

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *M. TUBERCULOSIS* К ФТОРХИНОЛОНАМ И АМИНОГЛИКОЗИДАМ/КАПРЕОМИЦИНУ

Ю.Д. Исаева, Л.Ю. Крылова, М.В. Макарова, А.А. Хахалина, Е.Ю. Носова, С.Г. Сафонова
ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом
Департамента здравоохранения города Москвы»

THE STUDY OF THE *M. TUBERCULOSIS* DRUG SUSCEPTIBILITY TO FLUOROQUINOLONES AND AMINOGLYCOSIDES/CAPREOMYCIN (BASIC CHARACTERISTICS)

Yu.D. Isaeva, L.Yu. Krylova, M.V. Makarova, A.A. Khakhalina, E.Yu. Nosova, S.G. Safonova

С использованием панели клинических штаммов *M. tuberculosis*, различающихся по спектру лекарственной устойчивости, определены критические концентрации шести противотуберкулезных препаратов резервного ряда. Для ускоренной оценки лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* в автоматизированной системе BACTEC™ MGIT™ 960 критические концентрации левофлоксацина, моксифлоксацина, гатифлоксацина, канамицина, амикацина и капреомицина составили 1,0, 0,25, 0,25, 2,5, 1,0 и 2,5 мкг/мл, соответственно. Для оценки лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* классическим методом абсолютных концентраций на плотной среде Левенштейна-Йенсена критические концентрации левофлоксацина, моксифлоксацина и гатифлоксацина составили 2,0, 0,75, 0,75 мкг/мл, соответственно.

Ключевые слова: критическая концентрация, резервные противотуберкулезные препараты, лекарственная устойчивость

By *M. tuberculosis* clinical isolates panel of the strains with different drug resistance patterns the critical concentrations of six second-line antituberculosis drugs were studied. For the *M. tuberculosis* drug resistance accelerated testing in the BACTEC™ MGIT™ 960 the critical concentrations for levofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin, kanamycin, amikacin and capreomycin were 1,0, 0,25, 0,25, 2,5, 1,0 and 2,5 µg/ml, accordingly. For classic absolute concentrations methods in solid Löwenstein-Jensen media the critical concentrations of levofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin were 2,0, 0,75, 0,75 µg /ml, accordingly.

Keywords: critical concentration, second-line antituberculosis drugs, drug resistance

Введение

Одной из главных проблем современной фтизиатрии является все более частое выявление у больных туберкулезом возбудителя с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ/ШЛУ) [17, 24, 25].

В связи с этим для успешного лечения заболевания очевидна необходимость своевременного выявления лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ), в том числе к препаратам группы фторхинолонов, аминогликозидам и капреомицину, с применением ускоренных специфических и высокочувствительных методов [1, 2, 4, 7].

При исследовании лекарственной чувствительности (ЛЧ) МБТ необходимо учитывать количественные критерии – ми-

нимальные ингибирующие концентрации (МИК) и критические концентрации (КК) противотуберкулезных препаратов (ПТП). Значение КК позволяет дифференцировать штаммы МБТ на устойчивые и чувствительные к ПТП. Для разных методов и отличающихся по составу питательных сред КК одного и того же препарата могут существенно различаться [3, 6, 12, 27].

Цель работы

Разработка критериев лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к препаратам группы фторхинолонов (левофлоксацину, моксифлоксацину, гатифлоксацину), аминогликозидов (канамицину, амикацину) и капреомицину в жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 (M7H9) с помощью системы

БАСТЕС™ MGIT™ 960 и на плотной яичной питательной среде Левенштейна-Йенсена (Л-Й) для препаратов группы фторхинолонов.

Материалы и методы исследования

Изучено 182 клинических штамма *M. tuberculosis*, выделенных из различного диагностического материала (мокрота, бронхиальный смыв, бронхоальвеолярный лаваж, экссудат, резекционный материал – содержимое туберкулем и каверн), полученных от 182 больных, находящихся на лечении в филиалах и клиниках МНПЦ борьбы с туберкулезом. Для определения КК фторхинолонов была сформирована стандартная панель из 68 клинических штаммов МБТ, а для аминогликозидов и капреомицина – из 67; с использованием установленных КК были изучены остальные 114 штаммов.

Все штаммы были разделены на условно чувствительные и условно устойчивые к изучаемым фторхинолонам, аминогликозидам и капреомицину. Критериями включения штаммов в группу «условно чувствительных» являлись: выделение штаммов МБТ из диагностического материала пациентов с подозрением на наличие туберкулезной инфекции или впервые выявленных больных туберкулезом легких (ранее не получавших противотуберкулезную химиотерапию), отсутствие мутаций в генах-мишенях. Критериями включения штаммов в группу «условно устойчивых» являлись: выделение штаммов МБТ из диагностического материала пациентов с подозрением на рецидив или с хроническим течением туберкулеза (ранее леченных пациентов, в том числе препаратами изучаемых групп), наличие мутаций в генах-мишенях.

В итоге условно чувствительными к фторхинолонам считали 29 штаммов МБТ, а условно устойчивыми – 39. К группе условно чувствительных к аминогликозидам и капреомицину отнесли 29 штаммов, а условно устойчивыми к канамицину, амикацину и капреомицину были 38, 32 и 31 штамм, соответственно.

Использовали субкультуры МБТ, выросшие на плотной питательной среде Л-Й в течение 2–3 недель с момента видимого роста и в жидкой питательной среде *M7H9* («возраст» культуры – трое суток от момента индикации БАСТЕС™ MGIT™ 960).

В качестве контрольного применяли стандартный лабораторный референс-штамм *M. tuberculosis* H₃₇Rv – ATCC® 25618 (American Type Culture Collection, Bethesda, Md).

В качестве лекарственных препаратов *in vitro* использовали чистые субстанции левофлоксацина (Lev, Sigma-Aldrich 28266-10G-F), моксифлоксацина (Мох) хлористокислового (Sequoia Research Products Ltd SRPO6644m), гатифлоксацина (Gat, Sequoia Research Products Ltd SRPO1230g), канамицина (K, Sigma K4000-5G), амикацина (A, Sigma 3650-5G) и капреомицина (Cap, Sigma C4142-1G). По данным производственных сертификатов активность препаратов фторхинолонового ряда

составляла более 98%, а K, A и Cap – 77,0%, 94,0% и 84,8%, соответственно.

Необходимый ряд исследуемых концентраций фторхинолонов, аминогликозидов и Cap подбирали согласно опубликованным данным об активности препаратов *in vitro* в жидкой среде *M7H9* в отношении МБТ [15, 16, 18, 19]. Каждый штамм был исследован по меньшей мере к шести концентрациям каждого изучаемого препарата.

Для установления критических концентраций Lev, Mox, Gat, K, A и Cap определяли МИК препаратов методом серийных разведений в жидкой питательной среде *M7H9* (БАСТЕС™ MGIT™ 960) согласно рекомендациям С. Sanders и соавт. (2004) [20], А. Krüüner и соавт. (2006) [15], S. Rüsч-Gerdes и соавт. (2006) [19], а также S.-Y. G. Lin и соавт. (2009) [16]. На плотной среде Л-Й МИК препаратов определяли согласно методическим рекомендациям В.Н. Степаншиной и соавт. (2009) [11].

Критерием для выбора значения КК являлось условие, при котором полученная концентрация подавляла рост более чем 95% условно чувствительных штаммов и позволяла расти более чем 95% условно устойчивых штаммов [10, 16, 18, 19, 20].

Для подтверждения полученных значений КК фторхинолонов определяли ЛЧ методом пропорций на агаровой среде *Middlebrook 7H10* (*M7H10*) [22].

Определение ЛЧ штаммов МБТ к фторхинолонам, аминогликозидам и Cap в системе БАСТЕС™ MGIT™ 960 проводили согласно рекомендациям S. Siddiqi и соавт. (2006) [21] по изучению ЛЧ к ПТП основного ряда и в соответствии с инструкцией; методом абсолютных концентраций на среде Л-Й согласно приказу Минздрава России № 109 от 21 марта 2003 г. [8].

Выявление мутаций в гене *gyrA*, ответственных за устойчивость к фторхинолонам, осуществляли при помощи тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2» (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия) согласно методическим рекомендациям МНПЦ борьбы с туберкулезом [5, 9]. Секвенирование генов *gyrA* и *gyrB* проводили на автоматическом секвенаторе GS Junior («Roche», Германия).

При молекулярно-генетическом тестировании устойчивости к аминогликозидам и Cap анализ мутаций в гене *rrs* проводили с помощью тест-системы «GenoType MTBDRsl» (Hain Lifescience, Германия). Промоторную область гена *eis* анализировали с помощью тест-системы, основанной на методе SSCP, которая была разработана на базе МНПЦ борьбы с туберкулезом, а для уточнения типа мутаций в гене *eis* проводили секвенирование [9, 14].

Результаты исследования

Определение критических концентраций левофлоксацина, моксифлоксацина и гатифлоксацина для *M. tuberculosis* в жидкой среде *Middlebrook 7H9* (БАСТЕС™ MGIT™ 960) и на плотной среде Левенштейна-Йенсена

Значения МИК препаратов для условно чувствительных штаммов в жидкой среде были ниже, чем на плотной, и колебались в пределах 0,125–1,0 мкг/мл и 0,5–2,0 мкг/мл, соответственно; для Lev – 0,063–0,25 мкг/мл и 0,25–0,5 мкг/мл, соответственно; для Mox – 0,063–0,125 мкг/мл, и 0,125–0,5 мкг/мл, соответственно, – для Gat.

Аналогичная тенденция отмечена при сопоставлении значений МИК фторхинолонов для условно устойчивых штаммов. Значения МИК Lev колебались в пределах от 1,0 до более 32,0 мкг/мл при использовании жидкой среды и в диапазоне от 2,0 до более 32,0 мкг/мл – плотной; МИК Mox составили 0,25–8,0 мкг/мл и 1,0–16,0 мкг/мл, соответственно, Gat – 0,25–4,0 мкг/мл и 0,5–8,0 мкг/мл, соответственно.

Для контрольного штамма *M. tuberculosis* H₃₇Rv значения МИК Lev составили 0,5 мкг/мл в жидкой и 1,0 мкг/мл на плотной питательной среде; Mox и Gat имели одинаковые значения – 0,125 мкг/мл в жидкой и 0,25 мкг/мл на плотной среде.

На основании полученных МИК Lev, Mox и Gat были построены графики, на которых была видна граница распределения МИК, полученных в отношении условно чувствительных и условно устойчивых штаммов. Критической концентрацией препарата являлось значение в точке перехода графических кривых, которое составило 1,0 мкг/мл для Lev, 0,25 мкг/мл – для Mox и Gat в системе BACTEC™ MGIT™ 960. Критерием для выбора значения КК являлось условие, при котором полученная концентрация подавляла рост более чем 95% условно чувствительных штаммов и позволяла расти более чем 95% условно устойчивых штаммов [10, 16, 18, 19, 20].

При установленных КК Lev, Mox и Gat 100% (29 из 29) условно чувствительных штаммов не росли, тогда как 97,4% (38 из 39) условно устойчивых продолжали размножение в жидкой среде M7H9 в системе BACTEC™ MGIT™ 960.

По аналогии с определением КК фторхинолонов для системы BACTEC™ MGIT™ 960 были построены графики для метода абсолютных концентраций.

Графическая кривая указывала на значение КК Lev – 2,0 мкг/мл и Mox – 1,0 мкг/мл, однако при данной концентрации дали рост только 94,9% условно устойчивых штаммов, а это противоречило установленному критерию определения КК и требовало корректировки. Поэтому дополнительно было проведено исследование ЛЧ к Mox в концентрации 0,75 мкг/мл двух условно устойчивых штаммов МБТ с МИК 1,0 мкг/мл. При этом установлено наличие устойчивости у одного штамма и чувствительности у другого. Полученные результаты позволили сделать заключение, что КК Mox для метода абсолютных концентраций является 0,75 мкг/мл, что отвечает выбранному критерию (не подавляет рост 95,0% и более условно устойчивых штаммов).

Для установления точного значения КК Gat для метода абсолютных концентраций проведено дополнительное исследо-

вание, так как граница кривых распределения МИК препарата находилась в диапазоне 0,5–1,0 мкг/мл. Определили ЛЧ четырех условно устойчивых штаммов с МИК 1,0 мкг/мл к концентрации Gat 0,75 мкг/мл. Все штаммы проявили устойчивость к изучаемой концентрации, которая и была определена как критическая.

Таким образом, было установлено, что 100% (29 из 29) условно чувствительных штаммов не растут, тогда как 97,4% (38 из 39) условно устойчивых продолжают размножение при использовании значений КК Lev 2,0 мкг/мл и Mox и Gat – 0,75 мкг/мл для метода абсолютных концентраций на плотной среде Л-Й.

В связи с тем, что для ускоренного определения ЛЧ МБТ к Lev и Mox в системе BACTEC™ MGIT™ 960 рекомендуют различные значения КК (для Lev – 1,5 и 2,0 мкг/мл [16, 24]; для Mox – 0,125, 0,25 и 0,5 мкг/мл [16, 20, 23]), провели дополнительное исследование по определению ЛЧ методом пропорций на агаровой среде M7H10 с использованием КК Lev – 1,0 мкг/мл и Mox – 0,5 мкг/мл [22]. Использовали штаммы (15 для Lev и 14 для Mox), у которых результаты ЛЧ в системе BACTEC™ MGIT™ 960 отличались при использовании КК, установленной нами и предложенной другими авторами. При сравнительном анализе ЛЧ, полученной тремя культуральными методами (BACTEC™ MGIT™ 960, методами абсолютных концентраций и пропорций), полное совпадение результатов наблюдали при использовании в системе BACTEC™ MGIT™ 960 установленной нами КК Lev (1,0 мкг/мл). В 92,9% случаев (максимально) результаты определения ЛЧ к Mox были сопоставимы при использовании в системе BACTEC™ MGIT™ 960 КК Mox 0,25 мкг/мл, установленной нами и рекомендованной рядом других авторов.

В процессе установления КК Gat было также проведено дополнительное исследование по определению ЛЧ методом пропорций на агаровой среде M7H10 с применением для оценки результатов КК равной 1,0 мкг/мл [24]. Исследованы те же 14 штаммов, для которых этим методом ранее была изучена ЛЧ к Mox. Поскольку активность Gat не ниже чем Mox, а КК Mox для метода пропорций равна 0,5 мкг/мл, исследована такая же концентрация Gat. Результаты изучения ЛЧ к Gat при использовании трех культуральных методов показали полное совпадение при использовании КК Gat 0,5 мкг/мл для метода пропорций и совпадение в 64,3% при использовании КК Gat 1,0 мкг/мл.

Определение критических концентраций канамицина, амикацина и капреомицина для *M. tuberculosis* в жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 (BACTEC™ MGIT™ 960)

Установлено, что МИК К и Сар для условно чувствительных штаммов колебались в пределах 0,31–2,5 мкг/мл и 0,25–1,0 мкг/мл, соответственно, а для условно устойчивых – от 5,0 до более 80,0 мкг/мл и от 5,0 до более 20,0 мкг/мл, соответственно. МИК А в отношении всех условно устойчивых штаммов составили более 64,0 мкг/мл.

На основании полученных МИК К и Сар были построены графики, на которых была видна граница распределения МИК, полученных в отношении условно чувствительных и условно устойчивых штаммов. Критической концентрацией препарата являлось значение в точке перехода графических кривых, которое составило 2,5 мкг/мл для К и 2,5 мкг/мл для Сар в системе BACTEC™ MGIT™ 960. Для контрольного штамма *M. tuberculosis* H₃₇Rv значения МИК К и Сар также составили 2,5 мкг/мл.

Было установлено, что при использовании в качестве КК К значения 1,25 мкг/мл, предложенного В.Н. Степаншиной и соав. (2009) [10, 11], возможно получение ложных заключений об устойчивости штаммов. В нашем исследовании МИК К в отношении двух (6,9%) из 29 штаммов «дикого» типа составила 2,5 мкг/мл, такая же величина МИК была определена и для контрольного чувствительного штамма *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

МИК Сар для 17 из 32 (53,1%) условно устойчивых штаммов МБТ составила 5,0 мкг/мл (в системе BACTEC™ MGIT™ 960). Параллельно была определена ЛЧ данных штаммов при использовании КК, равной 3,0 мкг/мл, предложенной G. Lin et al. (2009) [16]. Два устойчивых штамма (6,3%) проявили чувствительность к изучаемой концентрации Сар. Следовательно, при использовании в качестве КК Сар 3,0 мкг/мл в системе BACTEC™ MGIT™ 960 возможно получение ложных заключений о чувствительности штаммов.

При определении КК А из-за отсутствия штаммов с низким уровнем устойчивости к препарату (все устойчивые штаммы имели МИК 64,0 мкг/мл и более) не удалось построить необходимый график и пришлось ограничиться гистограммой. Наименьшая достоверная МИК А составила 1,0 мкг/мл, поскольку при ней не росло более 95,0% чувствительных штаммов и 100% устойчивых продолжали размножение в жидкой среде M7H9.

Для контрольного штамма *M. tuberculosis* H₃₇Rv МИК А составила 1,0 мкг/мл.

Определение лекарственной чувствительности клинических штаммов *M. tuberculosis* к левофлоксацину, моксифлоксацину и гатифлоксацину

Исследовали 103 клинических штамма МБТ, выделенных из разнообразного диагностического материала 103 больных туберкулезом органов дыхания. Определили ЛЧ штаммов к Lev, Мох и Gat в системе BACTEC™ MGIT™ 960 и методом абсолютных концентраций на среде Л-Й при использовании установленных в настоящем исследовании КК препаратов. При сравнительном изучении ЛЧ, полученной двумя культуральными методами, наблюдали высокий процент совпадения результатов в 99,0% для Lev, 97,1% для Мох и 96,1% для Gat, что еще раз подтверждает достоверность установленных нами КК фторхинолонов.

Определение лекарственной чувствительности клинических штаммов *M. tuberculosis* к канамицину, амикацину и капреомицину

Исследовали 114 клинических штаммов МБТ, выделенных из разнообразного диагностического материала 114 больных туберкулезом органов дыхания. Определили ЛЧ штаммов к К, А и Сар в системе BACTEC™ MGIT™ 960 при использовании установленных в настоящем исследовании КК препаратов и методом абсолютных концентраций на среде Л-Й в КК препаратов согласно приказу Минздрава России № 109 от 21 марта 2003 г. [8].

При сравнительном изучении ЛЧ к К, А и Сар, полученной двумя культуральными методами, наблюдали совпадение результатов в 90,4% для К, 100% для А и 88,6% для Сар.

Обсуждение результатов и заключение

В настоящем исследовании для оценки ЛЧ МБТ в жидкой среде M7H9 (BACTEC™ MGIT™ 960) определена КК Lev 1,0 мкг/мл, которая не совпала с данными, представленными в литературе (2,0 и 1,5 мкг/мл) [16, 24]. Впервые установлена и КК Lev 2,0 мкг/мл для метода абсолютных концентраций на плотной среде Л-Й. При исследовании ЛЧ 15 штаммов МБТ с низким уровнем устойчивости к Lev тремя культуральными методами полное совпадение результатов было достигнуто при использовании КК препарата в жидкой среде M7H9 (BACTEC™ MGIT™ 960) 1,0 мкг/мл, установленной в нашем исследовании.

Рекомендованные значения КК Мох для определения ЛЧ МБТ в системе BACTEC™ MGIT™ 960, по данным ряда авторов, различны: 0,125, 0,25 и 0,5 мкг/мл [15, 21, 24]. Для Gat КК в системе BACTEC™ MGIT™ 960 в литературе не найдена. Значение КК Gat 1,0 мкг/мл для оценки ЛЧ МБТ имеется только для метода пропорций на агаровой среде M7H10 [24].

В данной работе КК Мох и Gat были определены для оценки ЛЧ МБТ в системе BACTEC™ MGIT™ 960 и методом абсолютных концентраций на плотной среде Л-Й и составили для обоих препаратов 0,25 и 0,75 мкг/мл, соответственно.

Наибольшее совпадение результатов определения ЛЧ к Мох (92,9%) на трех питательных средах при тестировании 14 штаммов МБТ было достигнуто при использовании в жидкой среде M7H9 (BACTEC™ MGIT™ 960) КК 0,25 мкг/мл, установленной нами и рекомендованной рядом других авторов. Мы предполагаем, что при использовании для оценки ЛЧ МБТ к Мох в системе BACTEC™ MGIT™ 960 КК 0,125 мкг/мл возможно получение ложноположительных заключений об устойчивости, а при КК 0,5 мкг/мл – ложноотрицательных.

Сравнительное изучение ЛЧ 14 штаммов МБТ к Gat тремя культуральными методами показало, что при использовании концентрации 0,5 мкг/мл для метода пропорций результаты совпадают в 100% случаев, тогда как при КК 1,0 мкг/мл – в 64,3%. Следовательно, применение в качестве КК Gat значения 1,0 мкг/мл для метода пропорций не позволяет в полной мере выявить устойчивые штаммы, тогда как использование концентрации 0,5 мкг/мл дает возможность обнаружить штаммы с низким уровнем устойчивости.

Проведенная работа по определению МИК Lev, Mox и Gat позволила оценить степень противотуберкулезной активности этих фторхинолонов. При сравнении МИК препаратов, полученных в системе BACTEC™ MGIT™ 960 и на плотной среде Л-Й, было установлено, что наибольшей противотуберкулезной активностью *in vitro* обладает Gat, а наименьшей – Lev. Gat по противотуберкулезной активности превосходил Mox почти в два раза и Lev – в два-четыре раза. Значения МИК, полученные на плотной среде Л-Й, в 2,5 раза выше, чем на жидкой среде M7H9 (BACTEC™ MGIT™ 960). Данное обстоятельство объясняется разницей физико-химических свойств питательных сред, абсорбцией и инактивацией препаратов в средах.

При определении ЛЧ 84 клинических штаммов МБТ, исследованных с помощью молекулярно-генетических методов, к Lev, Mox и Gat в системе BACTEC™ MGIT™ 960 и методом абсолютных концентраций была получена высокая сходимость результатов, что подтвердило достоверность установленных нами значений КК препаратов.

В настоящем исследовании для оценки ЛЧ МБТ в системе BACTEC™ MGIT™ 960 также были определены КК трех инъекционных противотуберкулезных препаратов: К – 2,5 мкг/мл, А – 1,0 мкг/мл и Сар – 2,5 мкг/мл. Полученные значения КК совпали с данными большинства зарубежных авторов [13, 18, 19, 22, 23, 24].

Исследована ЛЧ 114 клинических штаммов МБТ к К, А и Сар в жидкой среде M7H9 (с использованием установленных КК) и методом абсолютных концентраций на плотной среде Л-Й (при КК 30 и 50 мкг/мл). При сопоставлении результатов с данными молекулярно-генетического исследования установлено, что перекрестная устойчивость к аминогликозидам и капреомицину наблюдалась только при выявлении мутации в гене *rrs* [16, 22, 26]. Замена A1401G в гене *rrs* обуславливала высокий уровень устойчивости штаммов МБТ к инъекционным препаратам, при этом МИК для этих штаммов составили 80,0 мкг/мл и более у К, 20,0 мкг/мл – у Сар и 64,0 мкг/мл и более – у А. Наличие в геноме МБТ мутации в гене *eis* [14, 25, 26] являлось маркером невысокого и среднего уровня устойчивости штаммов МБТ к К (5,0–40,0 мкг/мл), при этом сохранялась чувствительность к А и Сар.

Результаты определения ЛЧ 114 клинических штаммов МБТ к К, А и Сар, полученные с использованием жидкой среды M7H9

(BACTEC™ MGIT™ 960) и метода абсолютных концентраций на плотной среде Л-Й совпали в 90,4, 100,0 и 88,6% случаев, соответственно. Наибольший процент совпадения результатов оценки ЛЧ МБТ к К, А и Сар молекулярно-генетическими исследованиями наблюдался в случае использования метода BACTEC™ MGIT™ 960: в 97,4%, 100% и 98,2% случаев, соответственно.

Таким образом, в результате исследований в системе BACTEC™ MGIT™ 960 и методом абсолютных концентраций на плотной среде Л-Й при использовании панели клинических штаммов МБТ, различающихся по спектру лекарственной устойчивости, были определены КК шести ПТП резервного ряда (Lev, Mox, Gat, К, А и Сар).

Исследование показало, что определение ЛЧ МБТ к Lev, Mox, Gat, К, А и Сар в системе BACTEC™ MGIT™ 960 с использованием установленных КК позволяет получить результаты, коррелирующие с данными культуральных исследований на плотной среде.

С помощью установленных КК Lev, Mox, Gat, К, А и Сар для оценки ЛЧ в системе BACTEC™ MGIT™ 960 появилась возможность получать лабораторный протокол культурального определения ЛЧ МБТ к препаратам резервного ряда – фторхинолонам, аминогликозидам и капреомицину в короткие сроки, что особенно важно в условиях распространения туберкулеза с МЛУ и ШЛУ возбудителя,

Так как для фторхинолонов характерна перекрестная устойчивость, то необходимо определить ее культуральными методами по крайней мере к одному из трех вышеперечисленных препаратов [22]. Однако Lev, Mox и Gat, обладающие высокой эффективностью в отношении МБТ, могут оказывать клинический эффект, несмотря на то что по КК к ним установлена лекарственная устойчивость. Вместе с тем выявление уровня устойчивости к более высоким концентрациям фторхинолонов при количественном определении ЛЧ (определение МИК) в предельно сжатые сроки может быть единственной альтернативой в решении вопроса. Исследования МИК могут обеспечить более точную оценку вероятности клинической эффективности фторхинолонов для штаммов МБТ, чем использование только КК препаратов.

Что касается определения ЛЧ к К, А и Сар, то культуральное изучение ЛЧ необходимо проводить к трем препаратам.

Литература

1. Дорожкова И.Р., Фрейман Г.Е., Абрамова З.П. и др. Новая технология для скрининга туберкулеза легких // Рос. мед. ж. – 2007. – № 2. – С. 12-15.
2. Дорожкова И.Р., Носова Е.Ю., Абрамова З.П. и др. Успешное решение многолетней проблемы экспресс-диагностики возбудителя туберкулеза и его лекарственной чувствительности к препаратам I и II ряда / Тезисы докладов. 3-я научно-практич. конф. «Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ» – М., 2010. – С. 28-29.
3. 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.
4. Иртуганова О.А., Смирнова Н.С. Культуральное определение чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам / Лабораторная диагностика туберкулеза / Под ред. В.И. Литвинова, А.М. Мороза. – М.: МНПЦБТ, 2001. – С. 39-50.

5. Мороз А.М., Носова Е.Ю., Галкина К.Ю. и др. Определение лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с помощью биочипов: методические рекомендации / Департамент здравоохранения города Москвы. – М., 2008. – 26 с.
6. Пелоквин Ч., Оклер Б. Фармакология / Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью / Под ред. И. Бастикана, Ф. Порталес. – М.: Медицина и жизнь, 2003. – С. 197-199.
7. Попов С.А., Пузанов В.А., Нарвская О.В. Лекарственная устойчивость. Фтизиатрия: национальное руководство / Под ред. М.И. Перельмана. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – С. 87-91.
8. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21 марта 2003 года № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». – М., 2003. – С. 292-308.
9. Сон И.М., Мороз А.М., Стерликов С.А. и др. Руководство по выявлению микобактерий туберкулеза и определению лекарственной чувствительности с использованием биологических микрочипов // М.: РИО ЦНИИОИЗ, 2009. – 52 с.
10. Степаншина В.Н., Попов С.А., Апарина Н.А. и др. Определение критической концентрации канамицина для *Mycobacterium tuberculosis* в системе MGIT BACTEC 960 // Туберкулез и болезни легких. – 2009. – № 12. – С. 71-78.
11. Степаншина В.Н., Низова А.В., Мухина Т.Н. и др. Определение критических концентраций канамицина, капреомицина и офлоксацина, используемых для оценки лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* методом абсолютных концентраций на питательной среде Левентштейна-Йенсена: методические рекомендации / ФГУН ГНЦПМБ. – М., 2009. – 12 с.
12. Такифф Х. Молекулярные механизмы лекарственной устойчивости у *Mycobacterium tuberculosis* / Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью / Под ред. И. Бастикана, Ф. Порталес. – М.: Медицина и жизнь, 2003. – С. 125-127, глава 10. С. 197-199.
13. A Canadian multicenter laboratory study for standardized second-line antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 10. – P. 1128-1150.
14. Gicalo M. B., Nosova E. Y., Krylova L.Y., Moroz A.M. The role of *eis* mutations in the development of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region // Antimicrob. Chemother. – 2012. – Vol. 67. – N. 9. – P. 2107-2109.
15. Krüüner A., Yates M.D., Drobniewski F.A. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial testing and determination of critical concentration of first and second-line antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* // Clinical Microbiology. – 2006. – Vol. 44. – N. 3. – P. 811-818.
16. Lin G. S.-Y., Desmond E., Bonato D. et al. Multicenter evaluation of Bactec MGIT 960 system for second-line susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex // Clinical Microbiology. – 2009. – Vol. 47. – N. 11. – P. 3630-3634.
17. Revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis / CDC & WHO // JAMA. – 2006. – Vol. 296. – N. 23. – P. 2792.
18. Rodrigues C., Jani J., Shenai S. et al. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against second-line drugs using the Bactec MGIT 960 systems // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2008. – Vol. 12. – P. 1449-1455.
19. Rüscher-Gerdes S., Pfyffer G.E., Casal M. et al. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials // Clinical Microbiology. – 2006. – Vol. 44. – N. 3. – P. 688-692.
20. Sanders C.A., Nieda R.R., Desmond E.P. Validation of the use of Middlebrook 7H10 agar, BACTEC MGIT 960, and BACTEC 460 12B media for testing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to levofloxacin // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42. – P. 5225-5228.
21. Siddiqi S., Rusch-Gerdes S., Alexander H. et al. 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).
22. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard – second edition: document M24-A2 // Clinical and Laboratory Standards Institute. – 2011. – Vol. 31. – N. 5. – 61 p.
23. Van Ingen J., Simons S., Zwaan de R. et al. Comparative study on genotypic and phenotypic second-line drug resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates // Clinical Microbiology. – 2010. – Vol. 48. – N. 8. – P. 2749-2753.
24. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. (WHO HTM/TB/2008.392). – Geneva: WHO, 2008. – 20 p. [Электронный ресурс] URL: http://www.stoptb.org/wg/new_diagnosics/assets/documents/who_policy_DST_2008.392_eng.pdf. (Дата обращения 25.07.2015).
25. World Health Organization Global Tuberculosis report 2012. – [Электронный ресурс] URL: <http://www.globalhealthprogress.org/global-tuberculosis-report-2012>. (Дата обращения 25.07.2015).
26. Zaunbrecher M.A., Sikes R.D., Metchock B et al. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase *eis* confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // PNAS. – 2009. – Vol. 106. – N. 47. – P. 20004-20009.
27. Zhang Y., Yew W W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2009. – Vol. 13. – P. 1320-1330.

Сведения об авторах

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

e-mail: juliaisaeva81@rambler.ru

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

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, 10

Тел. +7 (916) 688-98-25, факс +7 (495) 964-86-37

e-mail: makarova75@yandex.ru

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

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (495) 603-30-33, факс + 7 (499) 785-20-82

e-mail: nastec@bk.ru

Носова Елена Юрьевна – ведущий 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 медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (495) 603-30-33, факс + 7 (499) 785-20-82

e-mail: rna68@rambler.ru

Сафонова Светлана Григорьевна – заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ 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 (499) 268-08-76, факс + 7 (499) 785-20-82

e-mail: safonova.s.g@inbox.ru

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

РОССИЙСКИЙ ИННОВАЦИОННЫЙ ПРЕПАРАТ:

ПЕРХЛОЗОН® (тиоуреидоиминометилпиридиния перхлорат) – первый инновационный противотуберкулезный препарат для лечения МЛУ ТБ за последние 40 лет.



Патогенетическая терапия:

- Ингаляция с АСС
- Бронхопителики
- Витамины группы «В»
- Гепатопротекторы

- оказывает строго избирательное действие на МБТ
- активизирует фагоцитарную активность макрофагов
- сокращает время заживления очагов деструкции в легких
- обладает хорошей переносимостью

Предпочтительный режим применения:

Лечение по IV режиму

- Перхлозон® из расчета 10 мг/кг массы тела
- Пиразинамид
- Капреомицин
- Этамбутол / Протионамид
- ПАСК
- Циклосерин

NEW!

НОВАЯ ДОЗИРОВКА – **ПЕРХЛОЗОН® 200 мг**

Преимущества:

- Более точный подбор дозировки препарата пациентам
- Более высокий уровень комплаенса со стороны пациента
- Благодаря более точному подбору дозировки препарата, уменьшение проявления возможных нежелательных явлений

КРАТКАЯ ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ПРЕПАРАТА



ПЕРХЛОЗОН[®]

МЕЖДУНАРОДНОЕ НАИМЕНОВАНИЕ

Тиоуреидоиминометилпиридиния перхлорат

ФОРМА ВЫПУСКА

Таблетки 200 мг, 400 мг

ФАРМАКОДИНАМИКА

Противотуберкулезное средство. Активен в отношении *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis*. Обладает выраженным ингибирующим действием на жизнеспособность микобактерий туберкулеза, в том числе устойчивых к другим противотуберкулезным препаратам. Перхлозон - малотоксичное вещество, не вызывает существенных структурно-функциональных нарушений жизненно важных органов и систем, а также раздражающего действия на слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта. Механизм действия не установлен, изучение продолжается.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Туберкулез легких, в т.ч. с множественной лекарственной устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis* (в составе комбинированной терапии).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

Повышенная чувствительность к активному веществу или к любым компонентам препарата, нарушение функции печени и/или почек (возможность применения препарата у данной категории пациентов не изучена), беременность, период грудного вскармливания, детский возраст (до 18 лет).

РЕЖИМ ДОЗИРОВАНИЯ

Внутрь, после приема пищи один раз в сутки. Препарат назначают взрослым из расчета 9,5 - 12,5 мг/кг/сутки: при массе тела менее 50 кг - 400-600 мг/сутки; с массой тела 50-80 кг по 800-1000 мг/сутки, с массой тела более 80 кг не более 1200 мг/сутки. Продолжительность терапии - до 3 месяцев.

Срок годности - 4 года.