

ИЗУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *M. TUBERCULOSIS* С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ *SENSITITRE MYCOTB* НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРИТИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ХИМИОПРЕПАРАТОВ

М.В. Макарова, Ю.Д. Исаева, Л.Ю. Крылова, В.И. Литвинов

ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

STUDY DRUG SENSITIVITY *M. TUBERCULOSIS* WITH TEST SYSTEM *SENSITITRE MYCOTB* BASED ON CERTAIN CRITICAL CONCENTRATION FOR THE ANTITUBERCULOSIS DRUGS

M.V. Makarova, Yu.D. Isaeva, L.Yu. Krilova, V.I. Litvinov

В тест-системе Sensititre MycoTB изучены минимальные ингибирующие концентрации (МИК) изониазида, рифампицина, стрептомицина, этамбутола, амикацина, канамицина, офлоксацина и моксифлоксацина в отношении условно чувствительных и условно устойчивых штаммов МБТ, выделенных из различного диагностического материала, полученного от больных различными формами туберкулеза легких, находящихся на лечении в стационарах МНПЦ борьбы с туберкулезом.

Критические концентрации (КК) химиопрепаратов для тест-системы Sensititre MycoTB были определены в результате анализа полученных значений МИК препаратов, как наименьшие концентрации, подавляющие рост 95% чувствительных штаммов и не препятствующие росту 95% устойчивых. Установлены следующие их значения: для стрептомицина – 1,0, изониазида – 0,25, рифампицина – 1,0, этамбутола – 4,0, офлоксацина – 2,0, моксифлоксацина – 0,25, канамицина – 2,5 и амикацина – 1,0 мкг/мл.

На основе определения КК проведено сравнительное изучение эффективности использования тест-системы Sensititre MycoTB в сопоставлении с методами культивирования в BACTEC™ MGIT™ 960 и в среде Левенштейна-Йенсена для определения ЛЧ МБТ.

*Изучены культуры *M. tuberculosis*, выделенные от 137 больных. Установлено, что имеет место высокий процент совпадения данных, полученных при определении ЛЧ с помощью тест-системы Sensititre MycoTB, и других методов. Эта система имеет преимущества, связанные со стандартизацией процесса и возможностью количественного определения (степени) устойчивости одновременно к 12 химиопрепаратам в короткие сроки (7–14 дней). Метод определения ЛЧ *M. tuberculosis* с помощью тест-системы Sensititre MycoTB технически проще в исполнении, чем все другие методы, она апробирована как за рубежом, так и в МНПЦБТ, сертифицирована и может быть использована в клинической практике.*

Ключевые слова: *лекарственная чувствительность *M. tuberculosis*, минимальные ингибирующие концентрации, критические концентрации, тест-система Sensititre MycoTB*

*Determination of the critical concentrations (CC) of drugs, widely used in the treatment of tuberculosis, to evaluate the results of the drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* isolates using Sensititre MycoTB test system.*

We studied using Sensititre MycoTB test system the minimal inhibitory concentrations (MICs) of streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol, amikacin, kanamycin, moxifloxacin and ofloxacin on the panel of the conditionally sensitive and conditionally resistant MBT strains isolated from different diagnostic material obtained in patients with pulmonary tuberculosis who were treated at the Moscow research and Clinical Center for Tuberculosis Control.

As a result of the analysis of the obtained MICs values, we determined the critical concentrations of antituberculosis drugs by MycoTB test system as the lowest concentration which inhibits the growth of 95% of sensitive MBT strains and allows the growth of 95% resistant MBT strains. We determined the following values of CCs: streptomycin – 1,0, isoniazid – 0,25, rifampicin – 1,0, ethambutol – 4,0, ofloxacin – 2,0, moxifloxacin – 0,25, kanamycin – 2,5 and amikacin – 1,0 µg/ml.

*We carried out the comparative analysis of the effectiveness of the drug susceptibility testing (DST) of *M. tuberculosis* performed by Sensititre MycoTB test in comparison with the cultivation methods on Middlebrook in the BACTEC™ MGIT™ 960 system and on Löwenstein-Jensen solid medium.*

*The cultures of *M. tuberculosis* obtained from 137 patients were investigated. There was the high percentage of matches of data obtained by Sensititre MycoTB test and other methods. The Sensititre MycoTB test has some advantages such as the standardization of the process and the ability of simultaneous quantitative determination of the drug resistance level for 12 antituberculosis drugs in the short period (7-14 days). The method of the DST by Sensititre MycoTB test is simpler than others. This Sensititre MycoTB test-system was tested abroad and in Moscow TB Control Center, certified in Russia and can be used in clinical practice.*

Keywords: **M. tuberculosis* drug susceptibility, minimal inhibitory concentration, critical concentration, Sensititre MycoTB test-system*

Введение

Сегодня одной из главных проблем фтизиатрии является быстро прогрессирующее увеличение частоты лекарственной устойчивости возбудителя заболевания – множественной (МЛУ) и даже широкой (ШЛУ) (МЛУ в сочетании с устойчивостью к фторхинолонам и аминогликозидам) [1, 2, 5, 7, 8, 11].

Для оценки результатов культурального определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) микобактерий туберкулеза (МБТ) используют следующие интерпретационные категории.

Критическая концентрация (КК) – наименьшая концентрация лекарственного препарата, которая ингибирует рост 95% «диких штаммов» МБТ, не встречавшихся с данным препаратом, а также не препятствует росту штаммов, выделенных от больных, «не отвечающих» на лечение данным препаратом. Основным параметром, необходимым для эффективного использования метода определения ЛЧ, является разработка КК каждого препарата, поскольку этот показатель позволяет разделить исследуемые штаммы на чувствительные и устойчивые. Значения КК существенно различаются при использовании разных методов определения ЛЧ (и, соответственно, питательных сред).

Чувствительный штамм (при использовании КК) имеет уровень чувствительности, который соответствует уровню чувствительности «диких штаммов» или незначительно отличается от него – исследуемый препарат в КК полностью подавляет его рост.

Устойчивый штамм (при использовании КК) обладает измененной (сниженной) чувствительностью, по сравнению с «дикими штаммами» – растет в присутствии исследуемого препарата в КК.

Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) – концентрация лекарственного препарата, полностью подавляющая рост данного микроорганизма. Применяется для количественной оценки уровня чувствительности/устойчивости штамма.

Чувствительный штамм (при определении МИК) – рост штамма ингибируется концентрацией антимикробного препарата, которая ниже концентрации, достигаемой в местах локализации возбудителя в организме при приеме рекомендованных для лечения данной инфекции доз препарата.

Устойчивый штамм (при определении МИК) – рост штамма ингибируется концентрацией лекарственного препарата, которая превышает обычно достигаемую в местах локализации возбудителя в организме при приеме рекомендованных для лечения данной инфекции доз препарата.

Понятно, что отсутствие быстрого и надежного метода исследования ЛЧ ограничивает возможности назначения эффективного сочетания препаратов для конкретного больного.

Основными микробиологическими методами определения ЛЧ *M. tuberculosis in vitro* к противотуберкулезным препаратам являются:

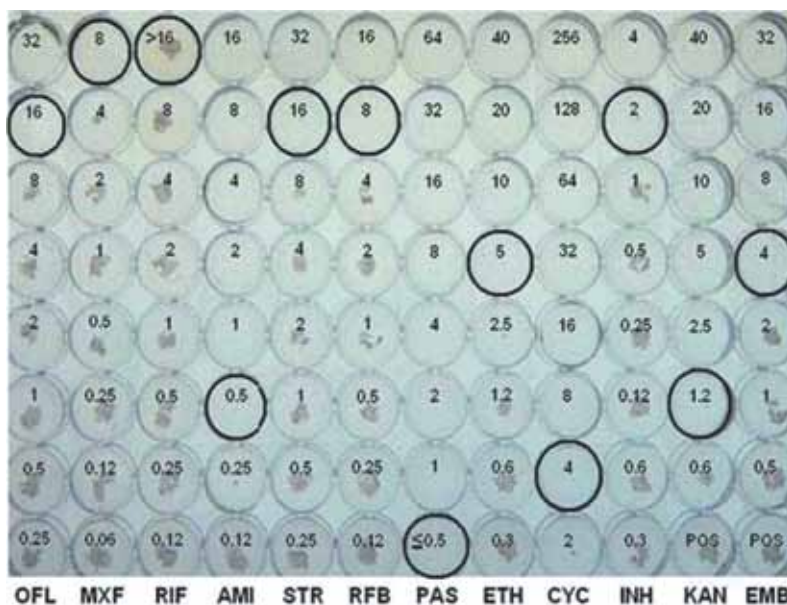
- Метод абсолютных концентраций – на плотных питательных средах – в России на среде Левенштейна-Йенсена (Л-Й), срок получения результата – 21 день, из-за длительной инкубации происходит частичная инактивация лекарственного препарата в среде.
- Метод пропорций на агаровой среде *Middlebrook 7H10* или *7H11* является «золотым стандартом», срок получения результата – 21 день, трудоемкий, инактивация лекарственного препарата в среде также происходит в результате длительного срока инкубации.
- Определение ЛЧ в жидких средах в автоматизированных системах (VersaTREK, BACTEC™ MGIT™ 960), длительность получения результата – 5–14 дней; дорогостоящее оборудование, технически трудоемкий способ.

Недостатком всех широко применяющихся до настоящего времени методов определения ЛЧ является то, что они качественные – определение производится к одной (критической), иногда и к более высокой концентрации препарата, что не дает в полном объеме представления о степени устойчивости/чувствительности исследуемого штамма МБТ.

В настоящее время появилась новая тест-система – Sensititre MycoTB, разработанная компанией *TREK Diagnostic Systems*, основанная на принципе серийных микроразведений в жидкой питательной среде и предназначенная для количественного определения ЛЧ изолятов *M. tuberculosis* к 12 препаратам, используемым для лечения туберкулеза.

В литературе имеется небольшое количество работ, в которых изучена эффективность тест-системы Sensititre MycoTB. При сопоставлении результатов определения ЛЧ *M. tuberculosis*, полученных при использовании метода пропорций на агаровой среде *Middlebrook 7H10* и Sensititre MycoTB, совпадение наблюдали более чем в 95% случаев для всех препаратов (за исключением этамбутола – 55–60%), при использовании BACTEC™ MGIT™ 960 и Sensititre MycoTB – более чем в 95% случаев для изониазида, более чем в 90% – для рифампицина и стрептомицина и в 60% – для этамбутола [4, 6, 9, 10, 12, 13].

В отличие от классических методов определения ЛЧ, в которых для тестирования изолятов МБТ используют критическую (КК) и высокую (реже) концентрации препарата, в тест-системе Sensititre MycoTB содержится по восемь концентраций каждого препарата, что дает возможность определить его МИК и сравнить ее с КК, тем самым оценить степень чувствительности/устойчивости штамма МБТ к данному препарату. МИК препарата, установленную для выделенного штамма МБТ, также можно соотносить с концентрацией его в плазме, достигаемой при приеме в рекомендованных для лечения туберкулеза дозах.



В лунках указаны разведения препаратов (мкг/мл), слева направо:
 офлоксацин (0,25-32),
 моксифлоксацин (0,06-8),
 рифампицин (0,12-16),
 амикацин (0,12-16),
 стрептомицин (0,25-32),
 рифабутин (0,12-16),
 аminosалициловая кислота (0,5-64),
 этионамид (0,3-40),
 циклосерин (2-256),
 изониазид (0,03-4),
 канамицин (0,6-40),
 этамбутол (0,5-32).

Рис. Тест-система Sensititre MycoTB (производство TREK Diagnostic Systems, США, Великобритания) [9]

Цель исследования

Определить критические концентрации противотуберкулезных препаратов и использовать их в оценке лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* с помощью тест-системы Sensititre MycoTB.

Материалы и методы исследования

Первоначально были изучены 99 штаммов МБТ, выделенных в жидкой (ВАСТЕС™ MGIT™ 960) и на плотной (Л-Й) питательных средах из различного диагностического материала (мокрота, бронхиальный смыв, БАЛЖ, экссудат, операционный материал – содержимое туберкулем и каверн), полученного от 99 больных туберкулезом легких, находившихся на лечении в стационарах МНПЦ борьбы с туберкулезом.

Принадлежность выделенных культур к МБТ подтверждали микробиологическими (микроскопия мазка, окрашенного по Ziehl-Neelsen, морфология колоний, биохимические свойства, иммунохроматографический тест «BD MGIT TBc ID») и молекулярно-генетическими («ТБ-БИОЧИП», производство ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия) методами.

Для определения КК изониазида (H), рифампицина (R), стрептомицина (S), этамбутола (E), офлоксацина (Ofl), моксифлоксацина (Mox), канамицина (K), амикацина (A) в Sensititre MycoTB были сформированы панели из чувствительных и устойчивых к каждому препарату штаммов МБТ.

Предварительными критериями включения штаммов в группу чувствительных (условно) являлись: выделение МБТ из диагностического материала пациентов с подозрением на наличие туберкулезной инфекции или впервые выявленных больных туберкулезом легких, ранее не получавших противотуберкулезную химиотерапию. Предварительными кри-

териями включения штаммов в группу устойчивых (условно) являлись: выделение штаммов МБТ из диагностического материала пациентов с подозрением на рецидив или с хроническим течением туберкулеза, ранее леченных, в том числе вышеуказанными препаратами.

МИК препаратов для условно чувствительных и условно устойчивых штаммов МБТ в тест-системе Sensititre MycoTB определяли согласно инструкции производителя. Затем на основании полученных МИК были определены КК препаратов.

Суспензию из исследуемой культуры МБТ, приготовленную по 0,5 стандарту мутности McFarland, в количестве 100 мкл переносили в пробирку с обогащенной жидкой питательной средой *Middlebrook 7H9* и засеивали по 100 мкл в лунки планшета, содержащие лиофилизированные химиопрепараты в двукратных концентрациях. Планшеты инкубировали при 37°C. Рост МБТ оценивали визуально с помощью зеркала через 10–14 дней, в зависимости от скорости роста микобактерий в контрольной лунке без препарата (рисунок).

МИК препарата считали наименьшую его концентрацию, подавляющую видимый рост микроорганизма в лунке, и сравнивали ее с установленными в МНПЦ борьбы с туберкулезом значениями КК (H – 0,25, R – 1,0, E – 4,0, S – 1,0, A – 1,0, K – 2,5, Mox – 0,25, Ofl – 2,0 мкг/мл) и предложенными S. Mragata и соавт. (2013) [13] КК аminosалициловой кислоты (2,0 мкг/мл), этионамида (5,0 мкг/мл) и циклосерина (32,0 мкг/мл). Штаммы МБТ, для которых определены значения МИК, равные значениям КК или на одно разведение ниже, оценивали как «обладающие пограничной чувствительностью», а имеющие МИК на одно разведение выше значения КК – как «обладающие низким уровнем устойчивости».

Таблица 1. Минимальные ингибирующие концентрации противотуберкулезных препаратов основного ряда, полученные в тест-системе Sensititre MucotB

МИК (мкг/мл)	Количество штаммов				МИК (мкг/мл)	Количество штаммов			
	чувств. (n=31)		уст. (n=68)			R	чувств. (n=36)		уст. (n=63)
S	абс.	%	абс.	%	R		абс.	%	абс.
≤0,25	18	58,1	0	0	≤0,125*	28	77,8	0	0
0,5	10	32,3	1	1,5	0,25	7	16,7	1	1,6
1,0*	3	9,7	2	2,9	0,5	1	5,6	0	0
2,0	0	0	5	7,4	1,0	0	0	1	1,6
4,0	0	0	10	14,7	2,0	0	0	2	3,2
8,0	0	0	5	7,4	4,0	0	0	2	3,2
16,0	0	0	0	0	8,0	0	0	6	9,5
32,0 ≥	0	0	45	66,2	16,0 ≥	0	0	51	81,0
H	чувств. (n=28)		уст. (n=71)		E	чувств. (n=53)		уст. (n=46)	
	абс.	%	абс.	%		абс.	%	абс.	%
≤0,03	16	57,1	0	0	≤0,5	8	15,1	0	0
0,06*	10	35,7	0	0	1,0	14	26,4	0	0
0,125	0	0	2	2,8	2,0*	17	32,1	1	2,2
0,25	2	7,1	1	1,4	4,0	13	24,5	12	26,1
0,5	0	0	2	2,8	8,0	1	1,9	27	58,7
1,0	0	0	2	2,8	16,0	0	0	5	10,9
2,0	0	0	11	15,5	32,0 ≥	0	0	1	2,2
4,0 ≥	0	0	53	74,6	-	-	-	-	-

Примечание:

* – МИК препаратов для контрольного штамма *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

Таблица 2. Минимальные ингибирующие концентрации противотуберкулезных препаратов резервного ряда, полученные в тест-системе Sensititre MucotB

МИК (мкг/мл)	Количество штаммов				МИК (мкг/мл)	Количество штаммов			
	чувств. (n=57)		уст. (n=42)			K	чувств. (n=58)		уст. (n=41)
Ofi	абс.	%	абс.	%	K		абс.	%	абс.
≤ 0,25	23	40,4	0	0	≤0,6	28	48,3	0	0
0,5	14	24,6	0	0	1,2	22	37,9	0	0
1,0*	18	31,6	0	0	2,5*	6	10,3	2	4,9
2,0	2	3,5	3	7,1	5,0	2	3,4	14	34,1
4,0	0	0	16	38,1	10,0	0	0	6	14,6
8,0	0	0	17	40,5	20,0	0	0	3	7,3
16,0	0	0	4	9,5	40,0 ≥	0	0	16	39,0
32,0 ≥	0	0	2	4,8	-	-	-	-	-
Mox	чувств. (n=59)		уст. (n=40)		A	чувств. (n=79)		уст. (n=20)	
	абс.	%	абс.	%		абс.	%	абс.	%
≤0,06	32	54,2	0	0	≤0,125	28	35,4	1	5,0
0,125	11	18,6	0	0	0,25	30	38,0	0	0
0,25*	13	22,0	2	5,0	0,5	15	19,0	0	0
0,5	2	3,4	3	7,5	1,0*	6	7,6	0	0
1,0	1	1,7	12	30,0	2,0	0	0	1	5,0
2,0	0	0	12	30,0	4,0	0	0	1	5,0
4,0	0	0	9	22,5	8,0	0	0	0	0
8,0 ≥	0	0	2	5,0	16,0 ≥	0	0	17	85,0

Примечание:

* – МИК препаратов для контрольного штамма *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

После определения КК исследовано 137 изолятов *M. tuberculosis*, выделенных от больных с хроническим течением заболевания. Образцы респираторного материала, полученного от больных, после деконтаминации культивировали в жидкой среде Middlebrook 7H9 в системе BACTEC™ MGIT™ 960 и/или на плотной яичной среде Л-Й. Принадлежность выросших культур к *M. tuberculosis complex* подтверждали микробиологическими, иммунохроматографическими и молекулярно-генетическими методами.

Лекарственную чувствительность культур изучали в автоматизированной системе BACTEC™ MGIT™ 960, методом абсолютных концентраций на среде Л-Й и с помощью тест-системы Sensititre MucotB.

Тестирование в BACTEC™ MGIT™ 960 проводили согласно стандартной методике определения ЛЧ к химиопрепаратам первого и резервного ряда [14]. Наборы из индикаторных пробирок, содержащих противотуберкулезные препараты в КК, рекомендованных ВОЗ для BACTEC™ MGIT™ 960 [8, 15], и контроли (пробирки без препаратов) инкубировали на специальных держателях со штрихкодом. На среде Л-Й ЛЧ МБТ определяли согласно методике, утвержденной приказом Минздрава России № 109 от 21.03.2001 г. [3].

Все микробиологические исследования проводили с параллельной постановкой контрольных исследований со стандартным штаммом *M. tuberculosis* H₃₇Rv – ATCC® 25618 из музея Централизованной бактериологической лаборатории МНПЦ борьбы с туберкулезом.

Результаты исследования и обсуждение

Результаты определения МИК каждого препарата в отношении чувствительных и устойчивых штаммов в тест-системе Sensititre MucotB представлены в таблицах 1 и 2. Критические концентрации химиопрепаратов для тест-системы Sensititre MucotB были определены в результате математического анализа полученных значений МИК как наименьшие концентрации, подавляющие рост 95% чувствительных штаммов и не препятствующие росту 95% устойчивых.

Для условно чувствительных штаммов МБТ МИК S составили ≤ 1,0 мкг/мл, H – ≤ 0,25 мкг/мл, R – ≤ 0,5 мкг/мл, E – ≤ 4,0 мкг/мл (исключение – один штамм МБТ с МИК 8,0 мкг/мл); для условно устойчивых: S – ≥ 0,5 мкг/мл, H – ≥ 0,125 мкг/мл, R – ≥ 1,0 мкг/мл, E – ≥ 2,0 мкг/мл (табл. 1).

Для всех чувствительных штаммов МБТ МИК Ofi составили ≤ 2,0 мкг/мл, Mox – ≤ 0,5 мкг/мл, K – ≤ 5,0 мкг/мл

Таблица 3. Сравнительный анализ результатов исследования лекарственной чувствительности клинических штаммов *M. tuberculosis* (n = 137) в Sensititre MycoTB и ВАСТЕС™ MGIT™ 960

Препарат	Метод исследования (абс. число штаммов)				Количество совпадений	
	ВАСТЕС™ MGIT™ 960		Sensititre MycoTB			
	чувств.	уст.	чувств.	уст.	абс.	%
Изониазид	28	109	31	106	134	97,8
Рифампицин	39	98	41	96	135	98,5
Этамбутол	73	64	90	47	114	83,2
Стрептомицин	33	104	36	101	132	96,4
Амикацин	107	30	108	29	136	99,3
Канамицин	68	69	72	65	133	97,1
Моксифлоксацин	77	60	71	66	131	95,6
Офлоксацин	75	62	75	62	137	100,0
Аминосалициловая кислота	92	45	95	42	130	94,9
Этионамид	61	76	70	67	128	93,4

Примечание: в таблице приведены результаты сопоставления только по тем препаратам, ЛЧ к которым определяли двумя методами

и А – ≤ 1,0 мкг/мл, для всех устойчивых: OfI – ≥ 2,0 мкг/мл, Mox – ≥ 0,25 мкг/мл, K – ≥ 2,5 мкг/мл, A – ≥ 2,0 мкг/мл (табл. 2).

Согласно данным, полученным при анализе МИК противотуберкулезных препаратов, установлены следующие их КК для тест-системы Sensititre MycoTB: S – 1,0, H – 0,25, R – 1,0, E – 4,0, OfI – 2,0, Mox – 0,25, K – 2,5 и A – 1,0 мкг/мл.

Для контрольного чувствительного штамма *M. tuberculosis* H₃₇Rv значения МИК (мкг/мл) составили: S – 1,0, H – 0,06, R – 0,125, E – 2,0, OfI – 2,5, Mox – 0,25, K и A – 1,0.

После определения КК было проведено сравнительное изучение ЛЧ клинических изолятов МБТ с помощью тест-системы Sensititre MycoTB, в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 и методом абсолютных концентраций на среде Л-Й. Анализ провели только для тех из 12 препаратов, к которым были установлены КК и которые также использовали при определении ЛЧ методом абсолютных концентраций на среде Л-Й и в ВАСТЕС™ MGIT™ 960.

Одновременно с помощью тест-системы Sensititre MycoTB и ВАСТЕС™ MGIT™ 960 было изучено 137 клинических штаммов МБТ (табл. 3).

При определении ЛЧ к *изониазиду* результаты совпали в 134 случаях (97,8%), несовпадение отмечено у трех штаммов с пограничной чувствительностью в Sensititre MycoTB: у двух с МИК 0,12 и одного – с МИК 0,25 мкг/мл; в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 они были устойчивы. У двух чувствительных по данным обоих методов штаммов определена пограничная чувствительность (МИК 0,25 мкг/мл). Для двух устойчивых штаммов определен низкий уровень устойчивости в Sensititre MycoTB (МИК 0,5 мкг/мл). У всех устойчивых штаммов МБТ МИК H превышала 4 мкг/мл.

При определении ЛЧ к *рифампицину* совпадение результатов отмечено в 135 (98,5%) случаях, два штамма, устойчивые в ВАСТЕС™ MGIT™ 960, оказались в Sensititre MycoTB один чувствительным с МИК 0,25 мкг/мл и один – с пограничной чувствительностью (МИК 1,0 мкг/мл). Практически для всех устойчивых (при определении ЛЧ двумя методами) штаммов МБТ МИК R составила 16 и более мкг/мл. Пограничная чувствительность определена у трех чувствительных штаммов (два с МИК 0,5 и один – с МИК 1,0 мкг/мл), низкий уровень устойчивости отмечен у двух устойчивых штаммов (МИК 2,0 мкг/мл).

Совпадение результатов определения ЛЧ к *этамбутолу* двумя методами наблюдали в 114 (83,2%) случаях, а у 23 штаммов МБТ результаты различались. Так, 18 штаммов из 40, имевших в Sensititre MycoTB пограничную чувствительность (МИК 4,0 мкг/мл), были устойчивыми в ВАСТЕС™ MGIT™ 960, четыре штамма с низким уровнем устойчивости в Sensititre MycoTB (МИК 8,0 мкг/мл) в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 были чувствительными, а один штамм с пограничной чувствительностью в Sensititre MycoTB (МИК 2,0 мкг/мл) в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 был устойчивым.

Совпадение результатов определения ЛЧ к *стрептомицину* наблюдали в 132 (96,4%) случаях. Из пяти штаммов с несовпадением результатов у четырех в Sensititre MycoTB была определена пограничная чувствительность (у трех МИК 1,0 и у одного – 0,5 мкг/мл), а в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 – устойчивость, а один штамм, чувствительный в ВАСТЕС™ MGIT™ 960, в Sensititre MycoTB имел низкий уровень устойчивости (МИК 2,0 мкг/мл). Рост устойчивых штаммов МБТ ингибировали в основном высокие концентрации S (> 32 мкг/мл), низкий уровень устойчивости определен у четырех штаммов (МИК 2,0 мкг/мл). Среди чувствительных к S штаммов МБТ пограничная чувствительность наблюдалась у трех (МИК 1,0 мкг/мл).

При определении ЛЧ к *амикацину* совпадение результатов получено в 136 (99,3%) случаях. Только один штамм МБТ с пограничной чувствительностью в Sensititre MycoTB (МИК 0,5 мкг/мл) оказался устойчивым в ВАСТЕС™ MGIT™ 960. Пограничная чувствительность к А определена у 20 штаммов (11 – с МИК 0,5, девять – с МИК 1,0 мкг/мл), причем все они были устойчивы к К. Все устойчивые к А штаммы также были устойчивы к К.

Совпадение результатов определения ЛЧ к *канамицину* получено в 133 (97,1%) случаях, четыре штамма с пограничной чувствительностью в Sensititre MycoTB (МИК 2,5 мкг/мл) в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 были устойчивы. Низкий уровень устойчивости к К определен у 17 штаммов МБТ (МИК 5,0 мкг/мл), все они сохраняли чувствительность к А.

При изучении ЛЧ к *моксифлоксацину* совпадение результатов получено в 131 (95,6%) случае, а у шести штаммов, чувствительных в ВАСТЕС™ MGIT™ 960, в Sensititre MycoTB определен низкий уровень устойчивости (МИК 0,5). У 13 штаммов в Sensititre MycoTB определена пограничная чувствительность (МИК 0,25 мкг/мл).

Таблица 4. Сравнительный анализ результатов исследования лекарственной чувствительности клинических штаммов *M. tuberculosis* в Sensititre MycoTB и методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена

Препарат	Число изученных штаммов (абс.)	Метод исследования (абс. число штаммов)				Количество совпадение	
		Л-Й		Sensititre MycoTB		чувст.	уст.
		чувст.	уст.	чувст.	уст.		
Изониазид	36	11	25	8	28	31	86,1
Рифампицин	36	8	28	12	24	32	88,9
Этамбутол	36	21	15	26	10	21	58,3
Стрептомицин	36	20	28	26	23	33	91,7
Амикацин	62	46	16	46	16	62	100,0
Канамицин	62	41	21	31	31	52	83,9
Моксифлоксацин	62	24	38	25	37	61	98,4
Офлоксацин	62	24	38	24	38	62	100,0
Аминосалициловая кислота	62	48	14	46	16	50	80,6
Этионамид	62	53	9	35	27	44	71,0
Циклосерин	62	59	3	60	2	57	91,9

Примечание: в таблице приведены результаты сопоставления только по тем препаратам, ЛЧ к которым была определена обоими методами.

При определении ЛЧ к **офлоксацину** совпадение результатов наблюдалось в 100% случаев. У 22 штаммов определена пограничная чувствительность (у 18 – с МИК 1,0 и у четырех – с МИК 2,0 мкг/мл).

Результаты определения ЛЧ к **аминосалициловой кислоте** совпали в 130 (94,9%) случаях, пять штаммов, чувствительных в Sensititre MycoTB (МИК 0,5 мкг/мл), были устойчивы в ВАСТЕС™ MGIT™ 960, а два штамма с низким уровнем устойчивости в Sensititre MycoTB (МИК 4,0 мкг/мл) в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 были чувствительными.

Результаты определения ЛЧ к **этионамиду** совпали в 128 (93,4%) случаях. Девять штаммов с пограничной чувствительностью (четыре с МИК 5,0 и пять – с МИК 2,5 мкг/мл) в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 были устойчивыми. Из чувствительных штаммов, по данным двух методов, у 10 определена пограничная чувствительность (МИК 5,0 мкг/мл).

Таблица 5. Критические концентрации противотуберкулезных препаратов (мкг/мл)

Препараты	Метод исследования		
	Метод пропорций в агаре (L. Hall и соавт., 2012 [10])	Bactec MGIT 960 (S. Mрагата и соавт., 2013 [13])	Sensititre MycoTB (данные МНПЦ борьбы с туберкулезом)
Изониазид	0,2	0,25	0,25
Рифампицин	1,0	1,0	1,0
Амикацин	5,0	1,0	1,0
Канамицин	5,0	5,0	2,5
Офлоксацин	2,0	2,0	2,0
Моксифлоксацин	2,0	0,25	0,25
Стрептомицин	2,0	2,0	1,0
Этамбутол	5,0	4,0	4,0

При сопоставлении данных о лекарственной чувствительности и устойчивости клинических штаммов *M. tuberculosis*, полученных с помощью Sensititre MycoTB и на плотной среде Левенштейна-Йенсена, отмечена высокая степень совпадения результатов – от 80,0 до 100%. Исключением были результаты определения ЛЧ к этамбутолу (58,3%) и этионамиду (71,0%) (табл. 4).

Следует подчеркнуть, что КК большинства противотуберкулезных препаратов разработаны для метода пропорций на агаровой среде и для системы ВАСТЕС™ MGIT™ 960. Они приведены в работах ряда авторов, в том числе в материалах ВОЗ [11, 12, 15]. В указанных выше исследованиях по использованию тест-системы Sensititre MycoTB были использованы именно эти КК. Данные о разработке КК специально для тест-системы Sensititre MycoTB отсутствуют.

В таблице 5 приведены сравнительные данные определения КК, полученные в МНПЦБТ (в тест-системе Sensititre MycoTB) и в работах других исследователей (для ВАСТЕС™ MGIT™ 960 и метода пропорций в агаре).

Сопоставление данных показывает, что для некоторых препаратов КК для разных тест-систем совпадают, а для других – нет, что зависит от их технических свойств (среды, методы учета и т. д.), а также, возможно, от региональных особенностей возбудителя.

Разработанные в МНПЦ борьбы с туберкулезом КК в настоящее время применяются в г. Москве для оценки чувствительности/устойчивости клинических изолятов МБТ с помощью тест-системы Sensititre MycoTB.

Заключение

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что имеет место высокий процент совпадения данных, полученных при определении ЛЧ с помощью тест-системы Sensititre MycoTB и других методов. Вместе с тем эта тест-система имеет преимущества, связанные со стандартизацией процесса и возможностью количественного определения (степени) устойчивости одновременно к 12 химиопрепаратам в короткие сроки (7-14 дней). Метод определения ЛЧ *M. tuberculosis* с помощью тест-системы Sensititre MycoTB технически прост, она апробирована как за рубежом, так и в МНПЦ борьбы с туберкулезом, сертифицирована и может быть использована в клинической практике для изучения влияния степени устойчивости/чувствительности возбудителя на течение туберкулеза («ответ на лечение»).

Литература

1. Дорожкова И.Р. Лекарственная чувствительность микобактерий туберкулеза. Методы определения. Оценка результатов. / *Лабораторные исследования при туберкулезе / под ред. В.И. Литвинова, А.М. Мороза.* – М.: МНПЦБТ, 2013. – С. 80-101.
2. Исаева Ю.Д., Крылова Л.Ю., Букатина А.А. и др. Выявление *Mycobacterium tuberculosis* с широкой лекарственной чувствительностью. / *Лабораторные исследования при туберкулезе / под ред. В.И. Литвинова, А.М. Мороза.* – М.: МНПЦБТ, 2013. – С. 111–120.
3. О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации: приказ Минздрава России от 21 марта 2003 г. № 109. Приложение № 11. Инструкция по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза. [Электронный ресурс] URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_100873/ (Дата обращения 25.04.2015).
4. Abuali M.M., Katariwala R., LaBombardi V.J. 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.* – 2011. – Vol. 31. – N. 5. – P. 835–839.
5. Ahuja S.D., Ashkin D., Avendano M. et al. Multidrug resistant pulmonary tuberculosis treatment regimens and patient outcomes: an individual patient data meta-analysis of 9,153 patients // *PLoS Med.* – 2012. – Vol. 9. – N. 8. – e1001300.
6. Banu S., Rahman S.M., Khan M.S. et al. Discordance across several methods for drug susceptibility testing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a single laboratory // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 52. – N. 1. – P. 156–63.
7. *Global tuberculosis report 2013.* – Geneva: WHO, 2013. [Электронный ресурс] URL: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html. (Дата обращения 25.04.2015).
8. *Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update.* – Geneva: WHO, 2011.
9. Hall L., Jude K.P., Clark S.L. et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex for first and second line drugs by broth dilution in a microtitre plate format // *J. Vis. Exp.* – 2011. – Vol. 24. – N. 52. – P. 1–4.
10. 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.
11. Heifets L. Qualitative and quantitative drug-susceptibility tests in mycobacteriology // *Am. Rev. Respir. Dis.* – 1998. – Vol. 137. – P. 1217–1222.
12. Lee J., Armstrong D., Sengoooba 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.
13. Mpagama S., Houpt E., Stroup S. et al. Application of quantitative second-line drug susceptibility at a multidrug-resistant tuberculosis hospital in Tanzania // *BMC Infectious Diseases.* – 2013. – Vol. 13. – P. 432–441.
14. Siddiqi S., Rüsck-Gerdes S. MGIT Procedure Manual for Bactec™ MGIT™ 960 TB System (Also applicable for Manual MGIT) *Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) / Culture and Drug Susceptibility Demonstration Projects.* – Foundation for Innovative New Diagnostics, 2007. [Электронный ресурс] URL: <http://www.ipaqt.org/wp-content/uploads/2013/02/MGIT-Procedure-Manual.pdf>. (Дата обращения 25.04.2015).
15. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low and medium income settings. Summary report of the Expert Group Meeting on the use of liquid culture media, WHO Stop TB Department. – Geneva: WHO, 2007. [Электронный ресурс] URL: [http://www.who.int/tb/dots/laboratory/Use of Liquid TB Culture_Summary Report.pdf](http://www.who.int/tb/dots/laboratory/Use%20of%20Liquid%20Culture_Summary%20Report.pdf). (Дата обращения 25.04.2015).

Сведения об авторах

Макарова Марина Витальевна – ведущий научный сотрудник отдела лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ 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. +7 (916) 688-98-25, факс +7 (495) 964-86-37

e-mail: makarova75@yandex.ru

Исаева Юлия Дмитриевна – научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ 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. +7 (496) 603 30 33

Крылова Людмила Юрьевна – ведущий научный сотрудник отдела лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ 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. +7 (495) 603-30-33, факс +7 (499)785-20-82

e-mail: mika_200417@yahoo.com

Литвинов Виталий Ильич – научный руководитель ГКУЗ 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) 603-09-63

e-mail: mnpctlv@yandex.ru