

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОГРАНИЧНОГО ЗНАЧЕНИЯ МИНИМАЛЬНОЙ ИНГИБИРУЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕДАКВИЛИНА В ОТНОШЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* НА РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

И.В. Перетокина, Л.Ю. Крылова, С.Г. Сафонова, М.В. Макарова, Е.Ю. Носова, В.И. Литвинов  
ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом  
Департамента здравоохранения города Москвы»

## DEFINITION OF THE BOUNDARY VALUES OF MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATIONS OF BEDAQUILINE IN THE SUSCEPTIBLE CLINICAL STRAINS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN VARIOUS NUTRIENT MEDIA

I.V. Peretokina, L.Yu. Krilova, S.G. Safonova, M.V. Makarova, E.Yu. Nosova, V.I. Litvinov

В статье представлены результаты определения значений минимальной ингибирующей концентрации (МИК) бедаквилина в отношении чувствительных к противотуберкулезным препаратам (ПТП) основного ряда 100 клинических штаммов *M. tuberculosis* на разных питательных средах. Исследования проводили в жидкой среде Middlebrook 7H9 (M7H9) с использованием автоматизированной системы BACTEC™ MGIT™ 960 и 96-луночного планшета, а также на агаровой среде Middlebrook 7H11 (M7H11). На основании полученных данных определены диапазоны значений МИК: в жидкой среде M7H9 – от 0,03 до 0,25 мкг/мл; на агаре M7H11 – от  $\leq 0,015$  до 0,03 мкг/мл. В отношении чувствительных штаммов *M. tuberculosis* установлены пограничные значения МИК: 0,25 мкг/мл в жидкой среде M7H9 и 0,03 мкг/мл на агаровой среде M7H11.

**Ключевые слова:** *M. tuberculosis*, бедаквилин, минимальная ингибирующая концентрация

The article presents the results of determining the values of the minimum inhibitory concentration (MIC) of bedaquiline to the first line anti-tuberculosis drugs (ATD) of the main series of 100 clinical strains of *M. tuberculosis* in different nutrient media. The studies were carried out in the liquid Middlebrook 7H9 (M7H9) medium using an automated system BACTEC™ MGIT™ 960 and 96-well panel, as well as on the agar medium Middlebrook 7H11 (M7H11). Based on the obtained data, the ranges of MIC values were determined: in the liquid medium M7H9 – from 0.03 to 0.25 µg/ml, agar M7H11 – from  $\leq 0.015$  to 0.03 µg/ml. For sensitive strains of *M. tuberculosis*, the limit values of MIC were determined: 0.25 µg/ml in M7H9 liquid medium and 0.03 µg/ml in M7H11 agar medium.

**Key words:** *M. tuberculosis*, bedaquiline, minimal inhibitory concentration

### Введение

Новый противотуберкулезный препарат (ПТП) из группы диарилхинолинов – бедаквилин в настоящее время получил широкое применение во всем мире в составе комбинированной терапии туберкулеза органов дыхания при наличии множественной и широкой лекарственной устойчивости возбудителя [7, 10, 16, 21].

Использование химиотерапевтических препаратов непременно должно сопровождаться исследованием на чувствительность возбудителя с целью контроля над развитием лекарственной устойчивости. На сегодняшний день для оценки чувствительности *M. tuberculosis* к бедаквилину официальные данные о величине критической концентрации (КК) препарата отсутствуют, так же как и утвержденные унифицированные методы определения данного параметра. Всемирная орга-

низация здравоохранения (ВОЗ) при отсутствии конкретных данных о значениях КК бедаквилина рекомендовала косвенно отслеживать чувствительность *M. tuberculosis* путем оценки минимальной ингибирующей концентрации (МИК) препарата [11].

Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST) предложил пограничное значение МИК  $\leq 0,25$  мкг/мл для выявления чувствительных к бедаквилину штаммов *M. tuberculosis* при использовании агаровых сред Middlebrook 7H11/7H10 [8]. Однако данный метод определения МИК не удовлетворяет потребности клиники в связи с длительной продолжительностью периода, необходимого для получения результата исследования.

Определить значения МИК бедаквилина в отношении штаммов *M. tuberculosis* гораздо быстрее, используя жидкую среду Middlebrook 7H9 (M7H9) [2].

**Цель исследования**

Определить пограничные значения МИК бедаквилина в отношении чувствительных к ПТП основного ряда клинических штаммов *M. tuberculosis* на разных питательных средах.

**Материалы и методы исследования**

Исследования проведены в Централизованной бактериологической лаборатории МНПЦ борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы на 100 клинических штаммах *M. tuberculosis*, чувствительных к ПТП основного ряда. Штаммы выделены от больных туберкулезом легких, находящихся на лечении в клиниках и филиалах МНПЦ борьбы с туберкулезом и не получавших бедаквилин в схеме химиотерапии.

Выделение культур *M. tuberculosis* из диагностического материала (мокрота) и определение их лекарственной чувствительности (ЛЧ) проводили с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС™ MGIT™ 960 по общепринятому методу [3, 18]. Параллельно осуществляли молекулярно-генетические исследования с целью доказательства принадлежности выделенной культуры к виду *M. tuberculosis*, а также определения генетических маркеров устойчивости к ПТП [5].

Значения МИК бедаквилина были определены методом серийных разведений с двойным шагом снижения концентрации в жидкой среде *M7H9* с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС™ MGIT™ 960 и 96-луночного планшета [2, 4, 6, 12, 14, 18]. Диапазон исследуемых концентраций препарата был выбран от 0,015 до 1,0 мкг/мл на основании данных литературы [20] и полученных нами предварительных результатов.

Аналогичное исследование по определению МИК бедаквилина проводили на агаровой среде *M7H11*, которая считается референс-методом для определения МИК. Согласно данным, представленным в инструкции к препарату, диапазон исследуемых концентраций установили от 0,008 до 0,12 мкг/мл [1, 19].

Пограничное значение МИК бедаквилина было установлено как самое высокое значение МИК препарата в отношении всех изученных чувствительных штаммов *M. tuberculosis* на разных питательных средах.

В качестве контрольного штамма использовали стандартный референс-штамм *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv – ATCC®.

При статистической обработке полученных результатов, используя программное обеспечение Epi Info 7.1.4.0 [9], определяли критерий Мак-Немара и 95%-ные доверительные интервалы (95%ДИ). Различия в результатах определения значений МИК бедаквилина на разных питательных средах считали значительными при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и обсуждение**

Результаты определения значений МИК бедаквилина, полученные на агаровой и жидкой питательных средах в отношении 100 чувствительных к ПТП штаммов *M. tuberculosis*, представлены в таблице.

Значения МИК бедаквилина, полученные в жидкой среде *M7H9* с помощью ВАСТЕС™ MGIT™ 960 и с использованием 96-луночного планшета, находились в диапазоне от 0,03 до 0,25 мкг/мл. Для большей части штаммов МИК составили 0,06 мкг/мл (34,0% и 37,0% соответственно) и 0,12 мкг/мл (36,0% и 34,0% соответственно). Несколько ниже была доля штаммов, в отношении которых была установлена МИК бедаквилина 0,25 мкг/мл (23,0% и 18,0% соответственно). Наименьшее значение МИК бедаквилина – 0,03 мкг/мл – определено для 7,0% штаммов с помощью ВАСТЕС™ MGIT™ 960 и для 11,0% штаммов – с использованием 96-луночного планшета. Сравнительный анализ результатов показал достоверность совпадения значений МИК, полученных в жидкой среде *M7H9* с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС™ MGIT™ 960 и 96-луночного планшета ( $p > 0,05$ ).

Диапазон значений МИК, полученных на агаровой среде *M7H11*, составил от 0,015 и менее до 0,03 мкг/мл. Для 29,0% штаммов МИК бедаквилина составили 0,015 мкг/мл и менее, для 71,0% – 0,03 мкг/мл. Результаты определения МИК бедаквилина на агаровой среде *M7H11* значительно отличались от результатов, полученных в жидкой среде *M7H9*, что объясняется различиями в составе питательных сред. По данным M. Rouan и соавт. (2012), значения МИК препаратов могут увеличиваться в присутствии 5% бычьего сывороточного альбумина, который содержится в жидкой среде *M7H9* и не содержится в агаровой [17]. Также это может быть связано с составом пластика, используемого для MGIT-пробирок или

Таблица. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) бедаквилина в отношении чувствительных клинических штаммов *M. tuberculosis*

МИК бедаквилина (мкг/мл)	Количество штаммов <i>M. tuberculosis</i> , рост которых ингибируется данной концентрацией бедаквилина (n = 100)									Достоверность различий для жидких сред (p)
	<i>M7H11</i> (агар)			<i>M7H9</i> (жидкая среда)						
				ВАСТЕС™ MGIT™ 960			96-луночный планшет			
	абс.	%	95%ДИ	абс.	%	95%ДИ	абс.	%	95%ДИ	
0,015	29	29,0	20,4–38,9	–	–	0,0–3,6	–	–	0,0–3,6	–
0,03	71	71,0	61,1–79,6	7	7,0	2,9–13,9	11	11,0	5,6–18,8	0,2888
0,06	–	–	0,0–3,6	34	34,0	24,8–44,3	37	37,0	27,6–47,2	0,6056
0,12	–	–	0,0–3,6	36	36,0	26,6–46,2	34	34,0	24,8–44,2	0,7728
0,25	–	–	0,0–3,6	23	23,0	15,2–32,5	18	18,0	11,0–27,0	0,0736

люминесцентными составляющими, встроенными в силикон на дне пробирок [15].

Таким образом, при определении МИК бедаквилина в жидкой среде *M7H9* в отношении всех изученных штаммов *M. tuberculosis* получен более широкий «спектр» значений, в то время как в агаровой среде *M7H11* МИК ограничивается двумя значениями.

Для контрольного чувствительного штамма *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv значение МИК бедаквилина в жидкой среде *M7H9* в системе ВАСТЕС™ MGIT™ 960 составило 0,12 мкг/мл, с использованием 96-луночного планшета – 0,06 мкг/мл, а на агаровой среде *M7H11* – 0,03 мкг/мл. Полученные значения МИК бедаквилина для референс-штамма H<sub>37</sub>Rv совпали с данными литературы [13, 20].

В результате определения на разных средах самых высоких значений МИК бедаквилина были установлены пограничные значения в отношении чувствительных к ПТП основного ряда клинических штаммов *M. tuberculosis*: 0,25 мкг/мл в жидкой среде *M7H9* и 0,03 мкг/мл на агаровой среде *M7H11*.

Установленное пограничное значение МИК бедаквилина 0,03 мкг/мл на агаровой среде *M7H11* отличается от значения, предлагаемого EUCAST [8].

## Заключение

В настоящем исследовании установлены пограничные значения МИК бедаквилина в отношении 100 чувствительных к ПТП основного ряда клинических штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких, не получавших бедаквилин. В жидкой среде *M7H9* пограничное значение составило 0,25 мкг/мл, на агаровой среде *M7H11* – 0,03 мкг/мл.

Результаты исследования показали высокую степень корреляции результатов, полученных в жидкой среде *M7H9* с помощью системы ВАСТЕС™ MGIT™ 960 и с использованием 96-луночного планшета ( $p > 0,05$ ).

Установленные пограничные значения МИК бедаквилина на разных питательных средах для клинических штаммов, чувствительных к ПТП основного ряда, будут использоваться как критерии оценки лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* в дальнейших исследованиях до начала и в процессе лечения больных туберкулезом легких, в режимы химиотерапии которых будет включен бедаквилин, а также с целью изучения формирования лекарственной устойчивости.

Полученные пограничные значения МИК в отношении чувствительных штаммов *M. tuberculosis* в дальнейшем могут быть использованы для установления критических концентраций и клинических пограничных значений.

## Литература

1. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Сиртуро (Sirturo®). Регистрационный номер: ЛП-002281. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ros-med.info/reestrsl/info.php?action=info&id=26223>. (Дата обращения 10.03.2018).
2. Макарова М.В., Крылова Л.Ю., Носова Е.Ю., Литвинов В.И. Характеристика штаммов *M. tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью с помощью тест-системы Sensititre MycoTB (предпосылки для внесения корректив в лечение больных туберкулезом с ШЛУ возбудителя) // Туберкулез и социально значимые заболевания. – М. – 2016. – № 2. – С. 38-43.
3. О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации: приказ № 109 Минздрава России от 21 марта 2003 г. – М., 2003. – С. 186–198.
4. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания МУК 4.2.1890-04 от 4 марта 2004 года. [Электронный ресурс]. URL: [http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT\\_ID=4957](http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4957). (Дата обращения 27.02.2018).
5. Руководство по применению набора реагентов для выявления микобактерий туберкулезного комплекса и определения их лекарственной чувствительности к рифампицину и изониазиду на биологических микрочипах «ТБ-БИОЧИП-1». Регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Российской Федерации № ФСР 2011/10088 от 03.02.2011 г. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.biochip-imb.ru/attachments/article/24/ТБ-БИОЧИП-1%20Руководство%20пользователя.pdf%8F.pdf>. (Дата обращения 27.02.2018).
6. Abuali M., Katariwala R., LaBombardi V. A comparison of the Sensititre® MYCOTB panel and the agar proportion method for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 31. – N. 5. – P. 835-839.
7. Borisov S., Dheda K., Enwerem M. et al. Effectiveness and safety of bedaquiline-containing regimens in the treatment of multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: a multicentre study // *Eur. Respir. J.* – 2017. – Vol. 49. – N. 5. 1700387. doi: 10.1183/13993003.0387-2017.
8. Definitions of clinical breakpoints and epidemiological cut-off values. Clinical breakpoints table V.5.0. Valid From 2015-01-01. [Электронный ресурс]. URL: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) (Дата обращения 27.02.2018).
9. Epi Info™ help desk Centers for Disease Control and Prevention [Электронный ресурс]. URL <http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/> (Дата обращения 27.02.2018).
10. Field S. Bedaquiline for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: great promise or disappointment? // *Ther. Adv. Chronic. Dis.* – 2015. – Vol. 6. – N. 4. – P. 170-184.
11. Global tuberculosis report 2014. WHO/HTM/TB/2014.08, 2014. – Geneva: WHO, 2014. – 154 p. [Электронный ресурс]. URL: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) (Дата обращения 27.02.2018).
12. Hall L., Jude K. P., Clark S.L. et al. Evaluation of the Sensititre MycoTB plate for susceptibility testing of the *Mycobacterium tuberculosis* complex against first- and second-line agents // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol. 50. – N. 11. – P. 3732-3734.
13. Kaniga K., Cirillo D., Hoffner S. et al. A Multilaboratory, multicountry study to determine bedaquiline MIC quality control ranges for phenotypic drug susceptibility testing // *J. Clin. Microbiol.* – 2016. – Vol. 54. – N. 12. – P. 2956-2962.

14. Lee J., Armstrong D., Ssengooba W. et al. Sensititre MYCOTB MIC plate for testing Mycobacterium tuberculosis susceptibility to first- and second-line drugs // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58. – N. 1. – P. 11-18.
15. Lounis N., Vranckx L., Gevers T. In vitro culture conditions affecting minimal inhibitory concentration of bedaquiline against M. tuberculosis // *Med. Mal. Infect.* – 2016. – Vol. 46. – N. 4. – P. 220-225.
16. Pym A., Diacon A., Tang S. et al. Bedaquiline in the treatment of multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis // *Eur. Respir. J.* – 2016. – Vol. 47. – N. 2. – P. 564-74.
17. Rouan M.C., Lounis N., Gevers T. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of TMC207 and its N-desmethyl metabolite in a murine model of tuberculosis // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2012. – Vol. 56. – P. 1444-1451. doi:10.1128/AAC.00720-11.
18. Siddiqi S.H., Rusch-Gerdes S. MGIT procedure manual for BACTEC™ MGIT 960™ system. – Foundation for Innovative New Diagnostics, 2006. – 74 p. [Электронный ресурс]. URL: [https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit\\_manual\\_nov2006.pdf](https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf)
19. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes: approved standard: 2nd Ed. CLSI document M24-A2. – Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011. [Электронный ресурс]. URL: [https://www.clsi.org/media/1463/m24a2\\_sample.pdf](https://www.clsi.org/media/1463/m24a2_sample.pdf). (Дата обращения 27.02.2018).
20. Torrea G., Coeck N., Desmaretz C. et al. Bedaquiline susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in an automated liquid culture system // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2015. – Vol. 70. – N. 8. – P. 2300-2305.
21. The use of bedaquiline in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: interim policy guidance. WHO/HTM/TB/2013.6. – Geneva: WHO, 2013. – 64 p. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.who.int/tb/publications/mdrtb-treatment-guideline/en/> (Дата обращения 27.02.2018).

## Сведения об авторах

**Перетокина Ирина Витальевна** – врач-бактериолог Централизованной бактериологической лаборатории ГБУЗ города Москвы «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10  
Тел. + 7 (499) 268-70-33, тел./факс + 7 (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. + 7 (499) 268-70-33, тел./факс + 7 (499) 785-20-82  
e-mail: luda.yurievna2017@yandex.ru

**Сафонова Светлана Григорьевна** – заведующая отделом лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «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 (495) 603-30-33  
e-mail: safonova.s.g@inbox.ru

**Макарова Марина Витальевна** – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «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 (916) 688-98-25, факс + 7 (495) 964-86-37  
e-mail: makarova75@yandex.ru

**Носова Елена Юрьевна** – ведущий научный сотрудник отдела лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д. 10  
Тел. + 7 (495) 603-30-33, тел. /факс + 7 (499) 785-20-82  
e-mail: rna68@rambler.ru

**Литвинов Виталий Ильич** – научный руководитель ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10  
Тел. + 7 (495) 268-04-15  
e-mail: mnpcbtlv@yandex.ru