

А. І. Барбова, О. А. Журило, Н. М. Алієва, Л. М. Сладкова
ВИЗНАЧЕННЯ КРИТЕРІЇВ РЕЗИСТЕНТНОСТІ M. TUBERCULOSIS ДО ПРЕПАРАТІВ ДРУГОГО
І РЕЗЕРВНОГО РЯДУ ЗА ДОПОМОГОЮ РІДКОГО ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА
MIDDLEBROOK 7H9 В СИСТЕМІ BACTEC MGIT 960

ДУ «Національний інститут фізіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»
 Полтавський обласний клінічний протитуберкульозний диспансер
 ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРИТЕРИЕВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
M. TUBERCULOSIS К ПРЕПАРАТАМ ВТОРОГО И РЕЗЕРВНОГО
РЯДА С ПОМОЩЬЮ ЖИДКОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ
MIDDLEBROOK 7H9 В СИСТЕМЕ BACTEC MGIT 960

А. И. Барбова, А. А. Журило, Н. Н. Алиева, Л. М. Сладкова

Резюме

Цель исследования — повышение эффективности и стандартизация метода определения лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* к препаратам 2-го и резервного ряда путем использования среды Middlebrook 7H9 в системе BACTEC MGIT 960.

Материалы и методы исследования. Использована система BACTEC MGIT 960, работа которой основана на регистрации флуоресценции, которая возникает в пробирке при поглощении растущими микобактериями кислорода из жидкой питательной среды Middlebrook 7H9. Флуоресценция становится видимой при облучении пробирки ультрафиолетовым светом и автоматически регистрируется фотодатчиками, которые вмонтированы в прибор BACTEC MGIT 960. Интенсивность свечения прямо пропорциональна уровню использования кислорода и регистрируется в единицах роста (GU — growth units).

Результаты. Отработана методика базового теста и был определен диапазон антибактериальных тестовых концентраций для препаратов 2-го и резервного ряда. Исследовано по несколько концентраций каждого препарата. Учтены «критические» концентрации препаратов 2-го и резервного ряда, которые используются при тестировании на плотных средах, поскольку они зависят от минимальной ингибирующей концентрации каждого препарата. Проведенные исследования дали возможность определить «критические» концентрации препаратов 2-го ряда — Et (5,0 мкг/мл), Cm (2,5 мкг/мл), Pt (2,5 мкг/мл), Am (1,0 мкг/мл), Ofx (2,0 мкг/мл), Mfx (0,25 мкг/мл), Lfx (2,0 мкг/мл) и резервного препарата — Lzd (1,0 мкг/мл) при использовании их для постановки теста лекарственной устойчивости в жидкой среде в системе BACTEC MGIT 960.

Выводы. Установлены «критические» концентрации препаратов 2-го ряда и резервного препарата — Lzd при использовании их для постановки теста лекарственной устойчивости в среде Middlebrook 7H9 в системе BACTEC MGIT 960. Стандартная методика определения лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* к препаратам 2-го ряда и резервного препарата — линезолида в системе BACTEC MGIT 960 внедрена в работу бактериологических лабораторий 3 уровня сети противотуберкулезных учреждений Украины.

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, система BACTEC MGIT 960, лекарственная устойчивость к препаратам 2-го и резервного ряда.

Укр. пульмонол. журнал. 2017, № 1, С. 47–52.

Барбова Анна Іванівна

ДУ «Національний інститут фізіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»

Лабораторія мікробіології

Старший науковий співробітник, канд. мед. наук

10, М. Амосова, м. Київ, 03680, Україна

Тел.: 38 044 275-54-30, microbio@ifp.kiev.ua

DETERMINATION OF RESISTANCE CRITERIA OF M. TUBERCULOSIS
TO SECOND-LINE AND RESERVE MEDICATIONS USING LIQUID
MEDIA MIDDLEBROOK 7H9 IN BACTEC MGIT 960 SYSTEM

A. I. Barbova, A. A. Zhurylo, N. N. Alyeva, L. M. Sladkova

Abstract

Aim: an increase of efficiency and standardization of determination of *M. tuberculosis* drug resistance to second-line and reserve medications using Middlebrook 7H9 culture medium in BACTEC MGIT 960 system.

Materials and methods. BACTEC MGIT 960 system was used. It utilizes the principle of fluorescence registration, which appears in a tube as a result of oxygen absorption from a liquid medium by growing mycobacteria. Fluorescence becomes visible at irradiation of the test tube by ultraviolet light. It is automatically registered by a photosensors. Intensity of fluorescence is directly-proportional to the level of the oxygen spent and measured in growth units (GU).

Results. Methodology of the basic test was developed and the range of antibiotics concentrations was defined. Different concentrations of each compound were tested. The “critical” concentrations of second-line and reserve medications to be tested on solid medium were defined, as they depended on the minimum inhibitory concentration of the antibiotic. The following “critical” concentrations were defined: Et (5,0 mcg/of ml), Cm (2,5 mcg/of ml), Pt (2,5 mcg/of ml), Am (1,0 mcg/of ml), Ofx (2,0 mcg/of ml), Mfx (0,25 mcg/of ml), Lfx (2,0 mcg/of ml); Lzd (1,0 mcg/of ml) for the use in BACTEC MGIT 960.

Conclusions. The “critical” concentrations of second-line and reserve medication (Lzd) were determined to use in Middlebrook 7H9 media in BACTEC MGIT 960 system. New methodology for determination of drug resistance of *M. tuberculosis* to second-line and reserve medications to be used in BACTEC MGIT 960 system was introduced for the third level bacteriological laboratories of TB network in Ukraine.

Key words: *M. tuberculosis*, BACTEC MGIT 960 system, drug resistance to second-line and reserve medications.

Ukr. Pulmonol. J. 2017; 1: 47–52.

Anna I. Barbova

SI “National institute of phthisiology and pulmonology named after F. G. Yanovskyi NAMS of Ukraine”

Laboratory of microbiology

Senior research assistant, PhD

10, M. Amosova str., 03680, Kyiv, Ukraine

Tel.: 38 044 270-35-41, microbio@ifp.kiev.ua

Сучасний етап розвитку методів діагностики туберкульозу характеризується впровадженням нових технологій, в першу чергу, систем з комп'ютерною детекцією росту мікобактерій, заснованих на використанні рідких живильних середовищ, які призначені для прискореного виділен-

ня збудника туберкульозу та визначення спектру його медикаментозної стійкості (МС). Однією з них є система BACTEC MGIT 960, яка призначена для прискореної бактеріологічної діагностики туберкульозу і визначення МС мікобактерій до препаратів 1-го ряду, але й не виключає можливість визначення чутливості мікобактерій і до медикаментозних препаратів 2-го і резервного ряду [2, 6, 7].

Збільшення частоти MDR-туберкульозу в світі призвело до широкого використання препаратів 2-го і резервного ряду для лікування таких форм захворювання. Оскільки препарати 2-го і резервного ряду є високо-вартісними, їх призначення в кожному випадку потребує клінічного і бактеріологічного обґрунтування. Тому, на сучасному етапі наявність стандартизованих методик визначення МС до препаратів 2-го і резервного ряду є вкрай необхідним. Наші дослідження були спрямовані на пошук шляхів, які могли б забезпечити швидке отримання надійних і точних результатів ТМЧ до препаратів 2-го і резервного ряду [8, 9, 10, 11].

В результаті впровадження в практичну діяльність бактеріологічних лабораторій 3-го рівня ПТЗ України рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 з використанням системи BACTEC MGIT 960, скоротилися терміни визначення МС до препаратів 1-го ряду. Тому, нами було зроблено припущення, що аналогічні результати можливо одержати при вивченні МС *M. tuberculosis* до препаратів 2-го ряду (Et, Cm, Pt, Ofx, Mfx, Lfx, Am, Km) і резервного препарату — Lzd в середовищі Middlebrook 7H9 з використанням системи BACTEC MGIT 960 [1, 3, 5].

Основою досліджень було визначення критерію МС, яким є «критична» концентрація препаратів. «Критична» концентрація — один із критеріїв резистентності. Це строго визначена кількість кожного медикаментозного препарату, яку повинно містити середовище для постановки ТМЧ. В якості контролю в роботі була використана контрольна міжнародна панель, що була надіслана в лабораторію мікробіології з Супранациональної лабораторії ВООЗ (м. Рига, Латвія) та включала 40 штамів *M. tuberculosis* з відомими результатами МС до препаратів 2-го і резервного ряду, які були визначені на щільному живильному середовищі Левенштейна-Єнсена методом пропорцій (20 штамів *M. tuberculosis* з чутливістю і 20 штамів *M. tuberculosis* з МС до препаратів 2-го і резервного ряду).

Використання методу пропорції на щільному середовищі при визначенні МС штамів *M. tuberculosis* до препаратів 2-го і резервного ряду було обумовлено тим, що основою визначення МС на рідких середовищах в системі BACTEC MGIT 960 також є метод пропорцій. Принцип методу пропорцій полягає у визначенні співвідношення (пропорції) між чутливими і стійкими до препаратів в «критичних» концентраціях особинами в популяції штаму *M. tuberculosis*, який виділено від хворого на туберкульоз. Таким чином, наша задача полягала в тому, щоб за допомогою системи BACTEC MGIT 960 знайти такі «критичні» концентрації препаратів 2-го і резервного ряду в рідких середовищах, які після інокуляції контрольними штамми *M. tuberculosis* підтвердили б еквівалентність результатів МС *M. tuberculosis*, що були отримані на щільному та рідкому середовищі [4].

Метою досліджень було підвищення ефективності і стандартизація методу визначення МС *M. tuberculosis* до препаратів 2-го і резервного ряду шляхом використання рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі BACTEC MGIT 960.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводилось у клініці Інституту в атестованій лабораторії мікробіології (СВІДОЦТВО ПРО АТЕСТАЦІЮ № ПТ — 474/13, видане ДП «Укрметртест-стандарт» 30.12.2013 р.) Лабораторія атестована на підставі Закону України «Про метрологію та метрологічну діяльність», відповідає критеріям атестації вимірювальних лабораторій відповідно до вимог Правил уповноваження та атестації в державній метрологічній системі.

Лабораторія мікробіології атестована Супранациональною референс-лабораторією (Латвія, Рига) за результатами проходження раунду зовнішньої оцінки якості для ТМЧ туберкульозу з загальною ефективністю 99,0 % (СЕРТИФІКАТ № 1 від 23 вересня 2013 р.).

В роботі використана система BACTEC MGIT 960. Дія системи заснована на реєстрації флуоресценції, що виникає в пробірці при поглинанні зростаючими мікобактеріями кисню із рідкого живильного середовища. Флюорохром, що запаяний у силікон, утримується на дні пробірки. Спочатку концентрація кисню в рідкому живильному середовищі Middlebrook 7H9 є досить великою, цей факт викликає гасіння флуоресценції. При наявності мікобактерій і їх наступному рості концентрація кисню в середовищі зменшується, що викликає флуоресценцію та подальше її посилення. Флуоресценція стає видимою при опроміненні пробірки ультрафіолетовим світлом і автоматично реєструється фотодатчиками, які вмонтовані в прилад BACTEC MGIT 960. Інтенсивність світіння прямо пропорційна рівню витрати кисню і реєструється в одиницях росту — GU.

При приготуванні наважки препаратів 2-го ряду і Lzd нами була врахована потенція кожного з препаратів та зроблено відповідне перерахування на вміст активної речовини кожної чистої субстанції препарату. Для розчинення субстанцій препаратів Cm, Am, Km та Lzd використовувалась стерильна дистильована вода, чисті субстанції препаратів Et і Pt розчиняли в димексидсульфоксиді (DMSO), чисті субстанції препаратів Ofx, Mfx і Lfx розчиняли в 0,1 N NaOH. Всі розчини розливали в пробірки типу Eppendorf по 0,5 мл та зберігали при температурі (– 70 °С). Для проведення досліджень необхідну кількість пробірок розморожували, залишки відбраковували та знищували [3, 4, 7].

Результати та їх обговорення

Дослідження були проведені в два етапи. На 1-му етапі була відпрацьована методика базового тесту та був визначений діапазон антибактеріальних тестових концентрацій для препаратів 2-го і резервного ряду. Нами було досліджено по декілька концентрацій кожного з препаратів. Було враховано «критичні» концентрації препаратів 2-го і резервного ряду, які використовуються для тестування на щільних середовищах, оскільки вони залежать від мінімальної інгібуючої концентрації (MIC) кожного з препаратів (табл. 1).

Оскільки «критичні» концентрації фторхінолонових антибіотиків в щільному середовищі є нижчими в порівнянні з іншими препаратами 2-го ряду, ми порахували за необхідним приготувати серію розведень з більш меншими концентраціями даних препаратів.

Таблиця 1

Концентрації препаратів 2-го і резервного ряду, які були використані на 1-му етапі досліджень

Препарати	Концентрації препаратів, (мкг/мл)
Oxf	20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125
Mfx	20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125
Lfx	20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125
Et	40,0; 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625
Pt	40,0; 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625
Cm	40,0; 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625
Am	40,0; 20,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625
Lzd	20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625

Для приготування робочих розведень препаратів 2-го і резервного ряду використовували чисті субстанції препаратів. Насамперед готували робочі розведення препаратів. Для приготування 1-го розведення використовували відповідні наважки хімічно чистих субстанцій препаратів, які розчиняли в відповідній рідині. Подальші робочі розведення готували з наступних розведень шляхом додавання стерильної дистильованої води. Кінцеві концентрації препаратів в рідкому середовищі Middlebrook 7H9 готували шляхом додавання по 0,1 мл відповідних розведень препаратів 2-го і резервного ряду, які були підготовлені раніше, до пробірок MGIT, кожна з котрих містила 7,0 мл бульйону Middlebrook 7H9, 0,8 мл збагачуючої добавки та 0,5 мл бактеріальної суспензії культур *M. tuberculosis* контрольної панелі.

Перше розведення Oxf, Lfx та Mfx (1680 мкг/мл) готували шляхом додавання до 16,8 мг активних речовин чистих субстанцій 10,0 мл 0,1 N NaOH, а Am і Lzd — шляхом додавання до 16,8 мг активних речовин 10,0 мл стерильної дистильованої води. Наступні розведення готували за схемою, що наведена в табл. 2.

Таблиця 2

Приготування робочих розведень офлоксацину, моксифлоксацину, левофлоксацину, амікацину і лінезоліду

Номер робочого розведення препаратів	Концентрація препаратів Oxf, Lfx, Mfx, Am і Lzd в робочих розведеннях, мкг/мл	Кількість рідких інгредієнтів, мл	
		робоче розведення	H ₂ O
2	840	1,0 мл 1-го розведення	1,0
3	420	1,0 мл 2-го розведення	1,0
4	210	1,0 мл 3-го розведення	1,0
5	105	1,0 мл 4-го розведення	1,0
6	50,25	1,0 мл 5-го розведення	1,0

З отриманих робочих розведень Oxf, Mfx, Lfx, Am і Lzd в подальшому готували наступні розведення з різним вмістом препаратів в рідкому середовищі для подальших досліджень в системі BACTEC MGIT 960 (табл. 3).

Перше розведення Et і Pt (6720 мкг/мл) готували шляхом додавання до 33,6 мг активних речовин 5,0 мл DMSO, а Km і Cm (6720 мкг/мл) — шляхом додавання до 33,6 мг активних речовин 5,0 мл стерильної дистильованої води. Наступні розведення готували за схемою, що наведена в табл. 4.

Таблиця 3

Приготування концентрацій офлоксацину, моксифлоксацину, левофлоксацину, амікацину і лінезоліду в рідкому середовищі MGIT

Концентрація препаратів Oxf, Lfx, Mfx, Am і Lzd в рідкому середовищі MGIT, мкг/мл	Кількість відповідного розведення препаратів Oxf, Lfx, Mfx, Am і Lzd що додавали до 8,4 мл вмісту пробірки MGIT
20,0	0,1 мл (1680 мкг/мл)
10,0	0,1 мл (840 мкг/мл)
5,0	0,1 мл (420 мкг/мл)
2,5	0,1 мл (210 мкг/мл)
1,25	0,1 мл (105 мкг/мл)
0,625	0,1 мл (50,25 мкг/мл)

Таблиця 4

Приготування робочих розведень етіонаміду, протіонаміду, канаміцину і капреоміцину

Номер робочого розведення препаратів	Концентрація Et, Pt, Km і Cm в робочих розведеннях, мкг/мл	Кількість рідких інгредієнтів, мл	
		робоче розведення	H ₂ O
2	3360	1,0 мл 1-го розведення	1,0
3	1680	1,0 мл 2-го розведення	1,0
4	840	1,0 мл 3-го розведення	1,0
5	420	1,0 мл 4-го розведення	1,0
6	210	1,0 мл 5-го розведення	1,0
7	105	1,0 мл 6-го розведення	1,0
8	50,25	1,0 мл 7-го розведення	1,0

3 отриманих робочих розведень Et, Pt, Km і Cm готували наступні розведення з різним вмістом препаратів в рідкому середовищі для досліджень в системі BACTEC MGIT 960 (табл. 5).

Таблиця 5

Приготування концентрацій етіонаміду, протіонаміду і капреоміцину в рідкому середовищі MGIT

Концентрація Et, Pt, Km і Cm в рідкому середовищі MGIT, мкг/мл	Кількість відповідного розведення Et, Pt, Km і Cm, що додавали 8,4 мл до вмісту пробірки MGIT
40,0	0,1 мл (3360 мкг/мл)
20,0	0,1 мл (1680 мкг/мл)
10,0	0,1 мл (840 мкг/мл)
5,0	0,1 мл (420 мкг/мл)
2,5	0,1 мл (210 мкг/мл)
1,25	0,1 мл (105 мкг/мл)
0,625	0,1 мл (50,25 мкг/мл)

Підготування культур *M. tuberculosis*, що виростили на щільному живильному середовищі та інокуляцію рідкого середовища здійснювали у відповідності до стандартного протоколу визначення МС в системі BACTEC MGIT 960 до препаратів 1-го ряду. Пробірки з препаратами 2-го і резервного ряду разом з контролями розміщували в так звані "транспортувальні" контейнери зі штрих-кодом та вставляли в гнізда системи BACTEC MGIT 960 як "невідомі ліки" з урахуванням особливостей вводу даних для визначення МС. При цьому для тестування кожного з препаратів незалежно

від кількості пробірок з різними його концентраціями використовувався окремий "транспортувальний" контейнер з особистим штрих-кодом.

При інкубації посівів система BACTEC MGIT 960 сигналізувала про "повну" ємність коли показник росту в контролі досягав 400 GU. В цій точці показників GU, за якими здійснюється оцінка росту мікобактерій в пробірках з різним вмістом препаратів 2-го і резервного ряду, система проводила вибірку результатів, дані роздруковували та інтерпретували. Якщо показник GU в пробірках з препаратами був вищим ніж 100 GU при інтенсивності росту в контролі 400, штами визначались резистентними до даних концентрацій препаратів, якщо показник GU в пробірках з препаратами був нижчим ніж 100 GU при інтенсивності росту в контролі 400, штами визначались чутливими до даних концентрацій препаратів.

При коректному виконанні тесту інтенсивність росту в контролі повинна завжди бути постійною величиною — 400 GU. Вивчення ряду концентрацій кожного з препаратів в рідкому живильному середовищі повинно привести до того, щоб експериментальним шляхом знайти таку концентрацію для кожного із вищезазначених препаратів, при якій будуть рости стійкі штами *M. tuberculosis* контрольної панелі з інтенсивністю росту 100 GU та не будуть давати ріст штами *M. tuberculosis* контрольної панелі, які є чутливими. Ця концентрація буде вважатися "критичною" при дослідженні в рідкому середовищі.

Результати тестування на MC штамів *M. tuberculosis* контрольної панелі в системі BACTEC MGIT 960 в рідкому середовищі були проаналізовані для кожної концентрації препаратів 2-го і резервного ряду та явилися основою для планування наступного етапу досліджень.

Результати титрування штамів *M. tuberculosis* на рідкому середовищі в системі BACTEC MGIT 960 з різними концентраціями препаратів наведені в табл. 6.

Як видно із табл. 6, зменшення концентрації Et в рідкому середовищі приводило до збільшення одиниць росту штамів *M. tuberculosis* контрольної панелі, що були стійкими до препаратів 2-го ряду. Звертає на себе увагу той факт, що ріст штамів з MC почався при концентрації Et 10,0 мкг/мл, але оскільки інтенсивність росту була незначною — менше ніж 100 одиниць росту, тому ці штами вважались чутливими до даної концентрації Et, при концентрації препарату 2,5 мкг/мл спостерігався інтенсивний ріст *M. tuberculosis* — 100 GU при інтенсивності у контролі — 400 GU, подальше зменшення концентрації препарату приводило до збільшення інтенсивності росту штамів *M. tuberculosis*. Важливо відмітити, що чутливі штами *M. tuberculosis* контрольної панелі при різних концентраціях Et в рідкому середовищі, росту не дали. Тому, до Et найменша концентрація, при якій спостерігався ріст *M. tuberculosis* 100 GU, вважається «критичною». Це концентрація 5,0 мкг/мл.

Результати дослідження штамів *M. tuberculosis* в рідкому живильному середовищі з різними концентраціями Cm показали, ріст штамів почався при концентрації препарату 5,0 мкг/мл. Але виявився незначним — 41 GU, ріст стійких штамів *M. tuberculosis* — 100 GU відбувався

Таблиця 6

Визначення «критичних» концентрацій препаратів 2-го та резервного ряду для постановки ТМЧ штамів *M. tuberculosis* в рідкому середовищі в системі BACTEC MGIT 960

Штами <i>M. tuberculosis</i> контрольної панелі	Інтенсивність росту (GU) <i>M. tuberculosis</i> при різних концентраціях препаратів (мкг/мл) в рідкому середовищі									Інтенсивність росту в контролі (GU)
	40,0	20,0	10,0	5,0	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,156	
етіонамиду										
Стійкі	0	0	52	100	200	400	400	-	-	400
Чутливі	0	0	0	0	0	0	0	-	-	400
капреоміцину										
Стійкі	0	0	0	41	100	200	400	-	-	400
Чутливі	0	0	0	0	0	0	0	-	-	400
протіонамиду										
Стійкі	0	0	0	58	100	200	400	-	-	400
Чутливі	0	0	0	0	0	0	0	-	-	400
офлоксацину										
Стійкі	-	0	0	0	87	200	400	-	-	400
Чутливі	-	0	0	0	0	0	0	-	-	400
левофлоксацину										
Стійкі	-	0	0	0	74	200	400	-	-	400
Чутливі	-	0	0	0	0	0	0	-	-	400
амікацину										
Стійкі	-	0	0	0	0	71	200	-	-	400
Чутливі	-	0	0	0	0	0	0	-	-	400
лінезоліду										
Стійкі	-	0	0	0	0	79	200	400	-	400
Чутливі	-	0	0	0	0	0	0	0	-	400
моксифлоксацину										
Стійкі	-	0	0	0	0	0	82	200	-	400
Чутливі	-	0	0	0	0	0	0	0	-	400
канаміцину										
Стійкі	-	0	0	68	100	200	400	-	-	400
Чутливі	-	0	0	0	0	0	0	0	-	400

при концентрації Cm 2,5 мкг/мл, інтенсивність в контролі була 400 GU. Ріст чутливих штамів при даній концентрації не спостерігався. Тому для Cm концентрація 2,5 мкг/мл може вважатися "критичною" при визначенні MC *M. tuberculosis* в рідкому середовищі в системі BACTEC MGIT 960.

Аналогічно зменшення концентрації Pt в рідкому середовищі приводило до збільшення GU штамів *M. tuberculosis* контрольної панелі, що були стійкими до цього препарату. Звертає на себе увагу той факт, що ріст штамів почався при концентрації Pt 5,0 мкг/мл, але оскільки інтенсивність росту була незначною — менше ніж 100, тому ці штами вважались чутливими до даної концентрації Pt, при концентрації препарату 2,5 мкг/мл спостерігався інтенсивний ріст *M. tuberculosis* — 100 GU при рості у контролі 400 GU, подальше зменшення концентрації препарату приводило до збільшення інтенсивності росту штамів *M. tuberculosis*. Важливо відмітити, що чутливі штами *M. tuberculosis* контрольної панелі при різних концентраціях Pt в рідкому середовищі росту не дали. Тому, до Pt найменша концентрація, при якій спо-

стерігався ріст *M. tuberculosis* більше ніж 100 GU, вважається «критичною». Це концентрація 2,5 мкг/мл.

Ріст штамів *M. tuberculosis* в присутності препарату Km почався при його концентрації 5,0 мкг/мл. Але виявився незначним — 68 GU, ріст стійких штамів МБТ — 100 GU відбувався при концентрації Km 2,5 мкг/мл, інтенсивність в контролі була 400 GU. Ріст чутливих штамів при даній концентрації не спостерігався. Тому для Km концентрація 2,5 мкг/мл може вважатися «критичною» при визначенні МС *M. tuberculosis* в рідкому середовищі в системі BACTEC MGIT 960.

Результати досліджень показали (табл. 6), що ріст стійких штамів *M. tuberculosis* спостерігався при концентрації Ofx 2,5 мкг/мл, Lfx — при концентрації 2, 5 мкг/мл, Am і Lzd — при концентрації 1,25 мкг/мл, Mfx — при концентрації 0,625 мкг/мл. Але інтенсивність росту штамів *M. tuberculosis* була нижчою, ніж показник 100 GU при інтенсивному рості в контролях. Було виявлено, що в присутності обраних нами концентрацій вищезгаданих препаратів жодний стійкий штам *M. tuberculosis* контрольної панелі не дав інтенсивність росту 100 GU, низькі концентрації препаратів в рідкому середовищі сприяли більш інтенсивному росту *M. tuberculosis* — 200 GU і більше. Тому нами не була визначена «критична» концентрація для цих препаратів.

Для визначення «критичних» концентрацій необхідно було провести подальші дослідження. Для цього потрібно було обрати додаткові концентрації препаратів в інтервалах значень показників, при яких спостерігався би ріст *M. tuberculosis* від мінімальної інтенсивності до 200 GU з метою визначення концентрації препаратів, при якій інтенсивність росту *M. tuberculosis* була б на рівні 100 GU. Для Ofx та Lfx подальші дослідження були проведені в інтервалі концентрацій 2,5–1,25 мкг/мл, для Am, Mfx і Lzd — в інтервалі 1,25–0,25 мкг/мл. Тому 2-й етап наших досліджень був присвячений визначенню «критичних» концентрацій Ofx, Lfx, Mfx, Am і Lzd в рідкому середовищі в системі BACTEC MGIT 960.

Для більш точних результатів в обраних інтервалах концентрацій послідовний шаг розведення складав 0,25 мкг/мл для кожного з вищезгаданих препаратів.

Результати проведених досліджень представлені в табл. 7 і 8.

Таблиця 7

Визначення «критичних» концентрацій офлоксацину і левофлоксацину для ТМЧ *M. tuberculosis* в рідкому середовищі в системі BACTEC MGIT 960

Штами <i>M. tuberculosis</i> контрольної панелі	Інтенсивність росту (GU) <i>M. tuberculosis</i> при різних концентраціях препаратів (мкг/мл) в рідкому середовищі						Інтенсивність росту в контролі (GU)
	2,5	2,25	2,0	1,75	1,5	1,25	
офлоксацин							
Стійкі	0	52	100	142	187	247	400
Чутливі	0	0	0	0	0	0	400
левофлоксацин							
Стійкі	0	63	100	156	192	264	400
Чутливі	0	0	0	0	0	0	400

Результати досліджень показали, що 2,0 мкг/мл є найменшою концентрацією Ofx і Lfx, при якій відбувався інтенсивний ріст стійких штамів МБТ — 100 GU при інтенсивності росту в контролі 400 GU. Ріст чутливих штамів при даній концентрації не спостерігався. Тому, для Ofx і Lfx концентрація 2,0 мкг/мл може вважатися «критичною» при визначенні МС *M. tuberculosis* в рідкому середовищі в системі BACTEC MGIT 960.

Таблиця 8

Визначення «критичних» концентрацій амікацину, лінезоліду і моксифлоксацину для ТМЧ *M. tuberculosis* в рідкому середовищі в системі BACTEC MGIT 960

Штами <i>M. tuberculosis</i> контрольної панелі	Інтенсивність росту (GU) <i>M. tuberculosis</i> при різних концентраціях препаратів (мкг/мл) в рідкому середовищі					Інтенсивність росту в контролі (GU)
	1,25	1,0	0,75	0,5	0,25	
амікацин						
Стійкі	71	100	153	209	256	400
Чутливі	0	0	0	0	0	400
лінезолід						
Стійкі	84	100	167	224	267	400
Чутливі	0	0	0	0	0	400
моксифлоксацин						
Стійкі	32	54	82	100	243	400
Чутливі	0	0	0	0	0	400

Аналогічно при концентрації Am і Lzd в рідкому живильному середовищі 1,0 мкг/мл інтенсивність росту стійких штамів *M. tuberculosis* досягала 100 GU при інтенсивності росту в контролі 400 GU. Ріст чутливих штамів при даній концентрації не спостерігався. Ця концентрація Am і Lzd може вважатися «критичною» при визначенні МС МБТ в рідкому середовищі в системі BACTEC MGIT 960.

Інтенсивний ріст стійких штамів *M. tuberculosis* — 100 GU в присутності препарату Mfx відбувався при його концентрації 0,5 мкг/мл. Ріст чутливих штамів при даній концентрації не спостерігався. Тому для Mfx концентрація 0,5 мкг/мл може вважатися «критичною» при визначенні МС МБТ в рідкому середовищі в системі BACTEC MGIT 960.

Висновки

1. Проведені дослідження, дали можливість визначити «критичні» концентрації препаратів 2-го ряду — етіонаміду (5,0 мкг/мл), капреоміцину (2,5 мкг/мл), протіонаміду (2,5 мкг/мл), амікацину (1,0 мкг/мл), офлоксацину (2,0 мкг/мл), моксифлоксацину (0,5 мкг/мл), левофлоксацину (2,0 мкг/мл), канаміцину (2,5 мкг/мл) і резервного препарату — лінезоліду (1,0 мкг/мл) при використанні їх для тесту медикаментозної чутливості в рідкому середовищі із застосуванням системи BACTEC MGIT 960.

2. Отримані дані є дуже важливими, тому що вперше в Україні дозволили розробити стандартну методику визначення медикаментозної стійкості *M. tuberculosis* з використанням рідкого живильного середовища до широкого спектру препаратів 2-го ряду і резервного препарату — лінезоліду із застосуванням системи BACTEC MGIT 960, яка впроваджена в роботу бактеріологічних лабораторій 3 рівня мережі протитуберкульозних закладів країни.

ЛІТЕРАТУРА

1. Иртуганова, О. А. Автоматизированные методы культурального определения *Mycobacterium tuberculosis* на жидких средах [Текст] / О. А. Иртуганова [и др.] // Проблемы туберкулеза. — 2001. — № 3. — С. 53–56.
2. Алгоритм діагностики хіміорезистентного туберкульозу з комплексним використанням генотипних методів в бактеріологічних лабораторіях протитуберкульозних закладів України [Текст]: методичні рекомендації / ДУ «Національний інститут фізіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України». — Київ, 2013. — 24 с.
3. Застосування автоматизованої системи MGIT для діагностики туберкульозу легень і визначення медикаментозної стійкості мікобактерій [Текст]: методичні рекомендації / Інститут фізіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України. — Київ, 2007. — 24 с.
4. Наказ МОЗ України № 45 [Текст] : Інструкція з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції. — Київ, 2002. — 118 с.
5. Попов, С. А. Основные направления развития лабораторной диагностики туберкулеза [Текст] / С. А. Попов, Т. П. Сабгайда // Туберкулез и болезни легких. — 2012. — № 11. — С. 3–13.
6. Журило, О. А. Система забезпечення якості бактеріологічних досліджень в закладах, що здійснюють мікробіологічну діагностику туберкульозу на різних рівнях надання медичної допомоги Україні [Текст] / О. А. Журило [та ін.] — Кіровоград : Поліум, 2013. — 72 с.
7. Журило, О. А. Стандарти бактеріологічної діагностики туберкульозу в лабораторіях протитуберкульозних закладів України [Текст] / О. А. Журило [та ін.] — Кіровоград : Поліум, 2012. — 190 с.
8. Елисеєв, П. И. Результаты применения методов GenoType MTBDRplus и BACTEC MGIT для определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза [Текст] / П. И. Елисеєв [и др.] // Туберкулез и болезни легких. — 2012. — № 10. — С. 31–34.
9. Фещенко, Ю. І. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Туберкульоз»: особливості його підготовки та чим відрізняється від попередніх клінічних протоколів [Текст] / Ю. І. Фещенко, С. О. Черенко, А. І. Барбова // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. — 2013. — № 2. — С. 8–18.
10. Lu, P. L. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 System in Combination with the MGIT Tbc Identification Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens [Text] / P.-L. Lu [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2011. — V. 49, № 6. — P. 2290–2292.
11. Rusch-Gerdes, S. Multi-center laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials [Text] / S. Rusch-Gerdes [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — № 44. — P. 688–692.

REFERENCES

1. Irtyuganova OA, et al. *Avtomatizirovannyye metody kulturalnogo opredeleniya Mycobacterium tuberculosis na zhidkikh sredakh* (Automated methods for determining *Mycobacterium tuberculosis* culture in liquid media). *Problemy tuberkuleza*. 2001;No 3:53–56.
2. *Algoritm diagnostyky khimiorезystentnogo tuberkulozu z kompleksnym vykorystannam genotypichnykh metodiv v bakteriolohichnykh laboratoriyakh protytuberkuloznykh zakladiv Ukrainy: metodychni rekomendatsiyi*. "Natsionalnyy instytut fizyiatriyi i pulmonologiyi im. F. G. Yanovskogo, NAMN Ukrainy" (Diagnostic algorithm for drugresistant tuberculosis complex using genome and phenotypic methods in bacteriological laboratories TB facilities of Ukraine: guidelines. "National Institute of phthisiology and Pulmonology named by FG Yanovsky, AMS of Ukraine"). Kyiv. 2013;24 p.
3. *Zastosuvannya avtomatyzovanoi systemy MGIT dlya diagnostyky tuberkulozu legen i vyznachennya medykamentoznoi stiykosti: metodychni rekomendatsiyi*. "Natsionalnyy instytut fizyiatriyi i pulmonologiyi im. F. G. Yanovskogo AMN Ukrainy" (The use of automated MGIT system for the diagnosis of pulmonary tuberculosis and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* definition: guidelines. Institute of phthisiology and pulmonology named by FG Yanovsky, AMS of Ukraine.). Kyiv. 2007;24 p.
4. *Nakaz MOZ Ukrainy № 45:Instruktsiya z bakteriolohichnoyi diagnostyky tuberkuloznoyi infektsiyi* (Decree of MOH of Ukraine № 45: Instructions bacteriological diagnosis of tuberculosis infection). Kyiv. 2002;118 p.
5. Popov SA, Sabgayda TP. *Osnovnyye napravleniya razvitiya laboratornoy diagnostiki tuberkuleza* (The main directions of development of the laboratory diagnosis of tuberculosis). *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2012;11:3–13.
6. Zhurilo OA, et al. *Systema zabezpechennya yakosti bakteriolohichnykh doslidzhen zakladakh, shcho zdiysnyuyut mikrobiologichnu diagnostyku tuberkulozu na riznykh rivnyakh nadannya medychnoyi dopomogy Ukrainy* (The quality assurance system bacteriological research institutions in carrying out microbiological diagnosis of tuberculosis at different levels of care in Ukraine). Kirovograd: Polium. 2013;72 p.
7. Zhurilo OA, et al. *Standarty bakteriolohichnoyi diagnostyky tuberkulozu v laboratoriyakh protytuberkuloznykh zakladiv Ukrainy* (Standards bacteriological diagnosis of tuberculosis in the laboratory TB facilities of Ukraine). Kirovograd: Polium. 2013;72 p.
8. Yeliseyev PI, et al. *Rezultaty primeneniya metodov GenoType MTBDRplus i BACTEC MGIT dlya opredeleniya lekarstvennoy chuvstvitelnosti vzbuditelya tuberkuleza* (The results of the application of methods and GenoType MTBDRplus BASTES for MGIT drug susceptibility of TB pathogen). *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2012;11:3–13.
9. Feshchenko Yul, Cherenko SO, Barbova AI. *Unifikovannyi klinichnyy protokol pervynnoyi, vtorynnoyi (spetsializovannoyi) ta tretynnoyi (vysokospetsializovannoyi) medychnoyi dopomogy "Tuberkuloz": osoblyvosti yogo pidgotovky ta chym vidriznyayetsya vid poperednikh klinichnykh protokoliv* (Unified clinical protocols of primary, secondary (specialized) and tertiary (highly specialized) medical care "Tuberculosis", especially its preparation and differs from previous clinical protocols). *Tuberkuloz, legenevi khvoroby, VIL-infektsiya*. 2013;No 2:8–18.
10. Lu PL, et al. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 System in Combination with the MGIT Tbc Identification Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens. *J. Clin. Microbiol*. 2011;49(6):2290–2292.
11. Rusch-Gerdes S, et al. Multi-center laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials. *J. Clin. Microbiol*. 2006;44:688–692.