

УДК 615.015.8:579.873.21

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ЗНАЧЕНИЙ МИНИМАЛЬНЫХ ИНГИБИРУЮЩИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БЕДАКВИЛИНА В ОТНОШЕНИИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫХ БОЛЬНЫХ, С НАЛИЧИЕМ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ/УСТОЙЧИВОСТИ К ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ПРЕПАРАТАМ И ИХ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬЮ К ГЕНЕТИЧЕСКИМ СЕМЕЙСТВАМ

*И.В. Перетокина, Л.Ю. Крылова, Ю.Д. Михайлова, М.А. Свириденко, А.А. Хахалина, С.Г. Сафонова
ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом
Департамента здравоохранения города Москвы»*

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP OF VALUES OF MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATIONS OF BEDAQUILINE AGAINST ISOLATED FROM NEWLY DETECTED PATIENTS *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS WITH THEIR SUSCEPTIBILITY/RESISTANCE TO ANTITUBERCULAR DRUGS AND GENETIC FAMILIES.

I.V. Peretokina, L.Yu. Krylova, Yu.D. Mikhailova, M.A. Sviridenko, A.A. Khakhalina, S.G. Safonova

*В статье представлены результаты определения лекарственной чувствительности к ПТП 120 штаммов *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), выделенных от больных с впервые установленным диагнозом туберкулеза легких до начала химиотерапии и постоянно проживающих в городе Москве. При тестировании ЛЧ МБТ к препаратам основного и резервного рядов в 50% случаев штаммы микобактерий обладали устойчивостью к ПТП. Проведенное исследование показало, что бедаквилин *in vitro* обладает высокой противотуберкулезной активностью как в отношении чувствительных, так и устойчивых штаммов МБТ. В исследовании была установлена принадлежность штаммов МБТ к различным генетическим семействам. Среди изученных клинических штаммов преобладала генетическая группа Beijing (64,2%).*

Сравнительный анализ результатов определения значеный МИК бедаквиллина в отношении данных штаммов МБТ не выявил взаимосвязи между результатами тестирования ЛЧ микобактерий к ПТП и их принадлежностью к генетическим семействам. Согласно критическим концентрациям, рекомендованным ВОЗ, все исследованные штаммы, выделенные до начала лечения, определены как чувствительные к бедаквилину.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, бедаквилин, минимальная ингибирующая концентрация, лекарственная устойчивость, генетическое семейство

*The article presents the results of drug susceptibility testing (DST) for anti-TB drugs of 120 strains of *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) isolated from newly detected patients with pulmonary TB before starting chemotherapy. All patients permanently resided in Moscow. DST for the main and reserve drugs revealed that MBT strains were resistant to anti-TB drugs in 50% of cases. Our study showed that bedaquiline has high anti-tuberculosis activity *in vitro* against sensitive and resistant MBT strains. Investigated MBT strains belonged to different genetic families, but the Beijing strains prevailed (64.2%). A comparative analysis of the results of determining the MIC values of bedaquiline concerning these MBT strains did not reveal a relationship between the results of DST of MBT for anti-TB drugs and their belonging to genetic families. According to the critical concentrations recommended by WHO, all investigated strains were identified as susceptible to bedaquiline.*

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, bedaquiline, minimum inhibitory concentration, drug resistance, genetic family

В настоящее время для лечения больных с множественной и широкой лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза (МЛУ/ШЛУ МБТ) в список первоочередных средств включен новый противотуберкулезный препарат – бекваквлин [1, 19].

С целью контроля за развитием лекарственной устойчивости (ЛУ) возбудителя к данному препарату необходимо изучать лекарственную чувствительность (ЛЧ) микобактерий туберкулеза, выделенных от больных до начала лечения бекваквином и в процессе его применения.

В 2018 году Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) опубликованы предварительные данные о значениях критических концентраций (КК) бекваквина: 0,25 мкг/мл для метода пропорций на агаровой среде *Middlebrook 7H11* (M7H11) и 1,0 мкг/мл для модифицированного метода пропорций в жидкой среде *Middlebrook 7H9* (M7H9) с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС™ MGIT™ 960 (ВАСТЕС 960) [19]. В связи с тем, что на сегодняшний день штаммы МБТ с устойчивостью к бекваквину встречаются редко, преждевременно говорить о стандартном критерии тестирования ЛЧ МБТ к данному препарату. Таким образом, предложенные ВОЗ значения КК носят рекомендательный характер, которые, возможно, будут пересматриваться и уточняться. Этим продиктована необходимость исследования значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) бекваквина в отношении штаммов МБТ, которое является исходной точкой для оценки ЛЧ МБТ к новым противотуберкулезным препаратам (ПТП).

В городе Москве, как и в регионах Российской Федерации, циркулируют штаммы МБТ с различной устойчивостью к ПТП и с разнообразными генотипами [3, 7, 8, 9, 14]. Представляет интерес изучить МИК бекваквина в отношении штаммов МБТ, выделенных из диагностического материала от впервые выявленных больных, постоянных жителей г. Москвы. А также исследовать взаимосвязь результатов определения МИК бекваквина с результатами определения ЛЧ штаммов МБТ к иным ПТП и их принадлежностью к генетическим семействам.

Цель исследования

Изучить наличие взаимосвязи значений МИК бекваквина в отношении штаммов МБТ, выделенных от больных, постоянно проживающих в г. Москве, с впервые выявленным туберкулезом легких до начала лечения, с чувствительностью/устойчивостью микобактерий к ПТП и их принадлежностью к генетическим семействам.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на базе Централизованной бактериологической лаборатории ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ».

Предметом исследования являлись 125 штаммов МБТ, выделенных от 125 постоянных жителей г. Москвы, с впервые выявленным туберкулезом легких за период с 1 июля по 31 декабря 2017 года до начала противотуберкулезной терапии или не более одного месяца ее проведения. Пять штаммов МБТ были утрачены в процессе хранения и последующего пересева. Таким образом, в исследование вошли 120 штаммов МБТ, полученных от 120 больных туберкулезом (95% пациентов из сплошной выборки).

Культуры МБТ выделены из мокроты и других видов отделяемого трахеобронхиального дерева с использованием стандартных методов в жидкой среде *Middlebrook 7H9* с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС 960 (Becton Dickinson, США) или на плотной среде Левенштейна-Йенсена.

Полученные культуры микобактерий идентифицировали с помощью иммунохроматографического теста для определения антигена комплекса *M. tuberculosis* (Becton Dickinson, США).

Лекарственную чувствительность клинических штаммов МБТ к препаратам основного ряда: изониазиду (H), рифампицину (R), стрептомицину (S), этамбутолу (E), пиразинамиду (Z), и резервного: офлоксацину (Ofx), левофлоксацину (Lfx), моксифлоксацину (Mfx), канамицину (Km), амикацину (Am), капреомицину (Cm), этионамиду (Eto), аминосалициловой кислоте (PAS), линезолиду (Lzd) – определяли фенотипическими методами в жидкой и плотной питательных средах.

В жидкой среде M7H9 тестирование ЛЧ штаммов МБТ к ПТП проводили модифицированным методом пропорций с помощью системы ВАСТЕС 960 с использованием критических концентраций препаратов, рекомендованных ВОЗ в 2014 году [17, 18]. Чувствительность МБТ к циклосерину определяли классическим методом абсолютных концентраций на плотной среде Левенштейна-Йенсена [5].

Принадлежность штаммов МБТ к генетическим семействам определяли молекулярно-генетическим методом с использованием тест-системы «ТБ-ТЕСТ» (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия) [6].

В качестве контрольного штамма использовали референс-штамм *M. tuberculosis H₃₇Rv* – ATCC® 25618.

Для проведения исследований по определению МИК бекваквина тремя фенотипическими методами *in vitro* использовали порошкообразную субстанцию бекваквина fumarата (Janssen Pharmaceutica NV, Бельгия), предоставленную ОАО «Фармстандарт-УфаВита» (Россия) и содержащую 82,72% активного вещества бекваквина. Навеску препарата растворяли в 95%-ном этиловом спирте и готовили основной спиртовый раствор бекваквина в концентрации 1000,0 мкг/мл. Затем путем последовательного разведения с двойным шагом снижения получали рабочие растворы для агаровой M7H11 и жидкой M7H9 питательных сред с необходимыми концентрациями препарата.

Таблица 1. Лекарственная устойчивость штаммов МБТ к ПТП

Препараты	Количество штаммов МБТ с ЛУ к ПТП (n = 60)		
	абс.	%**	95%ДИ
Стрептомицин	54	45,0	35,9–54,4
Изониазид	50	41,7	32,7–51,0
Рифампицин	35	29,2	21,2–38,2
Этамбутол	23	19,2	12,6–27,4
Пиразинамид	23	19,2	12,6–27,4
Фторхинолоны*	10	8,3	4,1–14,8
Канамицин	19	15,8	9,8–23,6
Амикацин	10	8,3	4,1–14,8
Капреомицин	8	6,7	2,9–12,7
Этионамид	29	24,2	16,8–32,8
Аминосалициловая кислота	13	10,8	5,9–17,8
Линезолид	0	0	0,0–3,0
Циклосерин	1	0,8	0,02–4,56

Примечание: * – с учетом перекрестной устойчивости МБТ к Ofx, Lfx, Mfx данные по ЛУ объединены в группу фторхинолоны; абс. – абсолютное количество штаммов МБТ, устойчивых к данному препарату; ** – процент штаммов МБТ, устойчивых к данному препарату, от 120 клинических штаммов микобактерий

Таким образом, тестировали следующие концентрации бедаквилина: для среды *M7H11* – 0,25; 0,12; 0,06; 0,03 мкг/мл; для среды *M7H9* – 1,0; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03 мкг/мл.

С целью получения равной величины колониеобразующих единиц (КОЕ) возбудителя в миллилитре среды все культуры МБТ пересеивали в жидкую среду *M7H9* для культивирования в системе ВАСТЕС 960. В исследовании использовали культуры при регистрации прибором роста МБТ, равного КОЕ микобактерий 105–106 в миллилитре среды [17]. Полученную суспензию культуры использовали для исследований МИК бедаквилина как на агаровой среде *M7H11* с применением полистироловых двухсекционных чашек Петри диаметром 90 мм, так и в жидкой среде *M7H9* в поликарбонатных пробирках MGIT с помощью системы ВАСТЕС 960 и полистиролового 96-луночного планшета.

Определение значений МИК бедаквилина на агаровой среде *M7H11* проводили методом пропорций согласно методике, рекомендованной Институтом клинических и лабораторных стандартов США (CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute) [10]. За величину МИК принимали концентрацию препарата, при которой наблюдали рост микобактерий ≤ 1% на чашке с агаровой средой с препаратом по сравнению с ростом в контрольной чашке с агаровой средой без препарата.

Исследование по определению МИК бедаквилина в жидкой среде *M7H9* с помощью системы ВАСТЕС 960 проводили в соответствии с общими рекомендациями с незначительными изменениями, позволяющими проводить изучение ряда концентраций препарата [16, 17, 18]. Минимальной ингибирующей концентрацией бедаквилина (МИК) считали концентрацию препарата, при которой рост МБТ полностью отсутствовал или

количество ростовых единиц в пробирке составляло < 100 при наличии роста в контрольной пробирке 400 ростовых единиц.

Определение значений МИК бедаквилина в отношении штаммов МБТ в жидкой среде *M7H9* с использованием планшета проводили методом двукратных серийных разведений в соответствии с рекомендациями CLSI [10]. Рабочие растворы препарата вносили по 10 мкл в каждую лунку планшета. Для тестирования одной культуры МБТ использовали ряд из восьми лунок (одна контрольная лунка без препарата и 7 лунок с двукратно увеличивающимися концентрациями бедаквилина), на одном планшете исследовали 12 культур. Значением МИК бедаквилина для среды *M7H9* с использованием планшета считали наименьшую концентрацию препарата, подавляющую видимый рост МБТ в лунке.

В данной работе для характеристики ЛЧ МБТ к бедаквилину использовали установленные в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» пограничные значения МИК (ЕСОФФ) – самые высокие значения МИК препарата в отношении штаммов МБТ, чувствительных к ПТП основного ряда, выделенных от больных туберкулезом легких, не получавших бедаквилин. Пограничное значение МИК на агаровой среде *M7H11* составило 0,03 мкг/мл, в жидкой среде *M7H9* (ВАСТЕС 960, планшет) – 0,25 мкг/мл [4].

Для оценки ЛЧ МБТ к бедаквилину использовали рекомендованные ВОЗ критические концентрации 0,25 мкг/мл (агар) и 1,0 мкг/мл (ВАСТЕС 960). Ввиду отсутствия оценочных критериев для интерпретации результатов, полученных в жидкой среде *M7H9* с использованием планшета, ориентировались на КК 1,0 мкг/мл, установленную для ВАСТЕС 960 [19].

Для статистической обработки полученных результатов рассчитывали 95%-ный доверительный интервал (95%ДИ).

Результаты исследования

По результатам определения ЛЧ МБТ к препаратам основного и резервного рядов 60 (50%) клинических штаммов МБТ из 120 обладали чувствительностью ко всем препаратам. Другие 60 (50%) штаммов МБТ имели устойчивость к различным ПТП. Данные по ЛУ штаммов МБТ к ПТП приведены в таблице 1.

Устойчивость к ПТП основного ряда варьировала от 19,2% до 45,0%, а к препаратам резервного ряда – от 0,8 до 24,2%, за исключением линезолида, к которому все штаммы МБТ проявили чувствительность. Наибольшее количество штаммов МБТ обладали устойчивостью к S (45,0%, 95%ДИ 35,9–54,4%) и к H (41,7%, 95%ДИ 32,7–51,0%). Наименьшее число устойчивых штаммов (0,8%, 95%ДИ 0,02–4,56%) выявлено к Cс.

Таким образом, 60 штаммов МБТ имели различные профили ЛУ к препаратам основного и резервного ряда (рис. 1).

Из 120 изученных штаммов МБТ монорезистентностью (устойчивость к одному ПТП) обладали 13 штаммов (10,8%; 95%ДИ 5,9–17,8%); полирезистентностью (устойчивость к двум

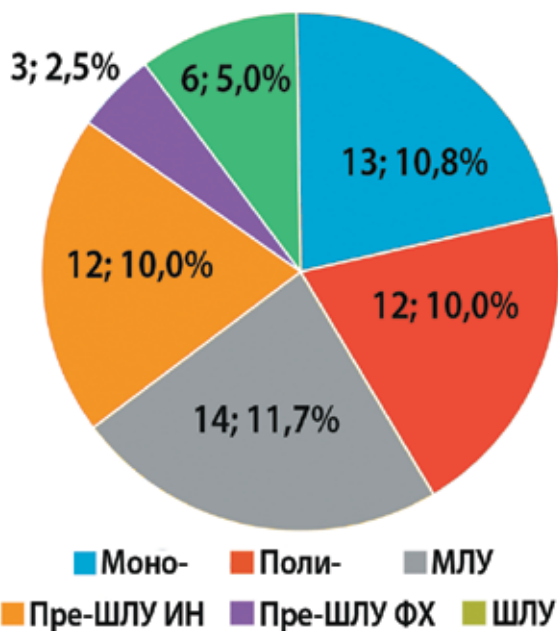


Рис. 1. Профили лекарственной устойчивости штаммов МБТ к ПТП (n = 60)

и более препаратам при условии сохранения чувствительности к рифампицину или изониазиду) – 12 штаммов (10,0%;

95%ДИ 5,3–16,8%); штаммов МБТ с МЛУ (устойчивость к изониазиду и рифампицину независимо от наличия устойчивости к другим ПТП, но при отсутствии ЛУ к фторхинолонам (ФХ) или инъекционным (ИН) препаратам резервного ряда) было 14 (11,7%; 95%ДИ 6,5–18,8%); с пре-ШЛУ ИН (МЛУ в сочетании с ЛУ к любому из ИН, но при отсутствии устойчивости к ФХ) – 12 штаммов (10,0%; 95%ДИ 5,3–16,8%); с пре-ШЛУ ФХ (МЛУ в сочетании с ЛУ к любому из ФХ, но при отсутствии устойчивости к ИН) – 3 штамма (2,5%; 95%ДИ 0,5–7,1%); с ШЛУ (МЛУ в сочетании с устойчивостью к ФХ и ИН независимо от наличия ЛУ к другим ПТП) – 6 штаммов (5,0%; 95%ДИ 1,9–10,6%).

Следующий этап наших исследований заключался в определении значений МИК бедаквилина с помощью трех фенотипических методов. В таблице 2 представлены результаты распределения значений МИК бедаквилина в отношении 60 чувствительных и 60 устойчивых к ПТП штаммов МБТ.

Рост 50% (МИК₅₀), 90% (МИК₉₀) и 100% (МИК₁₀₀) исследуемых клинических штаммов МБТ на агаровой среде М7Н11, независимо от профиля ЛУ к ПТП, ингибировала концентрация бедаквилина 0,03 мкг/мл, которая совпала с пограничным значением (ЕСОFF), установленным на среде М7Н11 для чувствительных к ПТП штаммов МБТ [4].

Таблица 2. Распределение значений МИК бедаквилина в зависимости от чувствительности/устойчивости к ПТП штаммов МБТ

МИК Вdq, мкг/мл	Клинические штаммы МБТ							
	Чувствительные штаммы (n = 60)	Штаммы с различным профилем ЛУ к ПТП (n = 60)						Все штаммы (n = 120)
		Моно-	Поли-	МЛУ	Пре-ШЛУ ИН	Пре-ШЛУ ФХ	ШЛУ	
	абс. / %	абс. / %	абс. / %	абс. / %	абс. / %	абс. / %	абс. / %	абс. / %
М7Н11 (агар)								
≤ 0,03	60 / 50,0	13 / 10,8	12 / 10,0	14 / 11,7	12 / 10,0	3 / 2,5	6 / 5,0	120 / 100,0
МИК ₅₀	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
МИК ₉₀	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
МИК ₁₀₀	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
М7Н9 (ВАСТЕС 960)								
≤ 0,03	2 / 1,7	3 / 2,5	1 / 0,8	3 / 2,5	1 / 0,8	1 / 0,8	1 / 0,8	12 / 10,0
0,06	18 / 15,1	7 / 5,8	6 / 5,0	4 / 3,3	5 / 4,2	1 / 0,8	2 / 1,7	43 / 35,9
0,12	30 / 25,0	0	4 / 3,3	6 / 5,0	4 / 3,3	1 / 0,8	2 / 1,7	47 / 39,1
0,25	10 / 8,4	3 / 2,5	1 / 0,8	1 / 0,8	2 / 1,7	0	1 / 0,8	18 / 15,0
МИК ₅₀	0,12	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,12
МИК ₉₀	0,25	0,25	0,12	0,12	0,25	0,12	0,12	0,25
МИК ₁₀₀	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,12	0,25	0,25
М7Н9 (планшет)								
≤ 0,03	10 / 8,3	4 / 3,3	5 / 4,2	3 / 2,5	3 / 2,5	2 / 1,7	3 / 2,5	30 / 25,0
0,06	32 / 26,8	7 / 5,8	5 / 4,2	9 / 7,5	7 / 5,8	1 / 0,8	1 / 0,8	62 / 51,7
0,12	16 / 13,3	2 / 1,7	2 / 1,7	1 / 0,8	2 / 1,7	0	1 / 0,8	24 / 20,0
0,25	2 / 1,7	0	0	1 / 0,8	0	0	1 / 0,8	4 / 3,3
МИК ₅₀	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,03	0,06	0,06
МИК ₉₀	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,06	0,12	0,12
МИК ₁₀₀	0,25	0,12	0,12	0,25	0,12	0,06	0,25	0,25

Примечание: абс. – абсолютное количество штаммов МБТ, рост которых ингибировала данная концентрация бедаквилина; % – процент штаммов МБТ, рост которых ингибировала данная концентрация бедаквилина.

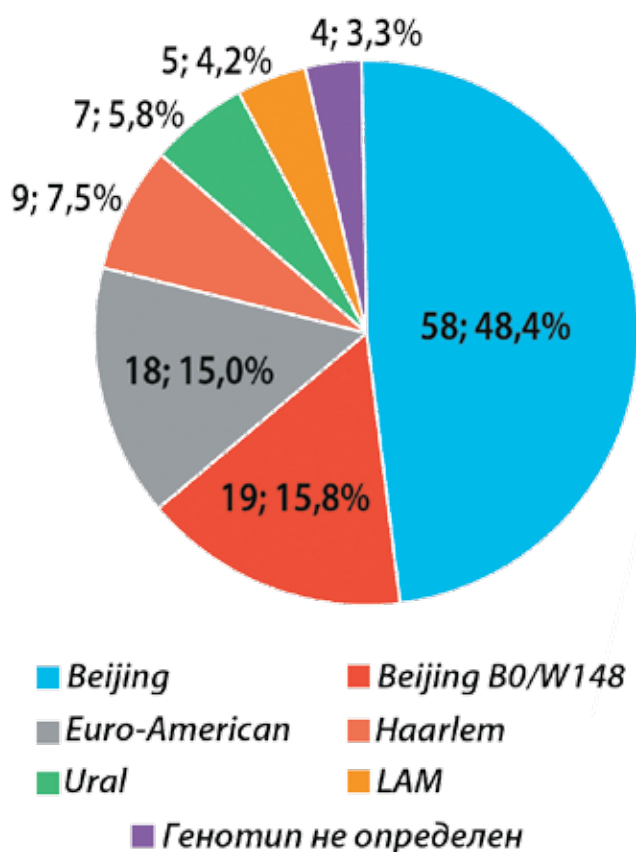


Рис. 2. Распределение клинических штаммов МБТ по генетическим семействам (n = 120)

Значения МИК бедаквилина, определенные в жидкой среде *M7H9* с помощью ВАСТЕС 960 и 96-луночного планшета, распределились в одинаковом диапазоне – от $\leq 0,03$ до 0,25 мкг/мл, отличным от результатов, полученных на плотной среде *M7H11*.

Так, в системе ВАСТЕС 960 значение $МИК_{50}$ бедаквилина составило 0,12 мкг/мл для чувствительных штаммов и 0,06 мкг/мл для штаммов с устойчивостью к ПТП независимо от профиля устойчивости. Однако общий показатель $МИК_{50}$ в отношении всех 120 изученных штаммов МБТ составил 0,12 мкг/мл. Показатель $МИК_{90}$ препарата, равный 0,12 мкг/мл, был одинаковым для штаммов МБТ с полирезистентностью, с МЛУ, с пре-ШЛУ ФХ и с ШЛУ, в то время как для чувствительных штаммов МБТ к ПТП и штаммов с монорезистентностью, с пре-ШЛУ ИН составил 0,25 мкг/мл. Значение $МИК_{100}$ бедаквилина для большинства штаммов МБТ составило 0,25 мкг/мл, за исключением трех штаммов с пре-ШЛУ ФХ, рост которых подавлялся препаратом в концентрации 0,12 мкг/мл. В то же время значения $МИК_{90}$ и $МИК_{100}$ бедаквилина в отношении всех 120 клинических штаммов МБТ, установленные в ВАСТЕС 960, составили 0,25 мкг/мл.

Для штаммов МБТ, чувствительных к ПТП и с различным профилем ЛУ к ПТП, в среде *M7H9* при использовании 96-лу-

ночного планшета были установлены $МИК_{50}$ бедаквилина – 0,06 мкг/мл, за исключением штаммов с пре-ШЛУ ФХ, для которых это значение составило 0,03 мкг/мл. Значение $МИК_{90}$ равно 0,12 мкг/мл, отмечено для большинства штаммов МБТ, за исключением штаммов с пре-ШЛУ ФХ, для которых $МИК_{90}$ была равна 0,06 мкг/мл. Показатель $МИК_{100}$ для чувствительных штаммов МБТ к ПТП, штаммов с МЛУ и с ШЛУ составил 0,25 мкг/мл, для штаммов МБТ с монорезистентностью, полирезистентностью, пре-ШЛУ ИН – 0,12 мкг/мл, для штаммов с пре-ШЛУ ФХ – 0,06 мкг/мл. В отношении всех 120 штаммов МБТ, исследованных на планшете, $МИК_{50}$ составила 0,06 мкг/мл, $МИК_{90}$ – 0,12 мкг/мл, $МИК_{100}$ – 0,25 мкг/мл.

Таким образом, в жидкой среде *M7H9* концентрация бедаквилина 0,25 мкг/мл подавляла 100% исследуемых штаммов МБТ двумя методами и совпала с пограничным значением (ЕСОFF), установленным с помощью ВАСТЕС 960 и планшета для чувствительных к ПТП штаммов МБТ [4].

Для контрольного штамма *M. tuberculosis H₃₇Rv* значения МИК бедаквилина составили: на агаровой среде *M7H11* – 0,03 мкг/мл (в 100% случаев), в жидкой среде *M7H9* с помощью ВАСТЕС 960 – 0,12 мкг/мл и с использованием 96-луночного планшета – 0,06 мкг/мл (в 99% случаев).

Из-за использования разных по составу питательных сред и пластика результаты определения МИК бедаквилина на агаровой среде *M7H11* отличались от результатов, полученных в жидкой среде *M7H9* (ВАСТЕС 960, планшет). Тем не менее данные настоящего исследования, полученные на разных средах, свидетельствуют о высокой противотуберкулезной активности бедаквилина *in vitro* как в отношении чувствительных штаммов МБТ, так и для штаммов с разным профилем ЛУ к ПТП.

Параллельно изучению ЛЧ МБТ к ПТП проводили исследования по определению принадлежности 120 клинических штаммов МБТ к генетическим семействам с помощью молекулярно-генетических методов, в результате которых выявлена генетическая неоднородность этих штаммов. Данные генотипирования представлены на рис. 2.

Исследованные штаммы МБТ отнесены к двум основным генетическим группам Beijing и non-Beijing, которые составили 77 (64,2%; 95%ДИ 54,9–72,7%) и 39 (32,5%; 95%ДИ 24,2–41,7%) штаммов МБТ соответственно. У 4 штаммов МБТ (3,3%; 95%ДИ 0,9–8,3%) генотип не был определен.

Наибольшее количество штаммов МБТ – 58 (48,4%; 95%ДИ 39,1–57,6%) было отнесено к генетической группе Beijing и представлено штаммами семейства Beijing. В свою очередь 19 штаммов МБТ (15,8%; 95%ДИ 9,8–23,6%) относились к семейству Beijing B0/W148. В настоящее время известно, что семейство Beijing широко распространено на территории Евразии. В России представители генотипа Beijing также занимают первое место по выявлению среди генетических семейств [3, 9, 13,]

Таблица 3. Распределение штаммов МБТ из разных генетических семейств в зависимости от чувствительности/устойчивости МБТ к ПТП

Результаты ЛЧ к ПТП штаммов МБТ, (n = 120)		Генетические семейства штаммов МБТ							Всего
		Beijing	Beijing B0/W148	Euro-American	Haarlem	LAM	Ural	Генотип не определен	
		абс.	абс.	абс.	абс.	абс.	абс.	абс.	
		%	%	%	%	%	%	%	
Чувствительные		28	0	15	5	2	7	3	60
		23,3	0	12,5	4,2	1,7	5,8	2,5	50,0
Профили ЛУ к ПТП	Моно-	9	0	1	2	1	0	0	13
		7,5	0	0,8	1,7	0,8	0	0	10,8
	Поли-	8	2	2	0	0	0	0	12
		6,7	1,7	1,7	0	0	0	0	10,0
	МЛУ	5	7	0	1	0	0	1	14
		4,2	5,8	0	0,8	0	0	0,8	11,7
	Пре-ШЛУ ИН	4	7	0	0	1	0	0	12
		3,3	5,8	0	0	0,8	0	0	10,0
	Пре-ШЛУ ФХ	1	1	0	1	0	0	0	3
		0,8	0,8	0	0,8	0	0	0	2,5
ШЛУ	3	2	0	0	1	0	0	6	
	2,5	1,7	0	0	0,8	0	0	5,0	
Всего		58	19	18	9	5	7	4	120
		48,4	15,8	15,0	7,5	4,2	5,8	3,3	100,0

Примечание: абс. – абсолютное количество штаммов МБТ, относящееся к данному семейству; % – количество штаммов МБТ в процентах, относящееся к данному семейству.

Из группы генетических семейств non-Beijing наиболее встречаемыми было семейство Euro-American, представленное 18 штаммами МБТ (15,0%; 95%ДИ 9,1–22,7%). Количество штаммов из семейства Haarlem составило 9 штаммов МБТ (7,5%; 95%ДИ 3,5–13,8%); Ural – 7 штаммов (5,8%; 95%ДИ 2,4–11,7%); LAM – 5 штаммов (4,2%; 95%ДИ 1,4–9,5%).

Результаты исследования по изучению принадлежности клинических штаммов МБТ к различным генетическим семействам сопоставили с результатами определения ЛЧ МБТ к препаратам основного и резервного рядов (таблица 3).

28 штаммов МБТ (23,3%; 95% ДИ 16,1–31,9%) из семейства Beijing были определены как чувствительные к ПТП, тогда как 30 (25,1%) штаммов МБТ обладали различным профилем ЛУ к ПТП: монорезистентностью – 9 штаммов (7,5%; 95%ДИ 3,5–13,8%); полирезистентностью – 8 штаммов (6,7%; 95%ДИ 2,9–12,7%); МЛУ – 5 штаммов (4,2%; 95%ДИ 1,4–9,5%); пре-ШЛУ ИН – 4 штамма (3,3%; 95%ДИ 0,9–8,3%); пре-ШЛУ ФХ – один штамм (0,8%; 95%ДИ 0,02–4,56%); ШЛУ – 3 штамма (2,5%; 95%ДИ 0,5–7,1%).

В группе Beijing B0/W148 штаммов МБТ с чувствительностью к ПТП и с монорезистентностью не обнаружено. Все штаммы из этой группы имели разный профиль устойчивости МБТ к ПТП: полирезистентность – два штамма (1,7%; 95%ДИ 0,2–5,9%); МЛУ – 7 штаммов (5,8%; 95%ДИ 2,4–11,7%); пре-ШЛУ ИН –

7 штаммов (5,8%; 95%ДИ 2,4–11,7%); пре-ШЛУ ФХ – один штамм (0,8%; 95%ДИ 0,02–4,56%); ШЛУ – два штамма (1,7%; 95%ДИ 0,2–5,9%). Полученные результаты соответствуют данным литературы о том, что штаммы МБТ генотипа Beijing B0/W148 чаще ассоциированы с лекарственной устойчивостью к ПТП [14].

Пятнадцать штаммов МБТ (12,5%; 95%ДИ 7,2–19,8%) из семейства Euro-American обладали чувствительностью к ПТП, один штамм (0,8%; 95%ДИ 0,02–4,56%) имел монорезистентность и два штамма обладали полирезистентностью (1,7%; 95%ДИ 0,2–5,9%).

Штаммы МБТ из семейства Haarlem в пяти случаях (4,2%; 95%ДИ 1,4–9,5%) обладали чувствительностью к ПТП, у двух (1,7%; 95%ДИ 0,2–5,9%) выявлена монорезистентность, у одного (0,8%; 95%ДИ 0,02–4,56%) – МЛУ и в одном случае (0,8%; 95%ДИ 0,02–4,56%) – пре-ШЛУ ФХ. Таким образом, в большинстве случаев штаммы МБТ семейства Haarlem ассоциированы с чувствительностью к противотуберкулезным препаратам, что также подтверждается литературными данными [2].

Малочисленную группу штаммов МБТ (4,2%; 95%ДИ 1,37%–9,46%) составили штаммы семейства LAM. Как известно из литературных источников, циркулирующие на территории России штаммы LAM чаще всего ассоциированы с ЛУ МБТ к ПТП [11, 13, 15]. По нашим данным, два штамма МБТ (1,7%; 95%ДИ 0,2–5,9%) имели чувствительность к ПТП, и три штамма

Таблица 4. Распределение значений МИК бедаквилина в зависимости от генотипа штаммов МБТ

МИК Bdq, мкг/мл	Генетические семейства штаммов МБТ							
	Beijing (n = 58)	Beijing B0/W148 (n = 19)	Euro-American (n = 18)	Haarlem (n = 9)	LAM (n = 5)	Ural (n = 7)	Генотип не определен (n = 4)	Всего (n = 120)
	абс. / %	абс. / %	абс. / %	абс. / %	абс. / %	абс. / %	абс. / %	абс. / %
M7H11 (агар)								
≤ 0,03	77 / 100,0	19 / 100,0	18 / 100,0	9 / 100,0	5 / 100,0	7 / 100,0	4 / 100,0	120 / 100,0
МИК ₅₀	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
МИК ₉₀	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
МИК ₁₀₀	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
M7H9 (ВАСТЕС 960)								
≤ 0,03	4 / 6,9	3 / 15,8	0	3 / 33,3	2 / 40,0	0	0	12 / 10,0
0,06	23 / 39,7	8 / 42,1	6 / 33,3	1 / 11,2	0	4 / 57,1	1 / 25,0	43 / 35,8
0,12	26 / 44,8	6 / 31,6	8 / 44,5	3 / 33,3	2 / 40,0	1 / 14,3	1 / 25,0	47 / 39,2
0,25	5 / 8,6	2 / 10,5	4 / 22,2	2 / 22,2	1 / 20,0	2 / 28,6	2 / 50,0	18 / 15,0
МИК ₅₀	0,12	0,06	0,12	0,12	0,12	0,06	0,12	0,12
МИК ₉₀	0,12	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
МИК ₁₀₀	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
M7H9 (планшет)								
≤ 0,03	14 / 24,2	6 / 31,6	3 / 16,6	3 / 33,3	1 / 20,0	2 / 28,6	1 / 25,0	30 / 25,0
0,06	39 / 67,2	9 / 47,3	7 / 38,9	1 / 11,2	2 / 40,0	4 / 57,1	0	62 / 51,7
0,12	4 / 6,9	3 / 15,8	7 / 38,9	4 / 44,3	2 / 40,0	1 / 14,3	3 / 75,0	24 / 20,0
0,25	1 / 1,7	1 / 5,3	1 / 5,6	1 / 11,2	0	0	0	4 / 3,3
МИК ₅₀	0,06	0,06	0,06	0,12	0,06	0,06	0,12	0,06
МИК ₉₀	0,12	0,12	0,12	0,25	0,12	0,12	0,12	0,12
МИК ₁₀₀	0,25	0,25	0,25	0,25	0,12	0,12	0,12	0,25

Примечание: абс. – абсолютное количество штаммов МБТ, рост которых ингибировала данная концентрация бедаквилина;
% – процент штаммов МБТ, рост которых ингибировала данная концентрация бедаквилина.

обладали по одному (0,8%; 95%ДИ 0,02–4,56%): монорезистентностью, пре-ШЛУ ИН и ШЛУ соответственно.

Ранее считалось, что штаммы МБТ семейства Ural фенотипически не ассоциированы с ЛУ [12]. Однако имеются литературные данные о появлении штаммов МБТ из представленного семейства с устойчивостью к ПТП [14]. По результатам настоящего исследования все 7 штаммов МБТ (5,8%; 95%ДИ 2,4–11,7%), принадлежащие семейству Ural, были чувствительными по отношению к ПТП.

Три штамма МБТ (2,5%; 95%ДИ 0,5–7,1%) с неопределенным генотипом обладали чувствительностью к ПТП, у одного выявлена МЛУ (0,8%; 95%ДИ 0,02–4,56%).

В дальнейшем нами были проанализированы результаты определения значений МИК бедаквилина в отношении 120 клинических штаммов МБТ в зависимости от принадлежности к различным генетическим семействам. Данные приведены в таблице 4.

Значения МИК₅₀, МИК₉₀ и МИК₁₀₀, установленные на агаровой среде M7H11 для всех клинических штаммов МБТ, не зависели от принадлежности к генетическому семейству, так же как и от профиля ЛУ к ПТП, и составили 0,03 мкг/мл, что соответствует пограничному значению (ECOFF) [4].

Диапазон значений МИК бедаквилина, полученный в жидкой среде M7H9 с помощью ВАСТЕС 960 и 96-луночного планшета, в зависимости от принадлежности к тому или иному генетическому семейству, находился пределах – от ≤ 0,03 до 0,25 мкг/мл.

Значения МИК₅₀ бедаквилина, полученные в системе ВАСТЕС 960, для штаммов МБТ из семейства Beijing B0/W148 и Ural составили 0,06 мкг/мл, тогда как для штаммов из семейства Beijing, Euro-American, Haarlem, LAM и группы штаммов с неопределенным генотипом данный показатель, как и общий показатель МИК₅₀ для всех штаммов, составил 0,12 мкг/мл. Показатель МИК₉₀ для всех штаммов МБТ из различных генетических семейств составил 0,25 мкг/мл, за исключением штаммов из семейства Beijing, 90% которых подавляла концентрация препарата 0,12 мкг/мл. Рост всех 120 штаммов МБТ, принадлежащих к разным генетическим семействам, бедаквилин ингибировал в концентрации, соответствующей пограничному значению (ECOFF) – 0,25 мкг/мл (МИК₁₀₀).

В жидкой среде M7H9 с использованием 96-луночного планшета для штаммов МБТ из семейства Beijing, Beijing B0/W148, Euro-American, LAM и Ural значение МИК₅₀ бедаквилина составило 0,06 мкг/мл, а для штаммов семейства Haarlem,

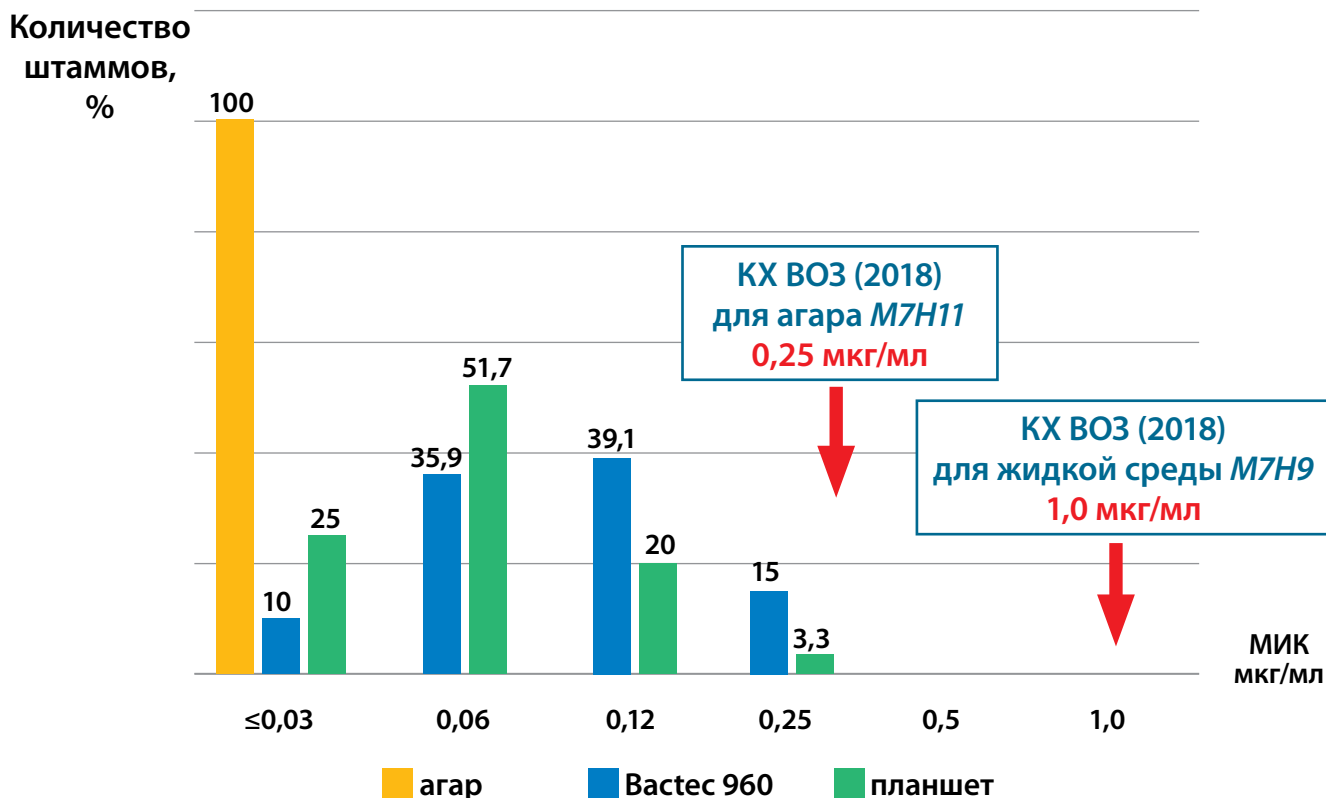


Рис. 3. Распределение МИК бедаквилина, полученных тремя фенотипическими методами (n = 120)

и с неопределенным генотипом этот показатель был 0,12 мкг/мл. Для большинства штаммов МБТ из разных генетических семейств значение $МИК_{90}$ бедаквилина составило 0,12 мкг/мл, за исключением штаммов из семейства Haarlem, для которых $МИК_{90}$ препарата составило 0,25 мкг/мл. Значение $МИК_{100}$ бедаквилина для клинических штаммов из семейства Beijing, Beijing B0/W148, Euro-American, Haarlem составило 0,25 мкг/мл, для штаммов семейства LAM, Ural и штаммов с неопределенным генотипом – 0,12 мкг/мл. Рост всех 120 штаммов МБТ в 100% случаев в жидкой среде на планшете подавляла концентрация препарата 0,25 мкг/мл, так же как и в системе ВАСТЕС 960, и соответствовала пограничному значению (ECOFF).

Для интерпретации ЛЧ МБТ к бедаквилину применили критерии, рекомендованные ВОЗ (2018) для агаровой среды M7H11 и жидкой среды M7H9 в системе ВАСТЕС 960 (рис. 3) [19].

На агаровой среде M7H11 рост всех штаммов (100,0%) ингибировала концентрация бедаквилина – 0,03 мкг/мл, которая в шесть раз меньше КК препарата 0,25 мкг/мл, рекомендованной ВОЗ.

В жидкой среде M7H9 с помощью системы ВАСТЕС 960 в 100,0% случаев препарат подавлял рост штаммов МБТ в концентрации 0,25 мкг/мл, что в четыре раза меньше КК бедаквилина 1,0 мкг/мл, рекомендованной ВОЗ.

Результаты определения МИК, полученные в жидкой среде M7H9 с помощью планшета, свидетельствуют о том, что рост 100,0% штаммов МБТ бедаквилин ингибировал в концентрации 0,25 мкг/мл. Критерий оценки ЛЧ к препарату для данного метода на сегодняшний день не разработан, в связи с чем в данном исследовании мы ориентировались на КК для среды M7H9 в системе ВАСТЕС 960, рекомендованную ВОЗ, которая составляет 1,0 мкг/мл. Таким образом, значения МИК бедаквилина, полученные на планшете, также не превышали данный показатель.

Заключение

В рамках проведенного исследования изучена лекарственная чувствительность МБТ к ПТП, определены значения МИК бедаквилина и установлена принадлежность к генетическим семействам 120 штаммов МБТ, выделенных от 120 больных с впервые выявленным туберкулезом легких до начала химиотерапии и постоянно проживающих в городе Москве.

По результатам определения ЛЧ МБТ к препаратам основного и резервного рядов в 50% случаев штаммы микобактерий обладали чувствительностью и в 50% – устойчивостью к ПТП. Среди изученных клинических штаммов преобладала генетическая группа Beijing (64,2%).

Проведенное исследование по тестированию МИК бедаквилина показало, что препарат обладает *in vitro* высокой противотуберкулезной активностью как в отношении чувствительных штаммов МБТ, так и для штаммов с разным профилем ЛУ к ПТП.

Сравнительный анализ результатов определения значений МИК бедаквилина в отношении данных клинических штаммов

МБТ не выявил взаимосвязи с результатами ЛЧ микобактерий к ПТП и их принадлежностью к генетическим семействам.

Согласно критическим концентрациям, рекомендованным ВОЗ, все исследованные клинические штаммы, выделенные до начала лечения, определены как чувствительные к бедаквилину.

Литература

1. Борисов С.Е., Филиппов А.В., Иванова Д.А., Иванушкина Т.Н., Литвинова Н.В., Гармаш Ю.Ю. Эффективность и безопасность основанных на использовании бедаквилина режимов химиотерапии у больных туберкулезом органов дыхания: непосредственные и окончательные результаты // *Туберкулез и болезни легких*. – 2019. – Т. 97. – № 5. – С. 28-40. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2019-97-5-28-40>.
2. Мокроусов И.В. Методологические подходы к генотипированию *Mycobacterium tuberculosis* для эволюционных и эпидемиологических исследований // *Инфекция и иммунитет*. – 2012. – Т. 2. – № 3. – С. 603-614.
3. Мокроусов И.В., Вязова А.А., Старкова Д.А., Нарвская О.В. Высокоразрешающее типирование штаммов генотипа Beijing российской популяции *Mycobacterium tuberculosis* // *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. – 2012. – Т. 89. – № 7. – С. 46-53.
4. Перетокина И.В., Крылова Л.Ю., Сафонова С.Г., Макарова М.В., Носова Е.Ю., Литвинов В.И. Определение пограничного значения минимальной ингибирующей концентрации бедаквилина в отношении чувствительных клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* на разных питательных средах // *Туберкулез и социально значимые заболевания*. – 2018. – № 3. – С. 32-35.
5. О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации: приказ Минздрава России № 109 от 21 марта 2003 г. – М., 2003. – С. 186– 198.
6. Руководство по применению набора реагентов для выявления ДНК возбудителя туберкулеза, с одновременным установлением генотипа и определением детерминант лекарственной устойчивости к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, аминогликозидам, капреомицину и этамбутолу методом гибридизации на биологическом микрочипе. – Регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития РФ № ФСР 2014/1709 – 2015.
7. Сапожникова Н.В., Скворцова Л.А., Павлова М.В. и др. Туберкулез легких, вызванный *Mycobacterium tuberculosis* различных генотипов // *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. – 2003. – № 10. – С. 13-15.
8. Умпелева Т.В., Кравченко М.А., Еремеева Н.И. и др. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Уральского региона России // *Инфекции и иммунитет*. – 2013. – № 1. – С. 21-28.
9. Хахалина А.А., Краснова М.А., Белиловский Е.М., Перетокина И.В., Носова Е.Ю., Сафонова С.Г. Структура популяции *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью на территории Москвы // *Туберкулез и социально значимые заболевания*. – 2019. – № 2. – С. 29-39.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard – second edition: CLSI document M24-A2. – Wayne, PA, USA. – 2011.
11. Ignatova A., Dubiley S., Stepanshina V., Shemyakin I. Predominance of multi-drug-resistant LAM and Beijing family strains among *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from prison inmates in Tula Region, Russia // *J. Med. Microbiol.* – 2006. – Vol. 55. – N. 10. – P. 1413-1418. doi: 10.1099/jmm.0.46575-0.
12. Mokrousov I. The quiet and controversial: Ural family of *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect. Genet. Evol.* – 2012. – Vol. 12. – N. 4. – P. 619-629. doi: 10.1016/j.meegid.2011.09.026.
13. Mokrousov I., Vyazovaya A., Otten T., Zhuravlev V., Pavlova E., Tarashkevich L., Krishevich V., Vishnevsky B., Narvskaya O. *Mycobacterium tuberculosis* population in northwestern Russia: an update from Russian-EU/Latvian border region // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7: e41318. doi: 10.1371/journal.pone.0041318.
14. Mokrousov I., Vyazovaya A., Solovieva N., Sunchalina T., Markelov Y., Chernyaeva E., Melnikova N., Dogonadze M., Starkova D., Vasilieva N., Gerasimova A., Kononenko Y., Zhuravlev V., Narvskaya O. Trends in molecular epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Republic of Karelia, Russian Federation. // *BMC Microbiol.* – 2015. – 279. doi: 10.1186/s12866-015-0613-3.
15. Reynaud Y., Millet J., Rastogi N. Genetic structuration, demography and evolutionary history of *Mycobacterium tuberculosis* LAM9 sublineage in the Americas as two distinct subpopulations revealed by bayesian analyses // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – P. 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0140911.
16. Rusch-Gerdes S., Pfyffer G.E., Casal M., Chadwick M., Siddiqi S. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44. – N. 3. – P. 688–692. doi:10.1128/JCM.44.3.688-692.2006.
17. Siddiqi S.H., Rusch-Gerdes S. Foundation for Innovative new Diagnostics. BACTEC™ MGIT™ 960. – 2006. – 74 p.

18. Siddiqi S.H. Guidelines for second-line drug susceptibility testing in MGIT based on published studies // Crit. Concentrations and Procedures. – 2014. – 28 p.

19. World Health Organization. Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis // WHO/CDS/TB/2018.5. Geneva. – 2018

[Электронный ресурс] URL: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/260470> (Дата обращения 12.04.2021).

Сведения об авторах

Перетокина Ирина Витальевна – научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. 8 (499) 268-70-33, тел/факс 8 (499) 785-20-82
e-mail: iraperetokina@yandex.ru

Крылова Людмила Юрьевна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. 8 (499) 268-70-33, тел/факс 8 (499) 785-20-82
e-mail: l1959krylova@yandex.ru

Михайлова Юлия Дмитриевна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. 8 (499) 268-70-33, тел/факс 8 (499) 785-20-82
e-mail: juliaisaeva81@rambler.ru

Свириденко Мария Александровна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. 8 (495) 603-30-33, тел/факс 8 (499) 785-20-82
e-mail: dna77@mail.ru

Хахалина Анастасия Александровна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. 8 (495) 603-30-33, тел/факс 8 (499) 785-20-82
e-mail: nastec@bk.ru

Сафонова Светлана Григорьевна – заведомо проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. 8 (499) 268-08-76, тел/факс 8 (499) 785-20-82
e-mail: safonova.s.g@inbox.ru