



Определение чувствительности *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам второго ряда с использованием XDR-теста в клинических исследованиях и в международных циклах профессионального тестирования

Л. В. ДОМОТЕНКО, Т. П. МОРОЗОВА, М. В. ХРАМОВ, А. П. ШЕПЕЛИН

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Московская область, РФ

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: оценка коммерческого XDR-теста при определении чувствительности *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам (ПТП) 2-го ряда в клинических исследованиях и в рамках ежегодных циклов профессионального тестирования, координированных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ).

Материалы и методы. Свежевыделенные на яичных средах культуры *M. tuberculosis* ($n = 90$) из клинических образцов от больных туберкулезом тестировали в равнозначных условиях в системе Bactec MGIT 960 и с помощью XDR-теста. Хорошо охарактеризованные штаммы *M. tuberculosis* ($n = 216$), полученные из супранациональных лабораторий ВОЗ, перед исследованием рекультивировали на среде Миддлбрука 7H10. Лекарственную чувствительность культур с использованием XDR-теста оценивали нитратредуктазным методом.

Результаты исследования. Показано высокое совпадение (96,7-100%) результатов при определении чувствительности 90 изолятов *M. tuberculosis* к канамицину, амикацину, капреомицину и офлоксацину с помощью XDR-теста и системы Bactec MGIT 960 при сравнимых сроках тестирования. Использование XDR-теста для определения лекарственной чувствительности 216 штаммов *M. tuberculosis* в ходе одиннадцати ежегодных циклов профессионального тестирования, координированных супранациональными лабораториями ВОЗ, привело к получению результатов, совпадающих с консенсусными для канамицина, капреомицина, офлоксацина и амикацина в 98,6; 99,4; 99,4; 99,0% случаев соответственно. Для моксифлоксацина и левофлоксацина, дополнительно введенных в состав XDR-теста, получены полностью совпадающие результаты.

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, лекарственная чувствительность, противотуберкулезные препараты второго ряда, нитратредуктазный метод, XDR-тест

Для цитирования: Домотенко Л. В., Морозова Т. П., Храмов М. В., Шепелин А. П. Определение чувствительности *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам второго ряда с использованием XDR-теста в клинических исследованиях и в международных циклах профессионального тестирования // Туберкулез и болезни лёгких. – 2021. – Т. 99, № 8. – С. 13-20. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-8-13-20>

Testing Susceptibility of *M. tuberculosis* to Second Line Anti-Tuberculosis Drugs Using the XDR Test in Clinical Trials and International Professional Testing Cycles

L. V. DOMOTENKO, T. P. MOROZOVA, M. V. KHRAMOV, A. P. SHEPELIN

State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Rospotrebnadzor, Moscow Region, Russia

ABSTRACT

The objective of the study: to evaluate the commercial XDR test for susceptibility testing of *M. tuberculosis* to second line anti-tuberculosis drugs in clinical trials and as part of annual professional testing cycles coordinated by the World Health Organization (WHO).

Subjects and Methods. Cultures of *M. tuberculosis* ($n = 90$) freshly isolated on egg media from clinical samples collected in tuberculosis patients were tested using the Bactec MGIT 960 system and the XDR test under identical conditions. Well-studied strains of *M. tuberculosis* ($n = 216$) obtained from the WHO supranational laboratories were repeatedly cultured on Middlebrook 7H10 medium before the study. The drug susceptibility of the cultures was assessed using the XDR test by the nitrate reductase method.

Results. A high concurrence (96.7-100%) of the results was shown when testing susceptibility of 90 *M. tuberculosis* isolates to kanamycin, amikacin, capreomycin and ofloxacin using the XDR test and the Bactec MGIT 960 system with comparable test periods. The use of the XDR test for drug susceptibility testing of 216 *M. tuberculosis* strains in eleven annual professional testing cycles coordinated by the WHO supranational laboratories provided the results consistent with the consensus one for kanamycin, capreomycin, ofloxacin and amikacin in 98.6, 99.4, 99.4, and 99.0% of cases, respectively. For moxifloxacin and levofloxacin additionally incorporated to the XDR test, completely identical results were obtained.

Key words: *M. tuberculosis*, drug susceptibility, second line anti-tuberculosis drugs, nitrate reductase method, the XDR test

For citations: Domotenko L.V., Morozova T.P., Khranov M.V., Shepelin A.P. Testing susceptibility of *M. tuberculosis* to second line anti-tuberculosis drugs using the XDR test in clinical trials and international professional testing cycles. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2021, Vol. 99, no. 8, P. 13-20. (In Russ.) <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-8-13-20>

Для корреспонденции:

Домотенко Любовь Викторовна
E-mail: domotenko@list.ru

Correspondence:

Lyubov V. Domotenko
Email: domotenko@list.ru

Заболеваемость и смертность от туберкулеза (ТБ) по-прежнему остаются высокими во всем мире и в России, несмотря на тенденцию к снижению [4, 7]. Серьезную проблему представляет туберку-

лез с множественной (МЛУ-ТБ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ, или XDR-ТБ). По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в среднем ШЛУ-ТБ составляет 6%

среди МЛУ-ТБ [7]. Основными факторами высокой распространенности лекарственно-устойчивого ТБ являются недостаточный уровень лабораторной диагностики и эмпирическое лечение пациентов, инфицированных устойчивыми штаммами *M. tuberculosis*, без тестирования чувствительности к лекарственным препаратам [5, 13]. Поэтому использование быстрых и надежных диагностических инструментов с простым экспериментальным протоколом может способствовать снижению распространенности лекарственно-устойчивого ТБ.

Классические методы определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* довольно длительны и требуют 3-4 нед. для получения результатов. Автоматизированная система Bactec 960 MGIT, молекулярно-генетические тесты (биочипы, Xpert MTB / RIF, LPA и др.), тесты на основе применения микобактериофагов существенно ускоряют определение лекарственной устойчивости, но требуют дорогостоящего оборудования, или ограничены небольшим количеством тестируемых детерминант устойчивости и геномных областей, или находятся на стадии научных разработок [1, 3, 8, 10, 12]. Затраты и проблемы интерпретации данных полного геномного секвенирования (WGS) в настоящее время не позволяют широко его использовать в клинической практике [6].

В качестве экономически эффективного и быстрого метода определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* ВОЗ одобрен нитрат-редуктазный метод (НРМ) [16]. Принцип НРМ используется в работе с ТБ-тест-набором для ускоренной идентификации и определения лекарственной чувствительности к противотуберкулезным препаратам 1-го ряда, что позволяет сократить время получения результатов почти в 3 раза по сравнению с методом абсолютных концентраций [2].

Во ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ГНЦ ПМБ) Роспотребнадзора разработана технология промышленного изготовления XDR-теста для ускоренного определения чувствительности микобактерий туберкулеза (МБТ) к изониазиду, рифампицину, амикацину, канамицину, капреомицину и офлоксацину. Определение чувствительности *M. tuberculosis*, как и в случае с ТБ-тест-набором, основано на регистрации нитрат-редуктазной активности *M. tuberculosis*. Растущие культуры МБТ восстанавливают нитрат натрия в нитрит натрия, который регистрируется по цветной реакции с раствором реактива Грисса. XDR-тест зарегистрирован в Росздравнадзоре в качестве медицинского изделия и разрешен к применению в РФ (регистрационное удостоверение № РЗН 2013/ 902).

Цель исследования: оценить XDR-тест при определении чувствительности к противотуберкулезным препаратам 2-го ряда клинических штаммов возбудителя ТБ и панелей контрольных штаммов

M. tuberculosis в рамках ежегодных циклов профессионального тестирования, координированного супранациональной лабораторией ВОЗ.

Материалы и методы

Биоэтические требования. Клинические штаммы, использованные в работе, не содержат персональных данных пациентов, они промаркированы без указания фамилии, даты рождения, адреса проживания, номера истории болезни, личных документов и других именных материалов. В соответствии с требованиями биоэтического комитета Российской Федерации каждый пациент при поступлении в клинику заключал договор с лечебным учреждением, содержащий согласие на проведение лечения и лабораторного обследования.

Штаммы. В испытаниях исследованы 90 свежесделанных изолятов *M. tuberculosis* из клинических образцов (мокрота, промывные воды бронхов, моча), полученных от впервые выявленных и ранее лечившихся больных с различными формами ТБ, и 216 хорошо охарактеризованных штаммов *M. tuberculosis*, присланных одной из двух супранациональных лабораторий ВОЗ, базирующихся в Шведском институте по контролю за инфекционными болезнями и в Институте тропической медицины в Антверпене (Бельгия). Изоляты *M. tuberculosis* ($n = 90$) использованы непосредственно со среды выделения (среды Левенштейна – Йенсена или Финна) через 2-3 нед. после появления видимого роста без дополнительного хранения и субкультивирования. Штаммы *M. tuberculosis*, полученные из супранациональных лабораторий ВОЗ, перед исследованием субкультивированы на среду Миддлбука 7Н10 и инкубированы в течение 2-3 нед.

Методика определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* с помощью XDR-теста. Бактериальные суспензии готовили суспендированием изолятов *M. tuberculosis* в 0,3 мл 0,2%-ного стерильного раствора твина-80 на Vortex со стеклянными бусами диаметром 1 мм. Мутность суспензий доводили до 5 ЕД по стандартному образцу мутности ОСО-42-28-86 П и затем разводили 1 : 10 стерильным 0,9%-ным раствором натрия хлорида. По 0,2 мл полученной суспензии инокулировали в каждый флакон XDR-теста с помощью шприца путем прокалывания резиновой пробки. Засеянные флаконы укладывали в наклонном положении в упаковочную коробку, которую затем помещали в термостат при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Через 8 сут инкубации добавляли 0,5 мл 7,5%-ного раствора реактива Грисса в один из двух контрольных флаконов. В случае появления в нем интенсивной розовой или красной окраски (не менее 3+ по цветовой шкале) вносили по 0,5 мл 7,5%-ного раствора реактива Грисса во все оставшиеся флаконы и проводили визуальный учет результатов

по появлению окраски. Если в контрольном флаконе окраска менее 3+, этот флакон уничтожали, остальные продолжали инкубировать до 10-12 сут, затем вносили раствор реактива Грисса в оставшиеся флаконы и проводили учет результатов по наличию окраски. Культура считалась чувствительной к противотуберкулезным препаратам (ПТП), если во флаконе с ним не наблюдалось появления окраски (при интенсивной окраске в контрольном флаконе). Культура считалась устойчивой при появлении окраски (от 1+ до 5+).

Определение лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* на автоматизированной системе Bactec MGIT 960 проводили в равнозначных условиях в соответствии с инструкцией производителя к следующим конечным концентрациям ПТП: амикацин – 1,0 мг/л, канамицин – 2,5 мг/л, капреомицин – 2,5 мг/л, офлоксацин – 2 мг/л.

Анализ результатов. При анализе результатов оценивали диагностические характеристики XDR-теста: чувствительность (способность определять истинную лекарственную устойчивость), специфичность (способность определять истинную лекарственную чувствительность), эффективность (доля правильных результатов к общему числу результатов) [15]. За истинную лекарственную чувствительность/устойчивость принимали долю числа совпадающих устойчивых/чувствительных штаммов, определенных XDR-тестом и референтным методом, к общему числу устойчивых/чувствительных штаммов, выявленных референтным методом. Диагностические характеристики определены для каждого ПТП отдельно. Для штаммов с несовпадающими результатами в циклах 16 и 20 проведено секвенирование соответствующих генов по Сэнгеру [11].

Результаты исследования

Клинические испытания. XDR-тест представляет собой набор готовых к использованию питательных сред, содержащих противотуберкулезные препараты: 1 мкг/мл изониазида, 40 мкг/мл рифампицина, 30 мкг/мл канамицина, 30 мкг/мл амикацина, 30 мкг/мл капреомицина и 3 мкг/мл офлоксацина и без препаратов (контроль). Питательные среды для определения чувствительности к изониазиду и рифампицину, входящие в состав XDR-теста, аналогичны средам, входящим в состав ТБ-тест-набора, результаты оценки качества которых ранее опубликованы [2]. В данной статье результаты определения чувствительности *M. tuberculosis* к ПТП 1-го ряда не приводятся.

Клинические исследования XDR-теста проводены в Московском научно-практическом центре борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения г. Москвы. В ходе испытаний протестировано 90 изолятов с различными спектрами лекарственной чувствительности. Диагностические характеристики XDR-теста, полученные в ходе испытаний, приведены в табл. 1.

Анализ представленных в табл. 1 данных показывает, что процент совпадений (эффективность) результатов, полученных с использованием XDR-теста и Bactec MGIT 960, для всех четырех исследованных противотуберкулезных препаратов достаточно высок и составляет 96,7% для канамицина и капреомицина, 97,8% для офлоксацина и 100% для амикацина. Чувствительность и специфичность XDR-теста также имеют высокие значения: 100 и 100% для амикацина, 92,3 и 97,4% для канамицина и капреомицина, 92,3 и 98,7% для офлоксацина. Время получения результатов с помощью XDR-те-

Таблица 1. Результаты сравнительного тестирования чувствительности изолятов *M. tuberculosis* с использованием XDR-теста и Bactec MGIT 960

Table 1. Results of comparative susceptibility testing of *M. tuberculosis* isolates using the XDR test and Bactec MGIT 960

ПТП	XDR-тест	Bactec MGIT 960			Чувствительность, %	Специфичность, %	Эффективность, %
		Ч	У	общее количество			
Амикацин	Ч	76 ^{a)}	0 ^{b)}	76	100	100	100
	У	0 ^{c)}	14 ^{d)}	12			
	Общее количество	76	14	90 ^{e)}			
Канамицин	Ч	75	1	76	92,3	97,4	96,7
	У	2	12	14			
	Общее количество	77	13	90			
Капреомицин	Ч	75	1	76	92,3	97,4	96,7
	У	2	12	14			
	Общее количество	77	13	90			
Офлоксацин	Ч	76	1	77	92,3	98,7	97,8
	У	1	12	13			
	Общее количество	77	13	90			

Примечание: Ч – чувствительные изоляты, У – устойчивые изоляты; чувствительность – отношение «d» к «b+d»; специфичность – отношение «a» к «a+c»; эффективность – отношение «a+d» к «e»

ста составляет 9,5 сут (диапазон 8-14) и для Вастес MGIT 960 – 6,8 сут (диапазон 4-9).

Тестирование в рамках ежегодных циклов профессионального тестирования. XDR-тест использован для определения чувствительности хорошо охарактеризованных штаммов *M. tuberculosis* к ПТП 2-го ряда в рамках 11 ежегодных циклов ВОЗ (№ 15-25) по профессиональному тестированию в период с 2009 по 2020 г. Каждая панель содержала по 20 штаммов микобактерий. В семи раундах она состояла только из штаммов *M. tuberculosis*. В последних четырех раундах панель представлена 9 парами повторяющихся штаммов *M. tuberculosis*, одним непарным штаммом *M. tuberculosis* и одним штаммом, принадлежащим к нетуберкулезным микобактериям (НТМБ).

Всего протестировано 216 штаммов *M. tuberculosis* с различным спектром лекарственной устойчивости и примерно 50% с резистентностью к каждому противотуберкулезному препарату. Начиная с 22-го цикла все штаммы *M. tuberculosis* охарактеризованы молекулярно-генетическими методами на наличие мутаций в генах, ответственных за устойчивость к ПТП: для аминогликозидов и капреомицина в генах *rrs 1400*, *eis* и *tlyA*, для фторхинолонов – в генах *gyrA* и *gyrB* (табл. 2). В циклах 24 и 25 за эталон генотипического тестирования стали принимать результаты полногеномного секвенирования.

В двух циклах № 24-25 определение чувствительности к капреомицину и офлоксацину организаторами заменено тестированием чувствительности к левофлоксацину (LVX) и моксифлоксацину (MFX). Для этого готовили дополнительные флаконы XDR-теста с данными препаратами в концен-

трациях 2,0 и 1,0 мг/л соответственно. Значения критических концентраций левофлоксацина и моксифлоксацина для метода абсолютных концентраций нормативными документами не регламентированы. Поэтому в работе использованы критические концентрации, рекомендованные ВОЗ для среды Левенштейна – Йенсена при определении лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* методом пропорций [14].

Тестирование проводили следующим образом: лаборатория ГНЦ ПМБ получала панели зашифрованных штаммов *M. tuberculosis* и НТМБ, анализировала их слепым методом, а затем полученные результаты отправляла в адрес супранациональной лаборатории ВОЗ по ТБ. Супранациональная лаборатория сравнивала присланные результаты с консенсусными, полученными региональными супранациональными лабораториями (их количество варьировало от 29 до 35) с использованием фенотипических методов. Для фенотипического тестирования лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* использовали Bactec MGIT 960, метод пропорций на среде Левенштейна – Йенсена, метод пропорций на агаре Миддлбука, метод абсолютных концентраций, метод определения коэффициента резистентности. Консенсусные результаты фенотипического тестирования принимались за эталон, за исключением штаммов с межлабораторным совпадением менее 80%.

Из 216 штаммов, протестированных в рамках всех 11 циклов, из-за низкой межлабораторной конкордантности исключены из анализа по 2 результата для канамицина, амикацина, капреомицина, офлоксацина и 1 результат для моксифлоксацина. Итого

Таблица 2. Мутации, ассоциированные с устойчивостью к ПТП 2-го ряда, *M. tuberculosis* в циклах профессионального тестирования

Table 2. Mutations associated with *M. tuberculosis* resistance to second line anti-tuberculosis drugs in professional testing cycles

Гены	Мутации, выявленные секвенированием по Сэнгеру или LPA		Мутации, выявленные полногеномным секвенированием для 10 из 20 штаммов <i>M. tuberculosis</i>	
	22-й цикл	23-й цикл	24-й цикл	25-й цикл
<i>rrs 1400</i>	A1401G (n = 3); Thr1208Gly (n = 1); Ala1401Gly (n = 1); G -10A (n = 2)	A1401G (n = 5)	A1401G (n = 4)	A1401G (n = 4)
<i>eis</i>	НД	Wildtype (n = 19)	Wildtype (n = 10)	Wildtype (n = 10)
<i>tlyA</i>	Gly196Glu (n = 1) pos. 33 A->G (n = 2)	Insertion G 132(GAGG) (n = 1); pos. 33 A->G (n = 2)	НД	НД
<i>gyrA</i>	Ala90Val (n = 4); Ser91Pro+ Asp94Asn (n = 1); Ala90Val+ Ser91Pro (n = 1)	Ala90Val (n = 5); Asp94Ala (n = 1); Ser91Pro+Asp94Asn (n = 1); Asp94Gly (n = 2)	Ala90Val (n = 4); Asp94Gly (n = 1); Ser91Pro+Asp94Asn (n = 1)	Glu21Gln + Ala90Val + Ser95Thr + Gly668Asp (n = 2); Glu21Gln + Ser91Pro+ Asp94Asn+Ser95Thr + Gly668Asp (n = 1); Glu21Gln + Asp94Gly +Ser95Thr +Gly668Asp (n = 1); Glu21Gln + Ser95Thr +Ala210Val + Gly668Asp (n = 1); Glu21Gln + V15:AA16+ Gly668Asp (n = 1); Gly668Asp (n = 1)
<i>gyrB</i>	Wildtype (n = 19)	Wildtype (n = 19)	Wildtype (n = 10)	Wildtype (n = 10)

Обозначение: НД – нет данных; n – количество штаммов

в ходе 11 циклов анализировали 214 данных для канамицина и амикацина, 176 – для капреомицина и офлоксацина, 38 – для левофлоксацина и 37 – для моксифлоксацина. Результаты определения лекарственной чувствительности штаммов *M. tuberculosis* к ПТП 2-го ряда в 11 циклах (№ 15-25), определенные с помощью XDR-теста, в сравнении с консенсусными данными супранациональных лабораторий, представлены в табл. 3. В табл. 3 серым цветом выделены ячейки для тех циклов, в рамках которых тестирование чувствительности панельных штаммов *M. tuberculosis* к капреомицину, офлоксацину, левофлоксацину и моксифлоксацину не проводилось.

Как видно из представленных данных в табл. 3, результаты исследований по четырем ПТП (КМ, АМК, САР и ОФХ) полностью совпали с консенсусными в 8 циклах. Расхождения зарегистрированы для 5 тестов из 856 (0,6%). Для канамицина – по двум штаммам: один штамм в цикле № 16 определен как устойчивый XDR-тестом при чувствительном консенсусном результате, а один устойчивый штамм по консенсусным данным в цикле № 20, напротив, определен как чувствительный. Для амикацина получено несовпадение результа-

тов по одному чувствительному штамму в цикле № 16. Для капреомицина один чувствительный штамм в цикле № 16 идентифицирован как устойчивый, а для офлоксацина один устойчивый штамм в цикле № 20 определен как чувствительный. Для моксифлоксацина и левофлоксацина результаты определения оказались полностью идентичны консенсусным. Полное совпадение результатов показывает принципиальную возможность использования выбранных значений критических концентраций для данных ПТП, а также возможность модификации XDR-теста за счет расширения перечня ПТП или замены некоторых ПТП более актуальными.

Устойчивость штаммов *M. tuberculosis* с несовпадающими результатами к канамицину, амикацину, капреомицину и офлоксацину не подтверждена наличием мутаций в генах, ответственных за лекарственную устойчивость, при ПЦР-секвенировании (табл. 4). Обнаруженная мутация AGC–ACC в кодоне 95 (Ser95Thr) гена *gyrA* считается генетическим полиморфизмом, связанным с лекарственной устойчивостью [9].

Несмотря на несовпадающие результаты, диагностические характеристики XDR-теста, полученные

Таблица 3. Результаты определения лекарственной чувствительности штаммов *M. tuberculosis* к ПТП 2-го ряда в 11 циклах (№№ 15-25) профессионального тестирования, определенные с помощью XDR-теста, в сравнении с консенсусными данными супранациональных лабораторий

Table 3. The results of drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* strains to second line anti-tuberculosis drugs in 11 professional testing cycles (no. 15-25) when the XDR test was used, in comparison with the consensus data of supranational laboratories

Устойчивость/ чувствительность <i>M. tuberculosis</i>	Количество устойчивых и чувствительных штаммов <i>M. tuberculosis</i> к ПТП 2-го ряда в циклах профессионального тестирования											
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Общее количество**
Канамицин												
У	9/9*	5/6	5/5	8/8	8/8	6/5	7/7	7/7	8/8	6/6	8/8	76+1/76+1
Ч	11/11	15/14	15/15	12/12	12/12	14/15	13/13	10/10	11/11	13/13	11/11	136+1/136+1
Амикацин												
У	6/6	3/4	5/5	4/4	4/4	5/5	6/6	7/7	8/8	6/6	8/8	62+0/62+1
Ч	14/14	17/16	15/15	16/16	16/16	15/15	14/14	10/10	11/11	13/13	11/11	151+1/151+0
Капреомицин												
У	8/8	4/5	6/6	4/4	5/5	5/5	7/7	7/7	8/8			54+0/54+1
Ч	12/12	16/15	14/14	16/16	15/15	15/15	13/13	10/10	11/11			121+1/121+0
Офлоксацин												
У	2/2	3/3	2/2	3/3	5/5	6/5	8/8	8/8	9/9			45+1/45+0
Ч	18/18	17/17	18/18	17/17	15/15	14/15	12/12	9/9	10/10			130+0/130+1
Левофлоксацин												
У										12/12	8/8	20+0/20+0
Ч										7/7	11/11	18+0/18+0
Моксифлоксацин												
У										12/12	8/8	20+0/20+0
Ч										6/6	11/11	17+0/17+0

Примечание: У – устойчивый штамм; Ч – чувствительный штамм; * числитель – консенсусные данные супранациональных референс-лабораторий по туберкулезу, знаменатель – результаты XDR-теста; ** общее количество чувствительных и устойчивых штаммов, представленное в виде суммы совпадающих результатов XDR-теста с консенсусными данными (количество истинно чувствительных или устойчивых штаммов) и количества несовпадающих результатов. Серым цветом выделены ячейки для тех циклов, в рамках которых тестирование чувствительности панельных штаммов *M. tuberculosis* к капреомицину, офлоксацину, левофлоксацину и моксифлоксацину не проводилось

в ходе всех проведенных циклов профессионального тестирования, достаточно высокие (табл. 5).

Из приведенных в табл. 5 данных видно, что при тестировании чувствительности 214 штаммов *M. tuberculosis* к канамицину и амикацину, 176 штаммов к капреомицину и офлоксацину, 38 штаммов к левофлоксацину и 37 штаммов к моксифлоксацину получены высокие значения чувствительности, специ-

фичности и эффективности, находящиеся в диапазонах 96,8-100; 99,2-100; 98,6-100% соответственно.

Заключение

В ходе сравнительных исследований XDR-теста и автоматизированной системы Bactec MGIT 960 показано высокое совпадение результатов

Таблица 4. Анализ несовпадающих результатов

Table 4. Analysis of inconsistent results

Несовпадения по ПТП	Цикл	Консенсусные данные	Данные XDR-теста	Мутации
Канамицин	16	Ч	У	<i>rrs</i> : дикий штамм; <i>eis</i> : НД
	20	У	Ч	<i>rrs</i> : дикий штамм; <i>eis</i> : НД
Амикацин	16	Ч	У	<i>rrs</i> : дикий штамм; <i>eis</i> : НД
Капреомицин	16	Ч	У	<i>tlyA</i> : дикий штамм; <i>tlyB</i> : НД <i>rrs</i> : дикий штамм; <i>eis</i> : НД
Офлоксацин	20	У	Ч	<i>gyrA</i> : 95 AGC→ACC

Таблица 5. Диагностические характеристики XDR-теста в одиннадцати циклах профессионального тестирования

Table 5. Diagnostic characteristics of the XDR test in eleven professional testing cycles

ПТП	Чувствительность, %	Специфичность, %	Эффективность, %
Канамицин	98,7	99,3	99,1
Капреомицин	100	99,2	99,4
Офлоксацин	97,8	100	99,4
Амикацин	100	99,3	99,5
Левофлоксацин	100	100	100
Моксифлоксацин	100	100	100

при определении чувствительности 90 изолятов *M. tuberculosis* к канамицину, амикацину, капреомицину и офлоксацину. Сроки определения лекарственной чувствительности МБТ с помощью XDR-теста сравнимы со сроками определения на Bactec MGIT 960.

При использовании XDR-теста для определения лекарственной чувствительности 216 штаммов *M. tuberculosis* в ходе 11 ежегодных циклов профессионального тестирования, координированных супранациональными лабораториями ВОЗ, получены результаты, совпадающие с консенсусными для канамицина, капреомицина, офлоксацина и

амикацина в 98,6; 99,4; 99,4; 99,0% случаев соответственно.

Для моксифлоксацина и левофлоксацина, которые дополнительно введены в состав XDR-теста, в двух циклах получены полностью совпадающие результаты. Положительные результаты и универсальность технологии производства показывают принципиальную возможность модифицировать XDR-тест за счет изменения перечня ПТП в соответствии с требованиями современных стандартов. Для внедрения в производство модифицированного XDR-теста будут проведены дополнительные клинические испытания с использованием изолятов *M. tuberculosis*.

Благодарность. Авторы выражают искреннюю признательность Г. Е. Фрейману, И. Р. Дорожковой за помощь в проведении исследований.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Gratitude. The authors express their sincere gratitude to G.E. Freyman and I.R. Dorozhkova for their assistance in this research.

Funding. This research was funded within the sectoral program of Rosпотребнадзор.

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

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

ЛИТЕРАТУРА

REFERENCES

- Беспятых Ю. А., Шитиков Е. А., Зименков Д. В., Кулагина Е. В., Грядун Д. А., Носова Е. Ю. и др. Определение лекарственной устойчивости и генотипирование клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* при помощи экспериментального набора «ТБ-ТЕСТ» // Пульмонология. – 2013. – Т. 4. – С. 77-81.
- Домотенко Л. В., Морозова Т. П., Шемякин И. Г., Шепелин А. П. Опыт использования ТБ тест-набора для ускоренного определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 2. – С. 122-130. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-122-130>.
- Лепенкова М. Б., Арустамова Г. А., Аляпкина Ю. С., Филиппов П. Н., Лазебный С. В., Владимирский М. А. Тест-система для фенотипического определения лекарственной чувствительности клинических изолятов микобактерий туберкулеза на основе применения микобактериофагов // Туб. и болезни легких. – 2020. – Т. 98, № 8. – С. 14-22. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-8-14-22>.
- О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: Государственный доклад. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020. – 299 с.
- Gandhi N. R., Nunn P., Dheda K., Schaaf H. S., Zignol M., Soolingen D., Jensen P., Bayona J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: A threat to global control of tuberculosis // Lancet. – 2010. – № 375. – P. 1830-1843. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60410-2.
- Genestet C., Hodille E., Berland J.-L. et al. Whole genome sequencing in drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in routine practice in Lyon, France // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2020. – № 55. 105912. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105912.
- Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. – 208 p. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.
- Grace Lin S.-Y. G., Desmond E., Bonato D., Gross W., Siddiqi S. Multicenter evaluation of BACTEC MGIT 960 system for second-line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47, № 11. – P. 3630-3634. Doi: 10.1128/JCM.00803-09.
- Oudghiri A., Karimi H., Chetoui F., Zakham F. et al. Molecular characterization of mutations associated with resistance to second-line tuberculosis drug among multidrug-resistant tuberculosis patients from high prevalence tuberculosis city in Morocco // BMC Infect. Dis. – 2018. – № 18. – P. 98.
- Ruvandhi R., Nathavitharana P., Cudahy T., Samuel G. Accuracy of line probe assays for the diagnosis of pulmonary and multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis // Eur. Resp. J. – 2017. – № 49. – 1601075.
- Sanger F. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1977. – Vol. 74, № 12. – P. 5463-5467.
- Seo Y. S., Kang J. M., Kim D. S. et al. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis in children: a systematic review and meta-analysis // BMC Infect. Dis. 2020. – № 20. – P. 14. doi.org/10.1186/s12879-019-4745-1.
- Siddiqi S., Ahmed A., Asif S., Behera D. et al. Direct drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* for rapid detection of multidrug resistance using the BACTEC MGIT 960 System: A Multicenter Study // J. Clin. Microbiol. – 2012. – № 50. – P. 435-440. doi: 10.1128/JCM.05188-11.
- Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. – WHO/CDS/TB/2018.24. – 2018. – 39 p. URL: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275469/9789241514842-eng.pdf?ua=1>.
- Toman K. Sensitivity, specificity and predictive value of diagnostic tests // Bull. Int. Union Tuberc. – 1981. – № 5. – P. 18-28.
- World Health Organization. Noncommercial culture and drug susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis. – 2011. World Health Organization, Geneva, Switzerland. URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44601/9789241501620_eng.pdf?sequence=1.
- Bespyatykh Yu.A., Shitikov E.A., Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Gryadunov D.A., Nosova E.Yu. et al. Drug susceptibility testing and genotyping of clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* using the experimental toolkit of TB-TEST. *Pulmonologiya*, 2013, vol. 4, pp. 77-81. (In Russ.)
- Domotenko L.V., Morozova T.P., Shemyakin I.G., Shepelin A.P. Experience of using TB test kit for the rapid drug susceptibility testing of *M. tuberculosis*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 122-130. (In Russ.) doi: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-122-130>.
- Lapenkova M.B., Arustamova G.A., Alyapkina Yu.S., Filippov P.N., Lazebnyi S.V., Vladimirovskiy M.A. Mycobacteriophage-based test system for phenotypic drug sensitivity of clinical isolates of tuberculous mycobacteria. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2020, vol. 98, no. 8, pp. 14-22. (In Russ.) <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-8-14-22>.
- O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiyskoy Federatsii v 2019 year. Gosudarstvennyy doklad. [State report on the state on sanitary and epidemiological welfare of population in the Russian Federation in 2019]. Moscow, Federal Surveillance Service for Protection of Consumers' Rights and Well-being Publ., 2020. 299 p.
- Gandhi N.R., Nunn P., Dheda K., Schaaf H.S., Zignol M., Soolingen D., Jensen P., Bayona J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: A threat to global control of tuberculosis. *Lancet*, 2010, no. 375, pp. 1830-1843. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60410-2.
- Genestet C., Hodille E., Berland J.L. et al. Whole genome sequencing in drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in routine practice in Lyon, France. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2020, no. 55, 105912. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105912.
- Global tuberculosis report 2020. Geneva, World Health Organization; 2020. 208 p. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.
- Grace Lin S.Y.G., Desmond E., Bonato D., Gross W., Siddiqi S. Multicenter evaluation of BACTEC MGIT 960 system for second-line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, no. 11, pp. 3630-3634. doi: 10.1128/JCM.00803-09.
- Oudghiri A., Karimi H., Chetoui F., Zakham F. et al. Molecular characterization of mutations associated with resistance to second-line tuberculosis drug among multidrug-resistant tuberculosis patients from high prevalence tuberculosis city in Morocco. *BMC Infect. Dis.*, 2018, no. 18. (In Russ.) pp. 98.
- Ruvandhi R., Nathavitharana P., Cudahy T., Samuel G. Accuracy of line probe assays for the diagnosis of pulmonary and multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Resp. J.*, 2017, no. 49. (In Russ.) 1601075.
- Sanger F. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463-5467.
- Seo Y.S., Kang J.M., Kim D.S. et al. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis in children: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.*, 2020, no. 20, pp. 14. doi.org/10.1186/s12879-019-4745-1.
- Siddiqi S., Ahmed A., Asif S., Behera D. et al. Direct drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* for rapid detection of multidrug resistance using the BACTEC MGIT 960 System: A Multicenter Study. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, no. 50, pp. 435-440. doi: 10.1128/JCM.05188-11.
- Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. WHO/CDS/TB/2018.24. 2018, 39 p. Available: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275469/9789241514842-eng.pdf?ua=1>.
- Toman K. Sensitivity, specificity and predictive value of diagnostic tests. *Bull. Int. Union Tuberc.*, 1981, no. 5, pp. 18-28.
- World Health Organization. Noncommercial culture and drug susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis. 2011, World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44601/9789241501620_eng.pdf?sequence=1.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, Московская обл., г. о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А».

Домотенко Любовь Викторовна

кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник отдела диагностических препаратов.

E-mail: domotenko@list.ru

Морозова Татьяна Павловна

научный сотрудник отдела диагностических препаратов.

E-mail: morozova@obolensk.org

Храмов Михаил Владимирович

кандидат медицинских наук, заместитель директора по внедрению и развитию.

E-mail: khramov@obolensk.org

Шепелин Анатолий Прокопьевич

доктор биологических наук, заместитель директора по научно-производственной деятельности.

E-mail: shepelin.rabota@rambler.ru

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Rosпотребнадзор, A Block Territory, Obolensk, Serpukhov District, Moscow Region, 142279.

Lyubov V. Domotenko

Candidate of Chemical Sciences, Leading Researcher of Diagnostic Agents Department.

Email: domotenko@list.ru

Tatiana P. Morozova

Researcher of Diagnostic Agents Department.

Email: morozova@obolensk.org

Mikhail V. Khramov

Candidate of Medical Sciences, Deputy Director for Implementation and Development.

Email: khramov@obolensk.org

Anatoliy P. Shepelin

Doctor of Biological Sciences, Deputy Director for Research and Production Activities.

Email: shepelin.rabota@rambler.ru

Поступила 15.02.2021

Submitted as of 15.02.2021