

мия при диروفилариозе человека, вызванном *Dirofilaria repens* Raillie et Henry, 1911. Описание случая. *Медицинская паразитология*. 2013; 2: 3—7.

12. Бронштейн А.М., Малышев Н.А., Лучшев В.И. и др. Первый аутохтонный случай диروفилариоза лёгких в России. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2011; 3: 50—3.

REFERENCES

1. Bronshtein A.M., Supryaga V.G., Stavrovskii B.I. et al. Human dirofilariasis in the Moscow region. *Meditinskaya Parasitologiya*. 2003; (3): 51—6. (in Russian)
2. Sergiev V.P., Supryaga V.G., Bronshtein A.M. et al. Results of studies of human dirofilariasis in Russia. *Meditinskaya Parasitologiya*. 2014; (3): 3—9. (in Russian)
3. Sergiev V.P., Supryaga V.G., Morozov E.N., Zhukova L.A. Human dirofilariasis: diagnosis and the pattern of pathogen-host relations. *Meditinskaya Parasitologiya*. 2009; (3): 3—6. (in Russian)
4. Genchi C., Mortarino M., Rinaldi L. et al. Changing climate and changing vector-borne disease distribution: the example of *Dirofilaria* in Europe. *Veterinary Parasitology*. 2011; 176(4): 295—9.
5. Pampiglione S., Rivasi F. Human dirofilariasis due to *Dirofilaria (Nochtiella) repens*: an update of world literature from 1995—2000. *Parazitologiya*. 2000; 42: 231—54.
6. Bronstein A.M., Malyshev N.A., Zharov S.N. et al. The first case of a long mikrofilariemia due to *Dirofilaria repens* and the first experi-

- ence of a combine therapy. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2013; 3: 47—52. (in Russian)
7. Bronstein A.M., Fedyanina L.V., Malyshev N.A. et al. The human dirofilariasis caused by *Dirofilaria (Nochtiella) repens*: an migrating helminthiasis of a skin and entera: new data on «old» disease. Analysis of own observations and literature review. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2016; 3. (in Russian)
 8. Arakelyan R.S. *Epidemiology — epizootology features of the Dirofilariasis in the Astrakhan region* [Epidemiologo-epizootologicheskie osobennosti Dirofilariasis na territorii Astrakhanskoy oblasti]. Diss. Moscow, 2007. (in Russian)
 9. Morozov E.N., Supryaga V.G., Rakova V.M. et al. Human dirofilariasis: clinic — diagnostic signs and diagnostic methods. *Meditinskaya Parazitologiya*. 2014; 2: 13—7. (in Russian)
 10. Fedyanina L.V., Maximova M.S., Tikhonova D.V. et al. Clinical case of a dirofilariasis. *Meditinskaya Parasitologiya*. 2016; 4: 52—4. (in Russian)
 11. Fedyanina L.V., Shatova S.M., Rakova V.M. et al. Mikrofilariemia on the human dirofilariasis, due to *Dirofilaria repens* (Railliet et Henry, 1911). The cases description. *Meditinskaya parazitologiya*. 2013; 2: 3—7.
 12. Bronstein A.M., Malyshev N.A., Luchshev V.I. et al. The first autochthonny case of the human pulmonary dirofilariasis in Russia. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2011; 3: 50—3. (in Russian)
 13. Fedyanina L.V. Two interesting cases of the human dirofilariasis. *Meditinskaya parazitologiya*. 2010; 2: 43—4. (in Russian)

Поступила 22.06.17

Принята к печати 29.06.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.281.03:616-002.5].015.8.076.7

Смирнова Н.С., Шипина Л.К., Лапенкова М.Б., Владимирский М.А.

ПРИМЕНЕНИЕ ЛИТИЧЕСКОГО МИКОБАКТЕРИОФАГА D29 ДЛЯ УСКОРЕННОГО ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА К ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ПРЕПАРАТАМ

ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», НИИ фтизиопульмонологии, Минздрава РФ, 127994, Москва

В условиях широкого распространения лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ) необходимость ускоренных, в том числе фенотипических, методов определения чувствительности микобактерий к антимикробным химиотерапевтическим препаратам в клинических образцах является актуальным вопросом. Представлены результаты применения ускоренного фенотипического метода определения чувствительности к антимикробным химиотерапевтическим препаратам клинических штаммов МБТ на основе применения литического микобактериофага D29. Принцип метода состоит в оценке размножения микобактериофага в клетках МБТ в зависимости от ингибирования метаболизма растущих микобактерий в присутствии чувствительных к ним антибактериальных препаратов. Размножение микобактериофага оценивается посредством количественного анализа ДНК фага в полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). В работе использованы 102 клинических штамма МБТ, полученные после первичного культивирования или рекультивирования в пробирках системы MGIT (Bactec). После получения положительных результатов роста МБТ образцы инкубировали в течение 48 ч в CO₂-инкубаторе в присутствии критических концентраций 10 широко употребляемых при лечении туберкулеза лекарственных субстанций в жидкой питательной среде Миддлбрук 7H9, обогащенной компонентами OADC, в формате 24-луночного культурального планшета с объемом питательной среды 1 мл на лунку, после чего в лунки планшета вносили $2 \cdot 10^3$ плакообразующих единиц микобактериофага D29. Через 24 ч проводилось количественное определение ДНК фага с помощью ПЦР-РВ с использованием реагентов фаг D29, ООО «Синтол». Увеличение порогового уровня флюоресценции C_t более чем на 2 цикла в пробах с антибиотиком в сравнении с контролем свидетельствует о чувствительности исследуемого штамма МБТ к антибиотику. При сравнительном исследовании с посевом на питательную среду Левентштейна - Йенсена уровень совпадений полученных результатов составил 91%. При сравнительном исследовании с тест-системой Bactec ограниченного числа штаммов с определением чувствительности для 10 препаратов уровень совпадений результатов — 96%. Подтверждены данные об обратной зависимости величины ΔC_t и минимальной ингибирующей концентрации препарата. Отмечена предполагаемая высокая эффективность возможного набора реагентов на основе приведенного метода по критерию цена/качество.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза; лекарственная чувствительность; микобактериофаги.

Для корреспонденции: Владимирский Михаил Александрович, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. иммунол. исследований и мол. диагностики туберкулеза; e-mail: mvladimirskij@mail.ru

Для цитирования: Смирнова Н.С., Шипина Л.К., Лапенкова М.Б., Владимирский М.А. Применение литического микобактериофага D29 для ускоренного фенотипического определения чувствительности микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам. Клиническая лабораторная диагностика, 2017; 62 (12): 757-763. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-12-757-763>

Smirnova N.S., Shipina L.K., Lapenkova M.B., Vladimirovsky M.A.

THE APPLICATION OF LYTIC MICRO-BACTERIOPHAGE B29 FOR ACCELERATED PHENOTYPE DETECTION OF SENSITIVITY MYCOBACTERIA OF TUBERCULOSIS TO ANTI-TUBERCULOSIS MEDICATIONS

The research institute of phthisiopulmonology of the Federal state autonomous educational institution of higher education "The I.M. Sechenov first Moscow state medical university" of Minzdrav of Russia, 127994 Moscow, Russia

In conditions of prevalence of medicine-resistant strains of mycobacteria of tuberculosis necessity in accelerated, including phenotype techniques of detection of sensitivity of mycobacteria to anti-microbial chemotherapeutic medications in clinical samples is an actual issue. The results of application of accelerated phenotype techniques of detection of sensitivity of clinical strains of mycobacteria of tuberculosis to anti-microbial chemotherapeutic medications on the basis application of lytic mycobacteriophage D29 are presented. The principle of technique is in evaluation of reproduction of mycobacteriophage in cells of mycobacteria of tuberculosis in presence of sensitive to them anti-bacterial medications. The reproduction of mycobacteriophage is evaluated by quantitative analysis of phage DNA in polymerase chain reaction in real-time. The study used 102 clinical strains of mycobacteria of tuberculosis obtained after primary cultivation or re-cultivation in tubes of MGIT system (Bactec). After positive results of growth of mycobacteria of tuberculosis were obtained, the samples were incubated during 48 hours in CO₂ incubator in the presence of critical concentrations of 10 widely applied in case of treatment tuberculosis medicinal substances in liquid nutrient medium Middlebrook 7H9 enriched with components OADC, in format of 24 well cultural plate with volume of nutrient medium 1 ml per well. Whereupon, in plate wells deposited 2x10³ plaque-forming units of mycobacteriophage D29. After 24 hours a qualitative detection of phage DNA was implemented with polymerase chain reaction in real-time using reagents phage D29 ("Syntol", Russia). The increasing of threshold level of fluorescence of Ct more than to 2 cycles in samples with antibiotic as compared with control testifies sensitivity of the analyzed strain of mycobacteria of tuberculosis to antibiotic. The level of coincidence made up to 91% in comparative study with inoculation in Lowenstein-Jensen nutrient medium. The level of coincidence made up to 96% in comparative study with Bactec test-system of limited number of strains with establishment of sensitivity for 10 medications. The data was confirmed concerning inverse relationship of value ΔCt and minimal inhibiting concentration of medication. The supposed high efficiency of possible reagents' set on the basis of presented technique on cost/quality criterion.

Key words: mycobacteria of tuberculosis; medicinal sensitivity; mycobacteriophage; polymerase chain reaction in real-time

For citation: Smirnova N.S., Shipina L.K., Lapenkova M.B., Vladimirovsky M.A. The application of lytic micro-bacteriophage B29 for accelerated phenotype detection of sensitivity mycobacteria of tuberculosis to anti-tuberculosis medications. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic)* 2017; 62 (12): 757-763. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-12-757-763>

For correspondence: Vladimirovsky M.A., doctor of medical sciences, professor, the head of the laboratory of immunologic studies and molecular diagnostic of tuberculosis. e-mail: mvladimirskij@mail.ru

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

Acknowledgment. The authors express their gratitude to E.A. Il'ina, the head of microbiological laboratory of the Nizhny Novgorod oblast anti-tuberculosis dispensary and her colleagues for presented clinical strains of mycobacteria of tuberculosis with analyzed sensitivity to anti-microbial chemotherapeutic medications.

Received 22.06.2017
Accepted 30.06.2017

Введение. Одной из важнейших общемировых проблем борьбы с туберкулезом является распространение лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ) [1, 2]. В России эта проблема является ключевой, поскольку ведет к низкой эффективности лечения больных туберкулезом и дальнейшему распространению множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) — устойчивости к препаратам 1-го ряда и даже к широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ), что означает устойчивость к некоторым эффективным препаратам резервного ряда. По данным Федерального мониторинга заболеваний туберкулезом, уровень МЛУ среди ранее нелеченых больных составляет около 25%, среди ранее лечившихся пациентов — более 50%.

Лечение больных с МЛУ в несколько раз дороже, чем лечение пациентов, у которых выделяемые МБТ остаются чувствительными к эффективным препаратам 1-й линии. Для эффективного лечения больных туберкулезом и предупреждения селекции лекарственно-устойчивых штаммов МБТ важнейшей задачей является максимально раннее определение устойчивости МБТ к антимикробным химиотерапевтическим препаратам с вы-

бором оптимальной комбинации используемых специфических антибиотиков, оказывающих ингибирующее действие на микобактерии пациента. Культуральный метод определения чувствительности к противотуберкулезным препаратам требует 1,5—2 мес до получения ответа. Для ускоренного культивирования и определения МБТ в клинических образцах используется автоматизированное оборудование и тест-системы Bactec («Weston Dickinson», США), которые позволяют оценить чувствительность к противотуберкулезным препаратам в течение 8—10 дней после первичного роста или в течение 4 недель от первичного посева клинического образца. В основе тест-системы Bactec лежит использование жидких питательных сред Миддлбрук 7H9 в специальных пробирках с флуоресцентным сенсором роста микобактерий. Из-за дороговизны расходных материалов оборудование и тест-системы Bactec в региональных лабораториях Российской Федерации используются далеко не полностью. В части лабораторий они используются только для первичного культивирования; последующее исследование устойчивости к антимикробным химиотерапевтическим препаратам проводится на более деше-



Рис. 1. Зоны лизиса (плаки) на поверхности роста культуры *M. smegmatis* для подсчета активности вирусных частиц препарата микобактериофага.

вых плотных средах, для этого требуется дополнительно 3—4 недели. Врач получает результаты исследования чувствительности возбудителя к лекарственным препаратам не ранее чем через 1,5 мес от начала лечения, что при неоптимальном выборе препаратов существенно снижает эффективность и удлиняет сроки лечения пациентов. Врачу необходимы данные о чувствительности сразу широкого спектра препаратов, поскольку некоторые препараты могут характеризоваться плохой переносимостью.

Развитие молекулярно-генетических методов и тест-систем для быстрого определения устойчивости к антимикробным химиотерапевтическим препаратам не решило всех указанных выше проблем. Импортные тест-системы для определения чувствительности к таким препаратам дороги и трудоемки. Упрощенная для использования потребителем тест-система GeneXpert MTB/Rif (США) при высокой цене позволяет определить устойчивость только к рифампицину [3], другие — производства «Hain Lifescience» (Германия), MT-BDRsl (США) [4] — основаны на гибридизации ПЦР-амплифицированных фрагментов ДНК, и в связи с возможностью контаминации продуктами ПЦР требуют дополнительных помещений и высокого уровня организации работы. Эффективность их анализа в отношении этамбутола и некоторых специфических аминогликозидных антибиотиков существенно ниже по сравнению с фенотипическими методами, что связано, возможно, с эпигеномными факторами [5].

Отечественная молекулярно-генетическая тест-система для определения чувствительности/устойчивости к антимикробным химиотерапевтическим препаратам МБТ (Амплитуб-МЛУ-РВ) [1] имеет важное значение, но она позволяет определять чувствительность только к рифампицину и изониазиду.

Несмотря на широкое распространение технологии Вастес при культуральных исследованиях, не прекращаются поиски новых биомаркеров, в том числе с использованием микобактериофагов, для определения роста МБТ в жидкой питательной среде и фенотипического анализа чувствительности к антимикробным химиотерапевтическим препаратам. Одно из направлений — использование генно-модифицированных микобактериофагов со встроенным геном, экспрессирующим люциферазу, которая при взаимодействии с субстратом люцифери-

ном обеспечивает люминесцентный сигнал роста микобактерий [6]. Эта экспериментальная тест-система не получила развития для практического применения. Появились работы по рекомбинантным микобактериофагам, продуцирующим флюоресцирующий белок (так называемый флюорофаг), что может позволить количественно определять размножение бактериофага и, соответственно, чувствительность к антимикробным химиотерапевтическим препаратам при культивировании МБТ [7, 8]. Среди немодифицированных микобактериофагов наиболее изучен вирулентный как для нетуберкулезных быстрорастущих видов микобактерий, так и для МБТ — микобактериофаг D29. Он хорошо размножается в нетуберкулезных быстрорастущих микобактериях, особенно в *Mycobacterium smegmatis* mc²155, и может накапливаться в таких культурах с получением высоких титров — до 10^{11-12} в 1 мл плакообразующих частиц — зон лизиса на газоне культуры *M. smegmatis*. Ряд исследователей использовали этот фаг для фенотипических методов ускоренного определения чувствительности к антимикробным химиотерапевтическим препаратам МБТ [9—11]. При воздействии лекарственных препаратов, блокирующих метаболизм бактерий, размножение микобактериофагов в микобактериях ингибируется; в случае устойчивых МБТ микобактериофаги размножаются так же, как в контрольных пробах без антибиотиков [9]. Появились перспективные работы, в которых для оценки чувствительности к антимикробным химиотерапевтическим препаратам используются микобактериофаги, с определением результатов по критерию ингибирования метаболизма МБТ с помощью количественной оценки ДНК фага в клетках МБТ или в среде культивирования. Такой анализ проводится с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) [10, 11]. При этом сравниваются пороговый уровень флюоресценции C_t в контрольной пробе (без антибиотика) и в опытной пробе с антибиотиком, где пороговый уровень C_t сдвигается в сторону увеличения, что соответствует уменьшению количества ДНК фага. Определение чувствительности МБТ к лекарственным препаратам соответствует сдвигу пороговых уровней флюоресценции в сторону увеличения более чем на 2—3 цикла.

Создание экономичной отечественной тест-системы для ускоренного определения чувствительности к широкому спектру противотуберкулезных препаратов весьма актуально.

Цель исследования — изучение эффективности метода ускоренного определения чувствительности клинических штаммов МБТ к широкому спектру противотуберкулезных препаратов на основе применения микобактериофагов.

Материал и методы. Клинические штаммы МБТ и культивирование. Использовали 102 клинических штамма, полученных из микробиологических лабораторий противотуберкулезных диспансеров, преимущественно из лаборатории Нижегородского противотуберкулезного диспансера. Для проведения исследований МБТ рекультивированы в пробирках MGIT с добавлением 10% ростовой добавки OADC («Becton Dickinson», США) до получения положительных результатов роста с детекцией флюоресценции в ручном режиме.

Для культуральных исследований использована жидкая питательная среда Миддлбрук 7H9, приготовленная из сухой среды Difco 7H9 broth («Becton Dickinson») с 10% ростовой добавки OADC и 2 мл

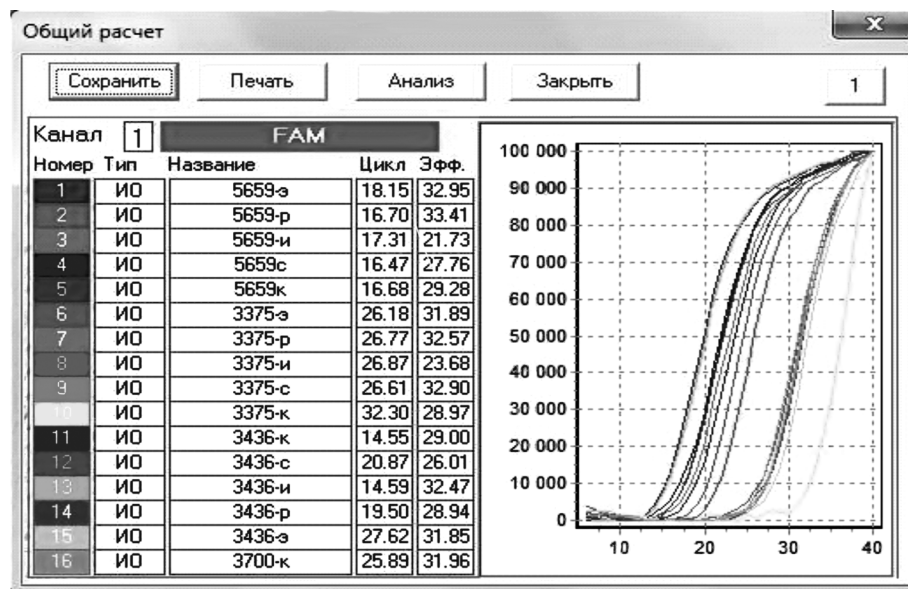


Рис. 2. Определение лекарственной чувствительности культур МБТ по критериям размножения микобактериофага с количественным анализом ДНК фага.

Культура № 5659 устойчива ко всем препаратам. Пороговые циклы значительно не отличаются от контроля. Культура № 3436 чувствительна к стрептомицину, рифампицину, этамбутолу, устойчива к изониазиду; № 3436 — пороговые циклы: контроль — 14,5, стрептомицин — 20,9 (+6,4), изониазид — 14,6 (устойчива), рифампидин — 19,5 (+5,0), этамбутол — 27,6 (+13); в скобках прирост C_t — пороговых уровней флуоресценции в опытных пробах по сравнению с контролем.

глицерина на 1 л жидкой среды, которую автоклавировали при 121°C 10 мин.

Получение и определение активности микобактериофага D29. Для размножения микобактериофага D29 использован штамм быстрорастущих микобактерий *M. smegmatis* mc² 155, любезно предоставленным нам сотрудниками НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. *M. smegmatis* культивировали в жидкой среде Миддлбрук 7Н9 с 10% ОАДС с добавлением 1 мМ CaCl₂. Плотность бактериальной суспензии определяли на спектофотометре при длине волны 600 нм. Для размножения микобактериофага использована культура плотностью 1,0.

Для работы с микобактериофагом использован фаговый буферный раствор: 10 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 1 мМ CaCl₂, 68,5 мМ NaCl. Приготовление питательной среды 7Н10: 19 г порошка агара 7Н10 Difco («Becton Dickinson») разводили в 900 мл дистиллированной воды с добавлением 5 мл глицерина, автоклавировали при 121°C 10 минут; при 50—55°C добавляли 10% ростовой добавки ОАДС. Приготовление полужидкого агара: 900 мл дистиллированной воды, 4,7 г порошка Миддлбрук 7Н9 (бульон), 7 г Миддлбрук 7Н10 (агар), 25 мл 10% раствора глюкозы, 10 мл 0,1 М раствора CaCl₂ (1,11 мл 10% раствора хлорида кальция).

Для получения фагового препарата в растущую на жидкой питательной среде культуру *M. smegmatis* вносили 10⁵ фаговых частиц, культивировали 24 ч. Затем на чашки для культивирования диаметром 100 мм с плотной питательной средой вносили по 3 мл полужидкого агара и 250 мкл суспензии *M. smegmatis*, содержащих микобактериофаг; чашки инкубировали в течение ночи при 37°C, после чего в них вносили по 5 мл фагового буферного раствора и инкубировали 4 ч при 4°C. Затем буферный раствор, содержащий фаговые частицы, удаляли, фильтровали для стерилизации через фильтр с по-

рами 0,22 мк и хранили при 4°C.

Активность полученного фагового препарата определяли при посевах на чашках с плотной питательной средой суспензии по 100 мкл *M. smegmatis* (5-й стандарт мутности). После всасывания суспензии микобактерий наносили по 100 мкл фагового препарата, разведенного последовательно серией 10-кратных разведений. На основании подсчета зон лизиса (плаков) (рис. 1) в чашках с крайним разведением и учетом 10-кратного разведения определяли число вирусных частиц (плакообразующих единиц) в 1 мл среды фагового препарата.

Субстанции антибактериальных препаратов («Sigma-Aldrich») и их критические концентрации для определения чувствительности МБТ готовили стерильно и разводили питательной средой так, чтобы в 10 мкл содержалась критическая концентрация препарата на 1 мл среды. Использовали следующие критические концентрации (в мкг/мл): стрептомицин — 1; изониазид — 0,1; рифампидин — 1; этамбутол — 5; амикацин — 1; капреомицин — 2,5; канамицин — 2,5; офлоксацин — 2; моксифлоксацин — 0,54; линезолид — 1; левофлоксацин — 1; этионамид — 5; циклосерин — 3; клофазимин — 1.

Определение чувствительности клинических штаммов МБТ. После получения положительного результата роста МБТ в пробирках MGIT («Becton Dickinson») с флуоресцентным маркером по 200 мкл культуры переносили в лунки 24-луночного культурального планшета. Количество лунок для дальнейшего культивирования соответствовало числу тестов с использованием контрольной пробы (без антибиотика) и числу антибактериальных препаратов, к которым определяется чувствительность. В каждую лунку, содержащую 200 мкл культуры клинического штамма МБТ, вносили по 800 мкл жидкой питательной среды Миддлбрук 7Н9, содержащей 10% ростовой добавки ОАДС и 1 мМ хлорида кальция, а также, за исключением контрольной пробы, по 10 мкл субстанций антибактериальных препаратов, содержащих критические концентрации исследуемых противотуберкулезных препаратов.

Лунки планшета маркировали и культивировали в CO₂-инкубаторе (Nu-Aire), подключенном к баллону с углекислым газом при 37°C с содержанием 5,5% CO₂. На дно влажной камеры (поддон с водой) вносили в качестве антисептика 200 г двуххромовокислого калия. Инкубацию культур с клиническими штаммами МБТ в присутствии антибактериальных препаратов проводили в течение 2 суток, после чего во все лунки, включая контрольную, вносили по 50 мкл микобактериофага D29 с активностью 10⁵ плакообразующих единиц в 1 мл и продолжали инкубирование культур в течение 24 ч.

На 4-е сутки культивирования образцы переносили в пробирки объемом 1,5 мл типа Эппендорф для выделения ДНК фага, содержащегося в клетках МБТ. Образцы центрифугировали в микроцентрифуге (12 000 об/мин)

Таблица 1

Чувствительность к антимикробным химиотерапевтическим препаратам

Антимикробные химиотерапевтические препараты	Чувствительность	Средняя ΔC_i	Число и результаты анализов	% устойчивых штаммов	Число штаммов	% совпадений с общепринятым методом
Стрептомицин	Ч.	4,4	9	85,5	62	92,6
	У.	0,13	53			
Изониазид	Ч.	6,3	14	77,4	62	97
	У.	0,04	48			
Рифампицин	Ч.	6,2	28	54,8	62	85
	У.	-0,17	34			
Этамбутол	Ч.	6,87	32	48,4	62	89
	У.	0,3	30			
Амикацин	Ч.	7,15	38	22,5	49	92
	У.	0,99	11			
Капреомицин	Ч.	7,5	41	16,3	49	86
	У.	1,18	7			
Канамицин	Ч.	8,0	33	21,4	42	79
	У.	0,74	9			
Моксифлоксацин	Ч.	6,45	32	20	40	90
	У.	0,62	8			

Примечание. Здесь и в табл. 2: Ч. — чувствительны; У. — устойчивы.

5 мин, супернатант отбрасывали и к осадку добавляли по 200 мкл деионизированной воды и прогревали в твердотельном микротермостате при 95°C 30 мин. После этого по 5 мкл ДНК фага в супернатанте анализировали с помощью количественной ПЦР-РВ с использованием тест-системы «фаг D29», ООО «Синтол».

Результаты измерения определяли по пороговым уровням подъема кривой флюоресценции C_i в реакции амплификации с ДНК-зондом, маркированным по флуорофору FAM. Результаты исследований в пробах с антибиотиками оценивали по отношению к контрольным пробам (без антибиотиков). Прирост порогового цикла C_i более чем на 2 цикла в опытной пробирке по сравнению с контрольной свидетельствовал о чувствительности культуры к исследуемой субстанции антибактериального препарата. В части исследований с помощью второго канала флюоресценции с ДНК-зондом, маркированным по флуорофору R6G, проверена возможность относительного ингибирования ПЦР. Установлено, что при такой обработке с выделением ДНК фага ингибирование ПЦР ни в одном случае не наблюдалось.

Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) использовали плотную среду 7Н10 на чашках 60 мм.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования чувствительности клинических штаммов МБТ, полученных от длительно леченных пациентов, к 8 антимикробным химиотерапевтическим препаратам на среде Левенштейна—Йенсена и ускоренного исследования с применением микобактериофага D29 представлены в табл. 1.

В отношении препаратов 1-го ряда (стрептомицин, изониазид, рифампицин, этамбутол) изучена чувствительность 62 клинических штаммов, в отношении препаратов 2-го ряда (аминогликозиды, моксифлоксацин)

— от 49 до 40 штаммов. Среднее совпадение результатов определения чувствительности к препаратам 1-го ряда (стрептомицин, изониазид, рифампицин, этамбутол) при использовании ускоренного метода на основе микобактериофагов в сравнении с общепринятым методом составило 90,9% с чувствительностью 92% и специфичностью 93%. Для препаратов 2-го ряда совпадение результатов составило 87%.

Определение чувствительности к антимикробным химиотерапевтическим препаратам МБТ с помощью количественного ПЦР-анализа ДНК микобактериофага представлено на рис. 2.

Прирост пороговых уровней подъема кривой флюоресценции (ΔC_i) по сравнению с пороговыми уровнями контрольных проб для чувствительных штаммов, отражающих количественные различия в ДНК микобактериофага в группе тестов с препаратами 1-го ряда, несколько ниже (в среднем 5,9), чем для препаратов 2-го ряда (7,2), но без достоверных различий.

В соответствии с ранее опубликованными данными [10] эти величины обратно коррелируют с уровнями МИК, т. е. величина ΔC_i позволяет оценить ингибирующую эффективность исследуемых препаратов в отношении исследуемого штамма. Эти величины (ΔC_i) у штаммов с сохраненной чувствительностью к одним и тем же препаратам указывают на значительную вариабельность для разных клинических штаммов

МБТ. Оценивали величину и вариабельность ΔC_i для 17 клинических штаммов МБТ, чувствительных к препаратам 1-го ряда (стрептомицин, изониазид, рифампицин, этамбутол). ΔC_i для этих штаммов варьировала от 2,4 до 16,0, но была примерно одинаковой для всех четырех препаратов, т. е. эта величина являлась характеристикой каждого штамма. Были изучены 2 штамма МБТ с существенно различающимися по ΔC_i — 3,5 (штамм № 7334) и штамм № 7354 (ΔC_i — 12,5), предварительно культивировавшиеся в жидкой среде Миддлбрук 7Н9 с концентрацией по 5-му стандарту мутности (ГИСК им. Л.А. Тарасевича), а также в разведении 1:100 для посевов на чашки (по 2 чашки на точку) с плотной средой Миддлбрук 7Н10 с МИК рифампицина (0,1 мкг/мл). Через 3 недели культивирования в CO_2 -инкубаторе при 37°C на чашках со штаммом № 7334 наблюдался сливной рост и 100—150 колоний в разведении 1:100; для штамма № 7354 — около 100 и 10—15 соответственно. Таким образом, в культуральных исследованиях подтверждена прямая корреляция различий в пороговых уровнях подъема кривых флюоресценции (ΔC_i), т. е. количественных характеристик уменьшения ДНК микобактериофага и ингибирующей эффективности антибактериального препарата.

В этой же группе клинических штаммов МБТ различия по ΔC_i (предполагаемая эффективность ингибирования метаболизма микобактерий) между штаммами № 11 и 16 в отношении 6 препаратов 2-го ряда были статистически значимыми (MS Excel) по t-критерию Стьюдента: $4,51 \pm 0,96$ против $8,0 \pm 0,81$; при CI 95% $p < 0,01$.

В настоящей работе было проведено первичное культивирование образцов мокроты больных с положительным результатом определения МБТ по микроскопии мазка с последующей оценкой чувствительности к критическим концентрациям 10 широко используемых

Таблица 2

Определение чувствительности к антимикробным химиотерапевтическим препаратам клинических штаммов МБТ с помощью микобактериофага и культурального исследования методом MGIT («Becton Dickinson»)

№ культуры МБТ	C_t — уровень ДНК фага в контроле	C_t — количество ДНК фага с антибиотиком	Антибиотики	Результат теста по фагу	Результаты теста MGIT
9	17,3	16,26	Стрептомицин	У.	У.
10	24,1	23,14	«	У.	У.
11	18,6	24,16	«	Ч.	Ч.
12	17,2	17,51	«	У.	У.
16	15,5	22,88	«	Ч.	Ч.
9	17,3	16,53	Изониазид	У.	У.
10	24,1	22,44	«	У.	У.
11	18,6	26,6	«	Ч.	Ч.
12	17,2	17,03	«	У.	У.
16	15,5	22,16	«	Ч.	Ч.
9	17,3	17,5	Рифампицин	У.	У.
10	24,1	23,5	«	У.	У.
11	18,6	26,64	«	Ч.	Ч.
12	17,2	17,9	«	У.	У.
16	15,5	24,24	«	Ч.	Ч.
9	17,3	17,45	Этамбутол	У.	У.
10	24,1	23,06	«	У.	У.
11	18,6	25,37	«	Ч.	Ч.
12	17,2	20,2	«	Ч.	Ч.
16	15,5	20,16	«	Ч.	Ч.
9	17,3	26,2	Амикацин	Ч.	Ч.
10	24,1	31,2	«	Ч.	Ч.
11	18,6	24,0	«	Ч.	Ч.
12	17,2	22,4	«	Ч.	Ч.
16	15,5	24,1	«	Ч.	Ч.
9	17,3	23,3	Капреомицин	Ч.	Ч.
10	24,1	29,4	«	Ч.	Ч.
11	18,6	22,3	«	Ч.	Ч.
12	17,2	24,16	«	Ч.	Ч.
16	15,5	23,7	«	Ч.	Ч.
9	17,3	24,0	Канамицин	Ч.	Ч.
10	24,1	29,1	«	Ч.	Ч.
11	18,6	23,1	«	Ч.	Ч.
12	17,2	18,6	«	У.	У.
16	15,5	23,6	«	Ч.	Ч.
9	17,3	17,8	Этионамид	У.	У.
10	24,1	28,9	«	Ч.	Ч.
11	18,6	24,4	«	Ч.	Ч.
12	17,2	17,16	«	У.	У.
16	15,5	21,6	«	Ч.	Ч.
9	17,3	22,3	Моксифлоксацин	Ч.	Ч.
10	24,1	21,0	«	У.	У.
11	18,6	21,3	«	Ч.	У.
12	17,2	19,1	«	У.	Ч.
16	15,5	24,4	«	Ч.	Ч.
9	17,3	22,1	Линезолид	Ч.	Ч.
10	24,1	28,23	«	Ч.	Ч.
11	18,6	23,42	«	Ч.	Ч.
12	17,2	22,74	«	Ч.	Ч.
16	15,5	23,3	«	Ч.	Ч.

противотуберкулезных препаратов с помощью технологии MGIT («Becton Dickinson») в сравнении с описанной выше технологией краткосрочного исследования с использованием микобактериофага D29 (табл. 2).

Как следует из табл. 2, из 50 проведенных тестов различия наблюдались лишь в отношении моксифлоксацина у 2 штаммов, т. е. совпадение сравниваемых двух методов составило 96%.

Применение микобактериофагов для быстрого определения чувствительности к антимикробным химиотерапевтическим препаратам клинических штаммов МБТ ранее успешно показано в работах нескольких авторов, в частности F.A. Drobniowski и соавт. [9], которые показали достоверность оценки чувствительности к рифампицину и изониазиду при использовании микобактериофага посредством определения количества плаков на газоне *M. smegmatis*. S. Pholwat и соавт. и S. Foongladda и соавт. [10, 11] опубликовали две работы, в которых количественное определение размножения микобактериофага D29 в микобактериях для оценки чувствительности к антимикробным химиотерапевтическим препаратам клинических штаммов МБТ проведено с помощью анализа ДНК фага при проведении ПЦР-РВ. Авторы учитывали в качестве положительного теста определения чувствительности к антимикробным препаратам превышение порогового уровня флюоресценции C_t в пробе с антибиотиком на 3 цикла по сравнению с контролем.

В нашей работе более высокая чувствительность анализа получена при различиях между контрольной (без антибиотика) и опытными пробами (ΔC_t) в два цикла. Представленные в табл. 1 данные об устойчивости клинических штаммов МБТ к препаратам 1-го ряда, прежде всего стрептомицину, изониазиду, рифампицину — более 50% и в несколько меньшей степени к этамбутолу, соответствуют нашим ранее полученным результатам исследований [1]. Такой уровень устойчивости микобактерий к антимикробным химиотерапевтическим препаратам у больных туберкулезом после длительного лечения в настоящее время уже не подвергается сомнению и указывает на необходимость быстрого определения чувствительности возбудителя для своевременного изменения протокола лечебных режимов химиотерапии.

Более высокий уровень совпадения результатов определения чувствительности к 10 препаратам в сравнении с технологией Vactec — 96%, возможно, объясняется тем, что в сравниваемой системе Vactec используется более достоверный метод пропорций в противоположность методу абсолютных концентраций, используемому в нашей стране при работе на среде Левенштейна—Йенсена.

Время, затрачиваемое на получение результата при использовании теста с микобактериофагом, составляет 4 дня по сравнению с 8—10 днями, необходимыми для получения результатов оценки чувствительности к антимикробным химиотерапевтическим препаратам в системе Bactec. Проведенное нами исследование стабильности препарата микобактериофага, используемого для анализа чувствительности к антимикробным химиотерапевтическим препаратам клинических штаммов МБТ, показало, что через 10 мес хранения стерильного микобактериофага при 4°C активность фага снижалась на 1 порядок с 10^8 до 10^7 плакообразующих единиц. Анализ стоимости использованной технологии, учитывая минимальный (1 мл в лунке планшета) объем жидкой питательной среды Миддлбрук 7Н9 и низкую себестоимость реагентов для количественного определения ДНК фага (около 50 руб. на 1 тест), позволяет считать предложенный метод весьма эффективным по критерию цена/качество. Использование только одного канала флуоресценции по флуорофору FAM дает возможность упростить и удешевить технологию исследования.

Расчет себестоимости одного теста (одна культура — один антибиотик) составляет около 150 руб. при стоимости одной пробирки с флуоресцентным сенсором с биодобавкой OADC для системы MGIT (Bactec) около 700 руб. Формат исследований не ограничен планшетной технологией культивирования образцов с использованием CO₂-инкубатора, поскольку, как показали наши предварительные эксперименты, исследование чувствительности к антимикробным химиотерапевтическим препаратам клинических штаммов МБТ может проводиться с использованием пробирок объемом 4—4,5 мл.

Полученные подтверждения корреляции между величиной различий пороговых уровней флуоресценции (ΔС) между контрольной и опытными пробирками и МИК для конкретных клинических штаммов открывают, по нашему мнению, также возможности применения данной технологии для ускоренного анализа ингибирующей активности различных комбинаций лекарств с целью будущего персонализированного, в соответствии с переменными свойствами клинического штамма, выбора схемы лечения больного туберкулезом.

Полагаем, что разработка и внедрение в нашей стране набора реагентов для быстрого определения чувствительности к антимикробным химиотерапевтическим препаратам клинических штаммов МБТ, основанного на технологии применения микобактериофага D29, может быть одним из важных факторов в борьбе с распространением лекарственной устойчивости и повышении эффективности лечения больных туберкулезом.

Благодарность. Авторы благодарят зав. микробиологической лабораторией Нижегородского областного противотуберкулезного диспансера Елену Александровну Ильину и ее сотрудников за предоставленные клинические штаммы микобактерий туберкулеза с изученной чувствительностью к антимикробным химиотерапевтическим препаратам.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2—11 см. REFERENCES)

1. Владимирский М.А., Аляпкина Ю.С., Алексеев Я.И., Варламов Д.А., Домотенко Л.В., Шипина Л.К. и др. Применение метода ПЦР в реальном времени для определения и контроля за распространением лекарственно устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза. *Проблемы туберкулеза и болезней лёгких*. 2008; 4: 38—44.

REFERENCES

1. Vladimirsky M.A., Alyapkina Yu.S., Alekseev Ya.I., Varlamov D.A., Domotenko L.V., Shipina L.K. et al. Real-time PCR application for detection and control of the spread of drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh*. 2008; (4): 38—44. (in Russian)
2. Enarson D.A., Harries A.D. Historical background and global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* resistance. In: *Guidelines for Clinical and Operational Management of Drug-Resistant Tuberculosis*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Paris, France: 2013; 7—12.
3. Pandey P., Dutt Pant N., Rijal K.R., Shrestha B., Kattel S., Banjaeraet M.R. et al. Diagnostic Accuracy of GeneXpert MTB/RIF Assay in Comparison to Conventional Drug Susceptibility Testing Method for the Diagnosis of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *PLoS One*. 2017; 12(1): e0169798.
4. Feng Y., Liu S., Wang Q., Wang L., Tang S., Wang J. et al. Rapid Diagnosis of Drug Resistance to Fluoroquinolones, Amikacin, Capreomycin, Kanamycin and Ethambutol Using GenoType MTBDRsl Assay: A Meta-Analysis. *PLOS one*. 2013; 8(2):1—13.
5. Wei-Lun Huang, Ting-Lin Chi, Mei-Hua Wu, Ruwen Jou. Performance Assessment of the GenoType MTBDRsl Test and DNA Sequencing for Detection of Second-Line and Ethambutol Drug Resistance among Patients Infected with Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2011; @2502—8.
6. Banaiee N., Bobadilla-Del-Valle M., Bardarov S. Jr., Riska P.F., Small P.M., Ponce-De-Leon A. et al. Luciferase reporter mycobacteriophages for detection, identification, and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 3883—8.
7. Jain P., Hartman T.E., Eisenberg Nell, O'Donnell M.R., Kriakov J., Govender K. et al. φ2GFP10, a High-Intensity Fluorophage, Enables Detection and Rapid Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Directly from Sputum Samples. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(4): 1362—9.
8. Xia Yu, Yunting Gu, Guanglu Jiang, Yifeng Ma, Liping Zhao, Zhaogang Sun, Paras Jain et al. Evaluation of a High-Intensity Green Fluorescent Protein Fluorophage Method for Drug-Resistance Diagnosis in Tuberculosis for Isoniazid, Rifampin and Streptomycin. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7, article 922: 1—6.
9. Eltringham J.S., Wilson M., Drobniewski F.A. Evaluation of a Bacteriophage-Based Assay (Phage Amplified Biologically Assay) as a Rapid Screen for Resistance to Isoniazid, Ethambutol, Streptomycin, Pyrazinamide, and Ciprofloxacin among Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37(11): 3528—32.
10. Foongladda S., Klayut W., Chinli R., Pholwat S., Houpt Eric. Use of Mycobacteriophage Quantitative PCR on MGIT Broths for a Rapid Tuberculosis Antibiogram. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014; 52(5): 1523—8.
11. Pholwat S., Ehdaie B., Foongladda S., Kelly K., Houpt E. Real-Time PCR Using Mycobacteriophage DNA for Rapid Phenotypic Drug Susceptibility Results for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50(3): 754—61.

Поступила 22.06.17

Принята к печати 30.06.17