

## БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА СПАРФЛО® *IN VITRO* В ОТНОШЕНИИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА С РАЗЛИЧНЫМ СПЕКТРОМ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

С.Г. Сафонова<sup>1</sup>, И.Р. Дорожкова<sup>1</sup>, Г.Е. Фрейман<sup>1</sup>,  
С.Л. Веденина<sup>2</sup>, О.О. Кутырова<sup>2</sup>, Е.М. Богородская<sup>1</sup>

## BACTERIOSTATIC ACTIVITY OF SPARFLO® *IN VITRO* ON MYCOBACTERIA TUBERCULOSIS WITH VARIOUS SPECTRUM OF DRUG RESISTANCE

S.G. Safonova, I.R. Dorozhkova, G.E. Freiman, S.L. Vedenina, O.O. Kutyrova, E.M. Bogorodskaya

Для определения бактериостатической активности препарата спарфлоксацина (Спарфло®) *in vitro* в отношении микобактерий туберкулеза (МБТ) с различным спектром лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам определяли его минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) в мкг/мл методом серийных разведений с двойным шагом снижения. На первом этапе исследования определение МИК Спарфло® проводилось с использованием 10 тест-штаммов МБТ, выделенных от больных туберкулезом, и музейного чувствительного лабораторного тест-штамма *M.tuberculosis* H37Rv, на втором этапе с использованием 200 штаммов МБТ, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом и больных с рецидивом заболевания до начала лечения. Для чувствительных штаммов МБТ и штаммов МБТ с множественной лекарственной устойчивостью, с сохраненной чувствительностью к фторхинолонам МИК составила от 0,25 до 0,5 мкг/мл. Для штаммов МБТ с широкой лекарственной устойчивостью МИК определялась в диапазоне от 1,0 до 2,0 мкг/мл. Установлено, что у штаммов МБТ при сохраненной чувствительности к фторхинолонам (левофлоксацину, моксифлоксацину) и моно-устойчивости к офлоксацину, чувствительность к спарфлоксацину сохраняется.

**Ключевые слова:** микобактерии туберкулеза, множественная лекарственная устойчивость, широкая лекарственная устойчивость, противотуберкулезные препараты, минимальная ингибирующая концентрация.

Sparflo® – comparably new antimycobacterial agent of fluoroquinolone group produced by «Dr Reddy's Laboratory's Ltd» (India). Sparflo® may be applied in perspective for treatment of multi- and extended drug-resistant tuberculosis (MDR and XDR TB). But it's necessary to know the main pharmacologic data of morbidity agent and first of all, its drug sensitivity to Sparflo®.

Article is devoted to the *in vitro* study of minimal inhibitory concentrations (mcg/ml) and the levels of bacteriostatic activity of Sparflo® in 200 strains of mycobacteria tuberculosis picked out from new detected tuberculosis patients and patients under suspicion on relapse who have various spectrum of drug resistance. These data may help to select strains with the most proper levels of drug resistance.

**Keywords:** Mycobacteria tuberculosis, multidrug-resistance, extended drug-resistance, anti-tuberculosis drugs, minimal inhibitory concentration.

<sup>1</sup> ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы».

<sup>2</sup> «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.»

## Введение

Распространение возбудителя туберкулеза (ТБ) с лекарственной устойчивостью (ЛУ) к противотуберкулезным препаратам (ПТП) является в последние десятилетия одним из ведущих факторов, определяющих снижение эффективности лечения больных ТБ, рост смертности от ТБ, ухудшение эпидемиологической ситуации в стране [1].

Для лечения ТБ с сохраненной лекарственной чувствительностью возбудителя применяют достаточно эффективные ПТП основного ряда, но при выявлении микобактерий туберкулеза (МБТ) с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) необходимо использовать более дорогие и обладающие выраженным токсическим воздействием препараты резерва, что требует дополнительных экономических вложений и медицинского обеспечения.

Стратегия лечения больных ТБ с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) возбудителя до настоящего времени еще окончательно не разработана, многим пациентам назначают те же препараты, что используются при лечении ТБ с МЛУ МБТ [6].

Успешное лечение больных ТБ с ЛУ МБТ возможно лишь при наличии быстрой и точной верификации диагноза и определения лекарственной чувствительности возбудителя, что требует применения методов ускоренной лабораторной диагностики и тесного сотрудничества между лабораторией и фтизиатрами-клиницистами.

Главным показателем лекарственной чувствительности, независимо от метода ее определения, является величина минимальной ингибирующей концентрации – МИК (в мкг/мл), т. е. минимальная концентрация препарата, которая задерживает видимый рост микроорганизма в стандартном опыте. Величину МИК определяют методом серийных разведений с двойным шагом снижения. На практике величина МИК позволяет отнести исследуемый штамм микроорганизма к одной из трех общепринятых категорий: чувствительной, умеренно устойчивой и устойчивой.

Микроорганизм считают **чувствительным**, если у него отсутствует механизм устойчивости к антимикробному препарату и при лечении стандартными дозами исследуемого препарата отмечается хорошая терапевтическая эффективность.

**Устойчивым** к антимикробному препарату считают микроорганизм, если он имеет механизмы устойчивости к данному препарату и при лечении этим препаратом отсутствует клинический эффект даже при использовании максимальных терапевтических доз препарата.

Микроорганизм относят к **умеренно устойчивым**, если по своей чувствительности он занимает промежуточное положение между чувствительными и устойчивыми штаммами и при лечении клинический эффект наблюдают только при использовании высоких терапевтических доз данного препарата.

Определение критериев лекарственной чувствительности/устойчивости намного более сложный процесс. При этом необходимо учитывать ряд факторов, включая особенности фармакокинетики препарата (колебание концентраций, распределение в организме, связывание с белками и др.), частоту возникновения и характер распределения устойчивых клонов в микробной популяции, скорость и равномерность роста популяции в применяемых условиях опыта.

В этой связи для максимально достоверной экстраполяции результатов тестирования *in vitro* требуются многочисленные и разноплановые исследования. Например, в ходе выработки критериев чувствительности в лаборатории должны быть исследованы штаммы МБТ, выделенные не менее чем от 200 больных.

При определении лекарственной чувствительности/устойчивости МБТ, в первую очередь, желательно использование стандартизированных методов, к которым относится автоматизированная система BACTEC MGIT 960 [2, 3, 4].

## Цель исследования

Изучение бактериостатической активности антибактериального препарата спарфлоксацина (Спарфло®) *in vitro* в отношении микобактерий туберкулеза с различным спектром лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам.

## Материалы и методы исследования

На первом этапе исследования осуществлен подбор 10 тест-штаммов МБТ, как чувствительных, так и устойчивых к различным противотуберкулезным препаратам, выделенных от больных ТБ, и музейного чувствительного лабораторного тест-штамма *M.tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ATCC № 25618, которые были охарактеризованы следующими:

1. Путем пересева исследуемых штаммов на жидкую питательную среду Middlebrook 7H9 с использованием автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 с целью перевода микобактериальных клеток в одинаковую фазу роста и получения с помощью BACTEC MGIT 960 величины КОЕ/мл для характеристики каждого штамма.

2. Путем определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) препарата Спарфло® *in vitro* на жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 с использованием тест-штаммов МБТ с различной лекарственной чувствительностью к противотуберкулезным препаратам основного и резервного ряда и чувствительного музейного штамма H<sub>37</sub>Rv.

В настоящее время объективным методом определения МИК антибактериальных и антимикробных препаратов является метод серийных разведений на автоматизированной системе BACTEC MGIT 960. Это позволяет упростить и ускорить проведение исследования.

Таблица. Результаты изучения минимальных ингибирующих концентраций препарата Спарфло® с использованием тест-штаммов микобактерий туберкулеза

№№ Тест-штаммов	Характеристика штаммов МБТ	Концентрации препарата (мкг/мл)									
		16,0	8,0	4,0	2,0	1,0*	0,5**	0,25	0,125***	0,063***	
1	Ч	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+++
2	Ч	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+++
3	Ч	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+++
4	МЛУ	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+++
5	МЛУ	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+++
6	ШЛУ	—	++	++	++	++	++	++	++	++	+++
7	ШЛУ	—	—	—	—	+	++	++	++	++	+++
8	ШЛУ	—	—	—	+	+	++	++	++	+++	+++
9	ШЛУ	—	—	—	+	+	+	++	++	++	+++
10	ШЛУ	—	—	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
11	Контроль H37Rv	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+++

Примечание:

Ч – тест-штамм, чувствительный ко всем противотуберкулезным препаратам;

МЛУ – тест-штамм с множественной лекарственной устойчивостью;

ШЛУ – тест-штамм с широкой лекарственной устойчивостью;

МБТ – микобактерии туберкулеза;

(—) – отсутствие роста МБТ (чувствительность сохранена);

(+, ++, +++) – наличие роста МБТ (устойчивость к препарату).

\* Соответствует пиковой концентрации спарфлоксацина в крови спустя 3-6 часов после приема 200 мг per os [5]

\*\* Соответствует пиковой концентрации спарфлоксацина в крови через 24 часа после приема 200 мг per os [5]

\*\*\* Концентрации ниже минимальной терапевтической дозы [5]

Определение бактериостатической активности препарата Спарфло® проводили в обогащенной жидкой среде Middlebrook 7H9 в следующих концентрациях: 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 и 16,0 мкг/мл. Контролем служило сравнение с ростом данных штаммов на среде, не содержащей препарата.

Микобактериальную суспензию, содержащую 100 млн. микробных тел в 1 мл, засеивали в каждую пробирку с указанными концентрациями, включая контрольные пробирки без препарата.

Детекцию роста культуры МБТ проводили с помощью автоматизированной системы учета роста культур BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, США) в специальных пробирках MGIT, содержащих связанный флюорофор под полупроницаемой мембраной на дне пробирки. Высвобождение флюорофора и испускание света определенной волны прямо пропорционально зависит от потребления микобактериальными клетками кислорода в среде. Чем больше активно делящихся клеток в среде, тем больше они потребляют кислорода и тем больше выделяется флюорофора. Детекцию роста микобактериальных культур проводили каждый час с помощью программного обеспечения Epicenter (Becton Dickinson, США). Время проведения эксперимента составило 42 дня, согласно протоколу Becton Dickinson.

После получения роста культуры были подвергнуты контролю на видовую специфичность (принадлежность к микро-

бактериям туберкулеза). Для контроля специфичности роста культуры микобактерий применяли: визуальный осмотр положительных пробирок (среда прозрачная, на дне пробирки могут отмечаться зернистые или облаковидные включения), микроскопия осадка при окраске по Цилю-Нельсену и ДНК-идентификация (исследование всех выделенных культур методом ПЦР на IS6110).

Для выполнения второго этапа исследования проводили анализ полученных результатов и отбирали концентрации препарата для дальнейшего изучения МИК у штаммов МБТ, выделенных от 200 больных ТБ.

### Результаты исследования и их обсуждение

На основании проведенного исследования с тест-культурами МБТ с различным спектром ЛУ определяли МИК препарата Спарфло® (табл.)

Для чувствительных штаммов МБТ и штаммов МБТ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), но чувствительных к фторхинолонам, МИК колебалась в диапазоне 0,25-0,5 мкг/мл. Для штаммов МБТ с ШЛУ МИК определялась в диапазоне 1,0-2,0 мкг/мл.

Следует отметить, что тест-штаммы с ШЛУ №№ 7, 8, 9 обладали лекарственной устойчивостью только к офлоксацину (их можно отнести к умеренно-устойчивым штаммам к спарфлоксацину), а тест-штаммы №№ 6 и 10 имели устойчивость как

к офлоксацину, так и к левофлоксацину и были устойчивы к спарфлоксацину.

Все использованные в исследовании тест-штаммы МБТ, выделенные от больных туберкулезом, были охарактеризованы с помощью тест-системы ТБ БИОЧИП-2, позволившей выявить мутации *gyr-A*, ассоциируемые с устойчивостью к фторхинолонам. Данные мутации были выявлены у всех тест-штаммов с ШЛУ.

В дальнейшем при изучении лекарственной чувствительности штаммов МБТ к препарату Спарфло® были сформированы две группы, включившие материалы от 100 больных каждая.

**Первую группу** составили 100 штаммов МБТ, выделенных от 100 диагностических пациентов с подозрением на ТБ и у впервые выявленных больных ТБ до начала лечения.

**Вторую группу** составили 100 штаммов МБТ, выделенных от 100 больных с подозрением на рецидив ТБ и с рецидивом заболевания до начала лечения.

В качестве контрольного штамма использовали чувствительный лабораторный штамм H<sub>37</sub>Rv.

Определение лекарственной чувствительности к препарату Спарфло® у всех выделенных штаммов МБТ проводили в диапазоне (2,0, 1,0, 0,5, 0,25 мкг/мл), установленном при исследовании тест-штаммов на первом этапе.

Чувствительными считались штаммы в том случае, если устойчивости в указанном диапазоне не выявляли.

Умеренно-устойчивыми считались штаммы при наличии устойчивости в диапазоне от 0,25 до 0,5 мкг/мл.

При наличии устойчивости в диапазоне от 1,0 до 2,0 мкг/мл штаммы считались устойчивыми.

В зависимости от спектра ЛУ штаммов МБТ, каждая группа была разделена на три подгруппы: штаммы МБТ, чувствительные к изониазиду и рифампицину (Н и R); штаммы МБТ с МЛУ (устойчивые к Н и R, но чувствительные к препаратам группы фторхинолонов) и штаммы МБТ с ШЛУ.

100 штаммов МБТ, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом (первая группа), распределились следующим образом: у 27 штаммов МБТ была сохранена чувствительность к Н и R; у 43 штаммов МБТ отмечена МЛУ с сохраненной чувствительностью к препаратам группы фторхинолов (офлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину, ципрофлоксацину), 30 штаммов имели ШЛУ, из них у 100% отмечена устойчивость к офлоксацину, а у части штаммов дополнительно выявлена устойчивость к левофлоксацину и моксифлоксацину.

Из 100 штаммов МБТ, выделенных от больных с рецидивом ТБ (вторая группа), у 26 штаммов была сохранена чувствительность к Н и R, у 41 штамма МБТ отмечена МЛУ при сохранении чувствительности к фторхинолонам, 33 штамма МБТ имели ШЛУ, при этом имелась устойчивость к одному и более препаратам из группы фторхинолов.

При определении лекарственной чувствительности к Спарфло® штаммов МБТ, выделенных от впервые выявленных больных ТБ, установлено, что при сохраненной чувствительности к Н и R в девяти случаях из 27 (33,3%) выявлена умеренная устойчивость к Спарфло® (0,25 и 0,5 мкг/мл), которая в трех случаях сочеталась с устойчивостью к офлоксацину, левофлоксацину или к канамицину.

Аналогичные результаты были получены при определении чувствительности к Спарфло® штаммов МБТ от больных с рецидивом заболевания: при сохраненной чувствительности к Н и R умеренная устойчивость к Спарфло® (0,25 и 0,5 мкг/мл) отмечена в восьми случаях из 26 (30,8%), что в пяти случаях сочеталось с устойчивостью к офлоксацину и к левофлоксацину.

При определении лекарственной чувствительности к Спарфло® штаммов МБТ МЛУ с сохраненной чувствительностью к фторхинолонам, выделенных как от впервые выявленных больных ТБ, так и от больных с рецидивом ТБ, отмечена чувствительность в 70% ко всем концентрациям Спарфло® и в 30% – умеренная устойчивость в диапазоне от 0,25 до 0,5 мкг/мл.

При определении лекарственной чувствительности к Спарфло® штаммов МБТ с ШЛУ, выделенных как от впервые выявленных больных, так и от больных с рецидивом заболевания, в 30 % отмечена умеренная устойчивость к Спарфло® (0,25-0,5 мкг/мл) при наличии устойчивости только к офлоксацину.

В 75% случаев устойчивость к Спарфло® выявлена в концентрациях 1,0-2,0 мкг/мл, при этом следует отметить, что данная устойчивость сочеталась с устойчивостью к левофлоксацину и моксифлоксацину.

Таким образом, независимо от группы больных, при сохранении чувствительности штаммов МБТ к препаратам фторхинолового ряда (офлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину) чувствительность к Спарфло® отмечена в концентрациях от 0,5 до 2,0 мкг/мл. При устойчивости штаммов МБТ к офлоксацину, но при сохраненной чувствительности к левофлоксацину и моксифлоксацину, чувствительность к Спарфло® также сохранялась.

### Заключение

При чувствительности МБТ к левофлоксацину, при устойчивости к офлоксацину в схемы химиотерапии больных туберкулезом можно включать Спарфло® вследствие его аналогичной эффективности. При клинической необходимости Спарфло® может быть включен в схему лечения больных туберкулезом при сохранении чувствительности МБТ к изониазиду и рифампицину.

Литература

1. Туберкулез в Российской Федерации 2010 г. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации. – М., 2011. – 280 с.
2. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis / World Health Organization: Geneva, 2008. – (WHO/HTM/TB/2008.402).
3. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis / World Health Organization: Geneva, 2009. – (WHO/HTM/TB/2009.442).
4. Interim recommendations for the surveillance of drug resistance in tuberculosis / World Health Organization: Geneva, 2007. – (WHO/HTM/TB/2007.385).
5. The Internet drug index. 2014. URL: <http://www.rxlist.com/zagam-drug/clinical-pharmacology.htm> (Дата обращения 14.04.2014).
6. Phillips L. TB's revenge // Nature. – 2013. – Vol. 493. – P. 14-16.

Сведения об авторах

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

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д.10  
Тел. + 7 (499) 268-08-76, факс + 7 (499) 785-20-82  
e-mail: safonova.s.g@inbox.ru

**Дорожкова Инна Рафаиловна** – главный научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор медицинских наук, профессор

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10  
Тел. +7 (499) 268-70-33, факс + 7 (499) 785-20-82

**Фрейман Георгий Ефимович** – заведующий Централизованной бактериологической лабораторией ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10  
Тел. +7 (499) 268-70-33, факс + 7 (499) 785-20-82  
e-mail: g.freiman@mail.ru

**Веденина Светлана Леонидовна** – маркетинг-менеджер «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.»

Адрес: 115035, г. Москва, Овчинниковская наб., д. 20, стр. 1  
Тел. + 7 (495) 795-39-39, факс + 7 (495) 795-39-08  
e-mail: Vedenina@drreddys.com

**Кутырова Ольга Олеговна** – старший бренд-менеджер «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.»

Адрес: 115035, г. Москва, Овчинниковская наб., д. 20, стр. 1  
Тел. + 7 (495) 795-39-39, факс + 7 (495) 795-39-08  
e-mail: olga.kutyrova@drreddys.com

**Богородская Елена Михайловна** – директор ГКУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10  
Тел. +7 (499) 268-00-05  
Факс +7 (499) 785-20-82  
e-mail: mnpcbdir2012@yandex.ru