

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИНИМАЛЬНЫХ ИНГИБИРУЮЩИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ В ЖИДКОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

О. И. АЛЬХОВИК¹, Т. И. ПЕТРЕНКО²

¹ФГБУ «Новосибирский НИИ туберкулеза» МЗ РФ, г. Новосибирск, Россия

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Новосибирск, Россия

Цель исследования: анализ лекарственной устойчивости некоторых видов нетуберкулезных микобактерий (НТМ) методом определения минимальных ингибирующих концентраций в жидкой питательной среде.

Материалы и методы: лекарственную устойчивость НТМ определяли методом минимальных ингибирующих концентраций в жидкой питательной среде. Исследован 51 штамм НТМ, относящийся к видам *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*. Минимальную ингибирующую концентрацию препаратов для медленно растущих НТМ определяли с использованием панели из 13 препаратов (SLOWMYCO), а для быстро растущих микобактерий – из 15 препаратов RAPMYCO Sensititre (Trek Diagnostic System, Thermo Scientific, США). Показано, что большинство исследованных быстро растущих НТМ нечувствительны к цефтриаксону, цефепиму, цефокситину, но чувствительны к амикацину, а медленно растущие НТМ чувствительны к кларитромицину, линезолиду и амикацину.

Ключевые слова: лекарственная устойчивость, нетуберкулезные микобактерии, минимальная ингибирующая концентрация

Для цитирования: Альховик О. И., Петренко Т. И. Опыт применения метода определения минимальных ингибирующих концентраций в жидкой питательной среде для выявления лекарственной устойчивости нетуберкулезных микобактерий // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, № 8. – С. 58-62. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-8-58-62

EXPERIENCE OF USING THE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION METHOD ON LIQUID NUTRITIONAL MEDIA FOR DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING OF NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA

O. I. ALKHOVIK¹, T. I. PETRENKO²

¹Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Goal of the study: analysis of drug resistance of certain species of non-tuberculous mycobacteria through testing by minimum inhibitory concentrations on the fluid nutritional media.

Materials and method: drug resistance of non-tuberculous mycobacteria was tested by the method of minimum inhibitory concentrations on the fluid nutritional media. 51 strains of non-tuberculous mycobacteria from the species of *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. abscessus* were tested. The minimum inhibitory concentration of the drug for slow-growing non-tuberculous mycobacteria was defined using the panel of 13 drugs (SLOWMYCO) and for the fast-growing mycobacteria – the panel of 15 drugs RAPMYCO Sensititre (Trek Diagnostic System, Thermo Scientific, USA) was used. It was proved that the majority of tested fast growing mycobacteria were resistant to ceftriaxone, cefepime, ceftioxin but susceptible to amikacin; and slow growing non-tuberculous mycobacteria were susceptible to clarithromycin, linezolid and amikacin.

Key words: drug resistance, non-tuberculous mycobacteria, minimum inhibitory concentration

For citations: Alkhovik O.I., Petrenko T.I. Experience of using the minimum inhibitory concentration method on liquid nutritional media for drug susceptibility testing of non-tuberculous mycobacteria. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, Vol. 95, no. 8, P. 58-62. (In Russ.) DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-8-58-62

При диагностике микобактериозов существует ряд проблем, так как недостаточно только охарактеризовать вид выделенного микроорганизма, необходимо еще оценить его этиологическую значимость в заболевании человека. До настоящего времени продолжает сохраняться несоответствие клинических потребностей и возможностей лабораторных исследований, опыт в этой области еще весьма ограничен [3].

Если в мировой практике рост частоты микобактериозов не вызывает никаких сомнений, то в России такая оценка не проводилась и соотношение

заболеваемости туберкулезом и микобактериозами неизвестно.

В последние годы в Сибирском федеральном округе России наблюдается снижение заболеваемости туберкулезом: с 2013 по 2015 г. она снизилась с 91,6 до 85,9 на 100 тыс. населения [5], уточненные данные о заболеваемости микобактериозами отсутствуют. При этом за указанный период, по отчетным данным региональных лабораторий, выявление нетуберкулезных микобактерий (НТМ) возросло с 0,4% в 2013 г. до 3,27% в 2015 г. Увеличение заболеваемости микобактериозами может быть истинным,

частично же рост можно объяснить повышением качества лабораторной диагностики НТМ. Если ранее широко использовали микробиологические методы диагностики НТМ, то в настоящее время с успехом применяют более чувствительные и специфические молекулярно-генетические тесты, позволяющие более точно и достоверно провести видовую идентификацию НТМ [2-4].

Основной задачей лабораторной службы теперь является не только идентификация видовой принадлежности НТМ, но и определение их чувствительности к антимикробным и противотуберкулезным препаратам и минимальных ингибирующих концентраций (МИК).

Определение МИК препаратов стало возможным только с появлением технологии культивирования микобактерий на жидких средах. Однако не для всех видов НТМ критерии интерпретации доработаны и освещены в литературе, в частности в рекомендациях Института по клиническому и лабораторным стандартам США (CLSI) [7].

Тест-системы TREK Diagnostic Systems, Thermo Scientific производства США RAPMYCO для быстрорастущих микобактерий, нокардий и др. и SLOWMYCO для медленно растущих микобактерий рекомендованы к использованию Федеральными клиническими рекомендациями по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза и приказом № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания» от 29.12.2014 г. [1, 4, 6].

Цель исследования: анализ лекарственной устойчивости некоторых видов НТМ методом определения МИК в жидкой питательной среде.

Материалы и методы

Методом ПЦР-гибридизации на стрип-полосках (Hain Lifescience GenoType Mycobacterium CM/AS) проведено генотипирование 51 изолята НТМ. Изоляты выделены от пациентов ФБГУ «ННИИТ» и противотуберкулезных стационаров Сибири (Новосибирской, Томской, Кемеровской областей, Алтайского края). По видам НТМ распределялись следующим образом: *M. intracellulare* – 18 изолятов, *M. avium* – 7, *M. kansasii* – 5, *M. gordonae* – 7, *M. fortuitum* – 5, *M. abscessus* – 9 изолятов.

Лекарственную устойчивость определяли культуральным методом с применением наборов TREK Diagnostic Systems, использовали 37 панелей для медленно растущих НТМ (SLOWMYCO), 14 – для быстрорастущих (RAPMYCO). Панель для быстрорастущих НТМ включает двухкратные микроразведения в лунках 15 препаратов (триметоприм/сульфометаксазол, линезолид, ципрофлоксацин, имипенем, моксифлоксацин, цефепим, цефокситин, амоксицилин, амикацин,

цефтриаксон, доксицилин, миномицин, тайгекцилин, тобрамицин, кларитромицин). Панель для медленно растущих позволяет определить МИК 13 препаратов (кларитромицин, ципрофлоксацин, стрептомицин, доксицилин, этамбутол, этионамид, линезолид, триметоприм/сульфометаксазол, рифампицин, рифабутин, изониазид, амикацин, моксифлоксацин).

Определение лекарственной устойчивости НТМ проводили в соответствии с инструкцией производителя: суспензию культуры микобактерий, выросших на плотных питательных средах Левенштейна – Йенсена (в концентрации 5×10^5 КОЕ/мл), инокулировали в ячейки 96 луночных планшетов в количестве 100 мкл и инкубировали в термостате при температуре 37°C до появления роста в контрольных лунках. Результаты интерпретировали с использованием автоматического бактериологического анализатора Sensititre Vizion System TREK Diagnostic Systems (США).

Вычисляли среднюю и ошибку средней для МИК, проводили подсчет резистентных штаммов среди быстрорастущих и медленно растущих НТМ. Методика определения МИК в жидкой питательной среде является единственной регламентированной [6] в России.

Результаты исследования

Частота резистентности исследованных изолятов НТМ к антимикробным препаратам представлена в табл. 1 и 2. Средняя величина МИК антибактериальных препаратов для НТМ приведена в табл. 3 и 4.

Большинство изолятов *M. abscessus* были устойчивы даже к высоким концентрациям це-

Таблица 1. Частота резистентности к антимикробным препаратам быстрорастущих НТМ

Table 1. Frequency of drug resistance in the fast growing non-tuberculous mycobacteria

№ п/п	Препараты	Частота резистентности % (абс.)	
		<i>M. abscessus</i> (n = 9)	<i>M. fortuitum</i> (n = 5)
1	Амикацин	11,11% (1)	0
2	Амоксицилин	55,56% (5)	100% (5)
3	Доксицилин	44,44% (4)	100% (5)
4	Имипенем	66,67% (6)	100% (5)
5	Кларитромицин	11,11% (1)	40% (2)
6	Линезолид	0	20% (1)
7	Миноцилин	44,44% (4)	80% (4)
8	Моксифлоксацин	0	0
9	Тайгекцилин	0	20% (1)
10	Тобрамицин	44,44% (4)	60% (3)
11	Триметоприм	11,11% (1)	20% (1)
12	Цефепим	55,56% (5)	100% (5)
13	Цефокситин	44,44% (4)	80% (4)
14	Цефтриаксон	55,56% (5)	100% (5)
15	Ципрофлоксацин	33,33% (3)	0

Таблица 2. Частота резистентности к антимикробным препаратам медленнорастущих НТМ

Table 2. Frequency of drug resistance in the slow growing non-tuberculous mycobacteria

№ п/п	Препараты	Частота резистентности % (абс.)			
		<i>M. avium</i> (7)	<i>M. intracellulare</i> (18)	<i>M. kansasii</i> (5)	<i>M. gordonae</i> (7)
1	Амикацин	57,14% (4)	16,67 (3)	0	0
2	Доксициклин	57,14% (4)	77,78% (14)	20% (1)	0
3	Кларитромицин	14,29% (1)	5,56% (1)	40% (2)	28,57% (2)
4	Линезолид	71,43% (5)	33,33% (6)	20% (1)	0
5	Моксифлоксацин	28,57% (2)	44,44% (8)	20% (1)	0
6	Триметоприм	57,14% (4)	50% (9)	40% (2)	0
7	Ципрофлоксацин	42,86% (3)	66,67% (12)	60% (3)	0
8	Изониазид	71,43% (5)	83,33% (15)	60% (3)	14,29% (1)
9	Рифампицин	85,71% (6)	72,22% (13)	40% (2)	0
10	Рифабутин	28,57% (2)	33,33% (6)	0	14,29% (1)
11	Стрептомицин	42,86% (3)	38,89% (7)	20% (1)	28,57% (2)
12	Этамбутол	85,71% (6)	38,89% (7)	80% (4)	14,29% (1)
13	Этионамид	71,43% (5)	61,11% (11)	20% (1)	0

Таблица 3. Средняя МИК антимикробных препаратов для быстро растущих НТМ

Table 3. An average minimum inhibitory concentration for the fast growing non-tuberculous mycobacteria

№ п/п	Препараты	МИК, М ± m, мкг/мл	
		<i>M. abscessus</i>	<i>M. fortuitum</i>
1	Амикацин	9,44 ± 6,86	2,00 ± 0,55
2	Амоксилав	30,22 ± 7,15	64 ± 0
3	Доксициклин	8,72 ± 2,40	16 ± 0
4	Имипенем	26,89 ± 7,80	44,80 ± 11,76
5	Кларитромицин	3,21 ± 1,71	17,60 ± 11,89
6	Линезолид	4,11 ± 1,66	4,80 ± 1,36
7	Миноциклин	4,67 ± 1,09	8 ± 0
8	Моксифлоксацин	2,44 ± 0,52	0,40 ± 0,61
9	Тайгециклин	0,77 ± 0,27	1,60 ± 0,66
10	Тобрамицин	5,67 ± 1,51	12,80 ± 1,96
11	Триметоприм	2,75 ± 0,90	2,63 ± 1,84
12	Цефепим	20,89 ± 4,56	32 ± 0
13	Цефокситин	61,33 ± 17,49	89,60 ± 23,52
14	Цефтриаксон	31,11 ± 6,86	64 ± 0
15	Ципрофлоксацин	2,42 ± 0,54	0,35 ± 0,17

Примечание: здесь и в табл. 4

M ± m – среднее значение ± стандартная ошибка

фокситина (МИК 61,33 ± 17,49 мкг/мл), имипенема (МИК 26,89 ± 7,8 мкг/мл), цефтриаксона (МИК 31,11 ± 6,86 мкг/мл). Умеренная чувствительность зафиксирована для ципрофлоксацина (МИК 2,42 ± 0,54 мкг/мл), кларитромицина (МИК 3,21 ± 1,71 мкг/мл), линезолида (МИК 4,11 ± 1,66 мкг/мл), для моксифлоксацина – 2,44 ± 0,52 мкг/мл. Амикацин, наиболее доступный препарат, также показал хорошую эффективность (МИК 9,44 ± 6,86 мкг/мл).

Высокие показатели МИК амоксилава и доксициклина позволяют предположить тотальную

резистентность к ним всех изолятов *M. fortuitum*, средняя МИК цефокситина варьировалась в диапазоне 89,60 ± 23,52 мкг/мл, наблюдалась чувствительность к амикацину (средняя МИК 2,0 ± 0,55 мкг/мл), к линезолиду (средняя МИК 4,8 ± 1,36 мкг/мл).

Большинство изолятов *M. intracellulare* были резистентны к доксициклину (МИК 12,83 ± 1,29 мкг/мл), этионамиду (МИК 15,28 ± 1,3 мкг/мл). Средняя МИК для стрептомицина составила 6,83 ± 0,55 мкг/мл, этамбутола – 4,39 ± 0,67 мкг/мл, амикацина – 8,11 ± 1,13 мкг/мл, моксифлоксацина – 2,74 ± 0,58 мкг/мл, линезолида – 15,17 ± 2,19 мкг/мл, рифабутина – 3,33 ± 0,73 мкг/мл. Наиболее эффективен в отношении *M. intracellulare* был кларитромицин – средняя МИК составила 4,69 ± 3,49 мкг/мл.

Большинство изолятов *M. avium* были устойчивы к триметоприму (средняя МИК 6,57 ± 0,95 мкг/мл), доксициклину (средняя МИК 11,43 ± 2,21 мкг/мл), этамбутолу (средняя МИК 13,86 ± 2,14 мкг/мл), этионамиду (средняя МИК 16,57 ± 1,78 мкг/мл), ципрофлоксацину (средняя МИК 11,14 ± 1,78 мкг/мл). Для линезолида средняя МИК составила 38,29 ± 9,95 мкг/мл, для моксифлоксацина – 3,32 ± 0,97 мкг/мл, для кларитромицина – 13,52 ± 8,67 мкг/мл. При этом стандартные критерии интерпретации устойчивости *M. avium* complex существуют только в отношении макролидов [10].

Установлена чувствительность *M. gordonae* к доксициклину (средняя МИК 0,79 ± 0,21 мкг/мл), линезолиду (средняя МИК 2,57 ± 0,37 мкг/мл), моксифлоксацину (средняя МИК 0,39 ± 0,05 мкг/мл). По остальным препаратам панели нет четких данных по интерпретации [10].

Большинство изолятов *M. kansasii* были чувствительны к фторхинолонам: для моксифлоксацина средняя МИК составила 1,10 ± 0,73 мкг/мл,

Таблица 4. Средняя МИК антимикробных препаратов для медленно растущих НТМ**Table 4. An average minimum inhibitory concentration for the slow growing non-tuberculous mycobacteria**

№ п/п	Препараты	МИК, М ± m, мкг/мл			
		<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. goodnae</i>
1	Амикацин	24,29 ± 7,86	8,11 ± 1,13	8,00 ± 2,19	4,29 ± 0,68
2	Доксициклин	11,43 ± 2,21	12,83 ± 1,29	7,00 ± 2,68	0,79 ± 0,21
3	Кларитромицин	13,52 ± 8,67	4,69 ± 3,49	6,51 ± 3,87	2,41 ± 1,45
4	Линезолид	38,29 ± 9,95	15,17 ± 2,19	9,6 ± 5,6	2,57 ± 0,37
5	Моксифлоксацин	3,32 ± 0,97	2,74 ± 0,58	1,10 ± 0,73	0,39 ± 0,05
6	Триметоприм	6,57 ± 0,95	5,49 ± 0,95	3,6 ± 1,8	0,54 ± 0,09
7	Ципрофлоксацин	11,14 ± 2,39	8,53 ± 1,41	5,20 ± 2,78	1,32 ± 0,50
8	Изониазид	6,43 ± 1,07	6,83 ± 0,55	6,8 ± 1,2	2,71 ± 1,06
9	Рифампицин	7,14 ± 0,86	5,61 ± 0,67	2,25 ± 1,47	1,00 ± 0,28
10	Рифабутин	4,36 ± 1,06	3,33 ± 0,73	1,80 ± 0,58	2,71 ± 0,99
11	Стрептомицин	34,29 ± 8,14	16,50 ± 2,26	9,20 ± 2,94	18,29 ± 8,62
12	Этамбутол	13,86 ± 2,14	4,39 ± 0,67	10,00 ± 2,68	5,00 ± 2,04
13	Этионамид	16,57 ± 1,78	15,28 ± 1,31	9,00 ± 3,22	3,19 ± 1,25

для ципрофлоксацина – $5,20 \pm 0,78$ мкг/мл, для амикацина – $8,0 \pm 5,19$ мкг/мл. Относительно линезолида и изониазида нет четких данных по интерпретации [10].

Выводы

1. Для большинства быстрорастущих НТМ показатели МИК цефтриаксона, цефепима, цефокситина были максимальны, что позволяет предположить неэффективность этих препаратов при использовании для лечения вызванных ими микобактериозов.

2. Амикацин, линезолид, моксифлоксацин, ципрофлоксацин имеют низкие МИК для подавле-

ния роста быстрорастущих НТМ, а кларитромицин, линезолид, амикацин, моксифлоксацин – низкие МИК для медленно растущих НТМ, что делает эти препараты наиболее эффективными.

3. Для воздействия на самый распространенный вид НТМ в этом исследовании – *M. Intracellulare* – наиболее перспективными препаратами были этамбутол (МИК = $4,39 \pm 0,67$ мкг/мл), моксифлоксацин (МИК = $2,74 \pm 0,58$ мкг/мл), рифабутин (МИК = $3,33 \pm 0,73$ мкг/мл), кларитромицин (МИК = $4,69 \pm 3,49$ мкг/мл). При этом часто встречались штаммы, устойчивые к этамбутолу (38,89%), моксифлоксацину (44,44%), рифабутину (33,33%) и редко – к кларитромицину (5,56%).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Conflict of Interests. The authors state that they have no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреевская С. Н., Ларионова Е. Е., Смирнова Т. Г., Андриевская И. Ю., Киселева Е. А., Черноусова Л. Н. Лекарственная чувствительность медленно растущих нетуберкулезных микобактерий // Туб. и болезни легких. – 2016. – Т. 94, № 4. – Р. 43-50.
2. Литвинов В. И., Макарова Н. В., Краснова М. А. Нетуберкулезные микобактерии – М., 2008. – 95 с.
3. Оттен Т. Ф., Васильев А. В. Микобактериоз. – СПб.: Медицинская пресса, 2005. – 224 с.
4. Приказ № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания» от 29.12.2014 г.
5. Ревякина О. В., Алексеева Т. В., Филиппова О. П. Основные показатели противотуберкулезной деятельности в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах. – Новосибирск: Сибмедиздат НГМУ, 2016. – 92 с.
6. Черноусова Л. Н., Севостьянова Э. В., Ларионова Е. Е. и др. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. – Тверь: Триада, 2015. – 46 с.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia and other aerobic actinomycetes; approved Standard – Second Edition // M24 – A2 Wayne, PA: CLSI – 2011. – 76 p.

REFERENCES

1. Andreevskaya S.N., Larionova E.E., Smirnova T.G., Andrievskaya I.Yu., Kiseleva E.A., Chernousova L.N. Drug susceptibility of the slow growing non-tuberculous mycobacteria. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2016, vol. 94, no. 4, pp. 43-50.
2. Litvinov V.I., Makarova N.V., Krasnova M.A. *Netuberkulyoznye mikobakterii*. [Non-tuberculous mycobacteria]. Moscow, 2008, 95 p.
3. Otten T.F., Vasiliev A.V. *Mikobakterioz*. [Mycobacteriosis.] St. Petersburg, Meditsinskaya Pressa Publ., 2005, 224 p.
4. Edict no. 951 by RF MoH as of 29.12.2014 On Approval of Guidelines for Improvement of Respiratory Tuberculosis Diagnostics and Treatment. (In Russ.)
5. Revyakina O.V., Alekseeva T.V., Filippova O.P. *Osnovnye pokazateli protivotuberkuleznoy deyatel'nosti v Sibirskom i Dalnevostochnom federalnykh okrugakh*. [Main indicators of tuberculosis control activities in Siberian and Far Eastern Federal Districts]. Novosibirsk, Sibmedizdat NGMU Publ., 2016, 92 p.
6. Chernousova L.N., Sevostyanova E.V., Larionova E.E. et al. *Federal'nye klinicheskie rekomendatsii po organizatsii i provedeniyu mikrobiologicheskoy i molekulyarno-geneticheskoy diagnostiki tuberkuleza*. [Federal clinical recommendations on organization and implementation of microbiological and molecular-genetic diagnostics of tuberculosis]. Tver, Triada Publ., 2015, 46 p.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia and other aerobic actinomycetes; approved Standard, Second Edition. M24 – A2 Wayne, PA, CLSI, 2011, 76 p.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Альховик Ольга Ивановна

ФГБУ «Новосибирский НИИ туберкулеза» МЗ РФ,
кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник,
врач-бактериолог.

630040, г. Новосибирск, ул. Охотская, д. 81А.

Тел./факс: 8 (383) 203-83-62, 8 (383) 203-83-62.

E-mail: olgaialkhover@mail.ru

Петренко Татьяна Игоревна

ФГБОУ ВО «НГМУ» МЗ РФ,

доктор медицинских наук,

профессор кафедры туберкулеза ФПК и ППВ.

Тел.: 8 (383) 203-83-58.

E-mail: tipetrenko@gmail.com

FOR CORRESPONDENCE:

Olga I. Alkhover

Novosibirsk Tuberculosis Research Institute,

Candidate of Medical Sciences,

Junior Researcher, Bacteriologist.

81a, Okhotskaya St., Novosibirsk, 630040.

Phone/Fax: +7 (383) 203-83-62; +7 (383) 203-83-62.

E-mail: olgaialkhover@mail.ru

Tatiana I. Petrenko

Novosibirsk State Medical University,

Doctor of Medical Sciences,

Professor at FPK and PPV Tuberculosis Department.

Phone: +7 (383) 203-83-58.

E-mail: tipetrenko@gmail.com

Поступила 01.02.2017

Submitted as of 01.02.2017