рост первичной ЛУ к изониазиду (с 1,8 % до 7,8 %), стрептомицину (с 2,3 % до 6,1 %), рифампицину (до 2,7 %), этамбутолу (с 0,6 % до 2,7 %), пиразинамиду (с 0,5 % до 2,9 %), как минимум к рифампицину и изониазиду (до 3,5 % — в 1991 г., с последующим снижением до 1,9 % к 1996 г.). Приобретенная ЛУ повышалась к рифампицину (до 8,6 %), этамбутолу (до 4,5 %), пиразинамиду (с 1,6 % до 54,6 %), как минимум к рифампицину и изониазиду (до 6,9 %), и снижалась — к изониазиду (с 36,6 % до 17 %), стрептомицину (с 19,2 % до 8,7 %). В наблюдении за динамикой ЛУ все большее значение приобретает генетическое маркирование штаммов возбудителя. Особого внимания заслуживает ЛУ штамма W [21, 22] из генетического семейства *Beijing* [23, 24].

Успех химиотерапии ТЛ во многом зависит от правильного выбора препаратов и их комбинаций. При отсутствии ЛУ рифамицины (рифампицин, рифабутин), препараты гидразида изоникотиновой кислоты, фторхинолоны — высокоэффективны; пиразинамид, этамбутол, аминогликозиды — эффективны, аminosалициловая кислота, производные изоникотиновой кислоты, циклосерин — недостаточно эффективны; макролиды, ампициллины относятся к препаратам, которые пытаются использовать в качестве противотуберкулезных средств. Представителем нового класса (*oxazolidinon*) противотуберкулезных средств является *Linezolid* [25]. В отношении быстро размножающейся популяции активность наиболее часто используемых препара-

Таблица 1
Лекарственная устойчивость *M. tuberculosis* у впервые выявленных 358 больных ТЛ в Москве

Препараты	Лекарственная устойчивость, % (95%-ный доверительный интервал)			
	Первичная		Приобретенная	
	от общего количества больных ТЛ	от количества больных с положительными результатами бактериологических исследований	от общего количества больных ТЛ	от количества больных с положительными результатами бактериологических исследований
Как минимум к рифампицину и изониазиду	1,2–4,8	2–8,8	2,2–6,8	4,1–12,3
Как минимум к рифампицину	2,4–7	4,5–12,5	5,9–12,3	11,1–22,1
Как минимум к изониазиду	1,9–6,3	3,5–11,5	5,2–11,2	9,8–20,3
К стрептомицину	6,5–13,1	12,2–23,6	10,3–17,9	19,1–32,1
К канамицину	2,5–6,3	4,7–13,1	3,3–9,9	7,9–17,9
К этамбутолу	1,9–6,3	3,5–11,5	3,5–8,9	6,5–16,1

Таблица 2

Лекарственная устойчивость *M. tuberculosis* при различных формах ТЛ

Формы ТЛ	Больные ТЛ с положительным результатом бактериологического исследования, % (95%-ный доверительный интервал)					
	Первичная устойчивость			Приобретенная устойчивость		
	как минимум к рифампицину и изониазиду	как минимум к рифампицину	как минимум к изониазиду	как минимум к рифампицину и изониазиду	как минимум к рифампицину	как минимум к изониазиду
Очаговый	не выявлено	не выявлено	не выявлено	0,2–0,6	0,2–0,6	0,6–1,2
Инфильтративный	0,13–1,2	4,5–7,5	3,7–6,5	2,1–4,3	13,1–17,9	9,9–14,1
Диссеминированный	1,6–6,4	9,4–17,8	5,3–12,2	4,6–11,4	15–25	13,3–22,7
Казеозная пневмония	12,5–29,5	5,4–14,4	11,2–21,8	15,7–29,9	11,7–18,7	18,3–32,4
Кавернозный	20–32,6	12,5–22,5	9–18,3	21,1–35,5	13–28	17–31,7

тов располагается в следующей последовательности: изониазид, стрептомицин, рифампицин, этамбутол; медленно размножающихся — пиразинамид, рифампицин, изониазид; спорадически размножающихся — рифампицин, изониазид. Считается, что элиминация популяций *M. tuberculosis* достигается соответственно через 2; 1,5; 6 мес. лечения [9], в связи с чем определены относительно фиксированные периоды этиотропной терапии: 1-й период — подавление быстро и медленно размножающихся *M. tuberculosis*, 2-й — уничтожение спорадически размножающихся штаммов. ТЛ часто развивается на фоне или осложняется процессом, вызванным другими возбудителями. В этих случаях комбинированное применение антибактериальных препаратов должно предусматривать воздействие на несколько возбудителей.

Количество препаратов, входящих в ту или иную комбинацию, в 1-м периоде лечения, колеблется в основном от 3 до 5, составляя в среднем 4 препарата, во 2-м — от 2 до 3. Их уменьшение ведет к снижению активности в отношении *M. tuberculosis*, а увеличение — повышает риск нежелательных явлений. Число комбинаций (Pk, n) по количеству не упорядоченных друг относительно друга лекарственных препаратов ($n = 11$) и по количеству (k) используемых препаратов в комбинациях весьма велико (табл. 3).

Имеющихся данных недостаточно, чтобы судить о сравнительной эффективности различных схем лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза [26]. Выбор той или иной комбинации из такого их количества препаратов основывается чаще всего на изучении серии случаев и когортных исследованиях. Опти-

мальные условия могут быть достигнуты при помощи структурирования комбинаций по эффективности, взаимодействию, токсичности, переносимости, ЛУ, способам, длительности применения препаратов, возможности их использования при различных сопутствующих процессах в зависимости от функционального состояния органов и систем организма. Весьма важной является стратификация больных по клиническим формам ТЛ и вероятности ЛУ к тем или иным препаратам (табл. 2). Так, у больных очаговым и инфильтративным (нераспространенным) ТЛ (встречаемость в Москве — 60,8–64,3 % от всех впервые выявленных больных) вероятность ЛУ относительно низкая. В связи с этим в 1-й период (2–3 мес.) наиболее оптимальна комбинация рифампицина, изониазида, пиразинамида и этамбутола, во 2-й (4–6 мес.) — рифампицина, изониазида. Препараты принимают отдельно или в комбинированной форме с фиксированными дозами. При наличии информации или предположения об устойчивости возбудителя к рифампицину или изониазиду целесообразно использовать канамицин или амикацин в 1-м периоде и соответственно изониазид с этамбутолом, рифампицин с этамбутолом — во 2-м. Лечение проводится, в среднем, в течение года. У больных с распространенным инфильтративным и диссеминированным ТЛ (встречаемость среди впервые выявленных больных в Москве — 30,5–34,5 %, $P < 0,05$) наиболее часто встречается приобретенная устойчивость к рифампицину. В связи с этим целесообразно с самого начала лечения (исключение — терапия беременных) использовать рифабутин, учитывая его преимущества

Таблица 3

Число комбинаций противотуберкулезных препаратов, не упорядоченных друг относительно друга

Устойчивость <i>M. tuberculosis</i>	n	Число комбинаций (Pk, n) для k препаратов				
		2	3	4	5	Всего
Отсутствует	11	55	165	330	462	1012
К 1 препарату	10	45	120	210	252	627
К 2 препаратам	9	36	84	126	126	372
К 3 препаратам	8	28	56	70	56	210
К 4 препаратам	7	21	35	35	21	112
К 5 препаратам	6	15	20	15	6	56
К 6 препаратам	5	10	10	5	1	26

перед рифампицином [27]. При казеозной пневмонии и тяжелом диссеминированном ТЛ (встречаемость — 2,8–4,2 %, $P < 0,05$) может быть применена комбинация рифабутина, изониазида (парентерально в течение 2–3 нед., затем — внутрь), капреомицина, пиразинамида — в течение 4–6 мес., затем — рифабутин и изониазида (4–6 мес.). При устойчивости возбудителя к рифабутину или изониазиду целесообразно назначить в 1-й период лечения фторхинолон, а во 2-й период — соответственно изониазид с этабутолом или рифабутин с этабутолом. При устойчивости к рифабутину и изониазиду лечение проводится в течение 4–6 мес. фторхинолоном, капреомицином и 2 препаратами из следующего списка: этамбутол, пиразинамид, циклосерин, протионамид, аминосалициловая кислота. Во 2-м периоде применяют 3 препарата (6–9 мес.) с учетом ЛУ. Установленная ЛУ к другим препаратам требует их замены. У больных с рецидивом, хроническим ТЛ, а также в случаях "неудачи лечения" возможности формализации вариантов этиотропной терапии весьма ограничены. Выбор комбинации препаратов и длительность лечения основываются на предыдущих событиях. Необходимо использовать, по меньшей мере, 3 препарата, к которым чувствителен возбудитель.

Представленная информация призвана способствовать формированию целенаправленной деятельности для контроля ЛУ в интересах совершенствования лечебно-профилактических мероприятий у больных ТЛ.

Литература

1. Global tuberculosis programme. Treatment of tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 1997. WHO/TB/97.220.
2. Степаншин Ю.Г., Степаншина В.Н., Шемякин И.Г. Молекулярные механизмы устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к лекарственным препаратам. Антибиотики и химиотер. 1999; 4: 39–43.
3. Belanger A.E., Besta G.S., Ford M.E. et al. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996; 96: 1919–1924.
4. Telenti A. Genetics of drug resistance in tuberculosis. Clin. Chest Med. 1997; 18: 55–64.
5. Scoprio A., Zhanf Y. Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nature Med. 1996; 2: 662–667.
6. Cambau E., Jarlier V. Resistance to quinolones in mycobacteria. Res. Microbiol. 1996; 147: 52–59.
7. Heiden Van P.D. Bacterial genetics and strain variation. In: Genetics and tuberculosis. Chichester: John Wiley and Sons; 1998. 178–190.
8. Takiff H.E., Climini M., Musso C.M. et al. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996; 96: 362–366.
9. Iseman M.D. A clinician's guide to tuberculosis. New York; 2000.
10. Cole S.T., Barrell B.G. Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. In: Genetics and tuberculosis. Chichester: John Wiley and Sons; 1998. 166–168.
11. Ferrero L., Cameron B., Crouzet J. Analysis of gyrA and grlA mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 1995; 39: 1554–1558.
12. Литвинов В.И., Мороз А.М. (ред.). Лабораторная диагностика туберкулеза (опыт работы Московского научно-практического центра борьбы с туберкулезом Комитета здравоохранения г. Москвы). М.; 2001.
13. Musser J.M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. J. Clin. Microb. Rev. 1995; 8: 496–514.
14. Приказ МЗ РФ от 21.03.2003 г. № 109 "О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации". М.; 2003.
15. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология: пер. с англ. М.; 1998. 345.
16. Чуканов В.И. Основные принципы лечения больных туберкулезом легких. Рус. мед. журн. 1998; 17: 1138–1142.
17. Watterson S., Wilson S., Yates M. et al. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1998; 36: 1969–1973.
18. Yuen L.K., Leslie D., Coloe P. Bacteriological and molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 3844–3850.
19. WHO. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. The WHO/IUATLD global project on drug resistance surveillance, 1994–1997. Geneva; 1997.
20. Davies J. Antibiotic resistance in mycobacteria. In: Genetics and tuberculosis. Chichester: John Wiley and Sons; 1998. 195–205.
21. Frieden T.R., Fujiwara P.L., Washko R.M. et al. Tuberculosis in New York City — turning the tide. N. Engl. J. Med. 1995; 333: 229–233.
22. Sullivan E.A., Kreiswirth B.N., Palumbo L. et al. Emergence of fluoroquinolone-resistant tuberculosis in New York City. Lancet 1995; 345: 1148–1150.
23. Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф., Вишневский Б.И. Генетическое маркирование полирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных на Северо-Западе России. Пробл. туб. 1999; 3: 39–41.
24. Aleman M., Garcia A., Saab M. et al. *Mycobacterium tuberculosis*-induced activation accelerates apoptosis in peripheral blood neutrophils from patients with active tuberculosis. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2002; 27: 583–592.
25. Hadjiangelis N.P., Leibert E., Harkin T.J. et al. Linezolid: a promising new agent for multidrug-resistant tuberculosis treatment. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003; 167: A868.
26. Доказательная медицина. Ежегодный справочник. М.: Медиа Сфера; 2002; вып. 1. 1002–1016.
27. Медников Б.Л., Плaksin Д., Пиявский С.А. Фармакоэкономическая модель применения рифабутина у больных с впервые выявленным туберкулезом легких. Пробл. туб. 2002; 4: 13–17.

Поступила 18.03.05
 © Медников Б.Л., 2005
 УДК 579.852.044+615.015.8