

*На правах рукописи*

**Носова Елена Юрьевна**

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ  
ПРЕПАРАТАМ.  
МЕТОДЫ И АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ**

1.5.11. – микробиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»)

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, профессор,  
академик РАН

**Литвинов Виталий Ильич**

**Официальные оппоненты:**

**Чернуха Марина Юрьевна** - доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций, руководитель лаборатории

**Мавзютов Айрат Радикович** - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии, заведующий

**Быков Анатолий Сергеевич** - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, профессор кафедры

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

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

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

**Борисова Ольга Юрьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Нарастание лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) к антибактериальным препаратам (АБП) и повсеместное распространение устойчивых штаммов в мире, в том числе в большинстве регионов РФ, является одной из главных проблем, осложняющих борьбу с туберкулёзом (ТБ) (World Health Organization (WHO) Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis, 2014; Trauner A. et al., 2014; Васильева И.А. и др., 2017; Богородская Е.М. и др., 2019).

Тяжесть заболевания ТБ значительно увеличивается, прежде всего, при множественной (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) возбудителя и требует более длительного лечения препаратами, которые намного дороже, имеют ограниченную эффективность и большое количество побочных эффектов (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs-worldwide, 2000-2004, 2006; World Health Organization (WHO) Guidelines for the surveillance of drug resistance in tuberculosis, 2009; Haydel S. et al., 2010).

Для предотвращения распространения лекарственно-устойчивых микобактерий туберкулёза является важным своевременное максимально быстрое выявление возбудителя заболевания и определение профиля его лекарственной чувствительности к антибактериальным препаратам.

Современная лабораторная диагностика ТБ основана на использовании ускоренных микробиологических методов, к которым относятся молекулярно-генетические технологии и автоматизированная система Bactec MGIT 960 (Gryadunov D. et al., 2005; Владимирский М.А. и др., 2008; Hillemann D. et al., 2009; Marlowe E. et al., 2011; Белоусова К.В., 2013; Brossier F. et al., 2016; Черноусова Л.Н. и др., 2017). Однако, несмотря на их широкое применение в микробиологических лабораториях фтизиатрического профиля надёжность получаемых результатов не всегда соответствует приемлемому уровню. Существуют проблемы оценки чувствительности МБТ к рифампицину (R) и этамбутолу (Emb) в системе Bactec MGIT 960 (Kim S.J., 2005; Schön T. et al., 2009; Rigouts L. et al., 2013). А в отношении основных препаратов второго ряда (фторхинолонов и инъекционных препаратов) единых стандартов и готовых зарегистрированных (сертифицированных) наборов до сих пор нет, а разрабатываемые «критические концентрации» (КК) носят рекомендательный характер (World Health Organization (WHO) Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs, 2008; World Health Organization (WHO) Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis, 2014).

В свою очередь, высокочувствительные молекулярно-генетические технологии предназначенные, в первую очередь, для выявления генетических детерминант устойчивости к фторхинолонам (ФХ), аминогликозидам (АГ) и капреомицину (Cm) имеют ряд ограничений, главным из которых является анализ только генов *gyrA* (устойчивость к фторхинолонам) и *rrs* (устойчивость к инъекционным препаратам) с включением не всех мутаций, что приводит к увеличению расхождений с результатами бактериологического исследования (Brossier F. et al., 2010).

В последние годы также изменились представления о критериях оценки лекарственной чувствительности МБТ к АБП по установленным КК, приводящие, в некоторых случаях, к расхождению результатов между различными

микробиологическими методами (Kim S.J., 2005; Banu S. et al., 2014; Coeck N. et al., 2016).

Таким образом, проблема диагностики лекарственной чувствительности МБТ к АБП является актуальной и определяет необходимость совершенствования методических подходов с применением молекулярно-генетических (МГМ) и бактериологических методов для более точного определения лекарственной чувствительности.

### **Степень разработанности темы**

За последние годы в мировой литературе накоплены обширные сведения о механизмах развития приобретённой лекарственной устойчивости (ЛУ) МБТ, связанные с адаптацией возбудителя к лекарственным препаратам за счёт появления новых мутаций не только в известных генах-мишенях, но и в новых (Von Groll A. et al., 2009; Georghiou S.B. et al., 2012; Malik S. et al., 2012; Xu Y. et al., 2015). В случае развития устойчивости МБТ к ФХ это появление мутаций в гене *gyrB*, наряду с заменами в *gyrA* (Takiff H. et al., 1994; Wang J-Y. et al., 2007). А устойчивость только к канамицину (Km) с мутациями в промоторной области гена *eis* (Enhanced Intracellular Survival protein) (Hillemann D. et al., 2009, Zaunbrecher M.A. et al., 2009).

Большое внимание в зарубежной литературе уделяется вопросу о наличии корреляции между определёнными мутациями в геноме и уровнем устойчивости возбудителя (Springer B. et al., 2009; Zhang Z. et al., 2014; Kambli P. et al., 2015; Kambli P. et al., 2015). Степень устойчивости МБТ к каждому отдельному препарату группы ФХ может быть разный и зависит от типа мутаций в генах *gyrA* и *gyrB* (Kam K. et al., 2006; Li J. et al., 2014). На развитие устойчивости МБТ к невысоким дозам Km оказывают влияние мутации в промоторной области гена *eis* (Enhanced Intracellular Survival protein) (Zaunbrecher M.A., 2009). В отношении препаратов первого ряда также выявлены различия в уровне устойчивости МБТ, связанные с определёнными детерминантами резистентности (Kim S.J., 2005; Springer B. et al., 2008; Van Deun A. et al., 2009). Становится очевидной недостаточная эффективность определения лекарственной чувствительности МБТ к АБП по установленным КК препаратов и как следствие «слабой» корреляции с результатами молекулярных исследований (Springer B. et al., 2008; Trauner A. et al., 2014; Schön T. et al., 2017).

В России также на протяжении двух десятилетий велись работы по разработке молекулярно-генетических тест-систем и критериев оценки лекарственной чувствительности бактериологическими методами для диагностики лекарственной чувствительности МБТ к основным препаратам первого и второго ряда (Исаева Е.Л., 2002; Gryadunov D. et al., 2005; Скотникова О.И., 2008; Владимирский М.А. и др., 2008; Низова А.В., 2009; Исаева Ю.Д., 2013). Научные публикации посвящены изучению лекарственной устойчивости МБТ различными молекулярно-генетическими тест-системами и бактериологическими методами, эпидемиологическим аспектам распространения лекарственно-устойчивых штаммов и их геномной вариабельности в РФ (Черноусова Л.Н. и др., 2001; Mokrousov I. et al., 2002; Narvskaya O. et al., 2002; Исакова Ж.Т. и др., 2008; Скотникова О.И., 2008; Агаев Ф.Ф. и др., 2009; Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2013; Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2014; Шитиков Е.А., 2014; Аляпкина Ю.С. и др., 2018). Однако, объективная оценка устойчивости возбудителя туберкулёза к АБП осложняется тем, что используемые молекулярные тест-системы выявляют не весь спектр генетических детерминант устойчивости и не во всех генах МБТ, а также с периодическим пересмотром КК препаратов для фенотипической оценки лекарственной чувствительности в Bactec MGIT 960.

Всё вышесказанное определяет необходимость разработки молекулярно-генетических методик, позволяющих анализировать расширенный спектр мутаций и генов для повышения достоверности получаемых результатов устойчивости МБТ к основным препаратам резервного ряда. Актуальным остаётся оптимизация генодиагностики лекарственной чувствительности МБТ к основным препаратам первого и второго ряда за счёт адаптации и внедрения наиболее эффективных тест-систем, бактериологической диагностики для оценки уровня устойчивости МБТ к АБП и необходимость разработки алгоритма ускоренной лабораторной диагностики туберкулёза с применением современных бактериологических методов и молекулярно-генетических технологий для адекватного определения лекарственной чувствительности.

### **Цель исследования**

Разработать алгоритм качественного и количественного определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулёза к основным и резервным препаратам с использованием модифицированных методик, современных молекулярно-генетических и бактериологических технологий и изучить спектр генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis*.

### **Задачи исследования**

1. Разработать модификации методов для анализа спектра генетических детерминант устойчивости возбудителя туберкулёза к основным препаратам второго ряда (фторхинолонам и инъекционным препаратам) и сопоставить их с сертифицированными тестами.

2. Оценить эффективность использования в лабораторной диагностике тест-системы «ТБ-ТЕСТ», основанной на выявлении генетических детерминант устойчивости *M.tuberculosis* к основным препаратам первого и второго (резервного) ряда.

3. Изучить эффективность использования в лабораторной диагностике туберкулёза доступных молекулярно-генетических тест-систем для диагностики множественной и широкой лекарственной устойчивости *M.tuberculosis*.

4. Определить последовательность применения «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ» в алгоритме ускоренной лабораторной диагностики туберкулёза в комплексе с бактериологическими методами.

5. Изучить корреляцию (связь) различных типов генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* с результатами определения лекарственной чувствительности в Bactec MGIT 960 к основным препаратам основного и резервного ряда.

6. Изучить влияние различных типов мутаций в *M.tuberculosis* на степень лекарственной устойчивости к основным препаратам первого и второго ряда.

### **Научная новизна**

Впервые по результатам исследования установлена определяющая роль генетических детерминант устойчивости в генах *gyrA/gyrB* к фторхинолонам - офлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину (патенты на изобретения РФ № 2343197 от 10.01.2009, № 2439162 от 10.01.2012) и в генах *rrs/eis* к инъекционным препаратам - канамицину, амикацину и капреомицину (патенты на изобретения РФ № 2409680 от 20.01.2011, № 2509158 от 10.03. 2014).

Разработаны модифицированные молекулярно-генетические методики на основе ПЦР-SSCP и ПЦР-ПДРФ ДНК *M.tuberculosis* для увеличения пула анализируемых мутаций в генах *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis*.

Получены новые данные о спектре и частоте встречаемости мутаций в генах *gyrA* и *gyrB*. Впервые определены одиночные и двойные замены в *gyrA* или *gyrA/gyrB*, приводящие к умеренной и высокой степени устойчивости к офлоксацину, левофлоксацину и моксифлоксацину. Показано, что большинство штаммов с заменами A90V и D94A в *gyrA* проявляют низкую степень устойчивости к Ofx и «промежуточную» к Mfx. Выявлены редко встречающиеся в *gyrA* (G88A, D94V, A74S и G88A/H70A/G509A) и замены в *gyrB* (N538K, D500H, D500N, N538D, T539N), которые обуславливают «промежуточную» степень устойчивости *M.tuberculosis* к офлоксацину и моксифлоксацину.

Показано, что устойчивость к инъекционным препаратам (канамицину, амикацину и капреомицину) связана с мутациями в гене *rrs*, а замены в промоторной области гена *eis* с устойчивостью только к канамицину. Выявлены различия в степени устойчивости штаммов *M.tuberculosis* с мутациями в *rrs* (умеренная и высокая к канамицину и амикацину, умеренная и низкая к капреомицину) и *eis* (низкая и «промежуточная» к канамицину и «промежуточная» к амикацину).

Определено большое разнообразие генетических детерминант устойчивости *M.tuberculosis* к рифампицину, представленное 30 вариантами мутаций в 6 кодонах (511, 513, 516, 533, 526, 531) гена *rpoB*. Показано, что высокая и умеренная степень устойчивости к препарату в 89,9% изолятов ассоциирована с заменой S531L (79,7% изолятов) и мутациями в 526 кодоне. Впервые выявлена связь шести типов мутаций и трёх двойных (D516Y, D516G, H526N, H526C, L533P, L511P, L516G/S531W, S522L/D516G, L533P/S531L) с «промежуточной» степенью устойчивости к препарату.

Показано, что генетические детерминанты устойчивости к изониазиду, представленные мутациями в гене *katG* (S315T, I335V, S315N) или в сочетании с *inhA*, *ahpC*, а также заменой с(-15)t в промоторной части гена *inhA*, в 97% изолятов приводят к высокой/умеренной степени устойчивости. Установлена высокая частота обнаружения штаммов с умеренной и высокой степенью устойчивости к рифампицину и изониазиду (штаммы с множественной лекарственной устойчивостью) опосредованная мутациями S531L в *rpoB* и S315T в *katG*.

Впервые определено, что преобладающее большинство штаммов (88%) с различными типами мутаций в гене *embB* проявляют «промежуточную» устойчивость к этамбутолу.

Доказана необходимость включения в алгоритм лабораторной диагностики туберкулёза количественного определения лекарственной чувствительности возбудителя, наряду с молекулярно-генетическим определением генетических детерминант устойчивости, для получения наиболее достоверной информации о характере и степени устойчивости возбудителя к ключевым препаратам основного ряда (рифампицин, изониазид, этамбутол) и резервного ряда (фторхинолоны, инъекционные препараты).

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Научно подкреплён выбор генетических мишеней для выявления детерминант устойчивости возбудителя туберкулёза к основным препаратам резервного ряда в целях создания молекулярно-генетических методик, что делает возможным получать новые сведения о механизмах развития приобретённой лекарственной устойчивости *M.tuberculosis*.

Получены новые данные об уровне устойчивости возбудителя туберкулёза, заключающиеся в установлении спектра и частоты встречаемости мутаций, ассоциированных с высоким, низким и «промежуточным» уровнем резистентности к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам и инъекционным препаратам, существенно дополняют фенотипическую характеристику устойчивых *M.tuberculosis*.

Экспериментально выявленные различия в степени устойчивости *M.tuberculosis* к основным препаратам первого и второго ряда позволили теоретически обосновать несоответствия в бактериологическом и молекулярно-генетическом определении лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам.

Данные молекулярного изучения устойчивых штаммов *M.tuberculosis* на теоретической основе могут быть использованы для совершенствования микробиологической диагностики туберкулёза с применением современных молекулярно-генетических и бактериологических технологий для качественной и количественной оценки лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза.

Разработанный алгоритм комплексной лабораторной диагностики качественной и количественной оценки лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза, с включением современных молекулярно-генетических технологий и бактериологических методов, повышает достоверность результатов определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулёза к антибактериальным препаратам, сокращает время получения результатов и служит основанием для назначения адекватной химиотерапии.

С использованием разработанных молекулярно-генетических методик и секвенирования установлены клинически значимые типы мутаций и их сочетания в генах *gyrA/gyrB* и *rrs/eis*, приводящие к развитию устойчивости возбудителя туберкулёза к основным препаратам резервного ряда. Применение разработанных методик позволит увеличить спектр анализируемых мутаций и повысить надёжность получаемых результатов выявления генетических детерминант устойчивости *M.tuberculosis* к фторхинолонам, аминогликозидам и капреомицину.

Тестирование лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к моксифлоксацину при «критической концентрации» 0,25 мкг/мл в Bactec MGIT 960 позволяет увеличить корреляцию с молекулярно-генетическим определением чувствительности к препарату и получать адекватные результаты исследования.

Полученные данные ассоциации мутаций с уровнем устойчивости *M.tuberculosis* к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам и инъекционным препаратам более точно характеризуют устойчивость возбудителя по сравнению с результатами в Bactec MGIT 960 и дают возможность фтизиатрам своевременно внести коррективы в схему химиотерапии больных туберкулёзом.

Обоснована диагностическая эффективность молекулярных технологий при исследовании операционного материала у больных без бактериовыделения для адекватного назначения химиотерапии в послеоперационный период.

Десять штаммов *M.tuberculosis* с различными типами генетических детерминант широкой лекарственной устойчивости, выделенные из биологического материала больных туберкулёзом, депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» как контрольные штаммы для проведения фенотипических и молекулярно-генетических исследований устойчивости к антибактериальным препаратам (В-9360 - В-9369).

Сформирована рабочая коллекция штаммов *M.tuberculosis*, выделенных из клинического материала больных туберкулёзом, которая может быть использована для изучения фенотипических и молекулярно-генетических механизмов устойчивости.

Адаптированная для рутинных исследований методология применения тест-систем «ТБ-БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2» в лабораторной диагностике туберкулёза изложена в методических рекомендациях Департамента здравоохранения города Москвы «Определение лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с помощью биочипов» (№ 42 от 2008 г. - утверждены 29.09.2008 г.).

Разработанный алгоритм ускоренной лабораторной диагностики туберкулёза изложен в методических рекомендациях Департамента здравоохранения города Москвы «Алгоритм ускоренной микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулёза» (№ 53 от 2018 г. - утверждены 15.05.2018 г.).

Результаты исследования и разработанный алгоритм микробиологической диагностики туберкулёза внедрены в практической деятельности Централизованной бактериологической лаборатории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы» (акт внедрения от 21.05.2021 г.).

Материалы диссертации вошли в курс лекций на кафедре фтизиатрии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России» (акт внедрения от 18.05.2021 г.) и Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза» (акт внедрения от 26.05.2021 г.).

#### **Методология и методы исследования**

Методология работы, опираясь на современные научно обоснованные сведения о формировании лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза, спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования. Предметом исследования служили генетические и фенотипические свойства устойчивых *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам, совершенствование методических подходов молекулярно-генетической и бактериологической диагностики туберкулёзной инфекции. Объектом исследования являлся диагностический материал больных туберкулёзом лёгких (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), бронхиальный секрет, операционный материал, эмпиема, смыв из каверны, содержимое туберкуломы) и изоляты *M.tuberculosis*, выделенные из выше перечисленного материала. В работе использованы микробиологические, включая микроскопические, бактериологические и молекулярно-генетические методы, а также статистические методы исследования. Для исследования использовались репрезентативные выборки образцов диагностического материала и культур. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» (выписка из протокола заседания от 19.10.2017 г.).

#### **Объекты исследования**

За период с 2004 г. по 2018 г. было обследовано 2657 пациентов с различными формами туберкулёза (инфильтративный, фиброзно-кавернозный, диссеминированный, туберкулома, туберкулёз внутригрудных лимфоузлов и др.), из которых 2564 получали противотуберкулёзную терапию в условиях стационара Клиник и филиалов ГБУЗ «Московского научно-практического центра борьбы с туберкулёзом ДЗМ» и 93 больных

с подозрением на заболевание, направленных из Консультационно-диагностического центра ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулёзом» ДЗМ».

Исследовано 1516 клинических изолятов МБТ и 1551 проба респираторного материала (мокрота, бронхиальный секрет, бронхоальвеолярный лаваж) и материала, полученного после резекции лёгких (биоптат лёгочной ткани, содержимое каверн, туберкулом и эмпиемы), из которых выделено 3067 проб ДНК.

В работе для научных исследований и практических задач использовались типовые коллекционные штаммы из коллекции American Type Culture Collection (ATCC): *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *Mycobacterium avium* ATCC 35712, *Mycobacterium intracellulare* ATCC 35761, *Mycobacterium scrofulaceum* ATCC 35787, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 27336, *Staphylococcus intermedius* ATCC 27335, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

### **Бактериологические методы исследования**

#### ***Микроскопическое исследование диагностического материала***

Микроскопическое исследование проводили с помощью люминесцентного метода. Учёт результатов оценки количества кислотоустойчивых микобактерий (КУМ) в препарате проводили согласно приказу № 109 Министерства здравоохранения РФ от 21 марта 2003 г «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской Федерации» (Приказ №109 МЗ РФ от 21 марта 2003 г.).

#### ***Обработка диагностического материала для бактериологических исследований***

Деконтаминацию респираторных проб клинического материала выполняли в соответствии с рекомендациями CDC (Kent T.K., Kubica G.P., 1985).

Для люминесцентной микроскопии использовали 30 мкл осадка.

Для посева в индикаторные пробирки MGIT с жидкой питательной средой *Middlebrook 7H9* (M7H9) (Becton Dickinson and Company, США) и культивирования в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson and Company, USA) использовали 0,5 мл осадка. Оставшиеся 0,2 мл осадка засеивали на плотную, яичную среду Левенштейна-Йенсена (Л-Й).

#### ***Бактериологическое определение лекарственной чувствительности M.tuberculosis к антибактериальным препаратам***

Определение лекарственной чувствительности (ЛЧ) МБТ к противотуберкулёзным препаратам (ПТП) проводили в жидкой среде M7H9 в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 в соответствии с руководством Becton Dickinson (2002). – Режим доступа: [https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit\\_manual\\_nov2006.pdf](https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf)

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) Km, Am и Cm в жидкой среде M7H9 в системе Bactec MGIT 960 проводили согласно рекомендациям Rusch-Gerdes S и соавт. (2006). Rodrigues C и соавт. (2008) (Rusch-Gerdes S. et al., 2006; Rodrigues C. et al., 2008).

Определение ЛЧ МБТ к Ofx, Km, Am и Cm в автоматическом анализаторе Bactec MGIT 960 определяли в КК 2,0; 2,5; 1,0 и 2,5 мкг/мл соответственно (рекомендации WHO, 2008), к Lfx и Mfx при 2,0 и 0,25 мкг/мл (рекомендации WHO, 2008) и 1,5 и 0,5 мкг/мл (рекомендации WHO., 2014) соответственно.

Определение ЛЧ МБТ к Ofx, Km и Cm на плотной среде Л-Й определяли в двух концентрациях (КК и высокой) 2,0 и 10,0 мкг/мл; 30,0 и 50,0 мкг/мл соответственно (Приказ №109 МЗ РФ от 21 марта 2003 г.).

Определение МИК АБП проводили с использованием тест-системы *Sensititre Myco TB* согласно инструкции фирмы-производителя TREK Diagnostic Systems (США-Великобритания) и Hall L. и соавт. (2011) (Hall L. et al., 2011).

### **Молекулярно-генетические методы исследования**

#### ***Обработка клинического материала для молекулярно-генетических исследований***

В исследовании использовали респираторный (мокрота, бронхиальный лаваж, бронхиальный смыв, операционный материал) диагностический материал, порцию осадка деконтаминированного образца и культуры МБТ.

#### Сбор материала

- мокроту в объёме 5-6 мл собирали в контейнер для биологического материала ;
- деконтаминированные и осаждённые центрифугированием пробы (0,5 – 1,0 мл) и клинические штаммы МБТ, выделенные на плотной Л-Й и жидкой М7Н9 средах, получали из Централизованной бактериологической лаборатории (ЦБЛ) ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулёзом» ДЗМ».

#### ***Выделение ДНК *M.tuberculosis* из диагностического материала и культур***

##### Неавтоматизированный способ

Пробоподготовку клинического материала и экстрагирование ДНК МБТ из диагностических проб и культур осуществляли, исходя из руководства к тест-системам «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия).

Пробоподготовку диагностического материала для тест-системы в формате картриджа «Хpert МТВ/RIF» проводили согласно инструкции производителя (Cepheid, США).

##### Автоматизированный способ

Пробоподготовку клинического материала и культур МБТ (в жидкой среде М7Н9) осуществляли путём добавления «Инактивирующего реагента А» (НПК «СИНТОЛ», Россия).

Экстракция ДНК из осадка биологического материала и штаммов МБТ и внесение выделенной ДНК в пробирки с амплификационной смесью проводили в автоматическом режиме с использованием роботизированной полуавтоматической станции Freedom EVO (TECAN, Швейцария) и реагентов «М-Сорб-Туб-автомат-48» и «АмплиТуб-РВ» соответственно (НПК «СИНТОЛ», Россия).

#### ***Молекулярно-генетические тест-системы***

##### ПЦР в реальном времени

Количественное определение ДНК МБТ в диагностическом материале с помощью ПЦР-РВ проводили с использованием набора реагентов «АмплиТуб-РВ» (НПК «СИНТОЛ», Россия) на амплификаторе CFX 96 (BioRad, США).

##### Определение генетических детерминант устойчивости к рифампицину с использованием тест-системы «Хpert МТВ/RIF»

Проведение ПЦР с помощью картриджа «Хpert МТВ/RIF» осуществляли в анализаторе GeneXpert (Cepheid, США).

##### Определение генетических детерминант устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину и изониазиду с помощью тест-системы «ТБ-БИОЧИП-1» и стрипах GenoType® MTBDRplus

Исследование на биологических микрочипах «ТБ-БИОЧИП-1» (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия) и стрипах GenoType MTBDRplus (GenoType, Hain Lifescience, Германия) проводили согласно инструкции к тест-системам. ПЦР осуществляли на амплификаторе «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Определение генетических детерминант устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам с помощью тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2» и к фторхинолонам, этамбутолу и аминогликозидам на стрипах GenoType® MTBDRsl

Исследование на биологических микрочипах «ТБ-БИОЧИП-2» (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия) и стрипах GenoType MTBDRsl (GenoType, Hain Lifescience, Германия) проводили согласно инструкции к тест-системам. ПЦР осуществляли на амплификаторе «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Определение генетических детерминант устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к основным препаратам первого и второго ряда с помощью тест-системы «ТБ-ТЕСТ» в генах *rpoB*, *katG*, *oxyR/ahpC*, *inhA*, *embB*, *gyrA*, *gyrB*, *rrs* и *eis*

Исследование на биологических микрочипах «ТБ-ТЕСТ» проводили согласно инструкции к тест-системе. ПЦР осуществляли на амплификаторе C1000 (BioRad, США).

Секвенирование

Секвенирование анализируемых последовательностей ДНК генов *gyrA*, *gyrB*, *rrs* и промоторной области *eis* проводили на секвенаторах ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, США) и GS Junior («Roche», Германия).

**Статистическая обработка результатов и программное обеспечение**

Полученные данные бактериологических и молекулярно-генетических исследований клинического материала и штаммов МБТ, сведения о пациентах, включая диагноз, возраст, режим химиотерапии, систематизированы в таблицы Excel для статистической обработки.

Расчёт показателей эффективности лабораторных тестов (чувствительность, специфичность, эффективность, предсказательную ценность положительного и предсказательную ценность отрицательного результата) проводили с помощью программы Epi-Info 7.2 (CDC, США). Для статистической оценки характеристик методов вычисляли 95% доверительный интервал (ДИ) при уровне достоверности  $p < 0,05$ . Качественные признаки оценивали по критериям Хи-квадрат и Мак-Немара.

**Личное участие автора в получении результатов**

Основываясь на анализе источников литературы автором определена основная концепция научного исследования и его дизайн, конкретизированы цель и задачи, выбраны оптимальные методики исследования, разработан алгоритм лабораторной диагностики, проведены анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка полученных данных, оформлены патенты и подготовлены методические рекомендации. Автор участвовал во всех этапах молекулярно-генетических исследований по определению генетических детерминант устойчивости возбудителя туберкулёза к основным препаратам первого и второго ряда. Бактериологические исследования выполнены в ЦБЛ ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулёзом» ДЗМ» и интерпретированы совместно с научными сотрудниками отдела проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулёзом» ДЗМ» д.б.н М.В. Макаровой, к.б.н Ю.Д. Михайловой, к.б.н Л.Ю. Крыловой. Клинические штаммы *M. tuberculosis* секвенировали в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН совместно с научными сотрудниками Зименковым Д.В и Грядуновым Д.А.

**Положения, выносимые на защиту**

1. Разработанные методики генодиагностики (ПЦР-SSCP и ПЦР-ПДРФ) увеличивают спектр анализируемых генетических детерминант резистентности в генах *gyrA/gyrB* и *rrs/eis*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам и инъекционным препаратам (аминогликозидам и капреомицину).

2. Анализ сравнительного изучения эффективности молекулярно-генетических тест-систем для выявления *Mycobacterium tuberculosis* с множественной и широкой лекарственной устойчивостью позволил оптимизировать их применение в лабораторной диагностике туберкулёза.

3. Установленная ассоциация мутаций со степенью устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к основным препаратам первого и второго ряда сделала возможным обосновать несоответствия в бактериологическом и молекулярно-генетическом определении лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам.

4. Разработанный алгоритм микробиологической лабораторной диагностики, включающий комплекс молекулярно-генетических и бактериологических методов для проведения качественной и количественной оценки лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis*, увеличивает достоверность информации о характере и степени устойчивости возбудителя туберкулёза к антибактериальным препаратам.

#### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность результатов подтверждена проведением достаточного объёма исследований и выбором чётких, аргументированных критериев включения репрезентативного материала в исследование. Это позволило корректно осуществить статистическую обработку полученных данных. В работе использован комплекс современных молекулярно-генетических и бактериологических методов, которые отличаются высокой воспроизводимостью, чувствительностью и специфичностью. Исследования проводились с использованием современного сертифицированного оборудования с использованием программного обеспечения для проведения биоинформационного и статистического анализа.

Диссертационная работа выполнена в рамках научных программ Департамента здравоохранения города Москвы: «Совершенствование методов идентификации возбудителя туберкулёза и микобактериозов и эффективности химиотерапии» (2014-2016 гг., номер государственной регистрации 01201457859); «Новые подходы к дифференциальной диагностике туберкулёза и определения лекарственной чувствительности микобактерии туберкулёза и нетуберкулёзных микобактерий к антибактериальным препаратам у больных туберкулёзом, в том числе с ВИЧ-инфекцией» (2017-2019 гг., номер государственной регистрации АААА-А17-117060510016-6).

Диссертационная работа апробирована на заседании Учёного совета ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулёзом ДЗМ» (протокол № 5 от 16 июля 2020 г.).

Материалы диссертации были доложены на 14 конгрессе Европейского респираторного общества (14th ERS Annual Congress, Glasgow, UK, 2004); VI Московской ассамблее «Здоровье столицы», Москва, 2007; Конгрессе европейского респираторного общества (Annual Congress, Barcelona, 2010); X Московской ассамблее «Здоровье столицы», Москва, 2011; V научно-практической конференции «Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ», Москва 2012; V ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням, Москва, 2013; V Ежегодной конференции московских фтизиатров «Профилактическая противотуберкулёзная работа в мегаполисе: объем, затраты, эффективность», Москва, 2017; Конгрессе европейского респираторного общества (International Congress, Milan, 2017); международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018», Минск 2018; XI съезде фтизиатров России, Владикавказ, 2019.

## Публикации

По теме диссертации опубликовано 41 печатная работа, из них 21 статья – в рецензируемых изданиях, 7 статей – в других изданиях, 5 тезисов – в рецензируемых изданиях и 7 тезисов – в сборниках трудов и материалах конференций, 1 раздел – в коллективной монографии. Опубликовано 2 методических рекомендаций, получено 4 патента на изобретение РФ.

## Структура диссертации

Диссертация изложена на 311 страницах машинописного текста и содержит разделы введение, обзор литературы, 3 главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список литературы. Работа иллюстрирована 58 таблицами и 14 рисунками. Список литературы включает 366 работ, из них 39 отечественных и 327 зарубежных источников.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Возможности применения различных молекулярно-генетических методов в диагностике лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам

Для определения мутаций в определенных генах ДНК МБТ, в том числе с детекцией типа нуклеотидной замены, существует целый ряд методов. С целью изучения возможности определения ЛУ МБТ к основным препаратам резервного ряда – ФХ и АГ с помощью различных молекулярно-генетических методов проведено исследование.

### Определение чувствительности *M.tuberculosis* к фторхинолонам с помощью тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2»

Тест-система «ТБ-БИОЧИП-2» предназначена для определения 9 вариантов мутаций в 88, 90, 91 и 94 кодах и полиморфной замены S95T в гене *gyrA*, ответственных за развитие ЛУ МБТ к ФХ в респираторном материале и культурах.

При исследовании диагностического материала (мокроты) и культур тест-система показала хорошую диагностическую эффективность. Было установлено, что «ТБ-БИОЧИП-2» характеризуется большей чувствительностью по сравнению с люминесцентной микроскопией, увеличивая выявляемость возбудителя туберкулёза в мокроте на 23,0%. Совпадение результатов определения ЛЧ МБТ к Ofx на среде Л-Й и с помощью «ТБ-БИОЧИП-2» в образцах диагностического материала и культурах, выделенных из этих же образцов, составило 93,3% (95% ДИ 86,7-96,7) и 94,2% (95% ДИ 88-97,3) соответственно (Таблица 1).

Таблица 1 – Сопоставление результатов выявления мутаций в гене *gyrA* («ТБ-БИОЧИП-2») с бактериологическим определением ЛЧ к офлоксацину (среда Л-Й) в клинических изолятах и диагностическом материале (мокрота)

Плотная среда Л-Й	Материал	ТБ-БИОЧИП-2 (ген <i>gyrA</i> ) (n=104)						
		wt	S95T	D94G	A90V	D94N	D94A	D94G/A90V
чувствительные	мокрота	1	70		2			
	культуры	1	70		2			
устойчивые	мокрота		5	11	9	4	1	1
	культуры		4	11	10	4	1	1

Дискордантные результаты (выделено полужирным шрифтом) были связаны: в одном случае с возможным присутствием гетерорезистентной популяции (с мутацией A90V и с полиморфной заменой S95T) как в образцах, так и культурах и определяемые фенотипически то как чувствительные, то как устойчивые к Ofx на среде Л-Й; в другом, отсутствие мутаций ни в мокроте, ни в соответствующих устойчивых изолятах, которое

по-видимому связано с возникновением новых мутаций в гене *gyrA*, не включённых в биочип, или замен в гене *gyrB*, также связанных с устойчивостью к препаратам и не анализируемых данной тест-системой.

В результате распределение мутаций в мокроте и культурах несколько отличалось. Но и в тех и других пробах ДНК преобладали замены A90V и D94G, выявленные в одинаковом соотношении 10,6%/10,6% в мокроте и 11,5%/10,6% в культурах. Остальные мутации выявлены в меньшем проценте случаев. Тем не менее, выявление однотипных мутаций в диагностическом материале и в выделенных культурах из этих же образцов говорит о достоверности получаемых результатов с помощью «ТБ-БИОЧИП-2».

Диагностическая чувствительность и специфичность тест-системы составила для культур 87,1% (95% ДИ 71,1-94,9) и 97,3% (95% ДИ 90,5-99,2), для образцов мокроты 83,9% (95% ДИ 67,4-92,9) и 97,3% (95% ДИ 90,5-99,2) соответственно.

При анализе влияния мутаций на устойчивость МБТ к Ofx в КК = 2 мкг/мл и высокой 10 мкг/мл было установлено, что штаммы с заменами A90V, D94A и S91P в наибольшем проценте случаев – 91,7%, 75,0% и 66,7% соответственно, давали рост только при КК – 2 мкг/мл, т.е. обладали низким уровнем устойчивости. Напротив, штаммы с заменами D94G, D94N, D94Y распределились между КК 2 и 10 мкг/мл в равном соотношении, что с высокой вероятностью может говорить о их связи с умеренным и высоким уровнем устойчивости к препарату. В изолятах с мутацией D94N рост был зарегистрирован при высокой концентрации препарата – 10 мкг/мл. Двойные замены в *gyrA*, обнаруженные лишь в 0,9% изолятов, приводили к устойчивости как при КК, так и при высокой концентрации Ofx, но небольшое их количество не позволяет сделать однозначные выводы.

К достоинствам тест-системы можно отнести возможность регистрации и интерпретации получаемых результатов с помощью специального оборудования (ПЗС-камеры) и программного обеспечения, что исключает субъективные ошибки при получении результата.

Однако, в данной выборке в 14,4% устойчивых штаммов мутаций в гене *gyrA* не были обнаружены, но обладали устойчивостью при 2 мкг/мл (большинство изолятов) и при 10 мкг/мл (наименьшее количество). Такие изоляты были кандидатами для дальнейшего исследования гена *gyrA* и второго гена *gyrB*, кодирующего  $\beta$  субъединицу ДНК-гиразы (Aubry A. et al., 2006; Tretter E.M. et al., 2010), мутации в котором также связывают с устойчивостью к ФХ, но встречаются значительно реже, примерно в 7% случаев (Wang J-Y. et al., 2007).

#### ***Определение чувствительности M.tuberculosis к фторхинолонам с помощью разработанных модификаций метода конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов (ПЦР-SSCP) в генах gyrA и gyrB***

Для исследования двух генов *gyrA* и *gyrB* разработаны и адаптированы для исследования респираторного материала (мокрота) и культур МБТ две модификации метода ПЦР-SSCP («А-SSCP» и «М-SSCP»). Разработанные методики позволяют определять конформационные отличия на электрофореграмме, связанные с возникновением мутаций в генах *gyrA* и *gyrB* с последующим определением типа мутации с помощью секвенирования. Разработка методик включала: конструирование праймеров, оптимизацию состава реакционного буфера, отработку оптимального режима амплификации, условий денатурации полученных ампликонов и их разделение в полиакриламидном геле. В результате разработанные условия проведения ПЦР позволили проводить исследование диагностического материала, а разработанные одинаковые условия денатурации получаемых ампликонов после ПЦР и

электрофоретического разделения одноцепочечных фрагментов ДНК значительно упростило работу по изучению конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов одновременно двух генов.

Апробацию разработанной «А-SSCP» проводили на 68 образцах мокроты и 90 культурах МБТ. Исследование диагностического материала показало, что на получение интерпретируемого результата на электрофореграмме влияет количество микобактерий, содержащихся в диагностическом материале. Чувствительность метода при исследовании мокроты составила 85,3% (95% ДИ 75 - 91,8). Кроме того, присутствие в диагностическом материале двух популяций МБТ (двух чувствительных генотипов «А» (wt) и «В» (S95T)) может исказить сигнал разделяемых денатурированных нитей ДНК, что также приводит к трудностям в трактовке результата. Совпадение результатов «А-SSCP» и секвенирования по определению генотипов в мокроте составило 98,2%. При определении устойчивости МБТ к Ofx чувствительность «А-SSCP» составила 100% (95% ДИ 51-100), специфичность 100% (95% ДИ 93,6-100) (Таблица 2).

Таблица 2 – Результаты определения генотипов *M.tuberculosis* в гене *gyrA* с помощью «А-SSCP», секвенирования и бактериологического определения ЛЧ к офлоксацину

Фенотип	Генотип	Методы			Совпадение результатов	
		А-SSCP (n=58)	Секвенирование (n=58)	Среда Л-Й (n=68)	«А-SSCP» и секвенирование	«А-SSCP» и фенотип
<b>Результаты исследования мокроты (n=68)</b>						
чувствительные	wt (А)	7	8	64	98,2%	100%
	S95T (В)	44	46			
	сомнительный результат	3	-			
устойчивые	мутации	4	A90V - 1 D94A - 1 D94G - 2	4		
<b>Результаты исследования клинических изолятов (n=90)</b>						
чувствительные	wt (А)	26	26	86	100%	100%
	S95T (В)	60	60			
устойчивые	мутации	4	A90V - 1 D94A - 1 D94H - 2	4		

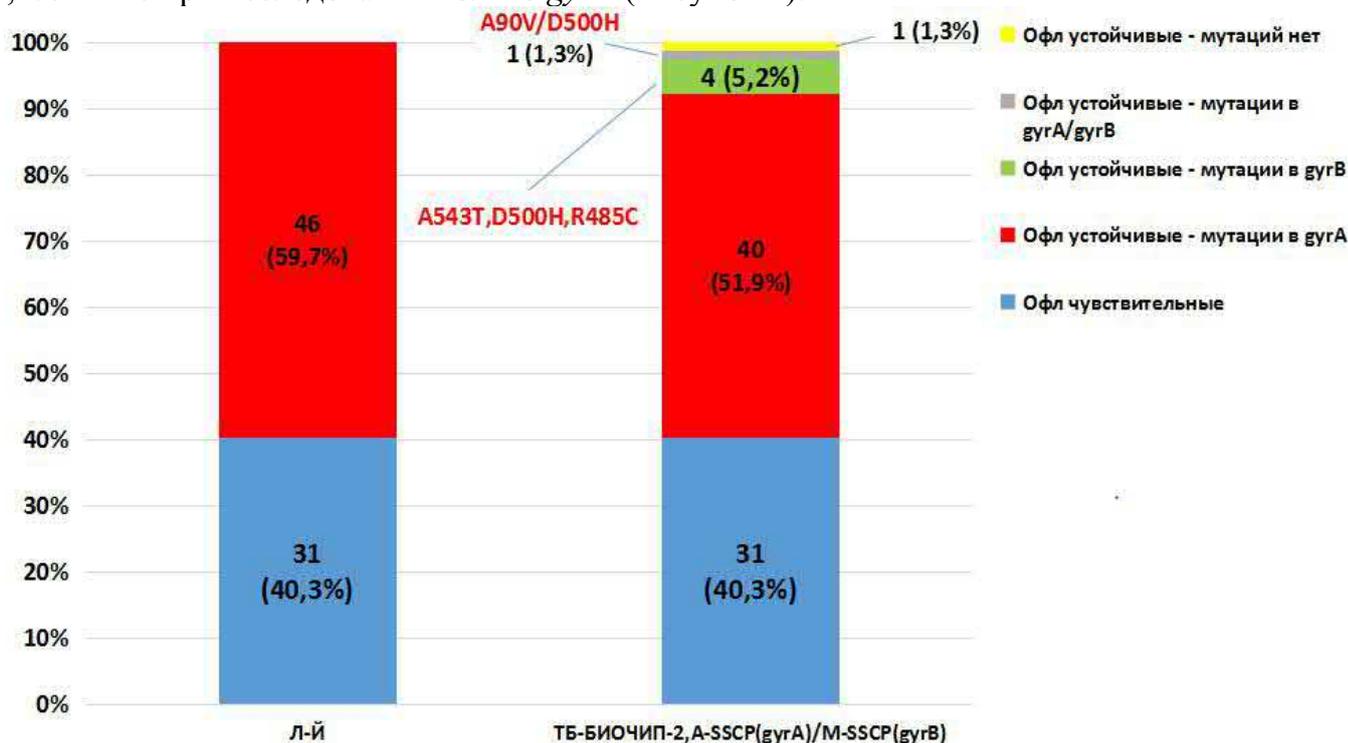
Тестирование проб ДНК, выделенной из культур, позволило в 100% случаев определить чувствительные («А» - 28,9%, «В» - 66,7%) и устойчивые (4,4%) генотипы, что подтверждено секвенированием и бактериологическими данными определения ЛЧ МБТ к Ofx на среде Л-Й. Использование изолятов МБТ для исследования является важным в ситуациях, когда недостаточное количество микобактерий в диагностическом материале (олигобацилярные пациенты) приводит к «сомнительным» результатам исследования.

Таким образом, разработанная методика «А-SSCP» за счёт своей простоты и дешевизны может применяться в качестве скрининг-метода с целью отбора штаммов МБТ - потенциальных кандидатов на наличие мутаций в исследуемом гене *gyrA*, с последующим установлением типа нуклеотидной замены с помощью секвенирования. Это делает её перспективной для быстрого выявления мутаций в рутинных диагностических исследованиях и поиска новых в научно-клинических исследованиях. К

недостаткам можно отнести влияние на качество получаемой электрофоретической картины количество ДНК в пробе, наличие смешанной популяции (генотипов) МБТ, чувствительность к качеству реактивов для электрофореза и условиям его проведения.

Апробацию разработанной методики «М-SSCP» для выявления мутаций в *gyrB* проводили на 77 образцах мокроты и 258 культурах МБТ. Определение типа мутаций в гене *gyrA* проводили с помощью «ТБ-БИОЧИП-2», поиск новых осуществляли с применением разработанной методики «А-SSCP».

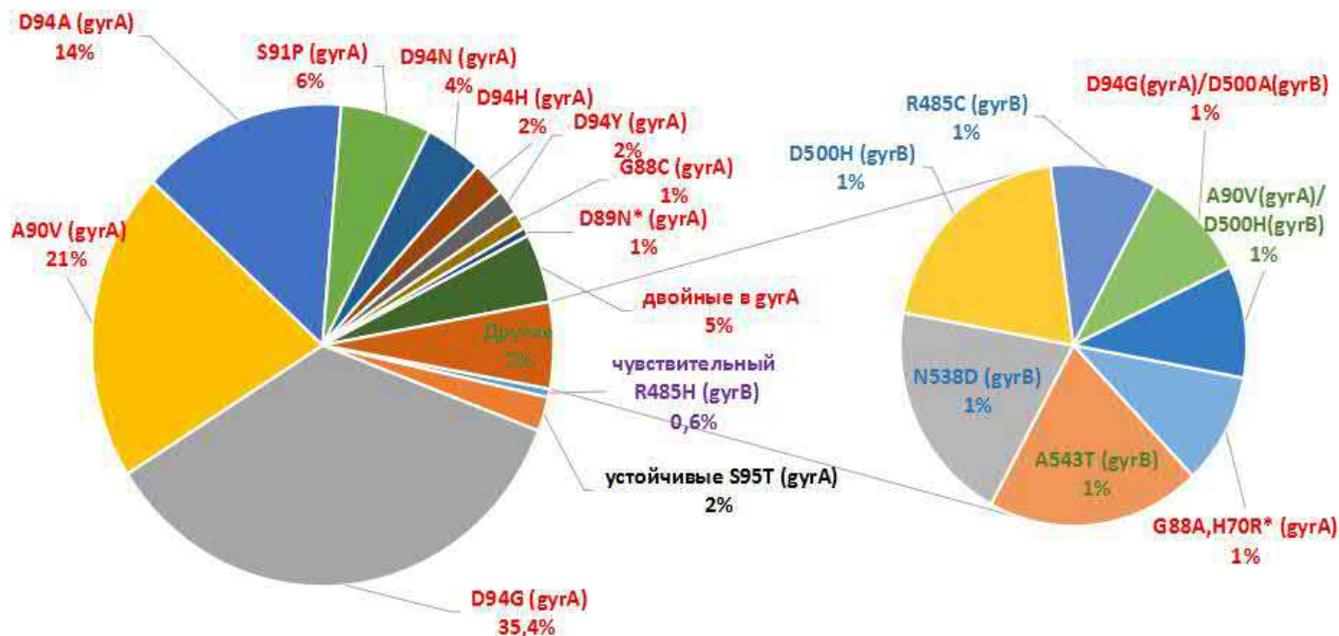
В результате было установлено, что «М-SSCP» обладает сопоставимой чувствительностью в диагностическом материале с тест-системой «ТБ-БИОЧИП-2» (во всех образцах диагностического материала получен результат молекулярного определения ЛЧ). Анализ мутаций в двух генах молекулярными тестами «ТБ-БИОЧИП-2», «А-SSCP» и «М-SSCP» увеличил совпадение с бактериологическими результатами определения ЛЧ МБТ к Ofx до 98,7% (95% ДИ 93-99,8) случаев, что на 5,2% выше при исследовании только *gyrA* (Рисунок 1).



**Рисунок 1** - Результаты молекулярно-генетического исследования генов *gyrA* и *gyrB* ДНК МБТ, выделенной из диагностического материала (мокроты)

В результате установлено, что распределение наличие/отсутствие мутаций в ДНК МБТ было следующим: S95T (полиморфная замена, не приводящая к устойчивости) - 32 (41,6%), мутации в *gyrA* - 40 (51,9%), в *gyrB* - 4 (5,2%) и в *gyrA/gyrB* - 1 (1,3%).

Впервые в исследуемой выборке культур (n=297) в двух устойчивых штаммах с помощью «А-SSCP» и секвенирования обнаружены редко встречаемые мутации в *gyrA* двойная H70R/G88A и одиночная D89N, не включённые в «ТБ-БИОЧИП-2». Среди одиночных мутаций в гене *gyrA* преобладали замены в 94 кодоне и 90 кодоне (A90V), выявленные в 58,5% и 21% устойчивых штаммов соответственно. По распространённости в 94 кодоне мутации расположились в следующей последовательности D94G > D94A > D94N > D94H > D94Y. Мутации в *gyrB* представлены в наименьшем проценте устойчивых изолятов (5,3%), из которых в 1,2% в сочетании с заменами в *gyrA* (Рисунок 2).



**Рисунок 2** - Распределение и частота встречаемости мутаций в генах *gyrA* и *gyrB* в устойчивых (одной чувствительной) культурах *M.tuberculosis* к офлоксацину

В ДНК, выделенной из мокроты, в гене *gyrB* обнаружены три типа замен (A543T, D500H, R485C), приводящих к устойчивости к Ofx, а из культур пять (A543T, D500H, D500A, N538D, R485C) и одна R485H, ассоциированная с чувствительностью к препарату, что подтверждает результаты исследований других авторов (Pitaksaijakul P. et al., 2005; Pantel A. et al., 2011; Malik S. et al., 2012).

Соотношение обнаруженных мутаций в двух генах или их отсутствие при исследовании ДНК МБТ, выделенной из мокроты и культур, было примерно одинаковым: около 52% в *gyrA*; 4% в *gyrB*; 1% одновременно в двух генах и примерно в 43% не обнаружены.

В итоге, также как при исследовании образцов мокроты, выявляемость устойчивости к препарату достоверно ( $p < 0,05$ ) увеличилась до 97,7% (95% ДИ: 92,5-98,8), тогда как при исследовании одного гена *gyrA* она составляла 92,4% (95% ДИ: 85,6-95,3).

Преимуществом разработанных «А-SSCP» и «М-SSCP» является возможность осуществлять «косвенную» детекцию новых мутаций в генах *gyrA/gyrB*, в отличие от тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2», позволяющей выявлять только замены в гене *gyrA*, включённые в мультиплексную ПЦР с последующей гибридизацией с соответствующими иммобилизованными зондами на биочипе. В развитии устойчивости МБТ к Ofx участвуют два гена, одновременный анализ которых позволяет более точно проводить молекулярное определение ЛЧ МБТ к этому препарату, что в свою очередь значительно повышает корреляцию результатов с данными бактериологических исследований.

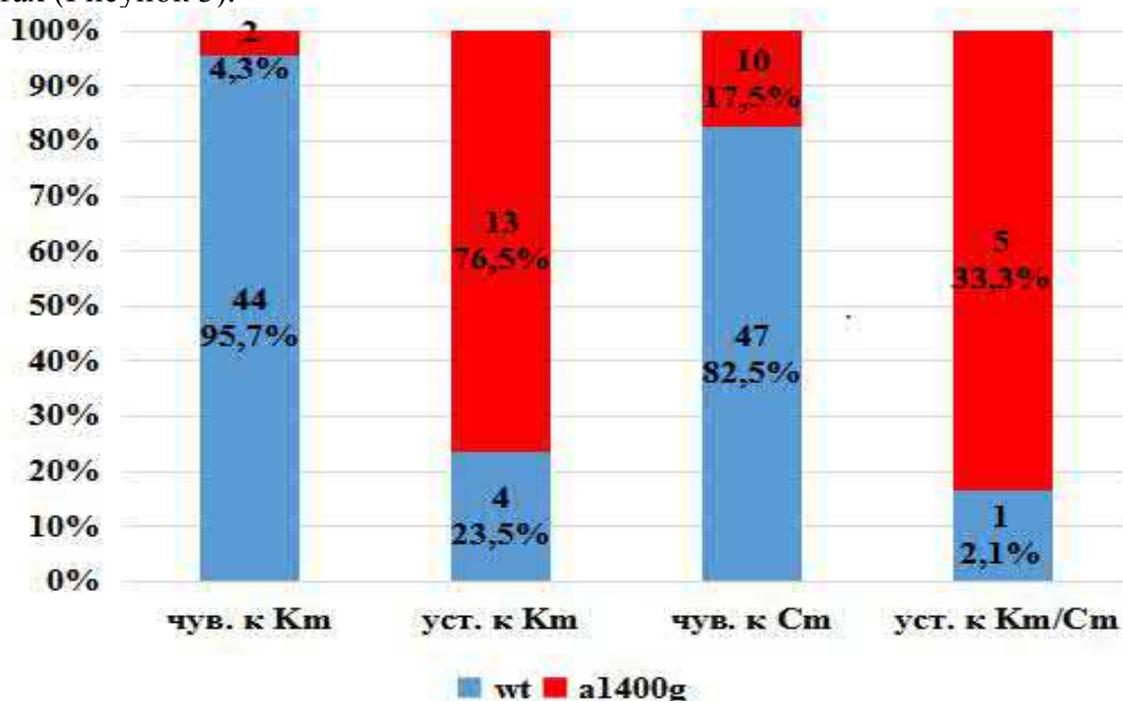
#### **Определение чувствительности *M.tuberculosis* к аминогликозидам и капреомицину с помощью разработанной методики на основе метода ПЦР-ПДРФ**

Второй класс АБП, широко применяющийся в терапии туберкулёза с МЛУ, является группа инъекционных препаратов резервного ряда — АГ (Km и Am) и антибиотик полипептидной структуры Cm. Хотя они принадлежат к разным классам АБП, но оказывают своё бактерицидное действие через одну и ту же мишень - 16S рНК, кодируемой геном *rrs*, мутации в котором вызывают устойчивость к Km, Am и в некоторых случаях к Cm (Ji YE. et al., 1994; Suzuki Y. et al., 1998; Alangaden G.J. et al., 1998; Da Silva P.E.A. et al., 2011; Palomino J.C. et al., 2014).

Для выявления генетических детерминант устойчивости в *rrs* был выбран метод ПЦР-ПДРФ, так как количество исследуемых замен в гене небольшое и подобрав соответствующие рестриктазы с его помощью можно точно определить кодон с мутацией, в отличие от метода SSCP, когда тип мутации можно определить только с помощью секвенирования. Разработка методики включала: оптимизацию состава реакционного буфера для ПЦР, отработку режима амплификации, оптимизацию проведения рестрикции. Это позволило определять мутации в гене *rrs* в культурах МБТ, выделенных в жидкой среде М7Н9, что ускорило получение результата чувствительности МБТ к аминогликозидам и Cm на 15-20 дней.

Исследование 63 культур МБТ с помощью разработанного теста на основе метода ПЦР-ПДРФ показало в высоком проценте случаев совпадение с результатами секвенирования: 100% (95% ДИ 79,6-100,0) для устойчивых изолятов, 98,4% (95% ДИ 91,5-99,7) для чувствительных. При оценке профиля рестрикции в 23,8% штаммах определено наличие в гене *rrs* мутации a1400g, в 74,6% отсутствие мутаций и в 1,6%, где анализ результата был затруднительным, после секвенирования мутаций не было обнаружено.

Несмотря на то, что мутации в *rrs* приводят к перекрёстной устойчивости к Km и Cm, при сопоставлении результатов между бактериологическим и ПЦР-ПДРФ методами установлены некоторые расхождения, которые связаны с присутствием мутации a1400g в чувствительных к Km и Cm изолятах и отсутствием замен в устойчивых к препаратам изолятах (Рисунок 3).



**Рисунок 3** - Результаты определения ЛЧ МБТ к канамицину и капреомицину бактериологическим и ПЦР-ПДРФ методами (n=63)

В первом случае объяснением может быть наличие в культуре двух различных популяций МБТ, один из которых устойчивый к данным препаратам, а другой – чувствительный (Cohn D. et al., 1997). Кроме того, микобактерии, устойчивые к антибиотикам, зачастую бывают «ослаблены» по сравнению с микобактериями дикого типа, т.е. обладают пониженным фитнесом и при пересевах (в нашем случае культуры выделены в жидкой среде М7Н9, а ЛЧ к Km и Cm проводится на плотной Л-Й) растут медленнее или не дают роста на среде (Cole S.T., 2005). Во втором - устойчивость

штаммов к Km может быть вызвана механизмами, не затронутыми в исследовании. В работе 2009 года Zaunbrecher M.A. и соавт. показано влияние мутаций в промоторном регионе гена *eis* (кодирует ацетилтрансферазу) на чувствительность МБТ к невысоким дозам Km (Zaunbrecher M.A. et al., 2009).

Совпадение результатов микробиологического определения ЛЧ и метода ПЦР-ПДРФ для Km и Cm составило 88,9% (95% ДИ 78,8-94,5) и 81,0% (95% ДИ 69,6-88,8) соответственно. При расчёте статистических характеристик для ПЦР-ПДРФ относительно метода абсолютных концентраций (МАК) было установлено, что он обладает достаточной чувствительностью (76,5% для Km и 83,3% для Cm). Однако низкая прогностическая значимость положительного результата (31,3%) для Cm говорит о недостаточной эффективности МАК для определения ЛЧ МБТ к препарату так как метод не в полной мере стандартизован (Kim S.J., 2005; Дорожкова И.Р. и др., 2013).

Таким образом, разработанная методика на основе ПЦР-ПДРФ позволяет проводить исследование культур МБТ, выделенных в жидкой среде М7Н9 в Bactec MGIT 960, что ускоряет получение результата определения чувствительности МБТ к аминогликозидам и Cm на 15-20 дней. Метод является не дорогим и может широко применяться для проведения диагностики ЛЧ к АГ и Cm в условиях рутинных исследований в микробиологических лабораториях, а секвенирование, как контрольный метод, в спорных случаях. К недостаткам можно отнести регистрацию результатов, связанную с просмотром гелей в ультрафиолетовом свете, не подвергающаяся автоматизации и оставляющая возможность для ошибок, например из-за смазанных светящихся полос, выгорания геля и т.д.

При этом следует подчеркнуть, что в 23,5% устойчивых изолятов только к Km мутации в гене *rrs* не были обнаружены, что говорит о необходимости проведения дальнейших исследований в определении роли гена *eis* в развитии устойчивости к этому препарату.

#### ***Определение роли гена *eis* в развитии лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* к канамицину***

Исследование промоторной области гена *eis* на наличие мутаций было проведено с помощью разработанной модификации метода ПЦР-SSCP, т.к. структурные особенности этого участка гена делают невозможным использование метода ПДРФ. Разработка методики включала: конструирование праймеров для ПЦР, отработку режима амплификации, которые также позволили определять мутации в промоторной области гена *eis* в культурах МБТ, выделенных в жидкой среде М7Н9, ускоряющие получение результата чувствительности МБТ к канамицину. А также этапы, аналогичные при исследовании гена *rrs* и *gyrA/gyrB*: состав реакционного буфера для ПЦР такой же, как для исследования гена *rrs*, а проведение тепловой денатурации ПЦР-продукта, электрофоретическое разделение денатурированных ампликонов и окраску геля аналогичный для разработанных методик для выявления мутаций в гене *gyrA* и *gyrB*.

Апробацию разработанной методики проводили на 114 клинических изолятах МБТ. Анализ мутаций в гене *rrs* проводили с помощью тест-системы GenoType MTBDRsl, сертифицированной для клинических исследований. Для определения типа мутаций в *eis* также проводили секвенирование. Всего было исследовано 114 клинических изолятов (67,5% с МЛУ, 21,1% МЛУ и устойчивые к Fq, 7% устойчивые только к H, 3,5% только к R и 0,9% к R и Fq).

При исследовании клинических изолятов было установлено, что определение мутаций в *eis* повышает на 23,7% выявляемость устойчивости к Km, при сопоставлении с МАК на среде Л-Й, до 98,3% (95% ДИ 91,0-99,7) (суммарная чувствительность двух

методов). При этом совпадение результатов определения ЛЧ к Км и См в системе Bactec MGIT 960 и МГМ выше по сравнению со средой Л-Й (Таблица 3). Это также свидетельствует о недостаточной эффективности определения ЛЧ МБК к Км на плотной среде МАК.

Таблица 3 – Результаты определения ЛЧ *M.tuberculosis* к канамицину, амикацину и капреомицину молекулярно-генетическими и бактериологическим методами (n=114)

Количество изолятов и гены <i>rrs/eis</i>	Фенотипическая категория	Препараты				
		Канамицин		Капреомицин		Амикацин
		плотная среда Л-Й	Bactec 960 > 2,5 мкг/мл	плотная среда Л-Й	Bactec 960 > 2,5 мкг/мл	Bactec 960 > 1,0 мкг/мл
<i>rrs</i> (a1401g) n=44	устойчивость	44	44	<b>33</b>	44	44
	чувствительность			<b>11</b>		
<i>eis</i> (g-10a,c-14t, g-37t,c-12t) n=26	устойчивость	<b>14</b>	24			
	чувствительность	<b>12</b>	2	26	26	26
wt n=44	устойчивость	1		1		
	чувствительность	43	44	43	44	44
Совпадение Л-Й и Bactec 960		92,1% (95% ДИ 85,7-95,8)		90,4% (95% ДИ 83,5-94,5)		
Совпадение Л-Й и МГМ		88,6% (95% ДИ 81,5-93,2)		89,5% (95% ДИ 82,5-93,9)		
Совпадение Bactec 960 и МГМ		98,2% (95% ДИ 93,8-99,5)		100,0% (95% ДИ 96,7-100,0)		

Следует подчеркнуть, что выявленные мутации в гене *eis* в устойчивых к Км изолятах в системе Bactec MGIT 960 не приводили к устойчивости к См и Ам, т.е мутации в этом гене не связаны с развитием резистентности к данным препаратам. Диапазон значений МИК (5,0 – 10,0 мкг/мл) для штаммов с мутациями g(-10)a, g(-37)t и c(-12)t соответствовал низкому уровню устойчивости к Км, а с заменой c(-14t) умеренной степени устойчивости (20,0 – 40,0 мкг/мл).

При исследовании гена *rrs* совпадение результатов для См, полученных МАК на среде Л-Й и МГМ, составило 89,5% (95% ДИ: 82,5-93,9), так как часть изолятов – 11 (25%) с мутациями в этом гене оставалась чувствительными к препарату. Вместе с тем, для изолятов с мутацией a1401g в гене *rrs* в жидкой среде определены высокие значения МИК Км и Ам (>64,0 – 80,0 мкг/мл) и умеренные См (5,0 – 20,0 мкг/мл). Это свидетельствует о том, что данная мутация приводит к перекрёстной устойчивости к данным препаратам.

Необходимо отметить, что дискордантные результаты были зарегистрированы как между двумя бактериологическими методами, так и молекулярно-генетическими и бактериологическими методами. К недостаткам определения ЛЧ МБТ на плотной среде Л-Й МАК можно отнести то, что учёт результатов устойчивости МБТ к АБП проводится визуально, начиная от 20 видимых колоний МБТ тогда, как в Bactec MGIT

960 осуществляется прибором автоматически, что исключает человеческий фактор. Кроме этого на результаты определения ЛЧ могут влиять такие параметры как состав питательной среды, величина адсорбции и скорость диффузии лекарственного препарата в среде, деградация препарата при длительной инкубации, величина засева и возраст культуры МБТ, pH среды, а также содержание CO<sub>2</sub> во время культивирования (CLSI, 2011).

Некоторые изоляты с мутацией *s(-12)t* остаются чувствительными к Km (Zaunbrecher M.A. et al., 2009). В настоящем исследовании при наличии этой замены МИК Km был приближен к пограничному значению, разделяющему на чувствительные и устойчивые МБТ. Возможно данные штаммы обладали либо пониженным фитнесом или присутствие чувствительной популяции повлияло на результаты определения ЛЧ микробиологическими методами.

Таким образом, установлено, что разработанная методика на основе ПЦР-SSCP позволяет эффективно проводить «косвенное» определение генетических детерминант устойчивости к Km в культурах МБТ, что подтверждено секвенированием. Использование изолятов, выделенных в жидкой М7Н9 в Bactec MGIT 960, ускоряет получение результата чувствительности возбудителя к препарату на 15-20 дней. В развитии устойчивости МБТ к Km участвует два гена – *rrs* и *eis*, одновременный анализ которых позволяет более точно проводить молекулярное определение ЛЧ МБТ к Km. Мутации в гене *eis* не связаны с развитием устойчивости к Cm и Am.

***Определение лекарственной чувствительности к основным препаратам первого и второго ряда в диагностическом материале с помощью тест-системы «ТБ-ТЕСТ»***

Тест-система «ТБ-ТЕСТ» позволяет идентифицировать 116 генетических детерминант устойчивости и устанавливать принадлежность МБТ к наиболее распространенным на территории России генетическим линиям (семействам) в диагностическом материале и культурах.

Для определения эффективности «ТБ-ТЕСТ» при исследовании диагностического материала проведена её апробация на 152 образцах клинического материала (мокрота и бронхиальный смывы), включая 103 с положительным и 49 с отрицательным результатом микроскопии, полученного от 111 пациентов с туберкулёзом лёгких.

Установлено, что «ТБ-ТЕСТ» обладает достоверно большей чувствительностью ( $p < 0,001$ ) по сравнению с люминесцентной микроскопией, увеличивая выявляемость МБТ в респираторном материале на 32,2%. Однако возможность определять генотип ЛЧ по сравнению с тест-системами «ТБ-БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2» достоверно ( $p < 0,001$ ) ниже на 17,8%. При этом тот факт, что у пациентов с помощью «ТБ-ТЕСТ» неоднократно (двукратно и трёхкратно) определялся один и тот же генотип ЛЧ, говорит о высокой воспроизводимости тест-системы. У 11 (42,3%) пациентов это был генотип чувствительного штамма МБТ, у трёх (11,5%) МБТ-МЛУ – устойчивый к Emb, у одного пациента (3,85%) – двукратно определена монорезистентность к H и у другого (3,85%) – к R и Ofx. У 6 (23,1%) пациентов определен генотип МБТ-ШЛУ и у 4 (15,4%) пре-ШЛУ.

При сопоставлении результатов определения ЛЧ возбудителя бактериологическими методами и «ТБ-ТЕСТ» установлена высокая корреляция данных оценки ЛЧ МБТ к R и H в Bactec 960 и «ТБ-ТЕСТ». Чувствительность теста для Emb составила 92,1%, специфичность 82,5%, в то же время предсказательная ценность положительного результата составила всего 77,8% (Таблица 4).

Таблица 4 – Диагностические характеристики «ТБ-ТЕСТ» при исследовании 95 образцов диагностического материала

Препарат/ локус	ТБ- ТЕСТ	Фенотипическая категория		Чувствительность % (ДИ 95%)	Специфичность % (ДИ 95%)	Предсказательная ценность положительного результата % (ДИ 95%)	Предсказательная ценность отрицательного результата % (ДИ 95%)
		Чувствительные	Устойчивые				
Рифампицин <i>rpoB</i>	мутации	1	53	100 (93,2-100,0)	97,6 (87,7-99,6)	98,2 (90,2-99,7)	100 (91,4-100,0)
	нет мутаций	41					
Изониазид <i>katG, inhA, ahpC</i>	мутации		60	93,8 (85,0-97,5)	100 (89,0-100,0)	100 (94,0-100,0)	88,6 (74,1-95,5)
	нет мутаций	31	4				
Этамбутол <i>embB</i>	мутации	10	35	92,1 (79,2-97,3)	82,5 (70,6-90,2)	77,8 (63,7-87,5)	94,0 (83,8-97,9)
	нет мутаций	47	3				
Офлоксацин <i>gyrA, gyrB</i>	мутации	4	25	96,2 (81,1-99,3)	94,2 (86,0-97,7)	86,2 (69,4-94,5)	98,5 (91,9-99,7)
	нет мутаций	65	1				
Канамицин <i>rrs, eis</i>	мутации	9	23	88,5 (71,0-96,0)	87,0 (77,0-93,0)	71,9 (54,6-84,4)	95,2 (86,9-98,4)
	нет мутаций	60	3				
Капреомицин <i>rrs</i>	мутации	1	12	92,3 (66,7-98,6)	98,8 (93,4-99,8)	92,3 (66,7-98,6)	98,8 (93,4-99,8)
	нет мутаций	81	1				

Это во многом связано с тем, что воспроизводимость результатов микробиологического определения ЛЧ МБТ к Emb низкая (Griffith M.E., Vodily H.L., 1992; Madison B. et al., 2002). Возможно генетический анализ лучше прогнозирует истинную устойчивость возбудителя туберкулёза к препарату (Mokrousov I. et al., 2002; Nazbón M. H. et al., 2005; Safi H. et al., 2008). Статистические характеристики «ТБ-ТЕСТ» показали несколько сниженную конкордантность с результатами бактериологической оценки ЛЧ МБТ к Ofx, Km и Cm, установленными на плотной среде. Это связано с описанными выше проблемами определения ЛЧ к препаратам II ряда на среде Л-Й. Вместе с тем, возможность выявлять мутации в *gyrB* увеличила чувствительность теста с 92,3% до 96,2%, специфичность составила 94,2%. Дополнительное исследование промоторной области гена *eis* позволило увеличить чувствительность теста для Km с 50,0% до 88,5%, специфичность для Km и Cm составила 87,0% и 98,8% соответственно. Недостаточная стандартизация отдельных методов и критериев оценки ЛЧ результатов чувствительности нередко приводят к расхождениям между различными методами и, следовательно, с молекулярными тестами (Kim S.J. et al., 2004; Kim S.J., 2005; Rigouts L. et al., 2013; Vanu S. et al., 2014). Это определяет необходимость проведения дальнейших исследований анализа результатов определения ЛЧ к этим препаратам между молекулярно-генетическими и другими бактериологическими методами.

Одновременно с определением ЛЧ «ТБ-ТЕСТ» позволяет устанавливать принадлежность МБТ к наиболее распространенным на территории России генетическим линиям (семейства) по анализу шести нуклеотидных полиморфизмов (SNPs). Определение генетических семейств важно для эпидемиологического мониторинга, направленного на выявление очагов туберкулёзной инфекции и путей её распространения, особенно трансмиссии мультирезистентных штаммов, как правило, связанных с семейством *Beijing*, осуществления разграничения случаев экзогенной инфекции и эндогенной реактивации туберкулёза, а также лабораторной кросс-контаминации (Supply P. et al., 2006). Важной способностью тест-системы является определение подсемейства *Beijing* B0/W148, характеризующегося высокой вирулентностью, трансмиссивностью и ассоциацией с ЛУ (Narvskaya O. et al., 2002; Pardini M. et al., 2009; Lasunskaja E. et al., 2010). Самым распространённым генотипом был *Beijing* определённый в 66,3% изолятов, из которых 33,3% принадлежали кластеру B0/W148, определение которого фактически означало выявление МЛУ, пре-ШЛУ и ШЛУ МБТ. Напротив, изоляты, принадлежащие к Европейско-Американской линии были в большей степени ассоциированы с чувствительными МБТ.

### **Изучение эффективности молекулярно-генетических технологий и оптимизация их применения в лабораторной диагностике туберкулёза**

На сегодняшний день в рутинных исследованиях бактериологических лабораторий фтизиатрической службы используются различные тест-системы, но особое внимание заслуживают три молекулярно-генетические технологии, предназначенные для детекции большинства или наиболее распространённых мутаций в генах-мишенях действия химиопрепаратов: катридная технология на основе ПЦР в реальном времени («Xpert MTB/RIF») и тест-системы гибридизационного анализа на стрипах («Genotype MTBDRplus», «GenoType MTBDRsl») и биочипах («ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ»).

Изучена эффективность данных тест-систем в выявлении и определении ЛЧ МБТ в диагностическом материале для определения их «места» в ускоренной лабораторной диагностике туберкулёза в комплексе с бактериологическими методами.

**Эффективность применения тест-систем «Хpert МТВ/RIF», «ТБ-БИОЧИП-1» и «GenoType MTBDRplus» для исследований респираторного материала пациентов**

Результаты сравнения трёх тест-систем по выявлению ДНК МБТ в диагностическом материале (137 мокрот и 126 бронхиальных смывов), показали, что наибольшей чувствительностью обладает тест-система «ХрегМТВ/RIF», которая даёт наибольшее совпадение с результатами бактериологических исследований — в мокроте и в 87,5% в бронхиальном смыве (Таблица 5).

Таблица 5 – Выявление КУМ и ДНК МБТ в образцах мокроты и бронхиальных смывах

Диагностический материал	Методы					
	Микроскопия ЛЮМ+	Хpert МТВ/RIF	ТБ-БИОЧИП-1	MTBDRplus	Рост микобактерий (Bactec 960)	
					МБТ	НТМБ
<b>Мокрота (n=137)</b>	32	47	40	25	51	4
Чувствительность		<b>92,2%</b> (81,5-96,9)	<b>78,4%</b> (65,4-87,5)	<b>49,0%</b> (35,9-62,3)		
Специфичность		<b>100%</b> (95,7-100)	<b>100%</b> (95,7-100)	<b>100%</b> (95,7-100)		
Предсказательная ценность положительного результата		<b>100%</b> (92,4-100)	<b>100%</b> (91,2-100)	<b>100%</b> (86,7-100)		
Предсказательная ценность отрицательного результата		<b>95,6%</b> (89,1-98,3)	<b>88,7%</b> (80,8-93,5)	<b>79,8%</b> (68,2-83,6)		
<b>Бронхиальный смыв (n=126)</b>	5	20*	5	2	16	2
Совпадение с ростом МБТ		(14) <b>87,5%</b>	(5) <b>31,3%</b>	(2) <b>12,5%</b>	16	2

Тест-системы «ТБ-БИОЧИП-1» и «GenoType MTBDRplus» позволяют анализировать одновременно большинство известных мутаций, ответственных за развитие устойчивости МБТ одновременно к двум препаратам – R и H. Сравнительный анализ чувствительности этих двух тестов показал преимущество «ТБ-БИОЧИП-1», который позволяет выявлять ДНК МБТ в мокроте как с положительной (совпадение составило в 96,7% образцах), так отрицательной микроскопией (в 52,4% образцах) в отличие «GenoType MTBDRplus», предназначенной для исследования образцов только с положительными результатами микроскопии (совпадение в 83,3% образцах) (согласно рекомендациям производителя тест-системы).

Следует отметить, что такие показатели были получены благодаря использованию одной порции мокроты как для молекулярно-генетических, так и для бактериологических исследований. Исследование разных порций диагностического материала уменьшает процент обнаружения возбудителя в образцах с положительной микроскопией до 87,0% с помощью «ТБ-БИОЧИП-1» и в образцах с отрицательной до 44,0% (Манаенкова Е.В., Савин А.А., 2015).

В образцах бронхиального смыва отмечена низкая корреляция результатов использования «ТБ-БИОЧИП-1» и «GenoType MTBDR*plus*» с наличием роста МБТ в Bactec MGIT 960 — всего 31,3% и 12,5% соответственно. Такие показатели свидетельствуют о малой эффективности тест-систем для исследования данного диагностического материала. Более рациональным для определения генотипов ЛЧ является использование выделенных из этого вида материала культур. Этот же алгоритм целесообразно применять и для образцов мокроты, в которых не удалось выявить ДНК МБТ и определить лекарственную чувствительность.

Одним из преимуществ молекулярных технологий является возможность исследования контаминированных проб в жидкой среде M7H9, используемой в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 (контаминация может достигать от 9,0 до 16,7%) (Williams-Bouyer N. et al., 2000; Huang T-S. et al., 2001]. В настоящем исследовании 9,3% образца мокроты подверглись микробной контаминации при посеве в Bactec MGIT 960 (не вошли в сравнительный анализ) и в 2,6% из них (два с положительным и два с отрицательным результатом микроскопии) только с помощью «Хpert MTB/RIF» и «ТБ-БИОЧИП-1» удалось дополнительно выявить ДНК МБТ и определить чувствительность к R и H, продемонстрировав важность их использования в таких ситуациях.

Возможность определения наличия/отсутствия генетических детерминант устойчивости в ДНК МБТ напрямую зависит от её концентрации в исследуемом диагностическом материале и от чувствительности тест-системы. В настоящем исследовании определить их в выявленной ДНК МБТ в наибольшем числе случаев удалось с помощью «Хpert MTB/RIF» в 97,9%, «ТБ-БИОЧИП-1» в 95,0% и «GenoType MTBDR*plus*» в 92% образцов. Совпадение результатов «Хpert MTB/RIF» с бактериологическим исследованием составило 100%, а «ТБ-БИОЧИП-1» для чувствительных МБТ — 100%, монорезистентных к H — 85,7%, с МЛУ — 92,8%. Расхождение связано с присутствием мутации L533P в гене *rhoB* в одном образце с фенотипической монорезистентностью МБТ к H. Определить ЛЧ с помощью «GenoType MTBDR*plus*» удалось в наименьшем количестве образцов, но для этой выборки совпадение результатов составило 100% и с бактериологическими данными, и с «ТБ-БИОЧИП-1».

В образцах бронхиального смыва результаты бактериологического определения ЛЧ МБТ к R и/или H полностью совпали с данными всех молекулярных тест-систем.

Необходимо подчеркнуть, что тест-система «Хpert MTB/RIF», обладая высокой чувствительностью в выявлении ДНК МБТ как в мокроте, так в бронхиальном смыве, обеспечивает автоматическое выполнение всех этапов молекулярного исследования, тем самым исключая риск контаминации образцов во время экстракции ДНК МБТ. Такие характеристики крайне важны для скринингового исследования в тех ситуациях, когда нет полноценной ПЦР - лаборатории с соответствующим кадровым и ресурсным обеспечением. Данную технологию целесообразно использовать в клиничко-диагностических лабораториях на этапе дифференциальной диагностики туберкулёза органов дыхания у пациентов с подозрением на это заболевание с отрицательной микроскопией образцов мокроты по *Ziehl-Neelsen*. В то же время, тест «Хpert MTB/RIF» не позволяет определять крайне важный показатель — чувствительность МБТ к H, высоко специфичному ПТП, что является недостатком этой тест-системы.

Тест-система «ТБ-БИОЧИП-1» наиболее эффективна, так как с достаточной чувствительностью позволяет выявлять ДНК МБТ в мокроте не зависимо от

результатов микроскопии и одновременно определять чувствительность к двум основным ПТП. Кроме того, с помощью биочипов можно охарактеризовать большинство мутаций, в том числе и редких, что даёт крайне важную дополнительную информацию при изучении эпидемиологии туберкулёза.

Технологии гибридизационного анализа предназначены для использования в бактериологических лабораториях фтизиатрического профиля, оснащённых соответствующим оборудованием и квалифицированными кадрами для проведения молекулярно-генетических исследований.

#### **Эффективность тест-систем «ТБ-БИОЧИП-2» и «GenoType MTBDRsl» при исследовании респираторного материала**

Сравнительный анализ эффективности тест-систем «ТБ-БИОЧИП-2» и «GenoType MTBDRsl» проводили на 135 препаратах геномной ДНК МБТ, выделенной из 102 образцов мокроты и 33 культур МБТ и охарактеризованной с помощью «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и бактериологическими методами.

Было установлено, что «ТБ-БИОЧИП-2» обладает большей чувствительностью при выявлении ДНК МБТ в мокроте по сравнению «GenoType MTBDRsl», увеличивая частоту обнаружения МБТ на 26,5%. В образцах с положительным результатом микроскопии с помощью «GenoType MTBDRsl» ДНК МБТ обнаружена в 86,1%, с отрицательной в 30,4%. Определить генетические детерминанты устойчивости к ФХ, АГ (Cm) и Emb в выявленной ДНК МБТ с помощью этого теста удалось только в 92,0% образцах (Таблица 6).

Таблица 6 – Результаты выявления ДНК *M. tuberculosis* и определение генотипов ЛЧ в мокроте с помощью «ТБ-БИОЧИП-2» и «GenoType MTBDRsl» (n=102)

Рост МБТ в Bactec 960	Микроскопия	Результаты выявления ДНК МБТ и определения генотипов ЛЧ			
		ДНК МБТ+		Генотип ЛЧ	
		MTBDRsl	ТБ-БИОЧИП-2	MTBDRsl	ТБ-БИОЧИП-2
79	ЛЮМ+ (n=79)	68	79	68	79
23	ЛЮМ- (n=23)	7	23	1	23
102 (100%)	79 (77,5%)	75 (73,5%)	102 (100%)	69/75 (92,0%)	102 (100%)

Преимуществом тест-системы «GenoType MTBDRsl» является то, что она позволяет выявлять мутации, связанные с устойчивостью не только к ФХ, но и АГ (Cm) и Emb. В определении мутаций в гене *gyrA* ДНК МБТ, выделенной как из мокроты, так и культур, две тест-системы продемонстрировали одинаковые «характеристики» (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты молекулярно-генетического выявления мутаций в генах *gyrA*, *rrs*, *embB* и определения ЛЧ МБТ к офлоксацину, канамицину/капреомицину и этамбутолу

Офлоксацин					Канамицин/капреомицин			Этамбутол		
Фенотип	MTBDRs/		ТБ-БИОЧИП-2		Фенотип	MTBDRs/		Фенотип	MTBDRs/	
	Без мутаций	мутации	Без мутаций	мутации		Без мутаций	мутации ( <i>rrs</i> )		Без мутаций	мутации
Чувствительные (n=49)	48 (wt)	1 (S91P)	48 (S95T)	1 (S91P)	<b>Km/Cm</b> чувствительные (n=53)	52 (wt)	1 (a1401g)	чувствительные (n=35)	26 (wt)	4 (M306V) 4(M306I) 1 (Δ wt)
Устойчивые (n=53)	4 (S95T)	19(D94G) 9(D94A) 5(D94N/Y) 2(D94Y/N) 9(A90V) 4(S91P) 1(Δ wt1)	4 (wt)	19(D94G) 9(D94A) 5(D94N) 2(D94Y) 9(A90V) 4(S91P) 1(G88C)	<b>Km/Cm</b> устойчивые (n=35)		34 (a1401g) 1(a1401g+g1484t)	устойчивые (n=67)	30 (wt)	30 (M306V) 6(M306I) 1 (Δ wt)
					<b>Km</b> устойчивые (n=14)	14 (wt)	-			
<b>чувствительность</b>	92,5% (ДИ 82,1-97,0)				<b>71,4%</b> (ДИ 57,6-82,1) <b>Km</b> 100% (ДИ 90,1-100) <b>Cm</b>			<b>55,2%</b> ( ДИ 43,4-66,5)		
<b>специфичность</b>	98,0% (ДИ 89,3-99,6)				<b>98,1%</b> (ДИ 90,1%-99,7%) <b>Km</b> 98,5% (ДИ 92,0-99,7) <b>Cm</b>			<b>74,3%</b> (ДИ 57,9-85,8)		
Предсказательная ценность положительного результата	98,0% (ДИ 89,5-99,7)				<b>97,2%</b> (ДИ 85,8%-99,5%) <b>Km</b> 97,2% (ДИ 85,8-99,5) <b>Cm</b>			<b>80,4%</b> (ДИ 66,8-89,4)		
Предсказательная ценность отрицательного результата	92,3% (ДИ 81,8-97,0)				<b>78,8%</b> (ДИ 67,5%-86,9%) <b>Km</b> 100% ( ДИ 94,5-100) <b>Cm</b>			<b>46,4%</b> ( ДИ 34,0-59,3)		

Несмотря на это, преимущество биочипа очевидна. Тест позволяет определять тип редко встречаемой мутации — G88C, тогда как «GenoType MTBDRsl» определяет её только по отсутствию гибридизации с зондом дикого типа ( $\Delta$  wt1), который перекрывает область с 85 по 90 кодон. Это даёт возможность только предположить наличие мутации в одном из этих кодонов, замены в которых не все связаны с устойчивостью, что в свою очередь может привести к ложно-положительному результату.

Генетические детерминанты устойчивости к Km, Am и Cm с помощью этого теста можно определять только в гене *rrs*, связанные с перекрёстной устойчивостью к ним, что уменьшает выявляемость устойчивых МБТ к Km на 28,6%.

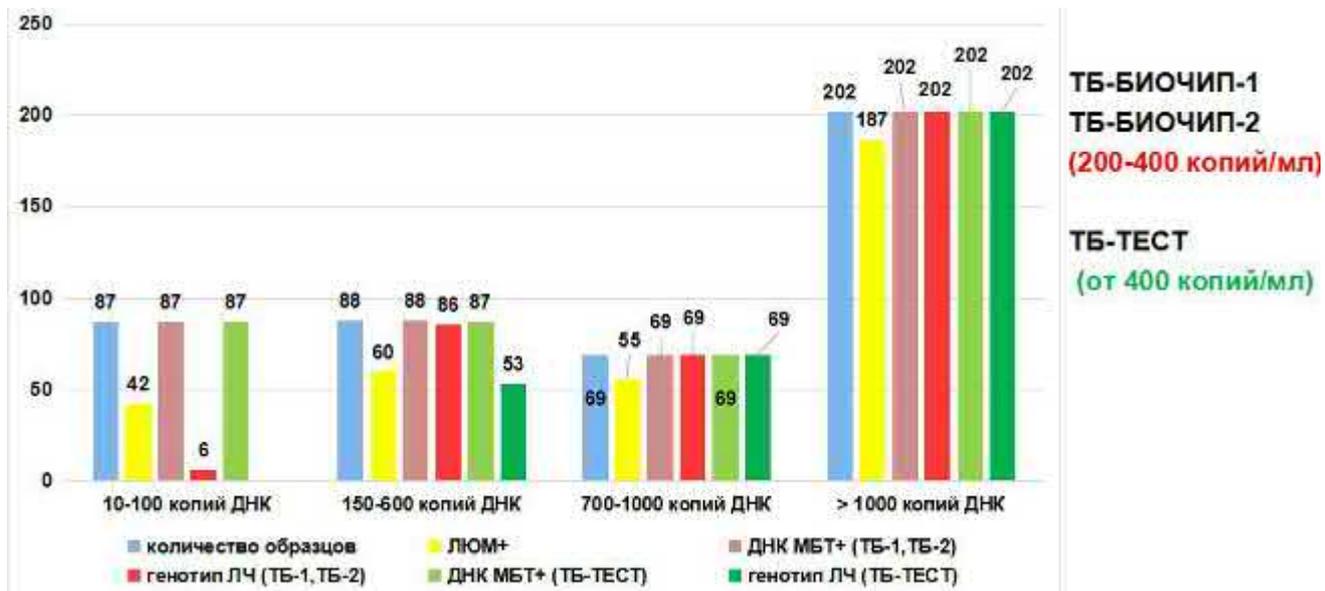
При определении ЛЧ МБТ к Emb в сравнении с фенотипом, установленным в системе Bactec MGIT 960, тест-система продемонстрировала низкую чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительного и отрицательного результата, так как с её помощью возможно определять мутации только в 306 кодоне в гене *embB*.

Таким образом, установлено что тест-система «ТБ-БИОЧИП-2» как и «ТБ-БИОЧИП-1» обладает наибольшей чувствительностью при выявлении ДНК МБТ в мокроте, как с положительной, так и отрицательной микроскопией. С помощью биочипов можно охарактеризовать большинство мутаций, в том числе и редких (определять тип мутаций), что исключает получение ложно-положительных результатов и даёт крайне важную дополнительную информацию при изучении эпидемиологии туберкулёза. В тоже время, тест-система «GenoType MTBDRsl» дополнительно позволяет определять генетические детерминанты устойчивости, но только связанные с перекрёстной устойчивостью к АГ и Cm (ген *rrs*) и часто встречаемые к Emb, что уменьшает совпадение с бактериологическим определением ЛЧ к этим препаратам.

Для более эффективного использования «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ» необходимо проводить исследование из единого образца мокроты или другого биологического материала в комплексе с применением бактериологических методов.

#### **Оптимизация применения молекулярно-генетических методов в лабораторной диагностике туберкулёза**

Несмотря на достоинства биочиповой технологии чувствительность тестов («ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ») в значительной степени зависит от концентрации ДНК в образце, что ограничивает их возможности в определении ЛЧ/ЛУ МБТ к АБП. Включение ПЦР-РВ позволило определить количество ДНК возбудителя в диагностическом материале, необходимое для последовательного применения тест-систем «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ» в алгоритме ускоренной лабораторной диагностики туберкулёза. Было установлено, что пороговые значения концентрации ДНК для получения качественной гибридизационной картины на чипах (наличие позитивных сигналов во всех группах анализируемых фрагментов) и соответственно установления генотипа ЛЧ составили для «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» от 200 до 400 копий/мл и от 400 копий/мл и выше для «ТБ-ТЕСТ» (Рисунок 4).



**Рисунок 4** - Определение пороговых значений концентрации ДНК *M.tuberculosis* в образце с помощью тест-системы «АмплиТуб-РВ» (n=446)

Выявление ДНК возбудителя с помощью МГМ было подтверждено ростом МБТ в Bactec MGIT 960 в 95,2% образцах и дополнительно в 4,8 % наличие МБТ было установлено с помощью ПЦР-РВ и 2,2% люминесцентной микроскопией. Генотипы ЛЧ определены в 81,4% (ДИ 77,5%-84,7%) с помощью «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и в 72,7% (ДИ 68,3%-76,6) «ТБ-ТЕСТ».

Эффективность разработанного алгоритма применения биочипов продемонстрирована на исследовании операционного материала.

Результаты проведённого исследования свидетельствовали, что частота выявления возбудителя ТБ в операционном материале больных ТБ с помощью МГМ в 8,5 раз выше по сравнению с бактериологическим методом (в жидкой среде М7Н9 в системе Bactec MGIT 960). Высокое содержание ДНК МБТ (от 500 до > 1000 копий/мл) в операционном материале позволило использовать в 91,5% случаев тест-систему «ТБ-ТЕСТ» для определения ЛЧ одновременно к пяти препаратам. У 42,3% больных ТБ этиологическая природа заболевания была подтверждена впервые с помощью молекулярно-генетического исследования операционного материала, из которых в 92,3% была определена ЛЧ МБТ с помощью «ТБ-ТЕСТ». Возможность использования «ТБ-ТЕСТ» для исследования этого вида материала позволила за кратчайший срок (2-3 дня, включая обработку материала) определить генетические детерминанты устойчивости, связанные с МЛУ (11,6% пациентов), пре-ШЛУ (12,8%), МБТ с ШЛУ (5,8%), монорезистентностью к H (17,4%) и R (1,2%). Самое распространённое сочетание мутаций S531L (в гене *rpoB*) и S315T (в гене *katG*), ответственных за развитие МЛУ МБТ, выявлено в 77,8% образцов ДНК. В генах *gyrA* и *gyrB* выявлены мутации, участвующие в проявлении устойчивости к ФХ, в 31,3% и 12,5% образцах соответственно. В 31,3% случаев мутации (a1401g) в гене *rrs* определяли устойчивость к АГ и Ст и в 56,3% образцах в *eis* - устойчивость к Км. Самым варибельным по типам выявленных мутаций был ген *embB*, в котором обнаружено 11 вариантов. Наиболее распространённые из них M306V и Q497R обнаружены в 26,9% и 23,1% образцах соответственно. Данные мутации встречались в МЛУ и пре- и ШЛУ образцах ДНК МБТ.

Необходимо отметить, что в связи с трудностью получения культуры МБТ из операционного материала, была показана возможность использования резекционного

диагностического материала для проведения эпидемиологических исследований с помощью «ТБ-ТЕСТ». В наибольшем проценте случаев (47,7%) определён генотип *Beijing*, вариант *Beijing B0* - в 12,8%, Европейско-Американское семейство - в 16,3% случаях, *LAM* - в 11,6%, *Ural* - в 9,3% и *Haarlem* - в 2,3%. Подобное распределение согласуется с данными литературы о широком распространении генотипа *Beijing* на территории РФ (Drobniewski F. et al., 2005; Шитиков Е.А., 2014).

На основании полученных данных в алгоритм ускоренной лабораторной диагностики туберкулёза были включены, как наиболее эффективные, молекулярно-генетические тест-системы «АмплиТуб-РВ», «Хpert МТВ/RIF», «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ».

**Результаты оценки лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам молекулярно-генетическим «ТБ-ТЕСТ» и бактериологическими методами. Алгоритм ускоренной микробиологической лабораторной диагностики туберкулёза**

Необходимость достоверной информации о ЛЧ МБТ к ПТП возрастает в связи с усилением противотуберкулёзного контроля за ЛУ, в первую очередь при лечении туберкулёза с МЛУ и ШЛУ, частота заболеваемости которым неуклонно растёт по всему миру (World Health Organization (WHO) Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis, 2014; Trauner A. et al., 2014). Однако результаты определения ЛЧ МБТ к АБП как между различными микробиологическими методами, так и с молекулярными тестами нередко различаются (Gangadharam P.R. et al., 1990; Kim S.J., 2005; Rigouts L. et al., 2013; Banu S. et al., 2014).

**Сопоставление результатов молекулярно-генетического и бактериологического определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к препаратам основного ряда в системе Vactec MGIT 960**

Исследование проводили с целью определить возможные несоответствия в результатах определения ЛЧ к препаратам I ряда (H, R и Emb) и II ряда (ФХ и инъекционным препаратам) в автоматизированной системе Vactec MGIT 960 и молекулярно-генетического с помощью «ТБ-ТЕСТ» и установить связанные с этим причины.

Для определения корреляции результатов определения ЛЧ возбудителя к АБП между молекулярно-генетической тест-системой «ТБ-ТЕСТ» и автоматизированной системой Vactec MGIT 960 изучено 808 штаммов МБТ, выделенных из диагностического материала 470 впервые выявленных больных, 163 из контингентов, 29 с обострением туберкулёзного процесса, 51 прибывших с других территорий и 95 с рецидивом заболевания.

Наибольшая частота совпадений результатов определения ЛЧ МБТ при применении этих методов была установлена в отношении H — 99,8% (ДИ; 99,1%-99,9%). Преобладающее количество замен (76,6%) определено в гене *katG*; из них превалировала S315T1, обнаруженная в 97,0% изолятов. Мутации в двух генах *katG* и *inhA* выявлены в 20,4% устойчивых изолятов; среди них преобладало сочетание мутаций S315T1, c(-15)t обнаруженное в 92,1% штаммов. В гене *inhA* выявлен только один тип замены c(-15)t, обнаруженный в 2,6% устойчивых изолятов. Необходимо отметить, что несмотря на то, что биочип позволяет определять довольно широкий спектр мутаций в трёх генах (в отличие от тест-системы GenoType MTBDRplus — мутации определяются только в двух генах - *katG* и *inhA*), в двух (0,3%) штаммах с МЛУ мутации отсутствовали. Расхождения, возможно связаны с иными механизмами устойчивости или гетерорезистентностью изолята (Ramaswamy S., Musser J., 1998;

Ramaswamy S.V. et al., 2003; Campbel, P.J. et al., 2011; Machado D. et al., 2013; Zhang Y. et al., 2015).

Совпадения результатов двух быстрых методов (Bactec MGIT 960 и «ТБ-ТЕСТ») для R составило 96,5% (ДИ; 95,0%-97,6%), что совпадает с данными, которые приводят другие авторы (Nikolayevskyy V. et al., 2009; Zimenkov D.V. et al., 2016; Meaza A. et al., 2017). Отмечено большое разнообразие типов мутаций в 6 кодонах (511, 513, 516, 533, 526, 531) гена *rpoB*. Всего обнаружено 30 вариантов замен: 40,0% двойных и 60,0% одиночных, из которых преобладала (83%) S531L. Высокий процент совпадений установлен при исследовании штаммов МБТ-МЛУ, пре-ШЛУ, МБТ-ШЛУ и монорезистентных к R — 99,4 % (ДИ; 98,5%-99,8%). Среди моно- и полирезистентных изолятов он составил лишь 66,7% (ДИ; 55,2%-76,5%). Треть из этих штаммов содержали замены L511P, H526L, H526N, D516Y, L533P, D516G и двойные D516G/S531W, D516G/S522L и L533P/S531L в *rpoB*. В литературе такие мутации классифицируют, как «спорные», так как в системе Bactec MGIT 960 большинство таких изолятов при КК = 1,0 мкг/мл оказываются чувствительными к R, что приводит к дискордантным результатам с другими микробиологическими методами (метод пропорций на плотной яичной среде Л-Й или агаровой Middlebrook 7H11 и Bactec MGIT 960) (Van Deun A. et al., 2009; Rigouts L. et al., 2013; Andres S. et al., 2014; Ocheretine O. et al., 2014). Тем не менее, при получении с помощью МГМ данных об устойчивости МБТ к R необходимо учитывать это при выборе схемы лечения, особенно когда штамм по культуральным данным обладает чувствительностью и к H и R. И наоборот, когда штамм культурально устойчивый к препарату, но мутации в исследуемом участке гена *rpoB* отсутствуют, необходимо проводить секвенирование, рекомендованное ВОЗ в качестве референс-метода определения ЛЧ к R (World Health Organization (WHO) Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis, 2018).

Наименьшее совпадение результатов установлено для Emb - 74,6% (95% ДИ 71,5-77,5). Мутации в гене *embB* были выявлены как в 57,4% устойчивых изолятах (90,9% замен), так и в 42,6% чувствительных МБТ, мутации в которых выявлены практически в половине изолятов - в 47,4%. Наиболее часто выявлялись мутации M306V (33,8%), D354V (14,7%), M306I1 (13,5%) и Q497R (10,1%). Остальные замены обнаружены в единичных случаях. Известно, что существуют проблемы при определении ЛЧ к этому препарату также классическими бактериологическими методами, что может быть связано с бактериостатической природой Emb, уменьшением его активности в культуральной среде или узким «диапазоном» между МИК чувствительных и устойчивых изолятов МБТ (Heifets L. et al., 1986; Gangadharam P. R. et al., 1990; Madison B. et al., 2002).

**Сопоставление результатов молекулярно-генетического и бактериологического определения лекарственной чувствительности в системе Bactec MGIT 960 *M.tuberculosis* к препаратам группы фторхинолонов**

В отношении препаратов группы ФХ (Ofx, Lfx и Mfx), КК которых для системы Bactec MGIT 960 пересматривались ВОЗ в 2008 г. (World Health Organization (WHO) Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs, 2008) и 2014 г (World Health Organization (WHO) Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis, 2014), было установлено, что наибольшая корреляция результатов определения ЛЧ между методами была определена при КК=2,0 мкг/мл Ofx и при применении КК=0,25 мкг/мл Mfx, что нельзя сказать о использовании КК 2,0 и 1,5 мкг/мл Lfx, при которых

устойчивые к Mfx изоляты проявляли чувствительность к препарату, несмотря на то, что Lfx обладает меньшей активностью. Снижение КК для Lfx до 1,0 мкг/мл и применение КК 0,25 мкг/мл для MFX (рекомендованной в 2008), позволило бы согласовать результаты молекулярно-генетического и фенотипического определения ЛЧ к ФХ в системе Bactec MGIT 960. Кросс-резистентность ко всем ФХ, независимо от применяемой КК (в указанные периоды), наблюдалась в 23,9% изолятов и была связана в преобладающем большинстве (92,7%) с заменами в 94 кодоне (D94G, D94N, D94Y, D94V) и со всеми (7,3%) двойными в гене *gyrA* и *gyrA/gyrB*. Расхождение в результатах между методами установлено в 13,7% изолятов: в 11,8% с мутациями в гене *gyrA* и во всех (1,9%) в *gyrB*. В зависимости от использования КК (2,0 и 1,5 мкг/мл Lfx и 0,25 и 0,5 мкг/мл Mfx) изоляты с мутациями A90V (49,5%), D94A (33,7%), S91P (14,7%) и G88A (2,1%) проявляли то чувствительность, то устойчивость к этим препаратам, что свидетельствует о разной степени устойчивости к ним и требует корректировки КК для точного тестирования ЛЧ в Bactec MGIT 960. Штаммы с мутациями T539N, N538K, E540D, D500H, D500N и N538D и двойной D500N/E540D в гене *gyrB* демонстрировали наибольшую вариабельность в чувствительности/устойчивости к ФХ, проявляя устойчивость почти в половине (43,8%) изолятов к Ofx и редко (в зависимости от КК) к Lfx и Mfx. Все изоляты с R485C, S486F, T539P, и T539I не обладали устойчивостью к тестируемому ФХ.

**Сопоставление результатов молекулярно-генетического и бактериологического определения лекарственной чувствительности в системе Bactec MGIT 960 *M.tuberculosis* к аминогликозидам и капреомицину**

В 2008 году ВОЗ впервые рекомендовала значения КК для определения ЛЧ МБТ к инъекционным ПТП в системе Bactec MGIT 960: для Km - 2,5 мкг/мл, Am - 1,0 мкг/мл и Cm - 2,5 мкг/мл и до настоящего времени они не менялись.

Настоящее исследование показало, что совпадение между результатами, полученными при использовании этих методов для Km (при исследовании генов *rrs* и *eis*), Am и Cm (только *rrs*) составило 92,8% (95% ДИ 90,8-94,4), 94,6% (95% ДИ 92,8-95,9) и 97,2% (95% ДИ 95,8-98,1) соответственно. Замены в промоторной области гена *eis* в преобладающем большинстве случаев (91,6%) выявлены в устойчивых к Km и в чувствительных к Cm (97,3%) и Am (85,1%) МБТ. Перекрестная устойчивость ко всем препаратам в большинстве изолятов (95,3%) связана с мутациями в гене *rrs* и в 1,3% в сочетании с заменами в *eis* - a1401g/c-(12)t, a1401g/g-(10)a.

Дискордантные результаты были связаны с присутствием мутаций в *eis* в наименьшем количестве чувствительных к Km МБТ и устойчивых к Am и Cm, а также наличием мутации в *rrs* (a1401g) в чувствительных штаммах к Cm. Возможно, такие изоляты обладают МИК близкой к КК препаратов в Bactec MGIT 960 и определяются то, как чувствительные, то как устойчивые. Нельзя исключить и тот факт, что определение ЛЧ к препаратам второго ряда в Bactec MGIT 960 полностью не стандартизовано и, следовательно, несоответствие между фенотипическими и молекулярно-генетическими тестами может быть связано с используемыми КК (Lacoma A. et al., 2015). Отсутствие мутаций в устойчивых МБТ к Km, Am и Cm в исследуемых генах может свидетельствовать о иных механизмах устойчивости, маркёры которых не включены в тест-систему (Reeves A. et al., 2013).

**Сопоставление результатов молекулярно-генетического «ТБ-ТЕСТ» и бактериологического определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* с помощью тест-системы Sensititre MYCOTB TREC DIAGNOSTICS**

Несмотря на достоинства автоматизированной системы Bactec MGIT 960 определение ЛЧ по КК не позволяет в полной мере оценить уровень устойчивости МБТ к АБП, которая может варьировать в широких пределах. Это, в свою очередь, нередко является причиной расхождений с МГМ. Более достоверную информацию о ЛЧ МБТ к АБП можно получить с помощью её количественного определения — способности микроорганизмов расти на среде, содержащей широкий диапазон концентраций препарата (Hall L. et al., 2012; Макарова М.В. и др., 2013). Известно, что различные типы мутаций, а также степень гетерогенности популяции влияют на уровень лекарственной устойчивости возбудителя (Böttger E.C., 2011; Zhang Z. et al., 2014).

Была изучена корреляция между различными типами мутаций, детерминирующими устойчивость к основным АБП первого и второго ряда и уровнем устойчивости возбудителя к ним с помощью тест-систем «ТБ-ТЕСТ» и Sensititre MycoTB. Всего было изучено 470 штаммов МБТ, из которых 83 (17,6%) обладали МЛУ, 139 (29,6%) пре-ШЛУ, 146 (31,1%) ШЛУ; 25 (5,3%) были монорезистентными к Н и 1 (0,2%) к R; 13 (2,8%) полирезистентными, 60 (12,8%) чувствительными и 3 (0,6%) чувствительными к Н и R, но устойчивые либо к ФХ и АГ, либо только к ФХ или АГ (по одному штамму). Установлен более высокий уровень корреляции результатов между «ТБ-ТЕСТ» и Sensititre MycoTB по сравнению с Bactec MGIT 960 для Emb (95,3% и 81,5% соответственно), в меньшей степени для Rif (98,1% и 96,0%), Km (99,2% и 92,3%), Am (99,8% и 95,9%), Ofx (99,1% и 97,5%), Mfx при КК=0,25 мкг/мл (98,3% и 98,9%) и сопоставима для Н (99,8%) (Таблица 8).

Таблица 8 – Результаты совпадения между тест-системой «ТБ-ТЕСТ» и бактериологическими методами (n=470)

Препараты	Результаты совпадения между методами % (ДИ 95%)	
	«ТБ-ТЕСТ» и Bactec MGIT 960	«ТБ-ТЕСТ» и Sensititre MycoTB («условное совпадение», Lee J et al, 2014)
Рифампицин	96,0 (93,8-97,4)	98,1 (96,4-99)
Изониазид	99,8 (98,9-99,9)	99,8 (98,9-99,9)
Этамбутол	81,5 (77,7-84,7)	95,3 (93,0-96,9)
Офлоксацин	97,5 (95,6-98,5)	99,1 (97,8-99,7)
Моксифлоксацин (КК=0,25 мкг/мл)	98,9 (96,1-99,7)	98,3 (95,2-99,4)
Канамицин	92,3 (89,6-94,4)	99,2 (97,8-99,7)
Амикацин	95,9 (93,8-97,4)	99,8 (98,8-99,9)

Исследование показало, что высокая и умеренная степень устойчивости к R преобладала среди исследуемых изолятов (около 89,9%) и была связана с заменой S531L (выявлена в 79,7% изолятов) и мутациями в 526 кодоне Н на R/Y/D/P, L511R, D516V, S531W, Q513G, Q513K, а также 9 типами двойных замен. «Промежуточная» чувствительность/устойчивость в области близкой к КК (МИК от 0,5 до 2,0 мкг/мл)

определена в наименьшем (9,4%) количестве изолятов и связана с мутациями D516Y, D516G, H526N, H526C, L533P, L511P и двойными L516G/S531W, S522L/D516G, L533P/S531L — эти штаммы чаще определяли в Bactec MGIT 960 как чувствительные. Надо отметить, что около половины штаммов с H526L и 3,6% с S531L также обладали «промежуточной» чувствительностью/устойчивостью, что возможно связано с низкой скоростью роста (фитнес) или гетерогенностью изолятов, что привело к снижению МИК.

В отношении H связь между типом мутации и уровнем устойчивости не установлена. Все выявленные замены в *katG*, из которых S315T обнаружена в наибольшем количестве изолятов (70,7%) или в сочетании с *inhA*, *ahpC* (25,1%), а также с(-15)t в промоторной части гена *inhA* (3,9%), приводили к устойчивости МБТ к препарату в Bactec MGIT 960 и преобладающее количество изолятов (96,8%) обладали высоким и умеренным уровнем устойчивости. «Промежуточной» чувствительностью/устойчивостью обладали 3,2% изолята с мутациями и 0,2% устойчивых без мутаций, что возможно связано с гетерогенностью изолятов (наличие чувствительных и устойчивых популяций), МИК для которых снижается при уменьшении устойчивой популяции. Отсутствие мутаций в устойчивых МБТ может также свидетельствовать о других механизмах устойчивости.

Достоверной связи между типом мутаций и уровнем устойчивости МБТ к Emb не наблюдалось. Наибольшее количество штаммов с мутациями (88,0%) и без (56,6%), как среди фенотипически чувствительных, так и устойчивых в Bactec MGIT 960, обладали «промежуточной» чувствительностью/устойчивостью, что по сути соответствует пиковому значению концентрации препарата, достигаемой в сыворотке крови (5 мкг/мл). По этой причине действие препарата может оставаться сублетальным в течении проводимого лечения (Böttger E.C., 2011). Однако наличие мутаций в 8,3% изолятов, обладающих высоким уровнем устойчивости, свидетельствует о том, что мутации увеличивают устойчивость МБТ к Emb.

При количественном определении ЛЧ МБТ к Ofx и Mfx установлены различия, связанные с определёнными типами мутаций в генах *gyrA/gyrB*. Штаммы с мутациями N538K, D500H, D500N, N538D, T539N в *gyrB* обладали «промежуточной» чувствительностью/устойчивостью к двум препаратам, а D500N/E540D приводила к умеренной степени устойчивости к Mfx и «промежуточной» к Ofx. Напротив, замены R485C, T539P и T539I не приводят к устойчивости к Ofx и Mfx, что подтверждено результатами в Bactec MGIT 960 и Sensititre MycoTB. Высокий и умеренный уровень устойчивости МБТ к обоим препаратам установлен в наибольшем количестве штаммов (около 59%) и связан с мутациями D94(G,H,Y,N), G88C, S91P и двойными в *gyrA* или *gyrA/gyrB*. Напротив, большинство штаммов с заменами A90V и D94A в *gyrA* имеют низкую степень устойчивости к Ofx (около 81,0%) и «промежуточную» к Mfx (около 82,6%). Редко встречающиеся мутации G88A, D94V, A74S и штамм с G88A/H70A/G509A проявляли «промежуточную» степень чувствительности/устойчивости к обоим препаратам. Снижение КК с 0,5 до 0,25 мкг/мл для качественного определения ЛЧ МБТ к Mfx в Bactec MGIT 960, предложенная ВОЗ (WHO., 2018), обосновано. Показано уменьшение количества изолятов с «промежуточной» степенью чувствительности/устойчивости с 45,4% при КК=0,5 мкг/мл до 31,1% при КК=0,25 мкг/мл, главным образом за счёт замен A90V и D94A, что подтверждено расчётом «условного» совпадения между методами «ТБ-ТЕСТ», Sensititre MycoTB и Bactec MGIT 960 — 97,8%.

В отношении Km и Am установлена корреляция между мутациями в генах *rrs* и *eis* и уровнем устойчивости. Замена a1401g в *rrs* в преобладающем количестве изолятов (38,1%), а также в сочетании с *eis* (в 0,9%), приводит к умеренному и высокому уровню устойчивости к Km и Am, тогда как редко встречающаяся g1484t (0,4%) к умеренному к Km и низкому к Am. Наибольшее количество штаммов (67,4%) с мутациями в промоторной области гена *eis* обладали низким и умеренным уровнем устойчивости к Km и 92,6% «промежуточной» чувствительностью/устойчивостью к Am. Мутации в *eis* не являются специфическими маркерами устойчивости к Am, однако замена с(-14)t связана с низкой устойчивостью к препарату, в настоящем исследовании она преобладала среди устойчивых изолятов в Bactec MGIT 960. Вместе с тем, «промежуточной» степенью чувствительности/устойчивости к Km обладали 41,5% изолятов с мутациями, из которых в 94,8% они выявлены в промоторной части *eis* и 5,2% в *rrs*; к Am в 6,3% с мутациями в *rrs* и в сочетании с *eis*, что возможно связано с гетерорезистентностью изолятов. Отсутствие мутаций в обоих генах в 5,5% устойчивых изолятов к Km и 0,9% к Am возможно связано с мутациями в другом регионе гена *rrs* (Zhang Z. et al., 2014) или в 5' Untranslated region *whiB7* не представленных в «ТБ-ТЕСТ» (Reeves A Z. et al., 2013).

Таким образом, включение в алгоритм лабораторной диагностики туберкулёза микробиологического теста Sensititre MусоТВ, наряду с тест-системой «ТБ-ТЕСТ», позволит установить количественную характеристику штаммов (уровень чувствительности/устойчивости к широкому спектру АБП) для выбора препаратов и оптимизации проводимого лечения.

В результате проведённых исследований разработан алгоритм, основанный на комплексном применении бактериологических и молекулярно-генетических методов, который позволяет в сроки от 2,5 часов до трёх дней не только обнаружить МБТ ( ДНК МБТ) в исследуемом материале, но и установить в генах возбудителя наличие мутаций, обуславливающих множественную и широкую лекарственную устойчивость (Рисунок 5).

Алгоритмом предусмотрено обязательное определение ЛЧ с помощью молекулярно-генетических технологий («Хpert МТВ/RIF», «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ») в диагностическом материале пациента и в культурах («ТБ-ТЕСТ»), в случае отрицательного результата при проведении МГМ. В качестве контроля детекции мутаций в *gyrA*, *gyrB*, *rrs* и *eis* с помощью разработанных методик на основе ПЦР-SSCP и ПЦР-ПДРФ необходимо проводить исследование культур МБТ.

Определение ЛЧ МБТ к препаратам только основного ряда с применением автоматизированной системы Bactec MGIT 960 целесообразно проводить для культур, у которых молекулярно-генетическими методами были определены чувствительные генотипы к препаратам, а определение ЛЧ МБТ одновременно к препаратам основного и резервного ряда — в случае, когда молекулярно-генетическими методами были установлены генотипы МБТ монорезистентные к изониазиду или рифампицину, с МЛУ и ШЛУ.

При выявлении штаммов МБТ-МЛУ (ШЛУ), необходимо устанавливать степень лекарственной устойчивости как к препаратам основного, так и резервного ряда с помощью молекулярно-генетического и бактериологического метода микроразведений, при этом время получения результата сокращается в 2,7 раза и служит основанием для назначения адекватной химиотерапии или её оптимизации.

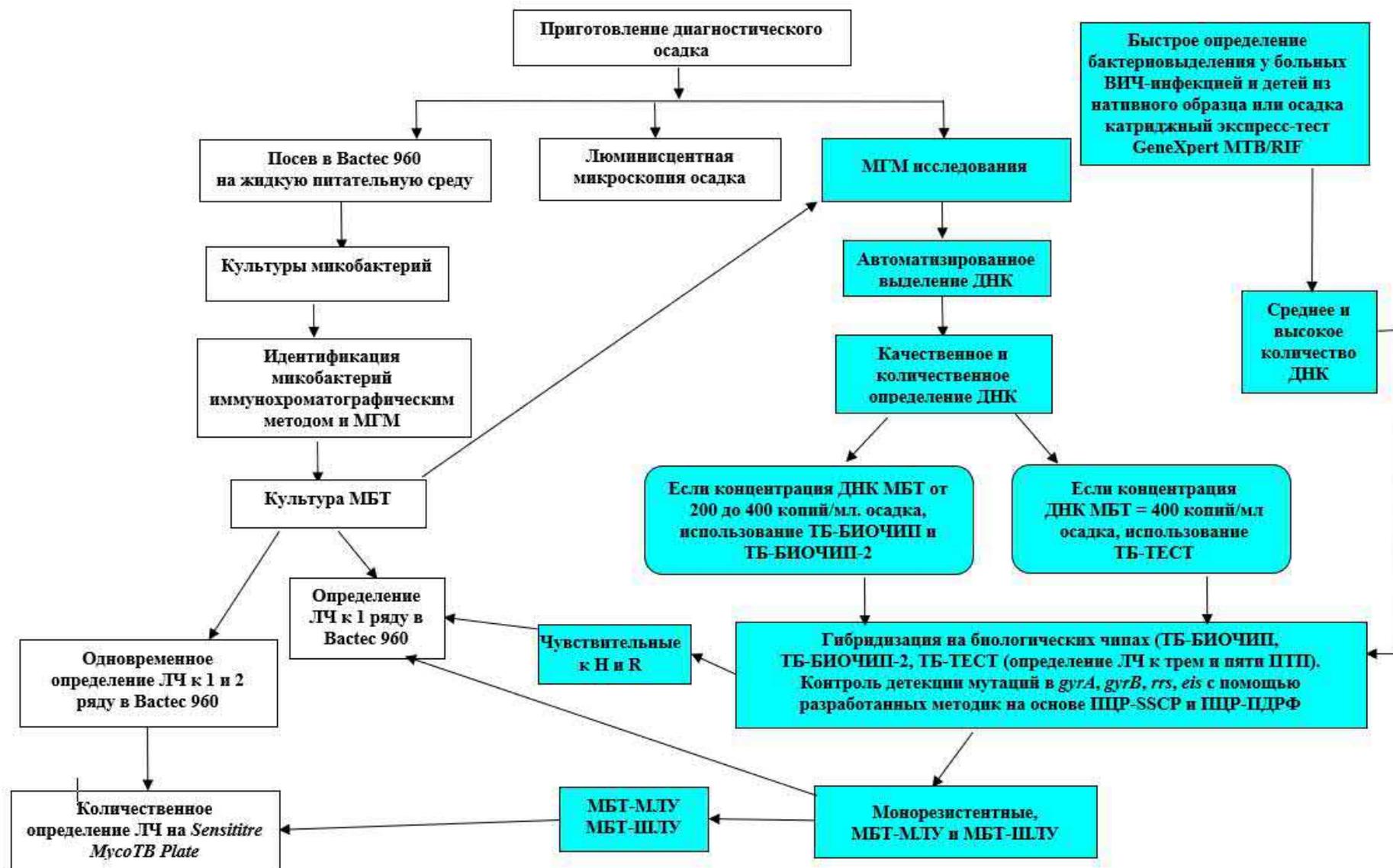


Рисунок 5 – Алгоритм ускоренной микробиологической лабораторной диагностики туберкулёза

## ВЫВОДЫ

1. С помощью тест-системы «ТБ-ТЕСТ» установлены клинически значимые типы мутаций и их сочетания, связанные с различным уровнем лекарственной устойчивости *M.tuberculosis*:

- к рифампицину — S531L (79,7%), H526R/Y/D/P, L511R, D516V, S531W, Q513G/K, 9 типов двойных замен — высокая и умеренная (89,9%), D516Y/G, H526N/C, L533P, L511P, L516G/S531W, S522L/D516G, L533P/S531L — «промежуточная» (9,4%);

- к изониазиду — S315T и другие в *katG* (70,7%) и в сочетании в *inhA*, *ahpC* — высокая и умеренная (96,8%);

- к офлоксацину и моксифлоксацину — D94(G,H,Y,N), G88C, S91P и двойными в *gyrA* или *gyrA/gyrB* — высокая и умеренная (59%), большинство из замен A90V и D94A — низкая к офлоксацину (81%) и «промежуточная» к моксифлоксацину (82,6%), G88A, D94V, A74S и двойная G88A/H70A/G509A в *gyrA* — «промежуточная» к обоим препаратам, N538K, D500H, D500N, N538D, T539N в *gyrB* — «промежуточная» к обоим препаратам, D500N/E540D — умеренная к моксифлоксацину и «промежуточная» к офлоксацину;

- к канамицину - a1401g (38,1%), g1484t (0,4%) в *rrs* и в сочетании с *eis* (0,9%) — высокая и умеренная, мутации в промоторной области гена *eis* — низкая и умеренная (80%);

- к амикацину - a1401g (38,1%) и в сочетании с *eis* (0,9%) — высокая и умеренная, g1484t (0,4%) в *rrs* — низкая, мутации в промоторной области гена *eis* — «промежуточная» (92,6%), кроме c14t (низкая).

2. Разработанные методики генодиагностики на основе ПЦР-SSCP и ПЦР-ПДРФ позволяют выявлять мутации, в том числе новые в генах *gyrA/gyrB* и *rrs/eis*, увеличивая выявляемость устойчивости к фторхинолонам до 97,7% (при исследовании только гена *gyrA* — 92,4%) и до 98,3% к канамицину (при исследовании только гена *rrs* — 74,6%).

3. Установлена эффективность тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2» для определения типа мутаций в гене *gyrA M.tuberculosis*, ответственных за резистентность к фторхинолонам в образцах мокроты (чувствительность - 83,9%, специфичность - 97,3%) и культурах (чувствительность - 87,1%, специфичность - 97,3%). Совпадение с результатами бактериологического определения лекарственной чувствительности на плотной среде Левенштейна-Йенсена составило для мокроты - 93,3% и для культур - 94,2%.

4. Показано, что «ТБ-ТЕСТ» обладает сопоставимой чувствительностью с «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2», увеличивая выявляемость ДНК *M.tuberculosis* в диагностическом материале на 32,2% и при этом уменьшая на 17,8% результативность определения генотипа ЛЧ, тест-система также характеризуется высокой воспроизводимостью результатов определения генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза.

5. Установлено, что тест-система «Xpert MTB/RIF» обладает высокой чувствительностью в выявлении ДНК *M.tuberculosis* и определении генетических детерминант устойчивости к рифампицину в образцах мокроты (92,2%) и бронхиального смыва (87,5%). Включение этапа количественного определения ДНК *M.tuberculosis* с помощью ПЦР-РВ позволило оптимизировать последовательное применение наиболее эффективных тест-систем гибридного анализа

«ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ» в алгоритме ускоренной лабораторной диагностики туберкулёза.

6. Установлена высокая корреляция результатов, полученных с помощью тест-системы «ТБ-ТЕСТ» и Sensititre MucOТВ по сравнению с Bactec MGIT 960, составившая для Emb (95,3% и 81,5% соответственно), для Rif (98,1% и 96%), Km (99,2% и 92,3%), Am (99,8% и 95,9%), Ofx (99,1% и 97,5%) и сопоставимая для Mfx при КК=0,25 мкг/мл (98,3% и 98,9%) и H (99,8%).

7. Разработан алгоритм ускоренной микробиологической диагностики туберкулёза, основанный на комплексном применении модифицированных методик, современных молекулярно-генетических и бактериологических технологий, позволяющий адекватно проводить определение лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При диагностике туберкулёза рекомендуется проводить молекулярно-генетические и бактериологические исследования не более трёх порций мокроты (на 1, 2 и 3 сутки) и пробы материала, полученного после бронхоскопии до начала лечения.

2. Молекулярно-генетические и бактериологические исследования целесообразно проводить из единой порции обработанного осадка диагностического материала.

3. Контаминированные пробы диагностического материала в жидкой питательной среде М7Н9 в автоматизированной системе Bactec MGIT 960, рекомендуется исследовать с помощью ПЦР в реальном времени (или «Xpert MTB/RIF») на наличие ДНК *M.tuberculosis* с последующим (при условии достаточного количества ДНК) определением генетических детерминант устойчивости с помощью «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» или «ТБ-ТЕСТ».

4. При получении отрицательного результата на наличие ДНК *M.tuberculosis* в мокроте или пробах материала, полученного после бронхоскопии, но при положительном росте возбудителя на жидкой питательной среде М7Н9, рекомендуется проводить исследование выделенной культуры с помощью «ТБ-ТЕСТ».

5. В связи с низкой высеваемостью *M.tuberculosis* из операционного материала на жидкой питательной среде М7Н9 в Bactec MGIT 960 рекомендуется проводить молекулярно-генетические исследования с включением количественного определения ДНК с помощью ПЦР в реальном времени с последующим определением генетических детерминант устойчивости к антибактериальным препаратам с помощью тест-систем «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» или «ТБ-ТЕСТ».

6. Разработанные молекулярно-генетические методики целесообразно использовать в качестве контроля детекции генетических детерминант устойчивости к фторхинолонам и инъекционным препаратам при исследовании культур *M.tuberculosis*, выделенных в Bactec MGIT 960.

7. При обнаружении генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости в выделенных культурах *M.tuberculosis* рекомендуется проводить дополнительное тестирование к основным и резервным препаратам с помощью бактериологического метода микроразведений для установления степени лекарственной устойчивости.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшие исследования должны быть направлены на усовершенствование методологии выявления лекарственно-устойчивых *M.tuberculosis* из гетерорезистентной популяции с использованием молекулярно-генетических и бактериологических методов.

Необходимо продолжить изучение молекулярно-генетических механизмов развития устойчивости *M.tuberculosis* к этамбутолу, связанных с появлением мутаций в гене *ubiA*, кодирующий DPPR синтазу; к капреомицину, с появлением мутаций в гене *tlyA*, кодирующим метилтрансферазу TlyA; к канамицину, с возникновением мутаций в других регионах гена *rrs* и *whiB7*, являющимся транскрипционным активатором гена *eis*. Продолжить исследование региона гена *rpoB*, расположенного в начале QRDR области, появление мутаций в котором приводят к возникновению резистентности к рифампицину.

Появление устойчивых штаммов *M.tuberculosis* к линезолиду и новому АБП – бедаквилину требует начать изучение природных и приобретённых механизмов устойчивости молекулярно-генетическими и бактериологическими методами с дальнейшей перспективой создания на их основе тест-систем.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Скотникова, О.И. Новые технологии в определении лекарственной чувствительности / О.И. Скотникова, В.М. Михайлович, Е.Ю. Носова, С.А. Лапа, Д.А. Грядунов, М.Ю. Донников, М.В. Бадлеева, К.Ю. Галкина, И.Р. Дорожкова, В.И. Литвинов, А.С. Заседателев, А.М. Мороз, А.Д. Мирзабеков // Проблемы туберкулёза и болезни лёгких. – 2004. – № 6. – С. 37-40.

2. Носова, Е.Ю. Определение устойчивости *M.tuberculosis* к фторхинолонам по гену *gyrA* методом ПЦР-SSCP / Е.Ю. Носова, О.И. Скотникова // Сб. трудов 5-ой Всероссийск. научно-практич. конф. «Генодиагностика инфекционных болезней», Москва, 19 – 21 октября, 2004 г. – 2004. – Т. 1. – С. 211-213.

3. Nosova, E.Yu. Express-diagnosing of multidrug resistant bacterial and L-forms of *mycobacterium tuberculosis* / E.Yu. Nosova, O.I. Skotnikova, M.V. Badleeva, K.Yu. Galkina, A.M. Moroz, V.M. Mikhailovich, I.R. Dorozhkova // European respiratory journal, Abstracts 14<sup>th</sup> ERS Annual Congres, GlasgoW, UK, 4 – 8 September 2004. – 2004. – Vol. 24. – P. 721s.

4. Скотникова, О.И. Характеристика чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину и изониазиду посредством определения мутаций в генах *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyA*, *kasA* различными молекулярно-биологическими методами / О.И. Скотникова, К.Ю. Галкина, Е.Ю. Носова, М.А. Краснова, А.М. Мороз // Проблемы туберкулёза и болезни лёгких. – 2005. – № 8. – С. 39-42.

5. Дорожкова, И.Р. Состав и лекарственная чувствительность микобактериальной популяции у больных с подозрением на туберкулёз / И.Р. Дорожкова, М.В. Бадлеева, О.И. Скотникова, Е.Ю. Носова, Е.А. Купавцева, С.Е. Борисов, А.М. Мороз // Проблемы туберкулёза и болезни лёгких. – 2005. – № 8. – С. 36-38.

6. Носова, Е.Ю. Изучение лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам путём выявления мутаций в гене *gyrA* / Е.Ю. Носова, К.Ю. Галкина, О.В. Маркова, Д.А. Грядунов, О.И. Скотникова // Проблемы туберкулёза и болезни лёгких. – 2007. – № 10. – С. 57-60.

7. Скотникова О.И. Современные технологии определения вида микобактерий и чувствительности *M.tuberculosis* к лекарственным препаратам / О.И. Скотникова, **Е.Ю. Носова**, К.Ю. Галкина, М.А. Краснова, М.В. Макарова, А.М. Мороз // Туберкулёз в России. Материалы VIII Российского съезда фтизиатров, Москва, 6 – 8 июня, 2007 г. – 2007. – С. 127-128.

8. **Носова, Е.Ю.** Молекулярно-биологический микрочип ТБ-БИОЧИП-2 для определения чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью к фторхинолонам у больных с впервые выявленным и хроническим течением туберкулёза / **Е.Ю. Носова, К.Ю. Галкина, О.В. Антонова, Ю.Ю. Гармаш, О.И. Скотникова, А.М. Мороз** // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2008. – № 3. – С. 16-19.

9. **Антонова, О.В.** Выявление мутаций в геноме *Mycobacterium tuberculosis*, приводящих к устойчивости к фторхинолонам, методом гибридизации на биологических микрочипах / **О.В. Антонова, Д.А. Грядун, С.А. Лапа, А.В. Кузьмин, Е.Е. Ларионова, Т.Г. Смирнова, Е.Ю. Носова, О.И. Скотникова, Л.Н. Черноусова, А.М. Мороз, А.С. Заседателей, В.М. Михайлович** // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 145, № 1. – С. 115–121.

10. **Nosova, E.Y.** Determination of MBT susceptibility to isoniazid, rifampicin, fluoroquinolones in TB patients by microchips / **E.Y. Nosova, K.Y. Galkina, A.A. Bukatina, A.M. Moroz** // 5th Congress of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Abstract Book, Dubrovnik, 27 –30 May, 2009. – 2009. – P. 83.

11. **Nosova, E.** Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance using molecular genetics methods / **E. Nosova, A. Bukatina, K. Galkina, M. Krasnova** // European respiratory society, Annual Congress, Barcelona, 18 – 22 September, 2010. – 2010. – V. 36. – P. 354.

12. **Дорожкова, И.Р.** Успешное решение многолетней проблемы экспресс-диагностики возбудителя туберкулёза и его лекарственной чувствительности к препаратам I и II ряда / **И.Р. Дорожкова, Е.Ю. Носова, З.П. Абрамова, К.Ю. Галкина, А.А. Букатина, А.М. Мороз** // III научно-практическая конференция «Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ», Москва, 13 – 14 мая, 2010 г. – 2010. – С. 28-29.

13. **Букатина, А.А.** Анализ мутаций в генах *gyrA* и *gyrB*, ответственных за устойчивость *M.tuberculosis* к фторхинолонам молекулярно-биологическими методами / **А.А. Букатина, Ю.Д. Исаева, Л.Ю. Крылова, Е.Ю. Носова** // Сб. трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2010», Москва, 24 – 26 ноября, 2010 г. – 2010. – Т.1. – С. 109-112.

14. **Литвинов, В.И.** Возбудители микобактериальной инфекции: видовая идентификация, лабораторная диагностика вызываемой ими патологии / **В.И. Литвинов, А.М. Шустер, П.П. Сельцовский, Л.В. Слогоцкая, Д.В. Зименков, Д.А. Грядун, И.Р. Дорожкова, М.В. Макарова, М.А. Краснова, Е.Ю. Носова, Г.Е. Фрейман** // Сб. Материалов XXIII (86-й) сессии Общего собрания Российской академии медицинских наук, Москва, 30 ноября, 2009 г. – 2009. – С. 164-183.

15. **Носова, Е.Ю.** Молекулярно-генетические исследования во фтизиатрии / **Е.Ю. Носова, М.А. Краснова, К.Ю. Галкина, А.А. Букатина, Ю.Д. Исаева** // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2011. – № 6. – С. 28-32.

16. **Литвинов, В.И.** Биочипы в диагностике туберкулёза и микобактериозов / **В.И. Литвинов, Е.Ю. Носова, М.А. Краснова, К.Ю. Галкина,**

А.А. Букатина, А.М. Мороз // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2011. – № 5. – С. 4-8

17. Мороз, А.М. Комплексная экспресс-диагностика возбудителя туберкулёза и его лекарственная чувствительность к препаратам I и II ряда / А.М. Мороз, И.Р. Дорожкова, М.В. Макарова, З.П. Абрамова, Е.Ю. Носова, А.А. Букатина // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2011. – С. 56-75.

18. Gikalo, M.V. The role of *eis* mutations in the development of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region / M.V. Gikalo, E.Y. Nosova, L.Y. Krylova, A.M. Moroz // J. Antimicrob Chemother. – 2012. – V. 67(9). – P. 2107-2109.

19. Галкина, К.Ю. Современные молекулярные технологии для быстрого выявления *M. tuberculosis* и определения лекарственной чувствительности к рифампицину (изониазиду) в мокроте / К.Ю. Галкина, Е.Ю. Носова, М.А. Краснова // V научно-практической конференции «Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ», Москва, 17 – 18 мая, 2012 г. – 2012. – С. 12-13.

20. Исаева, Ю.Д. Определение критических концентраций левофлоксацина для оценки лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* в жидкой *Middlebrook 7H9* (Bactec<sup>TM</sup>MGIT<sup>TM</sup> 960) и плотной Левенштейна-Йенсена питательных средах / Ю.Д. Исаева, А.А. Букатина, Л.Ю. Крылова, Е.Ю. Носова, М.В. Макарова, А.М. Мороз // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2012. – № 12. – С. 36-42.

21. Isaeva, Y.D. Determination of critical concentration of moxifloxacin and gatifloxacin in the Bactec MGIT 960 system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* / Y.D. Isaeva, A.A. Bukatina, L.Y. Krylova, E.Y. Nosova, M.V. Makarova, A.M. Moroz // J. Antimicrob Chemother. – 2013. – V. 68(10). – P. 2274-2281.

22. Nosova, E.Y. Analysis of mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes and their association with the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to levofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin / E.Y. Nosova, A.A. Bukatina, Y.D. Isaeva, M.V. Makarova, K.Y. Galkina, A.M. Moroz // J. Med. Microbiol. – 2013. – V. 62. – P.108-113.

23. Носова, Е.Ю. Сравнительная оценка эффективности молекулярных тест-систем «ТБ-БИОЧИП», «Хpert MTB/RIF» и «GenoType MTBDR<sub>plus</sub>» для быстрого определения мутаций, ответственных за лекарственную устойчивость *M.tuberculosis complex* в респираторном материале пациентов Московского региона / Е.Ю. Носова, М.А. Краснова, К.Ю. Галкина, М.В. Макарова, В.И. Литвинов, А.М. Мороз // Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47, № 1. – С. 1-8.

24. Беспярых, Ю.А. Определение лекарственной чувствительности и генотипирование клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* при помощи экспериментального набора ТБ-ТЕСТ / Ю.А. Беспярых, Е.А. Шитиков, Д.В. Зименков, Е.В. Кулагин, Д.А. Грядун, Е.Ю. Носова, А.А. Букатина, М.В. Шульгина, В.Ю. Журавлев, Е.Н. Ильина // Пульмонология. – 2013. – № 4. – С. 77-81.

25. Носова, Е.Ю. Молекулярные механизмы развития широкой лекарственной устойчивости и методы её определения у *M.tuberculosis* / Е.Ю. Носова, М.В. Гикало, А.А. Хахалина, К.Ю.Галкина, С.Г. Сафонова // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2013. – № 2. – С. 56-60.

26. **Носова, Е.Ю.** Применение «Xpert MTB/Rif» для молекулярной диагностики туберкулёза у больных ВИЧ-инфекцией / **Е.Ю. Носова, М.А. Краснова, М.Б. Гикало, С.Г. Сафонова** // Сб. трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014», Москва, 18 – 20 марта, 2014 г. – 2014. – С.54-55.
27. Краснова, М.А. Применение Xpert MTB/RIF для молекулярной диагностики туберкулёза у больных ВИЧ-инфекцией / М.А. Краснова, **Е.Ю. Носова**, К.Ю. Галкина, А.А. Хахалина, А.И. Исакова, Г.Е. Фрейман, И.Р. Дорожкова, М.В. Сеницын, С.Г. Сафонова // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2015. – № 4. – С. 29-33.
28. Исаева, Ю.Д. Определение основных характеристик лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к фторхинолонам и аминогликозидам/капреомицину / Ю.Д. Исаева, Л.Ю. Крылова, М.В. Макарова, А.А. Хахалина, **Е.Ю. Носова**, С.Г. Сафонова // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2015. – № 4. – С. 20-26.
29. **Макарова, М.В.** Определение критической концентрации химиопрепаратов для оценки лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с помощью тест-системы Sensititre MycoTB / **М.В. Макарова, С.Г. Сафонова, Ю.Д. Исаева, Л.Ю. Крылова, Е.Ю. Носова, В.И. Литвинов** // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2015. – № 3. – С. 63-67.
30. **Носова, Е.Ю.** Определение множественной и широкой лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* с помощью различных молекулярных тест-систем и Bactec MGIT-960 / **Е.Ю. Носова, А.А. Хахалина, К.Ю. Галкина, М.А. Краснова, Л.Ю. Крылова, С.Г. Сафонова** // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2015. – № 3. – С. 94-98.
31. Сафонова, С.Г. Современные подходы к ускоренной диагностике и определению лекарственной чувствительности возбудителя туберкулёза с использованием бактериологических и молекулярно-генетических методов / С.Г. Сафонова, **Е.Ю. Носова, К.Ю. Галкина, И.Р. Дорожкова** // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2016. – № 4. – С. 11-15.
32. **Макарова, М.В.** Определение лекарственной чувствительности *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулёзом с множественной лекарственной устойчивостью, в тест-системе «Sensititre MycoTB» / **М.В. Макарова, Л.Ю. Крылова, С.Г. Сафонова, Н.В. Литвинова, Е.Ю. Носова, В.И. Литвинов** // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61, № 5. – С. 308-310.
33. **Носова, Е.Ю.** Одновременное определение генетических детерминант широкой лекарственной устойчивости и генотипирование *M. tuberculosis* с помощью гибридационного анализа на биочипах / **Е.Ю. Носова, А.А. Хахалина, А.И. Исакова, К.Ю. Галкина, М.А. Краснова, М.В. Макарова** // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2016. – № 2. – С. 24-32.
34. **Nosova, E.Yu.** A Comparison of the Sensititre MycoTB Plate, the Bactec MGIT 960, and a Microarray-Based Molecular Assay for the Detection of Drug Resistance in Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Moscow, Russia / **E.Yu. Nosova, D.V. Zimenkov, A.A. Khakhalina, A.I. Isakova, L.Y. Krylova, M.V. Makarova, K.Y. Galkina, M.A. Krasnova, S.G. Safonova, V.I. Litvinov, D.A. Gryadunov, E.M. Bogorodskaya** // PLoS ONE. – 2016. – № 3. – P. 1-14.
35. **Nosova, E.Yu.** Simultaneous detection of XDR genetic determinants and *Mycobacterium tuberculosis* genotyping by TB-TEST / **E.Yu. Nosova, A.A. Khakhalina, A.I. Isakova, K.Yu. Galkina, M.A. Krasnova, M.V. Makarova, L.Yu. Krilova, G.E. Freiman, S.G.**

Safonova // European respiratory journal (Abstracts), Milan, 9 – 13 September, 2017. – 2017. – V. 50. doi: 10.1183/1393003.congress-2017.PA3488

36. **Исакова, А.И.** Современные молекулярно-генетические технологии в диагностике туберкулёза при исследовании операционного материала / **А.И. Исакова, Е.Ю. Носова, Ю.Ю. Гармаш, К.А. Богданов, В.Н. Трусов, С.Г. Сафонова** // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2018. – № 1. – С. 12-19.

37. **Михайлова, Ю.Д.** Критерии оценки чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к препаратам группы фторхинолонов / **Ю.Д. Михайлова, М.В. Макарова, И.В. Перетокина, Л.Ю. Крылова, Е.Ю. Носова, А.Б. Кулько, С.Г. Сафонова** // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2018. – № 3. – С. 19-25.

38. Jou, R. Minor genetic determinants of secline injection drugs resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / R. Jou, E.V. Kulagina, W.T. Lee, **E.Yu. Nosova**, J.Y. Weng, O.V. Antonova, W.H. Lin, A.I. Isakova, M.H. Wu, D.V. Zimenkov // Russian Journal of infection and immunity. – 2018. – V. 8(4). – P. 571.

39. **Хахалина, А.А.** Структура популяции *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью на территории Москвы / **А.А. Хахалина, М.А. Краснова, Е.М. Белиловский, И.В. Перетокина, Е.Ю. Носова, С.Г. Сафонова** // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2019. – № 2. – С. 29-39.

40. **Jou, R. Redefining MDR-TB: Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Russia and Taiwan** / R. Jou, W-T. Lee, E.V. Kulagina, J-Y. Weng, A.I. Isakova, W-H. Lin, O.V. Antonova, M-H. Wu, L.R. Arslanbaeva, H-Y. Tasi, E.Yu. Nosova, D.V. Zimenkov // Infection, Genetics and Evolution. – 2019. – V. 72. – P. 141-146.

#### **Коллективные монографии:**

41. **Носова Е.Ю.** Молекулярно-генетические исследования в лабораторной диагностике туберкулёза и определении лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* / **Е.Ю. Носова, М.А. Краснова, А.А. Букатина, М.Б. Гикало** // Лабораторные исследования при туберкулёзе: монография / под ред. В.И. Литвинова и А.М. Мороза. – М.: МНПЦБТ: Изд-во «Информационные технологии в медицине», 2013. – Глава 8. – С. 142-168.

#### **Методические рекомендации:**

1. Определение лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с помощью биочипов. Методические рекомендации № 42 / Мороз А.М., **Носова Е.Ю.**, Галкина К.Ю., Краснова М.А., Букатина А.А. – М., 2008. – 25 с. (Утверждено Департаментом Здравоохранения города Москвы, 29.09.2008).

2. Алгоритм ускоренной микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулёза. Методические рекомендации № 53 / **Носова Е.Ю.**, Краснова М.А., Макарова М.В., Галкина К.Ю., Хахалина А.А., Исакова А.И., Крылова Л.Ю., Перетокина И.В., Михайлова Ю.Д., Фрейман Г.Е., Сафонова С.Г. – М., 2018. – 26 с. (Рекомендовано Экспертным советом по науке Департамента Здравоохранения города Москвы, 15.05.2018).

#### **Патенты:**

1. Патент 2343197 Российская Федерация. Способ диагностики чувствительности штаммов *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам. / **Носова Е.Ю.**, Краснова М.А., Галкина К.Ю., Скотникова О.И., Мороз А.М., Литвинов В.И. Заявитель и патентообладатель: Московский городской научно-практический центр борьбы с

туберкулезом (RU). – № 2004137088/13; заявл. 20.12.2004; опубл.10.01.2009, Бюл. №1. – 6 с.

2. Патент 2439162 Российская Федерация. Способ диагностики чувствительности штаммов *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам по гену *gyrB*. / **Носова Е.Ю.**, Краснова М.А., Букатина А.А., Галкина К.Ю., Гикало М.Б., Мороз А.М., Литвинов В.И. Заявитель и патентообладатель: Государственное учреждение здравоохранения Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом ДЗМ (RU). – № 2010140202/10; заявл. 01.10.2010; опубл.10.01.2012, Бюл. №1. – 7 с.

3. Патент 2409680 Российская Федерация. Способ диагностики чувствительности штаммов *Mycobacterium tuberculosis* к аминогликозидам. / **Носова Е.Ю.**, Краснова М.А., Букатина А.А., Галкина К.Ю., Мороз А.М., Литвинов В.И. Заявитель и патентообладатель: Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом ДЗМ (RU). – № 2009127568/10; заявл. 27.07.2009; опубл.20.01.2011, Бюл. №2. – 7 с.

4. Патент 2509158 Российская Федерация. Способ диагностики чувствительности штаммов *Mycobacterium tuberculosis* к инъекционным противотуберкулёзным препаратам резервного ряда (аминогликозидам и капреомицину). / Гикало М.Б., **Носова Е.Ю.**, Краснова М.А., Букатина А.А., Галкина К.Ю., Мороз А.М., Литвинов В.И. Заявитель и патентообладатель: Государственное казённое учреждение Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом ДЗМ (RU). – № 2012110534/10; заявл. 21.03.2012; опубл.27.09.2013, Бюл. №7. – 8 с.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБП	<i>Антибактериальные препараты</i>
АГ	<i>Аминогликозиды</i>
БАЛ	<i>Бронхоальвеолярный лаваж</i>
БС	<i>Бронхиальный секрет</i>
ГБУЗ МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ	<i>Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский городской научно-практический Центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»</i>
ДИ	<i>Доверительный интервал</i>
ДНК	<i>Дезоксирибонуклеиновая кислота</i>
КК	<i>Критическая концентрация</i>
КУМ	<i>Кислотоустойчивые микобактерии</i>
Л-Й	<i>Левенштейна-Йенсена плотная питательная среда</i>
ЛУ	<i>Лекарственная устойчивость</i>
ЛЧ	<i>Лекарственная чувствительность</i>
МАК	<i>Метод абсолютных концентраций</i>
МБТ	<i>Микобактерии туберкулеза</i>
МГМ	<i>Молекулярно-генетические методы</i>
МИК	<i>Минимальная ингибирующая концентрация</i>
МЛУ	<i>Множественная лекарственная устойчивость</i>
ПДРФ	<i>Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов</i>
ПТП	<i>Противотуберкулёзные препараты</i>
ПЦР-РВ	<i>Полимеразная цепная реакция в реальном времени</i>

ТБ	<i>Туберкулёз</i>
ФХ	<i>Фторхинолоны</i>
ЦБЛ	<i>Централизованная бактериологическая лаборатория</i>
Am	<i>Амикацин</i>
Bactec MGIT 960	<i>Автоматизированная система Bactec™ MGIT™ 960</i>
Cfx	<i>Ципрофлоксацин</i>
Cm	<i>Капреомицин</i>
Emb	<i>Этамбутол</i>
H	<i>Изониазид</i>
Km	<i>Канамицин</i>
Lfx	<i>Левифлоксацин</i>
Mfx	<i>Моксифлоксацин</i>
M7H9	<i>Жидкая среда Middlebrook 7H9</i>
NALC	<i>N-acetyl-L-cysteine</i>
Ofx	<i>Офлоксацин</i>
R	<i>Рифампицин</i>
SSCP	<i>single-strand conformation polymorphism – конформационный полиморфизм длин одноцепочечных фрагментов</i>
WHO	<i>World Health Organization; Всемирная организация здравоохранения</i>