

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА И ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

*Е.Ю. Носова, М.В. Макарова, Ю.Д. Михайлова, М.А. Свириденко, А.А. Хахалина, С.Г. Сафонова
ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом
Департамента здравоохранения города Москвы»*

NEW APPROACHES TO THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS AND THE DETERMINATION OF THE DRUG SUSCEPTIBILITY OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS TO ANTIMICROBIAL DRUGS

E.Yu. Nosova, M.V. Makarova, Yu.D. Mikhailova, M.A. Sviridenko, A.A. Khakhalina, S.G. Safonova

Проведено исследование по определению последовательности применения микробиологических и молекулярно-генетических методов в алгоритме ускоренной лабораторной диагностики туберкулеза.

Установлены пороговые значения концентрации ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) в образцах различного диагностического материала для наиболее эффективного использования биочиповой технологии в определении лекарственной чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам.

Включение в алгоритм лабораторной диагностики туберкулеза микробиологического теста Sensititre MycoTB, наряду с тест-системой «ТБ-ТЕСТ», позволяет установить количественную характеристику штаммов (уровень чувствительности/устойчивости к широкому спектру АБП) для выбора препаратов и оптимизации проводимого лечения.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, культуральные методы, метод серийных микроразведений, молекулярно-генетические методы, определение лекарственной чувствительности, биочипы, ПЦР в реальном времени

A study was carried out to determine the sequence of application of microbiological and molecular genetic methods in the algorithm for accelerated laboratory diagnosis of tuberculosis. We set threshold values of the concentration of DNA of Mycobacterium tuberculosis (MTB) in various diagnostic samples for the most effective application of microarrays technology in determining the drug susceptibility of MTB to anti-TB drugs.

The inclusion of the Sensititre MycoTB microbiological test in the algorithm for laboratory diagnostics of tuberculosis together with the test-system "TB-TEST" makes it possible to establish the quantitative characterization of strains (the level of susceptibility/resistance to a wide range of antimicrobial agents) for the selection of anti-TB drugs and optimization of the treatment.

Keyword: Mycobacterium tuberculosis, culture methods, serial microdilution method, molecular genetic methods, drug susceptibility testing, microarrays, real-time PCR

Введение

Эпидемиологическая ситуация по заболеваемости туберкулезом постоянного населения города Москвы в последние годы не только улучшается, но и наметилась тенденция к ее стабилизации [2]. Несмотря на это, эффективная борьба с туберкулезом в значительной мере затруднена с увеличением случаев выявления заболевания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ, ШЛУ) к противотуберкулезным препаратам, тенденция роста которого также прослеживается во всем мире, что в свою очередь осложняет течение и исход заболевания. Существенную напряженность в эпидемическую ситуацию в первую очередь вносят мигран-

ты и больные с сочетанной инфекцией ВИЧ/туберкулез [3]. В связи с этим чрезвычайно важным в современной фтизиатрии является максимально быстрое выявление возбудителя заболевания и определение профиля его лекарственной чувствительности к антибактериальным препаратам.

На сегодняшний день для определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) МБТ наиболее широко применяются фенотипические методы с использованием автоматизированной системы BACTEC™ MGIT™ 960 на жидких питательных средах Middlebrook 7H9 и молекулярно-генетические методы (МГМ).

Молекулярно-генетические технологии во фтизиатрии стали неотъемлемой частью диагностических протоколов

микробиологических лабораторий и играют решающую роль в быстром выявлении ДНК возбудителя туберкулеза и определении его лекарственной чувствительности к химиопрепаратам. Одни тесты используются только для выявления ДНК возбудителя непосредственно в диагностическом материале больного, другие – для одновременного выявления и определения генетических детерминант устойчивости к противотуберкулезным препаратам (ПТП). Для этих целей главным образом применяют ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), гибридизацию на стрипах или на биочипах. Среди технологий гибридизационного анализа на твердых носителях для практического применения широко используют коммерческие тест-системы на основе гибридизации на ДНК-стрипах, разработанные компанией Hain Lifescience (Германия) и олигонуклеотидные микрочипы (биочипы) (ООО «БИОЧИП – ИМБ», Россия) [4, 13].

Преимуществом отечественных биочипов для определения генетических детерминант устойчивости, по сравнению с тестами гибридизационного анализа на стрипах – GenoType MTBDRplus и GenoTypeMTBDRsl, является то, что с их помощью можно точно определить тип мутаций, как наиболее распространенных, так и редко встречающихся. Это позволяет исключить получение ложноположительных результатов и является важной дополнительной информацией для проведения эпидемиологических исследований в области распространения штаммов с МЛУ и ШЛУ.

Однако чувствительность тестов гибридизационного анализа в значительной степени зависит от количества ДНК в исследуемом диагностическом материале, что ограничивает возможность прежде всего в определении лекарственной чувствительности/устойчивости МБТ к ПТП. Технология ПЦР-РВ значительно упростила решение этой задачи, так как в процессе проведения ПЦР постоянно осуществляется регистрация накапливаемой ДНК возбудителя в исследуемом образце, что позволяет за 1,5–2 часа с высокой чувствительностью и специфичностью определить ее количество в диагностическом материале, необходимое для последующего определения генетических детерминант устойчивости.

Несмотря на быстроту получаемых результатов, их надежность не всегда соответствует приемлемому уровню. Так, получаемые данные лекарственной устойчивости возбудителя с помощью различных молекулярных технологий нередко расходятся как с микробиологическими результатами, так и между собой вследствие разницы в количестве анализируемых генов и мутаций в них, что подрывает к ним доверие клиницистов [5]. С другой стороны, результаты определения ЛЧ МБТ к некоторым ПТП с помощью установленной «критической концентрации» (КК), получаемой различными микробиологическими методами, также могут расходиться [8, 12]. Это связано с тем, во-первых, что процесс развития устойчивости МБТ

опосредован последовательным появлением и накоплением мутаций при селективном воздействии препаратами, который приводит со временем к изменению состава микобактериальной популяции. Следовательно, возникает необходимость периодически корректировать значения КК лекарственных препаратов [1]. Так, КК некоторых препаратов в результате многоцентровых исследований неоднократно корректировались для левофлоксацина, моксифлоксацина, цикloserина, как для плотных, так и для жидких сред (BACTEC™ MGIT™ 960), и рекомендовались экспертами ВОЗ для определения ЛЧ в руководствах [17, 18, 19]. Во-вторых, КК некоторых препаратов может быть близкой к МИК для чувствительных штаммов, что осложняет их разделения от устойчивых [9]. Например, значения МИК этамбутола в некоторых штаммах с мутациями в 306-м кодоне гена *embB* очень близки к КК препарата как на плотных средах, так в Bactec™ MGIT™ 960, что является причиной низкой воспроизводимости результатов тестирования ЛЧ МБТ даже среди референс-лабораторий [15,7,20]. Другой пример связан с рифампицином: изоляты с редкими специфическими мутациями в кодонах 511, 516, 526 и 533 гена *rpoB* могут демонстрировать низкий уровень устойчивости к препарату или даже интерпретироваться как чувствительные в BACTEC™ MGIT™ 960 [14]. Таким образом, определение ЛЧ МБТ к ПТП с помощью одной установленной КК к каждому препарату является качественной характеристикой, разделяющей штаммы МБТ на «чувствительные» и «устойчивые», и, следовательно, не позволяет в полной мере оценить уровень устойчивости МБТ к препаратам, который может варьировать в широких пределах. Напротив, метод серийных микроразведений, в отличие от использования системы BACTEC™ MGIT™ 960, позволяет установить более точное определение ЛЧ по значению МИК в жидкой питательной среде для каждого ПТП, используемого для лечения туберкулеза [6, 10].

Все это определяет необходимость проведения анализа результатов определения лекарственной чувствительности МБТ к ПТП между различными микробиологическими методами и молекулярно-генетическим определением генетических детерминант устойчивости для получения более достоверного результата о степени устойчивости возбудителя, что в свою очередь поможет фтизиатрам в выборе оптимального режима лечения для каждого больного.

Цель исследования

Определение последовательности применения микробиологических и молекулярно-генетических методов в алгоритме ускоренной лабораторной диагностики туберкулеза для более эффективного выявления возбудителя из различного диагностического материала и определения лекарственной чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам.

Материал и методы исследования

Были изучены 248 образцов респираторного материала (мокрота, бронхиальный секрет), полученного от 180 пациентов, а также 353 штамма МБТ, выделенные от больных, находящихся на лечении в клиниках и филиалах Центра. Предметом исследования являлось внедрение новых методов в алгоритм ускоренной лабораторной диагностики туберкулеза.

Краткое описание методик выделения и определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам

Деконтаминацию респираторных образцов (мокрота, бронхиальный лаваж, бронхиальный смыв) проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ [11]. Для люминесцентной микроскопии использовали 30 мкл полученного осадка. В индикаторные пробирки MGIT с жидкой питательной средой *M7H9*, обогащенной ростовыми добавками засеивали по 0,5 мл осадка и культивировали в автоматизированной системе BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton, Dickinson and Company, USA).

Для постановки тестов на ЛЧ использовали субкультуры МБТ, полученные с помощью системы BACTEC™ MGIT™ 960 («возраст» культуры не более 3 дней от момента индикации роста прибором).

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

Лекарственную чувствительность МБТ к рифампицину (R), изониазиду (H) и этамбутолу (Emb) определяли в жидкой среде *Middlebrook 7H9* с использованием системы Bactec 960 в критических концентрациях 1,0; 0,1 и 4,0 мкг/мл соответственно [16]. Лекарственную чувствительность МБТ к офлоксацину (Ofx), канамицину (Km), амикацину (Am) и капреомицину (Cap) в системе BACTEC™ MGIT™ 960 определяли в критических концентрациях 2,0; 2,5; 1,0 и 2,5 мкг/мл соответственно, к левофлоксацину (Lfx) и моксифлоксацину (Mfx) при критических концентрациях 2,0 и 0,25 мкг/мл [17] и 1,5 и 0,5 мкг/мл соответственно [18].

Определение МИК АБП методом серийных микроразведений в жидкой питательной среде проводили с использованием тест-системы Sensititre MucotB согласно методике фирмы-производителя [10]. Для оценки значений МИК препаратов, устойчивых в отношении штаммов МБТ, использовали пограничные значения МИК.

Для проведения исследований молекулярно-генетическими методами (МГМ) пробоподготовку осадка деконтаминированного образца материала в объеме 0,5–1,0 мл и культуры МБТ, выделенных в системе BACTEC™ MGIT™ 960, проводили с использованием «Инактивирующего реагента «А» (НПК «СИНТОЛ», Россия).

Для выделения ДНК из осадка диагностического материала и культур МБТ применяли роботизированную станцию

Freedom EVO (TECAN, Швейцария) с использованием набора реагентов «М-Сорб-Туб-автомат-48» (НПК «СИНТОЛ», Россия).

Количественное определение ДНК МБТ в диагностическом материале с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили с использованием набора реагентов «АмплиТуб-РВ» (НПК «СИНТОЛ», Россия) на амплификаторе CFX 96 (BioRad, США).

Проведение ПЦР, гибридизации на биологических микрочипах и регистрацию результатов проводили согласно прилагаемому руководству с использованием набора реагентов к тест-системам «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ» (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия).

Результаты гибридизации на биологических микрочипах регистрировали с помощью аппаратно-программного комплекса для анализа изображений биологических микрочипов «Чипдетектор-01». Интерпретацию результатов осуществляли с помощью программы Imageware («БИОЧИП-ИМБ», Россия).

Статистическая обработка данных

Сбор и обработка информации о диагностическом материале пациента, культурах, результатах микробиологических и молекулярно-генетических исследований осуществлялись с помощью лабораторной информационной системы «АЛИСА» (ЗАО «Фирма Гален»). При расчете характеристик методов и доли совпадений результатов вычислялся 95%-ный доверительный интервал (ДИ). Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Для более эффективного использования тест-систем «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ» в рамках централизованной бактериологической лаборатории необходимо было определить последовательность их применения в алгоритме ускоренной лабораторной диагностики туберкулеза в комплексе с микробиологическими методами. Для этого необходимо было установить пороговые значения концентрации ДНК МБТ в образцах диагностического материала пациентов.

Исследовано 248 образцов респираторного материала (мокрота, бронхиальный секрет), полученных от 180 пациентов. Бактериологические (люминесцентная микроскопия и посев в жидкой среде *Middlebrook 7H9*) и молекулярно-генетические исследования («АмплиТуб-РВ» «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2», «ТБ-ТЕСТ») выполнялись из одной порции осадка обработанного диагностического материала. Для молекулярно-генетических исследований использовали последнюю порцию осадка.

Из 248 образцов с помощью люминесцентной микроскопии кислотоустойчивые микобактерии (КУМ) были обнаружены в 207 (83,5% ДИ 78,3%–87,6%), с помощью ПЦР в реальном времени ДНК МБТ выявлена в 246 (99,2% ДИ 97,1–99,8%) образцах диагностического осадка. Во всех исследуемых образцах был получен рост МБТ в BACTEC™ MGIT™ 960. С помощью «ТБ-

БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2» ДНК МБТ была обнаружена в 242 (97,6% ДИ 94,8–98,9%) образцах, тогда как определить лекарственную чувствительность (генотип) удалось только в 206 (83,1% ДИ 80,1–89,1%) образцах. С помощью «ТБ-ТЕСТ» ДНК МБТ была обнаружена в 209 (84,3% ДИ 79,2–88,3%) образцах, а генотип определен в 188 (75,8% ДИ 70,1–80,7%). Полученные результаты представлены в таблице 1.

Из 246 образцов с положительным результатом в 45 образцах (18,3%) концентрация ДНК МБТ варьировала от 20 до 100 копий на мл осадка, из которых только в 6 образцах была определена ЛЧ с помощью «ТБ-БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2», тогда как с использованием «ТБ-ТЕСТ» результат ЛЧ получить не удалось из-за малого количества ДНК копий.

В 35 (14,2%) образцах концентрация ДНК МБТ варьировала от 200 до 600 копий на мл осадка, из них в 34 (97,1% ДИ 85,5–99,5%) образцах определена ЛЧ [18] с помощью «ТБ-БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2» и 22 (62,9%) с «ТБ-ТЕСТ».

В 36 (14,7%) образцах ДНК МБТ обнаружена в концентрации от 700 до 1000 копий/мл осадка и в 130 (52,8%) образцах – свыше 1000 копий/мл. Во всех образцах был определен генотип МБТ с помощью «ТБ-БИОЧИП», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ».

Таким образом, для наиболее эффективного использования биочиповой технологии в определении ЛЧ МБТ к химио-

препаратам было установлено пороговое значение концентрации ДНК МБТ в образце диагностического материала с помощью ПЦР-РВ, которое составило для «ТБ-БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2» от 200 до 400 копий/мл и от 400 копий и выше для «ТБ-ТЕСТ».

В случае обнаружения ДНК МБТ в количестве до 200 копий/мл в образце диагностического материала определение ЛЧ целесообразно проводить в выделенной культуре МБТ с помощью «ТБ-ТЕСТ». Включение в алгоритм этапа количественного определения ДНК МБТ с помощью ПЦР-РВ позволило не только установить наличие возбудителя в диагностическом материале пациента, но и определить последовательность эффективного использования тест-систем гибридизационного анализа на биочипах.

Следующим этапом исследования явилось изучение определения лекарственной чувствительности 353 клинических штаммов МБТ к химиопрепаратам микробиологическими методами с использованием ВАСТЕС™ MGIT™ 960 и Sensititre МусоТВ (МусоТВ) и молекулярно-генетическим методом с использованием тест-системы «ТБ-ТЕСТ».

По данным, полученным в системе ВАСТЕС™ MGIT™ 960, число культур МБТ, которые имели устойчивость к изониазиду и/или рифампицину (МЛУ), составило 316 штаммов (89,0%).

Таблица 1. Определение пороговых значений концентрации ДНК МБТ в образце с помощью тест-системы «АмплиТуб-РВ»

Концентрация ДНК (копии/мл)	Всего образцов	Количество образцов					
		Микроскопия		«ТБ-БИОЧИП», «ТБ-БИОЧИП-2»		«ТБ-ТЕСТ»	
		ЛЮМ-	ЛЮМ+	ДНК МБТ+	генотип	ДНК МБТ+	генотип
отр	2	–	2	–	–	–	–
20	4	3	1	1	–	–	–
30	3	3	–	2	–	–	–
40	3	2	1	3	–	–	–
50	7	4	3	7	1	–	–
60	6	2	4	6	–	–	–
70	2	–	2	2	1	–	–
80	10	4	6	10	3	3	–
90	3	1	2	3	1	1	–
100	7	2	5	7	–	4	–
20-100	45	21	26	41	6	8	–
200	9	2	7	9	8	9	2
300	1	1	–	1	1	1	–
400	14	4	10	14	14	14	11
500	8	3	5	8	8	8	6
600	3	–	3	3	3	3	3
200-600	35	10	25	35	34	35	22
700	5	1	4	5	5	5	5
800	14	3	11	14	14	14	14
900	1	–	1	1	1	1	1
1000	16	1	15	16	16	16	16
700-1000	36	5	31	36	36	36	36
> 1000	130	5	125	130	130	130	130
Всего	248	41 (16,5%)	207 (83,5%)	242 (97,6%)	206 (83,1%)	209 (84,3%)	188 (75,8%)

Таблица 2. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) препаратов с помощью тест-системы Sensititre МусоТВ в отношении клинических штаммов МБТ (n = 353)

Препарат	МИК (мкг/мл)								
S	МИК	0,25	0,5	1	2*	4	8	16	32
	абс.	4	4	9	15	47	19	18	237
	%	1,1	1,1	2,6	4,3	13,3	5,4	5,1	67,1
H	МИК	0,03	0,06	0,125	0,25*	0,5	1	2	4
	абс.	1	3	–	3	–	–	15	331
	%	0,3	0,8	–	0,8	–	–	4,3	93,8
R	МИК	0,125	0,25	0,5	1*	2	4	8	16
	абс.	8	13	9	6	5	6	4	302
	%	2,3	3,7	2,5	1,7	1,4	1,7	1,1	85,6
E	МИК	0,5	1	2	4*	8	16	32	
	абс.	–	10	28	107	155	48	5	
	%	–	2,8	7,9	30,3	44,0	13,6	1,4	
Rfb	МИК	0,125	0,25	0,5*	1	2	4	8	16
	абс.	37	12	19	24	78	128	51	4
	%	10,5	3,4	5,4	6,8	22,1	36,3	14,4	1,1
Ofx	МИК	0,25	0,5	1	2*	4	8	16	32
	абс.	7	137	76	12	31	51	33	6
	%	2,0	38,8	21,5	3,4	8,8	14,5	9,3	1,7
Mfx	МИК	0,06	0,125	0,25	0,5*	1	2	4	8
	абс.	7	132	81	11	32	50	34	6
	%	2,0	37,4	22,9	3,1	9,1	14,2	9,6	1,7
Km	МИК	0,6	1,25	2,5*	5	10	20	40	
	абс.	4	112	60	76	32	11	58	
	%	1,1	31,7	17,1	21,5	9,1	3,1	16,4	
Am	МИК	0,125	0,25	0,5	1*	2	4	8	16
	абс.	–	18	136	122	15	3	2	57
	%	–	5,2	38,5	34,6	4,2	0,8	0,6	16,1
Eth	МИК	0,3	0,6	1,25	2,5	5*	10	20	40
	абс.	1	24	30	92	85	48	39	34
	%	0,3	6,9	8,5	26,1	24,1	13,4	11,1	9,6
PAS	МИК	0,5	1	2*	4	8	16	32	64
	абс.	204	49	32	36	16	7	4	5
	%	57,8	13,9	9,1	10,2	4,5	2,0	1,1	1,4
Cyc	МИК	2	4	8	16	32*	64	128	256
	абс.	–	7	37	220	86	3	–	–
	%	–	2,0	10,5	62,3	24,4	0,8	–	–

Примечание: * – значение критической концентрации.

Результаты определения чувствительности в Sensititre МусоТВ интерпретировали с применением значений критических концентраций препаратов (мкг/мл), разработанных в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»: для стрептомицина – 2,0; изониазида – 0,25; рифампицина – 1,0; этамбутола – 4,0; рифабутину – 0,5; офлоксацина – 2,0; моксифлоксацина – 0,5; канамицина – 2,5; амикацина – 1,0; ПАСК – 2,0; этионамида – 5,0 и циклосерина – 32,0 мкг/мл.

При сопоставлении результатов в выборку были включены данные для каждого конкретного препарата, полученные двумя культуральными методами – Sensititre МусоТВ и ВАСТЕС™ MGIT™ 960 (для циклосерина – Sensititre МусоТВ и

метод абсолютных концентраций на плотной среде Левенштейна-Йенсена).

Результаты определения значений МИК препаратов с помощью тест-системы Sensititre МусоТВ приведены в таблице 2.

Так, в ходе интерпретации полученных значений МИК более 50% штаммов МБТ оценены как: *устойчивые* к S (стрептомицину) – 274 (77,6%), к H (изониазиду) – 346 (98,0%), к R (рифампицину) – 312 (88,4%) и Rfb (рифабутину) – 261 (73,9%); *чувствительные* только к PAS (ПАСК) – 204 (57,8%) штамма; *промежуточные* к E (этамбутолу) – 290 (82,2%), Km (канамицину) – 248 (70,3%), Am (амикацину) – 273 (77,3%), Eth (этионамиду) – 225 (63,7%) и Cyc (циклосерину) – 309 (87,5%).

Примерно поровну распределились штаммы между устойчивыми, чувствительными и промежуточными в отношении Ofx (офлоксацина) – 90 (25%), 144 (40,8%) и 119 (33,7%) соответственно, и моксифлоксацина – 90 (25%), 139 (39,4%) и 124 (35,1%) соответственно.

Далее было проведено сравнительное изучение результатов ЛЧ, полученных с помощью тест-системы Sensititre MycoTB и автоматизированной системы BACTEC™ MGIT™ 960. Для цикloserина ЛЧ была изучена с применением тест-системы Sensititre MycoTB и метода абсолютных концентраций. Чувствительность к рифабутину в системе BACTEC™ MGIT™ 960 не была изучена из-за отсутствия чистой субстанции препарата.

Для удобства сравнения результатов, полученных с помощью Sensititre MycoTB, классифицировали как чувствительные или устойчивые. Группа промежуточных штаммов была объединена с группой чувствительных или устойчивых в зависимости от значений МИК. Если МИК препарата была менее или равна критическим концентрациям, штамм МБТ считался чувствительным; если МИК препарата была более критических концентраций, штамм МБТ считался устойчивым. Результаты представлены в таблице 3.

Сравнительный анализ результатов определения ЛЧ 353 клинических штаммов МБТ показал высокий процент совпадения в отношении S – 94,3% (ДИ 91,4%–96,3%), H – 99,7% (ДИ 98,4–99,9%), R – 98,0% (ДИ 96,0–99,0%), Ofx – 98,7% (ДИ 96,6–99,5%), Mfx – 94,4% (ДИ 91,2–96,5%), Km – 94,4% (ДИ 91,2–96,5%), Am – 95,4% (ДИ 92,7–97,2%) и Cys – 98,9% (ДИ 97,1–99,6%). Наименьший процент совпадений получен для Pas 87,1% (ДИ 82,8–90,4%), E – 75,4% (ДИ 70,6–79,6%) и крайне низкий для Eth – 56,2% (ДИ 50,9–61,3%).

С помощью «ТБ-ТЕСТ» в исследуемых штаммах определяли генетические детерминанты устойчивости к трем препаратам первого ряда – R, H, E и двум группам препаратов второго ряда – фторхинолонам (Ofx, Mfx) и инъекционным препаратам (Km, Am). Средняя корреляция между Bactec™ 960, Sensititre MycoTB и «ТБ-ТЕСТ» составила около 94% с учетом штаммов, входящих в «промежуточную» область чувствительности/устойчивости («условное совпадение»). Исследование показало, что «условное совпадение» между «ТБ-ТЕСТ» и Sensititre MycoTB, по сравнению с BACTEC™ MGIT™ 960, существенно выше для этambutола – 95,3% и 81,5% соответственно, в меньшей степени для рифампицина – 98,1% и 96,0%, для канамицина – 99,2% и 92,3%, для амикацина – 99,8% и 95,9%, офлоксацина – 99,1% и 97,5%, сопоставимо при КК = 0,25 мкг/мл для моксифлоксацина – 98,3% и 98,9% и изониазида – 99,8%.

Наибольшая доля штаммов с «промежуточной» чувствительностью/устойчивостью, детерминированная мутациями в генах мишенях действия препарата, составила для устойчивых или чувствительных штаммов МБТ в системе BACTEC™ MGIT™ 960

Таблица 3. Сравнительный анализ результатов определения лекарственной чувствительности МБТ

Препараты / Результаты ЛЧ различными методами				Число штаммов
S		Sensititre MycoTB		Всего
		уст.	чув.	
BACTEC	уст.	318	17	335
	чув.	3	15	18
Всего		321	32	353
H		Sensititre MycoTB		Всего
		уст.	чув.	
BACTEC	уст.	346	1	347
	чув.	0	6	6
Всего		346	7	353
R		Sensititre MycoTB		Всего
		уст.	чув.	
BACTEC	уст.	315	5	320
	чув.	2	31	33
Всего		317	36	353
E		Sensititre MycoTB		Всего
		уст.	чув.	
BACTEC	уст.	165	44	209
	чув.	43	101	144
Всего		208	145	353
Ofx		Sensititre MycoTB		Всего
		уст.	чув.	
BACTEC	уст.	100	1	101
	чув.	3	198	201
Всего		103	199	302
Mfx		Sensititre MycoTB		Всего
		уст.	чув.	
BACTEC	уст.	88	1	89
	чув.	16	197	213
Всего		104	198	302
Km		Sensititre MycoTB		Всего
		уст.	чув.	
BACTEC	уст.	148	12	160
	чув.	5	137	142
Всего		153	149	302
Am		Sensititre MycoTB		Всего
		уст.	чув.	
BACTEC	уст.	72	11	83
	чув.	5	262	267
Всего		77	273	350
Eth		Sensititre MycoTB		Всего
		уст.	чув.	
BACTEC	уст.	108	142	250
	чув.	11	88	99
Всего		119	230	349
PAS		Sensititre MycoTB		Всего
		уст.	чув.	
BACTEC	уст.	53	32	85
	чув.	7	210	217
Всего		60	242	302
Cys		Sensititre MycoTB		Всего
		уст.	чув.	
BACTEC	уст.	1	2	3
	чув.	2	348	350
Всего		3	350	353

к этамбутолу 88,0%, канамицину – 41,6% (за счет мутаций в промоторной области гена *eis*), офлоксацину – 39,7% (за счет замен в генах *gyrB* и *gyrA* – A90V, D94A, G88A, D94V, A74S), рифампицину – 9,4% (за счет мутаций N526N/C, D516Y/G, L533P, L511P). Наименьшая доля устойчивых штаммов МБТ определена в BASTEC™ MGIT™ 960 к амикацину в 6,3% и изониазиду в 3,2%.

Кроме того, в исследовании было установлено, что для качественного определения ЛЧ МБТ к моксифлоксацину снижение критической концентрации препарата в BASTEC™ MGIT™ 960 с 0,5 мкг/мл до 0,25 мкг/мл является обоснованным. Показано уменьшение количества штаммов МБТ с «промежуточной» степенью чувствительности/устойчивости с 45,4% при КК = 0,5 мкг/мл до 31,1% при КК = 0,25 мкг/мл главным образом за счет замен мутаций A90V и D94A, что подтверждено расчетом «условного» совпадения между тремя методами, составившего 97,8%.

Заключение

Лабораторная диагностика туберкулеза, основанная на комплексном применении культуральных и молекулярно-генетических методов, позволяет в сроки от 2,5 часа до трех дней не только обнаружить МБТ в исследуемом материале, но и установить в генах возбудителя наличие мутаций, обуславливающих множественную и широкую лекарственную устойчивость (МЛУ, ШЛУ).

Последовательное применение тест-систем гибридизационного анализа на биочипах («ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ») в алгоритме ускоренной лабораторной диагностики туберкулеза позволяет наиболее эффективно их применять для определения лекарственной чувствительности МБТ к антибактериальным препаратам как в диагностическом материале, так и культурах. Определения ЛЧ МБТ к ПТП только основного ряда с использованием автоматизированной системы BASTEC™ MGIT™ 960 целесообразно проводить для культур, у которых молекулярно-генетическими методами были выявлены чувствительные генотипы к R и H, а одновременное определение ЛЧ МБТ к препаратам основного и резервного ряда – в случае, когда молекулярно-генетическими методами были определены генотипы, резистентные к H и/или R.

При выявлении штаммов МБТ с МЛУ (ШЛУ) необходимо устанавливать степень лекарственной устойчивости как к препаратам основного, так и резервного ряда с помощью молекулярно-генетического и культурального метода микро-разведений. Включение в алгоритм лабораторной диагностики туберкулеза микробиологического теста Sensititre MycoTB наряду с тест-системой «ТБ-ТЕСТ» позволит установить количественную характеристику штаммов (определить уровень чувствительности/устойчивости к широкому спектру АБП) для выбора препаратов и оптимизации проводимого лечения.

Литература

1. Бастиян И. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (перевод с англ.) // Под ред. Ф. Порталс. – «Медицина и жизнь», 2003. – 368 с.
2. Богородская Е.М. Организация противотуберкулезной работы в городе Москве // Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу, 2019 г. / Под ред. Е.М. Богородской, В.И. Литвинова, Е.М. Белиловского. – М.: МНПЦБТ, 2020. – С. 16-25.
3. Борисов С.Е., Белиловский Е.М., Данилова И.Д., Рыбка Л.Н. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя // Противотуберкулезная работа в городе Москве. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу, 2019 г. / Под ред. Е.М. Богородской, В.И. Литвинова, Е.М. Белиловского. – М.: МНПЦБТ. – 2020. – Гл. 5. – С. 101-112.
4. Мирзабеков, А.Д. Биочипы в биологии и медицине XXI века // Вестник РАН. – 2003. – Т. 73. – № 5. – С. 412.
5. Носова Е.Ю., Михайлова Ю.Д., Перетокина И.В., Исакова А.А., Макарова М.В., Сафонова С.Г. Ускоренные методы определения устойчивости *M. tuberculosis* к химиопрепаратам. Надежность получаемых результатов. Материалы XI съезда фтизиатров России, 30 мая – 1 июня 2019, г. Владикавказ // Туберкулез и болезни легких. – 2019. – № 6. – С. 64-65.
6. Abuali M., Katariwala R., LaBombardi V. A comparison of the Sensititre® MYCOTB panel and the agar proportion method for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 31. – N. 5. – P. 835-839.
7. Angra P.K. Performance of tuberculosis drug susceptibility testing in U.S. laboratories from 1994 to 2008 / P.K. Angra, T.H. Taylor, M.F. Iademarco, B. Metchock, J.R. Astles, J.C. Ridderhof // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50. – P. 1233-1239.
8. Banu S., Rahman M. M., Khan M., Ferdous S., Ahmed S., Gratz J., Stroup S., Pholwat S., Heysell S.K., Houptb E.R. 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. 156-163.
9. Gangadharam P.R., Pratt F.P., Perumal V.K., Iseman M.D. The effects of exposure time, drug concentration and temperature on the activity of ethambutol versus *Mycobacterium tuberculosis* // Am. Rev. Respir. Dis. – 1990. – Vol. 141. – P. 1478-1482.
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. Kent, T.K. Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory / T.K. Kent, G.P. Kubica // CDC, Atlanta. – 1985. – 150p.
12. Kim S.J. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results // Eur. Respir. J. – 2005. – Vol. 25. – P. 564-69.
13. Miotto P., Piana F., Cirillo D.M., Migliori G.B. Genotype MTBDRplus: a Further step toward rapid identification of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46. – P. 393-94.
14. Rigouts, L. Rifampin Resistance Missed in Automated Liquid Culture System for *Mycobacterium tuberculosis* Isolates with Specific *rpoB* Mutations / L. Rigouts, M. Gumusboga, W. Bram de Rijk, E. Nduwamahoro, C. Uwizye, B. de Jong, A. Van Deun // J. Clinical Microbiol. – 2013. – Vol. 51. – N. 8. – P. 2641-2645.

15. Schön, T. Evaluation of wild-type MIC distributions as a tool for determination of clinical breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis* / T. Schön, P. Juréen, C.G. Giske, E. Chryssanthou, E. Sturegård, J. Werngren, G. Kahlmeter, S.E. Hoffner, K.A. Angeby // J. Antimicrob. Chemother. – 2009. – Vol. 64. – P. 786-793.
16. Siddiqi S.H., Rusch-Gerdes S., Alexander H. et al. MGIT TM Procedure Manual for BACTECTM MGITTM 960 TB System (Also applicable for Manual MGIT). *Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) culture and drug susceptibility demonstration projects* – 2007. Foundation for Innovative New Diagnostics, 2006. – 89 p.
17. WHO. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. Geneva, Switzerland: WHO, 2008. WHO/HTM/TB/2008.392.
18. WHO. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Chapter 3. Laboratory // Geneva: WHO. – 2014. – P. 39-60.
19. WHO. Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. WHO/CDS/TB/2018.5. – Geneva: WHO, 2018.
[Электронный ресурс] URL: <https://www.who.int/tb/publications/2018/concentrations-drug-susceptibility-testing-TB/en/> (Дата обращения 09.12.2019).
20. Zhang, Z. Ethambutol Resistance as Determined by Broth Dilution Method Correlates Better than Sequencing Results with *embB* Mutations in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates / Z. Zhang, Y. Wang, Y. Pang, K.M. Kam // J. Clin. Microbiol. – 2014. – Vol. 52. – N. 2. – P. 638-641.

Сведения об авторах

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

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

Тел. 8 (495) 603-30-33, тел./факс 8 (499) 785-20-82

e-mail: Rna68@rambler.ru

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

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

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

e-mail: Juliaisaeva81@rambler.ru

Сафонова Светлана Григорьевна – заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ 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.: 8 (499) 268-08-76, тел./факс 8 (499) 785-20-82

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

Макарова Марина Витальевна – главный научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ 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. 8 (916) 688-98-25, тел./факс 8 (499) 785-20-82

e-mail: makarova75@yandex.ru

Свириденко Мария Александровна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

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

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

e-mail: Dna77@mail.ru

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

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

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

e-mail: nastec@bk.ru