

Макарова М.В., Крылова Л.Ю., Сафонова С.Г., Литвинова Н.В., Носова Е.Ю., Литвинов В.И.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *M. TUBERCULOSIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ, В ТЕСТ-СИСТЕМЕ «SENSITITRE MYCOTB»

ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», 107114, г. Москва, Российская Федерация

С помощью тест-системы «Sensititre MycoTB» было исследовано 159 культур *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом. По данным изучения в «Bactec 960» они определены как обладающие множественной лекарственной чувствительностью (МЛУ). Детальный анализ результатов использования указанной тест-системы (Mycotb) продемонстрировал, что значительная часть культур с МЛУ чувствительна к противотуберкулезным препаратам. Существенная часть культур характеризуется «промежуточной» чувствительностью/устойчивостью, что можно установить помощью указанной тест-системы. Эти данные позволяют расширить возможности химиотерапии туберкулеза.

Ключевые слова: тест-система «Sensititre MycoTB»; множественная лекарственная устойчивость.

Для цитирования: Макарова М.В., Крылова Л.Ю., Сафонова С.Г., Литвинова Н.В., Носова Е.Ю., Литвинов В.И. Определение лекарственной чувствительности *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью в тест-системе Sensititre MycoTB. *Клиническая лабораторная диагностика*, 2016; 61(5): 303-307. DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307

Makarova M.V., Krylova L.Yu., Safonova S.G., Litvinova N.V., Nosova E.Yu., Litvinov V.I.

THE DETECTION OF MEDICATION SENSITIVITY OF *M. TUBERCULOSIS* ISOLATED FROM PATIENTS WITH TUBERCULOSIS WITH MULTIPLE MEDICATION RESISTANCE IN TEST-SYSTEM “SENSITITRE MYCOTB”

The Moscow municipal scientific practical center of struggle with tuberculosis of the Moscow health department, 107114 Moscow, Russia

The test-system “Sensititre MycoTB” was applied to analyze 159 cultures of *M. tuberculosis* isolated from patients with tuberculosis. According data of investigation in “Bactec 960” they are identified as cultures with multiple medicinal sensitivity. The detailed analysis of results of application of mentioned test-system (mycoTB) demonstrated that significant part of cultures with multiple medicinal sensitivity is sensitive to anti-tuberculosis pharmaceuticals. The significant part of cultures is characterized by “intermediate” sensitivity/resistance than can be established by mentioned test-system. This data permits enlarging possibilities of chemotherapy of tuberculosis.

Key words: test-system “Sensititre MycoTB”; multiple medicinal sensitivity.

For citation: Makarova M.V., Krylova L.Yu., Safonova S.G., Litvinova N.V., Nosova E.Yu., Litvinov V.I. The detection of medication sensitivity of *M. tuberculosis* isolated from patients with tuberculosis with multiple medication resistance in test-system “Sensititre MycoTB”. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (5): 303-307 (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307

For correspondence: Makarova M.V., doctor of biological sciences, leading research worker of the department problems of laboratory diagnostic of tuberculosis and pathomorphology. e-mail: makarova75@yandex.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Financing. The study had no sponsor support.

Received 17.08.2015
Accepted 15.12.2015

Одна из главных проблем фтизиатрии — все более частое выявление у больных туберкулезом возбудителя, обладающего лекарственной устойчивостью (ЛУ) к используемым для химиотерапии этого заболевания препаратам. В последние десятилетия особое значение имело распространение множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) *M. tuberculosis* — одновременно к изониазиду и рифампицину, а сегодня еще и широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) — МЛУ и резистентность по крайней мере к одному фторхи-

нолону и одному инъекционному препарату (чаще всего речь идет об аминогликозидах и капреомицине) [1—7]. При развитии МЛУ и ШЛУ *M. tuberculosis* для клинициста особенно важно в короткие сроки получить достоверные данные о характере и степени устойчивости и на этой основе выбрать оптимальный режим лечения.

До последнего десятилетия в лабораторной фтизиатрической практике имели (а во многих регионах мира и имеют) широкое распространение методы определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) на плотных, а позднее жидких питательных средах (в автоматизированных системах) [1, 8—13].

Оценку ЛЧ штаммов микобактерий, выделенных от больных, в этих случаях проводили качественным методом с использованием одной (критической) или двух (критической и

Для корреспонденции: Макарова Марина Витальевна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. отд. проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии, e-mail: makarova75@yandex.ru

высокой) концентраций препаратов. Но таким образом нельзя получить полной объективной оценки — существуют вариации чувствительности/резистентности. Определение таких вариаций создает возможности для использования препаратов, к которым по ранее принятым критериям штамм *M. tuberculosis* являлся устойчивым. Детализация данных о чувствительности/резистентности штаммов при использовании применявшихся ранее методов была технически сложной, требовалась индивидуальная дополнительная работа с каждой культурой. Эти технические проблемы частично были решены в результате создания тест-системы «Sensititre» (TREK Diagnostic Systems, Великобритания), которая существует в трех вариантах: *MycoTB* (для *M. tuberculosis*), SLOMyco (для медленно растущих) и RAPMyco (для быстрорастущих) нетуберкулезных микобактерий (НТМБ). Основными особенностями этой тест-системы является использование в ней одновременно большого спектра химиопрепаратов в ряде (8) концентраций, что позволяет оценивать не просто чувствительность/резистентность, но и их градации, что чрезвычайно важно для физиотрической клиники.

Цель работы — изучение «резерва» чувствительности к химиопрепаратам у больных туберкулезом с множественной ЛУ возбудителя.

Материалы и методы. С помощью тест-системы «Sensititre MycoTB» (*MycoTB*) проанализированы 159 культур *M. tuberculosis*, полученных от больных туберкулезом с впервые выявленными и хроническими формами заболевания.

Наличие МЛУ штаммов *M. tuberculosis* установлено на основании предварительных результатов, полученных в «Bactec 960», поскольку ЛЧ всех культур в практической работе лаборатории Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулезом (МНПЦБТ), главным образом изучают этим методом; затем культуры исследовали в «Sensititre MycoTB».

Они были выделены на плотной среде Левенштейна-Йенсена (Л-Й) или в жидкой среде Миддлбрук 7Н9 (7Н9) в системе «Bactec MGIT 960» (Bactec 960). Принадлежность культур к *M. tuberculosis* подтверждено микробиологическими и молекулярно-генетическими методами.

ЛЧ выделенных культур изучали в «Bactec 960» и с помощью тест-системы «Sensititre MycoTB». Предварительно отобраны 189 культур, обладающих МЛУ (по данным «Bactec 960»).

Тестирование в «Bactec 960» проводили согласно стандартной методике определения ЛЧ к химиопрепаратам первого и резервного ряда. Химиопрепараты использовали в критических концентрациях (КК), рекомендованных ВОЗ для данной системы.

Для определения МИК препаратов в тест-системе Sensititre MycoTB суспензию из исследуемой культуры МБТ, приготовленную по 0,5 стандарту мутности McFarland, в количестве 100 мкл переносили в пробирку с обогащенной жидкой питательной средой Миддлбрук 7Н₉ и засеивали по 100 мкл в лунки планшета, содержащие лиофилизированные химиопрепараты в двукратно увеличивающихся концентрациях и инкубировали при 37°C. Рост *M. tuberculosis* оценивали визуально с помощью зеркала через 10—14 дней, в зависимости от скорости роста микобактерий в контрольной лунке без активного вещества. Определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) препарата, которой считали наименьшую его молярность, подавляющую видимый рост микроорганизма в лунке. МИК сравнивали с ранее установленными в МНПЦБТ значениями КК: изониазида — 0,25, рифампицина — 1,0, этамбутола — 4,0, стрептомицина — 2,0, амикацина — 1,0, канамицина — 5,0, моксифлоксацина — 0,25, офлоксацина — 2,0 мкг/мл и предложенными S. Mpagama и соавт. [16] ПАСК — 2,0, этионамида — 5,0, циклосерина — 32,0.

Штаммы МБТ, для которых определены значения МИК, равные значения КК или на одно разведение выше либо ниже, оценивали как обладающие промежуточной (пограничной) чувствительностью/устойчивостью.

Результаты и обсуждение. Результаты изучения ЛЧ штаммов *M. tuberculosis*, с установленной МЛУ, представлены в таблице.

Как видно из таблицы, в данной тест-системе 3 культуры имели промежуточную чувствительность к изониазиду и 6 — к рифампицину. Эти штаммы были ранее изучены в автоматизированной системе «Bactec» и по данным этого исследования являлись устойчивыми.

Чувствительными к ПАСК, циклосерину, канамицину, амикацину и офлоксацину были 40—60% штаммов. Часть из них чувствительна и к другим химиопрепаратам. Это, бесспорно, обеспечивало определенный резерв для лечения данного контингента больных. Значительная часть культур имела промежуточную чувствительность: 4/5 к этамбутолу, около половины к амикацину, канамицину, моксифлоксацину, офлоксацину, циклосерину, этионамиду. В определенном числе случаев она определялась и к другим препаратам. Это также создает возможность для использования их в химиотерапии туберкулеза (может быть с изменением доз — по решению лечащего врача).

Разной клинической интерпретации требуют штаммы, обладающие по данным MycoTB чувствительностью и промежуточной чувствительностью/устойчивостью. Среди культур с промежуточной чувствительностью можно выделить те, у которых МИК совпадают с критической и на одно разведение выше (промежуточно-чувствительные) или на одно разведение ниже (промежуточно-устойчивые). Однако все это требует детальных клинико-лабораторных сопоставлений, чтобы потом сделать конкретные рекомендации для практики.

Проведенное исследование продемонстрировало, что культуры *M. tuberculosis*, выделенные от больных туберкулезом, характеризующиеся МЛУ, сохраняют чувствительность к другим химиопрепаратам, т.е. имеется существенный резерв для лечения соответствующих больных.

В этой ситуации особое значение приобретает применение тест-системы «Sensititre MycoTB» [9, 14—17], которая,

Результаты определения чувствительности/резистентности к химиопрепаратам штаммов *M. tuberculosis* с МЛУ

Лекарственный препарат	Чувствительность штаммов <i>M. tuberculosis</i> (n = 159)					
	чувствительные		промежуточная чувствительность /устойчивость		устойчивые	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Изониазид	0	—	3	1,9	156	98,1
Рифампицин	0	—	6	3,7	150	94,3
Этамбутол	17	10,7	131	82,4	11	6,9
Стрептомицин	11	6,9	27	17,0	121	76,1
Амикацин	66	41,5	73	45,9	20	12,6
Канамицин	67	42,1	72	45,3	20	12,6
Моксифлоксацин	26	16,4	99	62,3	34	21,4
Офлоксацин	63	39,6	62	39,0	34	21,4
ПАСК	91	57,2	41	25,8	27	17,0
Циклосерин	71	44,7	82	51,6	6	3,7
Этионамид	32	20,1	85	53,5	42	26,4

в частности, позволяет выявить штаммы с так называемой промежуточной чувствительностью.

Это позволяет существенно увеличить объем важной для клиницистов информации, на основании которой они могут использовать для лечения и те препараты, к которым по результатам применения других микробиологических методов, выявленные штаммы *M. tuberculosis* отнесены к числу резистентных.

Молекулярно-генетические исследования свидетельствуют, что не во всех случаях гены, контролирующие чувствительность к химиопрепаратам, применяющимся для лечения больных туберкулезом, действует по принципу «все» (устойчивость) или «ничего» (чувствительность) [18—22], т.е. соответствующие данные, также требуют понимания и трактовки (вместе с результатами бактериологических исследований).

Заключение. С помощью тест-системы «Sensititre МусоТВ» исследовано 159 культур *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом. По данным изучения в «Bactec 960» они определены как обладающие МЛУ. Детальный анализ результатов использования указанной тест-системы (МусоТВ) продемонстрировал, что значительная часть культур с МЛУ чувствительна к ряду химиопрепаратов, применяющихся для лечения туберкулеза. Существенная часть культур характеризуется «промежуточной» чувствительностью/устойчивостью, что можно установить с помощью указанной тест-системы. Эти данные позволяют расширить возможности химиотерапии туберкулеза.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—7, 10—17, 19—22
см. REFERENCES)

8. Дорожкова И.Р. Лекарственная чувствительность микобактерий туберкулеза. Методы определения. Оценка результатов. В кн.: Литвинов В.И., Мороз А.М., ред. *Лабораторные исследования при туберкулезе*. М.; 2013: 80—99.
9. Исаева Ю.Д., Крылова Л.Ю., Макарова М.В., Букатина А.А., Гикало М.Б. Сравнительное изучение определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза с помощью тест-системы Sensititre МусоТВ и других культуральных методов. В кн.: Литвинов В.И., Мороз А.М., ред. *Лабораторные исследования при туберкулезе*. М.; 2013: 111—20.
10. Носова Е.Ю., Краснова М.А., Букатина А.А., Гикало М.Б. Молекулярно-генетические исследования в лабораторной диагностике туберкулеза и определение лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis*. В кн.: Литвинов В.И., Мороз А.М., ред. *Лабораторные исследования при туберкулезе*. М.; 2013: 142—66.

Поступила 17.08.15

REFERENCES

1. Daley C., Caminero J. Management of multidrug resistant tuberculosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2013; 34(1): 44—59.
2. Dheda K., Gumbo T., Gandhi N.R., Murray M., Theron G., Udwadia Z. et al. Global control of tuberculosis: from extensively drug-resistant to untreatable tuberculosis. *Lancet Respir. Med.* 2014; 2(4): 321—38.
3. Günther G. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review of current concepts and future challenges. *Clin. Med.* 2014; 14(3): 279—85.
4. Islam T., Hiatt T., Hennig C., Nishikiori N. Drug-resistant tuberculosis in the WHO Western Pacific Region. *Western Pac. Surveill. Response J.* 2014; 5(4): 34—46.

5. WHO. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update. Geneva: WHO; 2011.
6. WHO. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva: WHO; 2014.
7. Zignol M. Drug-resistant tuberculosis in the WHO European Region: an analysis of surveillance data. *Drug Resist. Updat.* 2013; 16(6): 108—15.
8. Dorozhkova I.R. Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility. Methods of detection. Results of estimation. In: Litvinov V.I., Moroz A.M., eds. *Laboratory Researches of Tuberculosis [Laboratornye issledovaniya pri tuberkuleze]*. Moscow; 2013: 80—99. (in Russian)
9. Isaeva Yu.D., Krylova L. Yu., Makarova M.V., Bukatina A.A., Gikalo M.B. Comparative investigation of drug susceptibility of micobacteria tuberculosis by Sensititre MycoTB test system and other cultural methods. In: Litvinov V.I., Moroz A.M., eds. *Laboratory Researches of Tuberculosis [Laboratornye issledovaniya pri tuberkuleze]*. Moscow; 2013: 111—20 (in Russian)
10. Heifets L. Qualitative and quantitative drug-susceptibility tests in mycobacteriology. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1998; 137(5): 1217—22.
11. Mani V., Wang S., Inci F., De Libero G., Singhal A., Demirci U. Emerging technologies for monitoring drug-resistant tuberculosis at the point-of-care. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014; 78: 105—17.
12. O'Grady J., Maeurer M., Mwaba P., Kapata N., Bates M., Hoelscher M. et al. New and improved diagnostics for detection of drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2011; 17(3): 134—41.
13. Wilson M. Recent advances in the laboratory detection of Mycobacterium tuberculosis complex and drug resistance. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 52(11): 1350—5.
14. Abuali M.M., Katariwala R., LaBombardi V.J. A comparison of the Sensititre® MycoTB panel and the agar proportion method for the susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 31(5): 835—9.
15. Hall L., Jude K.P., Clark S.L., Dionne K., Merson R., Boyer A. 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; 50(11): 3732—4.
16. Lee J., Armstrong D.T., Ssengooba W., Park J.A., Yu Y., Mumbowa F. et al. Sensititre MycoTB MIC plate for testing Mycobacterium tuberculosis susceptibility to first- and second — line drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(1): 11—8.
17. Mpagama S., Houpt E., Stroup S., Kumburu H., Gratz J., Kibiki G.S. et al. Application of quantitative second-line drug susceptibility at a multidrug-resistant tuberculosis hospital in Tanzania. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13: 432—41.
18. Nosova E.Yu., Krasnova M.A., Bukatina A.A., Gikalo M.B. Molecular-genetic investigation into laboratory diagnostics of tuberculosis and Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility testing. In: Litvinov V.I., Moroz A.M., eds. *Laboratory Researches of Tuberculosis [Laboratornye issledovaniya pri tuberkuleze]*. Moscow; 2013: 142—66. (in Russian)
19. Drobniowski F., Cooke M., Jordan J., Casali N., Mugwagwa T., Broda A. et al. Systematic review, meta-analysis and economic modelling of molecular diagnostic tests for antibiotic resistance in tuberculosis. *Health Technol. Assess.* 2015; 19(34): 1—188.
20. Kalokhe A., Shafiq M., Lee J.C., Ray S.M., Wang Y.F., Metchock B. et al. Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing. *Am. J. Med. Sci.* 2013; 345(2): 143—8.
21. Lin S., Desmond E. Molecular diagnosis of tuberculosis and drug resistance. *Clin. Lab. Med.* 2014; 34(2): 297—314.
22. Smith T., Wolff K., Nguyen L. Molecular biology of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 2013; 374: 53—80.

Received 17.08.15