

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ИНГИБИРУЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРЕПАРАТА ПЕРХЛОЗОН® В ОТНОШЕНИИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА С РАЗЛИЧНЫМ СПЕКТРОМ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ *

С.Г. Сафонова¹, И.В. Перетокина¹, М.В. Макарова¹, Л.Ю. Крылова¹, Ю.Д. Михайлова¹, Д.В. Григораш²

DETERMINATION OF THE MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION OF PERCHLOZON® AGAINST MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS WITH A DIFFERENT SPECTRUM OF DRUG RESISTANCE

S.G. Safonova, I.V. Peretokina, M.V. Makarova, L.Yu. Krylova, Yu.D. Mikhailova, D.V. Grigorash

В статье описано изучение противотуберкулезной активности препарата Перхлозон® (тиоуреидоиминометилпиридиния перхлорат) в отношении микобактерий туберкулеза (МБТ) с различным профилем лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам основного и резервного ряда путем определения минимальных ингибирующих концентраций препарата *in vitro*.

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) препарата проводилось на агаровой питательной среде Middlebrook 7H10 в диапазоне от 0,5 до 64,0 мкг/мл на клинических штаммах МБТ, как чувствительных, так и устойчивых к противотуберкулезным препаратам основного и резервного ряда.

В результате исследования получены различные значения МИК препарата Перхлозон®, при которых наблюдалось ингибирование роста МБТ. Так, для 86,7% чувствительных штаммов рост МБТ прекращался в диапазоне от 2,0 до 4,0 мкг/мл (включая референс-штамм *M.tuberculosis* H37Rv); для 46,7% штаммов с МЛУ рост МБТ прекращался в диапазоне от 2,0 до 16,0 мкг/мл и для 53,3% – в диапазоне от 32,0 до 64,0; для 73,3% штаммов с ШЛУ рост МБТ прекращался в диапазоне от 32,0 до 64,0 мкг/мл.

Установлено, что противотуберкулезная активность препарата Перхлозон® *in vitro* зависит от спектра лекарственной устойчивости МБТ к противотуберкулезным препаратам как основного, так и резервного ряда.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, лекарственная устойчивость, минимальная ингибирующая концентрация, препарат Перхлозон®

The article describes the study of the anti-tuberculosis activity of Perchlozon® (thioureidoiminomethylpyridinium perchlorate) against *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) with a different resistance profile to primary and reserve anti-TB drugs by *in vitro* determining the minimum inhibitory concentrations of the drug. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the drug was determined on Middlebrook 7H10 agar nutrient medium in the range from 0.5 to 64.0 µg/ml on clinical MBT strains, both susceptible and resistant to the main and reserve anti-TB drugs.

As a result, various Perchlozon® MIC values were obtained, at which inhibition of MBT growth was observed. 86.7% of the susceptible M MBT strains (including the *M. tuberculosis* H37Rv reference strain) stopped their growth in the range from 2.0 to 4.0 µg/ml, 46.7% of MDR- MBT strains stopped their growth in the range from 2.0 to 16.0 µg/ml, and 53.3% MDR- MBT strains stopped their growth in the range from 32.0 to 64.0; 73.3% of XDR- MBT strains stopped their growth in the range from 32.0 to 64.0 µg/ml.

It has been established that the antitubercular activity of Perchlozon® *in vitro* depends on drug resistance spectrum of the MBT to the first-line and reserve anti-TB drugs.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, minimal inhibitory concentration, Perchlozon®

* Настоящая статья основана на результатах выполненной по договору № 12486/2018 от 5 февраля 2019 г. в Централизованной бактериологической лаборатории (ЦБЛ) по диагностике туберкулеза ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» научно-исследовательской работы (НИР) по изучению противотуберкулезной активности препарата Перхлозон® (тиоуреидоиминометилпиридиния перхлорат) производства АО «Фармасинтез».

¹ ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы».

² Акционерное общество «Фармасинтез».

Введение

Необходимость разработки и внедрения в практику новых противотуберкулезных препаратов обусловлена все более широким распространением туберкулеза, вызванного микобактериями (МБТ) с лекарственной устойчивостью. По последним данным ВОЗ [1], в 2018 г. туберкулезом, устойчивым к рифампицину, заболели примерно полмиллиона человек (из них 78% – туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью МБТ. Наибольшая доля глобального бремени пришлось на три страны: Индию (27%), Китай (14%) и Российскую Федерацию (9%). Доля случаев заболевания туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью или устойчивостью к рифампицину во всем мире составила 3,4% среди новых случаев и 18% среди ранее пролеченных случаев и была наиболее высока (свыше 50% среди ранее пролеченных случаев) в странах бывшего Советского Союза.

В настоящее время общепризнана жизненная необходимость разработки новых противотуберкулезных препаратов (ПТП) и формирование на их основе новых режимов химиотерапии [6, 8, 9].

Одним из новых противотуберкулезных препаратов с уникальным механизмом действия является препарат Перхлозон®, разработанный в России сотрудниками Иркутского института химии имени А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской Академии наук (СО РАН) и ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России совместно с ОАО «Фармасинтез».

Препарат Перхлозон® (тиоуреидоиминометилпиридиния перхлорат) успешно прошел необходимые доклинические и клинические исследования [6] и был включен в российские национальные клинические рекомендации как препарат для лечения больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя [3, 5]. В настоящее время идут исследования, посвященные различным клиническим аспектам включения этого препарата в новые режимы химиотерапии туберкулеза [2, 4]. Одним из важных вопросов при определении дозировки препарата Перхлозон® является определение его минимальных ингибирующих концентраций в отношении МБТ, что позволит оптимизировать терапию и избежать излишних побочных эффектов лечения.

Цель работы

Оценка противотуберкулезной активности препарата Перхлозон® в отношении микобактерий туберкулеза с различным профилем лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам основного и резервного ряда путем определения минимальных ингибирующих концентраций препарата *in vitro*.

ПЕРВЫЙ ЭТАП ИССЛЕДОВАНИЯ

Первый этап исследования заключался в определении МИК препарата Перхлозон® *in vitro* на 16 штаммах МБТ (из коллекции ЦБЛ МНПЦ борьбы с туберкулезом) с различным профилем ЛУ к ПТП. По результатам тестирования был установлен диапазон концентраций препарата Перхлозон® для последующего определения МИК препарата в отношении 75 клинических штаммов МБТ на втором этапе исследования.

Материал и методы исследования

1. Отбор и подготовка лабораторных штаммов микобактерий туберкулеза для проведения исследований

Из лабораторной коллекции ЦБЛ ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» было отобрано 15 клинических штаммов:

- 5 штаммов МБТ, чувствительных к ПТП основного и резервного ряда;
- 5 штаммов МБТ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), устойчивых к изониазиду и рифампицину, независимо от устойчивости к другим ПТП;
- 5 штаммов МБТ с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ), устойчивых к изониазиду, рифампицину, к одному препарату из группы фторхинолонов и одному инъекционному препарату из группы резервного ряда: канамицину и/или амикацину, и/или капреомицину, независимо от устойчивости к другим ПТП.

Все клинические штаммы были выделены в 2017–2018 гг. из мокроты впервые выявленных больных до начала проведения им противотуберкулезной терапии или ее проведения длительно не более одного месяца.

В качестве контрольного штамма использовали лабораторный референс-штамм *M. tuberculosis H37Rv* – ATCC® 25618 (American Type Culture Collection, Bethesda, Md), чувствительный к ПТП.

Приготовление и посев микобактериальной суспензии исследуемых штаммов МБТ.

Исследуемые штаммы пересеивали в жидкую питательную среду Middlebrook 7H9 для культивирования в автоматизированной системе BACTEC™ MGIT™ 960 (BACTEC 960) с целью получения равной величины колониеобразующих единиц возбудителя в одном миллилитре среды (КОЕ/мл, приблизительно 10^5 – 10^6).

Исследуемые культуры с помощью микробиологической петли переносили в пробирку со стерильными физиологическим раствором и стеклянными бусинами. В плотно закрытой пробирке проводили встряхивание с помощью устройства типа «Вортекс» в течение 1–3 минут на средней скорости для измельчения бактериальной массы. После отстаивания (примерно 15 мин) суспензию готовили по оптическому стандарту мутности 0,5 по МакФарланду ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл), которую

в разведении 1:5 в количестве 0,5 мл использовали для посева в пробирку MGIT, содержащую 7,0 мл питательной жидкой среды Middlebrook 7H9 и обогатительную ростовую добавку Supplement Kit, предварительно добавленную перед началом тестирования в объеме 0,8 мл.

Все засеянные пробирки MGIT с жидкой питательной средой инкубировали в автоматизированной системе BACTEC 960 до получения сигнала о положительном результате.

2. Разведение чистой субстанции препарата Перхлозон®

Для проведения НИР представителем АО «Фармасинтез» была предоставлена чистая субстанция препарата в количестве 10 грамм (серия 400614, партия 1). Активность препарата составила более 98,5%.

Для приготовления навесок чистой субстанции использовали электронные аналитические весы ANALYTICAL Plus AP250D.

Опытным путем были подобраны способы растворения чистой субстанции препарата и стабилизации раствора с целью недопущения агломерации или выпадения в осадок препарата в рабочем растворе с заданной концентрацией. При соблюдении стерильности для первичного растворения (солюбилизации) навеску препарата растворяли в стерильной дистиллированной воде, 95%-ном этиловом спирте и диметилсульфоксиде (ДМСО). В ходе эксперимента было установлено, что препарат плохо растворим в воде и спирте. Полного растворения препарата удалось добиться при использовании ДМСО. Для приготовления основного раствора в качестве разбавителя была выбрана жидкая питательная среда Middlebrook 7H9. Для навески меньше 100 мг оптимальное соотношение растворителя и разбавителя составило 1:4 (ДМСО и среды Middlebrook 7H9 соответственно).

Приготовление рабочих растворов препарата методом двукратных серийных разведений. Для приготовления рабочих растворов использовали жидкую питательную среду Middlebrook 7H9. Путем последовательного разведения с двойным шагом снижения получали необходимые концентрации препарата. Растворы препарата различных концентраций добавляли в стерильную агаровую среду Middlebrook 7H10, которую затем разливали в стерильные, двухсекционные, полистироловые чашки Петри. Конечные концентрации в агаровой среде составили от 0,5 мкг/мл до 64,0 мкг/мл. В контрольные чашки Петри с агаровой средой Middlebrook 7H10 вносили такое же соотношение ДМСО и среды Middlebrook 7H9, как и при приготовлении основного раствора препарата.

Основной и рабочие растворы лекарственного препарата готовили в день их использования. Оставшееся количество растворов с препаратом подвергали уничтожению. Чашки со средой без препарата (контроль) и с препаратом хранили в холодильнике при температуре $(4,0 \pm 1,0 \text{ } ^\circ\text{C})$ не более 14 дней.

3. Определение МИК препарата Перхлозон®

Противотуберкулезную активность препарата определяли методом двукратных серийных разведений на агаровой среде Middlebrook 7H10, содержащую ростовую добавку OADC (олеиновая кислота, альбумин, декстроза и каталаза) для микобактерий. Тестирование проводили в соответствии с руководством Института клинических и лабораторных стандартов США (*Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*) [7] по определению лекарственной чувствительности МБТ методом пропорций на агаровой среде Middlebrook 7H10/7H11.

При пересеве штаммов МБТ в жидкую питательную среду Middlebrook 7H9 в момент положительной детекции в BACTEC 960 количество КОЕ микобактерий в пробирке MGIT равно 10⁵–10⁶ в 1 мл среды, что соответствует стандартизированной бактериальной суспензии по 0,5 оптическому стандарту мутности МакФарланда, разведенной в 100 раз (10⁻²). Для посева использовали еще одну концентрацию суспензии, разведенную до 10⁻⁴ КОЕ/мл. Каждый исследуемый штамм в двух разведениях, 10⁻² и 10⁻⁴, объемом по 0,2 мл засеивали на контрольный сектор чашки без препарата и на каждый сектор с лекарственным препаратом. Засеянную суспензию равномерно распределяли по всей поверхности среды с помощью бактериологической петли. Таким образом, примерное количество микробных клеток в 1 мл суспензии для посева составило: суспензия 10⁻² – 1 000 000 КОЕ, суспензия 10⁻⁴ – 10 000 КОЕ, а в посевной дозе 0,2 мл – 200 000 и 2 000 КОЕ соответственно.

Засеянные чашки инкубировали в термостате при температуре 37 °С и содержании 5–10% CO₂. Учет результатов осуществляли на 21-й день инкубации от момента посева при наличии исчисляемого количества колоний в контрольном секторе. За величину МИК принимали концентрацию, при которой наблюдали рост на чашке со средой, содержащей лекарственный препарат, ≤ 1% колоний.

Для вычисления процента устойчивых колоний МБТ при использовании разведения бактериальной суспензии 10⁻⁴ число колоний на секторе с препаратом делили на число колоний на контрольном секторе и умножали на 100%.

Оценку интенсивности роста МБТ в каждом секторе определяли в соответствии с руководством CLSI:

- > 500 колоний (сливной рост) – 4+;
- 200–500 колоний (почти сливной рост) – 3+;
- 100–200 колоний – 2+;
- 50–100 колоний – 1+;
- < 50 колоний – фактическое количество колоний.

Результаты исследования

В результате определения МИК препарата Перхлозон® в отношении 16 лабораторных штаммов МБТ установлено, что рост 6 чувствительных штаммов, включая референс-штамм

Таблица 1. Минимальные ингибирующие концентрации препарата Перхлозон® на агаровой среде Middlebrook 7H10 для штаммов МБТ с различным профилем лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам (плотность микобактериальной суспензии 104 КОЕ/мл)

| № п/п | Штаммы | Концентрации препарата (мкг/мл) и оценка роста микобактерий | | | | | | | | Оценка роста в контроле | МИК |
|-------|--------|---|----|----|----|----|----|----|-----|-------------------------|-----|
| | | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0,5 | | |
| 1 | Чув. | – | – | – | – | – | 45 | 2+ | 2+ | 2+ | 4 |
| 2 | Чув. | – | – | – | – | – | 25 | 1+ | 1+ | 1+ | 4 |
| 3 | Чув. | – | – | – | – | – | – | 1+ | 2+ | 2+ | 2 |
| 4 | Чув. | – | – | – | – | – | 1+ | 3+ | 3+ | 3+ | 4 |
| 5 | Чув. | – | – | – | – | – | – | 1+ | 2+ | 2+ | 2 |
| 6 | МЛУ | – | 35 | 1+ | 2+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 64 |
| 7 | МЛУ | – | – | – | 1+ | 1+ | 2+ | 3+ | 3+ | 3+ | 16 |
| 8 | МЛУ | – | 1+ | 1+ | 2+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 64 |
| 9 | МЛУ | – | – | – | – | – | 1+ | 2+ | 2+ | 2+ | 4 |
| 10 | МЛУ | – | – | 1+ | 1+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 32 |
| 11 | ШЛУ | – | – | 20 | 1+ | 2+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 32 |
| 12 | ШЛУ | – | – | – | – | 10 | 1+ | 3+ | 3+ | 3+ | 8 |
| 13 | ШЛУ | – | 45 | 1+ | 1+ | 2+ | 2+ | 3+ | 3+ | 3+ | 64 |
| 14 | ШЛУ | – | – | 38 | 1+ | 2+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 32 |
| 15 | ШЛУ | – | – | – | 12 | 1+ | 1+ | 3+ | 3+ | 3+ | 16 |
| 16 | H37Rv | – | – | – | – | – | 10 | 1+ | 1+ | 1+ | 4 |

Примечание: Чув. – чувствительный; (–) – отсутствие роста; 3+ – 200–500 колоний; 2+ – 100–200 колоний; 1+ – 50–100 колоний; < 50 колоний – фактическое количество колоний.

M. tuberculosis H37Rv, подавляли концентрации 2,0–4,0 мкг/мл препарата; рост штаммов МБТ с МЛУ возбудителя подавляли концентрации препарата в диапазоне от 4,0 до 64,0 мкг/мл; рост штаммов МБТ с ШЛУ подавляли концентрации от 8,0 до 64,0 мкг/мл. Результаты исследования представлены в таблице 1.

На основании проведенного эксперимента установлен диапазон МИК препарата Перхлозон® в отношении штаммов МБТ с различным профилем устойчивости к ПТП с целью определения МИК препарата на втором этапе исследования. Так, для чувствительных штаммов МБТ были выбраны следующие концентрации препарата Перхлозон®: 0,5; 1,0; 2,0 и 4,0 мкг/мл; для штаммов МБТ с МЛУ и ШЛУ – 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 и 64,0 мкг/мл.

ВТОРОЙ ЭТАП ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам тестирования на первом этапе исследования был установлен диапазон концентраций препарата Перхлозон® для определения МИК препарата. Целью второго этапа исследования являлась оценка противотуберкулезной активности препарата Перхлозон® в отношении 75 клинических штаммов МБТ, выделенных от больных с различным профилем лекарственной устойчивости к ПТП (как основного, так и резервного ряда) путем определения минимальных ингибирующих концентраций препарата *in vitro*.

Материал и методы исследования

Для реализации поставленной цели были последовательно выполнены следующие виды работ.

1. Отбор и подготовка клинических штаммов микобактерий туберкулеза

Из лабораторной коллекции ЦБЛ МНПЦ борьбы с туберкулезом было отобрано 75 клинических штаммов МБТ, выделенных из различного диагностического материала (мокрота – 64, бронхиальный смыв – 8, БАЛ – 1, мазок из зева – 1, резекционный материал – содержимое образования – 1) от 75 больных туберкулезом, находящихся на лечении в клиниках и филиалах МНПЦ борьбы с туберкулезом в течение 2017 года и февраля 2019 года. Были сформированы три группы штаммов: I группу составили 25 МБТ штаммов, чувствительных к ПТП основного ряда, II группу – 25 штаммов МБТ с МЛУ, III группу – 25 штаммов МБТ с ШЛУ.

В каждом эксперименте в качестве контрольного штамма использовали чувствительный лабораторный референс-штамм *M. tuberculosis H37Rv* – ATCC® 25618.

Приготовление и посев микобактериальной суспензии исследуемых штаммов, а также приготовление рабочих растворов препарата проводили аналогично вышеописанным методикам на первом этапе исследования.

2. Определение МИК препарата Перхлозон®

Определение МИК препарата у всех исследуемых штаммов проводили на агаровой питательной среде Middlebrook 7H10 в концентрациях, установленных на первом этапе: для чувствительных штаммов МБТ – 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 мкг/мл; для штаммов МБТ с МЛУ и для штаммов МБТ с ШЛУ – 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0 мкг/мл.

Для определения МИК препарата использовали аналогичную методику, описанную на первом этапе исследования.

Результаты исследования

Результаты определения МИК препарата Перхлозон® для чувствительных к ПТП основного ряда клинических штаммов МБТ представлены в таблице 2.

Таблица 2. Минимальные ингибирующие концентрации перхлозона для штаммов МБТ, чувствительных к ПТП (n = 25)

| | МИК препарата (мкг/мл) | | | |
|-----------------------------|------------------------|-----|------|-----|
| | 1,0 | 2,0 | 4,0* | 8,0 |
| Количество штаммов (n = 25) | 1 | 9 | 12 | 3 |

Примечание: МИК препарата Перхлозон® для контрольного штамма *M.tuberculosis H37Rv*.

В ходе проведения исследования для трех чувствительных штаммов МБТ МИК препарата Перхлозон® составили более 4,0 мкг/мл, то есть выше верхнего значения предполагаемого диапазона, установленного на первом этапе исследования (0,5–4,0 мкг/мл), в связи с чем для данной группы штаммов было проведено дополнительное тестирование в расширенном диапазоне концентраций. В результате значения МИК препарата для чувствительных штаммов распределились в диапазоне от 1,0 до 8,0 мкг/мл. Рост большинства штаммов (84,0%) ингибировали концентрации 2,0 и 4,0 мкг/мл.

Для контрольного штамма *M. tuberculosis H37Rv* значение МИК составило 4,0 мкг/мл.

Таким образом, исследование показало, что самым высо-

ким значением МИК препарата Перхлозон® (пограничное значение) для чувствительных штаммов явилось значение 8,0 мкг/мл.

Результаты определения МИК препарата для МЛУ-штаммов с различным спектром ЛУ к препаратам основного и резервного ряда представлены в таблице 3.

В ходе проведения исследования для трех МЛУ-штаммов значения МИК препарата Перхлозон® составили ≤ 2,0 мкг/мл, в связи с этим для установления истинного значения МИК было проведено дополнительное тестирование в более низких концентрациях. В результате значение МИК для данных трех штаммов МБТ составило 2,0 мкг/мл.

Таким образом, для клинических штаммов с МЛУ возбудителя значения МИК препарата распределились от 4,0 до 64,0 мкг/мл, из них для 9 штаммов МБТ (36%) значения МИК препарата Перхлозон® были меньше либо равны пограничному значению 8,0 мкг/мл и для 16 штаммов (64%) – больше пограничного значения.

Следует отметить, что в зависимости от спектра ЛУ МЛУ-штаммов значения МИК препарата разделились примерно поровну: для 11 штаммов МБТ (44%) с устойчивостью к 3–5 ПТП значения МИК препарата Перхлозон® составили от 2,0 до 16,0 мкг/мл, а для 13 штаммов МБТ (52%) с устойчивостью к 5–10 ПТП МИК препарата Перхлозон® имели более высокие значения – от 32,0 до 64,0 мкг/мл. Исключение составил только один штамм МБТ (4%), обладающий устойчивостью к 10 ПТП и имеющий МИК препарата Перхлозон® – 16,0 мкг/мл.

Результаты определения МИК препарата Перхлозон® для ШЛУ-штаммов МБТ представлены в таблице 4.

Таблица 3. Минимальные ингибирующие концентрации препарата Перхлозон® для штаммов МБТ с МЛУ (n = 25)

| ЛУ к ПТП I и II ряда | МИК (мкг/мл), количество штаммов МБТ и спектр их ЛУ | | | | | | |
|----------------------|---|-----------------|-------------|----------------------|---------------------------------------|--|-------|
| | 2,0 | 4,0* | 8,0 | 16,0 | 32,0 | 64,0 | 128,0 |
| 3 ПТП | 1 •SHR | 1 •SHR | 1 •SHR | – | – | – | – |
| 4 ПТП | – | 1 •SHRZ | 1 •SHREt | 1 •SHRE | – | – | – |
| 5 ПТП | 2 •SHREZ •SHREZ | 1 •HREOfILfx | 1 •SHRZK | 1 •SHREEt | – | 1 •SHREtPAS | – |
| 6 ПТП | – | – | – | – | 3 •SHREKt •SHRZKt •SHREEtPAS | 2 •SHRZKt •SHREZt | – |
| 7 ПТП | – | – | – | – | 1 •SHREZKt | – | – |
| 9 ПТП | – | – | – | – | 1 •SHREZKACmEt | 3 •SHREKACmEtPAS •SHREKACmEtPAS •SHREZKAEtPAS | – |
| 10 ПТП | – | – | – | 1 •SHREZKACmEtPAS | 1 •SHREZKACmEtPAS | 1 •SHREZKACmEtPAS | – |

Примечание: * – МИК препарата Перхлозон® для контрольного штамма *M. tuberculosis H37Rv*.

Сокращения: S – стрептомицин, H – изониазид, R – рифампицин, E – этамбутол, Z – пипразинамид, K – канамицин, A – амикацин, Cт – капреомин, Et – этионамид, PAS – аминосалициловая кислота, Lfx – левофлоксацин.

Таблица 4. Результаты изучения минимальных ингибирующих концентраций препарата Перхлозон® для штаммов МБТ с ШЛУ (n = 25)

| ЛУ к ПТП I и II ряда | 2,0 | 4,0* | 8,0 | 16,0 | 32,0 | 64,0 | 128,0 |
|----------------------|-----|---------------------------|---|--------------------------------|---|--|-------------------------------|
| 6 ПТП | - | - | - | - | - | 1 • HREOfxLfxK | - |
| 8 ПТП | - | - | - | - | 1 • SHREOfxLfxKEt | - | - |
| 9 ПТП | - | 1 • SHREZOfl KEtPAS | - | - | 2 • SHREOfx KAEtPAS • SHREOfxLfx MfxKEt | 2 • SHRZOfx LfxMfxEt • SHREOfxLfx MfxEtPAS | - |
| 10 ПТП | - | - | 2 • SHRZOfxLfx MfxKEtPAS • SHREZOfx LfxMfxKEt | 1 • SHRZOfxLfx MfxKEtPAS | 2 • SHREOfxLfx MfxKEtPAS • SHREZOfx LfxMfxKEt | 2 • SHREZOfx LfxMfxKEt • SHRZOfxLfx MfxKEtPAS | 1 • SHREOfxLfx KCmEtPAS |
| 11 ПТП | - | - | 1 • SHREZOfxLfx MfxKAEt | - | 2 • SHREZOfx KACmEtPAS • SHREZOfxLfx MfxKEtPAS | - | - |
| 12 ПТП | - | - | - | - | 1 • SHREZOfxLfx MfxKACmEt | 1 • SHREZOfxLfx MfxKACmEt | - |
| 13 ПТП | - | - | - | - | 2 • SHREZOfxLfx MfxKACmEtCs • SHRZOfxLfxMfx KACmEtPASCs | 3 • SHREZOfxLfxMfx KACmEtPAS • SHREZOfxLfxMfx KACmEtPAS • SHREZOfxLfxKA CmEtPASLzd | - |

Примечание: * – МИК препарата Перхлозон® для контрольного штамма *M.tuberculosis H37Rv* равно 4 мкг/мл.

Сокращения: S – стрептомицин, H – изониазид, R – рифампицин, E – этамбутол, Z – пиразинамид, K – канамицин, A – амикацин, Cm – капреомицин, Et – этионамид, PAS – аминосалициловая кислота, Ofx – офлоксацин, Lfx – левофлоксацин, Mfx – моксифлоксацин, Lzd – линезолид.

В ходе исследования у одного штамма МБТ с ШЛУ наблюдали рост при концентрации 64,0 мкг/мл, что требовало проведения дополнительного исследования для установления максимального значения МИК. Данный штамм МБТ был подвергнут тестированию в расширенном диапазоне концентраций, в результате которого было установлено максимальное значение МИК, равное 128,0 мкг/мл. В итоге значения МИК препарата для штаммов МБТ с ШЛУ распределились в диапазоне от 4,0 до 128,0 мкг/мл.

Анализ данных, представленных в таблице 4, показал, что 4 штамма МБТ с ШЛУ (16%) имели значения МИК препарата Перхлозон® меньше либо были равными пограничному значению 8,0 мкг/мл и 21 штамм МБТ с ШЛУ (84%) имели значения МИК больше пограничного. Преобладающая часть штаммов МБТ с ШЛУ (76%) имела МИК препарата в концентрациях от 32,0 до 64,0 мкг/мл.

Таким образом, в **общей сложности** были определены МИК препарата Перхлозон® у 90 штаммов МБТ – клинических изолятов. Обобщенные результаты изучения противотуберкулезной активности препарата Перхлозон® в отношении

чувствительных штаммов МБТ и штаммов МБТ с различным профилем лекарственной устойчивости к ПТП представлены в таблице 5.

В заключение необходимо отметить, что в зависимости от профиля ЛУ МБТ к ПТП были получены различные значения МИК препарата Перхлозон®, при которых наблюдалось ингибирование роста МБТ у преобладающего количества штаммов. Так, у 86,7% чувствительных штаммов рост МБТ прекращался в диапазоне от 2,0 до 4,0 мкг/мл (включая референс-штамм *M. tuberculosis H37Rv*), у 46,7% штаммов с МЛУ рост МБТ прекращался в диапазоне от 2,0 до 16,0 мкг/мл и у 53,3% штаммов рост МБТ прекращался в диапазоне от 32,0 до 64,0, у 73,3% штаммов с ШЛУ рост МБТ прекращался в диапазоне от 32,0 до 64,0 мкг/мл.

Выводы

1. Противотуберкулезный препарат Перхлозон® обладает ингибирующим действием в отношении лабораторного штамма *M. tuberculosis H37Rv* и клинических штаммов *M. tuberculosis* с различным профилем лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам.

Таблица 5. Минимальные ингибирующие концентрации препарата Перхлозон® для чувствительных штаммов и штаммов МБТ с различным профилем лекарственной устойчивости к ПТП (плотность микобактериальной суспензии 104 КОЕ/мл)

| МИК мкг/мл | Количество штаммов (n = 90) | | |
|------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Чувствительные штаммы МБТ (n = 30) | Штаммы МБТ с МЛУ (n = 30) | Штаммы МБТ с ШЛУ (n = 30) |
| 1 | 1 | 0 | 0 |
| 2 | 11 | 3 | 0 |
| 4* | 15 | 4 | 1 |
| 8 | 3 | 3 | 4 |
| 16 | 0 | 4 | 2 |
| 32 | 0 | 7 | 12 |
| 64 | 0 | 9 | 10 |
| 128 | 0 | 0 | 1 |

Примечание: *МИК препарата Перхлозон® для контрольного штамма *M. tuberculosis H37Rv*.

2. Значения МИК препарата для чувствительных штаммов МБТ (включая референс-штамм *M. tuberculosis H37Rv*) распределились от 1,0 до 8,0 мкг/мл, для штаммов МБТ с МЛУ значения МИК препарата Перхлозон® определены в диапазоне от 2,0 до 64,0 мкг/мл, для штаммов МБТ с ШЛУ – в диапазоне от 4,0 до 128,0 мкг/мл.

3. Установлено, что противотуберкулезная активность препарата Перхлозон® *in vitro* в большинстве случаев зависит от спектра лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам как основного, так и резервного ряда, однако данный фактор не всегда является решающим.

4. При назначении Перхлозона® для лечения больных туберкулезом желательнее проводить определение МИК препарата до начала терапии.

5. С учетом всего перечисленного препарат Перхлозон® является перспективным препаратом для использования в комплексной химиотерапии больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя в рамках предусмотренных клинических рекомендаций последнего издания [3].

Литература

1. Доклад о глобальной борьбе с туберкулезом. Резюме. 2019. – ВОЗ, 2020. [Электронный ресурс] URL: https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2019_ExecutiveSummary_ru.pdf?ua=1 (Дата обращения 03.06.2020 г.).
2. Кильдюшева Е.И., Егоров Е.А., Скорняков С.Н. и др. Клиническая результативность новых лекарственных препаратов в схемах лечения туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя // РМЖ. – 2017. – № 18. – С. 1288-1295.
3. Клинические рекомендации. Туберкулез у взрослых. МКБ 10: A15-A19. – 2020. ID: KP16/1 [Электронный ресурс] URL: <http://cr.rosminzdrav.ru/#!/schema/943> (Дата обращения 01.03.2020 г.).
4. Николаева С.В. Опыт применения противотуберкулезного препарата перхлозон у больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью в Республике Бурятия // Туберкулез и болезни легких. – 2015. – № 10. – С. 64-68.
5. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя; изд. 3-е – М., 2015 г. – 68 с.
6. Яблонский П.К., Виноградова Т.И., Левашев Ю.Н. и др. Доклинические и клинические исследования нового противотуберкулезного препарата Перхлозон® // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2016. – Т. 18. – № 1. – С. 42-48.
6. Caminero J.A., Garcia-Basteiro A.L., Rendon A. et al. The future of drug-resistant tuberculosis treatment: learning from the past and the 2019 World Health Organization consolidated guidelines // Eur. Respir. J. – 2019. – Vol. 54: 1901272. doi.org/10.1183/13993003.01272-2019.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia spp., and other aerobic actinomycetes; approved standard – 2nd ed.: document M24-A2. – CLSI, Wayne, PA, USA, 2011.
8. Pontali E., Raviglione M., Migliori G. et al. Regimens to treat multidrug-resistant tuberculosis: Past, present and future perspectives // Eur. Resp. Rev. – 2019. – Vol. 28. doi: 10.1183/16000617.0035-2019
9. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. WHO/CDS/TB/2019.3. – Geneva, World Health Organization, 2019. [Электронный ресурс] URL: <https://www.who.int/tb/publications/2019/consolidated-guidelines-drug-resistant-TB-treatment/en/> (Дата обращения 29.03.2019).

Сведения об авторах

Сафонова Светлана Григорьевна – заведующая отделом проблем 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. 8 (499) 268-08-76

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

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

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

Тел. 8 (499) 268-70-33, тел./факс 8 (499) 785-20-82

e-mail: iraperetokina@yandex.ru

Макарова Марина Витальевна – главный научный сотрудник отдела проблем 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. 8 (916) 688-98-25, тел./факс 8 (495) 964-86-37

e-mail: makarova75@yandex.ru

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

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

Тел. 8 (499) 268-70-33, тел./факс 8 (499) 785-20-82

e-mail: luda.yurievna2017@yandex.ru

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

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

Тел. 8 (499) 268-70-33, тел./факс 8 (499) 785-20-82

e-mail: juliaisaeva81@rambler.ru

Григораш Денис Викторович – менеджер по реализации новых проектов, Акционерное общество «Фармасинтез»

Адрес: 123100, г. Москва, Пресненская наб., д. 12, башня Федерация (Запад), 42-й этаж

Тел. 8 (495) 750-54-37, +7 (916) 910-13-67

e-mail: info@pharmasyntez.com