

На правах рукописи

Дюжик Елена Сергеевна

ОПТИМИЗАЦИЯ ДЕТЕКЦИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS К ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ
ПРЕПАРАТАМ ВТОРОГО РЯДА (ЦИКЛОСЕРИНУ И ПАСК)

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Черноусова Лариса Николаевна

Официальные оппоненты:

Леви Диана Тимофеевна - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, управление противобактериальных медицинских иммунобиологических препаратов, главный эксперт.

Владимирский Михаил Александрович - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, лаборатория иммунологических исследований и молекулярной диагностики туберкулеза, заведующий лабораторией.

Ведущая организация: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 года в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Туберкулез многие годы остается одной из глобальных проблем здравоохранения мирового сообщества и занимает второе место среди причин смерти от инфекционных заболеваний в мире после вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Необходимо отметить, что туберкулез, вызванный чувствительными к противотуберкулезным препаратам микобактериями, излечивается в большинстве случаев, тогда как вызванный лекарственно-устойчивыми микобактериями требует особого отношения как в плане диагностики, так и по интенсивности, срокам и стоимости лечения. Подсчитано, что в среднем в 15 странах Евросоюза плюс Кипр, Мальта и Словения стоимость лечения лекарственно-чувствительных форм туберкулеза составляет €10282, тогда как затраты на лечение форм туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью составляют €57213 и €170744, соответственно (R.Dieletal., 2014).

В последние два десятилетия в Российской Федерации сохраняется напряженная эпидемиологическая ситуация по туберкулезу, а также продолжается рост лекарственно-устойчивого туберкулеза среди впервые выявленных и ранее леченных больных (O.S.Toungousovaetal., 2005; Y. Balabanovaetal., 2005; O.Б. Нечаева, 2016).

Адекватный результат лечения лекарственно-устойчивых форм туберкулеза может быть достигнут за счет введения в стандартные режимы химиотерапии антибактериальных препаратов из числа резервных лекарственных средств – циклосерина и *para*-аминосалициловой кислоты (ПАСК). При этом исход лечения во многом зависит от времени начала лечения: эффективность химиотерапии существенно повышается при назначении препаратов, определенных по результатам исследования чувствительности культур *M.tuberculosis*, в активную фазу химиотерапии (В.Ю. Мишин, 2003; WHO, 2008; И.А. Васильева и др., 2011; IUTLD, 2013; C.Langeetal., 2014).

В настоящее время ВОЗ рекомендованы критические концентрации почти для всех противотуберкулезных препаратов при определении лекарственной чувствительности на плотных и жидких питательных средах. Однако, чувствительность к циклосерину и ПАСК определяется только традиционным методом абсолютных концентраций на плотных питательных средах, что значительно удлиняет сроки получения клиницистами результатов анализа и коррекции схемы лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью препаратами второго ряда (WHO, 2012).

Необходимость совершенствования метода детекции лекарственной чувствительности к резервным противотуберкулезным препаратам определяет актуальность проведенного исследования. Установление критических концентраций для циклосерина и ПАСК позволит проводить ускоренное определение лекарственной чувствительности методом пропорций в жидкой среде на автоматизированном анализаторе учета роста микобактерий ВАСТЕС MGIT 960.

Степень разработанности темы исследования

Определение чувствительности *M.tuberculosis* к противотуберкулезным на плотных питательных средах широко применяется в РФ в клинико-диагностических лабораториях фтизиатрического профиля с момента появления первых противотуберкулезных препаратов, а критические концентрации для метода абсолютных концентраций на плотных питательных средах регламентированы в Приказе МЗ РФ №109 от 21 марта 2003 г. Внедрение в лабораторную практику системы ВАСТЕСMGIT 960, позволяющей существенно сократить сроки культуральной диагностики, потребовало разработки адекватных для данной системы критических

концентраций для противотуберкулезных препаратов. В результате мультицентровых исследований, проведенных по 3-этапному протоколу, рекомендованному Институтом по клиническим и лабораторным стандартам, США (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) при установлении критических концентраций (G.E.Pfyffer et al., 2011), были отработаны критические концентрации для 5-ти препаратов 1 ряда и 9-ти препаратов 2 ряда (G. E. Pfyffer et al., 1999; S. Rusch-Gerdes et al., 2006; C. Rodrigues et al., 2008; K.M. Kamet al., 2010; M. Sharma et al., 2011; H. Kim et al., 2013; WHO, 2012). Однако, для цикloserина и ПАСК критические концентрации для проведения теста лекарственной чувствительности методом пропорций в системе ВАСТЕСМГИТ 960 до сих пор не отработаны, несмотря на предпринятые рядом исследователей попытки (C. Rodrigues et al., 2008; M. Sharma et al., 2011; H. Kim et al., 2013).

Цель работы: Совершенствование ускоренного определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам второго ряда - цикloserину и ПАСК.

Задачи исследования:

1. Изучить чувствительность к противотуберкулезным препаратам методом абсолютных концентраций на плотной среде Левенштейна-Йенсена или методом пропорций в жидкой среде использованных в работе штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от пациентов из Владимирской области в 2010 - 2015 гг.

2. Создать рабочую коллекцию клинических изолятов *M.tuberculosis* с лекарственной устойчивостью/чувствительностью к цикloserину и ПАСК по результатам тестирования лекарственной чувствительности на плотной среде Левенштейна-Йенсена.

3. Определить минимальные ингибирующие концентрации цикloserина и ПАСК в жидкой среде *Middlebrook 7H9* на анализаторе ВАСТЕСМГИТ 960 у штаммов *M.tuberculosis* с лекарственной устойчивостью/чувствительностью к цикloserину и ПАСК, установленной по результатам теста лекарственной чувствительности на плотной среде Левенштейна-Йенсена.

4. Установить критические концентрации цикloserина и ПАСК для ускоренного тестирования устойчивости/чувствительности штаммов *M.tuberculosis* методом пропорций в жидкой среде *Middlebrook 7H9* на анализаторе ВАСТЕСМГИТ 960.

Научная новизна исследования

На основании проведенного исследования охарактеризован спектр лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам популяции современных штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных с хроническим течением туберкулеза и рецидивами во Владимирской области в 2010-2015 гг., который представлен 43 вариантами профилей резистентности. Шесть профилей (HRE, HRECap, HRECapKan, HRECapOfl, HRECapKanOfl и HRECapKanOflCsPas) были наиболее распространены и относились к категории множественной или широкой лекарственной устойчивости. При этом цикloserин и ПАСК входили в структуру только одного из этих профилей, представленного 8-ю препаратами, который встречался у 5,22% исследованных штаммов.

Получены данные о степени чувствительности к цикloserину и ПАСК (по определению минимальных ингибирующих концентраций в жидкой среде *Middlebrook 7H9*) современных штаммов *M.tuberculosis*, циркулирующих во Владимирской области. Показано, что диапазон минимальных ингибирующих концентраций для штаммов

M.tuberculosis, чувствительных к циклосерину, составлял 4-15 мкг/мл, устойчивых к циклосерину - 20-40 мкг/мл, чувствительных к ПАСК - 0,5-2 мкг/мл, устойчивых к ПАСК - от 4 и до более 40 мкг/мл.

Впервые на коллекции региональных штаммов *M.tuberculosis* с множественной или широкой лекарственной устойчивостью проанализировано сочетание чувствительности/устойчивости к препаратам резервного ряда и показано, что 84,48% штаммов были чувствительны к циклосерину и 84,08% штаммов чувствительны к ПАСК, что обосновывает перспективы применения этих антибиотиков для лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза.

Для проведения ускоренного теста лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к различным противотуберкулезным препаратам методом пропорций в жидкой среде Middlebrook 7H9 на ВАСТЕС MGIT 960 впервые разработаны критические концентрации циклосерина (15,0 мкг/мл) и ПАСК (2,0 мкг/мл), что будет способствовать ускорению получения результатов теста, по сравнению с традиционным методом абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена.

Показано, что критические концентрации циклосерина и ПАСК, используемые при определении лекарственной чувствительности на плотных и жидких питательных средах, отличаются. Установленные для жидкой среды *Middlebrook 7H9* критическая концентрация циклосерина (15 мкг/мл) была в 2 раза ниже и ПАСК (2 мкг/мл) в 2 раза выше, чем концентрации этих препаратов, применяемые при постановке тестов лекарственной чувствительности методом абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена (30 мкг/мл и 1,0 мкг/мл, соответственно). Учитывая, что метод пропорций является более точным для детекции устойчивости, полученные данные свидетельствуют о перспективности и целесообразности применения культивирования *M.tuberculosis* в жидкой питательной среде в системе ВАСТЕСMGIT 960 в практическом здравоохранении.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные о характере резистентности *M.tuberculosis* формируют подходы к пониманию эволюции возбудителя в развитии резистентности к противотуберкулезным препаратам второго ряда.

Результаты по спектру и уровню резистентности к циклосерину и ПАСК штаммов *M.tuberculosis* могут быть использованы в рамках эпидемиологического надзора для изучения нарастания резистентности штаммов *M.tuberculosis*, циркулирующих в регионе, и прогнозирования временных тенденций ее дальнейшего распространения.

Полученные в исследовании данные указывают на накопление в регионе бациллярного ядра хронических форм туберкулеза с широким спектром резистентности, что, в перспективе, может негативно отразиться на эпидемиологической ситуации по туберкулезу.

Разработанные методологические подходы для определения критических концентраций циклосерина и ПАСК для проведения тестов лекарственной чувствительности штаммов *M.tuberculosis* в системе ВАСТЕСMGIT 960 могут быть применены для определения критических концентраций других противотуберкулезных препаратов.

Разработка критических концентраций циклосерина и ПАСК расширила возможности ускоренного тестирования лекарственной чувствительности одновременно ко всему спектру противотуберкулезных препаратов второго ряда методом пропорций в

жидкой среде на анализаторе ВАСТЕСМГИТ 960, что значительно повышает эффективность лечения туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью за счет сокращения сроков тестирования чувствительности и начала адекватной химиотерапии.

Назначение схемы лечения согласно результатам тестов лекарственной чувствительности предотвращает развитие резистентности и распространение штаммов *M.tuberculosis* с множественной и широкой лекарственной устойчивостью, что особенно актуально в настоящее время.

Собрана рабочая коллекция клинических изолятов *M.tuberculosis* с различной чувствительностью к противотуберкулезным препаратам 1 и 2 ряда, в том числе к препаратам резервного ряда – циклосерину и ПАСК, которая может быть использована для изучения механизмов развития резистентности к этим препаратам, создания молекулярно-генетических тест-систем для диагностики устойчивого туберкулеза, а также тестирования противотуберкулезной активности вновь синтезированных лекарственных препаратов.

Данные, полученные в диссертационной работе, используются в курсе лекций по современным методам микробиологической диагностики в Учебном центре ФГБНУ "Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза" (акт о внедрении от 21.12.2016 г.), на кафедре фтизиатрии лечебного факультета ФГБОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Минздрава России (акт о внедрении от 13.03.2017 г.), на межфакультетской кафедре фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО "Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова" Минздрава России (акт о внедрении от 09.03.2017 г.). В отделе фтизиатрии и детско-подростковом отделе ФГБНУ "Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза" для повышения эффективности лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью за счет ускоренного тестирования лекарственной чувствительности к резервным препаратам.

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована исходя из современных методов научного познания и организована согласно поставленной цели, для достижения которой были сформированы подходы и назначены ориентиры в проведении исследования, выбраны средства и методы, поставлены задачи, определяющие наилучший результат. Анализ научной литературы, посвященный проблеме, проведен на основе формально-логических методов исследования. В работе использованы классические и современные микробиологические методы исследования.

Штаммы *M.tuberculosis*

Предметом данного исследования стали 230 культур *M.tuberculosis*, полученные в результате первичного посева патологического материала на плотные и жидкие питательные среды. Культуры были получены от 230 больных туберкулезом, преимущественно с подозрением на рецидив или с хроническим течением туберкулеза, ранее леченых пациентов, в том числе исследуемыми препаратами, находящихся в 2010-2015 годах на лечении в ГБУЗ Владимирской области "Областной противотуберкулезный диспансер" (г. Владимир) и в двух районных противотуберкулезных стационарах: ГБУЗ Владимирской области "Ковровский противотуберкулезный диспансер" (г. Ковров,) и ГБУЗ Владимирской области "Муромский противотуберкулезный диспансер" (г. Муром) - на данный момент единое учреждение ГБУЗ Владимирской области "Центр

специализированной фтизиопульмонологической помощи". Также материал для исследования поступал из противотуберкулезного отделения ГКУЗ Владимирской области "Областная психиатрическая больница №2" (п. Содышка), ГБУЗ Владимирской области "Патакинская областная противотуберкулезная больница" (с. Патакино) и детского отделения на базе ГБУЗ Владимирской области "Городская больница №2 г. Владимира" (г. Владимир).

Микробиологические методы

Для получения чистой культуры из диагностического материала использовали два метода – посев на плотные яичные питательные среды Левенштейна-Йенсена (Л-Й) и Финна-II и посев в жидкую среду Middlebrook 7H9 с последующей инкубацией в системе для автоматизированного учета роста микобактерий ВАСТЕС MGIT 960. Все работы осуществляли согласно Приказа МЗ РФ №109 от 21 марта 2003 г. и Руководства по работе с системой ВАСТЕСMGIT 960.

Определение лекарственной чувствительности исследованных штаммов *M.tuberculosis* к изониазиду, рифампицину, этамбутолу, офлоксацину, капреомицину, канамицину проводили или методом абсолютных концентраций на среде Л-Й (критические концентрации: изониазид - 1.0 мкг/мл, рифампицин - 40.0 мкг/мл, этамбутол - 2.0 мкг/мл, офлоксацин - 2.0 мкг/мл, капреомицин - 50.0 мкг/мл, канамицин - 30.0 мкг/мл) или модифицированным методом пропорций в системе ВАСТЕС MGIT 960 (критические концентрации: изониазид - 0.1, рифампицин - 1.0, этамбутол - 5.0, канамицин - 2.5, капреомицин - 2.5, офлоксацин - 2.0). Чувствительность к циклосерину и ПАСК для всех культур была определена методом абсолютных концентраций на среде Л-Й (критические концентрации: циклосерин - 30.0 мкг/мл и ПАСК - 1.0 мкг/мл).

Для проведения исследований *invitro* использовали фармакопейные субстанции **циклосерина** (Sigma-Aldrich, Китай) и **p-аминосалициловой кислоты** (Sigma-Aldrich, Китай).

Статистические методы

При обработке данных применяли методы описательной статистики. Все расчеты проведены с использованием программного пакета MS Office Excell.

Личный вклад автора в получение результатов

Сбор и анализ материалов специальной литературы, составление плана исследования, культуральные исследования, статистическая обработка и систематизация результатов работы были проведены лично автором. На основе анализа полученных лично данных автор сформулировала выводы и практические рекомендации.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Рабочая коллекция штаммов *M.tuberculosis* (n=230) включала штаммы с профилями лекарственной чувствительности с разным числом и сочетанием противотуберкулезных препаратов (7,39% чувствительных, 92,61% устойчивых к противотуберкулезным препаратам со спектром устойчивости от 1 до 8 противотуберкулезных препаратов); исследуемые четыре группы штаммов сформированы на основании анализа результатов тестов лекарственной чувствительности циклосерина и ПАСК на плотной среде Левенштейна-Йенсена: чувствительных к циклосерину (n=170), устойчивых к циклосерину (n=56); чувствительных к ПАСК (n=151) и устойчивых к ПАСК (n=73).

2. Минимальная ингибирующая концентрация, подавляющая рост 100% штаммов *M.tuberculosis* на жидкой среде Middlebrook 7H9, для штаммов, устойчивых по тестам лекарственной чувствительности на плотной среде к циклосерину, составила 40 мкг/мл;

чувствительных к циклосерину - 15 мкг/мл; устойчивых к ПАСК - более 40 мкг/мл; чувствительных к ПАСК - 2 мкг/мл.

3. Установлены критические концентрации циклосерина - 15.0 мкг/мл, ПАСК - 2.0 мкг/мл для ускоренного тестирования лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* методом пропорций в жидкой среде *Middlebrook 7H9* на анализаторе ВАСТЕСМГИТ 960.

Степень достоверности и апробация результатов

О достоверности результатов работы свидетельствует использование сертифицированных микробиологических методов исследования, характеризующихся высокой чувствительностью и специфичностью. Проведен достаточный объем исследований: работа выполнена с использованием 230 культур *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких и внелегочной локализации. Для выполнения задачи исследования - поиска критических концентраций циклосерина и ПАСК при культивировании в жидкой питательной среде *Middlebrook 7H9* на анализаторе ВАСТЕС МГИТ 960, был использован подход, утвержденный Институтом по клиническим и лабораторным стандартам (США).

Результаты исследований были представлены и обсуждены на Российской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Новые технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей» (Москва, 2012, 2013 и 2015); на XIX Форуме «Национальные дни лабораторной медицины России» (Москва, 2015); на секции микробиологии и иммунологии туберкулеза Московского отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (21 декабря 2015 г.), на еженедельной конференции научных сотрудников и врачей ЦНИИТ (20 июня 2016 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 4 статьи опубликованы в рецензируемых научных изданиях, 4 - в материалах конференций.

Структура и объем диссертации

Материалы диссертации изложены на 119 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 3 глав описания результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы. Библиографический указатель включает 136 источников литературы, из них 39 работ отечественных и 97 работ зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 12 рисунками и 18 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика лекарственной чувствительности штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных на территории Владимирской области в 2010-2015 гг.

Изучение лекарственной чувствительности 230-ти штаммов МБТ, выделенных от 230 больных с подозрением на рецидив или хроническое течение туберкулеза, ранее леченых пациентов, в том числе исследуемыми препаратами, показало, что устойчивость к изониазиду была выявлена у 211 (91,74%) штаммов, к рифампицину - у 203 (88,26%), к этионамиду - у 198 (86,09%), к капреомицину - у 131 (56,96%), к

канамицину - у 119 (51,74%), к офлоксацину – у 119 (51,74%). Устойчивость к циклосерину была у 56 (24,35%), к ПАСК - у 73 (31,74%) штаммов (рисунок 1).

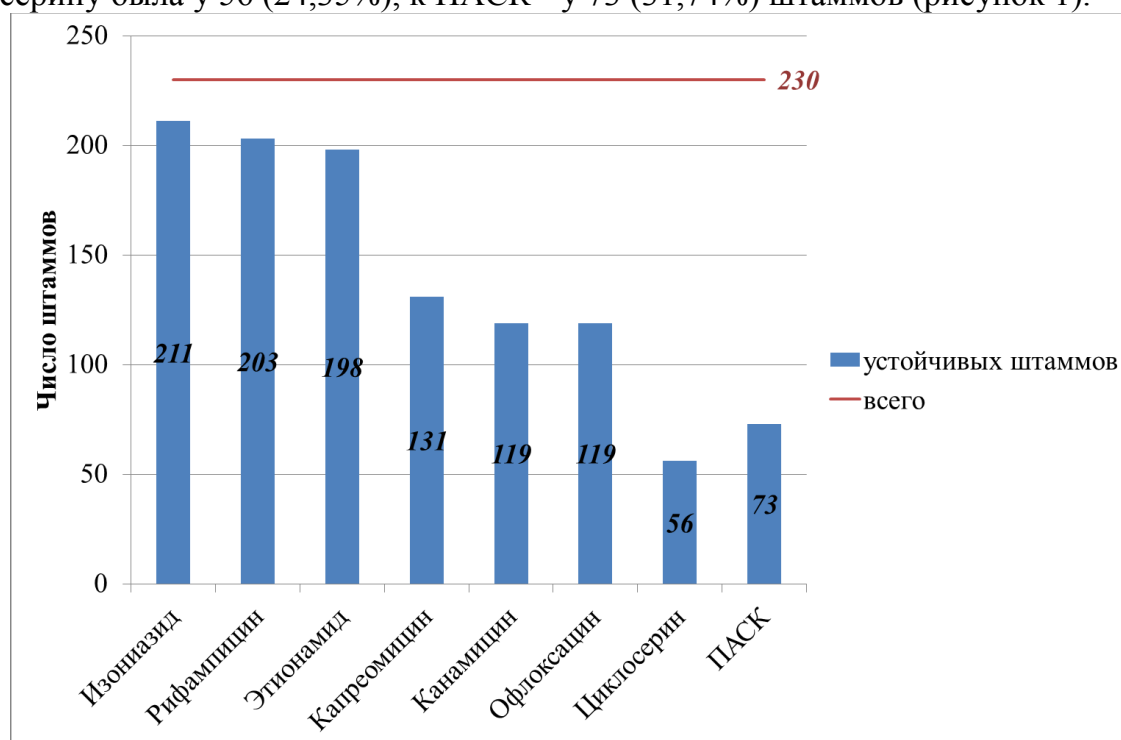


Рисунок 1 - Структура лекарственной устойчивости штаммов МБТ, выделенных от больных, ранее получавших лечение, включая рецидивы ТБ, из Владимирской области

Большинство штаммов характеризовалось М/ШЛУ - 202/230 (87,83%), однако, часть штаммов была чувствительна ко всем использованным в исследовании препаратам (H, R, E, Cap, Kan, OfI, Cs, Pas) - 17/230, 7,39%, два штамма были монорезистентными и 9 - полирезистентными с диапазоном профиля резистентности от 3 до 6 ПТП.

Всего было описано 43 варианта профилей резистентности изученных штаммов МБТ (таблица 1). В целом можно отметить, что устойчивость к циклосерину и/или ПАСК встречалась достаточно редко, по сравнению с остальными препаратами. Она была зарегистрирована не более, чем у 1/3 включенных в исследование штаммов (56/230, 24,35% - к циклосерину и 73/230, 31,74% - к ПАСК), что было достоверно ниже по сравнению с частотой устойчивости к остальным ПТП (от 51,74% штаммов, устойчивых к канамицину и офлоксацину, и до 91,74% штаммов, устойчивых к изониазиду). Этот факт дополнительно подчеркивает актуальность проведенного исследования, показывая важность ускоренной диагностики лекарственной чувствительности к циклосерину и ПАСК на фоне широкой распространенности в популяции штаммов МБТ с М/ШЛУ.

Для разработки критических концентраций (КК) штаммов важно было, чтобы в коллекцию культур входили штаммы с профилями лекарственной резистентности, включающими разное число и сочетание препаратов. Сформированная нами коллекция штаммов соответствовала этим требованиям: группа штаммов, чувствительных к циклосерину и/или ПАСК, включала в себя как чувствительные ко всем использованным в исследовании ПТП, так и штаммы, устойчивые к различным комбинациям ПТП (от 1 до 7-ми препаратов), в том числе с М/ШЛУ (84,48% штаммов, чувствительных к циклосерину, и 84,08% - чувствительных к ПАСК). Среди устойчивых к циклосерину и/или ПАСК штаммов преобладали штаммы с М/ШЛУ (98,21% штаммов, устойчивых к циклосерину, и 95,89% - устойчивых к ПАСК), как правило устойчивые, включая циклосерин и ПАСК, к 5

и более препаратам (83,93% штаммов, устойчивых к циклосерину и 97,26% - устойчивых к ПАСК).

Таблица 1 - Профили резистентности выделенных штаммов МБТ

Группа штаммов по характеру чувствительности к ПТП	Число ПТП, входящих в профиль резистентности	Профиль резистентности	Число штаммов		
			абс.	%	
Чувствительные	-	-	17	7,39	
Монорезистентные	1	H	1	0,43	
		Kan	1	0,43	
Полирезистентные	3	HOflPas	1	0,43	
	4	HCapKanOfI	2	0,87	
		HECapKan	3	1,30	
	5	HECapKanOfI	1	0,43	
	6	HECapKanOfIPas	1	0,43	
		HEKanOfICsPas	1	0,43	
МЛУ	3	HRE	15	6,52	
	4	HRECap	12	5,22	
		HREKan	11	4,78	
		HREOfI	7	3,04	
		HRCapCs	1	0,43	
		HRECs	8	3,48	
		HREPas	1	0,43	
	5	HRECapKan	20	8,70	
		HRECapCs	4	1,74	
		HREKanCs	2	0,87	
		HRCapKanPas	2	0,87	
		HREKanPas	3	1,30	
		HREOfIPas	10	4,35	
	6	HRECsPas	1	0,43	
		HRECapKanCs	1	0,43	
		HRECapKanPas	4	1,74	
		HRECapCsPas	1	0,43	
	7	HREKanCsPas	1	0,43	
		HRECapKanCsPas	2	0,87	
		ШЛУ	4	HRKanOfI	1
5			HRECapOfI	13	5,65
	HREKanOfI		8	3,48	
	HRCapOfIPas		1	0,43	
	HRKanOfIPas		3	1,30	
6	HRECapKanOfI		14	6,09	
	HRECapOfICs		5	2,17	
	HREKanOfICs		3	1,30	
	HRECapOfIPas	8	3,48		
	HREKanOfIPas	3	1,30		
	HRKanOfICsPas	1	0,43		
7	HRECapKanOfICs	7	3,04		
	HRECapKanOfIPas	11	4,78		
	HRCapKanOfICsPas	1	0,43		
	HRECapOfICsPas	5	2,17		
8	HRECapKanOfICsPas	12	5,22		
			Всего	230	

Определение МИК циклосерина и ПАСК в жидкой среде Middlebrook 7H9 на анализаторе ВАСТЕСМГИТ 960

Определение чувствительности отобранных штаммов МБТ проводили к 8-ми концентрациям циклосерина (4.0; 8.0; 10.0; 15.0; 20.0; 30.0; 40.0; 50.0 мкг/мл) и 7-ми концентрациям ПАСК (0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 8.0; 20.0; 40.0 мкг/мл) на жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 в системе ВАСТЕСМГИТ 960.

Отобранные культуры *M.tuberculosis* разделили на группы по результатам ТЛЧ методом абсолютных концентраций на плотной среде (таблица 2).

Таблица 2 - Характеристика групп штаммов МБТ, отобранных для определения КК циклосерина и ПАСК на жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 в системе ВАСТЕСМГИТ 960

Препарат	Чувствительные	Устойчивые	Всего
Циклосерин	170	56	226
ПАСК	151	73	224

В результате исследования было показано, что из 170 чувствительных к циклосерину по результатам определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) на среде Левенштейна-Йенсена штаммов МБТ к 4 мкг/мл было чувствительно 7 (4,12%) штаммов, к 8 мкг/мл - 44 штамма (25,88%), к 10 мкг/мл - 114 (67,06%) штаммов, к 15 мкг/мл и выше - 170 (100%) штаммов. Минимальной концентрацией, подавляющей рост не менее 50% чувствительных штаммов (МИК(50)), была 10 мкг/мл, для 100% штаммов - МИК(100) - 15 мкг/мл (рисунок 2).

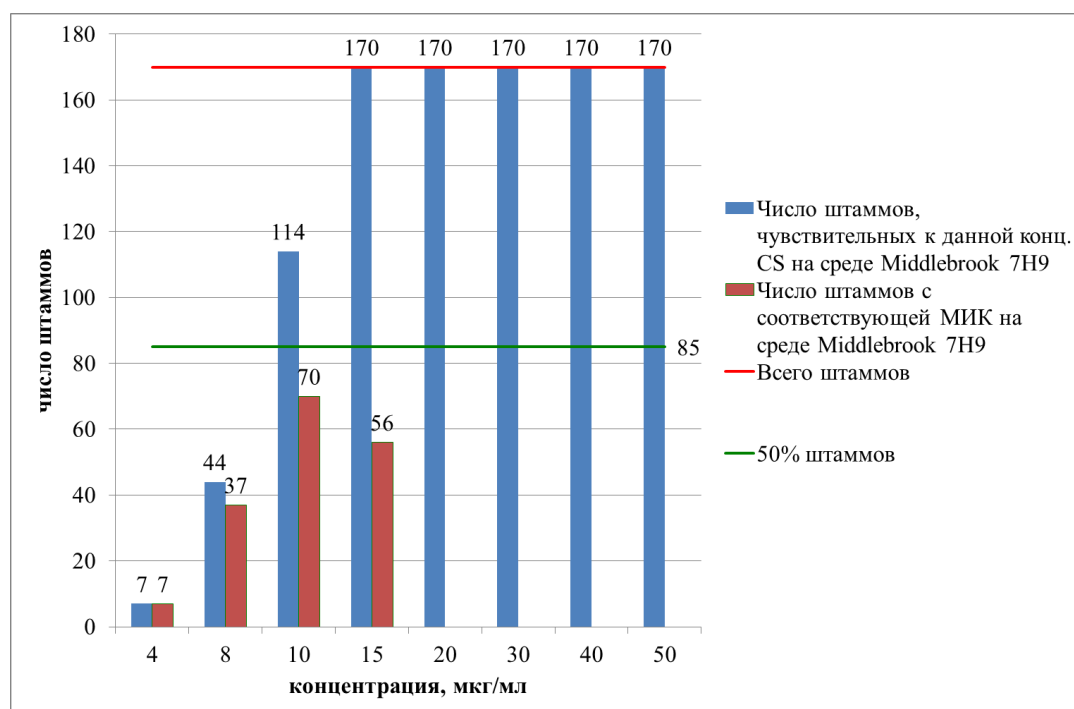


Рисунок 2 - Лекарственная чувствительность к тестируемым концентрациям циклосерина и МИК циклосерина для штаммов МБТ, чувствительных к циклосерину по данным референс-метода

Из 56 устойчивых к циклосерину по результатам определения ЛЧ на среде Левенштейна-Йенсена штаммов МБТ к 20 мкг/мл было чувствительно 14 (25,00%) штаммов, к 30 мкг/мл - 45 штаммов (80,36%), к 40 мкг/мл и 50 мкг/мл - 56 (100%) штаммов. МИК(50) для штаммов, устойчивых к циклосерину по результатам ТЛЧ на ППС была 30 мкг/мл, МИК(100) - 40 мкг/мл (рисунок 3).

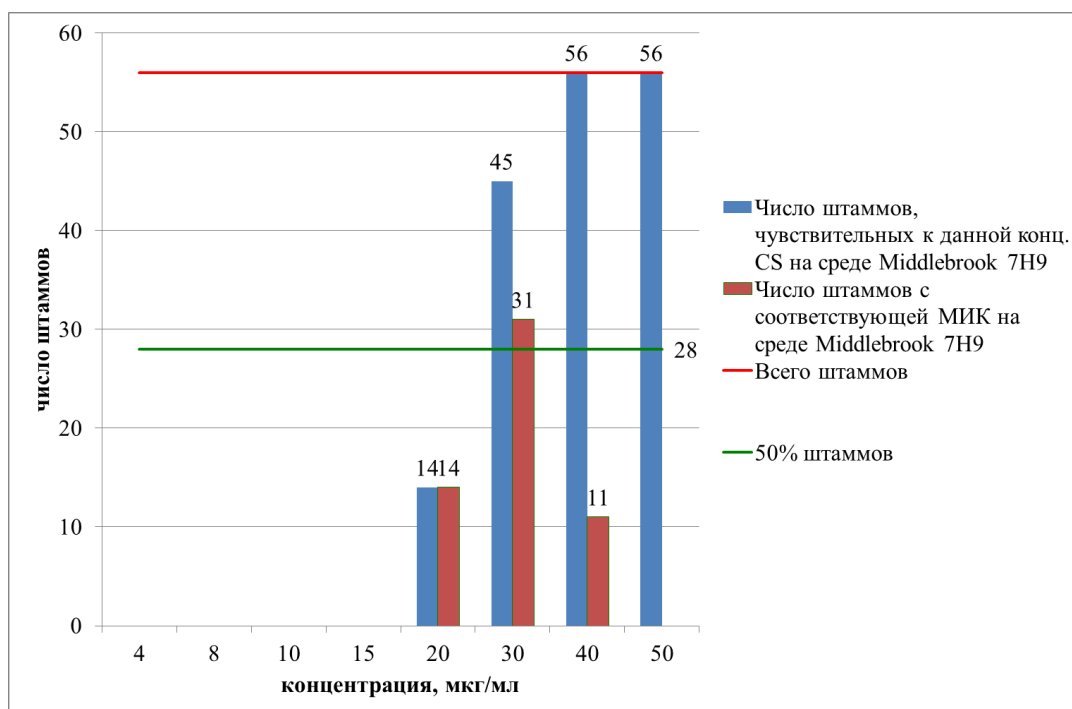


Рисунок 3 - Лекарственная чувствительность к тестируемым концентрациям цикloserина и МИК цикloserина для исследуемых штаммов МБТ, устойчивых к цикloserину по данным референс-метода

Из 151 чувствительного к ПАСК по результатам определения ЛЧ на среде Левенштейна-Йенсена штамма МБТ к 0,5 мкг/мл было чувствительно 80 (52,98%) штаммов, к 1 мкг/мл - 129 штамма (85,43%), к 2 мкг/мл и выше - 151 (100%) штаммов. МИК(50) для штаммов, чувствительных к ПАСК по результатам ТЛЧ на ППС, была 0,5 мкг/мл, МИК(100) - 2 мкг/мл (рисунок 4).

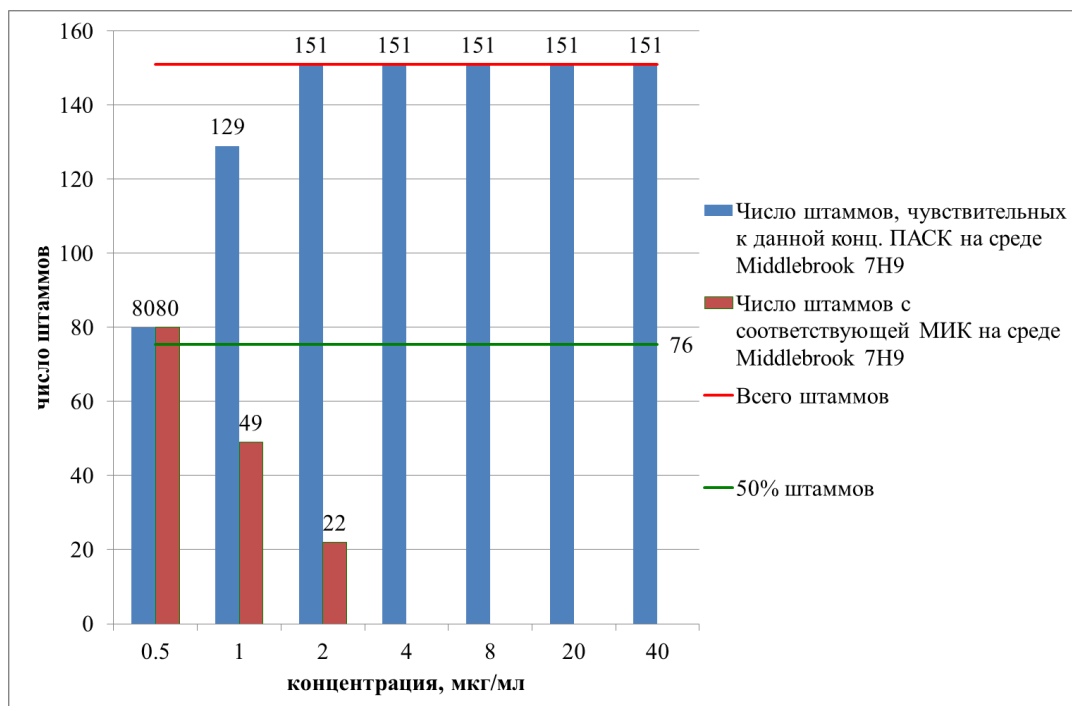


Рисунок 4 - Лекарственная чувствительность к тестируемым концентрациям ПАСК и МИК ПАСК для исследуемых штаммов МБТ, чувствительных к ПАСК по данным референс-метода

Из 73 устойчивых к ПАСК по результатам определения ЛЧ на среде Левенштейна-Йенсена штаммов МБТ к 4 мкг/мл было чувствительно 8 (10,96%) штаммов, к 8 мкг/мл - 20 штаммов (27,40%), к 20 мкг/мл - 35 штаммов (47,95%), к 40 мкг/мл - 45 (61,64%) штаммов. МИК(50) для штаммов, устойчивых к ПАСК по результатам ТЛЧ на ППС, была 40 мкг/мл, МИК(100)- более 40 мкг/мл (рисунок 5).

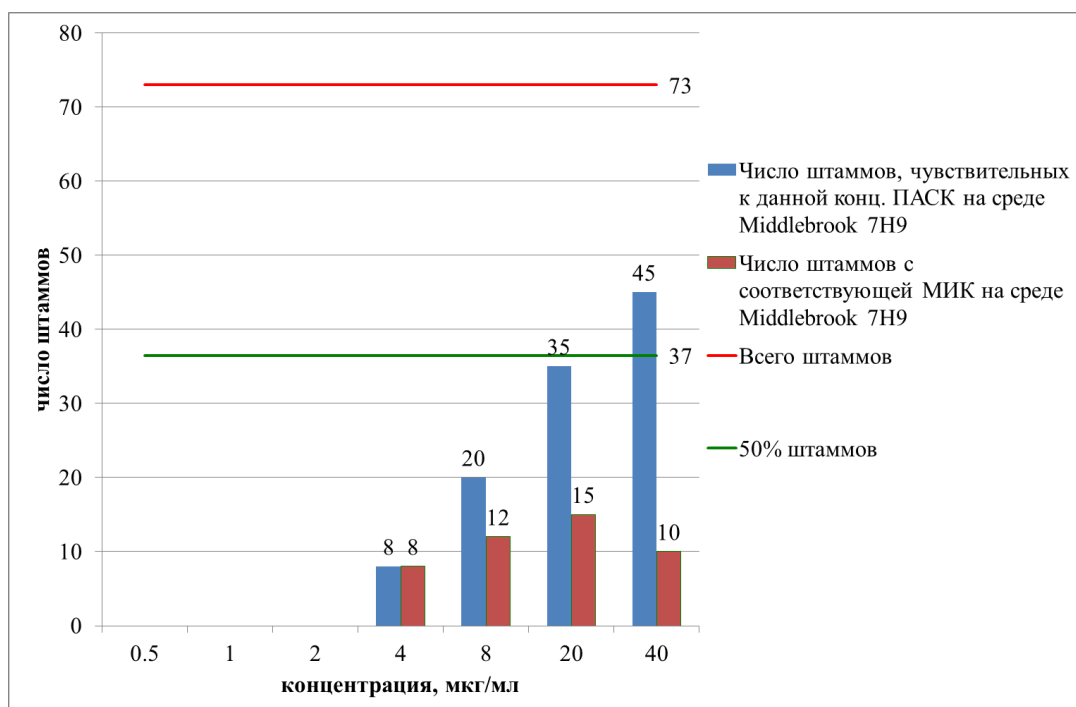


Рисунок 5 - Лекарственная чувствительность к тестируемым концентрациям ПАСК и МИК ПАСК для исследуемых штаммов МБТ, устойчивых к ПАСК по данным референс-метода

Определение критических концентраций цикloserина и ПАСК для тестирования ЛЧ МБТ методом пропорций при культивировании в жидкой среде *Middlebrook 7H9* на анализаторе ВАСТЕС MGIT 960

Критические концентрации цикloserина и ПАСК для МБТ при культивировании в жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 на анализаторе ВАСТЕС MGIT 960 устанавливали на основе анализа МИК для каждого препарата, исходя из подхода, предложенного Институтом по клиническим и лабораторным стандартам (США), согласно которому, критической концентрацией считается та концентрация препарата, которая подавляет рост более 95% от всех чувствительных штаммов *M.tuberculosis*, и не влияет на рост более 95% от всех устойчивых штаммов *M.tuberculosis* (G.E.Pfiffer et al., 2011).

Определение критической концентрации цикloserина. Сопоставление результатов определения МИК цикloserина в жидкой среде Middlebrook на анализаторе ВАСТЕС MGIT 960 в отношении МБТ, чувствительных и устойчивых к цикloserину по результатам ТЛЧ на ППС, представлено в таблице 3.

Так, в группе чувствительных к цикloserину штаммов критерию "концентрация, которая подавляет рост более 95% от всех чувствительных штаммов" соответствовали концентрации цикloserина 15 мкг/мл, 20 мкг/мл, 30 мкг/мл, 40 мкг/мл и 50 мкг/мл. В группе штаммов, устойчивых к цикloserину, критерию концентрации, которая "не влияет на рост более 95% от всех устойчивых штаммов" соответствовали концентрации 4 мкг/мл, 8 мкг/мл, 10 мкг/мл и 15 мкг/мл. Таким образом, концентрацией,

соответствующей обоим критериям, определяющим критическую концентрацию, была 15 мкг/мл (рисунок 6).

Таблица 3 - Сопоставление чувствительности/устойчивости к различным концентрациям циклосерина в жидкой среде *Middlebrook 7H9* на анализаторе ВАСТЕС MGIT 960 штаммов МБТ с опозитной чувствительностью к циклосерину по данным ТЛЧ на ППС

Результат определения ЛЧ к Cs на ППС		Концентрация циклосерина (мкг/мл)							
		4.0	8.0	10.0	15	20.0	30.0	40.0	50.0
Чувствительные	Число штаммов, чувствительных к данной концентрации								
	абс.	7	44	114	170	170	170	170	170
	%	4,12	25,88	67,06	100	100	100	100	100
Устойчивые	Число штаммов, устойчивых к данной концентрации								
	абс.	56	56	56	56	42	11	0	0
	%	100	100	100	100	75,00	19,64	0	0

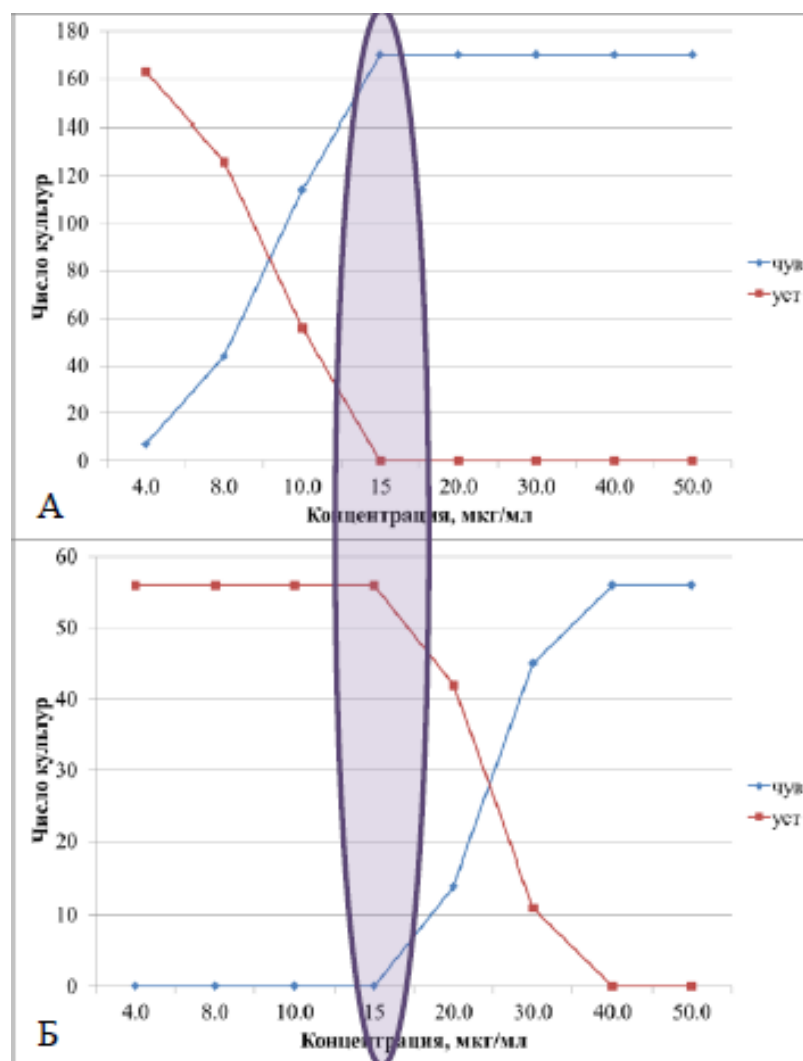


Рисунок 6 - Определение критической концентрации циклосерина.

Примечание: А. Культуры МБТ, чувствительные к циклосерину по данным ТЛЧ на ППС.

Б. Культуры МБТ, устойчивые к циклосерину по данным ТЛЧ на ППС.

чув - чувствительные к данной концентрации препарата;

уст - устойчивые к данной концентрации препарата

Определение критической концентрации ПАСК. Сопоставление результатов определения МИК ПАСК на жидкой среде Middlebrook на анализаторе ВАСТЕС MGIT 960 в отношении МБТ, чувствительных и устойчивых к ПАСК по результатам ТЛЧ на ППС, представлено в таблице 4.

Таблица 4 - Сопоставление чувствительности/устойчивости к различным концентрациям ПАСК в жидкой среде *Middlebrook 7H9* на анализаторе ВАСТЕС MGIT 960 штаммов МБТ с оппозитной чувствительностью к ПАСК по данным ТЛЧ на ППС

Результат определения ЛЧ к ПАСК на ППС		Концентрация ПАСК (мкг/мл)							
		0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	20.0	40.0	>40
Чувствительные		Число штаммов, чувствительных к данной концентрации							
	абс.	80	129	151	151	151	151	151	151
	%	52,98	85,43	100	100	100	100	100	100
Устойчивые		Число штаммов, устойчивых к данной концентрации							
	абс.	73	73	73	65	53	38	28	0
	%	100	100	100	89,04	72,60	52,05	38,36	0

Так, в группе чувствительных к ПАСК штаммов критерию "концентрация, которая подавляет рост более 95% от всех чувствительных штаммов" соответствовали концентрации ПАСК 2 мкг/мл, 4 мкг/мл, 8 мкг/мл, 20 мкг/мл и 40 мкг/мл. В группе штаммов, устойчивых к ПАСК, критерию концентрации, которая "не влияет на рост более 95% от всех устойчивых штаммов" соответствовали концентрации 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл и 2 мкг/мл. Таким образом, концентрацией, соответствующей обоим критериям, определяющим критическую концентрацию, для ПАСК была 2 мкг/мл (рисунок 7).

Следует отметить, что результаты, касающиеся критической концентрации циклосерина для определения ЛЧ МБТ на жидкой питательной среде *Middlebrook 7H9* в системе ВАСТЕС MGIT 960, ранее никем получены не были, несмотря на то, что подобные попытки предпринимались.

Полученная нами критическая концентрация ПАСК для определения ЛЧ МБТ на жидкой питательной среде *Middlebrook 7H9* в системе ВАСТЕС MGIT 960 совпадает с результатами, полученными Н. Kimetal. (2013). В исследованиях, проведенных С. Rodriguesetal. (2008) и М. Sharmaetal. (2011) критической концентрацией ПАСК была признана 4 мкг/мл. Согласно полученным нами результатам, ПАСК в этой концентрации действительно подавлял рост всех чувствительных штаммов, но к этой концентрации было устойчиво лишь 89,04% устойчивых к ПАСК штаммов, что не соответствует критериям Института по клиническим и лабораторным стандартам (США), согласно которым доля таких штаммов должна превышать 95%. В работе К.М. Kametal. (2010) критической концентрацией ПАСК была признана 0,5-1 мкг/мл. По нашим данным, в этой концентрации ПАСК подавлял рост менее 95% чувствительных штаммов МБТ, что также не соответствовало критериям Института по клиническим и лабораторным стандартам (США). Описанные разногласия можно объяснить особенностями популяции МБТ, характерной для данного географического региона.

В целом, полученные в исследовании результаты показывают, что циклосерин и ПАСК являются препаратами, к которым чувствительно около 70% штаммов с М/ШЛУ, в том числе устойчивых к 5-ти и более ПТП. Установление критических концентраций этих препаратов для определения ЛЧ МБТ на жидкой питательной среде *Middlebrook 7H9* в системе ВАСТЕС MGIT 960 позволит сократить время получения результатов ТЛЧ и своевременно корректировать курс химиотерапии.

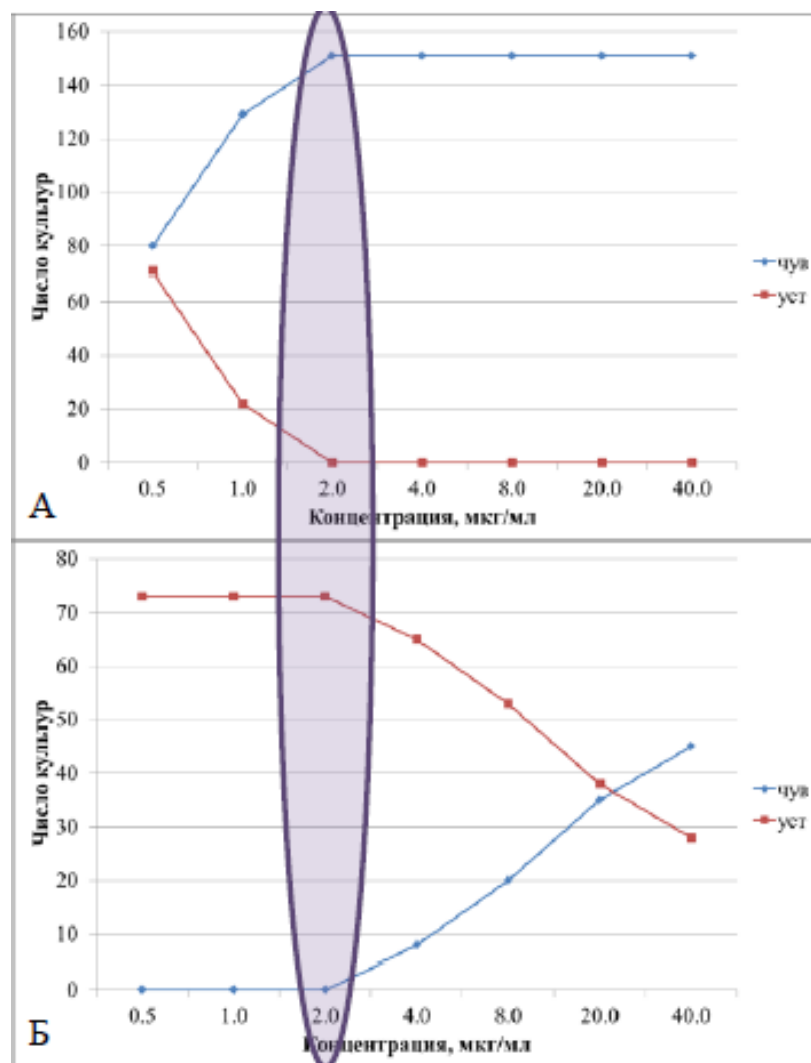


Рисунок 7 -Определение критической концентрации ПАСК

Примечание: А. Культуры МБТ, чувствительные к ПАСК по данным ТЛЧ на ППС.

Б. Культуры МБТ, устойчивые к ПАСК по данным ТЛЧ на ППС.

чув - чувствительные к данной концентрации препарата;

уст - устойчивые к данной концентрации препарата.

ВЫВОДЫ

1. Показано разнообразие чувствительности к противотуберкулезным препаратам 1 и 2 ряда (изониазиду, рифампицину, этамбутолу, капреомицину, канамицину, офлоксацину, циклосерину, ПАСК) рабочей коллекции штаммов *M.tuberculosis*, включающей 7,39% штаммов *M.tuberculosis*, чувствительных ко всем противотуберкулезным препаратам, 0,9% монорезистентных штаммов, 3,91% - полирезистентных с устойчивостью к 3 - 6 противотуберкулезным препаратам и 87,83% - с множественной или широкой лекарственной устойчивостью.

2. Анализ сочетания лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам штаммов *M.tuberculosis* исследуемых групп показал, что из 170 штаммов, чувствительных к циклосерину, множественной/широкой лекарственной устойчивостью обладали 84,48% штаммов, из 151 чувствительного к ПАСК штаммов - 84,08%, что подчеркивает важную роль данных препаратов как резервных в лечении устойчивых форм туберкулеза. Выявление устойчивости *M.tuberculosis* к циклосерину и ПАСК служит индикатором развития множественной лекарственной устойчивости, о чем свидетельствует тот факт, из 56 устойчивых к циклосерину штаммов - 98,21%, а из 73 устойчивых к ПАСК штаммов - 95,89% имели множественную лекарственную устойчивость.

3. Показана вариабельность степени чувствительности/устойчивости к циклосерину и ПАСК штаммов *M.tuberculosis* по результатам определения минимальных ингибирующих концентраций в жидкой среде *Middlebrook 7H9*: диапазон минимальных ингибирующих концентраций для штаммов *M.tuberculosis*, чувствительных к циклосерину, составлял 4-15 мкг/мл, устойчивых к циклосерину - 20-40 мкг/мл, чувствительных к ПАСК - 0,5-2 мкг/мл, устойчивых к ПАСК - от 4 и до более 40 мкг/мл.

4. Сопоставление результатов определения МИК циклосерина/ПАСК в жидкой среде *Middlebrook* на анализаторе ВАСТЕС MGIT 960 в отношении штаммов *M.tuberculosis*, чувствительных и устойчивых к циклосерину/ПАСК по результатам теста лекарственной чувствительности на плотной питательной среде, позволило установить критическую концентрацию циклосерина/ПАСК для определения лекарственной чувствительности методом пропорций в жидкой среде *Middlebrook 7H9* на ВАСТЕС MGIT 960: для циклосерина равную 15 мкг/мл, для ПАСК равную 2,0 мкг/мл.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При определении лекарственной чувствительности к циклосерину и ПАСК рекомендуется учитывать метод тестирования и культуральную среду, с использованием которой проводится исследование.

2. Для обеспечения адекватных результатов тестов лекарственной чувствительности к циклосерину и ПАСК необходимо использовать однородную суспензию клеток *M.tuberculosis*.

3. Для ускорения и стандартизации получения результатов лекарственной чувствительности к циклосерину и ПАСК целесообразно проведение тестов лекарственной чувствительности в системе ВАСТЕСMGIT 960 с разработанными в

диссертационном исследовании критическими концентрациями: 2 мкг/мл для ПАСК, 15 мкг/мл - для циклосерина.

4. Рекомендуется использовать отработанные критические концентрации циклосерина и ПАСК для определения лекарственной чувствительности штаммов *M.tuberculosis* с целью мониторинга устойчивости штаммов *M.tuberculosis* в регионе.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Планируется дальнейшее проведение ускоренной диагностики лекарственной чувствительности к циклосерину и ПАСК на базе ГБУЗ Владимирской области "Центр специализированной фтизиопульмонологической помощи" для мониторинга эпидемиологической ситуации по туберкулезу и для ускоренного назначения индивидуализированных схем химиотерапии больным с лекарственно-устойчивым туберкулезом.

2. На базе созданной рабочей коллекции штаммов *M.tuberculosis* возможно изучение механизмов развития лекарственной резистентности к циклосерину и ПАСК. Полученная информация послужит основой для создания молекулярно-генетических тест-систем детекции лекарственной устойчивости.

3. Использование рабочей коллекции штаммов *M.tuberculosis* для тестирования разрабатываемых препаратов с предполагаемой противотуберкулезной активностью.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Дюжик, Е.С.** Сравнение результатов определения лекарственной чувствительности клинических изолятов *M.tuberculosis* к препаратам второго ряда на плотных и жидких питательных средах / **Е.С. Дюжик** // Материалы 11-ой ежегодной Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием "Современные инновационные технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей", 23 марта. - Москва, 2012. - С. 34-36.

2. **Дюжик, Е.С.** Ускоренные методы лабораторной диагностики туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью во Владимирской области / **Е.С. Дюжик** // Материалы 12-ой ежегодной Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием "Современные инновационные технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей", 22 марта. - Москва, 2013. - С. 24-26.

3. **Дюжик, Е.С.** Лекарственная чувствительность *M.tuberculosis* во Владимирской области в 2012 году / **Е.С. Дюжик** // Фтизиатрия и пульмонология. - 2013. - №2(7). - С. 7.

4. **Дюжик, Е.С.** Определение критической концентрации препарата второго ряда циклосерина для постановки теста лекарственной чувствительности в жидкой среде Миддлбрук 7Н9 / **Е.С. Дюжик, Т.Г. Смирнова** // Материалы 14-ой ежегодной Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием "Современные инновационные технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей", 20 марта. - Москва, 2015. - С. 90-92.

5. **Дюжик, Е.С.** Критическая концентрация циклосерина для теста лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* в жидкой среде на Bactec MGIT 960 / **Е.С.**

Дюжик, Т.Г. Смирнова, И.В. Радюкина // Туберкулез и болезни легких. - 2015. - № 5. - С. 71-80.

6. **Дюжик, Е.С.** Лекарственная устойчивость штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких во Владимирской области в 2013 году / **Е.С. Дюжик, Н.В. Каунетис, Т.Г. Смирнова, Е.Е. Ларионова, Г.В. Волченков** // Туберкулез и болезни легких. - 2015. - № 10. - С. 36-41.

7. **Дюжик, Е.С.** Постановка теста лекарственной чувствительности к ПАСК и циклосерину на жидких средах: поиск критических концентраций / **Е.С. Дюжик, Т.Г. Смирнова, Е.Е. Ларионова, Л.Н. Черноусова** // Материалы международной научной конференции «Вопросы фундаментальной и прикладной науки», 29-30 июня. - Москва, 2015. - С. 266-275.

8. Севастьянова, Э.В. Роль мероприятий инфекционного контроля в обеспечении достоверности результатов лабораторных исследований // Э.В. Севастьянова, Е.Е. Ларионова, Т.Г. Смирнова, **Е.С. Дюжик, Г.В. Волченков, Л.Н. Черноусова** // Туберкулез и болезни легких. - 2015. - № 5. - С. 167-170.

9. **Дюжик, Е.С.** Определение критической концентрации препаратов второго ряда (циклосерина и ПАСК), для постановки теста лекарственной чувствительности в жидкой среде Middlebrook 7H9 / **Е.С. Дюжик, Н.В. Каунетис, Т.Г. Смирнова, Е.Е. Ларионова, Г.В. Волченков, Л.Н. Черноусова** // Туберкулез и болезни легких. - 2016. - №1. - С. 28-33.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КК - критические концентрации

Л-Й - Левенштейна-Йенсена

ЛЧ - лекарственная чувствительность

МБТ - микобактерии туберкулеза, *Mycobacterium tuberculosis*

МИК - минимальная ингибирующая концентрация

МИК(50) - минимальная концентрация, ингибирующая рост не менее 50% штаммов

МИК(100) - минимальная концентрация, ингибирующая рост 100% штаммов

МЛУ - множественная лекарственная устойчивость - устойчивость, как минимум, к изониазиду и рифампицину (двум основным лекарственным препаратам, применяемым в лечении туберкулеза)

ПАСК - пара-аминосалициловая кислота

ППС - плотная(ые) питательная(ые) среда(ы)

ПТП - противотуберкулезный(ые) препарат(ы)

ТЛЧ - тест(ы) лекарственной чувствительности

ШЛУ - широкая лекарственная устойчивость - сочетанная устойчивость *M.tuberculosis* к изониазиду, рифампицину, любому препарату из группы фторхинолонов и к одному из группы инъекционных препаратов: канамицину и/или амикацину и/или капреомицину, независимо от наличия устойчивости к другим противотуберкулезным препаратам

Сар - капреомицин

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute - Институт по клиническим и лабораторным стандартам, США

Cs - циклосерин

E - этамбутол

H - изониазид

Kan - канамицин

MGIT - MycobacteriaGrowthIndicatorTube - индикаторная пробирка для выращивания микобактерий

OfI - офлоксацин

Pas - ПАСК, *para*-аминосалициловая кислота

R - рифампицин