

Всероссийская научно-практическая онлайн конференция с
международным участием
«Перспективы развития отечественной фтизиатрии»
2-4 сентября 2020 г.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ Mycobacterium tuberculosis К ФТОРХИНОЛОНАМ

Д.В.Вахрушева

УНИИФ-филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России

Как лаборатории определяют фенотипическую чувствительность МБТ к фторхинолонам?

- В соответствии с ФКР фенотипическую чувствительность МБТ к фторхинолонам можно определять следующими методами:
 - методом абсолютных концентраций на ППС- **только к офлоксацину**;
 - методом пропорций с использованием технологии ВАСТЕС- ко всем фторхинолонам, которые используются для лечения больных туберкулезом (левофлоксацину, моксифлоксацину, спарфлоксацину, гатифлоксацину)
- В 2019 г. всего в РФ функционировала 251 лаборатория, выполняющая ТЛЧ к ПТП 2 ряда*.
- В 2019 г. технология ВАСТЕС использовалась в 130 лабораториях*, в 121 лаборатории ТЛЧ к фторхинолонам проводят только методом абсолютных концентраций .

Таким образом, в 48,2% лабораторий РФ ЛЧ к фторхинолонам (а значит, и долю МБТ с ШЛУ) оценивают по офлоксацину

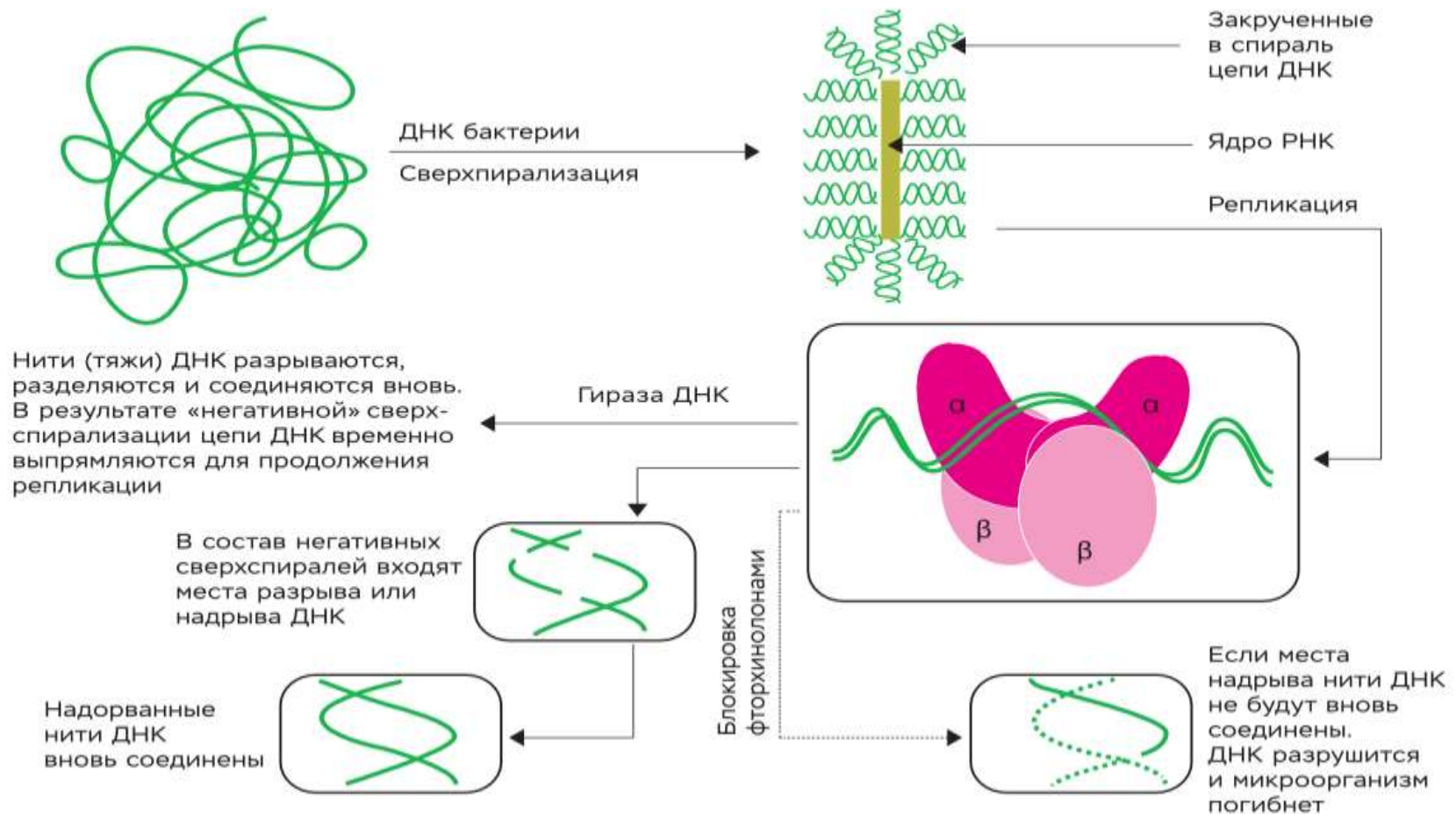
* По данным Федерального центра мониторинга противодействия распространению туберкулеза

«Эволюционное древо» фторхинолонов [P. Ball, 2000]



- Первый хинолон был получен случайно в процессе очистки хлорохина — вещества с антималярийными свойствами. Это была налидиксовая кислота, которая уже более 40 лет применяется для лечения инфекций мочевых путей. В последующем введение атома фтора в химическую формулу налидиксовой кислоты положило начало новому классу химических соединений — фторхинолонам.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФТОРХИНОЛОНОВ- НАРУШЕНИЕ РЕПЛИКАЦИИ ДНК



Генетические детерминанты устойчивости МБТ к фторхинолонам

- По современным представлениям устойчивость МБТ к фторхинолонам в большинстве ассоциирована с мутациями в двух генах, кодирующих ДНК-гиразу - *gyrA* и *gyrB*.
- Существующие в настоящее время технологии, позволяющие выявить мутации в генах *gyrA* и *gyrB*:
 - биочип «ТБ-ТЕСТ»;
 - НАIN-тест;
 - Амплитуб Fq;
 - секвенирование;
 - GeneXpert®MTB/XDR*

*Тест-система, созданная в 2020 г.

Цель исследования

Провести сравнительное изучение фенотипической чувствительности МБТ к офлоксацину и моксифлоксацину и сопоставить эти данные с наличием в геноме МБТ мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к фторхинолонам, для определения возможности использования результатов молекулярно-генетических исследований при формировании режимов химиотерапии, до получения результатов фенотипического ТЛЧ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

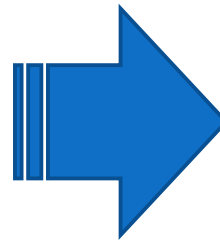
- В исследование было включено 108 культур МБТ, полученных в 2018-2019 гг. из клинического материала пациентов, больных туберкулезом, в трех регионах России (Челябинской (36 культур), Кемеровской (13 культур) и Свердловской (59 культур) областях). Все культуры обладали множественной лекарственной устойчивостью.
- ТЛЧ к офлоксацину (2 мг/л) и моксифлоксацину (0,5 мг/л) проводили с использованием технологии ВАСТЕС MGIT 960.
- Выявление мутаций, ассоциированных с ЛУ МБТ к фторхинолонам, проводили с использованием тест-системы ТБ-ТЕСТ (15 мутаций в гене *gyrA* и 23 мутации в гене *gyrB*).

Результаты фенотипического ТЛЧ

По результатам ТЛЧ с использованием технологии ВАСТЕС MGIT из 108 культур лекарственной устойчивостью к офлоксацину обладали 66 (61%) культур, к моксифлоксацину - 42 (39%) культуры.

Среди 66 устойчивых к офлоксацину культур 26 (39.4%) были чувствительными к моксифлоксацину, 40 (60,6%) - устойчивыми к этому препарату.

Таким образом, около 40% изолятов, устойчивых к офлоксацину, были чувствительны к моксифлоксацину.



- Результаты нашего исследования показали, что если лаборатория выполняет ТЛЧ только методом абсолютных концентраций (и заключение об устойчивости к фторхинолонам и уровню ШЛУ делается на основе данных по офлоксацину), для 40% культур эти данные будут ошибочны, т.к. культуры могут быть чувствительны к моксифлоксацину.
- С другой стороны, в соответствии с ФКР при наличии устойчивости к офлоксацину (и/или левофлоксацину) в РХТ следует включать моксифлоксацин, но около 60% культур, устойчивых к офлоксацину, будут устойчивы также и к моксифлоксацину, т.е. включение этого препарата в РХТ будет нецелесообразным.

Таким образом, проведение ТЛЧ к фторхинолонам только методом абсолютных концентраций в настоящее время недопустимо

Результаты молекулярно-генетического тестирования ЛУ МБТ к фторхинолонам

Выявление детерминант лекарственной устойчивости к фторхинолонам у изученных культур позволило установить наличие мутаций в гене *gyrA* у 59 (54,6%) образцов, в том числе в четырех случаях (3,7%) были выявлены двойные замены.

В гене *gyrB* наличие мутаций выявлено у четырех культур.

У 45 (41,7%) культур мутаций в указанных генах выявлено не было.

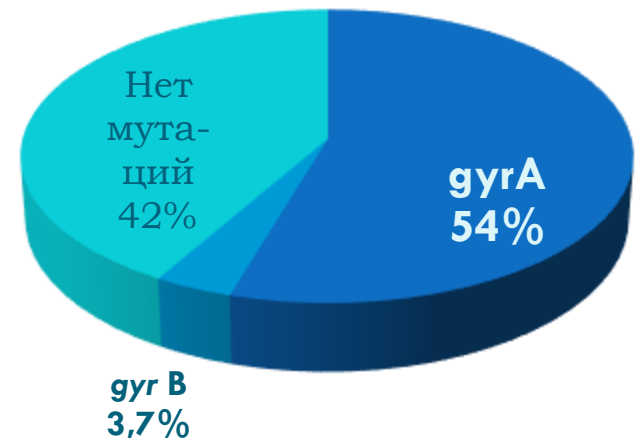
Наиболее частыми заменами были:

gyrAD94G – 26 (41,3%) и

gyrAA90V - 15 (23,8%),

остальные замены были более редкими (от 1 до 5 культур)

Доля мутаций, выявленных в различных генах, %



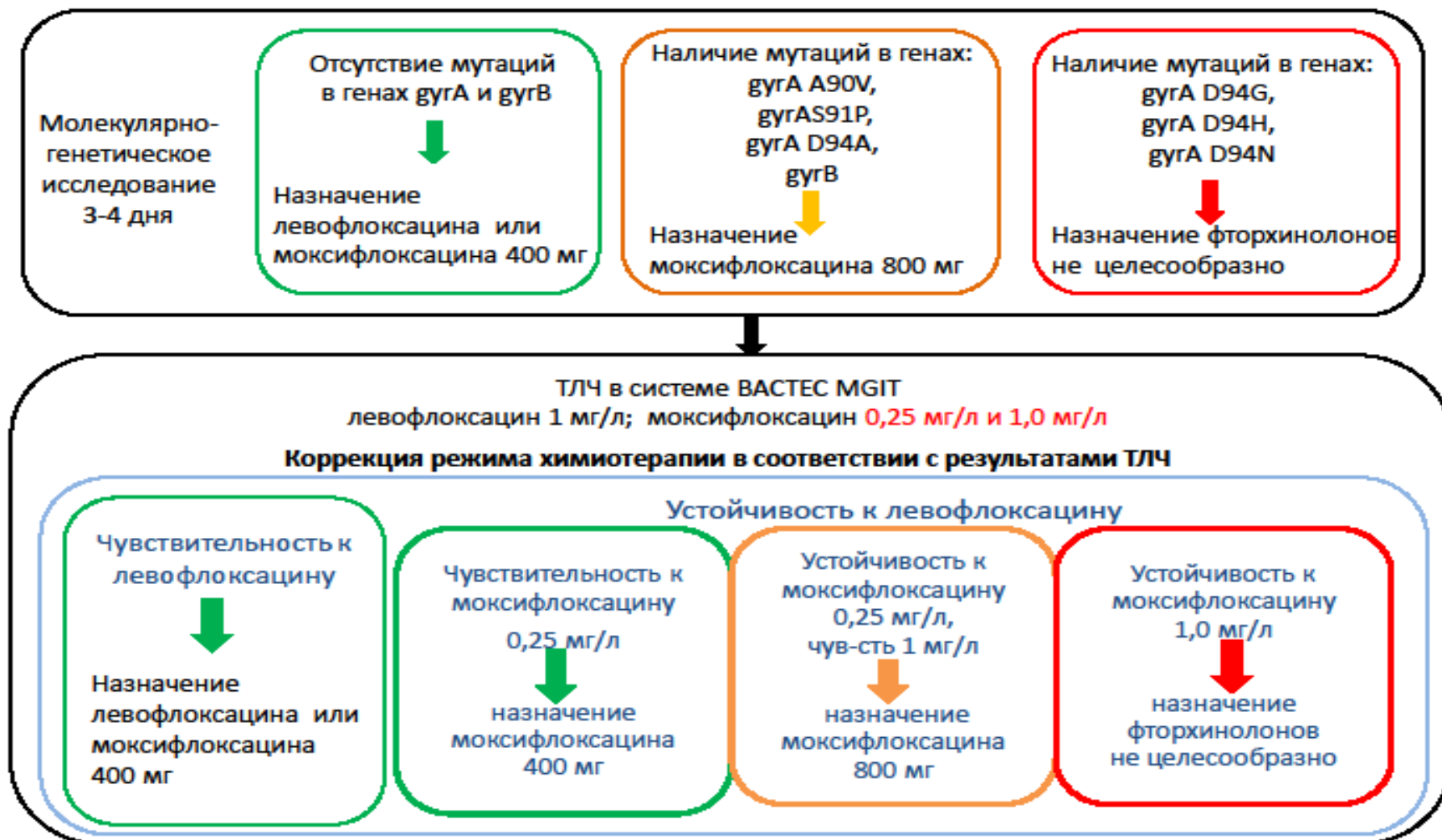
Сопоставление результатов выявления мутаций в генах *gyrA* и *gyrB* и фенотипического ТЛЧ к офлоксацину и моксифлоксацину

Мутации, выявленные тест-системой "ТБ-ТЕСТ"		Кол-во культур, всего	Результаты фенотипического ТЛЧ в системе ВАСТЕС MGIT			
			офлоксацин (2 мг/л)		моксифлоксацин (0,5 мг/л)	
ген	тип замены		Кол-во чувствительных культур	Кол-во устойчивых культур	Кол-во чувствительных культур	Кол-во устойчивых культур
gyrA	A90V	15	1	14	11	4
	S91P	1	0	1	0	1
	A90V, S91P	3	0	3	2	1
	A90V, D94G	1	0	1	0	1
	D94A	4	0	4	2	2
	D94G	26	0	26	6	20
	D94H	2	0	2	0	2
	D94N	5	0	5	0	5
	D94Y	1	0	1	1	0
	G88A	1	0	1	0	1
gyrB	N538D	1	0	1	1	0
	S486F	1	0	1	1	0
	T539N	1	1	0	1	0
	T539P	1	1	0	0	1
Нет мутаций		45	39	6	42	3

Рекомендации экспертов ВОЗ

- Согласно заключению экспертов ВОЗ для большинства изолятов МБТ с заменами *gyrAA90V*, *gyrAS91P*, *gyrAD94A*, и мутациями в гене *gyrB* МИК моксифлоксацина находится в диапазоне 0,25 – 1 мг/л, и в этом случае рекомендовано включение в режим химиотерапии моксифлоксацина в суточной дозировке 800 мг.
- Для изолятов с заменами *gyrAD94G*, *gyrAD94N*, *gyrAD94H* МИК моксифлоксацина находится в диапазоне 1 – 2 мг/л и выше, и в данном случае включение моксифлоксацина в режим химиотерапии не целесообразно.

Алгоритм включения фторхинолонов в схемы химиотерапии туберкулеза по результатам этиологической диагностики



РЕЗЮМЕ

- Использование метода абсолютных концентраций в качестве единственного при определении ЛУ МБТ к фторхинолонам недопустимо, интерполяция данных о ЛУ МБТ к офлоксацину на их устойчивость к моксифлоксацину является неоправданной и может привести как к исключению из режима химиотерапии такого эффективного препарата, как моксифлоксацин, так и к неоправданному включению этого препарата в РХТ.
- Молекулярно-генетические методы могут служить первым этапом дифференцированного подхода при включении разных групп фторхинолонов в режимы химиотерапии, до получения результатов фенотипического ТЛЧ.



Благодарю за внимание