

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы
«Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом
Департамента здравоохранения города Москвы»

Носова Елена Юрьевна

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

1.5.11. – микробиология

Диссертация на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
Доктор медицинских наук,
профессор, академик РАН
В.И. Литвинов

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность темы исследования.....	6
Степень разработанности темы исследования.....	8
Цель исследования.....	10
Задачи исследования.....	10
Научная новизна исследования.....	11
Теоретическая и практическая значимость исследования.....	13
Методология и методы исследования.....	16
Объекты исследования.....	16
Бактериологические методы исследования.....	17
Молекулярно-генетические методы исследования.....	19
Статистическая обработка результатов и программное обеспечение.....	21
Личное участие автора в получении результатов.....	21
Положения, выносимые на защиту.....	22
Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	23
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	25
Введение.....	25
1.1. Лекарственная устойчивость возбудителя туберкулёза и механизмы её формирования.....	28
1.1.1. Естественная устойчивость.....	28
1.1.2. Приобретённая лекарственная устойчивость.....	32
1.1.2.1. Молекулярно-генетические основы устойчивости <i>M.tuberculosis</i> к изониазиду.....	37
1.1.2.2. Молекулярно-генетические основы устойчивости <i>M.tuberculosis</i> к рифампицину.....	39
1.1.2.3. Молекулярно-генетические основы устойчивости <i>M.tuberculosis</i> к этамбутолу.....	40
1.1.2.4. Молекулярно-генетические основы устойчивости <i>M.tuberculosis</i> к фторхинолонам.....	41
1.1.2.5. Молекулярно-генетические основы устойчивости <i>M.tuberculosis</i> к аминогликозидам и капреомицину.....	44

1.2. Бактериологические методы определения лекарственной чувствительности <i>M.tuberculosis</i> к антибактериальным препаратам.....	46
1.3. Молекулярно-генетические методы и технологии для определения генетических детерминант устойчивости <i>M.tuberculosis</i>	54
1.4. Заключение.....	69
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	71
ГЛАВА 2. Возможности применения различных молекулярно-генетических методов в диагностике лекарственной чувствительности <i>M.tuberculosis</i> к антибактериальным препаратам.....	71
2.1. Определение чувствительности <i>M.tuberculosis</i> к фторхинолонам с помощью тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2».....	71
2.2. Определение чувствительности <i>M.tuberculosis</i> к фторхинолонам с помощью разработанных модификаций метода конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов (ПЦР-SSCP) в генах <i>gyrA</i> и <i>gyrB</i>	78
2.3. Определение чувствительности <i>M.tuberculosis</i> к аминогликозидам и капреомицину с помощью разработанной методики на основе метода ПЦР-ПДРФ.....	94
2.4. Определение роли гена <i>eis</i> в развитии лекарственной устойчивости <i>M.tuberculosis</i> к канамицину.....	103
2.5. Определение лекарственной чувствительности к основным препаратам первого и второго ряда в диагностическом материале с помощью тест-системы «ТБ-ТЕСТ».....	111
ГЛАВА 3. Изучение эффективности молекулярно-генетических технологий и оптимизация их применения в лабораторной диагностике туберкулёза.....	124
3.1. Эффективность применения тест-систем «Xpert MTB/RIF», «ТБ-БИОЧИП-1» и «GenoType MTBDR _{plus} » для исследований респираторного материала пациентов.....	125
3.1.1. Выявление ДНК МБТ в мокроте с помощью молекулярно-генетических технологий.....	125

3.1.2. Определение вариантов генетических детерминант устойчивости <i>M.tuberculosis</i> к рифампицину и/или изониазиду в образцах мокроты с помощью молекулярно-генетических технологий.....	129
3.1.3. Выявление ДНК МБТ в образцах бронхиальных смывов с помощью молекулярно-генетических технологий.....	132
3.1.4. Определение вариантов генетических детерминант устойчивости МБТ к рифампицину и/или изониазиду в образцах бронхиальных смывов с помощью молекулярно-генетических технологий.....	133
3.2. Эффективность тест-систем «ТБ-БИОЧИП-2» и «GenoType MTBDRs ^l » при исследовании респираторного материала.....	135
3.3. Оптимизация применения молекулярно-генетических методов в лабораторной диагностике туберкулёза.....	142
3.3.1. Определение пороговых значений концентрации ДНК МБТ в респираторном материале.....	143
3.3.2. Эффективность молекулярно-генетических методов при исследовании операционного материала.....	148
ГЛАВА 4. Результаты оценки лекарственной чувствительности <i>M.tuberculosis</i> к антибактериальным препаратам молекулярно-генетическим «ТБ-ТЕСТ» и бактериологическими методами. Алгоритм ускоренной микробиологической лабораторной диагностики туберкулёза.....	155
4.1. Сопоставление результатов молекулярно-генетического и бактериологического определения лекарственной чувствительности <i>M.tuberculosis</i> к препаратам основного ряда в системе Bactec MGIT 960.....	157
4.1.1. Рифампицин.....	157
4.1.2. Изониазид.....	162
4.1.3. Этамбутол.....	166
4.2. Сопоставление результатов молекулярно-генетического и бактериологического определения лекарственной чувствительности в системе Bactec MGIT 960 <i>M.tuberculosis</i> к препаратам группы фторхинолонов.....	168
4.3. Сопоставление результатов молекулярно-генетического и бактериологического определения лекарственной чувствительности в системе Bactec MGIT 960 <i>M.tuberculosis</i> к аминогликозидам и капреомицину.....	178

4.4. Сопоставление результатов молекулярно-генетического и бактериологического определения лекарственной чувствительности <i>M.tuberculosis</i> с помощью тест-системы Sensititre MYCOTB TREC DIAGNOSTICS.....	186
4.4.1. Рифампицин.....	190
4.4.2. Изониазид.....	194
4.4.3. Этамбутол.....	197
4.4.4. Офлоксацин.....	200
4.4.5. Моксифлоксацин.....	204
4.4.6. Канамицин и амикацин.....	210
4.5. Алгоритм ускоренной микробиологической лабораторной диагностики туберкулёза.....	216
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	221
ВЫВОДЫ.....	255
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	258
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	260
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	261
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	263

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Нарастание лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам и повсеместное распространение устойчивых штаммов в мире, в том числе в большинстве регионов РФ, является одной из главных проблем, осложняющих борьбу с туберкулёзом [5; 7; 317; 340; 344; 346].

Тяжесть заболевания туберкулёзом при лекарственной устойчивости возбудителя значительно увеличивается. Существуют два вида лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis*, которые особенно актуальны в клинике. Первый – это туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью, вызванный штаммами, устойчивыми к двум основным препаратам первого ряда – изониазиду и рифампицину. Лечение пациентов туберкулёзом с множественной лекарственной устойчивостью длительное (до 2 лет), и в настоящее время опирается на фторхинолоны и инъекционные препараты (канамицин, амикацин и капреомицин), компенсируя тем самым потерю двух самых эффективных противотуберкулёзных препаратов. Приобретение устойчивости к этим классам антибактериальных препаратов в сочетании с резистентностью к изониазиду и рифампицину называется широкой лекарственной устойчивостью и требует ещё более длительного лечения препаратами, которые намного дороже и имеют ограниченную эффективность и большое количество побочных эффектов [95; 160; 338; 343].

Туберкулёз с множественной и не редко уже с широкой лекарственной устойчивостью, все чаще выявляется не только у лиц с хроническим течением процесса, но и у впервые выявленных пациентов [230]. По данным ВОЗ среди 9,27 миллионов новых случаев заболевания 0,5 миллионов это зарегистрированные больные туберкулёзом с множественной лекарственной устойчивостью [346; 347]. В Российской Федерации в 2015 году доля таких больных составила 26,8% и 47,5% среди контингентов противотуберкулёзных

диспансеров [354], а в 2017 году 28,2% и 48,1% соответственно [33]. Москва относится к регионам РФ с одним из самых низких показателей заболеваемости и смертности, в том числе по распространению туберкулёза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью, что определяется, прежде всего, организацией противотуберкулёзной службы [5]. Однако и здесь ситуация далека от идеальной. Существенную напряжённость в эпидемиологическую ситуацию, в первую очередь, связанную с лекарственно-устойчивым туберкулёзом, вносят мигранты и больные с сочетанной инфекцией ВИЧ-туберкулёз. В 2017 г. в Москве среди новых случаев заболевания этот показатель вырос на 2% и составил 20,8%, по сравнению с 2016 годом, а среди контингентов достиг 40,5%. Но уже в 2018 г. отмечено снижение до 17,7% среди впервые выявленных больных и до 38,1% среди контингентов [6].

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

Современная лабораторная диагностика туберкулёза основана на использовании ускоренных микробиологических методов, к которым относятся молекулярно-генетические технологии и автоматизированная система Bactec MGIT 960 [4; 8; 37; 79; 153; 168; 221]. Однако, несмотря на их широкое применение в микробиологических лабораториях фтизиатрического профиля надёжность получаемых результатов не всегда соответствует приемлемому уровню. В частности, существуют проблемы оценки чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину и этамбутолу в системе Bactec MGIT 960, несмотря на то, что методика унифицирована с использованием готовых реактивов и лиофилизированных препаратов [191; 275; 293]. 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» носят рекомендательный характер [341; 342; 346].

В свою очередь, для выявления генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости в настоящее время имеется множество коммерческих тест-систем [68; 78; 81; 153; 221; 364]. Однако, несмотря на использование высокочувствительных технологических подходов, таких как ПЦР в реальном времени, стрип-детекция мутаций и гибридизация на биочипах, разработанные на их основе тест-системы и зарегистрированные в РФ для клинического применения, в первую очередь, для выявления генетических детерминант устойчивости к фторхинолонам, аминогликозидам и капреомицину имеют ряд ограничений. Главным из них 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.

В последние годы также изменились представления о критериях оценки лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам по установленным «критическим концентрациям», позволяющие проводить качественный анализ, разделяющий на «чувствительные» и «устойчивые» микобактерии. В некоторых случаях это приводит к расхождению результатов между различными микробиологическими методами [61; 105; 191].

Таким образом, проблема диагностики лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам является актуальной и определяет необходимость совершенствования методических подходов с применением молекулярно-генетических и бактериологических методов для более точного определения лекарственной чувствительности.

Степень разработанности темы исследования

За последние годы в мировой литературе накоплены обширные сведения о механизмах развития приобретённой лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis*, которые показали, что это длительный процесс, связанный с адаптацией возбудителя к лекарственным препаратам на счёт появления всё новых мутаций не только в известных генах-мишенях, но и в новых [147; 218; 327; 353]. Так, в случае развития устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к

фторхинолонам в 45-85% резистентных изолятов мутации сосредоточены в гене *gyrA* и примерно у 7 % штаммов в гене *gyrB* [309; 329]. Перекрестная устойчивость к препаратам группы аминогликозидов (канамицин, амикацин) и капреомицину определяется мутациями в гене *rrs*, а устойчивость только к канамицину в промоторной области гена *eis* (Enhanced Intracellular Survival protein) [168, 356].

Большое внимание в зарубежной литературе уделяется вопросу о наличии корреляции между определёнными мутациями в геноме и уровнем устойчивости возбудителя [186; 187; 302; 362]. Так, в отношении препаратов группы фторхинолонов показано, что уровень устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к каждому отдельному препарату может быть разным и зависит от типа мутаций в генах *gyrA* и *gyrB* [185; 205]. На развитие устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к невысоким дозам канамицина оказывают влияние мутации, обнаруженных в промоторной области гена *eis* (Enhanced Intracellular Survival protein) [356]. В отношении препаратов первого ряда также выявлены различия в уровне устойчивости *Mycobacterium tuberculosis*, связанные с определёнными детерминантами резистентности [191; 301; 323]. Становится очевидной недостаточная эффективность определения лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам по установленным «критическим концентрациям» препаратов и как следствие «слабой» корреляции с результатами молекулярных исследований [294; 302; 317].

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 *Mycobacterium tuberculosis* к основным препаратам первого и второго ряда [8; 13; 14; 21; 23; 24; 31; 153]. Научные публикации посвящены изучению лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* различными молекулярно-генетическими тест-системами и бактериологическими методами, эпидемиологическим аспектам распространения лекарственно-устойчивых штаммов и их геномной

вариабельности в РФ [1; 2; 16; 27; 28; 31; 36; 38; 235; 240]. Однако, объективная оценка устойчивости возбудителя туберкулёза к антибактериальным препаратам осложняется тем, что используемые молекулярные тест-системы выявляют не весь спектр генетических детерминант устойчивости и не во всех генах *Mycobacterium tuberculosis*, а также с периодическим пересмотром «критических концентраций» 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 *Mycobacterium tuberculosis* к основным препаратам резервного ряда. Актуальным остаётся оптимизация генодиагностики лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к основным препаратам первого и второго ряда за счёт адаптации и внедрения наиболее эффективных тест-систем, бактериологической диагностики для оценки уровня устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам 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 препаратом) 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 исследования

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 исследования

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-Оболенск» 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 диагностики 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 «Московского научно-практического центра борьбы с туберкулёзом ДЗМ» и 93 больных с подозрением на заболевание, направленных из Консультационно-диагностического центра МНПЦ БТ.

Исследовано 1516 клинических изолятов МБТ и 1551 проб 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 (Таблица 1).

Таблица 1 – Типовые коллекционные штаммы, используемые в исследовании

Штамм	Коллекция	Цель применения
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv ATCC 25618	American Type Culture Collection (ATCC)	Стандартный лабораторный референс-штамм для микробиологических и молекулярно-генетических исследований
<i>Mycobacterium avium</i> ATCC 35712	American Type Culture Collection (ATCC)	Проверка специфичности разработанных модификаций молекулярно-генетических методов
<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 35761	American Type Culture Collection (ATCC)	
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> ATCC 35787	American Type Culture Collection (ATCC)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	American Type Culture Collection (ATCC)	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	American Type Culture Collection (ATCC)	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	American Type Culture Collection (ATCC)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 27336	American Type Culture Collection (ATCC)	
<i>Staphylococcus intermedius</i> ATCC 27335	American Type Culture Collection (ATCC)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	American Type Culture Collection (ATCC)	

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 [26].

Обработка диагностического материала для бактериологических исследований

Деконтаминацию респираторных проб клинического материала выполняли в соответствии с рекомендациями CDC [189].

Для люминесцентной микроскопии использовали 30 мкл осадка.

Для посева в индикаторные пробирки MGIT с жидкой питательной средой 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 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

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) [277; 281].

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 [342], к Lfx и Mfx при 2,0 и 0,25 мкг/мл [342] и 1,5 и 0,5 мкг/мл [346] 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 [26].

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) [158].

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) МНПЦ БТ

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 «Xpert MTB/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 MTB/RIF»

Проведение ПЦР с помощью картриджа «Хpert MTB/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® MTBDsl

Исследование на биологических микрочипах «ТБ-БИОЧИП-2» (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия) и стрипах GenoType MTBDsl (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 С1000 (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 БТ и интерпретированы совместно с научными сотрудниками отдела проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГБУЗ МНПЦ БТ д.б.н М.В. Макаровой, к.б.н Ю.Д. Михайловой, к.б.н Л.Ю. Крыловой. Клинические штаммов *M.tuberculosis* секвенировали в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН совместно с научными сотрудниками Зименковым Д.В и Грядиновым 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 туберкулезом, 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Введение

Микобактерии туберкулёза (МБТ) считаются одними из самых «успешных» среди патогенов, которые вызывают инфекционные заболевания. Кроме естественной способности длительное время персистировать в организме человека за счёт выработки защитных механизмов от иммунного ответа, МБТ способны противостоять большинству доступных противомикробных препаратов, ограничивая их использование в лечении заболевания [157; 242].

Эта природная или естественная устойчивость в основном объясняется наличием толстой, богатой липидами, клеточной стенкой, которая является важной особенностью микобактерий, ограничивающей проникновение антибиотиков. Кроме того имеются различные защитные системы (специализированные механизмы) от действия антибактериальных препаратов (АБП), которые ферментативно расщепляют или структурно изменяют их и тем самым, делают неэффективными [328; 331], а также система эффлюксных насосов, состоящей из комплекса мембранных белков, через которые происходит отток АБП из клетки [41; 155; 204; 206].

Все же наибольшую клиническую значимость имеет приобретённая лекарственная устойчивость (ЛУ). В отличие от большинства бактерий, у которых резистентность приобретается через плазмиды (горизонтальный перенос генов), в МБТ этот механизм не играет роли, а развитие устойчивости обусловлено появлением хромосомных мутаций в генах, кодирующие ферменты, на которые непосредственно нацелены АБП, в регуляторных областях этих генов или в генах, продукты которых вовлечены в активацию пролекарств [270; 288; 317].

Приобретённая лекарственная устойчивость МБТ стала актуальной проблемой фтизиатрии ещё в середине прошлого столетия одновременно с открытием и началом широкого применения первого АБП - стрептомицина [114, 292]. В последующие годы были разработаны остальные, наиболее часто используемые противотуберкулёзные препараты (ПТП) - изониазид (И), рифампицин (R) и др. Для ограничения развития устойчивости предлагались

комбинированные режимы химиотерапии с включением 2-3 или 4 препаратов, что позволило резко сократить продолжительность лечения от 18 месяцев и более до 9 месяцев [77]. Однако, несмотря на применение комбинированной антибактериальной терапии туберкулёза, с помощью которой достигали высокую частоту излечения и низкий уровень рецидивов заболевания [77], ЛУ МБТ к препаратам продолжала развиваться.

Классическая дарвиновская модель предполагает, что мутации, связанные с устойчивостью, появляются в бактериальной популяции стохастически (спонтанно), независимо от воздействия АБП. Средняя скорость появления таких спонтанных мутаций у МБТ, устойчивых к H и R, оценивалась в 10^{-8} и 10^{-9} на одно деление бактериальной клетки, соответственно, допуская, что во время монотерапии появление устойчивых бактерий будет происходить почти неизбежно, учитывая, что среднее число бактериальных клеток, присутствующих в отдельных очагах туберкулёзного процесса составляет 10^8 [148; 239].

Отбор устойчивых к антибиотику МБТ возникает при периодическом воздействии сублетального уровня лекарственного препарата или в результате прерывания химиотерапии. При этом первоначально происходит появление гетерогенной, а затем полностью устойчивой бактериальной популяции [268].

Изучение механизмов развития лекарственной устойчивости показало, что этот процесс сильно зависит от двух факторов: эпистаза и бактериального фитнеса [151; 210; 333] Эпистаз - это набор генетических взаимодействий, где фенотипический эффект одной мутации обусловлен наличием другой или нескольких замен. Например, резистентные штаммы, несущие одинаковые генетические детерминанты устойчивости, различаются по своей трансмиссивности (способности передаваться от пациента к пациенту) [132; 139]. Бактериальный фитнес, с другой стороны, отражает скорость роста, вирулентность и способность к передаче генетических данных [73; 239]. Появление мутаций в тех или иных генах МБТ, связанных с устойчивостью к АБП, приводит к снижению бактериального фитнеса по отношению к штамму «дикого» типа [49]. В то же время, факт широкого распространения

лекарственно-устойчивых штаммов среди впервые выявленных больных указывает на наличие у микобактерий механизмов, способствующих восстановлению фитнеса до уровня чувствительных МБТ [74; 140]. Исследования показали, что ключевым в эволюции трансмиссии таких штаммов является приобретение компенсаторных мутаций [113; 239; 299]. Примером является наиболее часто встречаемая мутация S531L в гене *rpoB* в клинических изолятах устойчивых к R и среди штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [76; 94]. Показана прямая связь широкого распространения этой замены с приобретением компенсаторных мутаций в генах *rpoA* и *rpoC*, кодирующие субъединицы РНК-полимеразы, комбинация которых (эпистатическое взаимодействие) тесно связана с улучшением способности к передаче таких штаммов (бактериальный фитнес) среди пациентов [121]. Более того, в исследовании Vorrell S и соавт., (2013) показали, что специфические мутации в генах *rpoB* и *gyrA*, связанные с устойчивостью к R и ФХ, могут компенсировать сниженный фитнес друг друга, вплоть до того, что некоторые штаммы, содержащие мутации в обоих генах восстанавливают его [74]. Так же было установлено, что эффект эпистаза приводит к увеличению минимальной ингибирующей концентрации (МИК) лекарственного препарата. В частности, приобретение высокой устойчивости МБТ к Emb является многошаговым процессом и в дополнении к часто встречаемой мутации M306V (*embB*) связан с появлением мутаций в генах *Rv3806c* и *Rv3792*, участвующих в биосинтезе клеточной стенки [285].

Таким образом, неадекватный выбор химиотерапии, в первую очередь из-за длительного лабораторного определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) к АБП, низкой приверженности пациента к лечению или нерегулярного обеспечения препаратами способствовало последовательному накоплению генетических мутаций в генах-мишенях действия АБП возбудителя и появлению не только штаммов МБТ с МЛУ/ШЛУ (MDR/XDR), но и с тотальной устойчивостью ко всем используемым препаратам (XXDR) [142, 317].

Более широкое представление о механизмах развития ЛУ МБТ может помочь в совершенствовании, как генетических, так и фенотипических диагностических инструментов для эффективного и своевременного выявления ЛУ возбудителя, что в свою очередь даст возможность выбрать наилучшие варианты как существующих, так и новых режимов химиотерапии.

1.1. Лекарственная устойчивость возбудителя туберкулёза и механизмы её формирования

1.1.1. Естественная устойчивость

Как сказано выше представители рода *Mycobacterium*, к которым относятся микобактерия туберкулёза по своей природе обладают устойчивостью ко многим антибиотикам [157; 242]. Все эти механизмы естественной устойчивости формируют высокорезистентный фон, ограничивающий применение как специфических ПТП, так и АБП широкого действия.

Строение клеточной стенки M.tuberculosis (пассивная устойчивость).

Низкая проницаемость микобактериальной клеточной стенки связана с её составом и уникальным строением, обеспечивая эффективный барьер от проникновения АБП (Рисунок 1).

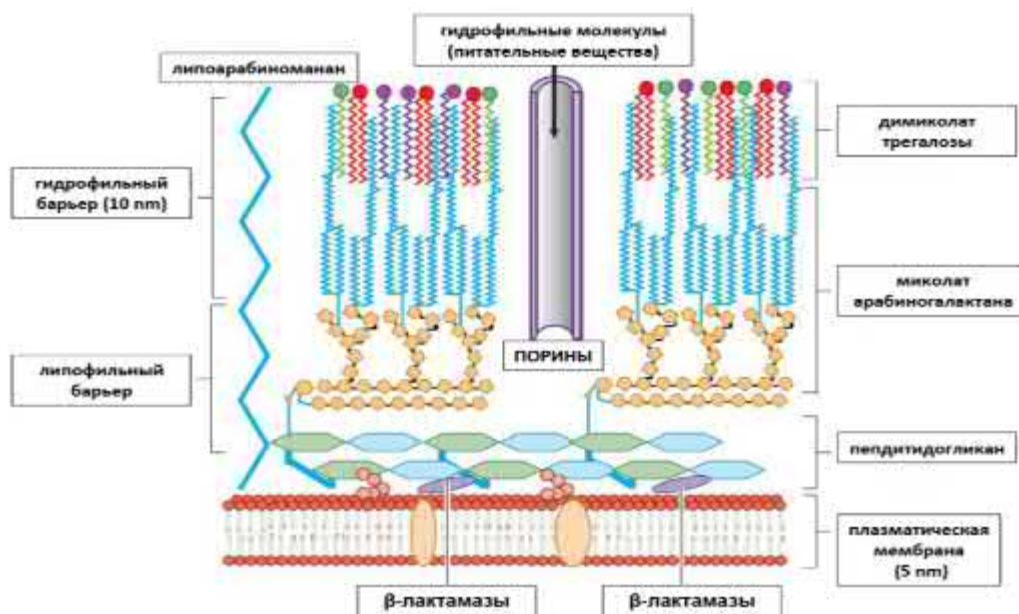


Рисунок 1 – Схематическое строение микобактериальной клеточной стенки (Nguyen L and Pieters J, 2009) [242].

Первичный каркас клеточной стенки образован перекрёстносвязанными пептидогликанами покрытыми слоем арабиногалактана, создавая, таким образом,

гидрофильный барьер от проникновения гидрофобных соединений (молекул). В свою очередь арабиногалактановый слой обёрнут длинноцепочечными миколовыми кислотами (липофильный барьер), ограничивающими проникновение гидрофильных соединений [47; 178; 267]. На внешней стороне этих трёх слоёв есть мобильный слой, состоящий из трегалозы и гликопептидолипидов. Подтверждением того, что липидный слой является основным фактором естественной устойчивости микобактерий ко многим гидрофобным антибиотикам (макролиды, рифампицин, тетрациклин, фторхинолоны) показано проведёнными исследованиями с мутантами, дефектными по синтезу липидов, в результате чего они становятся восприимчивыми к лекарствам в отличие от штаммов дикого типа, естественно устойчивых к ним [174; 242]. В тоже время, транспорт низкомолекулярных питательных веществ и метаболитов через эту непроницаемую клеточную стенку облегчается белками-поринами, похожими на те, что обнаружены во внешних мембранах грамотрицательных бактерий [243]. Считается, что маленькие гидрофильные соединения, в том числе многие антибиотики, активные против МБТ, могут пройти через клеточную стенку только через порины [118]. В экспериментальных работах на *M. smegmatis* по изучению роли поринов в импорте антибиотиков через клеточную стенку было показано, что экспрессия порина MspA в МБТ повышает чувствительность к H, S, Emb и β -лактамам, а делеция гена *mspA* наоборот приводит к увеличению устойчивости как к гидрофильным, так и крупным гидрофобным препаратам - рифампицин, ванкомицин и стрептомицин [217; 305]. Однако в исследованиях было показано, что в клеточной оболочке различных микобактерий содержится недостаточное количество поринов для обеспечения существенного вклада в её проницаемость [217; 242]. При этом, недавние исследования по изучению проницаемости клеточной стенки микобактерий продемонстрировали, что липофильность является важным, но не решающим фактором защиты от проникновения АБП [177].

Специализированные механизмы естественной устойчивости МБТ к АБП представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Специализированные механизмы природной устойчивости *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам

Типы природной устойчивости	Механизм	Гены, кодирующие ферменты и белки	Антибактериальные препараты	Литературные ссылки
Ферментативная деградация АБП	Расщепление АБП β -лактамазами	<i>blaC</i> и <i>blaS</i> - β -лактамазы BlaC (класс A) и цифалоспориназа BlaC ингибируется клавулановой кислотой	β -лактамы (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы) <i>Имепинем/клавуланат</i> <i>преодолевает деградационное</i> <i>действие β-лактамаз</i>	[96; 108; 120; 136; 172; 259; 328]
Ферментативная модификация АБП	метилирование и ацетилирование АБП	<i>eis</i> (ацетилтрансфераза Eis) <i>tlyA</i> (2'-O-метилтрансфераза)	Аминогликозиды (Eis специфически ацетирует Km и Am) Капреомицин (TlyA метилирует 16S рРНК и 23S рРНК)	[181; 224; 356]
Ферментативная модификация лекарственных мишеней	Структурная модификация рибосом посредством метилирования 23S рРНК - снижается аффинность с АБП	<i>erm37</i> (рибосомальная РНК-метилтрансфераза)	Макролиды Линкозамиды Стрептограмин	[84; 215]
Мимикрия мишени действия препарата	Белковая мимикрия (сходство) ДНК	<i>mfpA</i> (белок MfpA представляет собой правостороннюю свёрнутую спираль и напоминает структуру двойной спирали ДНК)	Фторхинолоны	[51; 133; 163; 236]

Продолжение таблицы 2

Типы природной устойчивости	Механизм	Гены, кодирующие ферменты и белки	Антибактериальные препараты	Литературные ссылки
Транскрипционный контроль множественной лекарственной устойчивости	Регуляторный контроль структурных белков (эффektorных, регуляторных, индукторных), защищающих бактерии от АБП	<i>whiB7</i> (белок WhiB7 транскрипционный фактор множественной лекарственной устойчивости) Контролирует экспрессию генов <i>eis</i> (ацетилтрансфераза), <i>erm37</i> (рибосомальная РНК-метилтрансфераза), <i>tap</i> (АВС транспортёр) <i>lsr2</i> (гистонотипный белок Lsr2) контролирует работу генов <i>iniABC</i> и <i>efpA</i> - отток АБП	Макролиды Линкозамиды Аминогликозиды Тетрациклин Стрептомицин ПАСК Этамбутол Изониазид	[44; 83; 83; 99; 109; 110; 202; 237; 287; 332]
Выведение антибактериальных препаратов из клетки (эффлюксные насосы)	Активный отток АБП с помощью эффлюксных насосов (комплекс мембранных белков) Формируют устойчивость низкого уровня	<i>jefA</i> , <i>efpA</i> , <i>tap</i> , <i>Rv1410c</i> , <i>Rv1634</i> (MFS белки транспортёры) <i>ddrA</i> , <i>ddrB</i> , <i>rv1217-rv1218</i> (ABC белки транспортёры) <i>mmr</i> (MmR белок) <i>mmpL7</i> , <i>mmpL5</i> (MmpL7, MmpL5 белки)	Изониазид Этионамид Этамбутол Стрептомицин Рифампицин Фторхинолоны Азолы	[44; 67; 116; 155; 156; 204; 231; 241; 256; 278; 297; 330]

*Лекарственная толерантность *M.tuberculosis**

Феномен лекарственной толерантности свойственен МБТ, находящихся в дормантном («дремлющем») состоянии, при котором бактерии остаются жизнеспособными, но не делятся. Субпопуляция МБТ может переходить в дормантное состояние в период латентной инфекции или под воздействием антибиотикотерапии, персистируя длительное время, и повышая риск рецидива заболевания. Такое состояние характеризуется снижением большей части метаболических процессов, вызывающих повышенную толерантность к АБП, которую называют фенотипической лекарственной устойчивостью [146; 150]. Это объясняется тем, что у медленно делящихся или не реплицирующихся дормантных МБТ из-за низкой метаболической активности снижается синтез белков, в том числе тех которые являются мишенями действия препаратов [145]. Следовательно, в отличие от генетической устойчивости, АБП связываются со своими мишенями, но этот процесс не приводит к гибели микроорганизма. «Дремлющие» клетки, по мере восстановления благоприятных условий среды, способны восстанавливать восприимчивость к АБП, так как генетически они идентичны с МБТ чувствительными к препаратам [203].

Профилактическое лечение латентной инфекции с использованием Н и R оправдано тем, что Н действует на активно реплицирующиеся бактерии, снижая риск реактивации за счёт действия на восстановившиеся клетки, а R на дормантные (для выживания бактериям требуются, по крайней мере, некоторая транскрипция генов) и тем самым может помочь элиминировать оставшуюся дормантную субпопуляцию [98].

1.1.2. Приобретённая лекарственная устойчивость

Наиболее распространённый механизм приобретённой ЛУ у МБТ это изменение последовательности ДНК в генах-мишенях действия АБП, опосредованное появлением мутаций в их кодирующих частях или регуляторных доменах [270]. Список генов, кодирующих мишени действия ПТП и АБП, мутации в которых связаны с формированием приобретённой ЛУ МБТ к ним представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Гены, вовлечённые в формирование приобретённой лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам

Препарат (механизм действия)	Ген (мишень)	Кодируемый фермент	Роль (функция)	Частота встречаемости мутаций (%)
Ингибиторы синтеза клеточной стенки				
Изониазид Ингибирование биосинтеза миколовых кислот, липидов, углеводов и других метаболических процессов	<i>katG</i>	каталаза-пероксидаза	активация пролекарства	60-95
	<i>inhA</i>	еноил -АСР-редуктаза	мишень перапарата	9-43
	<i>Промотр inhA</i>	еноил -АСР-редуктаза	сверхэксперсия мишени препарата	
	<i>oxyR-ahpC</i>	алкилгидропероксидредуктаза	маркер резистентности	10-15 с мутациями в <i>katG</i>
	<i>ndh</i>	NADH дегидрогеназа II типа	модуляция NADH/NAD	нет данных
Этионамид Ингибирование биосинтеза миколовых кислот	<i>kasA</i>	β -кетоацил АПБ синтетаза	мишень перапарата	5-8
	<i>inhA</i>	еноил -АСР-редуктаза	мишень перапарата	56
	<i>Промотр inhA</i>	еноил -АСР-редуктаза	сверхэксперсия мишени препарата	
	<i>ethA</i>	флавин монооксигеназа	активация пролекарства	37
	<i>ndh</i>	NADH дегидрогеназа II типа	модуляция NADH/NAD	нет данных
Этамбутол Ингибирование арабиногалактанового синтеза	<i>mshA</i>	гликозилтрансфераза	активация пролекарства	нет данных
	<i>embCAB</i>	арабинозилтрансфераза	мишень препарата	40-68
Циклосерин Ингибирование синтеза пептидогликанов	<i>ubiA</i>	DPPR синтаза	Сверхэксперсия субстрата	10-46 с мутациями в <i>embB</i>
	<i>alr</i>	аланинрацемаза	мишень препарата	нет данных
	<i>Промотр alr</i>	аланинрацемаза	сверхэксперсия мишени препарата	нет данных
	<i>cusA</i>	протонный симпортер D серина/L-D-аланина/глицина/D-циклосерина	транспортёр аланина	нет данных
	<i>Ald</i>	L-аланиндегидрогеназа	мишень препарата	нет данных

Продолжение таблицы 3

Препарат (механизм действия)	Ген (мишень)	Кодируемый фермент	Роль (функция)	Частота встречаемости мутаций (%)
Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот				
Рифампицин Ингибирование транскрипции	<i>rpoB</i>	β -субъединица РНК полимеразы	мишень препарата	95-98
Фторхинолоны Ингибирование ДНК-гиразы	<i>gyrA</i>	α субъединица ДНК гиразы	мишень препарата	57-90
	<i>gyrB</i>	β субъединица ДНК гиразы	участвует в связывании препарата	5-7
Ингибиторы синтеза белка				
Канамицин/ амикацин Ингибирование трансляции	<i>rrs</i>	16S rRNA	мишень препарата	60-76
	<i>eis</i>	ацетилтрансфераза Eis	модификация препарата	15-20
	<i>wniB7</i>	МЛУ регулятор транскрипции	регулирует экспрессию <i>eis</i>	нет данных
Капреомицин Ингибирование трансляции	<i>rrs</i>	16S rRNA	мишень препарата	60-76
	<i>tlyA</i>	метилтрансфераза rRNA	модификация мишени	нет данных
Стрептомицин Ингибирование трансляции	<i>rpsL</i>	рибосомный белок S12	мишень препарата	52-59
	<i>rrs</i>	16S rRNA	мишень препарата	8-21
Линезолид Ингибирование трансляции	<i>gidB</i>	метилтрансфераза 16S rRNA	модификация мишени	нет данных
	<i>rml</i>	23S rRNA	мишень препарата	Около 90
	<i>rplC</i>	50S рибосомный L3 белок	мишень препарата	1,9-11

Продолжение таблицы 3

Препарат (механизм действия)	Ген (мишень)	Кодируемый фермент	Роль (функция)	Частота встречаемости мутаций (%)
Ингибитор фолатного синтеза				
ПАСК (пара-Амино салициловая кислота) Ингибирование синтеза фолиевой кислоты	<i>tyhA</i>	тимидилатсинтаза	мишень препарата	37
	<i>folC</i>	дигидрофолатсинтаза	активация пролекарства	нет данных
Ингибитор мембранного транспорта				
Пиразинамид Ингибирование трансллокации	<i>prnA</i>	пиразинамидаза	активация пролекарства	72-99
	<i>prnA</i>	рибосомный белок S1	мишень препарата	
Ингибитор энергетического метаболизма				
Бедаквилин Ингибирование АТФ-синтазы	<i>atpE</i>	С-субъединица АТФ-синтазы	мишень препарата	нет данных
	<i>tmprR</i>	транскрипционный регулятор	Сверхэкспрессия эффлюксного насоса Mmp15	нет данных

Ингибирующее антибактериальное действие ПТП (и других АБП) направлено на различные клеточные мишени и в зависимости от мишени действия препарата их подразделяют на ингибиторы клеточной стенки, биосинтеза нуклеиновых кислот, синтеза белка, фолатного синтеза, энергетического метаболизма, нарушение мембранного транспорта. Основные механизмы устойчивости МБТ включают изменение лекарственной мишени, избыточную экспрессию лекарственной мишени, нарушение активации пролекарства и активацию оттока через эффлюксные насосы [360].

Общим механизмом развития устойчивости МБТ к ПТП и АБП является *изменение лекарственной мишени* в результате появления мутаций в кодирующих их генах (Таблица 3). В результате происходит изменение во взаимодействии препарата с сайтом структурно модифицированного белка, которое проявляется в образовании нестабильного комплекса антибиотик-мишень или его отсутствия, что сказывается на устойчивости МБТ к препарату [157].

Механизм *нарушения активации препарата* характерен для ПТП, являющихся пролекарствами как, в случае препаратов первого ряда - Н и пиперазид (PZA), и второго - этионамид (Eto) и пара-Аминосалициловая кислота (PAS). В определённых случаях активирующий пролекарство фермент не является необходимым для роста и выживания микобактерий, как в случае PZA, который обладает бактерицидным действием на дормантные формы МБТ. Ген-мишень PZA *prnA* - большого размера и вмещает множество точковых мутаций, вставок/делеций, вставок мобильных генетических элементов и т.д, которые будут приводить к синтезу модифицированного фермента, активирующего пролекарство без ущерба для выживания бактерий. Кроме того, мутации в промоторной части гена могут быть причиной снижения транскрипции и, следовательно, низкой продукции фермента, активирующего пролекарство [157].

Сверхэкспрессия лекарственной мишени за счёт появления мутаций в транскрипционных репрессорах или промоторе генов, кодирующих эти мишени, может вызвать избыточную продукцию ферментов, в частности в отношении Н,

Ето и циклосерина (Cs), что приводит к преодолению ингибирующего их действия. Избыточная экспрессия обеспечивает низкую устойчивость (например, к H или Cs), которую обычно можно преодолеть, увеличив дозу препарата [157].

Примером механизма *активации оттока через эффлюксный насос* является выведение из клетки МБТ нового препарата - бедаквилина (BQ). Появление мутаций в гене репрессора *mmpR* (*Rv0678*) приводит к повышению транскрипции оперона *mmpS5-L5* и увеличению продукции мембранного белка Mmp15, обеспечивающего эффлюкс препарата [69].

1.1.2.1. Молекулярно-генетические основы устойчивости *M.tuberculosis* к изониазиду

Изониазид является пролекарством, для активации которого необходим фермент каталаза/пероксидаза, кодируемая геном *katG*. Активация препарата сопровождается образованием свободнорадикальных форм изоникотиновой кислоты, которая, образуя комплекс с никотинамидом аденин динуклеотидом (H-NAD), плотно связывается с белком InhA (еноил-АСР-редуктаза), вызывая ингибирование синтеза миколовой кислоты - основного компонента клеточной стенки [117; 250]. H - высокоэффективный ПТП первого ряда и обладает ингибирующей активностью в отношении только делящихся МБТ. Персистирующие формы МБТ (не делящиеся клетки) толерантны к H, это может быть вызвано микобактериальным гистоноподобным ДНК-связывающим белком 1 (MDP1), подавляющим транскрипцию гена *katG* [244].

Возникновение устойчивости к H связывают с появлением мутаций в нескольких генах: ген *katG*, промоторная и структурная область гена *inhA*, межгенный регуляторный регион *oxyR-ahpC*, *kasA* и *ndh*. Большинство штаммов, устойчивых к H содержат мутации в 315 кодоне гена *katG*, из которых замена S315T является наиболее распространенной и встречается в 60–95% случаев [272; 279; 359]. Замены в 315 положении обычно не полностью подавляют каталазную активность МБТ и такие штаммы могут сохранять фитнес (скорость роста) и вирулентность, что объясняет их частое присутствие среди клинические изолятов.

Вторыми по встречаемости среди устойчивых к препарату штаммах являются мутации в положениях -15 и -8 в промоторной области гена *inhA* (оперон *mabA/inhA*), вызывающие сверхэкспрессию фермента InhA [126; 280]. В меньшем проценте случаев встречаются замены S94A и I194T в структурной части этого гена [213], которые снижают аффинность белка InhA с Н-NAD [326]. Мутации в *inhA* не только вызывают устойчивость к Н, но также приводят к перекрёстной устойчивости к структурно родственному препарату - Eto [198]. Исследованиями также показано, что существуют различия в степени устойчивости МБТ к препарату, ассоциированной с мутациями, из которых ведущими являются замены в *katG* (высокий уровень) и *inhA* (низкая степень резистентности) [358].

В синтезе миколовых кислот клеточной стенки, вместе с InhA, принимает участие фермент KasA (β -кетоацил-ацил-переносчик синтазы), кодируемый геном *kasA* [665]. Мутации в *kasA* регистрировали в 3,2% - 24% устойчивых штаммов, но только в сочетании с мутациями в *katG* или *katG/inhA* [31; 175]

Так же в приобретённой устойчивости к препарату участвует ген *ahpC* и межгенная регуляторная область - *oxyR-ahpC*, кодирующие алкилгидропероксид редуктазу и ответственные за клеточный ответ на окислительный стресс [190]. Ген *oxyR*, контролируя экспрессию *katG* и *ahpC*, регулирует реакцию на пероксид. Появление мутаций в промоторной области *ahpC* является компенсаторным механизмом на снижение или потерю активности каталазы-пероксидазы, контролируемой генами *katG* и *inhA* [276]. Примерно в 12% устойчивых изолятах эти мутации встречаются в сочетании с заменами в *katG* и *inhA* [190] и значительно реже (в 3,7%) самостоятельно [31].

В то же время незначительный процент штаммов с низким уровнем устойчивости к Н не имеет мутаций в *katG* или *inhA*, что возможно связано с другим(и) механизмом(ами) устойчивости [89; 295]. Альтернативным объяснением может быть гетерорезистентность или смешанная популяции МБТ, в которой присутствуют в большем количестве чувствительные и в меньшем устойчивые субпопуляции с мутациями в *katG* или *inhA* [361].

1.1.2.2. Молекулярно-генетические основы устойчивости *M.tuberculosis* к рифампицину

Рифампицин впервые был предложен как противотуберкулёзный препарат в 1972 году и обладает высоко бактерицидным и стерилизующим действием в отношении делящихся и не делящихся (персистирующих) МБТ. Механизм его действия основан на ингибировании синтеза мРНК (блокировка транскрипции) путём связывания с β -субъединицей фермента РНК-полимеразы, что приводит к гибели клетки [88]. Устойчивость МБТ к препарату в 96-98% штаммов обусловлена возникновением мутаций в гене *rpoB*, который кодирует РНК-полимеразу, в частности в структурной его области размером 81 п.н, получившей название «участок, определяющий устойчивость к рифампицину» (rifampicin resistance-determining region - QRDR) [313]. Мутации в 531, 526 и 516 кодонах, такие как S531L, H526Y/D, D516V, наиболее часто встречаются в R-устойчивых штаммах МБТ и связаны с высоким уровнем устойчивости [86; 301]. Обычно мутации в *rpoB* связаны с перекрёстной устойчивостью к R и рифабутину (Rfb), но некоторые R-устойчивые штаммы с заменами F514F, D516V и S522L проявляют чувствительность к Rfb [176]. Кроссрезистентность к обоим препаратам обеспечивают не только мутации в 531 и 526 кодонах, но и замены расположенные в начале региона *rpoB*, а так же двойные D516A-R529Q [176; 310]. Напротив мутаций E510H, L511P, D516Y, N518D, H526N и L533P были выявлены в чувствительных к препарату изолятах, которые встречались примерно в 10% случаев [50; 176; 246].

По данным ряда авторов эти так называемые «спорные» мутации, выявляемые в МБТ, стали причиной расхождений как между молекулярными и фенотипическими, так и между различными бактериологическими результатами определения ЛЧ [50; 246; 275; 323]. Так в исследовании Rigouts L и соавт., 2013 было показано, что большинство таких изолятов при КК = 1,0 мкг/мл в Bactec MGIT 960 проявляют чувствительность к R, но устойчивость на плотной среде Л-Й. В дальнейших исследованиях Ocheretina O и соавт., (2014), Jamieson F и соавт., (2014) была определена причина диссонанса результатов определения ЛЧ,

связанная с близкими значениями МИК препарата таких штаммов к КК, используемой для определения ЛЧ к R в Bactec MGIT 960, что не позволяет оценивать их как устойчивые [176; 275].

Были отмечены случаи неблагоприятных результатов лечения при использовании R в стандартном режиме у больных, выделяющих подобные штаммы [336]. Van Ingen J. и соавт., (2011) на основе фармакокинетических расчётов оценки потенциала R для лечения туберкулёза было показано, что МИК препарата до 1 мкг/мл можно безопасно преодолеть, применяя дозу в 20 мг/кг в схемах лечения [324]. Jeong, D.H и соавт 2018, в своей работе описали два случая излечения лёгочного туберкулёза у пациентов, выделяющих МБТ с мутацией L511P в *rpoB*, в режим терапии которых был включён R в повышенной дозе - 20 мг/кг в сутки [179].

Позднее Van Deun A и соавт., 2015 показали, что «спорные» мутации могут быть ответственными за устойчивость к R среди новых случаев туберкулёза и привести к неблагоприятным результатам лечения препаратами первого ряда [320].

1.1.2.3. Молекулярно-генетические основы устойчивости *M.tuberculosis* к этамбутолу

Этамбутол в отличие от ПТП первого ряда, обладающих бактерицидной активностью, является бактериостатическим препаратом и действует на активно делящиеся микобактерии. Мишенью его действия является фермент арабинозилтрансфераза, кодируемая геном *embB*, участвующем в синтезе арабиногалактана, компонента клеточной стенки МБТ [314]. Устойчивость к Emb вызвана появлением мутаций в опероне *embCAB*, в частности в кодонах 306, 406 и 497 *embB* [101].

Мутации в 306 кодоне *embB*, особенно M306V, наиболее часто встречаются в устойчивых клинических изолятах (до 68% от всех устойчивых штаммов) [271; 303]. Тем не менее около 35% резистентных штаммов не имеют мутаций в *embB* [46; 117; 250].

Другим механизмом устойчивости МБТ к препарату является появление мутаций V188A, A237V, R240C и A249G в гене *ubiA*, кодирующий DPPR синтазу (5-фосфо- α -d-рибоза-1-дифосфат:декапренил-фосфат-фосфорибозилтрансферазу), также вовлечённую в синтез клеточной стенки. Было показано, что избыточная экспрессия этого гена вызывает более высокий уровень устойчивости к препарату в сочетании с мутациями в *embB* [162; 285].

Вместе с тем, в многочисленных исследованиях сообщалось о наличии мутаций M306V и M306I в *embB* в чувствительных к Emb МБТ [42; 200; 235]. Такие расхождения могут быть вызваны тем, что установленное значение КК Emb, например для определения ЛЧ в Bactec MGIT 960, приближено к МИК чувствительных штаммов и таким образом, даёт плохую воспроизводимость результатов тестирования ЛЧ [191; 214].

1.1.2.4. Молекулярно-генетические основы устойчивости *M.tuberculosis* к фторхинолонам

Фторхинолоны являются препаратами широкого спектра действия и обладают высокой бактерицидной активностью в отношении МБТ и других инфекций. Эти соединения эффективно действуют как на делящиеся, так не делящиеся МБТ [233]. ФХ «старшего поколения», такие как офлоксацин (Ofx) и ципрофлоксацин (Cfx) были включены в терапию туберкулёза с МЛУ в качестве препаратов резервного ряда [337]. Вместе с тем, их использование для лечения неспецифических инфекций респираторного тракта и мочеполовой системы привело к довольно быстрому развитию к ним устойчивости у МБТ [329]. В руководстве ВОЗ 2011г. предпочтение в лечении туберкулёза с МЛУ отдаётся препарату третьего поколения - левофлоксацину (Lfx), который является левовращающим изомером Ofx и обладает более высокой противотуберкулёзной активностью по сравнению с Ofx [87; 149; 344].

Препараты четвёртого поколения ФХ - моксифлоксацин (Mfx) и гатифлоксацин (Gat) являются более эффективными для лечения туберкулёза с МЛУ, которые по сравнению с ФХ старшего поколения характеризуются более выраженной активностью и низкими значениями МИК в отношении МБТ-МЛУ и

МБТ-МЛУ, устойчивых к Ofx и Cfx [185; 283]. Высокая бактерицидная активность напрямую связана с особенностью их химического строения, а именно с присутствием метокси-группы (OCH₃) в 8 положении, что повышает сродство с хинолон-связывающим карманом ДНК-гиразы и вероятно, является главным фактором, определяющим низкие значения МИК [39; 125]. Это обстоятельство объясняет эффективность Mfx в отношении изолятов, содержащих мутацию A90V в гене *gyrA* или D500N в *gyrB*, но только в том случае если МИК препарата не больше 2 и 0,5 мкг/мл соответственно, а стандартная доза для его приёма увеличена вдвое [266].

Молекулярный механизм действия ФХ заключается в ингибировании активности топоизомеразы II (ДНК-гиразы), что в свою очередь предотвращает последующую транскрипцию ДНК и бактериальную репликацию МБТ [62; 232]. Ингибирование ДНК-гиразы ФХ происходит посредством взаимодействия препаратов с так называемым хинолон-связывающим карманом, который состоит как из аминокислотных остатков, так и нуклеотидов [264]. Тетрамерный фермент ДНК-гираза состоит из двух А (GyrA) и двух В (GyrB) субъединиц, кодируемые одноимёнными генами [56; 227]. Появление мутаций в двух генах изменяют структуру кармана и могут привести к широкой перекрёстной устойчивости ко всем ФХ [57; 318]. Наиболее распространёнными в устойчивых штаммах являются замены в 88, 90, 91 и 94 кодонах, расположенных в высоко консервативной области гена *gyrA*, называемой регионом, определяющим устойчивость к ФХ (РОУФ) [56; 149; 309]; они выявляются в 57 - 90 % случаев [100; 185; 263]. Чаще всего определяются мутации D94G, A90V, D94A и S91P [115; 298] и реже H70R, A74S, G88C и G88A [56; 198; 262].

Мутации в *gyrB* встречаются значительно реже, примерно в 7% случаев, как самостоятельно, так и в комбинации с заменами в *gyrA* [327; 329]. Устойчивость МБТ к ФХ связывают с заменами в 500, 538, 539 и 540 кодонах в этом гене [218; 252], а также с двумя мутациями в 485 кодоне Arg→Cys/Asn, обнаруженные в Узбекистане, Таиланде и Вьетнаме [115; 134; 263]. В штаммах встречаются замены и в других кодонах - D473N, P478A, R485H, S486F, A506G, A547V, G551R и

G559A, однако по данным из литературы эти изоляты остаются чувствительными к препаратам [251].

Устойчивость МБТ к ФХ носит перекрёстный характер, однако уровень резистентности к каждому отдельному препарату может быть разный [102; 185]. Так было показано, что это зависит от типа мутаций в *gyrA* и *gyrB* [187; 218]. Мутации A90V и D94A в *gyrA* приводят к более низкому уровню устойчивости к Ofx, Mfx и Gat, чем замены D94G, D94N, D94Y и D94H обуславливающие высокий уровень. Однако, эта корреляция не абсолютна и некоторые штаммы с мутациями A90V и D94A проявляют высокую степень устойчивости, МИК которых превышает 16 мкг/мл [205; 298]. По-видимому это связано с дополнительными механизмами проявления резистентности, такими как отток препаратов через эффлюксные насосы [116] или высоко устойчивым генетическим фоном этих изолятов [319]. Разную степень устойчивости проявляют штаммы и с редко встречаемыми мутациями A74S и D89N. В отличии от A74S, приводящей к низкой степени устойчивости МБТ только к Mfx, замена D89N ассоциирована с умеренной и высокой резистентностью к Ofx, Mfx и Lfx [57; 65; 199; 218]

В исследовании Malik S и соавт., (2012) было показано, что мутации в *gyrB* в меньшей степени связаны с перекрёстной устойчивостью к ФХ, что говорит об их ассоциации с разным уровнем резистентности к отдельным препаратам. Например, замены в 500 кодоне (D500H и D500N) приводят к устойчивости МБТ только к Lvх и Ofx, между тем к Mfx и Cfx эти штаммы проявляют чувствительность. Напротив, штаммы с заменами N538K и E540D устойчивые только к Mfx (МИК 2 и 4 мкг/мл), а изоляты с мутациями N538D, E540V и двойной R485C+T539N проявляют устойчивость ко всей группе ФХ [218].

В работе Pantel A и соавт., (2012) также выявил различия в степени устойчивости штаммов с мутациями D500A и E540V к Ofx, Lvх и Mfx. Изоляты с D500A обладают низкой степенью устойчивости только к Ofx и чувствительностью Mfx и Lvх, а с E540V низкой к Lvх и Ofx, умеренной к Mfx и высокой к Gat [252].

Высокую степень устойчивости обуславливают замены A508S и G512R, как к Ofx, так и Mfx [103].

Комбинация мутаций в обоих генах или двойные в *gyrA* также приводят к высокому уровню устойчивости к ФХ [209; 222].

Описаны и другие механизмы устойчивости МБТ к ФХ, которые являются клинически менее значимыми, но создают высоко резистентный фон, о которых сообщалось выше [256]. В недавнем исследовании Lu J и соавт., (2014) было показано, что в некоторых монорезистентных к ФХ изолятах определяли высокий уровень эффлюксных белков, кодируемых геном *pstB*. Авторы предположили, что PstB белки могут служить в качестве эффлюксных насосов, обеспечивающих высокий уровень устойчивости к Lvх [211].

1.1.2.5. Молекулярно-генетические основы устойчивости *M.tuberculosis* к аминогликозидам и капреомицину

Аминогликозиды Km и Am, а также циклический полипептид Cm относятся к инъекционным препаратам резервного ряда и в настоящее время применяются для лечения лекарственно-устойчивого туберкулёза. Хотя они принадлежат к разным классам антибиотиков, но оказывают бактерицидное действие через одну и ту же мишень [117; 250]. Все три препарата являются ингибиторами синтеза белка, которые связываясь с бактериальной 30S-рибосомой, приводят к модификации структуры 16S рРНК, кодируемой геном *rrs* [107; 307]. Появление в этом гене мутаций неизбежно вызывает устойчивость к Km, Am и в некоторых случаях к Cm [180].

Мутация A1401G в *rrs* является наиболее распространённой среди устойчивых МБТ к трём препаратам - в 70 - 80% ассоциируется с устойчивостью к Cm и Am и в 60% к Km. Реже встречаются замены G1484T, C1402T, C1402A, которые определяли как в устойчивых, так и в чувствительных к Am и Km МБТ [147; 223]. В литературе также имеются данные о степени устойчивости штаммов МБТ, связанной с мутацией A1401G, которая приводит к высокой к Km и Am и варьирует в отношении Cm [97; 128; 362].

Однако около 40% устойчивых изолятов к Km не имеют мутаций в гене *rrs*. Исследования показали, что другим механизмом приобретённой ЛУ МБТ к Km является появление мутаций в промоторной области гена *eis*, который кодирует ацетилтрансферазу Eis (Enhanced Intracellular Survival protein). Фермент Eis специфически ацетирует канамицин и амикацин, то есть химически модифицирует их, обеспечивая природную устойчивость МБТ к АГ. Возникновение мутаций в этой части гена усиливают эффект ацетилирования за счёт многократного увеличения его экспрессии, приводящей к накоплению фермента и как следствие к инактивации антибиотиков, но для Km она в 3 раза выше [216; 356]. В литературе описаны такие замены, как C2A, C12T, G10A, G37T, (+C14T) и C14T, в тоже время значение некоторых в развитии устойчивости возбудителя туберкулёза к Km спорна [89; 180; 356]. Тем не менее около 80% клинических изолятов, несущих эти мутации, демонстрируют низкий уровень устойчивости к препарату [89; 356]. С другим механизмом проявления низкой устойчивости МБТ к Km связывают возникновение мутаций в 5' Untranslated region гена *whiB7*, являющимся транскрипционным активатором гена *eis* [273].

Устойчивость к Cm связывают ещё с мутациями в гене *tlyA*, кодирующим метилтрансферазу TlyA, которая, как полагают, обеспечивает метилирование 16S-рРНК и 23S-рРНК в участках связывания с Cm. Мутации в этом гене обеспечивают появление неметилированной рибосомальной РНК, что обуславливает низкое сродство с Cm и как результат неспособность препарата оказывать бактерицидное действие. Однако влияние мутаций в этом гене на устойчивость к препарату недостаточно изучено. Так в клинических изолятах не все мутации приводят к снижению чувствительности МБТ к Cm, кроме того в некоторых изолятах устойчивость к препарату можно объяснить присутствием замен в *rrs*. В литературе описаны как нуклеотидные замены, так и инсерции, которые представлены множеством различных вариантов, но встречаемость их в устойчивых изолятах очень мала [89; 129; 180; 260].

1.2. Бактериологические методы определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам

Золотым стандартом определения ЛЧ МБТ к АБП является культивирование возбудителя на питательных средах, содержащих препараты. Такое тестирование «имеет важное значение для тактики химиотерапии больных, контроля за эффективностью лечения, определения прогноза заболевания и проведения эпидемиологического мониторинга лекарственной устойчивости микобактерий в пределах отдельной территории, страны и мирового сообщества» [26].

Для культурального исследования используют плотные на яичной основе или агаре и жидкие питательные среды. Традиционные методы культивирования на плотных средах до сих пор наиболее широко применяют во многих странах [91; 93; 189]. В настоящее время для определения ЛЧ МБТ к АБП в международной практике используют методы пропорций, абсолютных концентраций и коэффициент резистентности (последний применяется крайне редко) (Таблица 4).

Таблица 4 – Бактериологические методы определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis*

Методы	Питательные среды для определения лекарственной чувствительности МБТ к ПТП		Критерии устойчивости МБТ	Сроки получения результатов
	плотные среды	жидкие среды		
абсолютных концентраций	Л-Й	-	≥ 20 устойчивых КОЕ при обильном росте в контрольной пробирке	3 – 5 недель
пропорций	Л-Й, М7Н10, М7Н11	М7Н9 (система Bactec 960)*	$\geq 1\%$ устойчивых КОЕ (количество устойчивых микобактерий среди бактериальной популяции)	2 – 4 недели 4 – 13 дней*
коэффициента резистентности	Л-Й, М7Н10, М7Н11	-	соотношение МИК препарата для исследуемого штамма к МИК лекарственно-чувствительного стандартного штамма H37Rv	2 – 4 недели

Примечание: * - сроки получения результата для системы Bactec 960

В нашей стране в практике микробиологических лабораториях фтизиатрического профиля определение ЛЧ МБТ к ПТП проводится с

применением *метода абсолютных концентраций* на плотной яичной среде Л-Й. Метод характеризуется технической простотой приготовления инокулята и оценки результатов. Однако существенным недостатком его является длительный срок получения результата (3 - 5 недель), что значительно осложняет своевременный выбор режима химиотерапии. Кроме того, если критические и высокие концентрации препаратов первого ряда утверждены Приказом №109 МЗ РФ, 2003, то для резервного ряда они ориентировочные и окончательно не установлены и могут отличаться в отдельных лабораториях [23].

Метод пропорций в США и многих странах Европы является «золотым стандартом» для определения ЛЧ МБТ с использованием плотных агаровых сред *Middlebrook 7H10* (M7H10) или *Middlebrook 7H11* (M7H11). Он основан на определении отношения количества колоний, выделенных на среде с препаратом в КК, к количеству колоний, выделенных на среде без препарата. Критерием устойчивости является присутствие $\geq 1\%$ устойчивых микобактерий среди бактериальной популяции [93]. Преимуществом агаровых сред является их прозрачность, на которой рост колоний микобактерий визуализируется раньше на 1 - 2 недели. По сравнению с M7H10, среда M7H11 обеспечивает более обильный рост лекарственно-устойчивых колоний [164].

Наиболее точным из перечисленных методов является *метод оценки коэффициента резистентности*. Однако трудоёмкость постановки теста и его длительность резко ограничивает его применение.

Жидкие среды, по сравнению с плотными, характеризуются большей эффективностью и более коротким периодом времени, необходимым для получения роста культуры и определения ЛЧ к АБП. Использование жидкой питательной среды M7H9 в сочетании с автоматизацией бактериологического процесса, основанного на методе пропорций, в системе Bactec MGIT 960 является высокоэффективной технологией и позволяет осуществлять быструю диагностику туберкулёза. Продолжительность определения ЛЧ занимает от 5 до 13 суток (для PZA до 21 дня) против 5 недель на плотной среде Л-Й. Результаты ЛЧ МБТ прибором регистрируются автоматически, исходя из учёта ростовых единиц (РЕ)

в опытных пробирках MGIT в критических или высоких концентрациях лекарственного препарата и в контрольной пробирке без препарата, когда количество PE=400. В системе Bactec MGIT 960 методика определения ЛЧ МБТ к ПТП первого ряда с использованием готовых реактивов и лиофилизированных препаратов стандартизована. Для АБП второго ряда готовых наборов реагентов нет и определённое время не было единых стандартов.

Чувствительность или устойчивость МБТ к АБП выше описанными бактериологическими методами оценивается по КК лекарственных препаратов, значения которых разные в зависимости от применяемого метода определения ЛЧ. «КК для каждого препарата это наименьшая концентрация, которая ингибирует 95% «диких» штаммов МБТ, не подвергавшихся воздействию препаратом, но одновременно не подавляющая рост резистентных штаммов МБТ, выделенных от пациентов, не отвечающих на лечение» [104]. Для каждого конкретного ПТП значение КК варьирует в зависимости от состава используемой питательной среды. Это связано с тем установленным значением концентрации лекарственного средства, которое остаётся активным в среде при определении ЛЧ.

На результаты определения ЛЧ влияют такие факторы как состав питательной среды, величина адсорбции и скорость диффузии лекарственного препарата в среде, величина засева и возраст культуры МБТ, время инкубации, рН среды, а также содержание CO₂ во время культивирования [104]. Тщательная стандартизация всех этих параметров необходима для получения достоверных и воспроизводимых результатов определения ЛЧ. В связи с этим ВОЗ и Международным Союзом борьбы с туберкулёзом и болезнями лёгких (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease) была создана сеть наднациональных референс-лабораторий, деятельность которых была направлена на осуществление контроля за достоверностью и надёжностью получаемых результатов определения ЛЧ микробиологическими методами в лабораториях разных стран мира. По результатам этой работы с 1994 по 2002 год было установлено, что интерпретация результатов различными методами различается в значительной степени [191]. Так результаты устойчивости МБТ к Emb и S

показали большее расхождение, чем к R и H. Такие же результаты были получены и для системы Bactec MGIT 960 [64]. Подобное исследование было проведено 10 референс-лабораториями в отношении результатов определения ЛЧ МБТ к препаратам второго ряда. Результаты исследования выявили различия в отношении КК препаратов и критических пропорций устойчивости, что подчёркивает необходимость стандартизации методов и критериев оценки ЛЧ с целью оптимизации клинической значимости получаемых результатов [192]. В связи с этим, было предложено изменить критерии оценки ЛЧ на МИК препаратов, учитывая 1% критическую пропорцию устойчивой популяции МБТ, выделенной от никогда не лечившихся пациентов [91; 261].

Развитие устойчивости МБТ это динамичный процесс последовательного появления и накопления мутаций при селективном воздействии препаратами, который приводит со временем к изменению состава микобактериальной популяции. Следовательно, возникает необходимость периодически корректировать значения КК лекарственных препаратов [3]. Так КК некоторых препаратов в результате многоцентровых исследований неоднократно корректировались (Lfx, Mfx, Cs) или устанавливались (Am, Km) как для плотных, так и для жидких сред (Bactec MGIT 960) и рекомендовались экспертами ВОЗ для определения ЛЧ в руководствах WHO/2007, WHO/2008, WHO/2009, WHO/2014 [341; 342; 343; 346; 347].

Однако, в связи с ростом показателей ЛУ МБТ, встала необходимость модернизировать подходы определения ЛЧ для оптимизации проводимого лечения, а именно установить клинические пограничные значения МИК лекарственных препаратов (англ. clinical breakpoint), разделяющие штаммы, на чувствительные (высокая вероятность эффективности лечения), умеренно-устойчивые и на устойчивые (высокая вероятность неудачи лечения) [52; 53]. Согласно рекомендациям Европейского комитета по тестированию чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST) клинические пограничные значения МИК должны быть определены путём сопоставления данных клинического «разрешения» заболевания, значений МИК препарата,

генетических детерминант приобретённой лекарственной устойчивости, фармакокинетических и фармакодинамических (ФК, ФД) результатов в соответствии с дозой препарата [52; 184]. Используемые же в настоящее время КК ПТП для определения ЛЧ МБТ были определены экспериментально, путём сравнения роста на питательных средах штаммов «дикого» типа со штаммами не «дикого» типа и не были основаны на ФК и ФД и клинических данных [92]. Однако в связи с тем, что для лечения больных туберкулёзом применяют комбинированную терапию нельзя с уверенностью определить эффективность действия конкретного препарата против устойчивого к нему штамма.

В 2018 году ВОЗ ввела новое определение КК, которой является «самая низкая концентрация» препарата *in vitro*, подавляющая рост 99% фенотипически «диких» штаммов туберкулёзного комплекса [351]. Это определение в какой-то степени приближено к аналогичному ECOFF (эпидемиологическое отсечение - англ. epidemiological cut-off), предложенной EUCAST, как «наивысшее значение МИК» для микроорганизмов, не имеющих фенотипически выявляемых приобретённых механизмов устойчивости [131].

Кроме того, на основании имеющихся данных о МИК чувствительных и устойчивых к ФХ штаммов, данных секвенирования *gyrA* и *gyrB* генов, собранных из лабораторий разных стран мира, ВОЗ были пересмотрены и «рекомендованы КК Lfx (1,0 мкг/мл) и Mfx (0,25 мкг/мл) в Bactec MGIT 960, а также впервые предложено «клиническое пограничное значение» для Mfx, составившее 1,0 мкг/мл», для возможности увеличить дозу препарата до 800 мг/сутки [351]. Эти концентрации являются важными для определения низкого уровня устойчивости, например, в штаммах с заменой A90V в *gyrA*, МИК Mfx может быть ниже, чем клиническое пограничное значение [274; 293], но выше чем ECOFF и КК [257]. В таблице 5 представлены суммарные данные значений КК на разных питательных средах.

Таблица 5 – Значения критических концентраций препаратов первого и второго ряда на разных питательных средах при определении лекарственной чувствительности

Группа препаратов	Препарат	Критические концентрации на средах (мкг/мл)			
		Л-Й	M7H10	M7H11	M7H9 Bactec 960
Группа 1 Пероральные препараты 1 ряда	Изониазид	0,2	0,2/1,0 ¹	0,2/1,0 ¹	0,1/0,4 ¹
	Рифампицин	40,0	1,0	1,0	1,0
	Этамбутол	2,0	5,0	7,5	5,0/7,5 ¹
	Пиразинамид	-	-	-	100,0
Группа 2 Инъекционные препараты	Стрептомицин	4,0	2,0	2,0	1,0/4,0
	Канамицин	30,0	5,0	6,0	2,5
	Амикацин	30,0	4,0	-	1,0
	Капреомицин	40,0	4,0	-	2,5
Группа 3 Фторхинолоны	Офлоксацин	4,0	2,0	2,0	2,0
	Левифлоксацин	2,0*	1,0	-	1,0*
	Моксифлоксацин	1,0*	0,5/2,0 ¹	0,5*	0,25/1,0 ^{2*}
	Гатифлоксацин	0,5*	-	-	0,25*
Группа 4 Пероральные бактериостатические препараты 2 ряда	Этионамид	40,0	5,0	10,0	5,0
	Протионамид	40,0	-	-	2,5
	Циклосерин	30,0	-	-	-
	ПАСК	1,0	2,0	8,0	4,0
Группа 5 Агенты с неясной эффективностью (не рекомендуются ВОЗ для рутинного применения у больных с МЛУ)	Линезолид	-	1,0*	1,0*	1,0
	Клофазимин	-	-	-	1,0*
	Амокицилин/ клавулат	-	-	-	-
	Кларитромицин	-	-	-	-

Примечание: ¹ КК и высокая концентрация, ² КК и клиническое пограничное значение, * Значения КК рекомендованные ВОЗ в 2018 г.

Вместе с тем КК препаратов первого ряда в этом техническом отчёте не пересматривались, но остаются в качестве приоритета, поскольку по данным молекулярно-генетических исследований, некоторые мутации приводят к небольшому увеличению МИК, которые, как правило, близки к КК или ЕСOFF [351]. Например, значения МИК *Emb* в некоторых штаммах с мутациями в 306 кодоне гена *embB*, очень близки к КК препарата как на плотных средах, так в Bactec MGIT 960, что является причиной низкой воспроизводимости результатов тестирования ЛЧ МБТ, даже среди референс-лабораторий [54; 124; 293]. Другой пример связан с R. Недавние исследования показали, что изоляты с редкими специфическими мутациями в кодонах 516, 526 и 533 гена *groB*, могут демонстрировать низкий уровень устойчивости к R или даже интерпретироваться как чувствительные в Bactec MGIT 960 [275; 321]. Такие изоляты могут быть

отнесены к промежуточной категории чувствительности/устойчивости, поскольку согласно недавним клиническим исследованиям увеличение дозы R способствует преодолению «толерантности» таких штаммов [72]. В то же время, неадекватная доза препарата, назначенная пациенту, выделяющему штаммы с промежуточным уровнем чувствительности/устойчивости и ошибочно интерпретированными как чувствительные, может привести к плохим результатам лечения и дальнейшему развитию резистентности [257].

Это подчёркивает необходимость тестировать МБТ к КК и высокой концентрации, а также определять промежуточную категорию чувствительности/устойчивости [366]. Так, в руководстве к Bactec MGIT 960 и «Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI) для определения низкого и высокого уровня устойчивости к H, S и Emb рекомендованы две концентрации» (Таблица 5), но это обычно не выполняется в странах с высоким бременем туберкулёза из-за дополнительных материальных расходов [104]. Кроме того, в настоящее время для Bactec MGIT 960 установлены и рекомендованы две концентрации только для этих трёх препаратов, что также ограничивает возможности определения уровня устойчивости возбудителя к другим ПТП.

Таким образом, можно констатировать, что определение ЛЧ МБТ к ПТП с помощью одной установленной КК к каждому препарату независимо от использования питательной среды (плотная или жидкая M7H9 среда в Bactec MGIT 960) является качественной характеристикой, позволяющей разделять штаммы МБТ на «чувствительные» и «устойчивые». Это не даёт возможность оценить уровень устойчивости МБТ к препаратам, который может варьировать в широких пределах. Как сказано выше, для ряда препаратов возможна корректировка дозы для преодоления «пограничной» или «низкой» устойчивости возбудителя, поэтому качественное определение ЛЧ должно быть дополнено количественными методами. Для этого используют количественный показатель, характеризующий микробиологическую активность АБП - величину

минимальной концентрации препарата, подавляющую видимый рост культуры в жидкой или на плотной среде [22; 104].

Для этой цели модернизировали систему Bactec MGIT 960, оборудовав модулем TB eXiST и программным обеспечением EpiCenter (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA). Система позволяет одновременно тестировать несколько бактериальных штаммов на чувствительность к различным концентрациям препаратов с визуализацией результатов в режиме реального времени. В проведенном мультицентровом исследовании на 139 клинических МЛУ изолятах Cambau E и соавт. (2015) были установлены МИК или диапазон МИК, соответствующие низкому, умеренному и высокому уровню устойчивости МБТ к 13 ПТП. Также было оценено влияние различных мутаций в генах МБТ на уровень устойчивости к R, H, Emb, S, Eto, Am, Cm, Ofx и Mfx. Применение модернизированной системы Bactec MGIT 960 для количественного определения ЛЧ может быть полезным для назначения персонализированного лечения и увеличения частоты излечения пациентов с МЛУ/ШЛУ-ТБ, а также для профилактики развития устойчивости [86; 249]. Главным недостатком, ограничивающим его широкое применение, является удорожание исследования за счёт использования дополнительных пробирок MGIT и программного оборудования.

Другой тест-системой, предназначенной для количественной оценки ЛЧ МБТ является, относительно недавно сертифицированная в РФ, тест-система Sensititre MycoTB (MycoTB) (TREK Diagnostic Systems, США-Великобритания). Тест MycoTB, основанный на методе серийных микроразведений, представляет собой формат 96-луночного планшета с жидкой питательной средой M7H9, содержащей 12 лиофилизированных препаратов первого и второго ряда (S, H, R, Emb, Ofx, Mfx, Am, Km, PAS, Eto, Cs, Rfb) (Рисунок 2). С помощью планшета ЛЧ МБТ оценивается по определению МИК препаратов.

Регистрация результатов проводится при просмотре опытных и контрольной лунок с помощью зеркала или ручного «ридера» с программным обеспечением (Vizion System, TREK Diagnostics) на 7 - 14 день [159].

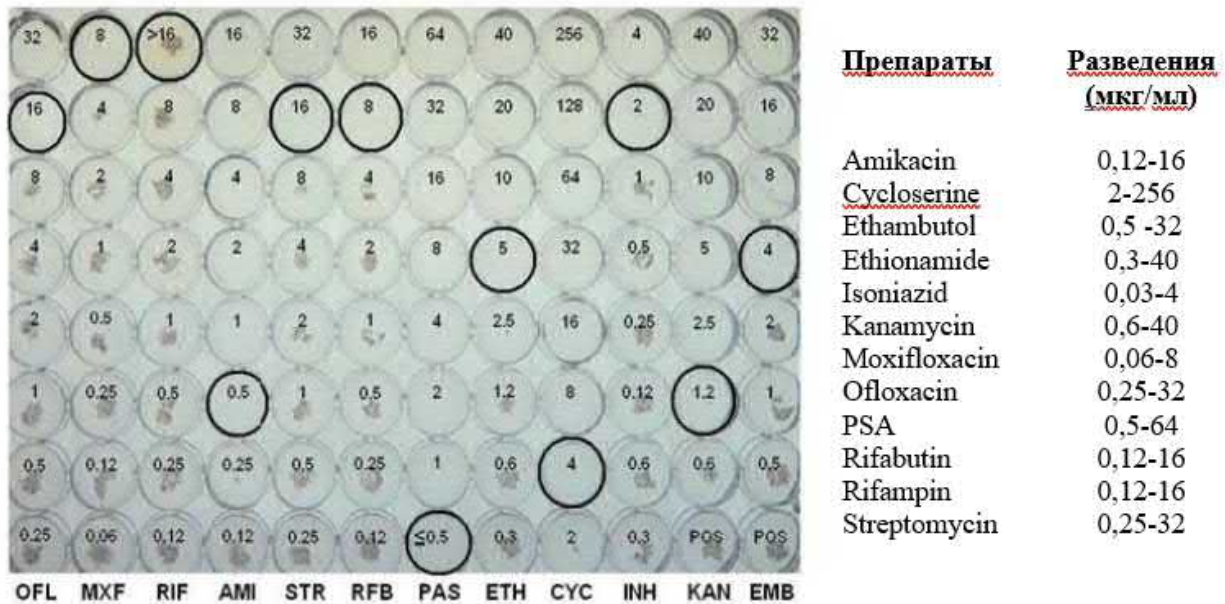


Рисунок 2 – 96-луночный планшет с лиофилизированными препаратами - Sensititre MycoTB (TREK Diagnostic Systems (США, Великобритания))

Была продемонстрирована хорошая надёжность и повторяемость результатов с помощью этой тест-системы в сравнении с методом пропорций на агаре [40; 158; 159; 201] и Bactec MGIT 960 [166; 238] для большинства препаратов. При этом, МусоТВ является более предпочтительной в силу дешевизны и простоты использования.

Таким образом, для определения ЛЧ МБТ к АБП имеется широкий арсенал различных микробиологических методов и технологий. Важнейшими условиями получения сопоставимых и достоверных результатов в рутинной практике является использование унифицированных методов, введение единого протокола исследований, строгая стандартизация технологий, осуществление внутреннего и внешнего контроля качества каждого этапа исследования [32; 34; 35; 191].

1.3. Молекулярно-генетические методы и технологии для определения генетических детерминант устойчивости *M.tuberculosis*

Лекарственная устойчивость МБТ к химиопрепаратам, как сказано выше, в подавляющем большинстве случаев вызвана однонуклеотидными полиморфизмами (точечные мутации), а также вставками или делециями в ДНК МБТ. Этот факт значительно упрощает разработку молекулярных диагностических инструментов, предназначенных для ускоренного выявления

устойчивости возбудителя, сокращая время исследования от нескольких недель до дней или даже часов [80; 294].

Для выявления мутаций, определяющих устойчивость МБТ, было предложено множество методов на основе которых разработано более 30 коммерческих тестов [124; 348].

Молекулярно-генетические методы (МГМ), позволяющие определять мутации, можно разделить на прямые и косвенные. По способу детекции мутаций МГМ можно сгруппировать на четыре категории: электрофоретическая детекция, гибридизационный анализ, технологии амплификации нуклеиновых кислот (АНК) и секвенирование. Секвенирование, гибридизационный анализ, а также некоторые технологии АНК позволяют определить нуклеотидную замену, т.е. определить тип мутации (прямые методы), в то время как электрофоретический анализ косвенно выявляет наличие мутации, не позволяя определить тип нуклеотидной замены (исключение метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов - ПДРФ). Основные характеристики методов представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Основные молекулярно-генетические подходы для выявления мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью *M.tuberculosis*

Способ детекции мутаций	Методы	Принцип детекции	Преимущества/ Недостатки
Электрофоретическая детекция	Конформационный полиморфизм длин одноцепочечных фрагментов (SSCP)	В основе метода лежит изменение электрофоретической подвижности одноцепочечных фрагментов ДНК, одинаковых по величине, но имеющих конформационные различия вследствие появления мутаций.	Недорогой, не требует дорогостоящего оборудования, быстрый и простой в выполнении (подходит для быстрого скрининга мутаций). Подходит только для малых размеров ПЦР-продукта (100-300 п.н), позволяет выявлять до 80-90% мутаций, возможен ложноположительный результат при функционально молчащей мутации, интерпретация результата зависит от нуклеотидной замены и положения кодона в амплифицированном фрагменте.
	Полиморфизм длин рестриционных фрагментов (ПДРФ)	Основан на разрезании рестриктазами (ферментом) анализируемой ДНК, в результате чего образуются фрагменты, величина которых соответствует сайту рестрикции. Появление мутации приводит к потере сайта рестрикции для фермента с образованием слитого фрагмента ДНК и изменению рестриционного профиля, который можно определить с помощью гель-электрофореза.	Недорогой, не требует дорогостоящего оборудования, быстрый и простой в выполнении (подходит для быстрого скрининга мутаций). Возможность точно определять нуклеотидную замену (точечные мутации). Не во всех случаях для однонуклеотидных замен удастся подобрать специфичный для этого локуса фермент (рестриктазу).

Продолжение таблицы 6

Способ детекции мутаций	Методы	Принцип детекции	Преимущества/ Недостатки
	Гетеродуплексный анализ (ГДА)	Основан на различии в электрофоретической подвижности гетеродуплекса (смесь ПЦР-продуктов исследуемого и чувствительного штаммов МБТ. Наличие мутации (даже одной пары) приводит к образованию в двухцепочечном фрагменте не спаренных оснований, что влияет на электрофоретическую подвижность фрагмента.	Недорогой, не требует дорогостоящего оборудования, исследование фрагментов ДНК менее 300 п.н увеличивает вероятность идентификации точечных мутаций до 90% Эффективность разделения гомо- и гетеродуплексов зависит от вариантов гелей.
	Денатурирующий градиент гель электрофорез (DGGE)	Это форма электрофореза, в которой используется химический градиент для денатурации небольших двухцепочечных фрагментов ДНК во время их движения в акриламидном геле. Денатурирующий градиентный гель разделяет ДНК одного размера на основе их денатурирующей способности, которая зависит от их нуклеотидной последовательности.	Подходит для исследования более крупных фрагментов ДНК, что увеличивает выявляемость мутаций практически до 96%. К недостаткам можно отнести техническую сложность, связанную с химическими агентами для получения равномерного денатурирующего градиента в полиакриламидном геле.

Продолжение таблицы 6

Способ детекции мутаций	Методы	Принцип детекции	Преимущества/ Недостатки
Твердофазная гибридизация	Гибридизация на нитроцеллюлозных стрипах (Line probe assay)	Основан на гибридизации меченных ПЦР-продуктов (ампликонов) с типоспецифичными олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на нитроцеллюлозных полосках. Гибридизация затем детектируется колориметрической реакцией.	Прост в исполнении, результаты хорошо коррелируют с секвенированием (расхождение составляет 2 - 4%), легко интерпретировать. Не детектирует вставки и делеции.
	Биочипы	Основан на связывании амплифицированной флюоресцентно меченной исследуемой ДНК с большим набором олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных в виде микропятен в полиакриламидном геле или на стеклянном носителе (олигонуклеотидные матрицы).	Позволяет одновременно определять устойчивость возбудителя к нескольким препаратам в клиническом материале. Возможность определить как точечные мутации, так вставки и делеции. Результаты легко интерпретировать, они хорошо коррелируют с секвенированием. Определяется только тот спектр мутаций, зонды к которому иммобилизованы на биочип.

Продолжение таблицы 6

Способ детекции мутаций	Методы	Принцип детекции	Преимущества/ Недостатки
	Дот-блот гибризация	Исследуемую ДНК фиксируют на нитроцеллюлозных или нейлоновых мембранах и к ней добавляют гибридационный раствор, содержащий специфические меченые зонды. В месте связывания зонда регистрируют флюоресценцию, изменение цвета реакции или автордиографически.	Высококчувствительный и специфичный. Дорогостоящий и трудоёмкий, состоящий из нескольких этапов исследования, критическим из которых является фиксация исследуемой ДНК-мишени на мембране, использование радиоактивной метки (в некоторых модификациях).
Секвенирование	Таргетное секвенирование нового поколения	Установление аминокислотной или нуклеотидной последовательности ДНК («прочтение» последовательности ДНК) в определённых локусах генома возбудителя туберкулёза.	Быстрое и точное определение мутаций в анализируемых локусах, как в диагностическом материале с положительным результатом микроскопии, так и в культурах. Подходит для небольших (до 1000 нуклеотидов) фрагментов ДНК. Дорогостоящее оборудование, отсутствие готовых наборов реагентов, сложность и трудоёмкость методик для рутинной практики в клиничко-диагностических лабораториях.
	Полногеномное секвенирование	Полное определение аминокислотной или нуклеотидной последовательности ДНК возбудителя туберкулёза.	Получение данных о клинически значимых мутациях и новых вариантах полиморфизмов в клинических изолятах и диагностическом материале с положительным результатом микроскопии. Полное совпадение данных с микробиологическим определением ЛЧ. Повышенные требования к методам обработки диагностического материала и выделения ДНК возбудителя, дорогостоящее оборудование, высокая стоимость исследования, отсутствие готовых наборов реагентов, сложность и трудоёмкость методик для рутинной практики в клиничко-диагностических лабораториях.

Продолжение таблицы 6

Способ детекции мутаций	Методы	Принцип детекции	Преимущества/ Недостатки
Гибридизация в процессе амплификации	ПЦР в реальном времени	<p>Основан на количественной флюоресцентно-гибридизационной детекции специфических продуктов амплификации с помощью гибридных зондов, в которых специальные красители (флюорохромы) используют для наблюдения за развитием амплификации. В качестве зондов, используют линейные олигонуклеотиды, меченные по концам флюорохромом и гасителем (TaqMan-зонд) или шпичичные (beacons), концевые последовательности которых спарены и также несут флюорохром и гаситель флюоресценции. При встраивании такого зонда в амплифицированный фрагмент интенсивность флюоресценции растёт. В случае наличия мутации зонд не связывается с матричной ДНК и интенсивность флюоресценции падает.</p>	<p>Высокая чувствительность и специфичность, возможность детекции ПЦР-продуктов в процессе реакции, отсутствие стадии электрофореза, что минимизирует риск контаминации, автоматическая регистрация и интерпретация результатов. Несмотря на возможность использования нескольких зондов (меченые различными флюоресцентными агентами) для создания формата мультиплексной ПЦР, многофакторный анализ мутаций по нескольким генам и их кодонам ограничен.</p>
Аллель-специфичная амплификация с электрофоретической детекцией, в реальном времени или на биочипе	Аллель-специфичная ПЦР	<p>Метод основан на способности Taq-полимеразы с отсутствующей 5'-3' экзонуклеазной активностью с разной эффективностью обрабатывать полностью спаренный и неспаренный нуклеотид на 3' конце праймера.</p>	<p>Метод обладает высокой чувствительностью при генотипировании ДНК и позволяет определять до 95% мутаций.. Метод достаточно капризный при обработке условий амплификации и зависит от выбранных праймеров и концентрации матричной ДНК.</p>

Первым этапом МГМ, предназначенных для определения генетических детерминант устойчивости, является наращивание генетического материала с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Исключением является использование технологий АНК, с помощью которых выявление мутаций осуществляется во время амплификации в режиме реального времени.

Методы электрофоретической детекции мутаций, основаны на регистрации различий в электрофоретической подвижности анализируемого участка ДНК в сравнении с эталонной последовательностью (дикий тип), возникающих вследствие наличия мутаций.

Для того, чтобы обнаружить такие различия, с помощью этих методов анализировали различные структурные варианты фрагментов ДНК (одноцепочечные, гетеродуплексы) и подбирали специальные электрофоретические условия (градиент рН, денатурирующие гели) [144]. Для поиска мутаций, связанных с устойчивостью к R и H чаще всего использовали метод конформационного полиморфизма длин одноцепочечных фрагментов (SSCP) [70; 290; 312], а Takiff HE и соавт., (1994) применили его для анализа мутаций в *gyrA*, ответственных за устойчивость к ФХ [309]. Устойчивость только к R - маркеру множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), изучали с помощью методов гетеродуплексного анализа [13; 334] и денатурирующего градиент геле электрофореза [291]. Эти методы предполагают обязательное секвенирование, исследуемых фрагментов ДНК, для точного определения нуклеотидных замен, оценки фенотипического проявления и определения причастности их к развитию устойчивости возбудителя к анализируемым препаратам, что ограничивает их широкое использование в рутинных исследованиях. В этом плане метод ПДРФ имеет преимущества, так как является не только простым и дешёвым, но и подходит для быстрого скрининга уже известных (описанных) мутаций не требующих секвенирования. Основным его ограничением для практического применения является возможность определять только мутации расположенные в сайтах рестрикции (не всегда для некоторых замен возможно подобрать соответствующие рестриктазы). Suzuki Y и соавт.,

(1998) впервые применили этот метод для определения наиболее часто встречаемых мутаций в гене *rrs*, связанных с устойчивостью к АГ и Ст [307].

Методы гибридизационного анализа обнаружения мутаций представлены гетерогенной группой и в настоящее время их наиболее широко используют в диагностике туберкулёза. Одни из них выполняют с помощью ПЦР в режиме реального времени, включающей специфические ДНК-зонды, другие с применением обычного гибридизационного анализа на твёрдых носителях или реже в растворе [37; 144]. Все они основаны на способности одноцепочечной молекулы изучаемой ДНК специфически соединяться с комплементарными одноцепочечными зондами с образованием гибридных дуплексов, которые флюоресцируют или меняют цвет реакционной смеси [25; 322]. Более того, использование нескольких зондов, комплементарных различным фрагментам ДНК и меченных разными красителями, испускающими флюоресценцию разных длин волн, позволяет анализировать одновременно несколько мутаций в одном или нескольких генах.

На сегодняшний день созданы различные диагностикумы на основе *метода ПЦР в реальном времени* (ПЦР-РВ), однако сочетание таких характеристик, как определение максимального спектра генов (исследуемых локусов), возможность анализа ДНК из диагностического материала и высокие диагностические параметры в одном тесте не всегда удаётся совместить. Так интеграционная микрофлюидная система TaqMan array card позволяет анализировать широкий спектр мишеней (10 генов - *rpoB*, *katG*, *inhA*, *embB*, *rpsL*, *rrs*, *gyrA*, *gyrB*, *pncA*), точно идентифицировать точечные мутации, определять фенотип устойчивости в 70 - 99%, но при этом набор мутаций в каждом гене для анализа ограничен и исследование ДНК проводится только в культуре (т.е. необходимо большое количество бактериальной массы) [137; 262]. Другая зарубежная тест-система Anyplex Plus MTB/NTM MDR-TB позволяет идентифицировать микобактерии (дифференцировать МБТ и НТМБ), определять 15 мутаций в *rpoB* и 6 в *katG/inhA* генах (быстро определять МЛУ штаммы), проводить анализ ДНК в любом респираторном и не респираторном диагностическом материале как с

положительным, так с отрицательным результатом микроскопии. Она обладает высокой чувствительностью (83,3%) и специфичностью (100%) при анализе Н устойчивого фенотипа [286]. При этом анализ мутаций в генах, связанных с устойчивостью к другим ПТП не проводится и данные о чувствительности и специфичности при анализе R устойчивого фенотипа отсутствуют. Другим решением для повышения чувствительности теста при анализе ДНК в диагностическом материале является Российская разработка в виде отдельных тестов «Амплитуб-МЛУ-РВ» и «Амплитуб-FQ-РВ» («СИНТОЛ», Россия), предназначенных для идентификации МЛУ и устойчивых к ФХ штаммов соответственно. С помощью мультиплексной аллель-специфичной ПЦР (АС-ПЦР) в режиме реального времени можно выявить мутации в *rpoB* (11 мутаций), *katG* (3 мутации), *inhA* (3 мутация) и *gyrA* (5 мутаций) и исследовать любой диагностический материал независимо от результатов микроскопии [21]. Однако, с их помощью возможно анализировать только «ключевые» гены-мишени и не все генетические детерминанты устойчивости, что увеличивает расхождение с результатами бактериологического исследования. Данные о чувствительности и специфичности тестов в публикациях отсутствуют [2; 8; 29].

Наибольший интерес вызывает уникальная в своём роде технология GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, США), рекомендованная ВОЗ для практического применения. Это полностью автоматизированная система в формате картриджа, в котором осуществляется выделение ДНК МБТ из клинического материала пациента, мультиплексная ПЦР-РВ с использованием шпичичных (beacons) зондов для детекции ДНК и мутаций в гене *rpoB* (устойчивость к R), автоматическая интерпретация результатов реакции в молекулярном анализаторе «GeneXpert». Полный цикл занимает 2,5 часа [71; 221]. Чувствительность и специфичность теста определения устойчивости к R в среднем составляет 95% 98% соответственно [304]. По этой причине «Xpert MTB/RIF» рекомендуют применять для исследования образцов с отрицательным результатом микроскопии и с внелёточной локализацией процесса [55; 122; 345].

Таким образом, «Хpert MTB/RIF» по сути является полноценной ПЦР лабораторией в одном картридже, для работы с которой не требуется высококвалифицированного персонала и дополнительного ресурсного обеспечения, а характеристики теста позволяют быстро выявлять бактериовыделителей с устойчивостью к R (маркёр МЛУ) - эпидемиологически опасную группу больных.

Среди технологий *гибридизационного анализа на твёрдых носителях* для практического применения широко используют коммерческие тест-системы на основе гибридизации на ДНК-стрипах, разработанные компанией Hain Lifescience (Германия) и олигонуклеотидные биочипы (ООО «БИОЧИП – ИМБ», Россия).

ДНК-стрип технология позволяет определять лекарственную устойчивость к R, H, Emb, Fq, AG (и Cm) и представлена двумя тест-системами - «GenoType MTBDR*plus*» для выявления мутаций в генах *rpoB* (R), *katG* и *inhA* (H) и «GenoType MTBDR*sl*» в генах *gyrA* (ФХ), *rrs* (AG и Cm) и *embB* (Emb), которые рекомендованы ВОЗ для быстрой диагностики МЛУ-туберкулёза [339; 342]. Первая версия «GenoType MTBDR*plus*» и «GenoType MTBDR*sl*», согласно инструкции производителя, предназначалась для анализа образцов диагностического материала с положительным результатом микроскопии и культурах МБТ [234]. Вторая версия этих тестов разработана для проведения исследований образцов диагностического материала как с отрицательными, так с положительными результатами микроскопии и в культурах. Чувствительность и специфичность тестов «GenoType MTBDR*plus*» вер.1 и вер.2 при определении устойчивости к R составляет в среднем 98,1% и 98,9% соответственно, для H чувствительность ниже 84,3%, а специфичность выше 99,5% [183; 207].

«GenoType MTBDR*sl*» вер.1 является единственной одобренной ВОЗ молекулярной тест-системой для выявления устойчивости к препаратам второго ряда [233]. Чувствительность и специфичность при определении устойчивости к ФХ в среднем составляет 85,6% и 98,5% соответственно. Эти показатели для инъекционных препаратов (Km, Am и Cm) составили 76,5% и 99,1% соответственно. При определении устойчивости к Emb была определена более

низкая чувствительность - 38,5 до 69,2% и специфичность 81,0% [168; 315]. Новая версия теста характеризуется расширенным охватом генов и мутаций при определении устойчивости к ФХ и Км с включением генов *gyrB* и *eis* соответственно. В связи с тем, что «GenoType MTBDRsl» ver.2 показала улучшенные показатели чувствительности и специфичности к основным препаратам второго ряда, недавно ВОЗ рекомендовала её для применения в практических исследованиях [79; 308; 349]. Однако, не смотря на преимущества, есть и недостатки, связанные с тем, что тесты позволяют точно определить только наиболее распространённые типы мутаций, тогда как о наличии редко встречающихся можно предположить только по отсутствию гибридизации с зондом дикого типа, перекрывающим анализируемую область, что иногда приводит к ложно-положительным результатам связанными с наличием в ней замен не приводящих к устойчивости [45]. Также есть проблемы с интерпритацией результатов гибридизации (при сравнении интенсивности окрашивания пробы дикого типа с контролем амплификации), при учёте которых можно пропустить, например, наличие мутации L533P в *rpoB* гене, связанной с низкой устойчивостью к R и тем самым исследуемый штамм ошибочно классифицировать как чувствительный [82]. Кроме того, в РФ для рутинных исследований зарегистрирована только первая версия данных тест-систем.

Технологию гибридизации нуклеиновых кислот на биологических микрочипах широко применяют в коммерческих тест-системах для определения генетических детерминант устойчивости к R, H и реже другим препаратам [85; 170; 208]. Отечественные молекулярные биочипы были созданы на технологии, разработанной в Институте молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта, под руководством А.Д. Мирзабекова и отличаются от зарубежных аналогов тем, что содержат трёхмерные гидрогелевый субстрат с иммобилизованными в нём олигонуклеотидными зондами прикрепленными к ровной подложке [20]. По сравнению с зарубежными двумерными биочипами они отличаются существенными преимуществами. Во-первых, зонды иммобилизованные в геле, а не на поверхности стекла, при контакте с молекулами анализируемого образца имеют больше сходства с

процессами, протекающими в растворе, что значительно повышает специфичность их взаимодействия. Кроме того, особенность гидрогелевых элементов состоит в том, что каждая ячейка содержит большое количество зондов, увеличивая вероятность контакта с анализируемыми молекулами образца и отделена от соседних гидрофобной поверхностью, позволяя осуществлять разные реакции - проводить ПЦР, изучать кинетику и термодинамику реакций, образование дуплексов нуклеиновых кислот [19].

На основе этой технологии были разработаны тесты «ТБ-БИОЧИП-1», а затем и «ТБ-БИОЧИП-2», предназначенные для быстрого определения МЛУ-МБТ и устойчивости к ФХ соответственно (за 48 часов), в диагностическом материале (независимо от результатов микроскопии) и культурах. Тест-системы прошли все этапы испытаний в лаборатории молекулярной диагностики МНПЦБТ и были адаптированы для практического применения. С помощью тест-системы «ТБ-БИОЧИП-1» можно выявлять 27 типов мутаций в гене *rpoB* и 21 в трёх генах - *katG* (11 мутаций), *inhA* (5), *ahpC/oxvR* (5), ответственных за устойчивость МБТ к R и H. По данным публикаций чувствительность «ТБ-БИОЧИП-1» при определении устойчивости к R в среднем составляет 88,8 - 96,9%, специфичность 90,3 - 99,4%. При анализе устойчивости к H чувствительность варьирует от 85,7 до 96,9%, специфичность 85,3 - 98,2% [1; 8; 27; 28; 153; 154].

«ТБ-БИОЧИП-2» позволяет обнаруживать 8 типов генетических детерминант устойчивости МБТ к ФХ в 88, 90, 91, 94 кодонах и полиморфную замену S95T в гене *gyrA*. По данным литературы чувствительность и специфичность тест-системы составляет 93,3% и 96,4% соответственно [37].

Тест-системы «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» были внедрены в практическую деятельность и их успешно применяют в Централизованной бактериологической лаборатории МНПЦБТ ДЗМ, а также в микробиологических лабораториях противотуберкулёзных учреждений РФ и странах СНГ [16; 154].

Позднее для одновременного определения генетических детерминант МЛУ и ШЛУ МБТ в диагностическом материале и культурах была разработана и сертифицирована тест-система «ТБ-ТЕСТ». Биочип позволяет идентифицировать

МБТ комплекс, суммарно выявлять 116 генетических детерминант лекарственной устойчивости: 28 мутаций в *rpoB* (устойчивость к R), 11 в *katG*, 5 в *inhA*, 5 в *ahpC/oxuR* (устойчивость к H), 15 замен в *gyrA* и 23 в *gyrB* (устойчивость к ФХ), 4 в *rrs* и 6 в *eis* (устойчивость к Km, Am, Cm), 23 в *embB* (устойчивость к Emb), а также определять генетические семейства *Beijing*, *Beijing B0*, *Haarlem*, *LAM*, *Ural* и принадлежность к Евро-Американской линии.

Чувствительность и специфичность при определении устойчивости к R составила 99,5% и 91,9%, к H - 98,2% и 93,9%, к Emb - 89,9% и 57,0% соответственно в сравнении с результатами определения ЛЧ в системе Bactec MGIT 960. При определении устойчивости к препаратам группы ФХ чувствительность теста составила 90,0%, специфичность - 90,9%, к Km, Am, Cm - 95,7% и 90,2%, а к Km (по гену *eis*) 96,8% и 87,9% соответственно в сравнении с результатами ЛЧ на плотной среде Л-Й [365]. Суммарная диагностическая чувствительность и специфичность определения МЛУ и ШЛУ составила 92%, 94% и 95%, 94% соответственно [154].

Преимуществом отечественных биочипов по сравнению с тестами «GenoType MTBDR*plus*» и «GenoTypeMTBDR*sl*» является, то что с их помощью можно точно определить тип мутаций не только наиболее распространённых, но и редко встречающихся, что во-первых исключает получение ложно-положительных и ложно-отрицательных результатов, во-вторых является важной дополнительной информацией для проведения эпидемиологических исследований в области распространения штаммов с МЛУ и ШЛУ.

Секвенирование

Секвенирование это визуализация полной нуклеотидной последовательности ДНК. Эта технология является «золотым стандартом» в области молекулярно-генетических исследований. Первая концепция секвенирования была предложена Ф. Сенгером в 1977 году и основана на определении нуклеотидной последовательности с последующим электрофоретическим разделением случайно терминированных продуктов удлинения.

Новые технологии секвенирования (next generation sequencing, NGS) позволили усовершенствовать этот метод, увеличив пропускную способность за счёт одновременного «считывания» последовательности миллионов коротких фрагментов ДНК. Это значительно удешевило стоимость метода за счёт возможности определять последовательность одновременно десятков геномов за один запуск прибора. Главной особенностью NGS является возможность многократного прочтения генетического материала необходимого для исследования новых геномов (*de novo*) или ресеквенирования. С их помощью можно осуществлять как таргетное (в определённых локусах гена), так и полногеномное секвенирование [233; 289].

На сегодняшний день для прикладных проектов предлагаются секвенаторы коммерческих компаний Illumina, Thermo Fisher Scientific, Oxford Nanopore Technologies, Pacific Biosciences и другие. Из перспективных разработок можно отметить следующие технологии: ионное полупроводниковое секвенирование Ion Proton и Ion Personal Genome Machine (Thermo Fisher Scientific), на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченых нуклеотидов HiSeq, MiSeq и NextSeq 500 (Illumina), нанопоровое секвенирование MinION, GridION X5, PromethION и SmidgION (Oxford Nanopore Technologies) и другие.

В 2012 году Daum LT и соавт. опубликовал первое исследование на анализаторе Ion Torrent Personal Genome Machine для выявления ЛУ в клинических изолятах МБТ [119]. В 2013 году были опубликованы работы в области эпидемиологических исследований и молекулярного определения ЛЧ с использованием полногеномного секвенирования изолятов МБТ на платформе Illumina (Сан-Диего, Калифорния, США), которые показали совпадение с фенотипическими результатами при идентификации вида 93% (95% ДИ: 90%-96%) и определения ЛЧ 93% (95% ДИ: 91%-95%) [194; 316].

Используя таргетное секвенирование NGS, можно прогнозировать развитие лекарственной устойчивости непосредственно в диагностических образцах (микроскопически положительных). В частности, была разработана Next Gen-RDST секвенирование, предназначенное для исследования генетических

биомаркёров семи препаратов и испытана на образцах мокроты, показавшее высокое совпадение (97%) с фенотипическим определением ЛЧ [112]. Более того, этот подход даёт возможность определять наименьшую (до $\leq 1\%$) долю устойчивого типа аллели в смешанной популяции микобактерий, давая возможность прогнозировать повышенный риск развития устойчивости [229].

Таким образом, секвенирование даёт наиболее полную и точную информацию о наличии мутаций, о гетерогенности исследуемого штамма (наличие устойчивой популяции в культуре), с его помощью определяют новые варианты полиморфизма генов (появление новых мутаций), проводят идентификацию возбудителя. В то же время, для проведения секвенирования необходимо дорогостоящее оборудование и реактивы, что увеличивает стоимость одного исследования, а отсутствие готовых наборов реагентов и унифицированных процедур ограничивает его использование в рутинных исследованиях клинических лабораторий. Поэтому секвенирование следует рассматривать как референс технологию для получения уточнённых данных или коммерческих услуг [322].

1.4. Заключение

Установление молекулярных механизмов формирования ЛУ МБТ к АБП способствовало разработке эффективных молекулярно-генетических методов и тест-систем для быстрого определения лекарственно-устойчивых штаммов возбудителя. Эти методы, несомненно, должны стать обязательным составным компонентом стандартных схем микробиологических исследований (МБИ), которые должны сочетать бактериологические методы, основанные на фенотипических свойствах возбудителя (тинкториальные, культуральные, биохимические и др.) и молекулярно-генетические технологии. Для выбора метода (теста) в рутинных исследованиях необходимо учитывать такие факторы, как скорость получения достоверного результата, надёжность с точки зрения прогноза развития устойчивости возбудителя и доступность, связанная с его централизованным использованием. Настоящая работа посвящена анализу ЛЧ МБТ к АБП с помощью разработанных и современных молекулярно-генетических

технологий, их возможности быстро и максимально точно определять генетические детерминанты устойчивости возбудителя, а также разработке алгоритма ускоренной лабораторной диагностики с использованием наиболее эффективных современных бактериологических методов и молекулярно-генетических тест-систем в рамках централизованной бактериологической лаборатории.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. Возможности применения различных молекулярно-генетических методов в диагностике лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам

За последние десятилетия молекулярно-генетические методы наряду с современными автоматизированными микробиологическими системами стали широко использоваться в мировой практике микробактериологических лабораторий противотуберкулёзных учреждений [12; 36; 247]. Распространение штаммов МБТ с МЛУ способствовали появлению новых молекулярных тест-систем для быстрого и специфического их выявления непосредственно в диагностическом материале больных. Однако в связи с тем, что химиотерапия больных туберкулёзом с МЛУ предусматривает переход на режим лечения с использованием препаратов резервного ряда, возникла необходимость разработки молекулярно-генетических тестов для быстрого определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) к ФХ и АГ, основным препаратам этого ряда.

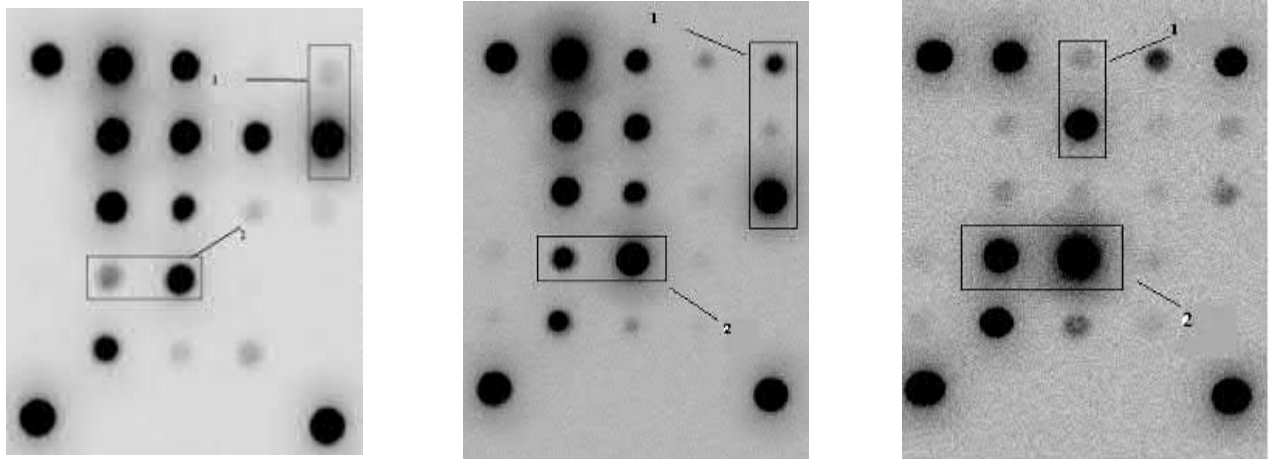
Изучению возможности определения ЛУ МБТ к основным препаратам резервного ряда с помощью различных молекулярно-генетических методов посвящён данный раздел работы.

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

Устойчивость МБТ к ФХ до 90% случаев обусловлена мутациями, сосредоточенными в узкой области гене *gyrA* (320 п.н.) [149; 309]. Среди молекулярных методов, позволяющих определять тип мутаций в ДНК МБТ технология гибридизационного анализа на биочипе является хорошей альтернативой по сравнению с технически сложным и более дорогим методом - секвенированием. На основе этой технологии разработана тест-система «ТБ-БИОЧИП-2» (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия) и сертифицирована для использования в диагностике туберкулёза для быстрого выявления устойчивых МБТ к ФХ в диагностическом материале и культурах. Тест-система основана на мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на биочипе для

идентификации 8 вариантов генетических детерминант устойчивости в 88, 90, 91 и 94 кодах и полиморфной замены S95T гена *gyrA* МБТ, присутствующей как в ДНК чувствительных, так и устойчивых изолятов.

На рисунке 3 представлена гибридизационная картина на биологическом микрочипе «ТБ-БИОЧИП-2» с мутациями в 90 и 94 кодонах гена *gyrA* в ДНК МБТ, выделенной из диагностического материала.



А. 1 - D94H; 2 - S95T

Б. 1 - D94A; 2 - S95T

В. 1 - A90V; 2 - S95T

Рисунок 3 – Варианты гибридизационной картины на биочипе с мутациями в гене *gyrA* *M.tuberculosis*

Примечание: А - мутация D94H (1) полиморфная замена S95T (2); Б - мутация D94A (1) полиморфная замена S95T (2); В - мутация A90V (1) полиморфная замена S95T (2)

Для определения диагностических характеристик тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2» и возможности её использования в лабораторной диагностике туберкулёза была проведена оценка эффективности биочипа по выявлению ДНК МБТ и генетических детерминант устойчивости к ФХ в гене *gyrA* в клиническом материале (мокрота) и культурах.

Критерием отбора исследуемого материала были выделенные культуры МБТ в Bactec MGIT 960 устойчивые к H или R (монорезистентные) и с МЛУ, а также наличие в них генетических детерминант устойчивости к данным препаратам с помощью «ТБ-БИОЧИП-1». Полученные результаты сравнивали с микробиологическим определением ЛЧ к Ofx на плотной среде Л-Й.

Всего нами было исследовано 419 проб ДНК МБТ, выделенных из 269 образцов мокроты и 150 культур МБТ, в том числе 104 образца мокроты и

выделенных из них 104 культуры. Материал получен от 315 больных туберкулёзом, из которых 108 были впервые выявленные, 25 с подозрением на рецидив и 182 пациентов из «контингентов».

В микробиологических лабораториях фтизиатрического профиля бактериовыделение у пациентов оценивают по результатам люминесцентной микроскопии респираторного материала, в частности мокроты. При этом микроскопически можно только констатировать выявление кислотоустойчивых микобактерий (КУМ), к которым относятся и нетуберкулёзные микобактерии (возбудители микобактериозов) и не возможно специфически идентифицировать МБТ. В связи с этим важно было оценить эффективность выявления ДНК МБТ в этом диагностическом материале с помощью «ТБ-БИОЧИП-2».

Результаты исследования проб мокроты показали недостаточную эффективность метода люминесцентной микроскопии, с помощью которой было обнаружено 207 (76,9%) кислотоустойчивых микобактерий (КУМ) в исследуемых образцах. С помощью «ТБ-БИОЧИП-2» в исследуемой выборке мокроты идентифицировано в 100% случаев принадлежность КУМ к туберкулёзному комплексу (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты исследования проб мокроты с помощью «ТБ-БИОЧИП-2»

Результаты ТБ-БИОЧИП- 2	Количество образцов (n,%)					
	ЛЮМ+		ЛЮМ-		Всего	
	абс.	%(95% ДИ %-%)	абс.	%(95% ДИ %-%)	абс.	%(95% ДИ %-%)
ДНК МБТ+	207	76,9 (71,6-81,6)	62	23,0 (18,4-28,4)	269	100 (98,6-100)

Таким образом, достоверно ($p < 0,05$) установлено, что чувствительность тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2» выше при выявлении возбудителя туберкулёза в мокроте по сравнению с люминесцентной микроскопией и подтверждена результатами роста МБТ (в Bactec MGIT 960) во всех исследуемых образцах мокроты.

Результаты определения ЛЧ МБТ к ПТП, получаемые МГМ, в диагностическом материале и культурах могут расходиться, так как не учитывают

более широкие изменения в физиологии устойчивых бактерий, влияющие на результаты фенотипического определения ЛЧ или связаны с разрешающей способностью конкретного микробиологического метода [317].

В этой связи нами было проведено исследование по сопоставлению результатов молекулярного выявления Ofx устойчивых МБТ в мокроте и выделенных из неё культур МБТ с данными ЛЧ к Ofx на среде Л-Й. Результаты исследования 104 клинических образцов (мокрота) и выделенных из них культур МБТ представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты исследования клинических изолятов и диагностического материала с помощью «ТБ-БИОЧИП-2»

ТБ-БИОЧИП-2 мутации в <i>gyrA</i>	Лекарственная чувствительность <i>M. tuberculosis</i> к офлоксацину на среде Л-Й (n=104)			
	клинические изоляты МБТ		диагностический материал (мокрота)	
	чувствительные	устойчивые	чувствительные	устойчивые
S95T	70 (95,9%)	4 (12,9%)	70 (95,9%)	5 (16,1%)
wt	1 (1,4%)		1 (1,4%)	
D94G*		11 (35,5%)		11 (35,5%)
A90V*	2 (2,7%)	10 (32,3%)	2 (2,7%)	9 (29,0%)
D94N*		4 (12,9%)		4 (12,9%)
D94A*		1 (3,2%)		1 (3,2%)
D94G, A90V*		1 (3,2%)		1 (3,2%)
Всего:	73 (100%)	31 (100%)	73 (100%)	31 (100%)

Примечание: * - выявлен полиморфизм S95T

Результаты исследования показали, что среди 31 изолята МБТ с устойчивостью к Ofx, в мокроте обнаружены мутации в 26 (83,9%), а в культурах, выделенных из этих образцов в 27 (87,1%). Расхождения связаны с наличием в одной (3,2%) культуре замены A90V и её отсутствием в мокроте (выявлена полиморфная замена S95T). Возможной причиной несоответствия результатов исследования мокроты и изолятов может быть гетерогенность диагностического материала, в котором количество мутантной субпопуляции МБТ не позволило её определить с помощью биочипа [59; 220].

Ещё в 4/31 (12,9%) образцах и соответствующих устойчивых культурах мутации не выявлены с помощью чипа, а определена полиморфная замена S95T. Это может быть связано с возникновением новых мутаций в этом гене, не

включённых в биочип или замен в гене *gyrB*, также связанных с устойчивостью к препаратам и не анализируемых данной тест-системой. А также возможно с тем, что установленная КК Ofx на среде Л-Й является низкой для оценки ЛУ МБТ [24; 123; 193; 218].

В то же время из 73 фенотипически чувствительных к Ofx МБТ в 2 (2,7%) образцах мокроты и изолятах, выделенных из этих же образцов, обнаружена замена A90V.

Подобное несоответствие может быть связано с рядом причин: 1) с ограничениями культурального метода – учёт результатов определения устойчивости проводится визуально, начиная от 20 видимых колоний МБТ на среде [26]; 2) в образце и культуре присутствует смесь устойчивых и чувствительных микобактерий, из которых устойчивые определяются генетически, но не культурально в связи со сниженной скоростью роста в присутствии перапарата [111]. Совпадение результатов с бактериологическим определением ЛЧ МБТ к Ofx на плотной среде Л-Й в мокроте и культурах составило 93,3% (95% ДИ 86,7-96,7) и 94,2% (95% ДИ 88,0-97,3) соответственно.

Ввиду дискордантности результатов распределение мутаций несколько отличалось в мокроте и культурах. Замены D94G и A90V преобладали и в тех и других видах исследуемого материала, но при этом в культурах A90V обнаружена в 12/104 (11,5%), а в мокроте в 11/104 (10,6%) пробах ДНК. Замена D94G обнаружена в одинаковом количестве изолятов и мокрот – 11/104 (10,6%). Распределение остальных мутаций составило D94N в 4/104 (3,8%), D94A в 1/104 (1,0%) и двойная в D94G, A90V в другом – 1/104 (1%).

Выявление однотипных мутаций, как в клинических образцах, так и культурах свидетельствует о достоверности полученных результатов. 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), а для образцов мокроты 83,9% (95% ДИ 67,4-92,9) и 97,3% (95% ДИ 90,5-99,2) соответственно.

В отечественной фтизиатрической практике для определения ЛЧ МБТ рекомендуют использовать две концентрации препаратов, в частности, для Ofx

КК = 2 мкг/мл и высокую 10 мкг/мл, позволяющие дифференцировать уровень лекарственной устойчивости возбудителя для выбора дозировки препаратов и режима их использования в терапии [26]. Известно, что различные типы мутаций могут влиять на уровень устойчивости МБТ к ФХ [185]. Нами проанализировано 315 проб ДНК МБТ, выделенных из 269 образцов мокроты и 46 клинических изолятов, на наличие мутаций, связанных с разным уровнем устойчивости. Результаты исследования приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Распределение мутаций в гене *gyrA*, обнаруженных в клинических образцах и изолятах с различной чувствительностью к офлоксацину

ТБ-БИОЧИП-2 <i>gyrA</i>	Лекарственная чувствительность <i>M. tuberculosis</i> с различной чувствительностью к офлоксацину на среде Л-Й (n=315)			Всего проб ДНК МБТ
	< 2,0	КК = 2,0	КК = 10,0	
wt	4 (2%)			4 (1,3%)
S95T	191 (97%)	16 (19,5%)	1 (2,8%)	208 (66%)
D94G*		29 (35,4%)	21 (58,3%)	50 (15,9%)
A90V*	2 (1%)	22 (26,8%)	2 (5,6%)	26 (8,3%)
D94N*		4 (5%)	4 (11%)	8 (2,5%)
D94A*		6 (7,3%)	2 (5,6%)	8 (2,5%)
S91P*		2 (2,4%)	1 (2,8%)	3 (1%)
D94H*			3 (8,3%)	3 (1%)
D94Y*		1 (1,2%)	1 (2,8%)	2 (0,6%)
D94A, D94H*		1 (1,2%)		1 (0,3%)
D94G, A90V*			1 (2,8%)	1 (0,3%)
D94A, A90V*		1 (1,2%)		1 (0,3%)
Всего	197 (100%)	82 (100%)	36 (100%)	315(100%)

Примечание: * - выявлен полиморфизм S95T

По данным бактериологического определения ЛЧ МБТ к Ofx 197/315 (62,5%) изолятов обладали чувствительностью и 118/315 (37,5%) устойчивостью к препарату. Среди 197 чувствительных к Ofx МБТ наибольшее количество 191/197 (97%) содержали полиморфную замену S95T, 4/197 (2%) не имели замен в гене *gyrA* и в двух (1%) изолятах (и мокротах) выявлена мутация A90V, описанная выше. Среди 118 устойчивых в 17 (14,4%) изолятах была выявлена только S95T, не приводящая к резистентности МБТ к препарату, что требует дальнейших исследований.

Полученные результаты демонстрируют связь уровня устойчивости МБТ к Ofx с определёнными типами мутаций. Мутации A90V, S91P и D94A в наибольшем количестве 22/24 (91,7%), 2/3 (66,7%) и 6/8 (75%) соответственно были выявлены в изолятах при исследовании в КК – 2,0 мкг/мл, т.е. приводили к низкому уровню устойчивости. Штаммы с мутациями D94/G,N,Y распределились между КК 2,0 мкг/мл и 10,0 мкг/мл в равном соотношении, что говорит о высокой вероятности их связи с умеренным и высоким уровнем устойчивости к Ofx. Замена D94H, обнаруженная в 3/118 (2,5%) изолятах при КК 10,0 мкг/мл связана с высокой степенью устойчивости возбудителя к Ofx. Также в 3/118 (2,5%) случаях были выявлены двойные мутации. Изолят с D94G/A90V выделен при КК=10,0 мкг/мл, то есть проявлял высокий уровень устойчивости и два штамма с D94A/A90V и D94A/D94H, рост которых зафиксирован при 2,0 мкг/мл, обладали низким уровнем. Наличие двойной замены D94A/D94H может свидетельствовать о смешанной популяции в образце, поскольку две мутации не могут присутствовать в одном и том же кодоне [298].

В данной выборке исследуемых образцов и изолятов МБТ наиболее часто встречаемыми из мутаций были D94G и A90V, выявленные в 50 (15,9%) и 26 (8,3%) случаев, далее D94N и D94A по 8 (2,5%), S91P и D94H по 3 (1%) образца, а остальные в количестве меньше одного процента.

Таким образом, установлено, что тест-система «ТБ-БИОЧИП-2» позволяет эффективно выявлять ДНК МБТ в диагностическом материале, обладает достаточной чувствительностью и специфичностью в определении генетических детерминант устойчивости как в клиническом материале (83,9% и 97,3% соответственно), так и в изолятах (87,1% и 97,3%). 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. К недостаткам - возможность анализировать только включённые в тест-систему варианты мутаций в исследуемых кодонах.

Полученные расхождения с фенотипическим определением ЛУ к ФХ демонстрируют необходимость дальнейшего исследования гена *gyrA* на наличие новых мутаций и определения роли гена *gyrB*, замены в котором, по данным литературы, могут приводить к развитию устойчивости к препаратам группы ФХ.

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

Большинство мутаций, приводящих к устойчивости ко всей группе ФХ, сосредоточено в гене *gyrA* и определяется в 45-85% резистентных изолятов. Приблизительно в 7,0% штаммов устойчивость МБТ к ФХ связывают с мутациями, находящимися в гене *gyrB* [329]. Среди молекулярно-генетических методов, позволяющих быстро выявлять мутации в определённых фрагментах ДНК, нами был выбран метод ПЦР-SSCP для исследования генов *gyrA* и *gyrB*, так как он подходит для анализа небольших размеров анализируемого ПЦР-продукта, обладает достаточной чувствительностью (до 90% обнаружения мутаций), обеспечивает прямую диагностику не только известных мутаций, но и выявление новых в анализируемой области гена. Метод не сложен в исполнении и не требует дорогостоящего оборудования, что делает его перспективным для рутинных клинических исследований. Метод основан на регистрации электрофоретических различий в подвижности одинаковых по размеру одноцепочечных фрагментов ДНК, но имеющие конформационные различия вследствие появления мутаций.

Отличие предлагаемого нами способа исследования гена *gyrA* состоит в следующем. Ранее метод применяли для исследования ДНК МБТ, выделенной из культур возбудителя. Разработанная модификация ПЦР-SSCP («А-SSCP») позволила проводить исследование ДНК, экстрагированной из культур МБТ, выделенных в жидкой М7Н9 или на плотной среде Л-Й, и из диагностического материала (мокрота). Также изменён способ детекции конформационного полиморфизма одноцепочечных амплифицированных фрагментов ДНК без применения изотопов и радиометрического анализа, что является безопасным в отличие от их использования другими авторами [290; 309].

Конструирование праймеров для амплификации участка гена *gyrA* ДНК МБТ проводили с помощью программы OLIGO ver.6.31. (2000, Molecular Biology Insights, Inc), при этом учитывали отсутствие образования вторичных структур (петель, димеров), степени гомологии праймеров с последовательностью гена-мишени, близость температуры отжига прямого и обратного праймеров. Специфичность праймеров (анализ нуклеотидных последовательностей на отсутствие комплементарных участков в исследуемой ДНК с другими видами микроорганизмов и человека) анализировали, используя базу данных GenBank с помощью программы BLAST WWW-сервиса в NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

В результате были выбраны следующие праймеры:

1-ый 5' СТА TGC AAT GTT CGA TTC CGG CTT С 3' – 25 bp,

2-ой 5' АСТ GTC TCC TCG TCG ATT TCC СТ 3' – 23 bp.

Ожидаемый размер ампликонов после ПЦР составил 282 п.н.

Далее нами для проведения ПЦР исследуемой последовательности ДНК гена *gyrA* был оптимизирован состав реакционного буфера, в котором важными составляющими являются тип буфера, концентрация трифосфатов, концентрация ионов магния, для обеспечения эффективности и специфичности амплификации. В 30 мкл среды содержалось 10 мМ трис-НСl (Sigma, США) рН 8,8; 50 мМ КСl (Panreac, Испания); 0,5% Твин 20 (AppliChem, Германия); 5% - формамид (AppliChem, Германия), 2,5 мМ MgCl₂ (НПК «СИНТОЛ», Россия); dNTP по 200 мкМ (НПК «СИНТОЛ», Россия); по 200 мкМ каждого олигонуклеотидного праймера; ДНК-полимераза (BIOTAQ ДНК-полимераза, Meridian Life Science Inc, США) 3U и 3 мкл образца. Оптимизированы условия режима амплификации за счёт выбора температуры для наиболее эффективного отжига праймеров, времени каждого цикла и количества циклов, что позволило выявлять ДНК МБТ и определять мутации, выделенной из мокроты. В результате режим амплификации представлял собой следующее: 1-ый этап - 95°- 4 мин; 2-ой этап – 95° - 30 сек., 65° - 40 сек., 72° - 40 сек (40 циклов); 3-ий этап: 72° - 4 мин; 10° - хранение. ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

После проведения ПЦР, полученные ампликоны раскапывали в лунки 2 % агарозного геля (AppliChem, Германия), содержащего этидиум бромид (Sigma, США), и проводили электрофорез в камере (Biometra, Германия) при 10 В/см в течение 10 минут в 1-кратном TBE буфере (0,089М трис-бората (Sigma, США); 0,089М борной кислоты (Panreac, Испания); 2мМ EDTA (AppliChem, Германия), рН 8,0). Регистрацию продуктов амплификации в виде светящихся полосок осуществляли в свете ультрафиолетовой лампы трансиллюминатора (VILBER LOURMAT, Франция). При наличии ДНК МБТ в биологической пробе наблюдалось свечение в соответствующих дорожках, указывающее на присутствие ДНК возбудителя размером 282 п.н и расположенное на одном уровне со светящейся полоской в дорожке контрольного типового штамма H37Rv. В месте с тем, свечение в полоске отрицательного контроля должно отсутствовать.

Оценку аналитической специфичности разработанной ПЦР проводили экспериментально с использованием коллекции типовых штаммов: стандартного лабораторного референс-штамма *M.tuberculosis* H37Rv, нетуберкулёзных микобактерий и неспецифических микроорганизмов, представленных в таблице 1. Результаты оценки аналитической специфичности представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Проверка аналитической специфичности праймеров

Микроорганизмы	Обнаружение ДНК
<i>M.tuberculosis</i> H37Rv	+
<i>M.avium</i>	–
<i>M.intracellulare</i>	–
<i>M.scrofulaceum</i>	–
<i>P.aeruginosa</i>	–
<i>S.aureus</i>	–
<i>E.coli</i>	–
<i>S.pneumoniae</i>	–
<i>S.intermedius</i>	–
<i>K.pneumoniae</i>	–

В результате проведённой оценки специфичности ПЦР перекрёстных реакций с ДНК других видов микроорганизмов не было установлено. Таким образом, разработанная ПЦР на образцах ДНК типовых штаммов обладает 100% аналитической специфичностью.

Для более эффективного электрофоретического разделения одноцепочечных фрагментов ДНК нами были отработаны условия денатурации полученных ампликонов: соотношение ампликонов и денатурирующего раствора, время денатурации, состав полиакриламидного геля (процентное содержание полиакриламида, глицерина и состав буфера), условия разделения (напряжение, время электрофореза, температура). В результате условия были следующие: для денатурации ампликонов (получение одноцепочечных фрагментов ДНК) смешивали 4 мкл образца с 6 мкл денатурирующего раствора (95% формамид (AppliChem, Германия), 20мМ ЭДТА (AppliChem, Германия), 0,05% бромфеноловый синий (AppliChem, Германия), 0,05% ксиленцианол (Диа-М, Россия)) и проводили денатурацию при 95° - 10 мин. Разделение денатурированных ампликонов проводили в 8% полиакриламидном геле (акриламид+бисакриламид (AppliChem, Германия), 25% APS (Thermo FS, США), ТЕМЕД (AppliChem, Германия), ТВЕ буфер) с 5% глицерином (Panreac, Испания), при напряжении 400 вольт в течение 5 часов при температуре 8° С в 2x-ТВЕ буфере в камере для вертикального электрофореза (Owl-P10DS, США). В качестве контроля использовали амплифицированную ДНК типового штамма H37Rv. Регистрацию результатов электрофореза проводили после окрашивания геля с помощью азотнокислого серебра (Acros Organics, Бельгия). Вначале гель готовили для окрашивания. Для этого проводили фиксацию одноцепочечных фрагментов ДНК в тех участках геля, где они расположились после электрофореза. С этой целью гель переносили в стеклянную ванночку для инкубации, содержащий 100 мл 10% этанола (40 мл 96% этилового спирта и 344 мл дистиллированная вода) на 5 мин. Затем спирт удаляли и в ванночку с гелем заливали 1% азотную кислоту (Panreac, Испания) на 3 мин. После этого кислоту сливали, а гель дважды споласкивали дистиллированной водой в течение 3 сек. Затем приступали к

окрашиванию геля холодным (8°C) раствором 0,012М нитрата серебра (Boehringer Mannheim, Германия). Процесс окрашивания проводился в течении 20 мин при постоянном помешивании ванночки на шейкере (Elmi, Латвия). После этого дважды промывали дистиллированной водой. Для проявления окрашенных полос денатурированной ДНК использовали раствор 0,28М карбоната натрия (Helicon, Россия) и 0,019% формалина (Panreac, Испания). Останавливали проявление 10% уксусной кислотой (Panreac, Испания).

Интерпретацию результатов конформационных различий в ДНК МБТ осуществляли, сравнивая расстояния между цепочками ДНК в контроле и исследуемых образцах при видимом свете без специального оборудования. Клинические изоляты и/или образцы мокроты, в которых выявляли отличия на электрофореграмме в *gyrA* МБТ секвенировали для определения нуклеотидной замены. На рисунке 4 представлен пример электрофореграммы выявления конформационных различий в ДНК, связанных с мутациями в гене *gyrA*.

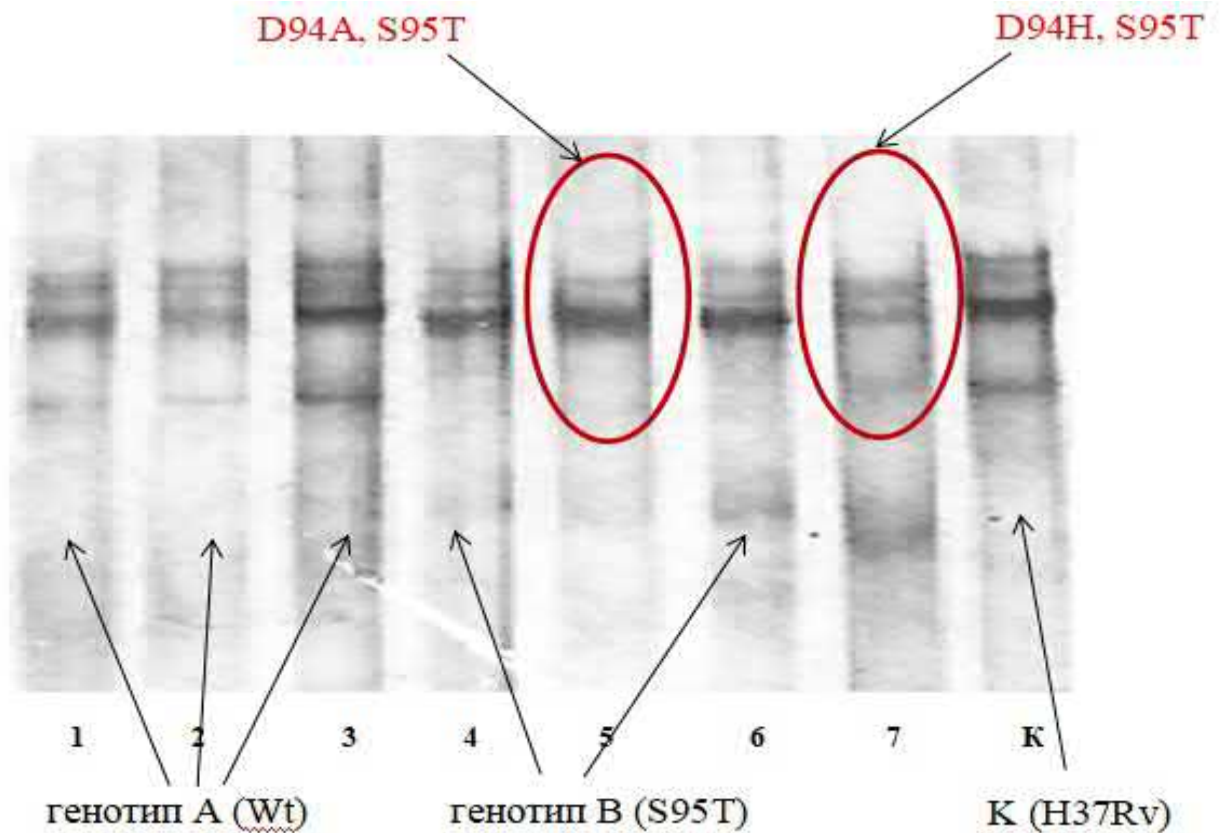


Рисунок 4 - Электрофореграмма анализируемой области гена *gyrA* *M.tuberculosis*

Примечание: 1-3 дикий тип (генотип А), 4,6 - полиморфная замена S95Т (генотип В), 5 - замена D94А, S95Т, 7 – замена D94Н, S95Т, К - H37Rv (1,2,4 - 7 – респираторные образцы, 3 – культура с плотной среды)

Так как метод позволяет устанавливать только конформационные отличия, связанные с возникновением мутаций, определение типа замены проводили с помощью секвенирования. Это позволило установить электрофоретическую картину чувствительных генотипов «А» (wt - дикий тип) и «В» (S95T - полиморфную замену), отличие от которых расценивали как наличие мутации в анализируемом участке ДНК.

Таким образом, разработана методика быстрой (в течении 2 дней) молекулярно-генетической диагностики на основе метода ПЦР-SSCP «косвенного» определения генетических детерминант устойчивости МБТ к ФХ в гене *gurA* в диагностическом материале (мокрота) и культурах возбудителя.

На разработанный способ диагностики получен патент на изобретение РФ № 2343197 от 10.01.2009 г.

Апробацию разработанной методики проводили на диагностическом материале (мокрота) и культурах микобактерий туберкулёза.

Всего было исследовано 68 образцов мокроты от 47 пациентов, из которых 25 впервые выявленных и 22 ранее получавших лечение, а также 90 культур МБТ, выделенных в жидкой М7Н9 в системе Bactec MGIT 960 или плотной питательной среде Л-Й, из которых 39 получены из диагностического материала впервые выявленных больных и 51 культура от пациентов, ранее получавших лечение. Критерием отбора исследуемого материала были результаты ЛЧ МБТ к H и R, полученные в Bactec MGIT 960 и к Ofx на среде Л-Й, а также данные о наличии, либо отсутствии генетических детерминант устойчивости к H и R, выявленные с помощью «ТБ-БИОЧИП-1».

Профиль лекарственной чувствительности МБТ, выделенной из диагностического материала 25 впервые выявленных больных туберкулёзом был следующим: у 17 (68,0%) МБТ были чувствительными к H и R, 5 (20,0%) - устойчивые только к H и у 3 (12,0%) МБТ с МЛУ. Срезы 22 пациентов, ранее получавших лечение, у 19 (86,4%) МБТ обладали МЛУ, из которых у 3 (15,8%) были устойчивыми к ФХ (Ofx) и у 3 (13,6%) определена монорезистентность к H.

Из 68 образцов мокроты с помощью «А-SSCP» интерпретируемый результат на электрофореграмме удалось получить только в 58 (85,3%; 95% ДИ 75-91,8) случаях. Это связано с тем, что в образцах мокроты содержится разное количество микобактерий, что влияет на получение чёткого сигнала на электрофореграмме. Результаты исследования 58 образцов диагностического материала (мокроты) с помощью «А-SSCP» и последующего секвенирования представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Анализ определения генотипов *M.tuberculosis* в гене *gyrA* с помощью «А-SSCP» и секвенирования

Результаты исследования диагностического материала мокроты (n=58)					
«А-SSCP»	абс.	%	секвенирование	абс.	%
А	7	12,1	wt	6	10,3
В	44	75,8	S95T	45	77,6
Сомнительный результат*	3	5,2	S95T	1	1,7
			wt	2	3,5
Мутация ¹	4	6,9	A90V**	1	6,9
			D94A**	1	
			D94G**	2	

Примечание: «А» генотип – дикий тип wt, «В» генотип – «полиморфная замена, не приводящая к устойчивости» S95T (названия генотипов даны согласно названиям в работе Takiff Н Е и соавт. (1994)), ¹ – мутация в *gyrA*, * – «А» или «В», ** - выявлен полиморфизм S95T

Из данных, представленных в таблице 11, видно, что из 58 образцов в 3 (5,2%) с помощью «А-SSCP» был получен сомнительный результат, то есть сигнал на фореграмме не давал чёткого различия между МБТ дикого типа и с заменой в 95 кодоне S на T. Это связано, по-видимому, с присутствием в образце обеих популяций микобактерий. По данным секвенирования участка гена *gyrA* в двух случаях определен wt, в одном – полиморфная замена S95T. В 4 (6,9%) образцах определено отличие от генотипов «А» и «В» (мутация), с помощью секвенирования в двух определена замена D94G, в одном D94A и другом A90V. Совпадение результатов по определению генотипов методов «А-SSCP» и секвенирования составило 98,2%. Результаты бактериологического определения ЛЧ возбудителя туберкулёза к Ofx на среде Л-Й показали, что в 4/58 (6,9%) образцах с выявленными мутациями МБТ были устойчивыми и 54/58 (93,1%)

чувствительными. Аналитическая чувствительность «А-SSCP» составила 100% (95% ДИ 51,0-100), специфичность 100 % (95% ДИ 93,6-100).

Таким образом, разработанная методика с использованием модификации метода ПЦР-SSCP («А-SSCP») показало свою эффективность при исследовании образцов диагностического материала (мокрота) пациентов. Однако, как сказано выше не всегда удаётся получить достоверный результат из-за недостаточного количества ДНК в материале. В этих случаях, чтобы ускорить диагностику ЛЧ МБТ к ФХ целесообразно использовать ДНК, выделенную из культур.

С этой целью была проведена апробация методики на образцах ДНК МБТ, экстрагированной из культур с жидкой или плотной среды.

Таблица 12 – Анализ определения генотипов *M.tuberculosis* в гене *gyrA* с помощью «А-SSCP» и секвенирования

Результаты исследования культур МБТ (n=90)					
«А-SSCP»	абс.	%	секвенирование	абс.	%
А	26	28,9	wt	26	28,9
В	60	66,7	S95Т	60	66,7
Мутация ¹	4	4,4	D94Н*	2	2,2
			A90V*	1	1,1
			D94А*	1	1,1

Примечание: «А» генотип – дикий тип wt, «В» генотип – «полиморфная замена, не приводящая к устойчивости» S95Т (названия генотипов даны согласно названиям в работе Takiff H E и соавт. (1994)), ¹ – мутация в *gyrA*, * – выявлен полиморфизм S95Т

Как видно из данных, представленных в таблице 12, в 60/90 (66,7%) выявлена полиморфная замена S95Т и 26/90 (28,9%) wt. В 4 (4,4%) культурах определены отличия от генотипов «А» и «В», в которых по данным секвенирования выявлены мутации в *gyrA* (в 2 - D94Н, S95Т, в 1 - A90V, S95Т и в 1 - D94А, S95Т). Совпадение этих результатов по определению генотипов в культурах МБТ составило 100%. Микробиологические результаты по определению ЛЧ МБТ к Ofx показали, что в 4 культурах определена устойчивость к препарату и в 86 чувствительность.

Из этого следует, что использование изолятов МБТ для исследования позволяет получать информативные результаты на электрофореграмме, что

является важным в ситуациях, когда недостаточное количество микобактерий в диагностическом материале (олигобацилярные пациенты) приводит к «сомнительным» результатам исследования.

Таким образом, установлено, что разработанная «А-SSCP» обладает 85,3% чувствительностью при детекции ДНК МБТ в мокроте и 100% в культуре, 100% чувствительностью при выявлении мутаций в ДНК МБТ, выделенной как из мокроты, так и культур. Методика 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.

Для повышения чувствительности модифицированного метода ПЦР-SSCP («М-SSCP») при анализе гена *gyrB* на наличие мутаций в диагностическом материале разработали методику двухстадийной ПЦР (Nested ПЦР) с «внешними» и «внутренними» праймерами.

Конструирование праймеров и оценку их специфичности, оптимизацию состава реакционного буфера, отработку программы амплификации проводили как описано выше для выявления мутаций в гене *gyrA*.

«Внешние» и «внутренние» праймеры были следующие:

«внешние»

1-ый – 5' AGA GTT GGT GCG GCG TAA GA 3' – 20 bp,

2-ой – 5' AAC ACA TGC CCG TTC TCG AT 3' – 20 bp.

«внутренние»

1-ый – 5' TAA GAG CGC CAC CGA CAT CG 3' – 20 bp,

2-ой – 5' GCG TGA ACC GGA ACA ACA AC 3' – 20 bp.

Ожидаемый размер ампликонов после второй стадии ПЦР составил 371 п.н.

Для предотвращения контаминации продуктами амплификации в первую реакционную смесь добавляли урацил-ДНК-гликозилазу.

Далее нами для проведения Nested ПЦР исследуемой последовательности ДНК гена *gyrB* был оптимизирован состав реакционных буферов для обеспечения эффективности и специфичности амплификации.

В 30 реакционной среды для ПЦР-1 с «внешними» праймерами содержалось 67 мМ трис-НСl (Sigma, США) рН 8,6; 2,5 мМ MgCl₂ (НПК «СИНТОЛ», Россия); 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄ (Panreac, Испания); dNTP по 200 мкМ (НПК «СИНТОЛ», Россия); праймеры по 5 мкМ; ДНК-полимераза (BIOTAQ ДНК-полимераза, Meridian Life Science Inc, США) 1,5U; UDG (Урацил-ДНК-гликозилаза, НПО «СибЭнзим», Россия) 0,15U и 3 мкл образца ДНК МБТ.

В 30 мкл реакционной среды для ПЦР-2 с «внутренними» праймерами содержалось 67 мМ трис-НСl (Sigma, США) рН 8,6; 2,5 мМ MgCl₂ (НПК «СИНТОЛ», Россия); 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄ (Panreac, Испания); dNTP по 200 мкМ (НПК «СИНТОЛ», Россия); праймеры по 5 мкМ; ДНК-полимераза (BIOTAQ ДНК-полимераза, Meridian Life Science Inc, США) 1,5U и 3 мкл ампликонов после проведения ПЦР-1.

Оптимизированы условия единого режима амплификации для проведения двух этапов ПЦР за счёт выбора температуры для наиболее эффективного отжига праймеров, времени каждого цикла и количества циклов, что позволило выявлять ДНК МБТ и определять мутации, выделенной из мокроты. В результате единый режим амплификации представляет собой следующее: 1-ый этап: 94° – 4 мин; 2-ой этап: 94° – 30 сек., 59° – 40 сек., 72° – 40 сек. (25 циклов); 3-ий этап: 72° – 4 мин., 10° – хранение. ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Горизонтальный электрофорез для регистрации наработанных ампликонов после Nested ПЦР, тепловую денатурацию ПЦР-продуктов, электрофоретическое разделение денатурированных ампликонов и окраску геля проводили как описано выше для выявления мутаций в гене *gyrA*, что значительно упрощало работу по

изучению конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов одновременно в двух генах.

Интерпретацию результатов конформационных различий в ДНК МБТ осуществляли, сравнивая расстояния между цепочками ДНК в контроле и исследуемых образцах при видимом свете без специального оборудования.

Клинические изоляты и/или образцы мокроты, в которых выявляли отличия на электрофореграмме в *gyrB* МБТ секвенировали для определения нуклеотидной замены.

Таким образом, в течение двух суток, можно определить чувствительность к ФХ по двум генам и тем самым обеспечить вероятность выявления мутаций, ответственных за устойчивость МБТ к этим препаратам, дополнительно ещё в 7 - 10 % случаях.

На рисунке 5 представлен пример электрофореграммы выявления конформационных различий в ДНК, связанных с мутациями в гене *gyrB*.

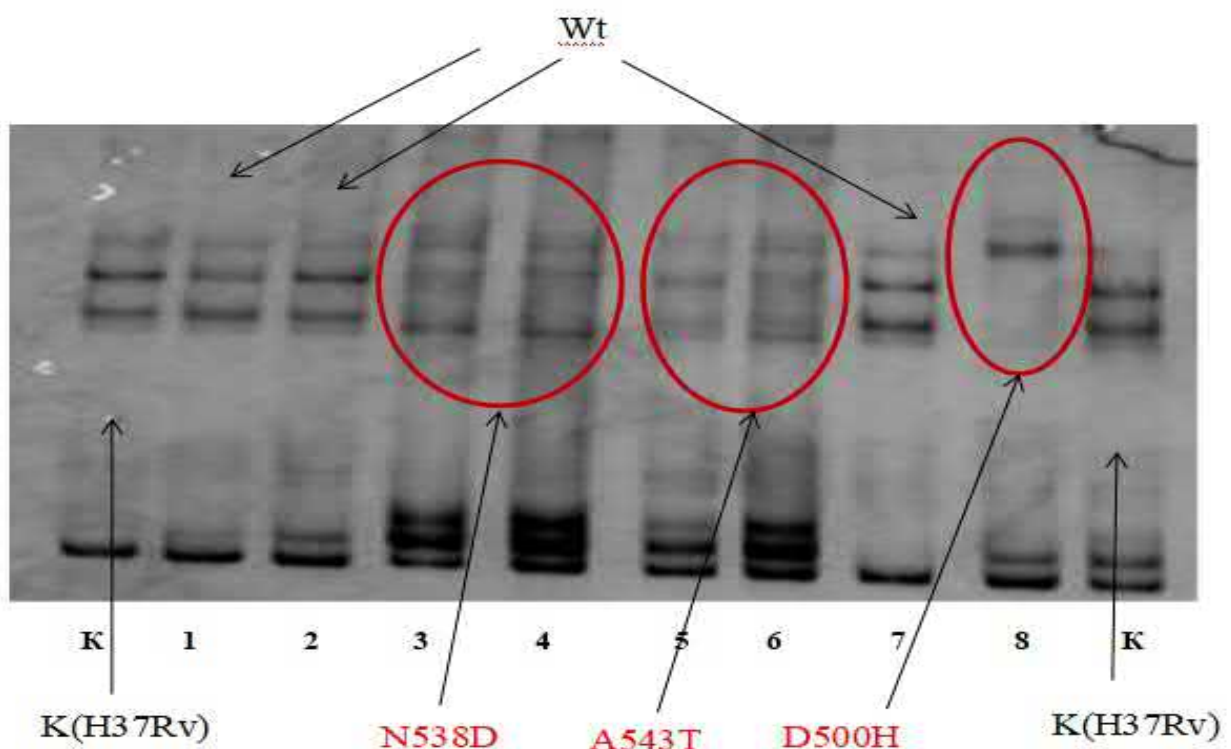


Рисунок 5 – Электрофоретические профили анализируемого участка гена *gyrB* *M. tuberculosis*
Примечание: К – H37Rv; 1, 2, 7 – образцы ДНК *M. tuberculosis* без мутаций в *gyrB*; 3-6, 8 – образцы ДНК *M. tuberculosis*, содержащие мутации в *gyrB*

На разработанный способ диагностики получен патент на изобретение РФ № 2439162 от 10.01.2012 г.

Апробацию разработанной методики проводили на диагностическом материале (мокрота) и культурах. Нами было исследовано 374 образца ДНК МБТ, выделенной из 297 культур и 77 образцов мокроты, полученных от 98 больных с впервые выявленным туберкулёзом лёгких и 276 больных с хроническим течением процесса. Критерием отбора исследуемого материала были ранее выделенные в Bactec MGIT 960 культуры МБТ, устойчивые к H или R (монорезистентные) и с МЛУ, а также наличие в них генетических детерминант устойчивости к данным препаратам, выявленных с помощью «ТБ-БИОЧИП-1». Тип мутаций в *gyrA* определяли с помощью тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2», поиск новых осуществляли с применением разработанной методики «A-SSCP». В качестве метода сравнения применяли бактериологическое определение чувствительности к Ofx на среде Л-Й.

С целью определения эффективности разработанного метода «M-SSCP» в мокроте для ускоренного определения генетических детерминант устойчивости в гене *gyrB* было исследовано 77 образцов, из которых 57 (74%) были с положительными и 20 (26%) с отрицательными результатами микроскопии. Результаты одновременного исследования двух генов *gyrA* и *gyrB* с помощью «ТБ-БИОЧИП-2» и разработанной методики «M-SSCP» представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты исследования генов *gyrA* и *gyrB* ДНК *M.tuberculosis*, выделенной из мокроты

Фенотипическая категория МБТ (n=77)	Результаты анализа генов <i>gyrA</i> и <i>gyrB</i>	
	«ТБ-БИОЧИП-2» <i>gyrA</i>	«M-SSCP» <i>gyrB</i>
Ofx чувствительные МБТ (n=31)	31 (100%) S95T	31 (100%) wt
Ofx устойчивые МБТ (n=46)	мутации – 41 (89,1%) нет мутаций – 4 (8,7%)	мутации* - 5 (10,9%) A543T – 2 D500H – 2 R485C – 1 нет мутаций – 40 (86,9%)
	1 (2,2%) S95T**	1 (2,2%) без мутаций

Примечание: * - тип мутации определён после секвенирования, ** - анализ гена *gyrA* с помощью «A-SSCP»

Согласно представленным данным в таблице 13, анализ обоих генов при исследовании 77 образцов показал, что в 46 (59,7%) выявлены мутации, из которых в 41/46 (89,1%) в *gyrA* ДНК МБТ и в 5/46 (10,9%) отличия на электрофореграмме при исследовании гена *gyrB*. После секвенирования в ДНК определены типы мутаций – A543T, D500H, R485C, из которых в одном случае (2,2%) одновременно в двух генах – A90V (*gyrA*) и D500H (*gyrB*). Все выделенные МБТ из этих образцов обладали устойчивостью к Ofx. В одном образце (2,2%) выделена МБТ фенотипически устойчивая к Ofx, но мутаций в двух исследуемых генах с помощью разработанных методик «А-SSCP» и «М-SSCP» обнаружены не были, что подтверждено секвенированием.

Исследование 31/77 (40,3%) образца мокроты показало отсутствие генетических детерминант устойчивости: в гене *gyrA* выявлена полиморфная замена (S95T) и *gyrB* wt, что подтверждено результатами фенотипического определения чувствительности МБТ к Ofx.

Распределение наличие/отсутствие мутаций в ДНК МБТ в результате проведённого исследования показало, что в 32 (41,6%) образцах клинического материала была выявлена полиморфная замена S95T, не связанная с устойчивостью к Ofx, замены в *gyrA* определены в 40 (51,9%) случаях, в *gyrB* в 4 (5,2%) и в 1 (1,3%) образце в двух генах *gyrA/gyrB*.

Таким образом, результаты исследования демонстрируют, что разработанная методика «М-SSCP» по выявлению ДНК МБТ в мокроте не уступает тест-системе «ТБ-БИОЧИП-2». Методика может использоваться в рутинных исследованиях одновременно с биочипом для определения генетических детерминант устойчивости к Ofx сразу в двух генах, увеличивая совпадение с бактериологическим результатом до 98,7% (95% ДИ 93-99,8), тогда как при исследовании только *gyrA* совпадение составило 93,5% (95% ДИ 85,7-97,2).

Как сказано выше результаты определения мутаций в ДНК, выделенной из диагностического материала и культур нередко расходятся. Для сопоставления спектра мутаций в обоих генах в диагностическом материале и культурах было

проведено исследование 297 культур МБТ с помощью двух молекулярно-генетических методов.

Результаты выявления генетических детерминант устойчивости в гене *gyrA* с помощью только тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2» в данной выборке исследуемого материала также показали наличие расхождений с фенотипическими результатами определения ЛЧ МБТ к Ofx (Таблица 14).

Установленное распределение (спектр) мутаций в генах *gyrA* и *gyrB* при исследовании культур с помощью молекулярно-генетических методов представлено в таблице 14.

Таблица 14 – Распределение и частота встречаемости мутаций в генах *gyrA* и *gyrB*, в чувствительных и устойчивых культурах *M.tuberculosis* к офлоксацину (n=297)

Мутации в <i>gyrA/gyrB</i>	Лекарственная чувствительность <i>M.tuberculosis</i> к офлоксацину на среде Л-Й (%)	
	Устойчивые (n=171)	Чувствительные (n=126)
Мутации в <i>gyrA</i>		
<i>gyrA</i> S95T	4 (2,3)	125 (99,2)
<i>gyrA</i> D94G	61 (35,6)	-
<i>gyrA</i> A90V	36 (21)	-
<i>gyrA</i> D94A	25 (14,6)	-
<i>gyrA</i> S91P	11 (6,4)	-
<i>gyrA</i> D94N	7 (4,1)	-
<i>gyrA</i> D94H	4 (2,3)	-
<i>gyrA</i> D94Y	3 (1,7)	-
<i>gyrA</i> G88C	2 (1,2)	-
<i>gyrA</i> D94Y,A90V	1 (0,6)	-
<i>gyrA</i> D94A,D94H	1 (0,6)	-
<i>gyrA</i> D94A,A90V	1 (0,6)	-
<i>gyrA</i> D94G,D94A	1 (0,6)	-
<i>gyrA</i> D94G,D94N	1 (0,6)	-
<i>gyrA</i> D94G,A90V	1 (0,6)	-
<i>gyrA</i> D94G,S91P	1 (0,6)	-
<i>gyrA</i> D89N*	1 (0,6)	-
<i>gyrA</i> G88A, H70R*	1 (0,6)	-
Всего в <i>gyrA</i>	162	125
Мутации в <i>gyrB</i>		
<i>gyrB</i> (R485H)*	-	1 (0,8)
<i>gyrB</i> (A543T)*	2 (1,2)	-
<i>gyrB</i> (N538D)*	2 (1,2)	-
<i>gyrB</i> (D500H)*	2 (1,2)	-
<i>gyrB</i> (R485C)*	1 (0,6)	-
Всего <i>gyrB</i>	7	1
Мутации в <i>gyrA</i> и <i>gyrB</i>		

Продолжение таблицы 14

Мутации в <i>gyrA/gyrB</i>	Лекарственная чувствительность <i>M.tuberculosis</i> к офлоксацину на среде Л-Й (%)	
	Устойчивые (n=171)	Чувствительные (n=126)
<i>gyrA</i> D94G <i>gyrB</i> (D500A)*	1 (0,6)	-
<i>gyrA</i> A90V <i>gyrB</i> (D500H)*	1 (0,6)	-
Всего в <i>gyrA</i> и <i>gyrB</i>	2	-
Всего мутаций в <i>gyrA</i> , выявленные «ТБ-БИОЧИП-2»	158	-
Нет мутаций	13	126
Чувствительность % (95% ДИ%-%)	92,4% (95% ДИ 87,4-95,5)	
Специфичность % (95% ДИ %-%)	100,0%, (95% ДИ 97-100)	
Всего мутаций в <i>gyrA</i> и <i>gyrB</i> , установленные тремя МГМ	167	1
Нет мутаций	4	125
Чувствительность % (95% ДИ%-%)	97,7% (95% ДИ 94,1-99,1)	
Специфичность % (95% ДИ %-%)	99,2% (95% ДИ 95,6-99,9)	

Примечание: * – нуклеотидная замена определена с помощью секвенирования

Среди 171 (57,6%) устойчивых изолятов в 158 (53,2%) определены мутации в *gyrA* с помощью биочипа и в 13 (4,4%) они не были обнаружены.

Исследование всех культур с помощью «M-SSCP» позволило определить мутации в *gyrB*. Среди 126 изолятов, чувствительных к Ofx (Таблица 14), в одном (0,8%) была выявлена мутация R485H в гене *gyrB*, которая описана ранее, как мутация, приводящая к устойчивости МБТ к ФХ [115; 263]. Однако в работе A. Pantel и соавт. (2011) вопрос о значении данной замены в развитии ЛУ МБТ к ФХ был поставлен под сомнение [251].

Проведённое исследование 13 (7,6%) устойчивых изолятов к Ofx без мутаций в гене *gyrA* показало присутствие в 7 штаммах в гене *gyrB* конформационных отличий от контроля. Секвенированием были установлены нуклеотидные замены в двух культурах A543T, в других – D500H, в третьих – N538D и в одной – R485C. В оставшихся 6 изолятах мутаций в обоих генах не было обнаружено. Используя разработанную методику «A-SSCP» для исследования гена *gyrA* нами были выявлены электрофоретические отличия от

контрольного штамма в двух изолятах, в которых методом секвенирования установлено наличие мутаций в кодонах, не «представленных» в тест-системе «ТБ-БИОЧИП-2»: в одном двойная замена в 70 и 88 кодонах (H70R/G88A), в другом в 89 (D89N). В 4 (3,0%) культурах (с S95T) мутации в исследуемых регионах генов обнаружены не были, что также подтверждено секвенированием. Возможной причиной этого несоответствия между методами может быть низкая КК для оценки ЛУ МБТ к Ofx (2,0 мкг/мл), либо в развитии устойчивости задействованы другие молекулярные механизмы [256].

Установленный спектр мутаций в двух генах, представленный в таблице 14, демонстрирует большое разнообразие мутаций в гене *gyrA*, среди которых преобладающее количество штаммов с одиночными заменами в 94 кодоне, обнаруженные в 100/171 (58,5%) изолятах. Наиболее часто встречаемой из них являлась замена D94G (61%). Далее по частоте встречаемости стала мутация в 90 кодоне (A90V) обнаруженные в 36/171 (21%) МБТ. Восемь изолятов (4,7%) имели двойные мутации в этом гене, три из которых только в 94 кодоне, что, связано с присутствием смешанной популяции в культуре МБТ [298]. Остальные генетические детерминанты устойчивости, в том числе и новые, обнаружены в наименьшем количестве.

Мутации в *gyrB* представлены в наименьшем проценте устойчивых изолятов (5,3%), из которых в 1,2% в сочетании с заменами в *gyrA* (Таблица 14).

В итоге, исследование показало, что 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.

Таким образом, разработанная методика «М-SSCP» позволяет быстро проводить «косвенное» выявление мутаций в гене *gyrB* ДНК МБТ, выделенной как из диагностического материала, так и культур, с последующим секвенированием. Методика «М-SSCP» обладает сопоставимой чувствительностью в диагностическом материале с тест-системой «ТБ-БИОЧИП-2» (во всех образцах диагностического материала получен

результат молекулярного определения ЛЧ). 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 результате проведённого исследования установлено, что развитие устойчивости МБТ к Ofx связано с появлением мутаций в двух генах, выявление которых значительно повышает корреляцию с данными бактериологического исследования и достоверно ($p < 0,05$) увеличивает выявляемость устойчивости к препарату до 97,7% (95% ДИ: 94,1-99,1) против 92,4% (95% ДИ 87,4-95,5) при исследовании только гена *gyrA*.

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

К основным препаратам резервного ряда, применяемых для лечения туберкулёза с МЛУ, кроме фторхинолонов, относятся аминогликозиды – Km, Am и препарат полипептидной структуры – Cm. Устойчивость МБТ к ним чаще всего обусловлена мутациями в гене *rrs* [223; 248; 307]. В 60-70% случаев именно мутации в положении 1400, 1401 и 1483 (1401, 1402 и 1484) в этом гене ответственны за возникновение перекрёстной устойчивости МБТ к Km, Am, Cm и виомицину (Vm) [223].

Для выявления генетических детерминант устойчивости к данным препаратам ранее использовали метод ПЦР-ПДФ, так как подобрав соответствующие рестриктазы с его помощью можно точно определить кодон с мутацией, при условии небольшого количества исследуемых замен.

Для амплификации локуса гена *rrs* в разработанной методике на основе метода ПЦР-ПДФ использовали опубликованную последовательность праймеров [307].

TBF *rrs*-1. 5' TTA AAA GCC GGT CTC AGT TC 3' – 20 bp,

TBR *rrs*-2. 5' TAC GCC CCA CCA GTT GGG GC 3' – 20 bp.

Ожидаемый размер ампликонов после ПЦР составил 300 п.н.

Отличие разработанной нами методики состояло в следующем:

1. Оптимизирован состав реакционного буфера для ПЦР, обеспечивающий эффективность и специфичность ПЦР. Необходимый конечный объем реакционной смеси для ПЦР для дальнейшего проведения рестрикции тремя ферментами составил 50 мкл и содержал: 10 mM Трис-НСl (Sigma, США) pH 8,8; 50 mM КСl (Panreac, Испания); 0,5% Твин 20 (AppliChem, Германия); 5% - формамид (AppliChem, Германия), 2,5 mM MgCl₂ (НПК «СИНТОЛ», Россия); dNTP по 200 мкМ (НПК «СИНТОЛ», Россия); праймеры по 0,5 мкМ; ДНК-полимераза (BIOTAQ ДНК-полимераза, Meridian Life Science Inc, США) 2,5U и 3 мкл образца.

2. Отработаны оптимальные условия режима амплификации, которые увеличили чувствительность методики и позволили 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. Выбранные условия представляют собой следующее: 1-ый этап - 94° - 5 мин; 2-ой этап – 94° - 60 сек., 55° - 60 сек., 72° - 60 сек (35 циклов); 3-ий этап: 72° - 5 мин; 10° - хранение. ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

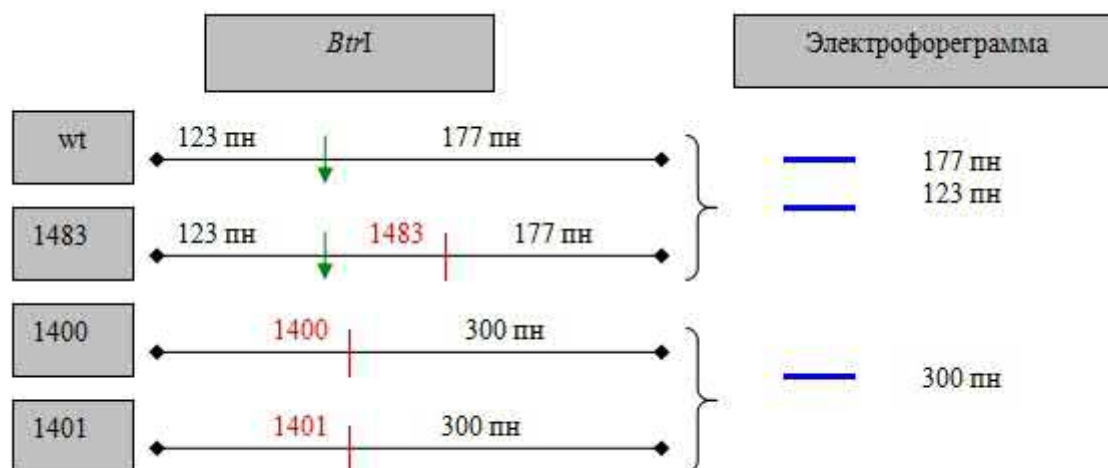
3. Оптимизировано проведение рестрикции, уменьшив количество рестриктаз до трёх: *BstDEI* (НПО «СибЭнзим», Россия), *BtrI* (НПО «СибЭнзим», Россия), *Hpy99I* (New England Biolabs, США), что позволило увеличить количество анализируемых образцов ДНК МБТ для одновременного исследования. Рестриктазы были подобраны с помощью компьютерной программы BioEdit v.7.0.1 таким образом, чтобы выявлять мутации в 1400, 1401 и 1483 положениях гена *rrs* (16S-РНК). В таблице 15 представлены источники их получения и сайты рестрикции.

Таблица 15 – Характеристики рестриктаз *BstDEI*, *BtrI* и *Hpy99I*

Рестриктаза	Источник	Сайт рестрикции
<i>BstDEI</i>	<i>Bacillus stearothermophilus DE</i>	5'...C↓TNA G...3' 3'...G ANT↑C...5'
<i>BtrI</i>	<i>Bacillus stearothermophilus SE-462</i>	5'...CAC↓GTC...3' 3'...GTG↑CAG...5'
<i>Hpy99I</i>	<i>Helicobacter pylori 99I</i>	5'... CGWCG↓...3' 3'...↑GCWGC ...5'

Ниже приведены схемы действия подобранных рестриктаз. Зелёными стрелками обозначены сайты рестрикции; красным цветом – точки мутаций; синим – светящиеся полосы на электрофореграмме.

Рестриктаза *BtrI* разрезает интересующий участок гена *rrs* на 2 фрагмента размером 123 п.н. и 177 п.н. Сайт рестрикции сохраняется в случае мутации в 1483 положении (2 фрагмента ДНК) и теряется в случае мутаций в 1400 и 1401 положениях (1 фрагмент ДНК размером 300 п.н.) (Рисунок 6).

Рисунок 6 – Схема действия рестриктазы *BtrI* (пояснение в тексте)

Рестриктаза *BstDEI* имеет 2 сайта рестрикции на амплифицированном фрагменте гена *rrs* дикого типа. Сайты рестрикции сохраняется в случае мутации в 1400 и 1401 положениях (1 фрагмент ДНК размером 248 п.н.). Возникновение мутации в 1483 положении приводит к образованию дополнительного сайта

рестрикции в изучаемой последовательности ДНК и изменению рестриционного профиля: полоса появляется на уровне 195 п.н. (Рисунок 7).

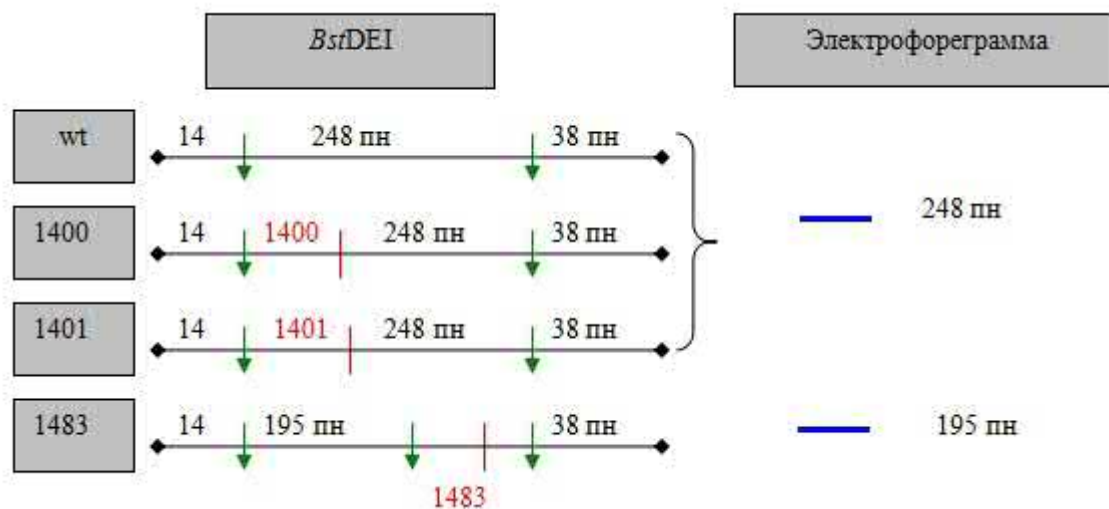


Рисунок 7 – Схема действия рестриктазы *BstDEI* (пояснение в тексте)

В случае рестриктазы *Hpy99I* сайт рестрикции возникает только при наличии мутации в 1400 положении (2 фрагмента ДНК размерам 177п.н. и 127п.н.). Во всех прочих случаях на изучаемом участке гена *rrs* нет сайта рестрикции для рестриктазы *Hpy99I* (1 фрагмент ДНК размером 300п.н.) (Рисунок 8).

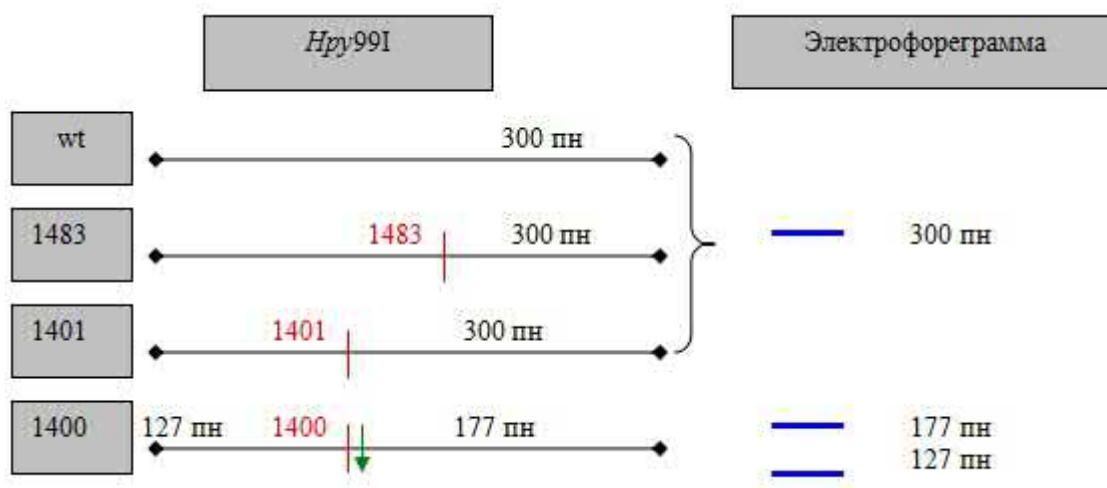


Рисунок 8 – Схема действия рестриктазы *Hpy99I* (пояснение в тексте)

Таким образом, мутации в 1400 и 1483 положениях гена *rrs* однозначно определяются с помощью рестриктаз *Hpy99I* и *BstDEI*, а мутации в 1401 положении – с помощью рестриктаз *BtrI* и *Hpy99I*.

Состав реакционного буфера для проведения рестрикции в расчёте на одну пробирку был следующим:

Для рестриктазы *BstDEI*: вода – 12 мкл; буфер для рестрикции SE Buffer G (НПО «СибЭнзим», Россия) – 2 мкл; Фермент (НПО «СибЭнзим», Россия) – 6 мкл;

Для рестриктаз *BtrI* и *Hpy99I*: вода – 16,3 мкл; буферы для рестрикции SE Buffer O для *BtrI* (НПО «СибЭнзим», Россия) и NE Buffer 4 для *Hpy99I* (New England Biolabs, США) – 2 мкл; BSA 10 мг/мл (New England Biolabs, США) – 0,2 мкл; Фермент *BtrI* (НПО «СибЭнзим», Россия) или *Hpy99I* (New England Biolabs, США) – 1,5 мкл;

В каждую пробирку добавляли по 5 мкл ампликонов (конечный объем каждой пробы 25 мкл). После этого реакционную смесь инкубировали в течение часа при температуре 60°C (*BstDEI*, *BtrI*) или 37°C (*Hpy99I*). Реакцию останавливали охлаждением до 0°C.

По окончании рестрикции ампликоны раскапывали в лунки 3 % агарозного геля (AppliChem, Германия), содержащего этидиум бромид (Sigma, США), и проводили электрофорез в камере (Helicon, Россия) при 10 В/см в течение 10 минут в 1-кратном TBE буфере (0,089М трис-бората (Sigma, США); 0,089М борной кислоты (Panreac, Испания); 2М EDTA (AppliChem, Германия), pH 8,0).

Регистрацию продуктов рестрикции в виде светящихся полосок осуществляли в свете ультрафиолетовой лампы трансиллюминатора (VILBER LOURMAT, Франция). Затем гель фотографировали и переносили изображение в компьютер с помощью программы ImageScore.

На рисунке 9 представлена электрофореграмма, полученная после обработки двух образцов ДНК *M.tuberculosis* рестриктазами *BstDEI*, *BtrI*, *Hpy99I*.

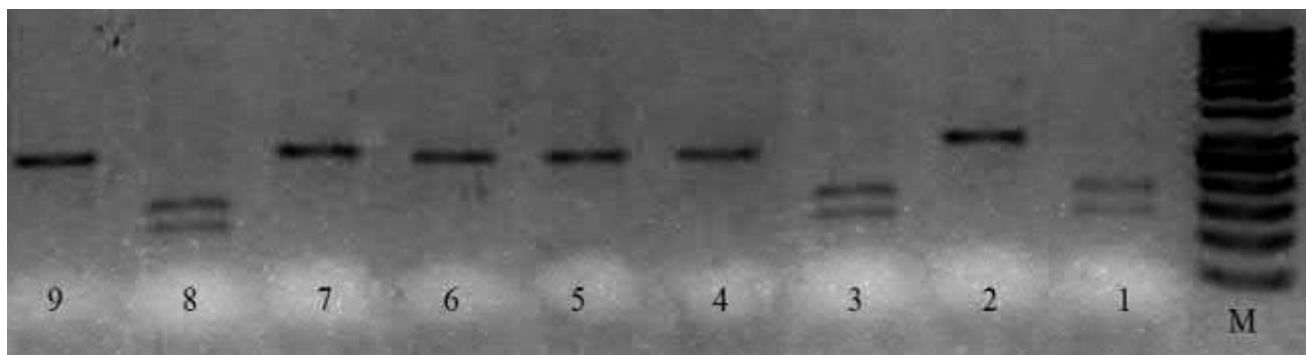


Рисунок 9 – Электрофореграмма, полученная после обработки двух образцов ДНК *M.tuberculosis* рестриктазами *BstDEI*, *BtrI*, *Hpy99I*.

Примечание: М – маркер с шагом 50 п.н. (Fermentas), дорожки 1-3 - образцы обработанные рестриктазой *BtrI*; 4-6 – рестриктазой *BstDEI*; 7-9 – рестриктазой *Hpy99I*.

1, 4, 7 – контрольный образец ДНК *M.tuberculosis* H37Rv. 3, 6, 9 – образец ДНК *M.tuberculosis*, не содержащий мутаций в 1400, 1401 и 1483 положениях гена *rrs*. 2, 5, 8 – образец ДНК *M.tuberculosis* с мутацией a1400g гена *rrs*

На разработанный способ диагностики получен патент на изобретение РФ № 2409680 от 20.01.2011г.

Апробацию разработанной методики на основе ПЦР-ПДРФ проводили на 63 культурах МБТ, выделенных в жидкой среде М7Н9 в Bactec MGIT 960. Материал для посева (мокрота) получен от 27 (43,0%) больных с впервые выявленным туберкулёзом и 36 (57,0%) – ранее леченых. Критерием отбора исследуемого материала были выделенные культуры МБТ с фенотипической устойчивостью к Н и R (МБТ-МЛУ) и МБТ-МЛУ устойчивые к ФХ, а также наличие в них генетических детерминант резистентности к данным препаратам определённые с помощью «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2». Среди отобранных культур 33 (52,0%) были МБТ-МЛУ и 30 (48,0%) МБТ-МЛУ устойчивые к ФХ. В качестве сравнения применяли микробиологическое определение ЛЧ к Km и Cm методом абсолютных концентраций на среде Л-Й при КК равном 30,0 мкг/мл и высокой 50,0 мкг/мл.

По результатам рестрикционного анализа 15 (23,8%) образцов ДНК содержали мутацию в положении 1400 в гене *rrs* и в 47 (74,6%) отсутствовали замены в исследованной части гена. Мутации в 1401 и 1483 положениях не встречались. В 1 (1,6%) случае оценка результата была затруднительной. В

таблице 16 представлены результаты рестрикционного анализа 63 изученных образцов ДНК из культур.

Таблица 16 – Сравнительный анализ определения мутаций в гене *rrs* по результатам ПЦР-ПДРФ и секвенирования

Результаты исследования культур МБТ (n=63)					
ПЦР-ПДРФ	абс.	%	секвенирование	абс.	%
wt	47	74,6	wt	47	74,6
1400	15	23,8	a1400g	15	23,8
1401	0	0	c1401a/t	0	0
1483	0	0	g1483t	0	0
сомнительный	1	1,6	wt	1	1,6

Все образцы, после рестрикционного анализа были секвенированы для определения типа замены. В одном образце с сомнительным результатом рестрикции с помощью секвенирования в исследуемой части гена *rrs* мутаций не выявлено – генотип wt. Совпадение результатов, полученных с помощью обоих методов (ПЦР-ПДРФ и секвенирования), было высоким: 100,0% (95% ДИ 79,6-100,0) для устойчивых образцов и 98,4% (95% ДИ 91,5-99,7) для чувствительных.

При сопоставлении результатов (Таблица 17) бактериологического определения ЛЧ МБТ к Km и Cm и молекулярно-генетического исследования (ПЦР-ПДРФ и секвенирования) 63 культур МБТ были установлены некоторые несовпадения.

Таблица 17 – Результаты определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к канамицину и капреомицину бактериологическим и молекулярно-генетическими методами

ПЦР-ПДРФ/ секвенирование	Количество изолятов (n=63)	Лекарственная чувствительность к Km и Cm (Л-Й)	
		Km (30,0 мкг/мл и 50,0 мкг/мл)	Cm (30,0 мкг/мл и 50,0 мкг/мл)
без мутаций/wt n=47	43	S	S
	3	R/R	S
	1	R/S	R/S

Продолжение таблицы 17

ПЦР-ПДРФ/ секвенирование	Количество изолятов (n=63)	Лекарственная чувствительность к Km и Cm (Л-Й)	
		Km (30,0 мкг/мл и 50,0 мкг/мл)	Cm (30,0 мкг/мл и 50,0 мкг/мл)
Сомнительный/wt n=1	1	S	S
мутации/a1400g n=15	7	R/R	S
	3	R/R	R/S
	2	R/R	R/R
	1	R/S	S
	2	S	S

Примечание: wt – дикий тип, R – устойчивый, S - чувствительный

Среди 46 (73,0) чувствительных изолятов к обоим препаратам в 44 (95,7%) в гене *rrs* мутации не обнаружены и в 2 (4,3%) выявлена мутация a1400g. Возможно это связано с присутствием в культуре двух различных популяций МБТ, одна из которых была устойчива к данным препаратам, а другая – чувствительной [106]. Кроме того, известно, что микобактерии, устойчивые к антибиотикам при пересевах (в нашем случае культуры выделены в жидкой среде М7Н9, а ЛЧ к Km и Cm проводится на среде Л-Й) растут медленнее или вообще не дают роста на среде [111].

Напротив, среди 17 (27,0%) устойчивых к Km и/или Cm МБТ в 13 (76,5%) случаев выявлена замена a1400g, из них 12 (92,3%) были устойчивыми к обеим концентрациям Km и одна (7,7%) к 30,0 мкг/мл. В 4 (23,5%) устойчивых к препарату изолятах мутации не выявлены, из них 3 были устойчивыми к обеим концентрациям Km и один к 30,0 мкг/мл. Отсутствие мутаций в анализируемом гене в устойчивых штаммах может быть связано с иными механизмами резистентности, например, с присутствием мутаций в промоторном регионе гена *eis* (что требует дальнейших исследований) или с изменениями в равновесии системы инфлюкс-эффлюкс, которые приводят к существенному изменению транспорта антибиотиков в клетку [243; 356].

Устойчивостью к Cm обладали только 6 штаммов МБТ (35,3%) из 17 устойчивых к Km. Это подтверждает литературные данные о том, что устойчивость к Km у МБТ возникает чаще, чем к Cm [138]. Однако, мутация

a1400g в исследуемом гене, приводящая к перекрёстной устойчивости к АГ и Cm, выявлена лишь в 5 из 15 (33,3%) изолятов с этой заменой. Это обстоятельство может быть связано с влиянием ряда факторов на результаты определения ЛЧ методом абсолютных концентраций: величина адсорбции препарата и скорость его диффузии в среде, время и температура инкубации, доза засева МБТ и другие [11; 191]. Совпадение результатов бактериологического определения ЛЧ МБТ к Km и Cm и выявления мутаций с помощью метода ПЦР-ПДРФ составило 88,9% (95% ДИ 78,8-94,5) и 81,0% (95% ДИ 69,6-88,8) соответственно, а с секвенированием 90,5% (95% ДИ 80,7-95,6) и 82,5 (95% ДИ 71,4-90,0).

Расчёт статистических характеристик для разработанной методики на основе ПЦР-ПДРФ относительно метода абсолютных концентраций (МАК) показал сопоставимые результаты с секвенированием (Таблица 18).

Таблица 18 – Сравнительный анализ трёх методов определения устойчивости *M.tuberculosis* к канамицину и капреомицину и расчёт статистических характеристик

-----	ПЦР-ПДРФ		Секвенирование		Среда Л-Й (МАК)	
					Km	Cm
Чувствительные	47		48		46	57
Устойчивые	15		15		17	6
Сомнительные	1		0		0	0
	Km	Cm	Km	Cm		
Чувствительность	76,5% (52,7-90,4)	83,3% (43,7-97,0)	76,5% (52,7-90,4)	83,3% (43,7-97,0)		
Специфичность	93,5% (82,5-97,8)	80,7% (68,7-88,9)	95,7% (85,5-98,8)	82,5% (70,6-90,2)		
Прогностическая значимость по устойчивости	81,3% (57,0-93,4)	31,3% (14,2-55,6)	86,7% (62,1-96,3)	33,3% (15,2-58,3)		
Прогностическая значимость по чувствительности	91,7% (80,5-96,7)	97,9% (88,9-99,6)	91,7% (80,5-96,7)	97,9% (89,1-99,6)		

Методика обладает достаточной чувствительностью для Km (76,5%) и Cm (83,3%), однако прогностическая значимость по устойчивости для Cm низкая (31,3%), несмотря на то, что полученные данные подтверждены секвенированием («золотой стандарт» среди МГМ) и демонстрируют достоверность полученных

результатов. Это говорит о недостаточной эффективности метода абсолютных концентраций для определения ЛЧ МБТ к препарату так, как метод не стандартизован.

Таким образом, разработанная методика на основе ПЦР-ПДРФ позволяет проводить исследование культур МБТ, выделенных в жидкой среде M7H9 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 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.

В результате проведённого исследования установлено, что при исследовании гена *rrs* устойчивость МБТ к Km определена в 76,5% изолятах и лишь в 33,3% к Cm, что требует проведения исследований по определению ЛЧ к данным препаратам разными бактериологическими методами. Отсутствие мутаций в 23,5% устойчивых изолятах только к Km говорит о необходимости проведения дальнейших исследований по определению роли гена *eis* в развитии устойчивости к этому препарату.

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

В 2009 году М. Zaunbrecher и соавт. опубликовали работу, в которой показали влияние мутаций, обнаруженных в промоторной области гена *eis* (Enhanced Intracellular Survival protein) на развитие устойчивости МБТ к невысоким дозам Km [356]. В связи с этим, было проведено исследование по определению вклада мутаций в этой области гена *eis* в развитие устойчивости МБТ к Km.

Особенности расположения мутаций и их количество в промоторной области гена *eis* не позволяют подобрать специфичные для этого локуса рестриктазы, и как следствие использовать метод ПЦР-ПДРФ. Поэтому нами был выбран метод ПЦР-SSCP, зарекомендовавший себя, как достаточно эффективный для «косвенного» выявления мутаций в интересующем нас фрагменте ДНК МБТ.

Конструирование праймеров для амплификации промоторной области гена *eis* проводили с помощью программы Lasergene® Core Suite (DNASTAR, Inc., США). Оценку и проверку специфичности подобранных праймеров проводили как описано выше.

Последовательность праймеров была следующей:

1-ый – 5' CGG AGC CGT CGG GGT ATG C 3' – 19 bp,

2-ой – 5' GCC GCG GCC AGT AGG AAC A 3' – 19 bp.

Отработаны оптимальные условия режима амплификации, которые увеличили чувствительность разработанной методики и позволили определять мутации в промоторной области гена *eis* в культурах МБТ, выделенных в жидкой среде М7Н9, что ускорило получение результата чувствительности МБТ к канамицину на 15-20 дней. Выбранные условия представляют собой следующее: 1-ый этап - 95° - 4 мин; 2-ой этап – 95° - 20 сек., 59° - 30 сек., 72° - 20 сек (30 циклов); 3-ий этап: 72° - 4 мин; 10° - хранение. ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Используемая нами методика включает этапы аналогичные при исследовании гена *rrs* и *gyrA/gyrB*:

1. Состав реакционного буфера для ПЦР аналогичен составу для амплификации анализируемого участка гена *rrs* с той разницей, что общий объем среды составил 30 мкл достаточный для проведения электрофоретического разделение денатурированных одноцепочечных фрагментов ДНК.

2. Проведение горизонтального электрофореза для детекции фрагментов ДНК возбудителя размером 250 п.н, тепловой денатурации ПЦР-продукта, электрофоретическое разделение денатурированных ампликонов и окраску геля проводили как описано выше для выявления мутаций в гене *gyrA* и *gyrB*.

На рисунке 10 представлен пример электрофореграммы конформационных различий в ДНК, связанных с мутациями в промоторной области гена *eis* МБТ с помощью метода ПЦР-SSCP.

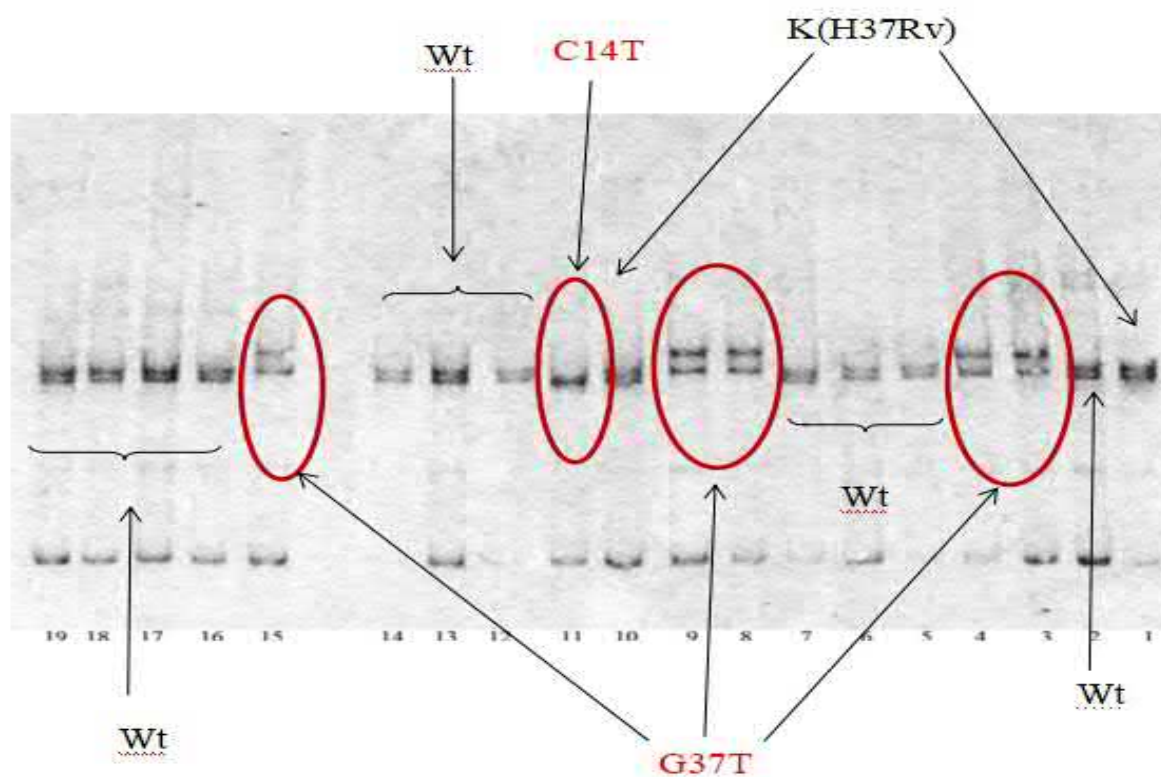


Рисунок 10 – Электрофореграмма промоторной области гена *eis* МБТ

Примечание: 1, 10 – штамм *M. tuberculosis* H37Rv; 11 – штамм МБТ, устойчивый к канамицину (мутация С14Т по данным секвенирования); 3, 4, 8, 9, 15 – штаммы МБТ, устойчивые к канамицину (мутация G37Т по данным секвенирования) 2, 5 – 7, 12 – 14, 16 – 19 – штаммы МБТ, чувствительные к канамицину без мутаций

На разработанный способ диагностики получен патент на изобретение РФ № 2509158 от 10.03.2014г.

Апробацию разработанной методики проводили на 114 клинических изолятах, выделенных из диагностического материала (мокрота) 114 больных туберкулёзом, из которых 35 с впервые выявленным туберкулёзом, 43 рецидивом заболевания и 36 ранее получавших лечение. Критерием отбора исследуемого материала были выделенные культуры МБТ в Bactec MGIT 960 устойчивые к H или R (монорезистентные), с МЛУ, МЛУ устойчивые к ФХ, а также наличие в них генетических детерминант устойчивости к данным препаратам выявленные с помощью «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2». Из 114 культур 77 (67,5%) были с

МЛУ, 24 (21,1%) МЛУ и устойчивые к ФХ, 8 (7%) устойчивые только к Н, 4 (3,5%) только к R и 1 (0,9%) к R и ФХ.

Анализ мутаций в гене *rrs* проводили с помощью тест-системы GenoType MTBDRsl сертифицированной для клинических исследований и позволяющей выявлять мутации только в этом гене. Промоторную область гена *eis* анализировали с помощью разработанной методики на основе ПЦР-SSCP. Для определения типа мутаций в *eis* проводили секвенирование тех образцов ДНК, в которых на электрофореграмме были выявлены конформационные отличия от контроля (чувствительный штамм *H37Rv*). В качестве сравнения применяли бактериологическое определение ЛЧ МБТ к Km и Cm проводили на среде Л-Й в критической концентрации 30,0 мкг/мл и высокой 50,0 мкг/мл [26].

С помощью GenoType MTBDRsl в 44/114 (38,6%) образцах ДНК были обнаружены мутации в исследуемой области гена *rrs*. Во всех штаммах была определена только замена a1401g (1401, 1402 и 1484 – новая нумерация гена *rrs*, после обновлённого полногеномного секвенирования *M.tuberculosis H37Rv*) [90]. При исследовании промоторной области гена *eis* с использованием разработанной методики выявлены электрофоретические отличия от контроля в 26/114 (27,6%) образцах.

Результаты секвенирования показали, что мутации в анализируемой области гена распределились следующим образом: наиболее распространённой оказалась замена g(-10)a, выявленная в 9/26 (34,6%) образцах, в 8/26 (30,8%) определена замена g(-37)t, в 6/26 (23,1%) c(-14)t и в 3 (11,5%) – c(-12)t. Результаты, полученные молекулярно-генетическими методами, сравнили с результатами определения ЛЧ МБТ к Km и Cm методом абсолютных концентраций на среде Л-Й (Таблица 19).

Таблица 19 – Распределение мутаций в генах *rrs* и *eis* в устойчивых и чувствительных *M.tuberculosis* к канамицину и капреомицину

Гены		Метод абсолютных концентраций (30,0 мкг/мл/50,0 мкг/мл)		Количество изолятов (n=114)
<i>rrs</i>	<i>eis</i>	Км	См	
a1401g	wt [#]	R/R ^{**}	R/R	8
		R/R	R/S [*]	25
		R/R	S/S	11
wt	g(-10)a	R/R	S/S	1
		R/S	S/S	2
		S/S	S/S	6
wt	c(-14)t	R/R	S/S	5
		R/S	S/S	1
wt	g(-37)t	R/R	S/S	1
		R/S	S/S	3
		S/S	S/S	4
wt	c(-12)t	R/S	S/S	1
		S/S	S/S	2
wt	wt	S/S	S/S	43
		R/R	R/S	1

Примечание: # – дикий тип, * – культура, чувствительная к данной концентрации препарата, ** – культура, устойчивая к данной концентрации препарата

По данным бактериологического исследования устойчивость МБТ к Км определена в 59/114 (51,8%) изолятах, а к См в 34/114 (29,8%). Все 44/114 (38,6%) изолята с заменой a1401g в гене *rrs* ДНК были устойчивыми к Км в концентрациях 30,0 мг/мл и 50,0 мг/мл. Из них к См только 8/44 (18,2%) обладали устойчивостью к двум концентрациям, 25/44 (56,8%) к 30,0 мкг/мл и 11/44 (25,0%) не проявили устойчивость на среде Л-Й. Мутации в гене *eis* были выявлены в 26/114 (22,8%) изолятах, из которых 14 (53,8%) были устойчивыми к Км и 12 (46,2%) чувствительными к препарату. Мутации g(-10)a, g(-37)t и c(-12)t выявлены как в устойчивых, так и чувствительных к препарату МБТ, кроме замены c(-14)t, которая определена во всех шести устойчивых изолятах.

Среди 9 МБТ с g(-10)a, один был устойчивый к обеим концентрациям, два к 30,0 мкг/мл и шесть чувствительных. Из 6 изолятов с заменой c(-14)t, 5 устойчивые к обеим концентрациям препарата и один к 30 мкг/мл. Мутация g(-37)t приводила к устойчивости к двум концентрациям в одном изоляте, в трёх к одной и четыре были чувствительными. Замена c(-12)t определена в одном

устойчивом МБТ к 30,0 мкг/мл и двух чувствительных к препарату. Все штаммы с мутациями в этом гене были чувствительными к Ст.

Одна культура, не содержащая мутаций в исследуемых участках ДНК, фенотипически показала устойчивость к высоким концентрациям Км и низкую к Ст. В исследованиях было показано что далеко не всегда резистентность к тем или иным препаратам, в том числе и к АГ, можно объяснить только возникновением мутаций в определённых генах. Фенотипическая устойчивость может развиваться по другим механизмам, например, за счёт изменения в работе системы Efflux/influx, обеспечивающей транспорт веществ через клеточную стенку, а также играть определённую физиологическую роль, заключающуюся в защите микобактериальной клетки от токсинов и поддержании гомеостаза [258].

Тем не менее, определение мутаций в промоторной области гена *eis* позволило выявить 14/59 (23,7%) устойчивых штаммов МБТ к Км дополнительно к 44 (74,6%) с заменами в гене *rrs*, и тем самым значительно повысить выявляемость устойчивых МБТ к препарату до 98,3% (95% ДИ 91,0-99,7) (суммарная чувствительность двух методов). При исследовании одного гена *rrs* выявляемость резистентных МБТ составляла 74,6% (95% ДИ 62,2-83,9). Вместе с тем, следует подчеркнуть, что выявленные мутации в гене *eis* в устойчивых изолятах к Км не приводили к устойчивости к Ст т.е мутации в этом гене не связаны с развитием резистентности к данному препарату.

Таким образом, результаты бактериологического определения ЛЧ МБТ к Км на среде Л-Й совпали с результатами анализа двух генетических мишеней в 88,6% (95% ДИ 81,5-93,2). При исследовании гена *rrs* совпадение результатов для Ст составило 89,5% (95% ДИ 82,5-93,9).

Однако, особый интерес вызывают полученные расхождения при сопоставлении результатов молекулярного и бактериологического определения ЛЧ МБТ к исследуемым препаратам в 13/114 (11,4%) изолятах, из которых в 12 чувствительных были определены мутации g(-10)a, g(-37)t и c(-12)t и одном устойчивом замены в исследуемых участках ДНК не выявлены.

Напротив, в одной фенотипически устойчивой к Km и Cm культуре МБТ мутаций в обоих генах не было обнаружено. Из-за указанных дискордантных данных суммарная специфичность и прогностическая значимость положительного результата МГМ при анализе двух генов составила 78,2% (95% ДИ 65,6-87,1) и 82,9% (95% ДИ 88,2-99,6).

В связи с этим было проведено исследование по определению МИК Km, Am и Cm в жидкой среде М7Н9 в системе Bactec MGIT 960 для всех 114 изолятов. Для этого в пробирки MGIT с питательной средой добавляли препараты Km и Cm для получения конечной концентрации в пределах от 0,16 мкг/мл до 80,0 мкг/мл, для Am 0,125 мкг/мл до 64,0 мкг/мл. Референсный типовой штамм H37Rv использовали в качестве контроля. Штамм определяли как устойчивый к Km и Cm при МИК > 2,5 мкг/мл и к Am при > 1,0 мкг/мл [277; 281]. Результаты представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Результаты определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к канамицину, амикацину и капреомицину бактериологическим и молекулярно-генетическими методами

Гены <i>rrs/eis</i>	Лекарственная чувствительность <i>M.tuberculosis</i>					Количество изолятов (n=114)
	Km		Cm		Am	
	среда Л-Й 30,0/50,0 мкг/мл	Bactec > 2,5 мкг/мл	среда Л-Й 30,0/50,0 мкг/мл	Bactec > 2,5 мкг/мл	Bactec > 1,0 мкг/мл	
<i>rrs(a1401g)</i>	R/R	>10,0 до >80,0	R/R	5,0 до 20,0	> 64,0	8 (7,0%)
	R/R	>10,0 до >80,0	R/S	5,0 до 20,0	> 64,0	25 (21,9%)
	R/R	>10,0 до >80,0	S/S	5,0 до 10,0	> 64,0	11 (9,6%)
<i>eis(g-10a)</i>	R/R	20,0	S/S	1,25	1,0	1 (0,9%)
	R/S	10,0	S/S	1,25-2,5	0,5-1,0	2 (1,8%)
	S/S	5,0	S/S	1,25 и 2,5	0,25 и 1,0	6 (5,3%)
<i>eis(c-14t)</i>	R/R	20,0 до 40,0	S/S	1,25 до 2,5	1,0	5 (4,4%)
	R/S	20,0	S/S	1,25	0,25	1 (0,9%)
<i>eis(g-37t)</i>	R/R	10,0	S/S	1,25	0,25	1 (0,9%)
	R/S	5,0 до 10,0	S/S	1,25	0,25 до 1,0	3 (2,6%)
	S/S	5,0	S/S	1,25	0,25 до 1,0	4 (3,5%)
<i>eis(c-12t)</i>	R/S	5,0	S/S	1,25	0,5	1 (0,9%)

Продолжение таблицы 20

Гены <i>rrs/eis</i>	Лекарственная чувствительность <i>M.tuberculosis</i>					Количество изолятов (n=114)
	Km		Sm		Am	
	среда Л-Й 30,0/50,0 мкг/мл	Vactec > 2,5 мкг/мл	среда Л-Й 30,0/50,0 мкг/мл	Vactec > 2,5 мкг/мл	Vactec > 1,0 мкг/мл	
	S/S	1,25	S/S	1,25	0,5	2 (1,8%)
нет мутаций	S/S	0,63 до 2,5	S/S	0,63 до 1,25	0,25 до 1,0	43 (37,7%)
	R/R	2,5	R/S	1,25	1,0	1 (0,9%)
<i>H37Rv</i>		2,5		2,5	1,0	

Из таблицы 20 следует, что для 44/114 (38,6%) изолятов с мутацией a1401g в гене *rrs* в жидкой среде установлены высокие значения МИК Km и Am (МИК >10,0 мкг/мл – >80,0 мкг/мл и >64,0 мкг/мл) и умеренные для Sm (5,0 мкг/мл – 20,0 мкг/мл), что свидетельствует о том, что данная мутация приводит к перекрёстной устойчивости к этим препаратам.

Среди штаммов МБТ с мутациями в промоторной области гене *eis*, проявляющие устойчивость только к Km, 24 изолята определены в системе Vactec MGIT 960 и лишь 15/114 (13,2%) на среде Л-Й. Для изолятов с заменами g(-10)a, g(-37)t и c(-12)t диапазон значений МИК составил от 5,0 мкг/мл до 20,0 мкг/мл, что соответствовало низкому уровню устойчивости к Km, в отличие от изолятов с c(-14)t, значения МИК которых соответствовал умеренной степени устойчивости (20,0 мкг/мл – 40,0 мкг/мл). Надо отметить, что все изоляты с мутациями в *eis* были также чувствительными к Am (область значений МИК составила 0,25 мкг/мл – 1,0 мкг/мл). Два изолята (1,8%) с мутацией c(-12)t как на плотной, так и в жидкой среде был чувствительным к Km, Sm и Am. Ранее установлено, что некоторые изоляты с этой мутацией остаются чувствительными к Km [356].

Напротив, другой штамм без мутаций и устойчивый к Km и Sm на среде Л-Й, в жидкой оказался чувствительным ко всем препаратам.

Совпадение между результатами ЛЧ к Km и Sm в системе Vactec MGIT 960 и МГМ составило 98,2% (95% ДИ 93,8-99,5) и 100% (95% ДИ 96,7-100) соответственно, что выше по сравнению со средой Л-Й – 88,6% (95% ДИ 81,5-93,2) и 89,5% (95% ДИ 82,5-93,9). Этот факт подтверждает недостаточную

эффективность МАК с использованием среды Л-Й для определения ЛЧ к данным препаратам.

Совпадение результатов между бактериологическими методами для Км составило 92,1% (95% ДИ 85,7-95,8), для Сm 90,4% (95% ДИ 83,5-94,5).

Таким образом, разработанная методика на основе ПЦР-SSCP позволяет эффективно проводить «косвенное» определение генетических детерминант устойчивости к Км 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 результате проведённого исследования установлено, что развитие устойчивости МБТ к Км связано с мутациями в двух генах – *rrs* и *eis*, выявление которых позволяет более точно проводить молекулярное определение ЛЧ МБТ к этому препарату. Мутации в гене *eis* не связаны с развитием устойчивости к Сm и Am.

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

В практике микробиологических лабораторий фтизиатрического профиля, наряду с другими молекулярными технологиями, стали широко применяться тест-системы гибридизационного анализа «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» для быстрого определения ЛЧ МБТ к H, R (выявление МБТ-МЛУ) и ФХ. Полученные результаты исследования, а также данные из литературы демонстрирующие, что нарастание ЛУ МБТ к ПТП и АБП связано с вовлечением новых мутаций либо в известных генах-мишенях, либо в других бактериальных генах или межгенных регионах способствовали появлению нового теста «ТБ-ТЕСТ». Тест-система сертифицирована для использования в диагностике туберкулёза и позволяет одновременно определять расширенный спектр мутаций (суммарно 116 генетических детерминант устойчивости), ответственных за развитие ЛУ к основным препаратам первого (H, R, Emb) и второго (ФХ, АГ и Сm)

ряда в диагностическом материале и культурах, а также устанавливать генотипы наиболее эндемичных для РФ штаммов (Таблица 21).

Таблица 21 – Генетические детерминанты устойчивости *M.tuberculosis* к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам, аминогликозидам/капреомицину, определяемые с помощью «ТБ-ТЕСТ»

Препарат	Гены	Количество мутаций
Рифампицин	<i>rpoB</i>	28
Изониазид	<i>katG</i>	11
	<i>inhA</i>	5
	<i>ahpC</i>	5
Этамбутол	<i>embB</i>	23
Фторхинолоны	<i>gyrA</i>	15
	<i>gyrB</i>	23
Аминогликозиды/капреомицин	<i>rrs</i>	4
	<i>eis</i>	6

Методика основана на одностадийной мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на биочипе. На рисунке 11 представлена гибридизационная картина штамма МБТ с ШЛУ, принадлежащего к генотипу *Beijing*.

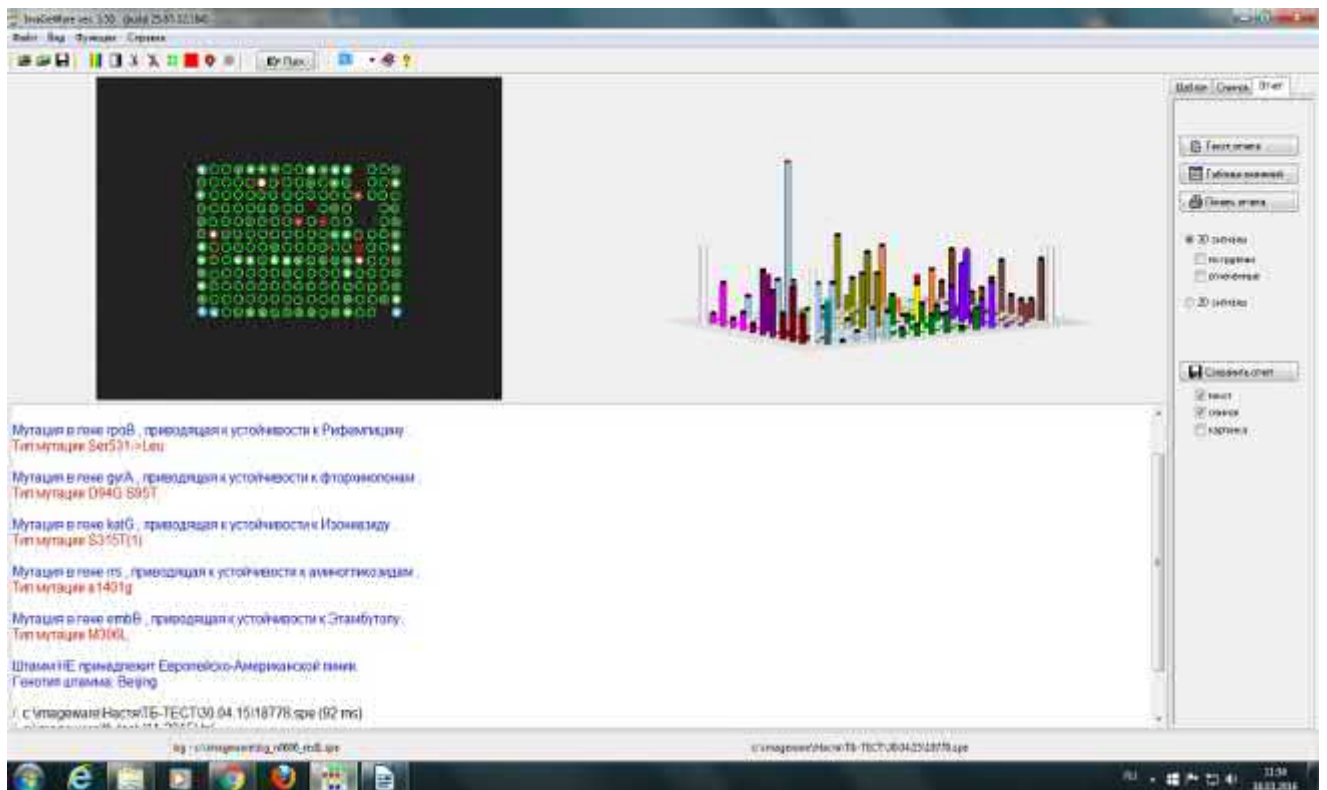


Рисунок 11 – Анализ гибридизационной картины биочипа «ТБ-ТЕСТ» с помощью программного обеспечения (гибридизационная картина штамма *M.tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью, принадлежащий к линии *Beijing*)

Для определения диагностических характеристик «ТБ-ТЕСТ» при исследовании респираторного материала нами была проведена её апробация. В

ретроспективное исследование были включены 152 образца диагностического материала (мокрота и бронхиальные смывы) полученные от 111 пациентов больных туберкулёзом лёгких до начала лечения. Критерии включения диагностического материала: результат люминесцентной микроскопии, ЛЧ (генотип ЛЧ) с помощью «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и выделение культуры МБТ в системе Bactec MGIT 960 с последующим определением ЛЧ к ПТП I и II ряда на среде Л-Й.

Как сказано выше (гл.2.1) бактериовыделение у пациентов (выявление КУМ) в лабораторной диагностике туберкулёза оценивают по результатам микроскопии. Для определения диагностической чувствительности и специфичности (выявление ДНК МБТ) «ТБ-ТЕСТ» в исследуемом диагностическом материале полученные результаты исследования сравнивали с данными микроскопии (таблица 22).

Таблица 22 – Результаты исследования диагностического материала с помощью «ТБ-ТЕСТ»

Результаты ТБ-ТЕСТ	Количество образцов (n,%)					
	ЛЮМ+ (n=103)		ЛЮМ- (n=49)		Всего	
	абс.	% (95% ДИ %-%)	абс.	% (95% ДИ %-%)	абс.	%
ДНК МБТ+	103	100,0 (96,4-100)	49	100,0 (92,7-100)	152	100

Как видно из таблицы 22, ДНК МБТ была выявлена (по специфичной для *M.tuberculosis complex* многокопийной последовательности IS6110) во всех 152 образцах как с положительными (103 образца), так и с отрицательными результатами микроскопии (49 образцов), что говорит о достоверно большей чувствительности ($p<0,001$) тест-системы «ТБ-ТЕСТ» по сравнению с люминесцентной микроскопией, которая подтверждена результатами роста МБТ в Bactec MGIT 960 во всех исследуемых образцах.

Однако получить полноценную гибридационную картину определения генотипа ЛЧ удалось в 125 из 152 (82,2%) образцах, что достоверно ($p<0,001$) ниже по сравнению с тест-системами «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2», с

помощью которых ЛЧ была определена во всех исследуемых образцах (Таблица 23).

Таблица 23 – Определение генотипа лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* в диагностическом материале с помощью «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ»

Результаты ТБ-БИОЧИП-1, ТБ-БИОЧИП-2	Результаты ТБ-ТЕСТ (n=152)			
	Генотип ЛЧ +		Генотип ЛЧ -	
	абс.	% (95% ДИ %-%)	абс.	% (95% ДИ %-%)
Генотип ЛЧ (n=152)	125	82,2 (75,4-87,5)	27	17,8 (12,5-24,6)

Этот факт подтверждается результатами анализа аналитической чувствительности «ТБ-ТЕСТ» в мокроте, проведённой разработчиками [10].

В результате, с помощью «ТБ-ТЕСТ» ДНК МБТ была обнаружена в диагностическом материале у всех 111 пациентов, из которых у 95 (85,6%) определена ЛЧ к пяти препаратам. У 69/95 (72,6%) ЛЧ определена однократно и у 26/95 (27,4%) один и тот же генотип ЛЧ в 2 и 3 образцах.

Сведения о частоте повторного выделения МБТ с идентичным генотипом у 26 больных представлены в таблица 24.

Таблица 24 – Частота повторного обнаружения отдельных генотипов лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* в диагностическом материале с помощью «ТБ-ТЕСТ» у 26 пациентов

Генотипы МБТ					Кратность выявления и число пациентов		Число больных обследованных повторно	
<i>rpoB</i>	<i>katG/inhA/oxvR</i>	<i>embB</i>	<i>gyrA/gyrB</i>	<i>rrs/eis</i>	2 раза	3 раза	абс.	%
wt	wt	wt	wt	wt	10	1	11	42,3
wt	S315T	wt	wt	wt	1	—	1	3,85
D516V	wt	wt	D94H S95T	wt	1	—	1	3,85
S513L	S315T	M306V	D94G S95T	c(-14)t	—	1	1	3,85
S513L	S315T	M306V	wt	wt	3	—	3	11,5
S513L	S315T	N296H M306I1	S91P S95T	a1401g	—	1	1	3,85

Продолжение таблицы 24

Генотипы МБТ					Кратность выявления и число пациентов		Число больных обследованных повторно	
<i>rpoB</i>	<i>katG/inhA/oxuR</i>	<i>embB</i>	<i>gyrA/gyrB</i>	<i>rrs/eis</i>	2 раза	3 раза	абс.	%
S513L	S315T	M306I3	wt	c(-14)t	1	—	1	3,85
S513L	S315T	G406A	D94Y S95T	wt	1	—	1	3,85
S513L	S315T	D354A	D94Y S95T	g(-37)t	1	—	1	3,85
S513L	S315T	D354A	D94G S95T	g(-37)t	1	—	1	3,85
S513L	c(-15)t	M306V	D94Y S95T	a1401g	—	1	1	3,85
S513L	S315T c(-15)t	wt	D94G S95T	wt	1	—	1	3,85
S513L	S315T c(-15)t	M306V	D94A S95T	a1401g	1	—	1	3,85
S513L	S315T c(-15)t	N296H	wt	a1401g	1	—	1	3,85
ВСЕГО					22	4	26	100
					84,6%	15,4%		

Результаты исследования показали, что из 26 пациентов двукратно выделяли один и тот же генотип МБТ 22 больных (84,6%), трёхкратно – 4 (15,4%). В 11 (42,3%) случаях это был генотип чувствительного штамма МБТ, в 3 (11,5%) МБТ-МЛУ устойчивого 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 определён генотип МБТ-ШЛУ и у 4 (15,4%) пре-ШЛУ.

Фенотипический профиль ЛЧ МБТ 95 культур МБТ был следующим: 31 (32,6%) изолят обладал чувствительностью к H, R, Ofx, Km, Cm и Emb, 9 (9,5%) были монорезистентные только к H и 2 (2,1%) к H и Km, 15 (15,8%) с МЛУ, 27 (28,4%) пре-ШЛУ и 11 (11,6%) ШЛУ. Результаты определения ЛЧ к исследуемым препаратам с помощью бактериологических методов и «ТБ-ТЕСТ» представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Сравнение результатов определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к основным препаратам первого и второго ряда с помощью бактериологических методов и «ТБ-ТЕСТ»

Фенотипическая категория	Профиль лекарственной чувствительности	Бактериологическое определение лекарственной чувствительности	ТБ-ТЕСТ	Совпадение результатов (%)
Чувствительные (n=31)	R ⁺ H ⁺ ФХ ⁺ АГ ⁺	31	34	91,2
Монорезистентные (n=9)	H ⁺	9	6	66,7
Полирезистентные (n=2)	H ⁺ АГ ⁺	2	1	50
	R ⁺ ФХ ⁺	-	1	
МЛУ (n=13)	R ⁺ H ⁺	15	11	73,3
Пре-ШЛУ (n=26)	R ⁺ H ⁺ ФХ ⁺	17	11	64,7
	R ⁺ H ⁺ АГ ⁺	10	14	71,4
ШЛУ (n=14)	R ⁺ H ⁺ ФХ ⁺ АГ ⁺	11	17	64,7
Всего		95	95	100

Как видно из таблицы 25, наибольшее расхождение между результатами «ТБ-ТЕСТ» и микробиологическим определением ЛЧ были получены среди монорезистентных к Н и полирезистентных МБТ. Это связано с тем, что в четырёх образцах пациентов с помощью «ТБ-ТЕСТ» генетические детерминанты устойчивости к Н не были обнаружены; из них три фенотипически были монорезистентные к препарату и один обладал МЛУ и устойчивостью к Ofx. Необходимо отметить, что такие же результаты в этих образцах были получены с помощью «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2». Возможно это связано с гетерогенностью популяции МБТ в диагностическом материале и превалированием чувствительных к препарату штаммов над устойчивыми, и как следствие с помощью биочипов мутации не определились [106] или наличием мутаций в других регионах генов *katG* и *inhA*, в другом гене *kasA*, которые не включены в биочипы. Кроме того, из литературы известны расхождения в результатах определения ЛЧ к Н и R между двумя фенотипическими методами Bactec 460 и Bactec MGIT 960 и молекулярно-генетическими методами [43].

Также, при сопоставлении данных бактериологического и молекулярно-генетического определения ЛЧ отмечены различия между

штаммами, отнесёнными к категориям МЛУ, пре-ШЛУ и ШЛУ. По данным генотипирования ЛЧ наблюдается увеличение числа штаммов МБТ-ШЛУ за счёт уменьшения МБТ-МЛУ. Это связано с описанными выше проблемами определения ЛЧ к препаратам II ряда на среде Л-Й.

Далее проведён анализ полученных результатов с помощью «ТБ-ТЕСТ» и бактериологическими методами к каждому препарату. Данные по обнаруженным детерминантам устойчивости представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Результаты определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам с помощью бактериологических методов и «ТБ-ТЕСТ» в 95 образцах диагностического материала

Препарат/ Ген мутации	Фенотипическая категория		Препарат/ ген мутации	Фенотипическая категория	
	устойчивые	чувствительные		устойчивые	чувствительные
Рифампицин/rpoB			Изониазид/katG,inhA,ahpC		
S531L	47	-	S315T	43	-
D516V	2	-	S315T, c(-15)t	13	-
D516G	1	-	S315T, t(-8)g	1	-
L533P	-	1	S315T, I335V	1	-
H526N, L511P	1	-	c(-15)t	2	-
H526N, L533P	1	-	Всего мутаций	60	-
H526Y, L511P	1	-			
Всего мутаций	53	1	Нет мутаций (wt)	4	31
Нет мутаций (wt)	-	41			
Чувствительность % (95% ДИ %-%)	100 (93,2-100)		Чувствительность % (95% ДИ %-%)	93,8 (85,0-97,5)	
Специфичность % (95% ДИ %-%)	97,6 (87,7-99,6)		Специфичность % (95% ДИ %-%)	100 (89,0-100)	
Предсказательная ценность положительного результата % (95% ДИ %-%)	98,2 (90,2-99,7)		Предсказательная ценность положительного результата % (95% ДИ %-%)	100,0 (94,0-100,0)	
Предсказательная ценность отрицательного результата % (95% ДИ %-%)	100 (91,4-100)		Предсказательная ценность отрицательного результата % (95% ДИ %-%)	88,6 (74,1-95,5)	

Продолжение таблицы 26

Препарат/ Ген мутации	Фенотипическая категория		Препарат/ ген мутации	Фенотипическая категория	
	устойчивые	чувствительные		устойчивые	чувствительные
Этамбутол/<i>embB</i>			Фторхинолоны (офлоксацин)/<i>gyrA, gyrB</i>		
M306V	16	2	D94G	9	1
D354A	4	2	D94A	5	1
G406A	2	-	D94N	2	-
M306I1	3	-	D94Y	3	-
M306I3	-	2	D94H	2	-
N296H	4	3	A90V	-	1
Q497R	3	1	S91P	2	-
Y319S	1	-	S91P, A74S	1	-
M306I1, N296H	1	-	D500N	1	-
M306I1, Q497K	1	-	E540D(2)	-	1
Всего мутаций	35	10	Всего мутаций	25	4
Нет мутаций (wt)	3	47	Нет мутаций (wt)	1	65
Чувствительность % (95% ДИ %-%)		92,1 (79,2-97,3)	Чувствительность % (95% ДИ %-%)		96,2 (81,1-99,3)
Специфичность % (95% ДИ %-%)		82,5 (70,6-90,2)	Специфичность % (95% ДИ %-%)		94,2 (86,0-97,7)
Предсказательная ценность положительного результата % (95% ДИ %-%)		77,8 (63,7-87,5)	Предсказательная ценность положительного результата % (95% ДИ %-%)		86,2 (69,4-94,5)
Предсказательная ценность отрицательного результата % (95% ДИ %-%)		94,0 (83,8-97,9)	Предсказательная ценность отрицательного результата % (95% ДИ %-%)		98,5 (91,9-99,7)
Канамицин/<i>rrs, eis</i>			Капреомицин/<i>rrs, eis</i>		
a1401g	13	-	a1401g	12	1
c(-14)t	4	1	c(-14)t	-	5
c(-12)t	1	2	c(-12)t	-	3
g(-10)a	1	2	g(-10)a	-	3
g(-37)t	4	4	g(-37)t	-	8
Всего мутаций	23	9	Всего мутаций в <i>rrs</i>	12	1
Нет мутаций (wt)	3	60	Нет мутаций в <i>rrs</i>	1	81
Чувствительность % (95% ДИ %-%)		88,5 (71,0-96,0)	Чувствительность % (95% ДИ %-%)		92,3 (66,7-98,6)

Продолжение таблицы 26

Препарат/ Ген мутации	Фенотипическая категория		Препарат/ Ген мутации	Фенотипическая категория	
	устойчивые	чувствительные		устойчивые	чувствительные
Специфичность % (95% ДИ %-%)	87,0 (77,0-93,0)		Специфичность % (95% ДИ %-%)	98,8 (93,4-99,8)	
Предсказательная ценность положительного результата % (95% ДИ %-%)	71,9 (54,6-84,4)		Предсказательная ценность положительного результата % (95% ДИ %-%)	92,3 (66,7-98,6)	
Предсказательная ценность отрицательного результата % (95% ДИ %-%)	95,2 (86,9-98,4)		Предсказательная ценность отрицательного результата % (95% ДИ %-%)	98,8 (93,4-99,8)	

Сопоставление данных, полученных «ТБ-ТЕСТ» с бактериологическими результатами в Bactec MGIT 960 для препаратов первого ряда - R, H и Emb показало высокое совпадение методов для R, составившее составило 99,0% (95% ДИ 94,3-99,8). Чувствительность теста составила 100% (95% ДИ 93,2-100), специфичность 97,6% (95% ДИ 87,7-99,6), за счёт выявленной мутации L533P в фенотипически чувствительной МБТ к препарату. В исследуемых образцах преобладала замена S531L, обнаруженная в 47/54 (87,0%) случаях, в 3 (5,6%) выявлены двойные замены в 526, 533 и 511 кодонах и ещё в 3 (5,6%) в 516 кодоне.

Устойчивость МБТ к H определена в 64/95 (67,4%) образцах, из которых мутации выявлены в 60/64 (93,8%). Наиболее часто определяемая замена была S315T в гене *katG* выявленная в 43/60 (71,7%) образцах. Далее по частоте встречаемости были двойные замены S315T в *katG* и c(-15)t в *inhA* генах, обнаруженные в 13/60 (21,7%) образцах. В 4 (6,3%) образцах мутации в ДНК обнаружены не были, однако МБТ обладали устойчивостью к H, возможной причиной которого является присутствие чувствительных и устойчивых к препарату микобактерий в диагностическом материале. Чувствительность и специфичность теста в мокроте составила 93,8% (95% ДИ 85,0-97,5) и 100% (95% ДИ 89,0-100) соответственно. Совпадение результатов между методами - 95,8% (95% ДИ 89,7-98,4).

«ТБ-ТЕСТ» позволяет выявлять 22 типа мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к Emb в кодонах 296 – 497 гена *embB*. В этом фрагменте гена генетические детерминанты устойчивости были обнаружены в 35/38 (92,1%) устойчивых и 10/57 (17,5%) чувствительных МБТ. В двух образцах двойные замены были обнаружены только в устойчивых МБТ к препарату. Наиболее часто встречаемой была мутация M306V, выявленная в 16/38 (42,1%) устойчивых и 2/57 (3,5%) чувствительных изолятах.

Чувствительность теста в мокроте составила 92,1% (95% ДИ 79,2-97,3), специфичность 82,5% (95% ДИ 70,6-90,2), в то время как предсказательная ценность положительного результата составила всего 77,8%, что заметно ниже по сравнению с результатами для R и H. Это во многом связано с тем, что воспроизводимость результатов бактериологического определения ЛЧ МБТ к Emb низкая [152; 214]. Возможно генетический анализ лучше прогнозирует истинную устойчивость возбудителя туберкулёза к препарату [161; 235; 284].

Надо отметить, что мутации были выявлены в 45 (100%) образцах мокроты, из которых выделенные культуры обладали МЛУ в 11/13 (84,6%), пре-ШЛУ в 20/26 (76,9%) и ШЛУ во всех 14 (100,0%) изолятах. Напротив, мутации отсутствовали в тех образцах, из которых выделенные культуры были чувствительными к H и R (31/31, 100%), монорезистентными к H (9/9, 100%) и полирезистентными (2/2, 100%). Совпадение результатов для Emb составило 86,3% (95% ДИ 78,0-91,8).

Сопоставление данных, полученных «ТБ-ТЕСТ» с бактериологическими результатами методом МАК на среде Л-Й для препаратов резервного ряда (Ofx, Km и Cm) показало несколько сниженную конкордантность, связанную с недостаточной эффективностью МАК в диагностике ЛЧ. Мутации в генах *gyrA* и *gyrB*, ответственные за устойчивость к ФХ, выявлены в 25/26 (96,2%) резистентных к Ofx МБТ и 4/69 (5,8%) чувствительных. Замены в гене *gyrA* преобладали и были обнаружены в 27/29 (93,1%) образцах, из которых наиболее часто встречаемой была D94G, выявленная в 10/29 (34,5%). Мутации в *gyrB* определены лишь в 2 (6,9%) образцах. Однако, возможность их выявления

увеличила чувствительность теста с 92,3% до 96,2%, специфичность составила 94,2% (95% ДИ 86,0-97,7). Совпадение результатов для Ofx составило 94,7% (95% ДИ 88,3-97,7).

По данным бактериологического определения ЛЧ 26/95 (27,4%) МБТ обладали устойчивостью к Km и 13/95 (13,7%) к Cm. Мутация a1401g в гене *rrs* выявлена в 13/26 (50,0%) штаммов, устойчивых к Km, из которых в 12/13 (92,3%) случаев определена устойчивость к обоим препаратам и в одном только к Km. Замены в гене *eis* обнаружены в 10/26 (38,5%) устойчивых к Km и 9/26 (34,6%) чувствительных МБТ, в то же время эти мутации не приводили к устойчивости к Cm. Тем не менее, дополнительное исследование промоторной области гена *eis* сделало возможным увеличить чувствительность теста для Km с 50,0% до 88,5%, специфичность для Km и Cm составила 87,0% и 98,8% соответственно.

Совпадение результатов между методами для Km и Cm составило 87,4% (95% ДИ 79,2-92,6) и 97,9% (95% ДИ 92,7-99,4) соответственно. Полученные данные свидетельствуют о низкой эффективности определения ЛЧ МБТ к Km на среде Л-Й.

«ТБ-ТЕСТ» также 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 (выявления очагов туберкулёзной инфекции и путей её распространения, особенно трансмиссии мультирезистентных штаммов, как правила, связанных с семейством *Beijing*), осуществления разграничения случаев экзогенной инфекции и эндогенной реактивации туберкулёза, а также лабораторной кросс-контаминации [306]. Согласно полученным результатам, генотип *Beijing* был определен в 66,3% изолятов, включая подсемейство B0/W148, характеризующееся высокой вирулентностью, трансмиссивностью и ассоциацией с ЛУ [197; 240; 253]. В меньшей степени представлены семейства, принадлежащие к «Европейско-Американскому типу» (13,7%), из которых 5,3% относились к *Haarlem*, 11,6% к *Ural* и 8,4% к *LAM* (Рисунок 12).

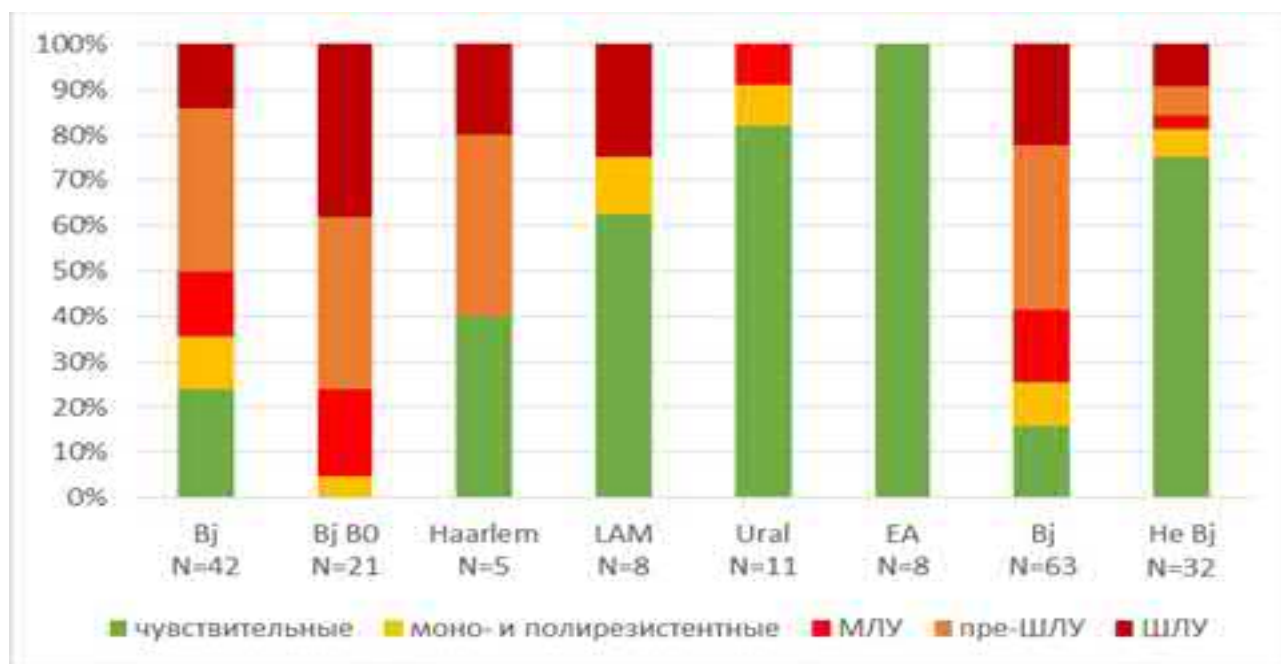


Рисунок 12 – Ассоциация выявленных генетических семейств с лекарственной чувствительностью МБТ. Профиль лекарственной чувствительности отмечен цветами.

Из всех изолятов, принадлежащих к семейству *Beijing*, 33,3% относилось к кластеру B0/W148, определение которого фактически означало выявление МЛУ, пре-ШЛУ и ШЛУ МБТ. Напротив, изоляты, принадлежащие к Европейско-Американской линии были ассоциированы с чувствительными МБТ.

Таким образом, установлено, что «ТБ-ТЕСТ» обладает сопоставимой чувствительностью с «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» при детекции ДНК МБТ в клиническом материале и достоверно ($p < 0,001$) меньшей (на 17,8%) при определении генотипа ЛЧ. При сопоставлении результатов определения ЛЧ бактериологическими методами с идентификацией генетических детерминант устойчивости МБТ в диагностическом материале, тест-система «ТБ-ТЕСТ» показала высокую чувствительность, специфичность, предсказательную ценность положительного и отрицательного результата для R и H, однако для Emb, ФХ (Ofx), Km и Sm эти параметры оказались ниже. Определение ЛЧ МБТ бактериологическими методами чаще всего проводится с помощью установленных КК каждого препарата, которая варьирует в зависимости от состава используемой питательной среды. Из-за недостаточной стандартизации отдельных методов и критериев оценки ЛЧ результаты чувствительности нередко

расходятся между различными методами и следовательно с молекулярными тестами [61; 191; 192; 275]. Это требует проведения дальнейших исследований по определению корреляции между молекулярно-генетическим определением ЛЧ к этим препаратам и другими бактериологическими методами.

ГЛАВА 3. Изучение эффективности молекулярно-генетических технологий и оптимизация их применения в лабораторной диагностике туберкулёза

В настоящее время во фтизиатрии молекулярно-генетические методы стали неотъемлемой частью диагностических протоколов микробиологических лабораторий и играют решающую роль в быстром выявлении ДНК возбудителя туберкулёза и определении его ЛЧ к АБП.

На сегодняшний день для практического применения используются различные тест-системы, но особое внимание заслуживают три молекулярно-генетические технологии, предназначенные для детекции большинства или наиболее распространённых мутаций в генах-мишенях действия препаратов: катридная технология на основе ПЦР-РВ («Xpert MTB/RIF»), тест-системы гибридизационного анализа на стрипах («Genotype MTBDR*plus*», «GenoType MTBDR*sl*») и биочипах («ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ»).

Исходя из технических характеристик, каждая из технологий имеет свои преимущества. Так, тест-система «XpertMTB/RIF» отличается скоростью получения результата (время полного цикла исследования занимает 2,5 часа) и исключает этапы длительной пробоподготовки диагностического материала и электрофореза во время визуализации ДНК, которые связаны с риском контаминации во время этих процессов. Однако, она позволяет определять генетические детерминанты ЛУ (мутации) только к R в гене *rpoB* МБТ. В то же время, тест-системы на основе гибридизационного анализа, несмотря на более длительные (но всё-таки небольшие) сроки получения результата (48 часов), позволяют определять мутации в генах, ответственных за устойчивость в совокупности к трём («ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2»), пяти («GenoTypeMTBDR*plus*» и «GenoType MTBDR*sl*») или одновременно к пяти препаратам («ТБ-ТЕСТ»).

Изучение их эффективности в выявлении и определении ЛЧ МБТ в первую очередь в респираторном материале, а также определение их «места» в

ускоренной лабораторной диагностике туберкулёза (в комплексе с бактериологическими методами) остаётся актуальной проблемой.

3.1. Эффективность применения тест-систем «Xpert MTB/RIF», «ТБ-БИОЧИП-1» и «GenoType MTBDRplus» для исследований респираторного материала пациентов

Для сравнения эффективности тест-систем в выявлении ДНК МБТ в респираторном материале и определении генетических детерминант устойчивости к R и/или H исследование выполняли в комплексе с бактериологическими методами из одной порции осадка диагностического материала, полученного после деконтаминации в соответствии с рекомендациями CDC [189]. ЛЧ МБТ к препаратам определяли в жидкой среде М7Н9 с использованием системы Bactec MGIT 960 в КК 1,0 мкг/мл и 0,1 мкг/мл соответственно [296]. Выделение ДНК МБТ в образцах и интерпретацию результатов с помощью биочипов и стрипов, проводили согласно прилагаемым инструкциям производителей данных тест-систем. В соответствии с руководством производителя об использовании тест-системы «GenoType MTBDRplus» проводили тестирование проб диагностического материала только с положительным результатом микроскопии. Полученные результаты сравнивали с данными люминесцентной микроскопии и роста микобактерий в жидкой среде М7Н9 в автоматизированной системе Bactec MGIT 960.

В этом разделе исследований изучены 278 респираторных образцов (151 мокрота и 126 бронхиальных смывов), полученных от 263 пациентов, из которых 206 были больные туберкулёзом и 57 пациентов с подозрением на это заболевание из клиник Центра и противотуберкулёзных диспансеров (ПТД) № 13, 17, 21 г. Москвы (в настоящее время филиалов Центра) до начала химиотерапии.

3.1.1. Выявление ДНК МБТ в мокроте с помощью молекулярно-генетических технологий

Сравнительные данные о результатах выявления ДНК МБТ в мокроте с помощью «XpertMTB/RIF», «ТБ-БИОЧИП-1» и «GenoTypeMTBDRplus» представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Выявление кислотоустойчивых микобактерий и ДНК *M.tuberculosis* в мокроте

Результаты микроскопии (n = 137)	Результаты исследования (n = 137)							
	Хpert MTB/RIF		ТБ-БИОЧИП-1		MTBDR ¹		Рост МБ (Bactec MGIT 960)	
	абс.	% (95% ДИ %-%)	абс.	% (95% ДИ %-%)	абс.	% (95% ДИ %-%)	абс.	% (95% ДИ %-%)
Положительный (един., 1+, 2+, 3+) (n=32)	30	93,8 (79,5-98,3)	29	90,6 (75,8-96,8)	25	78,1 (61,2-89)	32*	100 (89,3-100)
Отрицательный (n=105)	17	16,2 (10,4-24,4)	11	10,5 (5,9-17,8)	–	–	23**	21,9 (15,1-30,7)
Всего (n=137)	47	34,3 (26,9-42,6)	40	29,2 (22,2-37,3)	25	18,2 (12,7-25,5)	55	40,1 (32,3-48,5)

Примечание: ¹ – GenoType MTBDRplus; * из них 1 – *M.fortuitum*, 1 – *M.avium complex*; ** из них 2 – *M.chelonae*

Из 151 образца мокроты 14 не вошли в сравнительный анализ, так как их посева в Bactec MGIT 960 были подвержены микробной контаминации. В то же время они были исследованы молекулярно-генетическими тестами, результаты которых описаны ниже.

Как видно из таблицы 27, тест-система «Хpert MTB/RIF» обладает достоверно большей чувствительностью ($p < 0,001$), чем «ТБ-БИОЧИП-1» и «GenoType MTBDRplus». В 32 образцах (с положительным результатом микроскопии) с помощью «Хpert MTB/RIF» ДНК МБТ обнаружена в 30 (93,8%), с «ТБ-БИОЧИП-1» в 29 (90,6%) и с «GenoType MTBDRplus» в 25 (78,1%) случаев. В 105 образцах с отрицательным результатом микроскопии эти показатели составили: 17 (16,2%) с помощью «Хpert MTB/RIF» и 11 (10,5%) с «ТБ-БИОЧИП-1».

Рост КУМ на жидкой среде М7Н9 был обнаружен в 55 (40,1%) случаях, из которых 51 (37,2%) культура идентифицирована как *M.tuberculosis complex*, а 4 – как НТМБ (*M.fortuitum* – 1, *M.avium complex* – 1 и *M.chelonae* – 2). С помощью

люминесцентной микроскопии КУМ были обнаружены в 32 (23,4%) образцах мокроты.

Установлено, что высокие показатели совпадения были получены при сравнении результатов исследования образцов мокрот с положительными данными микроскопии и ростом МБТ на жидкой среде для всех трёх тест-систем и составили 100% для «Хpert МТВ/RIF», 96,7% для «ТБ-БИОЧИП» и 83,3% для «GenoType МТВDRplus». Для образцов мокроты с отрицательными данными микроскопии, но наличием роста возбудителя туберкулёза совпадение результатов для «Хpert МТВ/RIF» и для «ТБ-БИОЧИП-1» составили 80,9% и 52,4% соответственно (Таблица 28).

Таблица 28 – Результаты совпадения выявления *M.tuberculosis* в образцах мокроты с отрицательной и положительной микроскопией с помощью молекулярно-генетических тест-систем и в Bactec MGIT 960

Молекулярно-генетические тесты	Количество образцов с положительной микроскопией и ростом МБТ в Bactec MGIT 960 (n=30)	Совпадение результатов (%)	Количество образцов с отрицательной микроскопией и ростом МБТ в Bactec MGIT 960 (n=21)	Совпадение результатов (%)
ХpertMTB/RIF	30	100%	17	80,9%
ТБ-БИОЧИП-1	29	96,7%	11	52,4%
MTBDRplus	25	83,3%	-	-

При сравнении результатов бактериологического выделения МБТ в Bactec MGIT 960 и молекулярно-генетических тест-систем установлено, что при использовании «Хpert МТВ/RIF» ДНК МБТ выявлена в наибольшем проценте случаев – 47 из 51 (92,2%) образца, «ТБ-БИОЧИП-1» - 40 (78,4%) и 25 (49,0%) - «GenoType МТВDRplus». В образцах мокроты, в которых обнаружен рост НТМБ (*M.fortuitum*, *M.chelonae*, *M.avium complex*), ДНК МБТ ни одной из трёх молекулярных тест-систем не выявлена. Таким образом, чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительного и отрицательного результата составили: для «Хpert МТВ/RIF» - 92,2% (ДИ 81,5%-96,9%), 100% (ДИ 95,7%-100%), 100,0% (ДИ 92,4%-100%), 95,6% (ДИ 89,1-98,3%) соответственно;

для «ТБ-БИОЧИП-1» - 78,4% (ДИ 65,4%-87,5%), 100% (95,7%-100%), 100,0% (ДИ 91,2%-100%), 88,7% (ДИ 80,8%-93,5%) соответственно; для «GenoType MTBDR*plus*» - 49,0% (ДИ 35,9%-62,3%), 100% (95,7%-100%), 100,0% (ДИ 86,7%-100%), 79,8% (ДИ 68,2%-83,6%) соответственно.

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% [19].

Вместе с тем, жидкая среда M7H9, используемая в автоматизированной системе Bactec MGIT 960, не обладает селективными свойствами. По данным ряда авторов, контаминирование проб при посеве респираторного материала достигает от 9,0% до 16,7% [171; 335]. В настоящем исследовании 14 из 151 образцов мокроты (9,3%) подверглись контаминации и не вошли в анализ полученных результатов. Однако, с помощью «Xpert MTB/RIF» в 4 (28,6%) образцах (два с положительной и два с отрицательной микроскопией) у больных туберкулёзом из этой подгруппы была обнаружена ДНК МБТ. В двух ДНК выявлена в очень низкой концентрации и чувствительностью к R (**VL,RS**), из которых в одном с положительным результатом микроскопии (3/100 КУМ в поле зрения) и в другом с отрицательным. В двух других образцах с низкой концентрацией ДНК, а также наличием чувствительности к R (**L,RS**), в одном с отрицательным результатом микроскопии и в другом с положительным (5/100 КУМ в поле зрения). С помощью «ТБ-БИОЧИП-1» в этих образцах получен результат чувствительности МБТ к R и H. Таким образом, дополнительно в 4 образцах мокроты от больных туберкулёзом только молекулярно-генетические методы позволили вовремя выявить бактериовыделение, что продемонстрировало важность их использования в таких ситуациях.

3.1.2. Определение вариантов генетических детерминант устойчивости *M.tuberculosis* к рифампицину и/или изониазиду в образцах мокроты с помощью молекулярно-генетических технологий

Далее проведено сопоставление результатов молекулярного определения ЛЧ к R и/или H с помощью трёх тест-систем с данными о ЛЧ МБТ к препаратам, полученными в Bactec MGIT 960.

С помощью «Xpert MTB/RIF» молекулярно-генетическое определение ЛЧ МБТ к R удалось получить в 46/47 (97,9%) образцах мокроты. В одном образце, с отрицательным результатом микроскопии и ростом МБТ в Bactec MGIT 960, был получен результат о содержании ДНК МБТ в очень малом количестве и невозможности определения устойчивости к R. В 15/46 (32,6%) обнаружены генетические детерминанты устойчивости к R и в 31/46 (67,4%) они не выявлены. Совпадение с бактериологическим определением ЛЧ МБТ к препарату составило 100%.

С помощью «ТБ-БИОЧИП-1» в 38/40 (95,0%) образцах мокроты удалось определить чувствительность к H и R (Таблица 29). В 18/38 (47,4%) выявлена чувствительность к обоим препаратам как с помощью биочипов, так и в Bactec MGIT 960, в 6/38 (15,8%) монорезистентность к H на чипах и в 7/38 (18,4%) в Bactec MGIT 960; в 14/38 (36,8%) определены МБТ-МЛУ с помощью «ТБ-БИОЧИП-1» и в 13/38 (34,2%) бактериологическим методом. Совпадение с бактериологическим исследованием составило для чувствительных МБТ – 100,0%, монорезистентных к H – 85,7%, а с МЛУ – 92,8%. Расхождения связаны с тем, что в одном образце с фенотипической монорезистентностью МБТ к H выявлена мутация в гене *rpoB* (L533P), штаммы с которой определяются как чувствительные к R в Bactec MGIT 960 и как устойчивые на среде Л-Й [323]. Сведения о выявленных мутациях, связанных с устойчивостью к обоим препаратам в 20 образцах показаны в таблице 29.

Таблица 29 – Мутации и их комбинация в генах *rpoB*, *katG*, *inhA* и *oxyR-ahpC* *M.tuberculosis*, выделенных из мокроты пациентов (n=20)

Типы мутаций и их сочетание				
<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>oxyR-ahpC</i>	Количество образцов (n=38)
wt ¹	wt	wt	wt	18
wt	S315T	wt	wt	5
wt	S315T	c(-15)t*	wt	1
S531L	S315T	wt	wt	7
S531L	S315T	c(-15)t	wt	2
S531L	S315T	t(-8)a	wt	1
Q513L	S315T	t(-8)a	g(-6)a**	1
L533P	S315T	c(-15)t	wt	1
H526N L511P	S315T	wt	wt	1
S531L L533P	S315T	wt	wt	1

Примечание: ¹ wt – «дикий тип», * промоторная область *inhA*, ** межгенная область *oxyR-ahpC*

Мутация S315T в *katG* была обнаружена во всех монорезистентных к Н и МБТ с МЛУ (100%), в сочетании с c(-15)t в *inhA* в 4/20 (20%) образцах, из которых в 1 (25%) монорезистентном к Н и 3 (75%) с МЛУ. Среди микобактерий туберкулёза с МЛУ наиболее часто встречаемыми заменами были сочетание S531L в гене *rpoB* и S315T в гене *katG* 10/14 (71,4%), а также в трёх генах – S531L в *rpoB*, S315T в *katG* и c(-15)t или t(-8)a в *inhA* (14,3%). Необходимо отметить, что полученные данные встречаемости мутаций и их сочетаний в анализируемых генах при исследовании диагностического материала пациентов из Московского региона соответствует профилю мутаций в штаммах микобактерий туберкулёза, выявляемых в различных странах мира [195; 269; 355].

В двух образцах не удалось определить чувствительность к препаратам. В одном из них, с отрицательным результатом микроскопии и ростом МБТ в Bactec MGIT 960 была определена только инсерционная последовательность элемента *IS6110*, специфичная для *M.tuberculosis complex*. Сигналы в ячейках биочипа,

отвечающих за определение устойчивости к R и H, отсутствовали, что было обусловлено малым количеством ДНК в исходном образце.

В другом образце с положительным результатом микроскопии (1+) и ростом МБТ в Bactec MGIT 960 с помощью тест-системы «ТБ-БИОЧИП-1» была проведена идентификация МБТ (положительный сигнал по *IS6110*) и определена чувствительность к H, в то время как при выявлении чувствительности/устойчивости к R результат получить не удалось.

С помощью «GenoType MTBDR*plus*» чувствительность к R и H определена в 23/25 (92,0%) образцах мокроты. Для одного образца результат определения чувствительности/устойчивости к R оказался не интерпретируемым, для другого - к H. В 12 (52,2%) образцах определена чувствительность к обоим препаратам, в 3 (13,1%) монорезистентность к H и в 8 (34,8%) устойчивость к R и H (МБТ-МЛУ). Результаты совпали с данными бактериологического определения ЛЧ в Bactec MGIT 960 (Таблица 30).

Таблица 30 – Совпадение результатов определения чувствительности *M.tuberculosis* к рифампицину и изониазиду с помощью «Хpert MTB/RIF», «ТБ-БИОЧИП», «GenoType MTBDR*plus*» и Bactec 960 в образцах мокроты

Тест-системы	Bactec MGIT 960				
	R ^ч	R ^у	R ^ч H ^ч	H ^у	МЛУ
Хpert MTB/RIF (n=46)	31 (100)	15 (100)	-	-	-
«ТБ-БИОЧИП-1» (n=38)	-	-	18 (100)	6 (85,7)	14 (92,8)
GenoTypeMTBDR* (n=23)	-	-	12 (100)	3 (100)	8 (100)

Примечание: ¹ H – изониазид, R – рифампицин, ^у – устойчивый, ^ч – чувствительный, * – результаты молекулярного исследования совпали с «ТБ-БИОЧИП-1»

Кроме того, результаты молекулярно-генетического определения генетических детерминант устойчивости к H и R совпали между двумя тест-системами гибридизационного анализа.

Таким образом, тест-система «Хpert MTB/RIF» показала наибольшую эффективность в выявлении ДНК МБТ в образцах мокроты и соответственно определении генетических детерминант устойчивости к R, как суррогатному маркеру МБТ-МЛУ, обеспечивая автоматическое выполнение всех этапов

молекулярного исследования. В то же время H является высокоспецифичным ПТП, определение чувствительности МБТ к которому крайне важно для назначения адекватного лечения пациенту. В настоящем исследовании тест-система «ТБ-БИОЧИП-1» была более эффективна в выявлении ДНК МБТ в мокроте (78,4%) по сравнению с «GenoType MTBDR_{plus}» и, следовательно, одновременном определении чувствительности к двум основным ПТП. Монорезистентность к H определена в 15,8% случаев и в 36,8% МЛУ с помощью чипов и в таком же соотношении с помощью «GenoType MTBDR_{plus}» (13,1% и 34,8% соответственно).

3.1.3. Выявление ДНК МБТ в образцах бронхиальных смывов с помощью молекулярно-генетических технологий

Проведение диагностической бронхоскопии у пациентов является важным и обязательным этапом при диагностике туберкулёза. С целью определения эффективности молекулярных тест-систем по выявлению ДНК МБТ и определению генетических детерминант устойчивости к R и/или H в бронхиальных смывах проведено исследование 126 образцов (Таблица 31).

Таблица 31 – Выявление кислотоустойчивых микобактерий и ДНК *M.tuberculosis* в образцах бронхиальных смывов

Результаты микроскопии	Результаты молекулярно-генетических исследований (n = 126)						Рост МБ Bactec MGIT 960	
	Xpert MTB/RIF		ТБ-БИОЧИП-1		MTBDR		абс.	%
	абс.	% (95% ДИ %-%)	абс.	% (95% ДИ %-%)	абс.	% (95% ДИ %-%)		
Положительный (един., 1+ и 2+) (n=5)	5	100 (56,5-100)	4	80 (37,5-96,4)	2	40 (11,8-76,9)	5	100 (56,5-100)
Отрицательный (n=121)	15	12,4 (7,8-19,4)	1	0,8 (0,1-4,5)	-	-	13*	10,7 (6,4-17,5)
Всего (n=126)	20	15,9 (10,5-23,2)	5	4 (1,7-8,9)	2	1,6 (0,4-5,6)	18*	14,3 (9,2-21,4)

Примечание: * из них 1 – *M.kansasii* и 1 – *M.lentiflavum*

По данным микробиологического исследования в 18 (14,3%) из них был получен рост КУМ, из которых 16 (88,9%) были идентифицированы как МБТ и 2 как *M.kansasii* и *M.lentiflavum*. С помощью «Xpert MTB/RIF» ДНК МБТ выявлена

в 20 (15,9%) образцах, из которых в 14 (87,5%) результаты были подтверждены ростом МБТ в системе Bactec MGIT 960. В 6 образцах с отрицательным результатом роста и люминесцентной микроскопии ДНК МБТ была выявлена в очень малом количестве, 4 из этих образцов были получены от больных саркоидозом и 2 от пациентов с заболеванием нетуберкулёзной этиологии, то есть получены ложноположительные результаты. Это может быть связано с контаминированием образцов во время проведения бронхоскопии, так как **картриджная** технология «Xpert MTB/RIF», где проходят все этапы ПЦР, от выделения ДНК в пробе до получения автоматизированного результата, исключает контаминацию образца препаратами ДНК из других образцов. Поэтому при исследовании любого диагностического материала после проведения бронхоскопии необходимо параллельно брать на исследования смывы с бронхоскопов на наличие ДНК МБТ.

ДНК МБТ с помощью «Xpert MTB/RIF» была выявлена во всех 5 (100,0%) образцах, подтверждённых результатами бактериологического исследования наличия КУМ в препарате и роста возбудителя в Bactec MGIT 960. В образцах с отсутствием КУМ в препарате, но наличием роста МБТ в 9/11 (81,8%) ДНК МБТ была выявлена с помощью «Xpert MTB/RIF» и только в 1 (9,1%) - «ТБ-БИОЧИП-1».

Совпадения результатов, полученных с помощью «Xpert MTB/RIF», «ТБ-БИОЧИП-1» и «GenoType MTBDR*plus*» с наличием роста МБТ в Bactec MGIT 960 составило 14/16 (87,5%), 5/16 (31,3%) и 2/16 (12,5%) соответственно.

3.1.4. Определение вариантов генетических детерминант устойчивости МБТ к рифампицину и/или изониазиду в образцах бронхиальных смывов с помощью молекулярно-генетических технологий

Результаты бактериологического определения ЛЧ МБТ к R и/или H полностью совпали с данными всех молекулярных тест-систем. С помощью «Xpert MTB/RIF» в 6 из 14 (42,9%) образцов, подтверждённых ростом МБТ в Bactec MGIT 960, определена устойчивость и в 8 (57,1%) чувствительность к R. С

помощью «ТБ-БИОЧИП-1» в 2 из 5 образцов выявлены МБТ-МЛУ. В одном из них с двойной мутацией в *rpoB* (L511R, D516V), обнаружены замены S315T в гене *katG* и с(-15)t в *inhA*, в другом S531L в *rpoB* и S315T в *katG*. Ещё в одном идентифицирована монорезистентность к H (S315T (*katG*)), в двух других чувствительность к обоим препаратам. С помощью «GenoType MTBDRplus» в одном образце выявлены МБТ-МЛУ, в другом - чувствительные к R и H.

В исследовании образцов бронхиального смыва среди молекулярных тест-систем «Xpert MTB/RIF» также продемонстрировала наибольшую эффективность в выявлении ДНК МБТ по сравнению с тест-системами гибридизационного анализа. Однако, несмотря на то, что гибридизационные технологии «ТБ-БИОЧИП-1» и «GenoType MTBDRplus» обладают существенным преимуществом, позволяющим анализировать одновременно большинство известных мутаций, ответственных за развитие устойчивости МБТ к двум ПТП, они мало эффективны для исследования данного диагностического материала, особенно «GenoType MTBDRplus».

В данной ситуации более рациональным является применение «ТБ-БИОЧИП-1» в комплексе с системой Bactec MGIT 960. Время получения культуры на жидких средах в среднем занимает 5 – 12 дней, получение результата с помощью молекулярно-генетической тест-системы составит ещё 2 суток и таким образом всё исследование займёт 7 – 14 дней. Это значительно быстрее получения результата оценки ЛЧ бактериологическим методом в Bactec MGIT 960. Этот же алгоритм целесообразно применять и для образцов мокроты, в которых не удалось выявить ДНК МБТ и определить ЛЧ.

Таким образом, можно сказать, что тест-система «Xpert MTB/RIF» обладает двумя важными преимуществами, а именно, исключением этапа длительной «ручной» пробоподготовки диагностического материала, связанного с риском контаминации образцов во время экстракции ДНК МБТ, и высокой чувствительностью. Такие характеристики крайне важны для скринингового исследования в тех ситуациях, когда нет полноценной ПЦР-лаборатории с соответствующим кадровым и ресурсным обеспечением, но, естественно, важным

является скорейшее выявление пациентов с бацилловыделением – наиболее опасной в эпидемиологическом плане группы больных туберкулёзом. Данную технологию целесообразно использовать в клинико-диагностических лабораториях на этапе дифференциальной диагностики туберкулёза органов дыхания у пациентов с подозрением на заболевание и с отрицательным результатом микроскопии по *Ziehl-Neelsen* в образцах мокроты.

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

3.2. Эффективность тест-систем «ТБ-БИОЧИП-2» и «GenoType MTBDR_{sl}» при исследовании респираторного материала

Молекулярно-генетическая тест-система «ТБ-БИОЧИП-2» предназначена для определения генетических детерминант устойчивости МБТ только к ФХ непосредственно в диагностическом материале (независимо от результатов люминесцентной микроскопии) и культурах. Напротив, тест-система «GenoType MTBDR_{sl}», позволяет определять мутации, связанные с устойчивостью не только к ФХ, но и АГ и Emb, однако рекомендована ВОЗ только для образцов мокроты с положительной микроскопией и культур.

Данные тест-системы, как правило, применяют для последующего определения ЛЧ к препаратам II (резервного) ряда в образцах или культурах, в которых выявлены либо МБТ-МЛУ, либо монорезистентностные к одному из основных препаратов, или одновременно с «ТБ-БИОЧИП-1» и «GenoType MTBDR_{plus}» соответственно параллельно определяя ЛЧ к ПТП I и II (резервного) ряда во всех исследуемых образцах.

Нами была проведена сравнительная оценка эффективности выявления генетических детерминант устойчивости МБТ к ФХ в образцах мокроты и культурах в гене *gyrA* с помощью двух тест-систем «ТБ-БИОЧИП-2» и «GenoType MTBDR_{sl}», а также к АГ (ген *rrs*) и Emb (ген *embB*) с помощью «GenoType

MTBDRs l ». Результаты исследования сравнивали с бактериологическим определением ЛЧ МБТ к Ofx, Km и Cm на среде Л-Й и Emb в Bactec MGIT 960.

В ретроспективное исследование были включены 135 препаратов геномной ДНК МБТ из охарактеризованной коллекции с помощью «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и бактериологическими методами за период с 2011г. по 2014г (Таблица 32). Данная выборка была эпидемиологически не связанной и включала 102 образца ДНК МБТ, выделенной из мокроты и 33, выделенной из культур МБТ от 102 больных туберкулёзом (34 впервые выявленных, 2 с рецидивом заболевания и 66 пациентов из различных групп диспансерного учёта). Критерием отбора исследуемых образцов мокроты и культур было выявление ДНК МБТ с генетическими детерминантами МЛУ с помощью «ТБ-БИОЧИП-1».

Таблица 32 – Данные определения генетических детерминант устойчивости *M.tuberculosis* к изониазиду, рифампицину и офлоксацину с помощью биочипов

«ТБ-БИОЧИП-1» «ТБ-БИОЧИП-2»	Количество образцов ДНК <i>M. tuberculosis</i>	
	Определены в мокроте	Определены в изолятах
МЛУ	52	17
МЛУ, Ofx ^y	50	16
Итого:	102	33
Всего:	135	

Как видно из таблицы 32, из 102 образцов мокроты в 50 (49,0%) с помощью «ТБ-БИОЧИП-2» выявлены мутации в гене *gyrA*, ответственные за развитие устойчивости к препаратам фторхинолонового ряда.

Вначале определяли эффективность выявления ДНК МБТ в образцах мокроты с помощью «GenoType MTBDRs l ».

По данным люминесцентной микроскопии из 102 образцов мокроты в 79 были обнаружены КУМ, из которых в 68 (86,1%) с помощью «GenoType MTBDRs l » обнаружена ДНК МБТ. Из 23 образцов с отрицательным результатом микроскопии ДНК МБТ была обнаружена только в 7 (30,4%). Результаты этого исследования представлены в таблице 33.

Таблица 33 – Результаты идентификации ДНК *M.tuberculosis* в мокроте с помощью «ТБ-БИОЧИП-2» и «GenoType MTBDRsl»

Результаты микроскопии	Результаты в Bactec MGIT 960	Результаты МГМ			
		ТБ-БИОЧИП-2		GenoType MTBDRsl	
		пол	%	пол	%
ЛЮМ+ (n=79)	79	79	100	68	86,1
ЛЮМ-(n=23)	23	23	100	7	30,4
Всего образцов (n=102)	102	102 (100%)		75 (73,5%)	

Таким образом, достоверно большей чувствительностью ($p < 0,001$) при исследовании образцов мокроты обладала тест-система «ТБ-БИОЧИП-2», совпадение для которой с результатами бактериологического исследования (люминесцентная микроскопия и посев в жидкую среду) составило 100%, а для «GenoType MTBDRsl» – 73,5%.

Далее нами был проведён сравнительный анализ результатов бактериологического определения ЛЧ к Ofx, Km/Cm и Emb и выявления генетических детерминант устойчивости в гене *gyrA* с помощью «ТБ-БИОЧИП-2» и «GenoType MTBDRsl», а также с использованием «GenoType MTBDRsl» в генах *rrs* и *embB* соответственно.

Как сказано выше, ДНК МБТ с помощью «GenoType MTBDRsl» была выявлена в 75 из 102 образцов мокроты. Анализ генов *gyrA*, *rrs* и *embB* на наличие/отсутствие мутаций, ответственных за развитие устойчивости к Ofx, Km/Cm и Emb, удалось провести только в 69/75 (92,0%) образцах. В шести случаях с отрицательным результатом микроскопии результат был не интерпретируемым, из которых в трёх сработала только зона туберкулёзного комплекса, а в других был получен результат только при анализе гена *gyrA*. Поэтому для сопоставления с фенотипическим определением ЛЧ к указанным препаратам были включены для исследования изоляты МБТ (n=33), выделенные из мокроты 33 из 102 пациентов, в которых не удалось получить результат с помощью «GenoType MTBDRsl».

Вначале нами был проведён сравнительный анализ результатов корреляции выявления мутаций в гене *gyrA* МБТ с помощью «ТБ-БИОЧИП-2», «GenoType

MTBDRsl» и бактериологического определения ЛЧ к Ofx на среде Л-Й. Результаты представлены в таблице 34.

Таблица 34 – Результаты детекции мутаций в гене *gyrA* и бактериологического определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к офлоксацину (n=102)

Профиль лекарственной чувствительности <i>M.tuberculosis</i> к Ofx Л-Й	Молекулярно-генетические методы и анализируемый ген		Количество образцов ДНК
	ТБ-БИОЧИП-2 <i>gyrA</i>	GenoType MTBDRsl <i>gyrA</i>	
Ofx чувствительные МБТ (n=49)	S95T	wt3	48
	S91P	Δ wt2, mut2 (S91P)	1
Ofx устойчивые МБТ (n=53)	D94G	Δ wt3, mut3C (D94G)	19
	D94A	Δ wt1, mut3A (D94A)	9
	A90V	Δ wt1, mut1 (A90V)	9
	S91P	Δ wt2, mut2 (S91P)	4
	D94N	Δ wt1, mut 3B (D94N/Y)	5
	G88C	Δ wt1	1
	D94Y	Δ wt1, mut 3B (D94Y/N)	2
	S95T	wt3	4
Всего:	102		

Примечание: wt – «дикий тип»; S95T – естественный полиморфизм, не связанный с устойчивостью, Δ wt – отсутствие гибридизации с зондом дикого типа (wt1, wt2, wt3)

Среди 53 фенотипически устойчивых к Ofx МБТ в 49 (92,5%) образцах обнаружены мутации в гене *gyrA* тест-системой «ТБ-БИОЧИП-2», тогда как тип мутаций с помощью «GenoType MTBDRsl» определён в 48 (90,6%). В одном образце замена G88C, установленная «ТБ-БИОЧИП-2», определена только по отсутствию гибридизации с зондом дикого типа (Δ wt1), который перекрывает область с 85 по 90 кодон. В такой ситуации можно предположить только о наличии мутации в одном из этих кодонов, замены в которых не все связаны с устойчивостью. А это, в свою очередь, может привести к получению ложно-положительного результата. В 4 (7,5%) образцах ДНК мутации в *gyrA* обоими тестами не обнаружены, что возможно связано либо с наличием их в гене *gyrB*, который не анализируется данными тест-системами, либо низкой КК Ofx для оценки ЛУ МБТ [24; 123; 193; 218]. В 1(2,0%) образце из 49 чувствительных МБТ к препарату двумя тест-системами обнаружена мутация S91P. Такой

результат встречается примерно в 3,0% случаев и связан с рядом причин культурального выявления устойчивых штаммов на различных средах [11; 111; 191; 192].

Чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительного и отрицательного результата обоих тестов составила 92,5% (ДИ 82,1%-97%), 98,0% (ДИ 89,3%-99,6%), 98,0% (ДИ 89,5%-99,7%) и 92,3% (ДИ 81,8%-97,0%) соответственно.

Таким образом, несмотря на то, что оба теста обладают одинаковыми статистическими характеристиками в определении генетических детерминант устойчивости в гене *gyrA*, в выявлении ДНК МБТ в клинических образцах «ТБ-БИОЧИП-2» отличается большей чувствительностью, чем «GenoType MTBDRsl».

Результаты сопоставления результатов корреляции выявления мутаций в гене *rrs* с помощью «GenoType MTBDRsl» и бактериологического определения ЛЧ к Км/См на среде Л-Й представлены в таблице 35.

Таблица 35 – Результаты детекции мутаций в гене *rrs* и бактериологического определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к канамицину/капреомицину (n=102)

Профиль лекарственной чувствительности <i>M.tuberculosis</i> к Км/См Л-Й	GenoType MTBDRsl <i>rrs</i>	Количество образцов ДНК
Км/См чувствительные МБТ (n=53)	wt	52
	Δwt1, mut a1401g	1
Км/См устойчивые МБТ (n=35)	Δwt2, mut a1401g	34
	Δwt1, Δwt2, mut a1401g+g1484t	1
Км устойчивые МБТ (n=14)	wt	14
Всего:	102	

Примечание: wt – «дикий тип», Δ wt – отсутствие гибридизации с зондом дикого типа (wt1, wt2)

По данным бактериологического исследования устойчивость МБТ к Км/См определена в 35 (34,3%) из 102 изолятов и 14 (13,7%) только к Км, всего 49/102 (48,0%) устойчивых МБТ к двум препаратам. Генетические детерминанты

устойчивости в гене *rrs* выявлены во всех 35 из 49 (71,4%) устойчивых МБТ к обоим препаратам, что говорит о их связи с перекрёстной устойчивостью к ним. Напротив, в 14/49 (28,6%) штаммах, устойчивых только к Km, замены в исследуемом гене не обнаружены, а мутации в промоторной части гена *eis* данной тест-системой не анализируются.

Из 53 чувствительных МБТ к препарату в 1 (1,9%) была выявлена мутация a1401g в *rrs*, что возможно связано с теми же причинами, что и в случае с определением ЛЧ к Ofx.

Замена a1401g преобладала среди МБТ устойчивых к Km/Sm и выявлена в 34 из 49 (69,4%) образцов ДНК, в 1(2,1%) обнаружена двойная мутация a1401g+g1484t. Чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительного и отрицательного результата теста составила 71,4% (ДИ 57,6%-82,1%), 98,1% (ДИ 90,1%-99,7%), 97,2% (ДИ 85,8%-99,5%) и 78,8% (ДИ 67,5%-86,9%) для Km и 100% (95% ДИ 90,1-100), 98,5% (95% ДИ 92-99,7), 97,2% (95% ДИ 85,8-99,5) и 100% (95% ДИ 94,5-100) для Sm соответственно.

Таким образом, тест-система позволяет выявлять мутации, связанные только с перекрёстной устойчивостью к Km и Sm и не позволяет определять монорезистентность к Km.

В отношении Emb результаты исследования с помощью «GenoType MTBDRsl» показали, что мутации в гене *embB* среди устойчивых МБТ к Emb обнаружены в 36/67 (53,7%) образцов ДНК, из которых наиболее часто встречаемой была M306V, выявленная в 30/36 (83,3%) случаев. Замена M306I выявлена только в 6 (16,7%) устойчивых изолятах. В 1/67 (1,5%) образце в связи с отсутствием гибридизации с зондом дикого типа Δ wt можно предположить о наличии не анализируемой мутации в исследуемом гене данной тест-системой (Таблица 36).

Таблица 36 – Результаты детекции мутаций в гене *embB* и бактериологического определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к этамбутолу (n=102)

Профиль лекарственной чувствительности <i>M.tuberculosis</i> к Emb Л-Й	GenoType MTBDRsl <i>embB</i>	Количество образцов ДНК
Emb чувствительные МБТ (n=35)	wt	26
	Δ wt, M306V	4
	Δ wt, M306I	4
	Δ wt	1
Emb устойчивые МБТ (n=67)	Δ wt, M306V	30
	Δ wt, M306I	6
	wt	30
	Δ wt	1
Всего:	102	

Примечание: wt – «дикий тип», Δ wt – отсутствие гибридизации с зондом дикого типа

Среди чувствительных к Emb МБТ в 26/35 (74,3%) мутации в *embB* обнаружены не были, в то же время, в 8/35 (22,9%) выявлены замены M306V и M306I в равном количестве (по 4 - 11,4%), в другом 1/35 (2,8%) также выявлено отсутствие гибридизации с зондом дикого типа Δ wt.

Из полученных результатов следует, что в более трети (30/67) устойчивых к Emb изолятов мутации в 306 кодоне гена *embB* не были обнаружены, что говорит о низкой чувствительности теста 55,2% (95% ДИ 43,4%-66,5%), специфичность составила 74,3% (95% ДИ 57,9%-85,8%), прогностическая значимость положительного и отрицательного результата также были низкими 80,4% (95% ДИ 66,8%-89,4%) и 46,4% (95% ДИ 34%-59,3%) соответственно. Вместе с тем, исследование дополнительных мутаций в других кодонах (406 и 507), отдельные из которых включены в «ТБ-ТЕСТ», позволили бы увеличить корреляцию с бактериологическим определением ЛЧ МБТ к препарату (гл.2.5).

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 положительным, так и отрицательным результатом

микроскопии и являются наиболее эффективными для ускоренной лабораторной диагностики туберкулёза. С помощью биочипов можно охарактеризовать большинство мутаций, в том числе и редких (определять тип мутаций), что даёт крайне важную дополнительную информацию при изучении эпидемиологии туберкулёза.

В то же время, тест-система «GenoType MTBDR_{sl}» дополнительно позволяет определять генетические детерминанты устойчивости, но только связанные с перекрёстной устойчивостью к АГ и С_m (ген *rrs*), а так же часто встречаемые к Е_{mb}, что уменьшает частоту совпадения с бактериологическим изучением определения 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.

3.3. Оптимизация применения молекулярно-генетических методов в лабораторной диагностике туберкулёза

Несмотря на достоинства биочиповой технологии, чувствительность тестов в значительной степени зависит от количества ДНК в образце, что ограничивает их возможности прежде всего в определении лекарственной чувствительности/устойчивости МБТ к анализируемым лекарственным препаратам. Согласно руководству производителя тест-систем, присутствие ДНК МБТ в образце после мультиплексной ПЦР устанавливается на этапе электрофореза, который позволяет визуально определять наличие или отсутствие ДНК в виде светящихся полос в геле. Этот этап, во-первых, увеличивает риск контаминации ампликонами других проб и, как следствие, получения ложно-положительного результата, во-вторых, не позволяет определить количество ДНК в пробе, что влияет на качество результата определения наличия или отсутствия мутаций в анализируемых генах после гибридизации на чипе (отсутствия сигналов в ячейках биочипа с мутациями или без них). Появление технологии ПЦР-РВ значительно упростило решение этой задачи, так как

регистрация накапливаемой ДНК возбудителя в исследуемом образце осуществляется на каждом цикле амплификации, что позволяет в течении 2 часов с высокой чувствительностью и специфичностью определить количество ДНК МБТ в диагностическом материале, не прибегая к электрофоретической детекции продуктов амплификации. В связи с этим, для более эффективного использования тест-систем «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ» в рамках централизованной бактериологической лаборатории необходимо было определить последовательность их применения в алгоритме ускоренной лабораторной диагностики туберкулёза в комплексе с бактериологическими методами. Для этого требовалось установить пороговые значения концентрации ДНК МБТ в образце, полученном от пациента, с использованием ПЦР-РВ для последующего определения генотипа ЛЧ с помощью «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ».

3.3.1. Определение пороговых значений концентрации ДНК МБТ в респираторном материале

Для решения задачи нами для исследования были отобраны 446 образцов респираторного материала (мокрота n=360, бронхиальный секрет n=86) от 329 больных туберкулёзом, в которых из единой порции осадка обработанного материала были получены результаты люминесцентной микроскопии, посева в Bactec MGIT 960 и выявлена ДНК МБТ в различной концентрации с помощью тест-системы «АмплиТуб-РВ». Выделение ДНК проводили на автоматизированной станции Freedom EVO (TECAN, Швейцария) с использованием наборов «М-Сорб» («СИНТОЛ», Россия).

Все образцы были протестированы с помощью «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ» и во всех 446 (100,0%) образцах была обнаружена ДНК МБТ (Таблица 37).

Таблица 37 – Определение пороговых значений концентрации ДНК *M.tuberculosis* в образце с помощью тест-системы «АмплиТуб-РВ»

Концентрация ДНК (копии/мл)	Всего образцов	Результаты исследования (n=446)					
		микроскопия		ТБ-БИОЧИП-1 ТБ-БИОЧИП-2		ТБ-ТЕСТ	
		ЛЮМ+	ЛЮМ-	ДНК МБТ+	генотип ЛЧ	ДНК МБТ+	генотип ЛЧ
10	2	1	1	2	-	2	-
20	9	1	8	9	-	9	-
30	6	1	5	6	-	6	-
40	8	2	6	8	-	8	-
50	8	4	4	8	1	8	-
60	10	6	4	10	-	10	-
70	4	2	2	4	1	4	-
80	19	13	6	19	3	19	-
90	3	2	1	3	1	3	-
100	18	10	8	18	-	18	-
10 - 100	87 (100%)	42 (48,3%)	45 (51,7%)	87 (100%)	6 (6,9%)	87 (100%)	-
150	2	1	1	2	1	1	-
200	20	14	6	20	19	20	5
300	6	3	3	6	6	6	-
400	29	19	10	29	29	29	20
500	20	14	6	20	20	20	17
600	11	9	2	11	11	11	11
150 - 600	88 (100%)	60 (68,2%)	28 (31,8%)	88 (100%)	86 (97,7%)	87 (98,9%)	53 (60,2%)
700	12	9	3	12	12	12	12
800	20	16	4	20	20	20	20
900	9	8	1	9	9	9	9
1000	28	22	6	28	28	28	28
700 -1000	69 (100%)	55 (79,7%)	14 (20,3%)	69 (100%)	69 (100%)	69 (100%)	69 (100%)
> 1000	202 (100%)	187 (92,6%)	15 (7,4%)	202 (100%)	202 (100%)	202 (100%)	202 (100%)
Всего	446 (100%)	344 (77,1%)	102 (22,9%)	446 (100%)	363 (81,4%)	446 (100%)	324 (72,6%)

Важным критерием для определения ЛЧ (генотипа ЛЧ) с помощью тест-систем является получение качественной гибридизационной картины на чипах (наличие позитивных сигналов во всех группах анализируемых фрагментов) [365]. Из 446 образцов определить генотип ЛЧ удалось в 363 (81,4% ДИ

77,5%-84,7%) с помощью «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» и 324 (72,6% ДИ 68,3%-76,6%) с помощью «ТБ-ТЕСТ».

Концентрация ДНК МБТ в исследуемых образцах, как показано в таблице 39, колебалась от 10 копий/мл до > 1000 копий/мл осадка, из которых в 87 (19,5%) случаях она варьировала от 20 копий/мл до 100 копий/мл, в 88 (19,7%) - от 150 копий/мл до 600 копий/мл, в 69 (15,4%) - 700 копий/мл - 1000 копий/мл и 202 (45,3%) свыше 1000 копий/мл.

С помощью «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» наименьшее количество генотипов ЛЧ определено в 6/87 (6,9% ДИ 3,2%-14,2%) образцах с концентрацией ДНК от 10 копий/мл до 100 копий/мл. Но уже в диапазоне с 150 копий/мл до 600 копий/мл - в 86/88 (97,7% ДИ 92,1%-99,4%). В образцах, содержащих ДНК МБТ 200 копий/мл, генотип ЛЧ определён в 19/20 (95% ДИ 76,4%-99,1%) и с 400 копий/мл в 100% (ДИ 88,3%-100%) случаев.

С помощью «ТБ-ТЕСТ» генотипы ЛЧ удалось определить при содержании 400 копий/мл в 20/29 (69% ДИ 50,8%-82,7%) образцах, тогда как при 600 копий/мл в 100,0% (ДИ 74,1%-100,0%) случаев.

Из полученных результатов следует, что эффективность анализа на чипах зависит от концентрации ДНК МБТ в образце. Так, при количестве ДНК МБТ < 200 копий/мл «гибридизационная картина» на чипах «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» в 92,1% случаев и в 100,0% на «ТБ-ТЕСТ» полностью или частично не интерпретируется (нет полноценной гибридизационной картины).

Таким образом, для наиболее эффективного использования биочиповой технологии в определении ЛЧ МБТ к АБП было установлено пороговое значение концентрации ДНК МБТ в образце с помощью ПЦР-РВ, которое составило для «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» от 200 копий/мл до 400 копий/мл и от 400 копий/мл и выше для «ТБ-ТЕСТ». В случае обнаружения ДНК МБТ в количестве до 200 копий/мл определение ЛЧ целесообразно проводить в выделенной культуре с помощью «ТБ-ТЕСТ».

Подтверждение наличия МБТ результатами ПЦР-РВ и культуральным методом было получено в 411 (92,1%) образцах, из которых в 332 (80,8% (ДИ 76,7%-84,3%) с помощью люминесцентной микроскопии (Таблица 38).

Таблица 38 – Сопоставление результатов бактериологического и молекулярно-генетического выявления ДНК *M.tuberculosis*

Вастек MGIT 960	Микроскопия		Концентрация ДНК (копии/мл)	Генотип ЛЧ	
	ЛЮМ+	ЛЮМ-		ТБ-БИОЧИП-1 ТБ-БИОЧИП-2	ТБ-ТЕСТ
МБТ+ (определение ЛЧ)	42	33	10-100	6	-
	57	20	150-600	75	46
	53	13	700-1000	66	66
	180	13	> 1000	193	193
Всего (n=411)	332 (80,8%)	79 (19,2%)	411 (100%)	340 (82,7%)	305 (74,2%)
МБТ+ с др. диагностическ ого. материала (определение ЛЧ)	-	3	20	-	-
	-	1	40	-	-
	-	1	80	-	-
	-	4	100	-	-
	-	1	400	1	-
	1	-	500	1	1
	1	2	> 1000	3	3
Всего (n=14)	2 (14,3%)	12 (85,7%)	14 (100%)	5 (35,7%)	4 (28,6%)
МБТ- (контроль лечения)	-	1	200	1	1
	-	1	400	1	-
	-	1	500	1	1
	3	-	> 1000	3	3
Всего (n=6)	3 (50%)	3 (50%)	6 (100%)	6 (100%)	5 (83,3%)
МБТ-	-	1	10	-	-
	-	1	20	-	-
	-	1	200	1	-
	1	-	400	1	1
	-	2	600	2	2
	-	1	700	1	1
	2	-	> 1000	2	2
Всего (n=9)	3 (33,3%)	6 (66,7%)	9 (100%)	7 (77,8%)	6 (66,7%)
Микробная контаминация		1	40	-	-
		1	200	1	-
	1		500	1	1
	1		700	1	1
	1		900	1	1
	1		> 1000	1	1
Всего (n=6)	4 (66,7%)	2 (33,3%)	6 (100%)	5 (83,3%)	4 (66,7%)

Генотипы ЛЧ определены в 340 (82,7% ДИ 78,8%-86,1%) и 305 (74,2% ДИ 69,8%-78,2%) образцах с помощью «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ» соответственно.

В 14 (3,1%) образцах (13 - бронхиальный секрет и 1 - мокрота) рост МБТ не был получен, но обнаружен в образцах респираторного материала (мокрота), выделенного повторно. В 2 (14,3% ДИ 4,0%-39,9%) из них МБТ обнаружены при микроскопии. Генотипы ЛЧ в этих образцах определены в 5 (35,7% ДИ 16,3%-61,2%) с помощью «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» и 4 (28,6% ДИ 11,7%-54,6%) с «ТБ-ТЕСТ».

При исследовании 6 (1,4%) образцов на наличие МБТ во время химиотерапии (конверсия культуры), в 3 (50,0% ДИ 18,8%-81,2%) из них при концентрации ДНК > 1000 копий/мл сохранение МБТ подтверждено люминесцентной микроскопией. Во всех образцах (100,0%) генотип ЛЧ был определён с помощью «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» и 5 (83,3% ДИ 43,6%-97,0%) с «ТБ-ТЕСТ».

В 9 (2,0%) образцах выделить культуры МБТ не удалось, из которых в 3 (33,3% ДИ 12,1%-64,6%) присутствие МБТ подтверждено результатами люминесцентной микроскопии. Генотипы ЛЧ с помощью «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» определены в 7 (77,8% ДИ 45,3%-93,7%) случаях и 6 (66,7% ДИ 35,4%-87,9%) - с «ТБ-ТЕСТ».

Посев 6 (1,4%) образцов был подвержен контаминации, из которых в 4 (66,7% ДИ 30,0%-90,3%) наличие МБТ подтверждено результатами люминесцентной микроскопии. Генотипы ЛЧ удалось определить с помощью «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» в 5 образцах (83,3% ДИ 43,6%-97%) и в 4 (66,7% ДИ 30%-90,3%) образцах с «ТБ-ТЕСТ».

В результате дополнительно в 21/446 (4,8%) образцах наличие МБТ было подтверждено результатами ПЦР-РВ и 10 (2,2%) с помощью люминесцентной микроскопии, из которых генотипы ЛЧ определены в 18 (85,7%) и 15 (71,4%) с помощью «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ» соответственно.

Таким образом, включение в алгоритм этапа количественного определения ДНК МБТ с помощью ПЦР-РВ позволило не только устанавливать наличие возбудителя в диагностическом материале пациента, но и определить последовательность эффективного использования тест-систем гибридизационного анализа на биочипах.

3.3.2. Эффективность молекулярно-генетических методов при исследовании операционного материала

Верификация диагноза ТБ и определение ЛЧ МБТ к ПТП крайне необходимо при диагностических операциях. Более того, исследование операционного материала у больных без бактериовыделения с операционным этапом лечения ТБ лёгких является единственным способом получения данных о ЛЧ возбудителя. Нами проведено проспективное исследование с использованием разработанного алгоритма выявления и определения ЛЧ МБТ к основным АБП. Всего изучено 159 образцов операционного диагностического материала, полученные от 159 пациентов, прооперированных по поводу патологии лёгких.

Из 159 образцов 2 были «неинформативными» для проведения люминесцентной микроскопии, вследствие чего не вошли в исследование (Таблица 39).

Таблица 39 – Результаты исследований операционного диагностического материала

Результаты микроскопического исследования	Амплитуб-РВ		Биочипы («ТБ-ТЕСТ»)		Bactec MGIT 960	
	абс.	% (95% ДИ %-%)	абс.	% (95% ДИ %-%)	абс.	% (95% ДИ %-%)
Положительный (n=85)	77	90,6 (82,5 – 95,2)	74	87,1 (78,3 – 92,6)	12	14,1 (8,3 – 23,1)
Отрицательный (n=72)	17	23,6 (15,3 – 34,6)	12	16,7 (9,8 – 26,9)	3	4,2 (1,4 – 11,6)
Всего (n=157)	94*	59,9 (52,1 – 67,2)	86	54,8 (47,0 – 62,4)	15**	9,6 (5,9 – 15,2)

Примечание: * в 4 образцах генотип ЛЧ определён с помощью «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2», ** из них 3 *M. xenopi*, 1 МАС и 1 МБТ и МАС

С помощью ПЦР-РВ ДНК МБТ была обнаружена в 94 (59,9%) образцах, из которых в 76 (80,9%) её концентрация составила > 1000 копий/мл, а в 10 (10,6%) от 500 копий/мл до 1000 копий/мл и лишь в 8 (8,5%) до 100 копий/мл.

Таким образом, в преобладающем количестве 86/94 (91,5%) образцов операционного материала ДНК МБТ была выявлена в большой концентрации, что позволило использовать «ТБ-ТЕСТ» для определения генотипа ЛЧ.

По данным люминесцентной микроскопии КУМ обнаружены в 85 образцах, из которых в 77 (90,6%; 95% ДИ 82,5%-95,2%) была выявлена ДНК МБТ и 74 (87,1%; 95% ДИ 78,3%-92,6%) определены генотипы ЛЧ. Из 72 образцов с отрицательной микроскопией ДНК возбудителя выявлена в 17 (23,6%; 95% ДИ 15,3%-34,6%) случаев и в 12 (16,7%; 95% ДИ 9,8%-26,9%) определена ЛЧ к ПТП.

Рост микобактерий был получен в 15/157 (9,6%) образцах: в 12/85 (14,1%) с положительным результатом микроскопии и в 3 (4,2%) с отрицательным. Причём 10 изолятов были идентифицированы как МБТ и один как смешанная культура МБТ и НТМБ (*M. avium complex*).

Таким образом, МБТ в операционном материале достоверно чаще выявляется ($p < 0,001$) с помощью Амплитуб-РВ по сравнению с Bactec MGIT 960 и частота обнаружения МБТ достоверно не отличается ($p > 0,05$) в сравнении с люминесцентной микроскопией.

Диагноз туберкулёз был установлен у 123 (78,3%) из 157 пациентов, обследованных лабораторными методами. С помощью люминесцентной микроскопии у 83 (67,5%; 95% ДИ 58,8%-75,2%) пациентов с установленным диагнозом туберкулёз лёгких в операционном материале выявлены КУМ и у 2 (5,9%; 95% ДИ 1,6%-19,1%) из 34 пациентов с нетуберкулёзными заболеваниями лёгких (Таблица 40). Данный метод позволяет достоверно чаще выявлять КУМ в операционном материале больных туберкулёзом ($p < 0,01$).

Таблица 40 – Результаты проведённых лабораторных исследований в зависимости от установленного диагноза пациентов

Диагноз (n=157)	Микроскопическое исследование		Bactec MGIT 960		Молекулярно-генетическое исследование	
	абс.	% (95 ДИ %-%)	абс.	% (95 ДИ %-%)	абс.	% (95% ДИ %-%)
Туберкулез лёгких (n=123)	83	67,5 (58,8 – 75,2)	13 (11+2*)	10,6 (6,3 – 17,3)	94	76,4 (68,2 – 83,1)
Нетуберкулезные заболевания лёгких (n=34)	2	5,9 (1,6 – 19,1)	2*	5,9 (1,6 – 19,1)	0	0 (0 – 10,2)

Примечание: * НТМБ – нетуберкулезные микобактерии

Рост МБТ в исследованных образцах был получен лишь у 11 (8,9%) больных туберкулёзом, из которых одна культура была идентифицирована как смешанная (МБТ и НТМБ). Достоверных различий полученных результатов бактериологического исследования операционного материала в Bactec MGIT 960 у пациентов с туберкулёзом и с нетуберкулезными заболеваниями лёгких нет ($p > 0,05$). Чувствительность метода в выделении МБТ из операционного материала в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 с использованием жидкой среды М7Н9 составила 8,9 %.

Необходимо отметить, что ДНК МБТ была выявлена только у пациентов с установленным диагнозом туберкулёза лёгких - в 94 (76,4%; 95% ДИ 68,2%-83,1%) образцах ($p < 0,01$), что говорит о высокой специфичности теста. В 86 (91,5%; 95% ДИ 84,1%-95,6%) образцах из 94 случаев с помощью «ТБ-ТЕСТ» определена ЛЧ к ПТП (Таблица 40)

Таким образом, в операционном материале больных туберкулёзом ДНК возбудителя удаётся выявить в 8,5 раза чаще, чем выделить культуру МБТ ($p < 0,01$).

При сопоставлении результатов выявления и определения ЛЧ МБТ к ПТП до операции и после проведения хирургического лечения в операционном материале у 38 (30,9%) из 123 больных туберкулёзом из респираторного материала были получены данные о ЛЧ МБТ бактериологическим методом. Из них в операционном материале культура МБТ выделена лишь у 6 (15,8%)

пациентов (результаты определения ЛЧ МБТ к лекарственным препаратам, полученных из респираторного и операционного материалов совпали), тогда как ДНК МБТ выявлена в 37 (97,4%) случаях. Полученные данные свидетельствуют о том, что возбудитель туберкулёза значительно реже высевается из операционного, чем респираторного материала больных туберкулёзом.

У 85 (69,1%) пациентов к моменту проведения операции данных о ЛЧ МБТ к ПТП не было. Из них у 57 (67,1%) больных впервые в операционном материале удалось выявить ДНК МБТ, из которых у 5 пациентов результаты были подтверждены ростом МБТ в системе Bactec MGIT 960. Таким образом, у 52 (42,3%) из 123 больных туберкулёзом этиологическая природа заболевания была подтверждена впервые с помощью молекулярно-генетического исследования операционного материала. Вместе с тем у 28 (22,8%) пациентов в резекционном материале бактериологическими и молекулярно-генетическими методами МБТ или ДНК МБТ не выявлены, вследствие чего получить данные о ЛЧ было невозможно.

По данным «ТБ-ТЕСТ» генетические детерминанты устойчивости, связанные с МЛУ выявлены у 10 (11,6%) пациентов, у 11 (12,8%) - пре-ШЛУ, у 5 (5,8%) – ШЛУ, у 15 (17,4%) - с монорезистентностью к H и в 1 (1,2%) случае к R. В 44 (51,2%) случаях мутации в анализируемых генах не были обнаружены, то есть МБТ обладали чувствительностью к пяти препаратам.

В 27/42 (64,3%) образцах выявлены мутации в гене *rpoB*, из которых наиболее распространённой была мутация S531L, - в 21 (77,8%) образце.

Мутации, связанные с устойчивостью к H, обнаружены в 41 из 42 (97,6%) образцов ДНК. Наиболее часто встречающейся заменой была S315T (в гене *katG*), выявленная в 40 (97,6%) образцах. Самое распространённое сочетание мутаций S531L (в гене *rpoB*) и S315T (в гене *katG*), ответственных за развитие МЛУ МБТ, выявлено в 12 (28,6%) образце ДНК (Таблица 41).

Таблица 41 – Мутации и их сочетания, связанные с устойчивостью *M.tuberculosis* к рифампицину и изониазиду

<i>rpoB</i> (рифампицин)	<i>katG</i> (изониазид)	<i>inhA</i> (изониазид)	Количество
L511P	wt	wt	1
wt	S315T	wt	10
wt	wt	c(-15)t	1
wt	S315T	c(-15)t	4
S531L	S315T	-	12
S531L	S315T	c(-15)t	6
S531L	S315T, I335V	-	3
H526L	S315T	-	1
H526L	S315T	c(-15)t	1
D516V	S315T	-	1
D516V	S315T	c(-15)t	1
S531W	S315T	-	1
wt	wt	wt	44
Всего			86

В генах *gyrA* и *gyrB*, участвующих в проявлении устойчивости к ФХ, было выявлено 5 и 2 мутации соответственно. В гене *rrs* мутация a1401g определена в 5 образцах, а в гене *eis* мутации c(-12)t, c(-14)t и g(-10)a выявлены в 9 образцах ДНК МБТ. Варианты мутаций представлены в таблице 42.

Таблица 42 – Мутации и их сочетания, связанные с устойчивостью *M.tuberculosis* к фторхинолонам и аминогликозидам

<i>gyrA/gyrB</i> (фторхинолоны)	<i>rrs/eis</i> (аминогликозиды)	Количество штаммов
D94G (<i>gyrA</i>)	-	1
D485G, D500N (<i>gyrB</i>)	-	1
-	a1401g (<i>rrs</i>)	4
-	g(-10)a (<i>eis</i>)	3
-	c(-12)t (<i>eis</i>)	1
-	c(-14)t (<i>eis</i>)	1
D94Y(<i>gyrA</i>)	a1401g (<i>rrs</i>)	1
D500N, E540D (<i>gyrB</i>)	c(-12)t (<i>eis</i>)	1

Продолжение таблицы 42

D94G (<i>gyrA</i>)	g(-10)a (<i>eis</i>)	1
D94Y (<i>gyrA</i>)	c(-12)t (<i>eis</i>)	1
D94G (<i>gyrA</i>)	c(-12)t (<i>eis</i>)	1
Всего		16

Самым вариабельным по типам выявленных мутаций был ген *embB*, в котором обнаружено 11 вариантов. Наиболее распространённые из них M306V и Q497R, обнаруженные в 7 (26,9%) и 6 (23,1%) образцах соответственно. Данные мутации встречались в МЛУ и пре-ШЛУ и ШЛУ образцах ДНК МБТ.

Определить ЛЧ одновременно с помощью бактериологического и молекулярно-генетического теста удалось в 7 образцах из 10 (результаты совпали). У двоих пациентов в образцах было выявлено недостаточное количество ДНК МБТ для определения генотипа ЛЧ, у другого в материале ДНК не была обнаружена. В смешанной культуре (МБТ и НТМБ) ЛЧ определить не удалось, но с помощью «ТБ-ТЕСТ» выявлены мутации, связанные с развитием пре-ШЛУ МБТ. По данным бактериологического определения ЛЧ к ПТП, у 2 (20,0%) пациентов выявлены МБТ с МЛУ, у 3 (30%) - МБТ с пре-ШЛУ, у 3 (30%) - МБТ с ШЛУ, у 1 (10%) пациента монорезистентность МБТ к Н, у 1(10%) - МБТ чувствительные к исследуемым препаратам.

Одновременно с генотипами ЛЧ определены генотипы наиболее эндемичных для РФ МБТ. Так, генотип *Beijing* был определен в 41 случае (47,7%), вариант *Beijing B0* - в 11 (12,8%), Европейско-Американское семейство - в 14 (16,3%) случаях, *LAM* - в 10 (11,6%), *Ural* - в 8 (9,3%) и *Haarlem* - в 2 (2,3%). Следовательно, высокое содержание ДНК МБТ в операционном материале даёт возможность проведения эпидемиологических исследований с помощью молекулярно-генетических методов в случаях, когда невозможно получить культуру МБТ.

Таким образом, установлено, что молекулярно-генетические методы являются высоко специфичными по сравнению с люминесцентной микроскопией

и бактериологическим методом в верификации туберкулёза в операционном материале.

Частота выявления возбудителя туберкулёза в операционном материале больных туберкулёзом с помощью молекулярно-генетических методов в 8,5 раз выше по сравнению с бактериологическим методом.

Высокое содержание ДНК МБТ в операционном материале позволяет использовать в 91,5% случаев тест-систему «ТБ-ТЕСТ» для определения ЛЧ одновременно к пяти препаратам.

У 42,3% больных туберкулёзом этиологическая природа заболевания была подтверждена впервые с помощью молекулярно-генетического исследования операционного материала.

В связи с трудностью получения культуры МБТ из операционного материала показана возможность его использования, в том числе при проведении эпидемиологических исследований с помощью молекулярно-генетических методов.

Таким образом, на основании полученных данных в алгоритм ускоренной диагностики туберкулёза были включены, как наиболее эффективные, молекулярно-генетические тест-системы «АмплиТуб-РВ», «Xpert MTB/RIF», «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ».

ГЛАВА 4. Результаты оценки лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам молекулярно-генетическим «ТБ-ТЕСТ» и бактериологическими методами. Алгоритм ускоренной микробиологической лабораторной диагностики туберкулёза.

Потребность в надёжном определении ЛЧ МБТ к ПТП возрастает в связи с необходимостью усиления контроля за ЛУ возбудителя и лечением туберкулёза с МЛУ и ШЛУ, частота которых неуклонно растёт по всему миру [191; 193]. ЛЧ МБТ может быть определена либо наблюдением за видимым ростом возбудителя (или его отсутствием) в среде с ПТП (бактериологические методы), либо выявлением генетических детерминант устойчивости молекулярными тестами. Существует несколько бактериологических методов определения ЛЧ МБТ с использованием плотных (яичных или агаровых) и жидких (синтетических или полусинтетических) питательных сред. В наши дни в микробиологических лабораториях фтизиатрического профиля, наряду с применением метода абсолютных концентраций с посевом на среду Л-Й утверждённого приказом № 109 Министерства здравоохранения РФ от 21 марта 2003 г, широко используется автоматизированная система Bactec MGIT 960 [26]. Оценку ЛЧ МБТ чаще всего проводят с помощью установленных КК каждого препарата, что является качественным методом, разделяющим штаммы МБТ на «чувствительные» и «устойчивые». Однако, надёжность получаемых результатов не всегда соответствует приемлемому уровню. В литературе описаны расхождения в результатах как между различными бактериологическими методами, так и с молекулярными тестами [61].

Причиной этому может быть низкая воспроизводимость результатов из-за плохой стандартизации метода, влияние длительной инкубации на сохранение активности лекарственного препарата в среде (в случае использования плотной среды Л-Й) или КК некоторых препаратов может быть близкой к МИК для чувствительных штаммов (в Bactec 960) (например R, Emb) [143; 275; 363].

Кроме того, если для проведения тестов определения ЛЧ к ПТП I ряда (S, H, R, Emb и PZA) в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 методика

стандартизована (наборы лиофилизированных препаратов и реактивов выпускает фирма-производитель), то для определения ЛЧ к препаратам резервного ряда готовых наборов реагентов нет и определённое время не было единых стандартов. Так, КК для препаратов группы ФХ пересматривали уже два раза в 2008 и 2014 году.

В свою очередь, молекулярно-генетические технологии позволяют получить результат о наличии/отсутствии мутаций, ответственных за развитие устойчивости возбудителя к ПТП в течение 1 - 2 суток. Однако, нередко получаемые экспресс-данные расходятся с бактериологическими, что подрывает доверие клиницистов к ним [275].

В связи с выше изложенным нами на первом этапе исследования был проведён анализ результатов определения ЛЧ, полученных с помощью Bactec MGIT 960 и молекулярно-генетической системы «ТБ-ТЕСТ» к препаратам I ряда (H, R и Emb) и II ряда (ФХ и инъекционным препаратам). Исследование проводили с целью определить возможные несоответствия в определении ЛЧ к исследуемым препаратам между бактериологическими и молекулярно-генетическими результатами и установить связанные с этим причины.

Всего было 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.

По данным определения ЛЧ в Bactec MGIT 960, среди 808 исследуемых изолятов 221 (27,3%) обладали ШЛУ, 194 (24,0%) МЛУ, 255 (31,6%) относились к штаммам пре-ШЛУ, 75 (9,3%) моно- и полирезистентным и 63 (7,8%) чувствительным (Таблица 43). Устойчивость к Emb преобладала среди штаммов с пре-ШЛУ и ШЛУ, она выявлена в 158/255 (62,0%) и 181/221 (81,9%) соответственно. Также среди штаммов с пре-ШЛУ МБТ отмечалось превалирование устойчивости к инъекционным препаратам (190/255 - 74,5%), по сравнению с препаратами группы фторхинолонов (65/255 - 25,5%).

Таблица 43 – Профиль лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам и инъекционным препаратам, установленный в системе Bactec MGIT 960

Фенотипическая категория	Профиль лекарственной чувствительности/устойчивости R-H-ФХ ¹ -АГ ²	Количество штаммов (n=808)	Чувствительность/устойчивость к Emb	
			Emb ^y (n=464)	Emb ^u (n=344)
ШЛУ (n=221)	У-У-У-У	221	182	39
пре-ШЛУ (n=255)	У-У-Ч-У	190	115	75
	У-У-У-Ч	65	43	22
МЛУ (n=194)	У-У-Ч-Ч	194	94	100
	Ч-У-Ч-Ч	48	20	28
Моно- и полирезистентные (n=75)	Ч-У-Ч-У	14	7	7
	Ч-У-У-Ч	7	2	5
	Ч-У-У-У	3	-	3
	У-Ч-Ч-Ч	2	1	1
	У-Ч-У-У	1	-	1
	Ч-Ч-Ч-Ч	60	-	60
Чувствительные (n=63)	Ч-Ч-У-Ч	1	-	1
	Ч-Ч-Ч-У	1	-	1
	Ч-Ч-У-У	1	-	1

Примечание: ФХ¹ – офлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин; АГ² – канамицин, амикацин и капреомицин

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

4.1.1. Рифампицин

Молекулярно-генетический анализ исследуемых нами штаммов с помощью «ТБ-ТЕСТ» показал, что генетические детерминанты ЛУ к R были выявлены в 693/808 (85,8%) случаев МБТ, тогда как фенотипически устойчивых изолятов установлено 673/808 (83,3%) (Таблица 44). Отмечено большое разнообразие типов мутаций в 6 кодонах гена *rpoB*. Всего обнаружено 30 вариантов замен, из которых 12 (40%) двойных и 18 (60%) одиночных в 511, 513, 516, 533, 526, 531 кодонах.

Таблица 44 – Результаты бактериологического и молекулярно-генетического определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к рифампицину

Тип мутации <i>rpoB</i>	Количество штаммов (n=808)	Фенотипическая категория (n=808)													
		моно- и полирезистентные штаммы (n=75)						МЛУ, пре-ШЛУ и ШЛУ штаммы (n=670)				чувствительные к H и R (n=63)			
		Hy (n=48)	Hy ФХу (n=7)	Hy АГу (n=14)	Hy ФХу АГу (n=3)	Ry (n=2)	Ry ФХу АГу (n=1)	МЛУ (n=194)	МЛУ ФХу (n=65)	МЛУ АГу (n=190)	ШЛУ (n=221)	чув. (n=60)	чув. АГу (n=1)	чув. ФХу (n=1)	чув. ФХу АГу (n=1)
wt	115 (14,2%)	37	4	6	1			2		1	1	60	1	1	1
S531L	575 (71,2%)					1		177	57	167	173				
S531W	4 (0,5%)							2			2				
H526L	14 (1,7%)	1		4				4		3	2				
H526D	13 (1,6%)							4	3	1	5				
H526R	9 (1,1%)					1		1		2	5				
H526Y	4 (0,5%)							1	2		1				
H526N	1 (0,1%)	1													
H526P	1 (0,1%)									1					
H526C	1 (0,1%)									1					
D516V	23 (2,9%)							3		3	17				
D516Y	6 (0,8%)	2	1		1					1	1				
Q513G	3 (0,4%)									2	1				
D516G	1 (0,1%)	1													
N513G	1 (0,1%)										1				
Q513K	1 (0,1%)										1				
L511R	1 (0,1%)														
L511P	11 (1,4%)	3	2	3						2	1				
L533P	4 (0,5%)	2		1							1				
L511P D516G	2 (0,3%)									1	1				

Продолжение таблицы 44

Тип мутации <i>proB</i>	Количество штаммов (n=808)	Фенотипическая категория (n=808)													
		моно- и полирезистентные штаммы (n=75)						МЛУ, пре-ШЛУ и ШЛУ штаммы (n=670)				чувствительные к Н и R (n=63)			
		Hy (n=48)	Hy ФХу (n=7)	Hy АГу (n=14)	Hy ФХу АГу (n=3)	Ry (n=2)	Ry ФХу АГу (n=1)	МЛУ (n=194)	МЛУ ФХу (n=65)	МЛУ АГу (n=190)	ШЛУ (n=221)	чув. (n=60)	чув. АГу (n=1)	чув. ФХу (n=1)	чув. ФХу АГу (n=1)
L511R D516Y	3 (0,4%)								1		2				
L511P D516Y	3 (0,4%)										3				
L511P H526N	3 (0,4%)								3						
L511P H526D	1 (0,1%)							1							
L511R H526L	1 (0,1%)										1				
L533P H526N	2 (0,3%)										2				
L533P S531L	1 (0,1%)							1							
S531L D516Y	1 (0,1%)							1							
S531L H526Y	1 (0,1%)								1						
D516G S531W	1 (0,1%)	1													
D516G S522L	1 (0,1%)				1										
Всего	808	72 Hy (8,9%)						673 Ry (83,3%)				63 Нч и Rч (7,8%)			

Продолжение таблицы 44

Тип мутации <i>proB</i>	Количество штаммов (n=808)	Фенотипическая категория (n=808)													
		моно- и полирезистентные штаммы (n=75)						МЛУ, пре-ШЛУ и ШЛУ штаммы (n=670)				чувствительные к Н и R (n=63)			
		Hy (n=48)	Hy ФХу (n=7)	Hy АГу (n=14)	Hy ФХу АГу (n=3)	Ry (n=2)	Ry ФХу АГу (n=1)	МЛУ (n=194)	МЛУ ФХу (n=65)	МЛУ АГу (n=190)	ШЛУ (n=221)	чув. (n=60)	чув. АГу (n=1)	чув. ФХу (n=1)	чув. ФХу АГу (n=1)
Всего с мутациями	693 (85,8%)	24						669				0			
Всего без мутаций	115 (14,2%)	48						4				63			
Совпадения % (95% ДИ %-%)		66,7% (55,2-76,5)						99,4 (98,5-99,8)				100 (94,3-100)			
Всего совпадений % (95% ДИ %-%)		780/808 96,5% (95,0-97,6)													
Чувствительность % (95% ДИ %-%)		99,4% (98,5-99,8)													
Специфичность % (95% ДИ %-%)		82,2% (74,9-87,7)													
ПЦПР % (95% ДИ %-%)		96,5% (94,9-97,7)													
ПЦОР % (95% ДИ %-%)		96,5% (91,4-98,6)													

Среди МБТ-МЛУ мутации определены в 192/194 (99%), в 220/221 (99,5%) МБТ-ШЛУ, 254/255 (99,6%) в пре-ШЛУ и 2/2 (100,0%) в монорезистентных к R. В то же время в 4 из 673 (0,6%) МБТ, устойчивых к препарату, мутации в анализируемом участке гена *rpoB* не были обнаружены, что возможно связано с возникновением мутаций за пределами данного участка и не включёнными в биочип [176] или с присутствием в культуре гетеропопуляции микобактерий (чувствительных и устойчивых). Совпадение результатов, полученных обоими методами, в данной группе штаммов составило 99,4 % (ДИ 98,5%-99,8%).

Наиболее часто встречаемой была мутация S531L, выявленная в 575 (71,2%) изолятах, далее D516V в 23 (2,9%), H526L в 14 (1,7%), H526D в 13(1,6%), L511P в 11 (1,4%), H526R в 9 (1,1%) и D 516Y в 6 (0,8%). Остальные одиночные, а также двойные замены встречались в единичных случаях. Замена S531L среди всех выявленных мутаций преобладали 575/693 (83,0%) штаммов, что объясняется высокой трансмиссивностью таких штаммов вследствие наличия компенсаторных мутаций (эпистаз), незначительного снижения «фитнеса» по отношению к чувствительным штаммам и ассоциации с высоким уровнем ЛУ [38; 73; 113; 140; 141].

Наибольшие расхождения между результатами получены для 72 фенотипически устойчивых к H и дополнительно устойчивых к ФХ или АГ МБТ, из которых в 24 (33,3%) были выявлены мутации, ответственные за устойчивость к R. Среди обнаруженных замен преобладала L511P, она обнаружена в 8 (72,7%) чувствительных штаммах, из 11 содержащих эту мутацию. Следующей по частоте встречаемости была H526L, выявленная в 5/14 (35,7%) МБТ, D516Y обнаружена в 4/6 (66,7%), L533P в 3/4 (75%), D516G в одном и H526N в другом, а также две двойные D516G/S531W и D516G/S522L в двух изолятах. Можно предположить, что штаммы с этими мутациями обладают медленной скоростью роста (фитнес) в присутствии препарата или с гетерорезистентностью популяции МБТ, в которой присутствуют как чувствительные, так и устойчивые субпопуляции. Поэтому при КК = 1,0 мкг/мл в Bactec MGIT 960 такие изоляты как правило оказываются чувствительными к R.

Тем не менее, при получении с помощью молекулярно-генетических методов результата устойчивости МБТ к R необходимо однозначно учитывать это при выборе схемы лечения, особенно когда штамм по культуральным данным обладает чувствительностью и к H и R. В случае, 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 [352].

Вместе с тем, применение дополнительных фенотипических методов на основе микроразведений, которые в большей степени коррелируют с молекулярно-генетическими методами, позволит снизить получение неоднозначных результатов [86; 186; 187; 246].

Совпадение результатов, полученных обоими методами, в данной группе штаммов составило всего лишь 66,7% (ДИ 55,2%-76,5%).

Среди 63 чувствительных МБТ к H и R, 3 (4,8%) изолята дополнительно были устойчивыми к ФХ и/или АГ, из которых один (1,6%) обладал устойчивостью только к ФХ (Ofx и Mfx), другой (1,6%) к АГ (Km) и третий (1,6%) к тем и другим. Мутации, связанные с устойчивостью к H и R, не были обнаружены. Совпадение результатов, полученных обоими методами, среди изолятов составило 100,0% (ДИ 94,3%-100%).

Таким образом, совпадение результатов в целом, полученных двумя методами, составило 96,5% (ДИ 95%-97,6%).

4.1.2. Изониазид

Проведённый нами анализ генов *katG*, *inhA*, *ahpC* с помощью «ТБ-ТЕСТ» показал, что мутации были обнаружены в 740 (91,6%) устойчивых к препарату МБТ, а их отсутствие в 68 (8,4%) чувствительных. Напротив, в Bactec MGIT 960 742 (91,8%) штамма были устойчивыми и 66 чувствительными (8,2%) (Таблица 45).

Таблица 45 – Результаты бактериологического и молекулярно-генетического определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к изониазиду

Тип мутации katG/inhA/ ahpC	Количество штаммов (n=808)	Фенотипическая категория (n=808)													
		моно- и полирезистентные штаммы (n=75)					МЛУ, пре-ШЛУ и ШЛУ штаммы (n=670)				чувствительные к ИЗН и РИФ (n=63)				
		Hy (n=48)	Hy ФХу (n=7)	Hy АГу (n=14)	Hy ФХу АГу (n=3)	Ry (n=2)	Ry ФХу АГу (n=1)	МЛУ (n=194)	МЛУ ФХу (n=65)	МЛУ АГу (n=190)	ШЛУ (n=221)	чув. (n=60)	чув. АГу (n=1)	чув. ФХу (n=1)	чув. ФХу АГу (n=1)
wt	68 (8,4%)					2	1	2				60	1	1	1
S315T	550 (68,1%)	38	3	12	2			157	47	144	147				
S315N	2 (0,3%)								1		1				
S315T, c(-15)t	139 (17,2%)	4	4	2	1			25	13	32	58				
S315T,I335V	15 (1,9%)							2	1	5	7				
S315T,I335V, c(-15)t	1 (0,1%)									1					
S315T,t(-8)a	6 (0,7%)								2	2	2				
S315T, t(-8)g	5 (0,6%)							2	1	1	1				
S315T,c(-12)t	3 (0,4%)	1								2					
c(-15)t	19 (2,4%)	5						6		3	5				
Всего	808	72 Hy (8,9%)				3 Ry (0,3%)		670 Ry Hy (83%)				63 Нч и Рч (7,8%)			
Всего с мутациями	740 (91,6%)	72				0		668				0			
Всего без мутаций	68 (8,4%)	0				3		2				63			
Совпадения % (95 ДИ %-%)		100% (94,9-100)				100% (43,9-100)		99,7 (98,9-99,9)				100 (94,3-100)			
Всего совпадений % (95 ДИ %-%)		806/808 99,8% (99,1-99,9)													

Продолжение таблицы 45

Тип мутации katG/inhA/ ahpC	Количество штаммов (n=808)	Фенотипическая категория (n=808)												
		моно- и полирезистентные штаммы (n=75)					МЛУ, пре-ШЛУ и ШЛУ штаммы (n=670)				чувствительные к ИЗН и РИФ (n=63)			
		Hy (n=48)	Hy ФХу (n=7)	Hy АГу (n=14)	Hy ФХу АГу (n=3)	Ry (n=2)	Ry ФХу АГу (n=1)	МЛУ (n=194)	МЛУ ФХу (n=65)	МЛУ АГу (n=190)	ШЛУ (n=221)	чув. (n=60)	чув. АГу (n=1)	чув. ФХу (n=1)
Чувствительность % (95% ДИ%-%)		99,7% (99,0-99,9)												
Специфичность % (95% ДИ %-%)		100% (94,5-100)												
ПЦПР % (95% ДИ %-%)		100% (99,5-100)												
ПЦОР % (95% ДИ %-%)		97,1% (89,9-99,2)												

Среди МБТ-МЛУ мутации определены в 99%, в 100% в пре-ШЛУ и МБТ-ШЛУ и 100% в монорезистентных к Н и в сочетании к ФХ и/или АГ. Наибольшее количество замен 567/740 (76,6%) выявлено в гене *katG*, из которых превалировала S315T, обнаруженная в 550/567 (97%) изолятах, следующей по встречаемости была двойная замена S315T, I335V выявленная в 15/567 (2,6%), и в двух - S315N (0,4%). Мутации в двух генах *katG* и *inhA* выявлены в 151 из 740 (20,4%) изолятов, из которых превалировало сочетание мутаций S315T, с(-15)t, обнаруженные в 139 из 151 (92,1%) МБТ, замены S315T, t(-8)a; S315T, t(-8)g и S315T, I335V, с(-15)t обнаружены в 6/151 (4,0%), в 5/151 (3,3%) и в 1 (0,7%) изоляте соответственно.

В гене *inhA* был выявлен только один тип замены с(-15)t, обнаруженный в 19 из 740 (2,6%) МБТ. В 3 (0,4%) изолятах обнаружено сочетание мутаций в генах *katG* и *ahpC* - S315T, с(-12)t.

Мутация S315T и в сочетании с с(-15)t преобладали среди МЛУ, пре-ШЛУ и ШЛУ изолятов, выявленные в 495/550 (90,0%) и 128/139 (92,1%) среди изолятов с этими заменами соответственно. Двойная замена S315T, I335V в *katG* и в сочетании с с(-15)t, а также мутация S315T в сочетании с t(-8)a и t(-8)g были выявлены только среди МЛУ, пре-ШЛУ и ШЛУ штаммов в 27 случаях из 670 (4%). Мутация с(-15)t в промоторной области гена *inhA* также преобладала среди вышеуказанных штаммов и определена в 14 из 19 изолятов (73,7%).

Расхождение результатов было получено для 2 (0,3%) штаммов с МЛУ, определённых с помощью «ТБ-ТЕСТ» как монорезистентные к R, несмотря на то, что биочип позволяет определять довольно широкий спектр мутаций в трёх генах, в отличие от рекомендованной ВОЗ тест-системы GenoType MTBDRplus, с помощью которой мутации можно выявить только в двух генах - *katG* и *inhA* [43; 58]. Возможно, расхождения связаны с иными механизмами устойчивости [89; 213; 360].

Таким образом, совпадение результатов, полученных двумя методами, составило 99,8% (ДИ 99,1%-99,9%).

4.1.3. Этамбутол

Развитие устойчивости МБТ к Emb связывают с возникновением мутаций в гене *embB* [255; 265]. Наиболее часто встречающиеся являются замены в 306 кодоне, но и они выявляются как в устойчивых МБТ к Emb, так и в чувствительных [60]. Известны также, существующие проблемы в определении ЛЧ к этому препарату традиционными бактериологическими методами [214]. Это может быть связано с бактериостатической природой Emb, уменьшению его активности в культуральной среде или узкой областью между МИК чувствительных и устойчивых изолятов МБТ [143; 165].

В настоящем исследовании нами также не установлено достоверной корреляции между молекулярным и фенотипическим определением ЛЧ МБТ к Emb. Устойчивость к препарату в Bactec MGIT 960 была определена в 464/808 (57,4%) изолятах, из которых мутации в гене *embB* обнаружены в 422/464 (90,9%) и 42/464 (9,1%) они не выявлены. Напротив, среди 344/808 (42,6%) чувствительных МБТ, мутации были выявлены практически в половине изолятов - в 163/344 (47,4%) и не обнаружены у 181/344 (52,6%) (Таблица 46).

Наиболее часто выявляли замену M306V, обнаруженную в 195/577 (33,8%) случаев среди одиночных мутаций. Далее по частоте встречаемости были D354V, M306I1 и Q497R - в 85/577 (14,7%), 78/577 (13,5%) и 58/577 (10,1%) соответственно. Замены G406A и N296H, а также M306I2 и G406D выявляли примерно в одинаковом проценте случаев - 37/577 (6,4%), 31/577 (5,4%) и 20/577 (3,5%), 19/577 (3,3%) соответственно. В 8 (1,0%) изолятах обнаружены двойные мутации в этом гене, из них в 6 (75%) устойчивых и 2 (25%) чувствительных.

Так или иначе, можно сказать, что появление мутаций в гене *embB* лучше прогнозирует истинную устойчивость по сравнению с фенотипическим определением, к тому же известны проблемы в воспроизводимости результатов бактериологическими методами.

Таблица 46 – Результаты бактериологического и молекулярно-генетического определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к этамбутолу

ТБ-ТЕСТ (<i>embB</i>)	Лекарственная чувствительность в Bactec MGIT 960		Всего n=808 (%)
	Emb (КК=5,0 мкг/мл)		
	Чувствительность (n=344)	Устойчивость (n=464)	
wt	181	42	223 (27,6)
M306V	25	170	195
D354A	32	53	85
M306I1	26	52	78
Q497R	12	46	58
G406A	12	25	37
N296H	14	17	31
M306I2	10	10	20
G406D	7	12	19
G406S	3	9	12
Q497K	5	7	12
M306L	2	6	8
M306I3	4	3	7
S297A	2	3	5
Y319C	3	1	4
G406C	2	1	3
Y319S	-	1	1
Y319D	1	-	1
Q497P	1	-	1
Всего в <i>embB</i>	161	416	577 (71,4)
M306I1/N296H	-	2	2
M306I1/G406D	-	1	1
M306I2/S297A	1	-	1
M306V/Q497R	-	1	1
M306V/Q497D	-	1	1
D354A/D328G	-	1	1
D354A/M306V	1	-	1
Всего двойных в <i>embB</i>	2	6	8 (1)
Всего мутаций	163	422	585
Нет мутаций	181	42	223
Чувствительность % (95% ДИ%-%)	91 (88-93,2)		
Специфичность % (95% ДИ %-%)	52,6 (47,3-57,8)		
ПЦПР % (95% ДИ %-%)	72,1 (68,4-75,6)		
ПЦОР % (95% ДИ %-%)	81,2 (75,5-85,8)		

Таким образом, чувствительность «ТБ-ТЕСТ» составила 91 % (ДИ %%; 88-93,2), а специфичность лишь 52,6% (ДИ %%; 47,3-57,8). Полученные

результаты демонстрируют необходимость изучения лекарственной устойчивости МБТ к Emb с использованием метода микроразведений [363].

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

После того как в 2008 году ВОЗ впервые рекомендовала значения КК препаратов резервного ряда, в рутинную работу Централизованной бактериологической лаборатории МНПЦБТ было внедрено тестирование чувствительности МБТ к препаратам фторхинолонового ряда в системе Bactec MGIT 960 [11]. В 2014 году для Lfx и Mfx эти параметры были пересмотрены, тогда как для Ofx остались неизменными. В связи с этим, данные о ЛЧ 808 изолятов МБТ к ФХ в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 в жидкой питательной среде М7Н9 в процессе клинической работы были получены за два разных периода. В первом периоде тесты на чувствительность к Ofx (КК=2,0 мкг/мл), Lfx и Mfx были выполнены для 213 (26,4%) штаммов с применением КК, рекомендованных ВОЗ в 2008 году [341], во втором - для 595 (73,6%) штаммов в 2014 году [346].

По данным определения ЛЧ МБТ к Ofx, Lfx и Mfx, представленным в таблице 47, достоверно различались результаты, полученные в отношении Lfx и Mfx ($p < 0,001$), для которых и были в 2014 году ВОЗ пересмотрены значения КК. В первом периоде наибольший процент чувствительных штаммов при КК=2,0 мкг/мл был обнаружен к Lfx – 144/213 (67,6%), тогда как к Mfx (КК=0,25 мкг/мл) преобладали устойчивые изоляты – 85/213 (39,9%) против 69/213 (32,3%) к Lfx, что не совсем логично, так как Mfx является препаратом четвертого поколения, тогда как Lfx – третьего. Напротив, во втором периоде устойчивые штаммы к Lfx при КК=1,5 мкг/мл преобладали по отношению к Mfx и обнаружены в 173 из 595 (29,1%) изолятов, тогда как к Mfx при КК=0,5 мкг/мл были устойчивыми 165/595 (27,7%) МБТ, что оправдывает пересмотр в 2014 году ВОЗ значений КК к этим препаратам.

Таблица 47 – Данные о лекарственной чувствительности клинических штаммов *M.tuberculosis* к препаратам группы фторхинолонов, полученные в два периода

Препарат	Количество штаммов МБТ и данные об устойчивости/чувствительности								Достоверность различий
	I период (n=213)				II период (n=595)				
	устойчивые		чувствительные		устойчивые		чувствительные		
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Ofx	83	39	130	61	213	35,8	382	64,2	p<0,05
Lfx	69	32,4	144	67,6	173	29,1	422	70,9	p<0,05
Mfx	85	39,9	128	60,1	165	27,7	430	72,3	p<0,05
Перекрёстная устойчивость	57 из 85 (67,1% ДИ 56,5-76,1)				136 из 213 (63,8% ДИ 57,2-70,0)				p>0,05

Следует отметить, что во втором периоде из 213 устойчивых к Ofx («ранние» ФХ) штаммов у 40 (18,8%) наблюдали чувствительность к «поздним» (новым) — Lfx и Mfx. Вероятнее всего данная группа штаммов обладала устойчивостью низкого уровня.

Перекрёстной устойчивостью в первом периоде из максимального количества устойчивых к Mfx штаммов обладали 57/85 (67,1%), а во втором из максимального количества устойчивых к Ofx 136/213 (63,8%). Результаты значимо не отличались (p>0,05). Таким образом, у 34,0% штаммов, исследованных в оба периода, не отмечали перекрёстную устойчивость к ФХ при использовании КК, рекомендованных ВОЗ в 2008 и 2014 году.

Известно, что формирование лекарственной устойчивости ко всем ФХ обусловлена, главным образом, появлением мутаций в гене *gyrA* и некоторыми заменами в *gyrB* [149; 225; 226; 309]. В связи с этим нами проведён анализ корреляции результатов определения ЛЧ МБТ к ФХ, полученных с помощью «ТБ-ТЕСТ» и в системе Bactec MGIT 960 в два разных периода тестирования 808 исследуемых штаммов.

По данным «ТБ-ТЕСТ», из 808 исследованных штаммов у 504 (62,4%) мутации в обоих генах не были обнаружены и у 304 (37,6%) выявлены замены в *gyrA* и/или *gyrB* (Таблица 48).

Таблица 48 – Результаты молекулярно-генетического и бактериологического определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к фторхинолонам

ТБ-ТЕСТ (<i>gyrA/gyrB</i>)	Лекарственная чувствительность в Bactec MGIT 960										Всего n=808 (%)
	Ofx КК = 2,0 мкг/мл n=808		Lfx КК = 2,0* мкг/мл n=213 I период		Lfx КК = 1,5** мкг/мл n=595 II период		Mfx КК = 0,25* мкг/мл n=213 I период		Mfx КК = 0,5** мкг/мл n=595 II период		
	чув n=512	уст n=296	чув n=144	уст n=69	чув n=422	уст n=173	чув n=128	уст n=85	чув n=430	уст n=165	
wt/wt	501	3	126		378		126		376	2	504 (62,4)
wt/R485C	2		1		1		1		1		2
wt/S486F	1				1				1		1
wt/E540D	1				1					1	1
wt/T539N	1	1			2				2		2
wt/T539P	1				1				1		1
wt/T539I	1				1				1		1
wt/N538K	1	1	2					2			2
wt/N538D		1			1				1		1
wt/D500H		2		1		1		1	1		2
wt/D500N/ E540D	1	1	2				1	1			2

Продолжение таблицы 48

ТБ-ТЕСТ (<i>gyrA/gyrB</i>)	Лекарственная чувствительность в Vastec MGIT 960										Всего n=808 (%)
	Ofx КК = 2,0 мкг/мл n=808		Lfx КК = 2,0* мкг/мл n=213 I период		Lfx КК = 1,5** мкг/мл n=595 II период		Mfx КК = 0,25* мкг/мл n=213 I период		Mfx КК = 0,5** мкг/мл n=595 II период		
	чув n=512	уст n=296	чув n=144	уст n=69	чув n=422	уст n=173	чув n=128	уст n=85	чув n=430	уст n=165	
wt/wt	501	3	126		378		126		376	2	504 (62,4)
wt/D500N		1			1				1		1
Всего в <i>gyrB</i>	9	7	5	1	9	1	2	4	9	1	16 (1,9)
D94G		116		33		83		33		83	116
D94N		34		10		24		10		24	34
D94Y		13		3		10		3		10	13
D94A	2¹	30	9	1	12	10		10¹	13¹	9	32
D94H		11				11				11	11
A90V		47	2	7	20	18		9	30	8	47
S91P		14	2	3	1	8		5		9	14
G88C		3		1		2		1		2	3
G88A		2			2				2		2

Продолжение таблицы 48

ТБ-ТЕСТ (<i>gyrA/gyrB</i>)	Лекарственная чувствительность в Vastec MGIT 960										Всего n=808 (%)
	Ofx КК = 2,0 мкг/мл n=808		Lfx КК = 2,0* мкг/мл n=213 I период		Lfx КК = 1,5** мкг/мл n=595 II период		Mfx КК = 0,25* мкг/мл n=213 I период		Mfx КК = 0,5** мкг/мл n=595 II период		
	чув n=512	уст n=296	чув n=144	уст n=69	чув n=422	уст n=173	чув n=128	уст n=85	чув n=430	уст n=165	
wt/wt	501	3	126		378		126		376	2	504 (62,4)
D94V		2		2				2			2
Всего в <i>gyrA</i>	2	272	13	60	35	166		73	45	156	274 (33,9)
A90V/D94N		1		1				1			1
A90V/S91P		2				2				2	2
D94A/A90V		2				2				2	2
G88A/H70A/ G509A		1		1				1			1
S91P/D94A		1		1				1			1
Двойные в <i>gyrA</i>		7		3		4		3		4	7 (0,9)
A90V/ A543T		2				2				2	2
D94G/ G509A		1		1				1			1
D94A/ E540D		1		1				1			1

Продолжение таблицы 48

ТБ-ТЕСТ (<i>gyrA/gyrB</i>)	Лекарственная чувствительность в Vactec MGIT 960										Всего n=808 (%)
	Ofx КК = 2,0 мкг/мл n=808		Lfx КК = 2,0* мкг/мл n=213 I период		Lfx КК = 1,5** мкг/мл n=595 II период		Mfx КК = 0,25* мкг/мл n=213 I период		Mfx КК = 0,5** мкг/мл n=595 II период		
	чув n=512	уст n=296	чув n=144	уст n=69	чув n=422	уст n=173	чув n=128	уст n=85	чув n=430	уст n=165	
wt/wt	501	3	126		378		126		376	2	504 (62,4)
A90V/ D500N		1		1				1			1
D94N/ T539P		1		1				1			1
A90V/D94N/ A543T		1		1				1			1
Двойные в <i>gyrA/gyrB</i>		7		5		2		5		2	7 (0,9)
Всего мутаций	11	293	18	69	44	173	2	85	54	163	304 (37,6)
Нет мутаций	501	3	126		378		126		376	2	504 (62,4)
Чувстви- тельность % (95% ДИ%-%)	99 (97,1-99,6)		100 (94,7-100)		100 (97,8-100)		100 (95,7-100)		98,8 (95,7-99,7)		
Специфи- чность % (95% ДИ %-%)	97,8 (96,2-98,8)		87,5 (81,1-91,9)		89,6 (86,3-92,1)		98,4 (94,5-99,6)		87,4 (84,0-90,3)		
ПЦПР % (95% ДИ %-%)	96,4 (93,6-97,9)		79,3 (69,6-86,5)		79,7 (73,9-84,5)		97,7 (92,0-99,4)		75,1 (69,0-80,4)		

Продолжение таблицы 48

ТБ-ТЕСТ (<i>gyrA/gyrB</i>)	Лекарственная чувствительность в Vastec MGIT 960										Всего n=808 (%)
	Ofx КК = 2,0 мкг/мл n=808		Lfx КК = 2,0* мкг/мл n=213 I период		Lfx КК = 1,5** мкг/мл n=595 II период		Mfx КК = 0,25* мкг/мл n=213 I период		Mfx КК = 0,5** мкг/мл n=595 II период		
	чув n=512	уст n=296	чув n=144	уст n=69	чув n=422	уст n=173	чув n=128	уст n=85	чув n=430	уст n=165	
wt/wt	501	3	126		378		126		376	2	504 (62,4)
ПЦОР % (95% ДИ %-%)	99,4 (98,3-99,8)		100 (97-100)		100 (99-100)		100 (97-100)		99,5 (98,1-99,8)		

Примечание: * - КК Lfx и Mfx рекомендованы в 2008 г, ** - КК Lfx и Mfx рекомендованы в 2014г.

¹ - один штамм чувствительный к Ofx, но устойчивый к Mfx при КК = 0,25 мкг/мл, другой чувствительный к обоим препаратам (к Mfx при КК = 0,5 мкг/мл). Зелёным цветом отмечены мутации, обуславливающие перекрёстную устойчивость МБТ к ФХ независимо от применения КК в разные периоды, красным - мутации, приводящие к расхождению с результатами фенотипического определения ЛЧ в зависимости от применения КК в разные периоды.

В 274 (33,9%) изолятов выявлены одиночные мутации только в *gyrA*, у 7 (0,9%) двойные, ещё у 7 (0,9%) двойные в обоих генах - *gyrA/gyrB* и у 16 (1,9%) только в *gyrB*. Перекрестная устойчивость ко всем ФХ, независимо от применения КК в разные периоды, наблюдалась у 193/808 (23,9%) изолятов (Таблица 48 – отмечено зелёным цветом), из которых 179 (92,7%) с одиночными мутациями в гене *gyrA* и у всех 14/193 (7,3%) с двойными мутациями как в *gyrA*, так и обоих генах. Среди выявленных одиночных мутаций преобладали замены в 94 кодоне, которые «расположились» в следующей последовательности: в 116/193 (60,1%) - D94G, 34/193 (17,6%) - D94N, 13/193 (6,7%) - D94Y, 11/193 (5,7%) - D94H и 2/193 (1,0%) - D94V. Все двойные мутации выявлены в единичных случаях.

Расхождения в результатах фенотипического и молекулярно-генетического определения ЛЧ получены для 95/808 (11,8%) изолятов с мутациями в гене *gyrA* (Таблица 48 – отмечено красным цветом) и во всех 16 (1,9%) в *gyrB*. Из 95 изолятов с заменами в *gyrA* наибольшее количество 47 (49,5%) выявлено с мутацией A90V. Все штаммы с данной заменой были устойчивыми к Ofx. В первом периоде были выявлены 9 (19,1%) штаммов с этой мутацией, из которых 7 (77,8%) были устойчивыми к Lfx (КК=2,0 мкг/мл) и все 9 (100,0%) к Mfx (КК=0,25 мкг/мл), тогда как во втором периоде тестирования из 38 (80,9%) выявленных с A90V изолятов 18 (47,4%) были устойчивыми к Lfx (КК=1,5 мкг/мл) и 8 (21,1%) к Mfx (КК=0,5 мкг/мл).

Второе место по количеству «спорных» результатов тестирования было у штаммов с мутацией D94A, выявленной в 32/95 (33,7%) изолятах, из которых 10 (31,3%) в первый период и 22 (68,7%) во второй. Как видно из таблицы 50 из 32 изолятов 30 (93,8%) были устойчивыми к Ofx и 2 (6,2%) чувствительными. К Mfx при КК=0,25 мкг/мл все 10 (100%) МБТ были устойчивыми, тогда как к Lfx при КК=2,0 мкг/мл только один изолят (10%) обладал устойчивостью. Во второй период (после пересмотра КК к Lfx и Mfx) чувствительные штаммы преобладали над устойчивыми как к Lfx, так и Mfx приблизительно в одинаковом соотношении – 12/22 (54,5%) и 10/22 (45,6%) к Lfx и 13/22 (59,1%) и 9/22 (40,9%)

к Mfx соответственно. Следует отметить, что из двух чувствительных штаммов к Ofx, один был устойчивым к Mfx при КК=0,25 мкг/мл и чувствительным при КК=0,5 мкг/мл.

Следующая по встречаемости мутация была S91P, обнаруженная в 14/95 (14,7%) изолятах. Все 14 штаммов с этой мутацией были устойчивыми к Ofx и Mfx (5 при КК=0,25 мкг/мл и 9 при 0,5 мкг/мл). Однако, для Lfx результаты тестирования показали, что при КК=2,0 мкг/мл небольшое количество проанализированных изолятов устойчивые и чувствительные штаммы определены практически в равном количестве – 2/5 (40%) и 3/5 (60%), а при КК 1,5 мкг/мл преобладали устойчивые изоляты - 8/9 (88,9%).

Замена G88A выявлена в 2/95 (2,1%) изолятах устойчивых к Ofx и чувствительных к Lfx при КК=1,5 мкг/мл и к Mfx при КК=0,5 мкг/мл.

Мутации в гене *gyrB* выявлены в 16 клинических изолятах: в 9 (56,3%) чувствительных к Ofx и 7 (43,7%) устойчивых. Замены T539N (n=2), N538K (n=2) и двойная D500N/E540D (n=2) обнаружены как в чувствительных, так и устойчивых МБТ, что свидетельствует о пограничной чувствительности/устойчивости к препарату. Независимо от применения КК (в указанные периоды тестирования) штаммы с данными мутациями обладали чувствительностью к Lfx, в отношении Mfx два изолята с N538K и один с двойной D500N/E540D были устойчивыми в первый период при КК=0,25 мкг/мл. Мутация D500N была обнаружена в двух устойчивых к Ofx (при КК=2,0 мкг/мл) изолятах и при двух (1,5 мкг/мл и 2,0 мкг/мл) КК к Lfx. Один из них проявлял перекрёстную устойчивость ко всем трём ФХ при КК=0,25 мкг/мл к Mfx, а другой при КК=0,5 мкг/мл был чувствительным. Замены D500N и N538D обнаружены в двух устойчивых к Ofx штаммах, но не приводили к устойчивости к Lfx и Mfx (во второй период тестирования). Штамм с E540D был устойчивым при КК=0,5 мкг/мл к Mfx, но чувствительным к Ofx и при 1,5 мкг/мл к Lfx. Все изоляты с R485C, S486F, T539P и T539I не обладали устойчивостью к тестируемым ФХ.

При расчёте чувствительности, специфичности, прогностической значимости положительного и отрицательного результатов тест-системы

«ТБ-ТЕСТ» (в оба периода) наибольшие значения были установлены для Ofx (КК=2,0 мкг/мл) и Mfx (КК=0,25 мкг/мл), что нельзя сказать о Lfx, несмотря на то, что он является препаратом «третьего поколения», но обладает все таки меньшей активностью по сравнению с Mfx.

Таким образом, из полученных результатов видно, что мутации A90V, D94A, S91P и G88A в гене *gyrA* приводят к перекрёстной устойчивости МБТ к исследуемым ФХ, но, по-видимому, такие штаммы обладают разной степенью устойчивости к Lfx и Mfx. Замены в *gyrB* (кроме R485C, S486F, T539P и T539I) приводят к разной степени устойчивости к исследуемым ФХ. Из этого следует, что снижение КК для Lfx до 1,0 мкг/мл и применение КК 0,25 мкг/мл для Mfx (рекомендованной в 2008 году) позволило бы согласовать результаты молекулярно-генетического и фенотипического определения ЛЧ в системе Bactec MGIT 960 к ФХ.

В техническом отчёте 2018 года ВОЗ предлагает снизить значение КК для Lfx до 1,0 мкг/мл, а для Mfx использовать две концентрации — КК=0,25 мкг/мл и клиническую [351], равную 1,0 мкг/мл. Тестирование изолятов МБТ при «клиническом пограничном значении» даёт возможность врачу варьировать дозой Mfx в пределах максимально допустимого значения в режиме проводимого лечения, но только при условии сохранения чувствительности исследуемого штамма к ней.

Следует отметить, что в данном отчёте были использованы результаты совместной работы, проведённой сотрудниками МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ и ФГБУН института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, по изучению чувствительности МБТ к препаратам фторхинолонового ряда. Рекомендованные ВОЗ в 2018 году значения КК Lfx, Mfx и Ofx для оценки чувствительности в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 соответствуют установленным в МНПЦБТ [14].

4.3. 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: для Км - 2,5 мкг/мл, Ам - 1,0 мкг/мл и См - 2,5 мкг/мл и до настоящего времени они не менялись (в отличие от препаратов фторхинолонового ряда).

По данным определения ЛЧ МБТ к инъекционным ПТП, представленным в таблице 49, устойчивость к Км преобладала и определена в 422/808 (52,2%) изолятах, к Ам в 191/808 (23,6%) и 164/808 (20,3%) к См. Перекрёстная устойчивость наблюдалась у 149/422 изолятов (35,3%) из количества устойчивых МБТ к Км.

Таблица 49 – Результаты изучения лекарственной чувствительности изолятов *M.tuberculosis* к инъекционным препаратам

Препарат	Количество штаммов МБТ и данные об устойчивости/чувствительности			
	устойчивые		чувствительные	
	абс.	%	абс.	%
Км	422	52,2	386	47,8
Ам	191	23,6	617	76,4
См	164	20,3	644	79,7
Перекрёстная устойчивость	149 из 422 (35,3% ДИ 30,9-40,0)			

Проведённое нами исследование штаммов МБТ с помощью «ТБ-ТЕСТ» показало, что в 400/808 (49,5%) изолятах мутации в генах *rrs* и в промоторной части *eis* не были выявлены и в 408/808 (50,5%) случаях обнаружены мутации в *rrs* и/или *eis* (Таблица 50).

Таблица 50 – Результаты бактериологического и молекулярно-генетического определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к инъекционным препаратам

ТБ-ТЕСТ (<i>rrs/eis</i>)	Лекарственная чувствительность в Bactec MGIT 960						Всего n=808 (%)
	Km КК = 2,5 мкг/мл		Am КК = 1,0 мкг/мл		Cm КК = 2,5 мкг/мл		
	чувствительные n=386	устойчивые n=422	чувствительные n=617	устойчивые n=191	чувствительные n=644	устойчивые n=164	
wt/wt	364	36	395	5	387	13	400 (49,5%)
a1401g/wt		144		144	3	141	144
g1484t/wt		1		1		1	1
Всего в <i>rrs</i>		145		145	3	142	145 (17,9%)
a1401g/c(-12)t		1		1		1	1
a1401g/g(-10)a		1		1		1	1
Всего в <i>rrs</i> и <i>eis</i>		2		2		2	2 (0,3)
wt/c(-12)t	14	50	62	2	62	2	64
wt/c(-14)t	6	34	14	26	38	2	40
wt/g(-10)a	2	83	82	3	83	2	85
wt/g(-10)c		1	1		1		1
wt/g(-37)t		70	63	7	69	1	70
wt/g(-37)t g(-10)a		1		1	1		1
Всего в <i>eis</i>	22	239	222	39	254	7	261 (32,3%)
Всего мутаций в <i>rrs</i> и <i>eis</i>	22	386	222	186	257	151	408 (50,5%)
Нет мутаций в <i>rrs</i> и <i>eis</i>	364	36	395	5	387	13	400 (49,5%)

Продолжение таблицы 50

ТБ-ТЕСТ (<i>rrs/eis</i>)	Лекарственная чувствительность в Bactec MGIT 960						Всего n=808 (%)
	Km КК = 2,5 мкг/мл		Am КК = 1,0 мкг/мл		Cm КК = 2,5 мкг/мл		
	чувствительные n=386	устойчивые n=422	чувствительные n=617	устойчивые n=191	чувствительные n=644	устойчивые n=164	
wt/wt	364	36	395	5	387	13	400 (49,5%)
Чувствительность % (95% ДИ%-%)	91,5 (88,4-93,8)		97,4 (94-98,9)		92,1 (86,9-95,3)		
Специфичность % (95% ДИ %-%)	94,3 (91,5-96,2)		64 (60,2-67,7)		60,1 (56,3-63,8)		
ПЦПР % (95% ДИ %-%)	94,6 (92-96,4)		45,6 (40,8-50,4)		37 (32,5-41,8)		
ПЦОР % (95% ДИ %-%)	91 (87,8-93,4)		98,8 (97,1-99,5)		96,8 (94,5-98,1)		
Всего мутаций в <i>rrs</i> и в <i>rrs + eis</i>		147		147	3	144	147 (18,2%)
Нет мутаций в <i>rrs</i>	386	275	617	44	641	20	661 (81,8%)
Чувствительность % (95% ДИ%-%)	34,8 (30,4-39,5)		77 (70,5-82,4)		87,8 (81,9-92,0)		

Продолжение таблицы 50

ТБ-ТЕСТ (<i>rrs/eis</i>)	Лекарственная чувствительность в Bactec MGIT 960						Всего n=808 (%)
	Km КК = 2,5 мкг/мл		Am КК = 1,0 мкг/мл		Cm КК = 2,5 мкг/мл		
	чувствительные n=386	устойчивые n=422	чувствительные n=617	устойчивые n=191	чувствительные n=644	устойчивые n=164	
wt/wt	364	36	395	5	387	13	400 (49,5%)
Специфич-ность % (95% ДИ %-%)	100,0 (99,0-100,0)		100 (99,4-100)		99,5 (98,6-99,8)		
ПЦП % (95% ДИ %-%)	100 (97,5-100)		100 (97,5-100)		98 (94,2-99,3)		
ПЦОР % (95% ДИ %-%)	58,4 (54,6-62,1)		93,3 (91,2-95)		97 (95,4-98)		

В 145 (17,9%) выявлены замены только в гене *rrs*, в 2 (0,3%) в обоих генах и 261 (32,3%) только в промоторной области гена *eis*.

Все 145 (17,9%) изолятов с мутациями в гене *rrs* (a1401g - 144 и g1484t - 1) были устойчивыми к Km и Am, между тем к Cm устойчивостью обладал 141 (17,5%) изолят, что возможно связано с низкими значениями МИК трёх штаммов (0,4%) с мутацией a1401g [130; 188]. Напротив, два штамма (0,3%) с заменами a1401g/c-12t и a1401g/g-10a в обоих генах обладали перекрёстной устойчивости ко всем препаратам.

Мутации в промоторной области гена *eis* обнаружены в 261 (32,3%) изоляте, большинство из которых были устойчивыми к Km - 239 (91,6%), в 39 (14,9%) к Am и 7 (2,7%) к Cm.

Замены g(-10)a, c(-12)t, c(-14)t определены как среди устойчивых, так и среди чувствительных к инъекционным препаратам изолятов, но преобладали среди устойчивых к Km, выявленные в 83/85 (97,6%), 50/64 (78,1%) и 34/40 (85%) с этими заменами соответственно и в меньшем к Am и Cm. Напротив, замена g(-37)t обнаружена только в устойчивых к Km (n=70) изолятах и преобладала среди чувствительных к Am и Cm в 63/70 (90%) и 69/70 (98,6%) МБТ соответственно.

Вместе с тем, замена c(-14)t приводила к устойчивости к Am в 26/40 (65%) изолятах.

Для более детального анализа корреляции выявленных мутаций в обоих генах с установленной устойчивостью МБТ к инъекционным препаратам (в Bactec MGIT 960) проведено сравнение ЛЧ 808 штаммов возбудителя к данным препаратам (Таблица 51).

Таблица 51 – Связь между «профилями» лекарственной устойчивости к Km, Am и Cm, установленной в Bactec MGIT 960 и мутациями, обнаруженными в *rrs* и *eis* с помощью «ТБ-ТЕСТ»

Профиль ЛЧ			Количество штаммов с мутациями										wt	Всего
			<i>rrs</i>		<i>rrs/eis</i>		<i>eis</i>							
Km	Am	Cm	a1401g	g1484t	a1401g/c(-12)t	a1401g/g(-10)a	c(-12)t	c(-14)t	g(-10)a	g(-10)c	g(-37)t	g(-37t/ g(-10)a		
У	У	У	141	1	1	1	1	1					3	149
У	У	Ч	3				1	25	3		7	1		40
У	Ч	Ч					47	7	78	1	62		31	226
Ч	У	Ч											1	1
У	Ч	У					1	1	2		1		2	7
Ч	Ч	У											7	7
Ч	У	У											1	1
Ч	Ч	Ч					14	6	2				355	377

Примечание: У - устойчивость, Ч - чувствительность

Из данных, представленных в таблице 51, видно, что перекрёстная устойчивость ко всем препаратам в большинстве изолятов была связана с мутациями в гене *rrs* и наблюдалась в 142/149 (95,3%) штаммах МБТ. В двух изолятах в сочетании с заменами в *eis* - a1401g/c(-12)t, a1401g/g(-10)a, а также только в *eis* - c(-12)t и c(-14)t. В 3 (2,1%) изолятах мутации в обоих генах не были обнаружены.

В 226/808 (28,0%) изолятах определена устойчивость только к Км: в 195/808 (24,1%) выявлены мутации только в *eis* и 31/808 (3,8%) не были обнаружены. Среди замен преобладали g(-10)a, g(-37)t и c(-12)t, выявленные в 78/195 (40%), 62/195 (31,8%) и 47/195 (24,1%) случаях соответственно. Перекрёстная устойчивость к Км, Ам обнаружена в 40/808 (4,9%) изолятах, в которых преобладали мутации в гене *eis*, выявленные в 37/40 (92,5%), а также в 3 (7,5%) замена в *rrs* - a1401g. Следует отметить, что мутация c(-14)t преобладала среди штаммов устойчивых к обоим препаратам, обнаруженная в 25/40 (62,5%) изолятах.

Известно, что сверхэкспрессия гена *eis* приводит к низкому уровню устойчивости МБТ к Км и мутации в этом гене являются специфическими маркерами для устойчивых к этому препарату штаммов [356]. Это подтверждается при расчёте чувствительности, специфичности, прогностической значимости положительного и отрицательного результатов «ТБ-ТЕСТ» (Таблица 52). Так, при исследовании обоих генов чувствительность теста составляет 91,5%, а при исследовании только *rrs* 34,8%, прогностическая значимость отрицательного результата снижается с 91% до 58,4%.

Вместе с тем, присутствие мутаций в *eis* в 22/808 (2,7%) чувствительных к Км культурах, из которых в 14 (63,6%) c(-12)t, в 6 (27,3%) c(-14)t и в 2 (9,1%) g(-10)a, возможно связано с тем, что часть изолятов с данными мутациями обладают промежуточной степенью устойчивости (близкой к КК) к препарату и в Bactec MGIT 960 определяются то как чувствительные, то как устойчивые [89; 130; 356]. В отношении 31/808 (3,8%) устойчивых МБТ, мутации в которых в исследуемых генах не были обнаружены, генетические детерминанты

устойчивости могут быть расположены в 5' не транслируемом регионе гена *whiB7*, которые не включены в тест-систему [273].

Напротив, преобладающее большинство замен в *eis* выявлено среди чувствительных к Cm и Am изолятов; они обнаружены в 254/261 (97,3%) и 222/261 (85,1%) соответственно - это может свидетельствовать о том, что таковые не являются специфическими молекулярно-генетическими маркерами устойчивости к данным препаратам [356]. Это также подтверждается при расчёте статистических характеристик тест-системы «ТБ-ТЕСТ» (Таблица 50) - специфичность и прогностическая значимость положительного результата снижается при исследовании мутаций в двух генах до 64% и 45,6% для Am и до 60,1% и 37% для Cm. При этом чувствительность теста ниже при исследовании только гена *rrs* и составляет 77,0% для Am и 87,8% для Cm, тогда как при исследовании двух генов составляет 97,4% и 92,1% соответственно.

Это связано с тем, что у части штаммов замены с(-14)t,g(-37)t, g(-10)a и с(-12)t, выявленные в устойчивых к Am изолятах, также могут приводить к инактивации препарата, но инактивация в 3 раза ниже, чем в отношении Km [216; 356]. Кроме того, при определении МИК к инъекционным препаратам отмечено, что изоляты с мутациями в промоторной области *eis* имели низкий и умеренный уровень устойчивости к Km и МИК близкие к КК Am и Cm [188]. Нельзя исключить и тот факт, что определение ЛЧ к препаратам II ряда в Bactec MGIT 960 полностью не стандартизовано, и, следовательно, несоответствие между фенотипическими и молекулярно-генетическими тестами может быть связано с используемыми КК [196].

Таким образом, из полученных результатов исследования следует, что определение ЛЧ МБТ к основным препаратам первого и второго ряда с использованием Bactec MGIT 960 недостаточно для получения более точной и достоверной информации о фенотипических свойствах возбудителя туберкулёза. Проводимые исследования ЛЧ по рекомендуемым КК препаратов, прежде всего, необходимы для эпидемиологического скрининга ЛУ с целью установления изменений в микобактериальной популяции, дифференцирующих её от МБТ

«дикого» типа. В практической фтизиатрии из-за ограниченного количества АБП, входящих в режим лечения туберкулёза с ШЛУ возбудителя, особое значение приобретает информация о тех препаратах, которые возможно было бы использовать в противотуберкулёзной терапии при выявлении штаммов с «промежуточной» и низкой степенью устойчивости. Это также необходимо, чтобы минимизировать расхождения с экспресс-данными молекулярного исследования, получаемыми фтизиатрами в течении 2-3 дней. Особое место в решении этого вопроса занимают методы количественного определения ЛЧ МБТ, основанные на учёте МИК лекарственного средства при культивировании на питательной среде, содержащей широкий диапазон концентраций препарата.

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

Одной из перспективных тест-систем, а также предпочтительной в силу дешевизны и простоты использования, является Sensititre MycoTB (TREK Diagnostic Systems, США-Великобритания), основанная на методе серийных микроразведений и предназначенная для количественного определения ЛЧ клинических штаммов МБТ к 12 АБП в формате планшета. В свою очередь, проводимые исследования в области изучения механизмов формирования ЛУ МБТ показали, что мутации в генах, ответственных за ЛУ к R, H, ФХ, АГ (*rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, *gyrA/B*, *rrs* и *eis*), связаны с разной степенью устойчивости возбудителя [128; 187; 205; 218; 275]. Все это определяет необходимость проведения анализа результатов определения ЛЧ МБТ к ПТП методом микроразведений с использованием Sensititre MycoTB и молекулярно-генетическим определением генетических детерминант устойчивости «ТБ-ТЕСТ» для получения более достоверных данных о характере и степени устойчивости возбудителя, что поможет фтизиатрам в выборе оптимального для больного режима химиотерапии.

Тест-система Sensititre МусоТВ ранее была апробирована в ЦБЛ МНПЦБТ с помощью репрезентативной выборки чувствительных и устойчивых штаммов МБТ, отобранных по результатам тестирования ЛЧ бактериологическими методами [15, 17; 18]. На основе полученных результатов, а также анализа литературных данных, были установлены КК препаратов для дальнейшей оценки результатов определения ЛЧ в этой тест-системе. В результате значения КК для 12 ПТП и АБП были следующими (в мкг/мл): изониазид - 0,25; рифампицин - 1,0; рифабутин - 0,5; этамбутол - 4,0; стрептомицин - 1,0*; амикацин - 1,0; канамицин - 2,5; моксифлоксацин - 0,25*; офлоксацин - 2,0; ПАСК - 2,0; этионамид - 5,0; циклосерин - 32,0. После детального исследования чувствительных и устойчивых штаммов к Ofx и Mfx значения КК были уточнены и составили 2,0 мкг/мл и 0,5 мкг/мл соответственно [14; 15]. Также был установлен диапазон значений МИК при которых штаммы относили к «обладающим низкой чувствительностью» (значение МИК, равное КК или на одно разведение ниже) и «обладающим низким уровнем устойчивости» (на одно разведение выше значения КК). В таких случаях их оценивали, как штаммы с «промежуточной» степенью чувствительности/устойчивости (Рисунок 13).

Ofx	Mfx	R	Am	S	Rfb	PAS	Eto	Cs	H	Km	Emb
32,0	8,0	16,0	16,0	32,0	16,0	64,0	40,0	256,0	4,0	40,0	32,0
16,0	4,0	8,0	8,0	16,0	8,0	32,0	20,0	128,0	2,0	20,0	16,0
8,0	2,0	4,0	4,0	8,0	4,0	16,0	10,0	64,0	1,0	10,0	8,0
4,0	1,0	2,0	2,0	4,0	2,0	8,0	5,0	32,0	0,5	5,0	4,0
2,0	0,5	1,0	1,0	2,0	1,0	4,0	2,5	16,0	0,25	2,5	2,0
1,0	0,25	0,5	0,5	1,0	0,5	2,0	1,25	8,0	0,125	1,25	1,0
0,5	0,125	0,25	0,25	0,5	0,25	1,0	0,6	4,0	0,06	0,6	0,5
0,25	0,06	0,125	0,125	0,25	0,125	0,5	0,3	2,0	0,03	Контр.	Контр.

Рисунок 13 – Схема распределения концентраций антибактериальных препаратов в планшете Sensititre МусоТВ, КК и диапазон «промежуточной» области для каждого препарата.

Примечание: Желтый - значения КК препаратов, серый - диапазон значений МИК «промежуточной» области каждого препарата, красный - значения МИК устойчивых штаммов, зеленый - значения МИК чувствительных МБТ

Используя установленные критерии оценки ЛЧ МБТ к Н, R, Emb, Ofx, Mfx, Km и Am в тест-системе Sensititre MусoTB, нами было проведено исследование для определения связи типов мутаций, которые включены в тест-систему «ТБ-ТЕСТ» с уровнем ЛУ МБТ к каждому из препаратов.

Всего было изучено 470 штаммов МБТ, из которых, по данным, установленным в системе Bactec MGIT 960, 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).

Сравнение результатов определения ЛЧ МБТ к семи препаратам двумя бактериологическими методами представлены в таблице 52.

Как видно из данных, представленных в таблице 52, высокая степень корреляции результатов определения ЛЧ двумя методами наблюдалась для основных препаратов I ряда (Н и R), составившая 98,1% и 98,7% соответственно. Для остальных препаратов она превышала 90,0%, кроме Emb (75,5%). Причём, для Mfx ЛЧ в системе Bactec 960 определяли в разные периоды при КК = 0,25 мкг/мл (181 изолят) и 0,5 мкг/мл (289 изолятов), что повлияло на величину корреляции результатов между методами - 94,5% и 93,4% соответственно.

Таблица 52 – Результаты определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к основным препаратам I и II ряда, установленные в Bactec MGIT 960 и Sensititre MycoTB

MGIT 960			MYCOTB								No. У	No. Ч	КК на MYCOTB мкг/мл*	Совпадение по КК %	Условное совпадение %	
критическая концентрация	№. штаммов n=470	МИК (мкг/мл) и количество штаммов														
Рифампицин			0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16	364	6	1	98,1	100
1,0 мкг/мл	У	370					6	16	14	18	99					
	Ч	100	53	27	10	7	3						3	97		
Изониазид			0,03	0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4	>4	400	6	0,25	98,7	99,6
0,1 мкг/мл	У	406					2	4	8	11	58					
	Ч	64	24	35	3	2						0	64			
Этамбутол			0,5	1	2	4	8	16	32	>32	180	92	4	75,5	96,6	
5,0 мкг/мл	У	272					1	15	76	141						31
	Ч	198	10	52	49	64						23	175			
Офлоксацин			0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	183	13	2	96,6	100	
2,0 мкг/мл	У	196					13	64	61	43						15
	Ч	274	54	139	71	7						3	271			
Моксифлоксацин			0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	64	8	0,5	94,5	98,3	
0,25 мкг/мл**	У	72					2	6	14	15						21
	Ч	109	30	20	50	7						1	107			
Моксифлоксацин			0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	91	2	0,5	93,4	100	
0,5 мкг/мл**	У	93					2	23	35	26						7
	Ч	196	33	93	36	17						17	179			
Канамицин			0,63	1,25	2,5	5	10	20	40	>40	208	39	2,5	90	99,1	
2,5 мкг/мл	У	247					4	35	72	49						15
	Ч	223	38	131	46	8						8	215			
Амикацин			0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16	102	13	1	95,9	98,9
1,0 мкг/мл	У	115					4	9	12	9	13					
	Ч	355	21	71	158	99						5	349			

Примечание: * - КК установленные в МНПЦБТ и предложенные S.Мрагата и соавт. (2013), вертикальными линиями обозначена граница раздела между устойчивыми и чувствительными изолятами по КК, установленными в МНПЦ, ** - определение ЛЧ МБТ к Mfx, полученные в разные периоды с использованием КК = 0,25 и 0,5 мкг/мл

Продолжение таблицы 53

Рифампицин		МИК в МУСОТВ (мкг/мл)										
		количество изолятов										
мутации в <i>groB</i>	MGIT 960 КК=1,0	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	≥16	32	
L511R	R(n=2)					1			1			
D516Y	S(n=0)											
L511R	R(n=1)									1		
H526L	S(n=0)											
L516G	R(n=0)											
S531W	S(n=1)					1						
S522L	R(n=0)											
D516G	S(n=1)				1							
L533P	R(n=2)								1		1	
H526N	S(n=0)											
L533P	R(n=1)					1						
S531L	S(n=0)											
Всего с мутациями	R(n=368)				6	16	14	17	98	192	25	
	S(n=17)		3	4	7	3						
Всего без мутаций wt	R(n=2)							1	1			
	S(n=83)	53	24	6								
Чувствительность (с MIGIT)		99,5%					95% ДИ (98,1-99,9)					
Специфичность (с MIGIT)		83%					95% ДИ (74,5-89,1)					
Чувствительность (с МУСОТВ)		99,5%					95% ДИ (98,0-99,9)					
Специфичность (с МУСОТВ)		80,6%					95% ДИ (71,9-87,1)					
Совпадение между тремя методами		94,7%					95% ДИ (92,3-96,4)					
Условное совпадение между тремя методами		96%					95% ДИ (93,8-97,4)					
Совпадение с MIGIT		96%					95% ДИ (93,8-97,4)					
Совпадение с МУСОТВ		94,9%					95% ДИ (92,5-96,5)					
Условное совпадение с МУСОТВ		98,1%					95% ДИ (96,4-99)					

Как видно из таблицы 53, из 385 изолятов замена S531L идентифицирована в 307 (79,7%) устойчивых МБТ к R, большинство из которых 287/307 (93,5%) обладали высоким уровнем устойчивости (МИК \geq 8 мкг/мл), 9/307 (2,9%) умеренным (МИК = 4,0 мкг/мл) и только 11/307 (3,6%) низкой чувствительностью и низкой устойчивостью («промежуточной» чувствительностью/устойчивостью). Известно, что незначительная часть штаммов с такой заменой обладает пониженным **фитнесом** (скоростью роста), что приводит к снижению МИК [75; 86].

Также высокой и умеренной степенью устойчивости обладали изоляты резистентные к R с мутациями в 526 кодоне H на R/Y/D/P (n=14), L511R (n=1), D516V (n=10/13), S531W (n=4), Q513G (n=2), Q513K (n=1), МИК которых составил \geq 4,0 мкг/мл. Напротив, 8 штаммов с заменой в этом кодоне на L (H526L) в равном соотношении обладали как «промежуточной» степенью чувствительности/устойчивости (0,5 мкг/мл - 2,0 мкг/мл), так умеренной и высокой степенью устойчивости (4,0 мкг/мл - 16,0 мкг/мл).

Среди 17 изолятов с двойными мутациями 14 (82,4%) с 9 типами замен были устойчивые в Bactec MGIT 960 и проявляли высокий уровень устойчивости в Sensititre MycoTB (МИК $>$ 16,0 мкг/мл). Только 3 (17,6%) изолята с двойными мутациями (L516G/S531W, S522L/D516G, L533P/S531L), из которых два были чувствительными в системе Bactec MGIT 960 и один устойчивым (Таблица 55) обладали «промежуточной» чувствительностью/устойчивостью (МИК – 1,0 мкг/мл – 2,0 мкг/мл). 2 (0,4%) устойчивых штамма в Bactec MGIT 960 без мутаций в исследуемом участке гена *proB* также были устойчивыми в Sensititre MycoTB и обладали высоким уровнем резистентности (МИК - 8,0 мкг/мл и 16,0 мкг/мл), что возможно связано с наличием мутаций в других, не представленных на чипе кодонах [176; 357].

Так называемые «спорные» мутации - D516Y (n=5), D516G (n=1), H526N (n=1), H526C (n=1), L533P (n=4), L511P (n=6) (Таблица 53), штаммы с которыми в системе Bactec MGIT 960 проявляли то устойчивость, то чувствительность к препарату, по результатам Sensititre MycoTB обладали «промежуточной»

чувствительностью/устойчивостью (МИК 0,5 мкг/мл – 2,0 мкг/мл). В данном случае включение стандартных доз R в схему химиотерапии на основании данных только качественного микробиологического исследования (с использованием Bactec MGIT 960) может приводить к неблагоприятным клиническим результатам [321; 336].

Таким образом, 36 из 385 изолятов с мутациями (9,4%), приводящими к устойчивости к препарату, 14 (3,6%) (в Bactec MGIT 960 при КК=1,0 мкг/мл) определяются как чувствительные и 22 (5,8%) как устойчивые, тогда как количественная характеристика (в Sensititre MycoTB) указывает на наличие «промежуточной» чувствительности/устойчивости (МИК от 0,5 мкг/мл до 2,0 мкг/мл близкие к значению КК). В то же время, у значительной части штаммов (около 89,9%) определялась умеренная и высокая степень устойчивости.

4.4.2. Изониазид

Среди выявленных нами генетических детерминант устойчивости к И в ДНК МБТ наиболее часто встречаемой мутацией как среди монорезистентных МБТ к препарату, так и с МЛУ/ШЛУ была S315T в *katG*, обнаруженная в 287/406 (70,7%) устойчивых к препарату изолятов (Таблица 54).

Таблица 54 – Распределение значений МИК изониазида в чувствительных и устойчивых штаммах *M.tuberculosis* с мутациями в генах *katG, inhA, ahpC*

Изониазид		МИК в МУСОТВ (мкг/мл)								
мутации в <i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>ahpC</i>	MGIT 960 КК=0,1	количество изолятов								
		0,031	0,063	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	>4,0
S315T	R (n=287)			1	3	4	8	46	100	125
	S (n=0)									
S315N	R (n=2)									2
	S (n=0)									
S315T c(-15)t	R (n=81)					1	2	4	22	52
	S (n=0)									
S315T I335V	R (n=12)							1	8	3

Продолжение таблицы 54

Изониазид		МИК в МҮСОТВ (мкг/мл)								
		количество изолятов								
мутации в <i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>ahpC</i>	MGIT 960 КК=0,1	0,031	0,063	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	>4,0
			S (n=0)							
S315T	R (n=1)									1
I335V	S (n=0)									
c(-15)t										
S315T	R (n=3)							1	2	
t(-8)a	S (n=0)									
S315T	R (n=1)									1
t(-8)g	S (n=0)									
S315T	R (n=2)								1	1
c(-12)t	S (n=0)									
c(-15)t	R (n=16)				1	3	1	6		5
	S (n=0)									
Всего с мутациям и	R (n=405)			1	4	8	11	58	133	190
	S (n=0)									
Всего без мутаций wt	R (n=1)			1						
	S (n=64)	24	35	3	2					
Чувствительность (с MIGIT)		99,7%				95% ДИ (98,6-99,96)				
Специфичность (с MIGIT)		100%				95% ДИ (94,3-100)				
Чувствительность (с МҮСОТВ)		100%				95% ДИ (99,1-100)				
Специфичность (с МҮСОТВ)		92,9%				95% ДИ (84,3-96,9)				
Совпадение между тремя методами		98,9%				95% ДИ (97,5-99,5)				
Условное совпадение между тремя методами		99,6%				95% ДИ (98,5-99,9)				
Совпадение с MIGIT		99,8%				95% ДИ (98,9-99,9)				
Совпадение с МҮСОТВ		98,9%				95% ДИ (97,5-99,5)				
Условное совпадение с МҮСОТВ		99,8%				95% ДИ (98,9-99,9)				

Преобладающее большинство таких штаммов 225 (78,4%) обладали высокой степенью устойчивости (МИК $\geq 4,0$ мкг/мл). Другие замены в *katG* или в сочетании с *inhA*, *ahpC*, обнаруженные в 102/406 (25,1%) штаммов также приводили к умеренной и высокой степени устойчивости (диапазон МИК - от 1,0 мкг/мл до $\geq 4,0$ мкг/мл).

В ранее опубликованных работах показано, что мутация с(-15)t в промоторной части гена *inhA* приводит к развитию низкого или умеренного уровня устойчивости МБТ к Н [198]. Нами было установлено, что из 16 (4%) изолятов с заменой с(-15)t только 4 (25%) обладали «промежуточной» чувствительностью/устойчивостью (МИК= 0,25 мкг/мл - 0,5 мкг/мл) и 1 (6,3%) умеренной (МИК=1,0 мкг/мл). Все они были выявлены в монорезистентных (по данным Bactec MGIT 960) к препарату изолятах. Однако, 6 (37,5%) и 5 (31,3%), обнаруженные в МЛУ и ШЛУ изолятах, обладали высокой степенью устойчивости (МИК - 2,0 мкг/мл и $\geq 4,0$ мкг/мл соответственно). Возможно, данные изоляты имели мутации не только в промоторной, но и в структурной части гена *inhA* [213], которые в биочип «ТБ-ТЕСТ» не включены. В 1 (0,2%) изоляте, устойчивом в Bactec MGIT 960 и проявляющем «промежуточную» чувствительность/устойчивость (в «ТБ-ТЕСТ») мутаций не выявлено, что возможно связано либо с гетерогенностью (наличие чувствительной и устойчивой популяций), при этом МИК снижается одновременно с уменьшением доли устойчивой популяции [302; 361], либо с другими механизмами устойчивости.

Таким образом, среди изученных нами 405 устойчивых изолятов с мутациями в исследуемых генах высоким и умеренным уровнем устойчивости обладали 392 (96,8%) штамма и 13 (3,2%) «промежуточной» чувствительностью/устойчивостью, из которых 8 (2,0%) содержали S315T в *katG*, один (0,2%) S315T и с(-15)t и 4 (1%) с(-15)t в *inhA*.

4.4.3. Этамбутол

Проведённое нами исследование показало, что распределение МИК Emb среди 198/470 (42,1%) чувствительных и 272/470 (57,9%) устойчивых (Bactec MGIT 960) изолятов имело два максимума (4,0 мкг/мл и 8,0 мкг/мл) - для 64/198 (32,3%) чувствительных, 76/272 (27,9%) устойчивых и 23/198 (11,6%) чувствительных, 141/272 (51,8%) устойчивых МБТ соответственно (Таблица 55). Мутации в гене *embB* обнаружены в 325/470 (69,1%) изолятах в 296, 297, 306, 319, 354, 406 и 497 кодонах и представлены 18 типами мутаций и 6 двойными. Из них 286 (88%) обладали «промежуточной» чувствительностью/устойчивостью (МИК от 2 до 8 мкг/мл) и 39 (12%) высоким уровнем устойчивости (МИК от 16 до 32 мкг/мл). Напротив, 82/145 (56,6%) изолята без мутаций в исследуемом гене, из которых 16 (19,5%) устойчивых и 66 (80,5%) чувствительных (в Bactec MGIT 960) обладали «промежуточной» чувствительностью/устойчивостью (МИК от 2,0 мкг/мл до 8,0 мкг/мл). С умеренным и высоким уровнем устойчивости изолятов не было.

Таблица 55 – Распределение значений МИК этамбутола в чувствительных и устойчивых штаммах *M.tuberculosis* с мутациями в гене *embB*

Этамбутол		МИК в МУСОТВ (мкг/мл)						
мутации в <i>embB</i>	MGIT 960 КК=5,0	количество изолятов						
		0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0
D354A	R (n=33)				12	13	7	1
	S (n=9)			1	5	3		
G406A	R (n=19)				10	8	1	
	S (n=6)			1	5			
G406D	R (n=8)			2	4	2		
	S (n=4)				2	2		
G406S	R (n=7)				1	2	3	1
	S (n=2)				2			
G406C	R (n=1)				1			
	S (n=1)				1			
M306I1	R (n=32)			2	11	18	1	
	S (n=8)			4	4			
M306I2	R (n=8)			1	3	4		
	S (n=6)				3	3		

Продолжение таблицы 55

Этамбутол		МИК в МУСОТВ (мкг/мл) количество изолятов						
мутации в <i>embB</i>	MGIT 960 КК=5,0	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0
M306I3	R (n=3)				1	1	1	
	S (n=2)				2			
M306L	R (n=6)					5		1
	S (n=0)							
M306V	R (n=92)			4	18	58	7	5
	S (n=10)				7	3		
N296H	R (n=8)			1	3	4		
	S (n=6)			2	4			
Q497K	R (n=5)			2	3			
	S (n=2)				1	1		
Q497P	R (n=0)							
	S (n=1)			1				
Q497R	R (n=27)				5	14	8	
	S (n=6)			1	2	3		
Y319C	R (n=1)						1	
	S (n=2)				2			
Y319D	R (n=0)							
	S (n=1)				1			
Y319S	R (n=1)						1	
	S (n=0)							
S297A	R (n=1)				1			
	S (n=2)				2			
Q497R M306V	R (n=1)					1		
	S (n=0)							
D354A D328G	R (n=1)					1		
	S (n=0)							
D354A M306V	R (n=0)							
	S (n=1)					1		
M306I1 N296H	R (n=1)						1	
	S (n=0)							
M306I2 S297A	R (n=0)							
	S (n=1)				1			
Всего с мутациями	R (n=255)			12	73	131	31	8
	S (n=70)			10	44	16		
Всего без мутаций wt	R (n=17)		1	3	3	10		
	S (n=128)	10	52	39	20	7		

Продолжение таблицы 55

Этамбутол		МИК в МУСОТВ (мкг/мл)						
		количество изолятов						
мутации в <i>embB</i>	MGIT 960 КК=5,0	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0
Чувствительность (с MIGIT)		93,8%			95% ДИ (90,2-96,1)			
Специфичность (с MIGIT)		64,7%			95% ДИ (57,8-71)			
Чувствительность (с МУСОТВ)		91,6%			95% ДИ (87,0-94,7)			
Специфичность (с МУСОТВ)		47,9%			95% ДИ (42-53,9)			
Совпадение между тремя методами		61,9%			95% ДИ (57,4-66,2)			
Условное совпадение между тремя методами		78,9%			95% ДИ (75-82,4)			
Совпадение с MIGIT		81,5%			95% ДИ (77,7-84,7)			
Совпадение с МУСОТВ		66,8%			95% ДИ (62,4-70,9)			
Условное совпадение с МУСОТВ		95,3%			95% ДИ (93,0-96,9)			

Наиболее часто встречаемой была замена M306V, выявленная в 102 из 325 (31,4%) изолятов; 29 (28,4%) из них обладали низкой чувствительностью и 61 (59,8%) низкой устойчивостью («промежуточная» чувствительность/устойчивость), а 12 (11,8%) умеренной и высокой устойчивостью. Мутация D354A выявлена в 42/325 (12,9%) изолятах; из них 18 (42,9%) обладали низкой чувствительностью и 16 (38,1%) низкой устойчивостью, а 8 (19,0%) высокой устойчивостью к препарату. Среди 59 штаммов МБТ с мутацией M306I в 40 (67,8%) обнаружена нуклеотидная замена ATG – ATA (M306I1), 14 (23,7%) - ATG – ATC (M306I2) и 5 (8,5%) ATG – ATT (M306I3). Изоляты с этими заменами обладали как низким уровнем чувствительности, так и низкой степенью устойчивости, в то время как замена Q497R в большинстве штаммов МБТ связана с низкой и умеренной степенью устойчивости. Остальные замены определены в меньшем проценте случаев и также, в основном, при МИК от 2,0 мкг/мл до 8,0 мкг/мл.

Полученные нами результаты демонстрируют, что достоверной связи между типом мутаций и уровнем устойчивости МБТ к Emb не наблюдалось, что подтверждается специфичностью метода, которая составила 64,7% и 47,9% для Bactec MGIT 960 и Sensititre MycoTB соответственно. Вместе с тем, «условное совпадение», составившее 95,3%, с результатами теста Sensititre MycoTB подтверждают предыдущие данные, что методы микроразведений для определения уровня устойчивости лучше коррелируют с выявленными мутациями в гене *embB* по сравнению с качественными культуральными методами [363].

Вместе с тем, наличие мутаций увеличивает устойчивость изолята к Emb. Результаты исследования показали, что наибольшее количество штаммов 286/325 (88,0%) с мутациями, как среди фенотипически чувствительных, так и устойчивых (Bactec MGIT 960) попали в «промежуточную» область чувствительности/устойчивости (МИК от 2,0 мкг/мл до 8,0 мкг/мл), что по сути соответствует пиковому значению концентрации препарата, достигаемой в сыворотке крови (5,0 мкг/мл). По этой причине действие препарата может оставаться сублетальным в течение проводимого лечения [75].

4.4.4. Офлоксацин

При изучении ЛЧ МБТ к Ofx двумя фенотипическими методами нами были установлены различия, связанные с определёнными типами мутаций в генах *gyrA/gyrB* (Таблица 56). Так, из 204/470 (43,4%) изолятов с обнаруженными заменами, в 13 (6,4%) случаях они выявлены только в *gyrB*: из таких штаммов 4 (30,8%) с R485C (n=2), T539P (n=1) и T539I (n=1) обладали чувствительностью как в Bactec MGIT 960, так и в Sensititre MycoTB (МИК - 0,25 мкг/мл - 0,5 мкг/мл). Напротив, 9 (69,2%) штаммов с мутациями N538K (n=2), D500H (n=1), D500N (n=1), N538D (n=1), T539N (n=2) и двойной D500N/E540D (n=2) проявляли либо чувствительность, либо устойчивость в Bactec 960, а по данным Sensititre MycoTB обладали низкой чувствительностью и низкой устойчивостью (МИК от 2,0 мкг/мл до 4,0 мкг/мл).

Продолжение таблицы 56

G88A	R (n=2)				2				
	S (n=0)								
D94V	R (n=2)					2			
	S (n=0)								
A74S	R (n=0)								
	S (n=1)				1				
A90V/D94N	R (n=1)							1	
	S (n=0)								
A90V/S91P	R (n=2)							2	
	S (n=0)								
D94A/A90V	R (n=2)							1	1
	S (n=0)								
S91P/D94A	R (n=1)				1				
	S (n=0)								
G88A/H70A/ G509A	R (n=1)					1			
	S (n=0)								
A90V/D500N	R (n=1)							1	
	S (n=0)								
D94A/E540D	R (n=1)					1			
	S (n=0)								
D94G/G509A	R (n=1)							1	
	S (n=0)								
A90V/D94N/ A543T	R (n=1)								1
	S (n=0)								
Всего с мутациями	R (n=194)				12	63	61	43	15
	S (n=10)	1	3		3	3			
Всего без мутаций wt	R (n=2)				1	1			
	S (n=264)	53	136	71	4				
Чувствительность (с MIGIT)	99%					95% ДИ (96,4-99,7)			
Специфичность (с MIGIT)	96,4%					95% ДИ(93,4-98)			
Чувствительность (с МУСОТВ)	99,5%					95% ДИ (97-99,9)			
Специфичность (с МУСОТВ)	93,3%					95% ДИ (89,8-95,7)			
Совпадение между тремя методами	94,9%					95% ДИ (92,5-96,5)			

Продолжение таблицы 56

Офлоксацин		МИК в МУСОТВ (мкг/мл)							
		количество изолятов							
мутации в <i>gyrA/B</i>	MGIT 960 КК=2,0	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
Условное совпадение между тремя методами		97,5%				95% ДИ (95,6-98,5)			
Совпадение с MGIT		97,5%				95% ДИ (95,6-98,5)			
Совпадение с МУСОТВ		95,7%				95% ДИ (93,5-97,2)			
Условное совпадение с МУСОТВ		99,1%				95% ДИ (97,8-99,7)			

Мутации только в *gyrA* обнаружены в 186/204 (91,2%) изолятах, из них - 180 (96,8%) одиночные и 6 (3,2%) двойные. Высоким и умеренным уровнем устойчивости по данным, полученным Sensititre МусоТВ (МИК от 8,0 мкг/мл до $\geq 16,0$ мкг/мл) обладали 111 (59,7%) устойчивых штаммов (Bactec MGIT 960) с одиночными мутациями; большинство из них имели замены D94G (n=63/72 (87,5%)), D94N (n=17/21 - 80,9%), D94H (n=7/8 - 87,5%), D94Y (n=5/7 - 71,4%) и G88C (n=3 - 100%).

Низкий уровень устойчивости установлен в большинстве штаммов с мутациями A90V и D94A, в 28/34 (82,4%) и 16/20 (80,0%) случаев соответственно. «Промежуточной» чувствительностью/устойчивостью обладали 5 (2,7%) штаммов с редко встречающимися заменами G88A (n=2), D94V (n=2) и A74S (n=1), причём два изолята с мутацией D94A и один с A74S, в Bactec MGIT 960 проявляли чувствительность к препарату.

Замена S91P в *gyrA*, обнаруженная в 10/186 (5,4%) изолятах, у 6 (60%) из них приводила к умеренной и 4 (40%) к низкой степени устойчивости.

Все 6 (3,2%) изолятов с двойными заменами в *gyrA* были устойчивыми (в Bactec MGIT 960), из них 5 (83,3%) с высокими значениями МИК (≥ 16 мкг/мл) и один с S91P/D94A с «промежуточным» уровнем чувствительности/устойчивости (МИК=2 мкг/мл) в Sensititre МусоТВ.

Мутации в двух генах *gyrA* и *gyrB* были обнаружены в 5 (2,5%) устойчивых (в Bactec MGIT 960) штаммов, из которых два с G88A/H70A/G509A и

Продолжение таблицы 57

Моксифлоксацин		МИК в МУСОТВ (мкг/мл)							
		количество изолятов							
Мутации в <i>gyrA/B</i>	MGIT 960 КК=0,25	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
D94N	R (n=9)					2	2	2	3
	S (n=0)								
D94Y	R (n=2)							2	
	S (n=0)								
D94A	R (n=7)			1	2	1	3		
	S (n=0)								
A90V	R (n=8)				1	3	3	1	
	S (n=0)								
S91P	R (n=5)					1	1	3	
	S (n=0)								
G88C	R (n=1)								1
	S (n=0)								
D94V	R (n=2)			1		1			
	S (n=0)								
A90V/D94N	R (n=1)								1
	S (n=0)								
S91P/D94A	R (n=1)				1				
	S (n=0)								
G88A/H70A/ G509A	R (n=1)					1			
	S (n=0)								
A90V/ D500N	R (n=1)								1
	S (n=0)								
D94A/E540D	R (n=1)						1		
	S (n=0)								
D94G/ G509A	R (n=1)							1	
	S (n=0)								
A90V/D94N/ A543T	R (n=1)								1
	S (n=0)								
Всего с мутациями	R (n=72)			2	6	14	15	21	14
	S (n=2)			1			1		
Всего без мутаций wt	R (n=0)								
	S (n=107)	30	20	49	7	1			
Чувствительность (с MIGIT)		100%				(95% ДИ 94,9-100)			
Специфичность (с MIGIT)		98,2%				(95% ДИ 93,6-99,5)			

Продолжение таблицы 57

Моксифлоксацин		МИК в МУСОТВ (мкг/мл)							
		количество изолятов							
мутации в <i>gyrA/B</i>	MGIT 960 КК=0,5	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
Чувствительность (с МУСОТВ)		98,5%				95% ДИ (91,9-99,7)			
Специфичность (с МУСОТВ)		92,2%				95% ДИ (85,8-95,8)			
Совпадение между тремя методами		93,9%				95% ДИ (89,5-96,6)			
Условное совпадение между тремя методами		97,8%				95% ДИ (94,5-99,1)			
Совпадение с MIGIT		98,9%				95% ДИ (96,1-99,7)			
Совпадение с МУСОТВ		94,5%				95% ДИ (90,1-97)			
Условное совпадение с МУСОТВ		98,3%				95% ДИ (95,2-99,4)			
Моксифлоксацин		МИК в МУСОТВ (мкг/мл)							
мутации в <i>gyrA/B</i>	MGIT 960 КК=0,5	количество изолятов							
		0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
wt/wt	R (n=1)					1			
	S (n=158)	33	90	33	2				
R485C	R (n=0)								
	S (n=1)		1						
D500N	R (n=0)								
	S (n=1)			1					
N538D	R (n=0)								
	S (n=1)				1				
T539N	R (n=0)								
	S (n=2)				2				
T539P	R (n=0)								
	S (n=1)		1						
T539I	R (n=0)								
	S (n=1)		1						
D94G	R (n=45)					10	20	12	3
	S (n=0)								
D94N	R (n=12)					2	2	5	3
	S (n=0)								
D94Y	R (n=5)					1	4		
	S (n=0)								
D94A	R (n=6)				2	3		1	

Продолжение таблицы 57

Моксифлоксацин		МИК в МУСОТВ (мкг/мл)							
		количество изолятов							
мутации в <i>gyrA/B</i>	MGIT 960 КК=0,5	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
	S (n=7)				1	6			
D94H	R (n=8)					1	2	5	
	S (n=0)								
A90V	R (n=5)					4	1		
	S (n=21)				10	11			
S91P	R (n=5)					1	3	1	
	S (n=0)								
G88C	R (n=2)						2		
	S (n=0)								
G88A	R (n=0)								
	S (n=2)			2					
A74S	R (n=0)								
	S (n=1)				1				
A90V/ S91P	R (n=2)						1	1	
	S (n=0)								
D94A/ A90V	R (n=2)							1	1
	S (n=0)								
Всего с мутациями	R (n=92)				2	22	35	26	7
	S (n=38)		3	3	15	17			
Всего без мутаций wt	R (n=1)					1			
	S (n=158)	33	90	33	2				
Чувствительность (с MIGIT)		98,9%				95% ДИ (94,2-99,8)			
Специфичность (с MIGIT)		80,6%				95% ДИ (74,5-85,5)			
Чувствительность (с МУСОТВ)		99,1%				95% ДИ (94,9-99,8)			
Специфичность (с МУСОТВ)		87,3%				95% ДИ (81,6-91,4)			
Совпадение между тремя методами		85,8%				95% ДИ (81,3-89,4)			
Условное совпадение между тремя методами		86,5%				95% ДИ (82,1-90)			
Совпадение с MIGIT		86,5%				95% ДИ (82,1-90)			

Продолжение таблицы 57

Моксифлоксацин		МИК в МУСОТВ (мкг/мл)							
		количество изолятов							
мутации в <i>gyrA/B</i>	MGIT 960 КК=0,5	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
Совпадение с МУСОТВ		91,7%				95% ДИ (87,9-94,4)			
Условное совпадение с МУСОТВ		97,6%				95% ДИ (95,1-98,8)			

По результатам теста Sensititre МусоТВ для всех исследуемых штаммов мутации в генах *gyrA/gyrB* приводили к разной степени устойчивости. Как и в случае с Ofx штаммы с заменами R485C (n=2), T539P (n=1) и T539I (n=1) были чувствительными в Bactec MGIT 960 (при КК=0,25 мкг/мл и 0,5 мкг/мл). Согласно Sensititre МусоТВ, МИК трёх из них составил 0,125 мкг/мл и у одного (с мутацией R485C) - 0,25 мкг/мл - можно считать, что эти мутации не приводят к устойчивости к препарату.

Остальные 9 мутаций в этом гене были связаны с разной чувствительностью в системе Bactec MGIT 960. Так, при КК=0,25 мкг/мл изоляты с N538K (n=2), D500H (n=1) были устойчивыми (МИК в Sensititre МусоТВ составил 1,0 мкг/мл и 0,5 мкг/мл соответственно, равные низкому уровню устойчивости и низкой чувствительности («промежуточная» чувствительность/устойчивость). Тогда как два штамма с двойной заменой в этом гене D500N/E540D проявляли умеренную степень устойчивости (МИК в Sensititre МусоТВ составил 2,0 мкг/мл), в то время как в Bactec MGIT 960 один из них был чувствительным, а другой устойчивым. Напротив, три изолята с D500N, N538D и T539N при КК=0,5 мкг/мл обладали «промежуточной» степенью чувствительности/устойчивости (МИК составил 0,25 мкг/мл; 0,5 мкг/мл и 0,25 мкг/мл соответственно). Это свидетельствует о том, что данные замены связаны с развитием устойчивости к Mfx.

Штаммы МБТ с одиночными мутациями в 94 кодоне D на G, N, Y, H и G88C, а также шесть с двойными были устойчивыми в системе Bactec MGIT 960 как при 0,25 мкг/мл, так и при 0,5 мкг/мл. Также, как и в случае с Ofx, все они

обладали высокой и умеренной степенью устойчивости, кроме изолята с S91P/D94A, который проявлял «промежуточную» чувствительность/устойчивость к обоим препаратам.

Расхождение в результатах определения ЛЧ в Bactec MGIT 960 были получены для штаммов с мутациями A90V и D94A, которые при использовании КК=0,25 мкг/мл проявляли устойчивость, тогда как при КК=0,5 мкг/мл большинство из них были чувствительными - 21/26 (80,8%) и 7/13 (53,8%) соответственно. Диапазон МИК большинства исследованных штаммов с этими заменами 16/20 (80%) с D94A и 29/34 (85,3%) с A90V варьировал от 0,25 мкг/мл до 1,0 мкг/мл, что соответствует низкой чувствительности и низкому уровню устойчивости («промежуточная» чувствительность/устойчивость).

Мутация S91P, выявленная в 10 изолятах, приводила к устойчивости к препарату (при использовании КК 0,25 мкг/мл и 0,5 мкг/мл в Bactec MGIT 960) и также как, в случае с Ofx, МИК большинства изолятов - 8/10 (80%) соответствовала умеренной степени устойчивости.

Штаммы с редко встречающимися мутациями G88A (n=2), D94V (n=2) и A74S (n=1) проявляли низкую чувствительность и низкую устойчивость («промежуточная» степень чувствительности/устойчивости) к Mfx (МИК варьировал от 0,25 мкг/мл до 1,0 мкг/мл). Однако замена G88A в двух штаммах МБТ приводила к чувствительности к препарату в системе Bactec MGIT 960 (при КК=0,5 мкг/мл), то есть при 0,25 мкг/мл приводила бы к устойчивости. Замена A74S, как и в случае с Ofx, обуславливала чувствительность к обоим препаратам, а D94V - устойчивость к Mfx при КК=0,25 мкг/мл и к Ofx при 2,0 мкг/мл. Таким образом, данные замены детерминируют низкую чувствительность и низкую устойчивость («промежуточная» степень чувствительность/устойчивость) к исследуемым ФХ.

Лекарственная устойчивость к Mfx 5 изолятов в Bactec MGIT 960 с обнаруженными мутациями одновременно в двух генах была определена при КК=0,25 мкг/мл. Диапазон МИК препарата, так же как и с Ofx, для 4 из них составил от 2,0 мкг/мл до 8,0 мкг/мл, что соответствует умеренному и высокому

уровню устойчивости, тогда как штамм с G88A/H70A/G509A проявлял низкую степень устойчивости (МИК=1,0 мкг/мл).

Таким образом, установлено, что высокий и умеренный уровень устойчивости МБТ к обоим препаратам связан с мутациями D94(G,H,Y,N), G88C, S91P и двойными в *gyrA* или *gyrA/gyrB*, а низкая чувствительность и низкая устойчивость - в *gyrB*. Замены A90V и D94A в *gyrA* обуславливают низкую и умеренную степень устойчивости к Ofx и низкую чувствительность, и низкую устойчивость к Mfx.

Значения МИК Mfx в 2 – 4 раза меньше по сравнению с Ofx и в исследованиях *in vitro* продемонстрирована его эффективность против МБТ-МЛЮ и некоторых Ofx устойчивых изолятов [185]. Так, на мышинной модели было показано эффективность Mfx в отношении мутантов низкого уровня устойчивости к Ofx с заменами A90V *gyrA* (МИК= 2 мкг/мл) и D500N *gyrB* (МИК=0,5 мкг/мл), если стандартная доза увеличена вдвое – 800,0 мг препарата [266] и возникновение рецидивов в 30,0% случаев, если доза оставалась стандартной [135].

Из этого следует, что использовать Mfx целесообразно в суточной дозе 800,0 мг у пациентов, выделяющих штаммы с низким уровнем устойчивости, в том числе с заменами A90V и D94A, МИК препарата для которых не превышает 1,0 мкг/мл; и в дозе 400,0 мг, МИК для которых $\leq 0,25$ мкг/мл [274].

Обоснованность снижения КК с 0,5 мкг/мл до 0,25 мкг/мл для качественной оценки определения ЛЧ МБТ к Mfx в Bactec MGIT 960 подтверждается и при расчёте результатов «условного» совпадения (97,8%) между тремя методами, связанного с тем, что количество изолятов с «промежуточной» степенью чувствительности/устойчивости уменьшается с 45,4% (59/130) до 31,1% (23/74), главным образом за счёт замен A90V и D94A (Таблица 57).

4.4.6. Канамицин и амикацин

Проведённый нами анализ результатов ЛЧ МБТ к АГ показал, что фенотипической устойчивостью к Km в Bactec MGIT 960 обладали 247/470

(52,6%) штаммов и 115/470 (24,4%) к Am, тогда как в Sensititre МусоТВ 216/470 (46,0%) и 108/470 (23,0%) изолятов соответственно (Таблица 58).

Мутации в гене *rrs* и промоторной части *eis* выявлены в 221/247 (89,5%) Км-устойчивых изолятах (в Bactec MGIT 960) и 203/216 (94,0%) (в Sensititre МусоТВ, МИК от 5,0 мкг/мл до > 40,0 мкг/мл).

Перекры́стная устойчивость к обоим препаратам в Bactec MGIT 960 установлена в 111/470 (23,6%) изолятах и связана с обнаруженными мутациями; из них в 94 (84,7%) только в гене *rrs*, 15 (13,5%) в *eis* и 2 (1,8%) в обоих генах.

Замена a1401g преобладала среди штаммов МБТ, устойчивых к обоим АГ, и выявлена в 93/111 (83,8%) изолятах, большинство из которых обладали высоким уровнем устойчивости к Км и Am. Один (3,0%) изолят с g1484t показал в МусоТВ умеренный уровень устойчивости к Км и низкий к Am. Штаммы с заменами одновременно в двух генах - a1401g/g(-10)a и a1401g/c(-12)t обладали умеренной и высокой степенью устойчивости к обоим препаратам (МИК Км/Am 10,0/4,0 мкг/мл и 40,0/16,0 мкг/мл соответственно).

Таблица 58 – Распределение значений МИК канамицина и амикацина в чувствительных и устойчивых штаммах *M.tuberculosis* с мутациями в генах *rrs* и *eis*

Канамицин		МИК в МУСОТВ (мкг/мл)							
		количество изолятов							
мутации в <i>rrs/eis</i>	MGIT 960 КК=2,5	0,63	1,25	2,5	5	10	20	40	>40
wt/wt	R (n=26)		2	13	10	1			
	S (n=213)	38	130	43	2				
a1401g	R (n=93)				5	10	7	45	26
	S (n=0)								
g1484t	R (n=1)					1			
	S (n=0)								
c(-12)t	R (n=27)		1	14	10	1	1		
	S (n=9)		1	2	6				
c(-14)t	R (n=17)			2	7	3	5		
	S (n=1)			1					
g(-10)a	R (n=50)		1	5	30	13	1		
	S (n=0)								
g(-10)c	R (n=1)				1				

Продолжение таблицы 58

Канамицин		МИК в МУСОТВ (мкг/мл) количество изолятов								
мутации в <i>rrs/eis</i>	MGIT 960 КК=2,5	0,63	1,25	2,5	5	10	20	40	>40	
	S (n=0)									
g(-37)t	R (n=30)			1	9	19	1			
	S (n=0)									
a1401g/ c(-12)t	R (n=1)							1		
	S (n=0)									
a1401g/ g(-10)a	R (n=1)					1				
	S (n=0)									
Всего с мутациям и	R (n=221)		2	22	62	48	15	46	26	
	S (n=10)		1	3	6					
Всего без мутаций wt	R (n=26)		2	13	10	1				
	S (n=213)	38	130	43	2					
Чувствительность (с MIGIT)		89,5%				95% ДИ (85-92,7)				
Специфичность (с MIGIT)		95,5%				95% ДИ (91,9-97,6)				
Чувствительность (с МУСОТВ)		94%				95% ДИ (90-96,5)				
Специфичность (с МУСОТВ)		89%				95% ДИ (84,5-92,3)				
Совпадение между тремя методами		86,8%				95% ДИ (83,5-89,6)				
Условное совпадение между тремя методами		91,9%				95% ДИ (89,1-94)				
Совпадение с MIGIT		92,3%				95% ДИ (89,6-94,4)				
Совпадение с МУСОТВ		87%				95% ДИ (83,7-89,8)				
Условное совпадение с МУСОТВ		99,2%				95% ДИ (97,8-99,7)				
Амикацин		МИК в МУСОТВ (мкг/мл) количество изолятов								
мутации в <i>rrs/eis</i>	MGIT 960 КК=1,0	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
wt/wt	R (n=4)			1	3					

Продолжение таблицы 58

Амикацин		МИК в МУСОТВ (мкг/мл)								
		количество изолятов								
мутации в <i>rrs/eis</i>	MGIT 960 КК=1,0	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
	S (n=235)	21	62	120	31	1				
a1401g	R (n=93)					5	8	13	44	23
	S (n=0)									
g1484t	R (n=1)					1				
	S (n=0)									
a1401g/ c(-12)t	R (n=1)								1	
	S (n=0)									
a1401g/ g(-10)a	R (n=1)						1			
	S (n=0)									
c(-12)t	R (n=1)			1						
	S (n=35)		6	9	19	1				
c(-14)t	R (n=10)			1	3	6				
	S (n=8)			4	2	2				
g(-10)a	R (n=2)				2					
	S (n=48)		3	17	27		1			
g(-10)c	R (n=0)									
	S (n=1)			1						
g(-37)t	R (n=2)			1	1					
	S (n=28)			7	20	1				
мутации в <i>eis</i>	R (n=15)			3	6	6				
	S (n=120)		9	38	68	4	1			
мутации в <i>rrs</i>	R (n=96)					6	9	13	45	23
	S (n=0)									
Без мутаций в <i>rrs</i>	R (n=19)			4	9	6				
	S (n=355)	21	71	158	99	5	1			
Чувствительность (с MGIT)		83,5%				95% ДИ (75,6-89,2)				
Специфичность (с MGIT)		100%				95% ДИ (98,9-100)				
Чувствительность (с МУСОТВ)		88,9%				95% ДИ (81,6-93,5)				

Продолжение таблицы 58

Амикацин		МИК в МУСОТВ (мкг/мл) количество изолятов								
мутации в <i>rrs/eis</i>	MGIT 960 КК=1,0	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
Специфичность (с МУСОТВ)		100%				95% ДИ (98,9-100)				
Совпадение между тремя методами		94,7%				95% ДИ (92,3-96,4)				
Условное совпадение между тремя методами		95,7%				95% ДИ (93,5-97,2)				
Совпадение с MGIT		95,9%				95% ДИ (93,8-97,4)				
Совпадение с МУСОТВ		97,5%				95% ДИ (95,6-98,5)				
Условное совпадение с МУСОТВ		99,8%				95% ДИ (98,8-99,9)				

Мутации в промоторной области гена *eis* (с(-12)t,с(-14)t, g(-10)a, g(-10)c, g(-37)t) обнаружены в 135/470 (28,7%) изолятах. «Промежуточной» чувствительностью/устойчивостью к Km обладали 91/135 (67,4%) штамм: 28 (20,7%) с низкой чувствительностью (МИК 1,25 и 2,5 мкг/мл) и 63 (46,7%) низкой устойчивостью (МИК 5,0 мкг/мл). Наименьшее количество 10/91 (11%) изолятов из них проявляли чувствительность в Vastec MGIT 960 и наибольшее 81/91 (89%) устойчивость. 44/135 (32,6%) изолята, устойчивые в Vastec MGIT 960, обладали умеренной устойчивостью к препарату.

Напротив, «промежуточную» чувствительность/устойчивость к Am проявляли 125/135 (92,6%) изолятов, преобладающее количество штаммов 115/135 (85,2%) обладали низкой чувствительностью (МИК 0,5 и 1,0 мкг/мл) и наименьшее 10/135 (7,4%) низкой устойчивостью (МИК 2 мкг/мл). Наибольшее количество из них 110/125 (88,0%) в Vastec MGIT 960 проявляли чувствительность к Am и 15/125 (12%) устойчивость к обоим препаратам. Замена с(-14)t чаще приводила к низкой устойчивости к препарату (Таблица 58).

В 26/470 (5,5%) устойчивых к Km изолятах и 4/470 (0,9%) к Am мутации в *rrs* и *eis* не были обнаружены. Возможно это связано с мутациями в других регионах гена *rrs* или в 5' Untranslated region *whiB7* не представленных в «ТБ-ТЕСТ» [273; 362].

Таким образом, умеренная и высокая степень устойчивости МБТ к Km обусловлена появлением генетических мутаций в гене *rrs*, а низкая и умеренная в промоторной части *eis*. Перекрёстная устойчивость к обоим препаратам связана с мутациями в *rrs*, причём замена a1401g, а также в сочетании с *eis*, приводит к умеренному и высокому уровню устойчивости, тогда как замена g1484t связана с низким уровнем устойчивости к Am. Мутации в *eis* не являются специфическими маркерами устойчивости к Am, однако замену с(-14)t связывают с низкой устойчивостью к препарату [188].

«Промежуточной» степенью чувствительности/устойчивости к Km обладали 96/231 (41,5%) изолятов с мутациями, из которых в 91 (94,8%) выявлены в промоторной части *eis* и 5 (5,2%) в *rrs*, а к Am - 6/96 (6,3%) с мутациями в *rrs* и в сочетании с *eis*.

В результате проведённого исследования установлено, что:

1. Совпадение результатов между тремя методами составило около 94,0% с учётом штаммов, входящих в «промежуточную» область чувствительности/устойчивости («условное совпадение»).

2. «Условное совпадение» между «ТБ-ТЕСТ» и Sensititre MucоТВ по сравнению с Bactec MGIT 960 существенно выше для Emb (95,3% и 81,5% соответственно), в меньшей степени для R (98,1% и 96,0%), Km (99,2% и 92,3%), Am (99,8% и 95,9%), Ofx (99,1% и 97,5%) и сопоставимо для Mfx при КК=0,25 мкг/мл (98,3% и 98,9%) и H (99,8%).

3. Наибольшая доля штаммов с «промежуточной» чувствительностью/устойчивостью, детерминированная мутациями в генах-мишенях действия препарата, составила для изолятов устойчивых или чувствительных (в системе Bactec MGIT 960) к Emb - 88,0%, Km - 41,5% (за счет мутаций в промоторной области гена *eis*), Ofx - 39,7%, R - 9,4%. Наименьшая

доля таких штаммов определена для устойчивых МБТ (в Bactec MGIT 960) к Am (6,3%) и H (3,2%).

4. Обосновано снижение КК с 0,5 мкг/мл до 0,25 мкг/мл для качественного определения ЛЧ МБТ к Mfx в Bactec 960. 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 тремя методами, составившего 97,8%.

5. 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 дифференцированного выбора препаратов и оптимизации проводимого лечения (Рисунок 14).

4.5. Алгоритм ускоренной микробиологической лабораторной диагностики туберкулёза

На основе проведённых исследований разработан алгоритм ускоренной микробиологической лабораторной диагностики туберкулёза. Алгоритм включает проведение бактериологических и молекулярно-генетических исследований из единой порции обработанного осадка диагностического материала. Схема алгоритма представлена на рисунке 14.

Унифицированный протокол ускоренного микробиологического исследования состоит из следующих процедур:

- предварительная обработка диагностического материала N-acetyl-L-cysteine (NALC) в сочетании с NaOH для гомогенизации и деконтаминации с последующим центрифугированием и получением осадка диагностического материала;

- посев полученного осадка в объеме 0,5 мл на обогащённую жидкую питательную среду M7H9 для культивирования в Bactec MGIT 960 и параллельно

на плотную стандартную международную среду Л-Й.

Время получения положительного результата в среднем составляет в системе Bactec MGIT 960 от 7 до 12 дней, на плотной среде Л-Й от 3 до 8 недель;

- приготовление и окраска флюорохромами мазка из осадка (30 мкл) материала для люминесцентного микроскопического исследования с целью выявления КУМ.

Время получения результатов микроскопического исследования занимает 2,5 часа;

- осадок диагностического материала в объёме 0,5-1,0 мл используется для автоматизированного выделения ДНК микобактерий и её количественного определения с помощью «АмплиТуб-РВ» (ПЦР-РВ).

- определение ЛЧ к H, R и ФХ с помощью «ТБ-БТОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» проводится, если концентрация ДНК возбудителя в образце составляет от **200 до 400 копий на мл осадка диагностического материала;**

- определение ЛЧ к H, R, E, ФХ, АГ и См с помощью «ТБ-ТЕСТ» проводится, если концентрация ДНК возбудителя в образце составляет **400 копий и выше на мл осадка диагностического материала.**

Время проведения исследования от выделения ДНК до получения результата ЛЧ к ППП составляет 3 дня.

В качестве контроля детекции мутаций в *gyrA*, *gyrB*, *rrs* и *eis* с помощью разработанных методик на основе ПЦР-SSCP и ПЦР-ПДРФ проводится исследование выделенных культур МБТ.

Информация о результатах проведенных молекулярно-генетических исследований передаётся через лабораторную электронную базу в микробиологическую лабораторию.

Всем выделенным культурам микобактерий в системе Bactec MGIT 960 в течение 1-2 суток проводится оценка характера роста по наличию корд-фактора, а также первичная дифференциация в отношении её принадлежности к МБТ или

НТМБ. Дальнейшая дифференциация культур микобактерий, отнесенных к НТМБ, проводится с помощью бактериологических и молекулярно-генетических методов.

Следующим этапом исследования выделенных культур является качественное определение ЛЧ МБТ к ПТП и АБП в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 и количественное с помощью *Sensititre MycoTB Plate*.

- Определение ЛЧ МБТ для культур, чувствительных к Н и R, по результатам молекулярно-генетического определения, проводится только к препаратам I ряда в Bactec MGIT 960.

Время получения результатов составляет 12-14 дней.

Примечание: * В случае получения результата о наличии чувствительности МБТ к Н и R с помощью биочипов, но устойчивости к одному из этих препаратов в Bactec MGIT 960, данным культурам проводится определение ЛЧ к препаратам II ряда

Определение ЛЧ МБТ для культур, устойчивых к Н или R, МЛУ (ШЛУ), по результатам молекулярно-генетического определения, проводится одновременно к препаратам I (основного) и II (резервного) ряда в Bactec MGIT 960.

Время получения результатов ЛЧ МБТ сокращается в среднем до одного месяца.

- Количественное определение ЛЧ МБТ к ПТП с помощью *Sensititre MycoTB Plate* проводятся только в культурах с генетическими детерминантами МЛУ и ШЛУ.

Время получения результатов в среднем составляет 7 дней.

- Для быстрого определения бактериовыделения у пациентов с подозрением на туберкулез, в том числе у лиц находящихся в стационарах клинических больниц, обратившихся за консультацией в противотуберкулёзные учреждения (в т.ч. с ВИЧ инфекцией) и детей используется картриджный экспресс-тест GeneXpert MTB/RIF.

Время проведения исследования от выделения ДНК до получения результата ЛЧ к R составляет 2,5 часа.

Все результаты бактериологических и молекулярно-генетических исследований как отрицательные, так и положительные (выявление возбудителя, его идентификация, определение ЛЧ к ПТП и АБП) фиксируются в электронной информационной базе лаборатории (которые доступны для работы бактериологов и молекулярных генетиков), а также выдаются на бумажном носителе врачам-фтизиатрам.

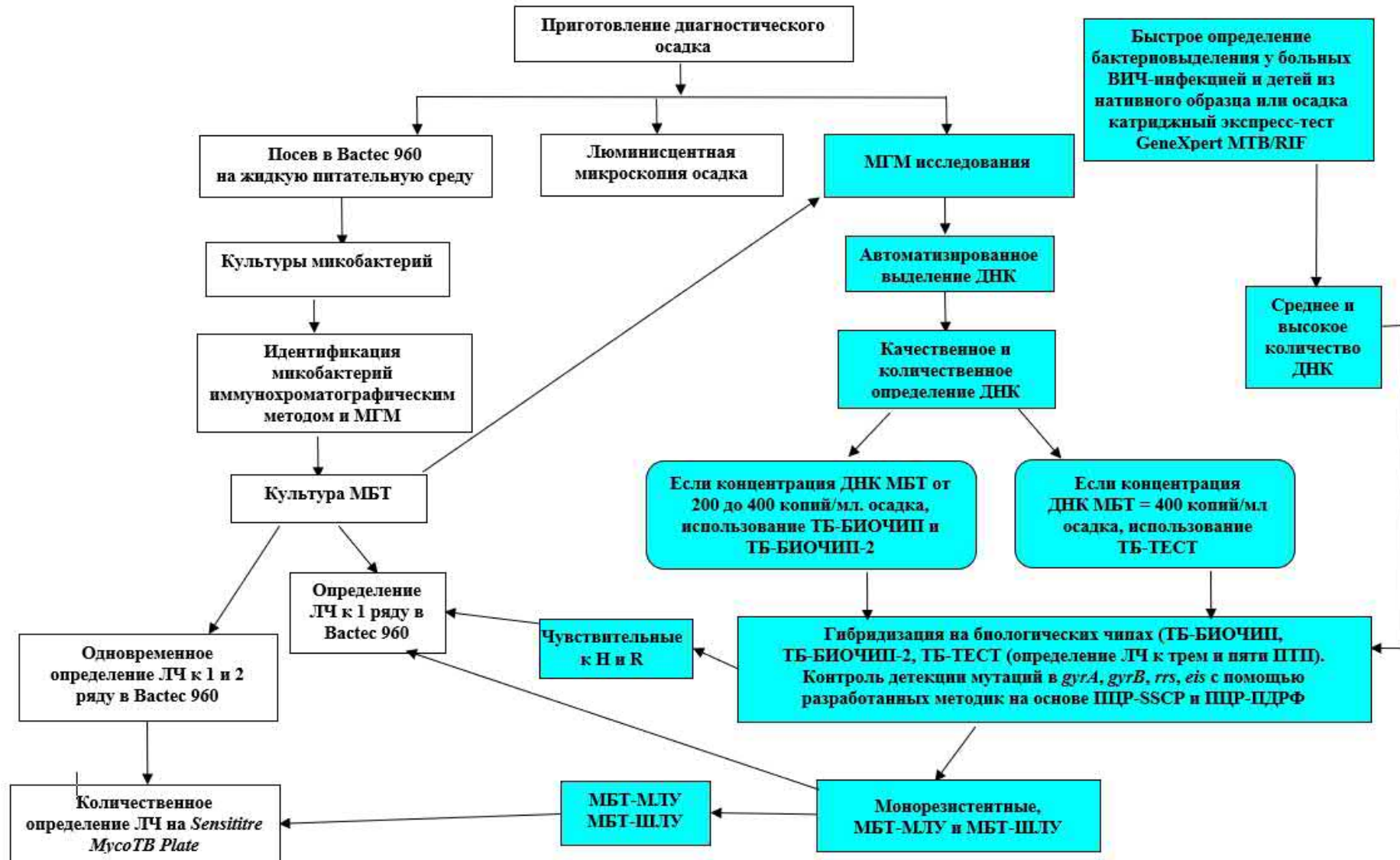


Рисунок 14 – Алгоритм ускоренной микробиологической лабораторной диагностики туберкулёза

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие и распространение ЛУ МБТ к ПТП и АБП является чрезвычайно важной проблемой в современной фтизиатрии. Туберкулёз с МЛУ и не редко уже с ШЛУ, все чаще стал выявляться не только у лиц с хроническим течением процесса, но и у впервые выявленных пациентов [230]. По данным ВОЗ среди 9,27 миллионов новых случаев заболевания 0,5 миллионов это больные туберкулёзом с МЛУ [346; 347]. Проблему быстрого определения ЛЧ МБТ к ПТП первого ряда решает использование автоматизированных систем Bactec MGIT 960, которые в последние десятилетия широко применяют в микробиологических лабораториях фтизиатрической службы [12; 34]. Среди МГМ широкое применение нашли тест-системы на основе гибридизационного анализа на биочипах («ТБ-БИОЧИП-1») и стрипах («GenoTypeMTBDRplus»), предназначенные для ускоренного определения ЛЧ МБТ к H и R (выявление МБТ-МЛУ) [16; 19; 37; 339; 349].

Химиотерапия больных с МЛУ предусматривает переход на режим лечения с использованием препаратов резервного ряда, основными из которых являются ФХ, АГ и Ст. Необходимость быстрого определения ЛЧ возбудителя к ним стала первоочередной задачей, для решения которой как в мире, так и в РФ проводились исследования в двух направлениях:

1. Разработка молекулярно-генетических методов и тест-систем.
2. Установление КК препаратов резервного ряда в жидкой среде M7H9 в автоматизированной системе Bactec MGIT 960, так как зарегистрированные (сертифицированные) готовые наборы предназначены только для четырёх препаратов первого ряда (S, H, R, E) и PZA [14; 277; 281].

Несмотря на обширные знания о известных механизмах резистентности МБТ к АБП развитие ЛУ характеризуется появлением мутаций не только в известных генах-мишенях, но и в новых бактериальных генах [147; 218; 327; 353]. Этот процесс сильно зависит от двух факторов: эпистаза и бактериального фитнеса, которые способствуют закреплению мутаций в геноме МБТ и распространению лекарственно-устойчивых штаммов [151; 210; 333]. Кроме того,

ЛУ возбудителя может варьировать в широких пределах и для ряда препаратов возможна корректировка дозы для преодоления «пограничной» или «низкой» устойчивости возбудителя [191; 301]. Исследования показали, что существует ассоциация определённых мутаций в геноме с уровнем устойчивости возбудителя [187; 302]. Определение ЛЧ МБТ к АБП с помощью установленных КК на плотных или жидких питательных средах позволяет провести качественную оценку, разделяющую на «чувствительные» и «устойчивые» МБТ. В некоторых случаях это приводит к расхождению результатов между различными микробиологическими методами [61; 191; 192]. В тоже время с помощью большинства молекулярно-генетических тест-систем проводится анализ только «ключевых» генов с включением не всех мутаций, что приводит к увеличению расхождений с результатами бактериологического исследования.

Поэтому необходимость разработки методов по изучению роли отдельных генов и мутаций в них в развитии ЛУ к основным препаратам резервного ряда, адаптации принципиально новой тест-системы «ТБ-ТЕСТ» для определения мутаций, связанных с разной степенью устойчивости к основным препаратам первого и второго (резервного) ряда и разработка алгоритма ускоренной диагностики туберкулёза с применением биочиповой технологии в комплексе с бактериологическими методами в рамках централизованной микробиологической лаборатории определяет актуальность данной работы.

Согласно поставленным задачам в нашем исследовании с помощью разработанных модификаций МГМ было проведено исследование генов *gyrA*, *gyrB* и *rrs*, *eis* по выявлению мутаций, приводящих к устойчивости к ФХ, АГ и/или С_m; изучена возможность использования разработанных методик и сертифицированных тест-систем для определения генетических детерминант устойчивости к этим препаратам в рутинных исследованиях; проведено сравнительное изучение эффективности наиболее широко используемых сертифицированных тест-систем в диагностике туберкулёза для быстрого определения МЛУ и ШЛУ возбудителя туберкулёза в диагностическом материале пациентов; изучена возможность последовательного применения

тест-систем «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ» для более эффективного определения МЛУ и ШЛУ МБТ в алгоритме ускоренной диагностики туберкулёза; изучена корреляция различных типов мутаций в МБТ-МЛУ и МБТ-ШЛУ с результатами определения ЛЧ в Bactec MGIT 960 к основным препаратам первого и второго ряда; изучено влияние различных типов мутаций в МБТ-МЛУ и МБТ-ШЛУ на степень лекарственной устойчивости к основным препаратам первого и второго ряда; разработан алгоритм ускоренной бактериологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулёза.

Материалом исследования служили результаты изучения генетических детерминант устойчивости возбудителя туберкулёза 3067 проб ДНК, выделенных из 1516 клинических изолятов МБТ и 1551 образца диагностического материала (мокрота, бронхиальный секрет, БАЛ, операционный материал, эмпиема, смыв из каверны, содержимое туберкуломы). Материал получен за период с 2004 г. по 2018 г. от 2657 пациентов, из которых 2564 находились на лечении в Клиниках и филиалах МНПЦБТ с различными формами туберкулёза (инфильтративный, фиброзно-кавернозный, диссеминированный, туберкулёма, туберкулёз внутригрудных лимфоузлов и др.) и 93 больных нетуберкулёзными заболеваниями.

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

Нами проведена апробация тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2» предназначенной 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.

Результаты определения ЛЧ МБТ к ПТП, получаемые МГМ, в диагностическом материале и культурах могут расходиться, так как не учитывают более широкие изменения в физиологии устойчивых бактерий, влияющие на результаты фенотипического определения ЛЧ или связаны с разрешающей способностью конкретного микробиологического метода [59; 220; 317; 329].

В ходе исследования полученные дискордантные результаты 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.

В отечественной фтизиатрической практике для определения ЛЧ МБТ рекомендуют использовать две концентрации препаратов, в частности, для Ofx КК = 2 мкг/мл и высокую 10 мкг/мл, позволяющие дифференцировать уровень лекарственной устойчивости возбудителя для выбора дозировки препаратов и режима их использования в терапии [26]. Известно, что различные типы мутаций могут влиять на уровень устойчивости МБТ к ФХ [185]. При анализе ассоциации мутаций с устойчивостью 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 D94H 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 β субъединицу ДНК-гиразы [57; 318], мутации в котором также связывают с устойчивостью к ФХ, но встречаются значительно реже, примерно в 7% случаев [329].

Для исследования двух генов *gyrA* и *gyrB* нами 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 в диагностическом материале, а разработанные одинаковые условия для осуществления денатурации получаемых ампликонов после ПЦР и электрофоретического разделения одноцепочечных фрагментов ДНК значительно упростили работу по изучению конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов одновременно в двух генах.

В результате проведённой апробации разработанной «А-SSCP» на 68 образцах мокроты и 90 культурах МБТ было установлено, что на получение интерпретируемого результата на электрофореграмме влияет количество микобактерий, содержащихся в диагностическом материале. Чувствительность метода при исследовании мокроты составило 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 искажать 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 фенотипа МБТ, устойчивого к Ofx чувствительность «А-SSCP» составила 100% (95% ДИ 51-100), специфичность 100% (95% ДИ 93,6-100). 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*.

Впервые в исследуемой выборке культур 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». В ДНК, выделенной из мокроты в гене *gyrB* обнаружены три типа замен (A543T, D500H, R485C), приводящие к устойчивости к Ofx, а из культур пять (A543T, D500H, D500A, N538D, R485C) к устойчивости и один - R485H к чувствительности к препарату.

После проведённого анализа одновременно двух генов исследуемых штаммов МБТ с помощью молекулярных методов и бактериологического определения ЛЧ к Ofx 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).

Следует подчеркнуть, что 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. 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 в 61%, D94A в 25%, D94N в 7%, D94H в 4% и D94Y в 3%. Замена S91P определена в 6,4% и G88C в 1,2% изолятов.

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.

Второй класс АБП, к которым относится группа инъекционных препаратов резервного ряда (Km, Am и Cm), широко применяющийся в терапии туберкулёза с МЛУ. Хотя они принадлежат к разным классам антибиотиков, все они оказывают своё бактерицидное действие через одну и ту же мишень - 16S рРНК, кодируемой геном *rrs*, мутации в котором вызывают устойчивость к Km, Am и в некоторых случаях к Cm [117; 250; 307].

Для выявления генетических детерминант устойчивости в *rrs* нами 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.

Апробацию разработанной методики проводили на 63 культурах МБТ, выделенных в жидкой среде М7Н9 в Bactec MGIT 960. Исследование культур с помощью модификации ПЦР-ПДРФ показало в высоком проценте случаев совпадение с результатами секвенирования: 100% (95% ДИ 79,6-100) для устойчивых изолятов, 98,4% (95% ДИ 91,5-99,7) для чувствительных. 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.

Дискордантные результаты установлены в 27,8% изолятов и связаны с присутствием в 4,3% чувствительных изолятах мутации a1400g в *rrs* и отсутствием замен в 23,5% устойчивых изолятах к Km. В первом случае объяснением может быть наличие в культуре двух различных популяций МБТ, один из которых устойчивый к данным препаратам, а другой – чувствительный [106]. 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 К_m и С_m проводится на плотной Л-Й) растут медленнее или не дают роста на среде [111]. Во втором - устойчивость штаммов к К_m может быть вызвана механизмами, не затронутыми в исследовании. В работе 2009 года Zaunbrecher М.А. и соавт. показано, влияние мутаций в промоторном регионе гена *eis* (кодирует ацетилтрансферазу) на чувствительность МБТ к невысоким дозам К_m.

Необходимо отметить, что мутация *a1400g* в исследуемом гене, приводящая к перекрестной устойчивости к АГ и С_m, выявлена лишь в 33,3% устойчивых изолятов к С_m. Это обстоятельство может быть связано с влиянием ряда факторов на результаты определения ЛЧ методом абсолютных концентраций (величина адсорбции препарата и скорость его диффузии в среде, время и температура инкубации, доза засева МБТ и другие), с детекцией результатов ЛЧ или сниженным фитнесом мутантной популяции МБТ [11; 191].

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 С_m на 15-20 дней. Метод является не дорогим и может широко применяться для проведения диагностики ЛЧ к АГ 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.

Отсутствие мутаций в 23,5% устойчивых изолятов только к К_m мутации в гене *rrs* говорит о необходимости проведения дальнейших исследований в определении роли гена *eis* в развитии устойчивости к этому препарату.

Исследование промоторной области гена *eis* на наличие мутаций было проведено с помощью разработанной методики на основе 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).

Было установлено, что определение мутаций в *eis* позволило выявить 23,7% устойчивых штаммов МБТ к Km дополнительно к 74,6% с заменами в гене *rrs*, и тем самым значительно повысить выявляемость устойчивых МБТ к препарату до 98,3% (95% ДИ: 91,0-99,7) (суммарная чувствительность двух методов). Несмотря на это, наличие дискордантных результатов для 11,4% изолятов повлияло на результаты совпадения между бактериологическим определением ЛЧ МБТ к Km на среде Л-Й и анализом двух генетических мишеней, составившее всего лишь 88,6% (95% ДИ: 81,5-93,2).

Основными причинами несовпадения результатов являлись присутствие мутаций в гене *eis* (g(-10)a, g(-37)t и c(-12)t) в 10,5% чувствительных к Km штаммах и наоборот отсутствие замен в двух генах в 0,9% устойчивых изолятах к

обоим препаратам. Из литературы известно, что мутации в промоторной области гена *eis* ответственны за развитие устойчивости к невысоким концентрациям Km [356]. В первом случае возможно, чувствительные культуры были устойчивые к концентрации препарата ниже 30,0 мкг/мл – минимальной концентрации при определении чувствительности к Km на среде Л-Й.

Во втором случае фенотипическая устойчивость может развиваться по другим механизмам, например, за счёт изменения в работе системы Efflux/influx, обеспечивающей не только транспорт веществ через клеточную стенку, но также играть определённую физиологическую роль, заключающуюся в защите микобактериальной клетки от токсинов и поддержании гомеостаза [258].

Следует подчеркнуть, что выявленные мутации в гене *eis* в устойчивых изолятах к Km не приводили к устойчивости к Cm, что подтверждает данные из литературы, что мутации в этом гене не связаны с развитием резистентности к данному препарату [147].

При исследовании гена *rrs* совпадение результатов для Cm составило 89,5% (95% ДИ: 82,5-93,9), так как часть изолятов (25%) с мутациями в этом гене оставались чувствительными к препарату на среде Л-Й.

Более точное определение ЛЧ возбудителя к Km, Am и Cm можно установить, определив значения МИК этих препаратов. Для всех 114 изолятов, используя критерии оценки ЛЧ, представленные в работе (Rüsch-Gerdes S. et al., 2006) определены значения МИК Km, Am и Cm в жидкой среде M7H9 в системе Bactec MGIT 960.

Установлено, что для всех 38,6% изолятов с мутацией a1401g в гене *rrs* в жидкой среде определены высокие значения МИК Km и Am и умеренные для Cm, тем самым свидетельствуя, что данная мутация приводит к перекрёстной устойчивости к этим препаратам, подтверждая данные из литературы [300].

Расхождения в результатах определением ЛЧ к Km были зарегистрированы как между двумя бактериологическими методами, так и молекулярно-генетическими и бактериологическими методами.

1) устойчивость МБТ только к Km в жидкой среде M7H9 определена в 21,1% изолятов, что подтверждено наличием мутаций в промоторной области гене *eis* в то время, как на плотной среде Л-Й в 13,2% МБТ. Полученные расхождения можно объяснить тем, что учёт результатов устойчивости МБТ к АБП на плотной среде Л-Й проводится визуально, начиная от 20 видимых колоний МБТ тогда, как в Bactec MGIT 960 осуществляется прибором автоматически, что исключает человеческий фактор при регистрации результатов. 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, рН среды, а также содержание CO₂ во время культивирования [104]. Диапазон значений МИК для штаммов с мутациями g(-10)a, g(-37)t и c(-12)t соответствовал низкому уровню устойчивости к Km, а с заменой c(-14t) умеренной степени устойчивости. Все изоляты с мутациями в *eis* были также чувствительными к Am.

2) 1,8% МБТ, содержащие замену c(-12)t, как на плотной, так и в жидкой не проявляли устойчивость к Km. Zaunbrecher MA и соавт, было показано, что некоторые изоляты с этой мутацией остаются чувствительными к препарату. В нашем исследовании МИК Km был приближен к пограничному значению, разделяющему на чувствительные и устойчивые МБТ с этой заменой. Возможно данные штаммы обладали либо пониженным фитнесом или присутствие чувствительной популяции повлияло на результаты определения ЛЧ бактериологическими методами.

3) Отсутствие мутаций в исследуемых генах в 0,9% устойчивых изолятах на плотной среде Л-Й подтверждено результатом чувствительности возбудителя ко всем препаратам в жидкой M7H9 в Bactec MGIT 960. Однако значения МИК также были приближены к пограничному значению, что возможно связано с природной устойчивостью этих изолятов [223].

Было установлено отсутствие полного совпадения результатов между бактериологическими методами для Km - 92,1% (95% ДИ: 85,7-95,8) и для Cm -

90,4% (95% ДИ: 83,5-94,5). Совпадение между результатами ЛЧ к К_m и С_m в системе Bactec MGIT 960 и МГМ составило 98,2% (95% ДИ 93,8-99,5) и 100% (95% ДИ 96,7-100) соответственно, что выше по сравнению со средой Л-Й – 88,6% (95% ДИ 81,5-93,2) и 89,5% (95% ДИ 82,5-93,9). Этот факт подтверждает недостаточную эффективность МАК с использованием среды Л-Й для определения ЛЧ к данным препаратам.

Таким образом, установлено, что разработанная методика на основе ПЦР-SSCP позволяет эффективно проводить «косвенное» определение генетических детерминант устойчивости к К_m 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 К_m участвует два гена – *rrs* и *eis*, одновременный анализ которых позволяет более точно проводить молекулярное определение ЛЧ МБТ к К_m. Мутации в гене *eis* не связаны с развитием устойчивости к С_m и А_m.

В практике микробиологических лабораторий фтизиатрического профиля широко используются тест-системы «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2», основанные на технологии гибридизационного анализа на биочипах. Полученные результаты исследования и данные из литературы, демонстрирующие нарастание ЛУ МБТ к ПТП и АБП за счёт появления новых мутаций в известных генах-мишенях или в других бактериальных генах, способствовали появлению нового сертифицированного для использования в диагностике туберкулёза теста «ТБ-ТЕСТ». Тест-система позволяет идентифицировать суммарно 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 нами была проведена её апробация. Всего исследовано 152 образца диагностического материала (мокрота и бронхиальные

смывы), полученные от 111 пациентов больных туберкулёзом лёгких до начала лечения.

Было 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-1» и «ТБ-БИОЧИП-2», достоверно ($p < 0,001$) ниже на 17,8%. При этом тот факт, что у пациентов в диагностическом материале неоднократно определялся один и тот же генотип ЛЧ с помощью «ТБ-ТЕСТ», 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 определён генотип МБТ-ШЛУ и у 4 (15,4%) пре-ШЛУ.

При сопоставлении результатов определения ЛЧ возбудителя бактериологическими методами (к H, R, Emb в Bactec 906 и Ofx, Km и Cm на плотной среде Л-Й) и «ТБ-ТЕСТ» наибольшее расхождение получено среди монорезистентных к H и полирезистентных МБТ. Причём такие же генотипы ЛЧ в этих образцах определены и с помощью «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2». Отмечено перераспределение между штаммами, отнесёнными к категории МЛУ, пре-ШЛУ и ШЛУ, а именно наблюдается увеличение МБТ-ШЛУ за счёт уменьшения МБТ-МЛУ. Это связано с проблемами определения ЛЧ к препаратам 2 ряда на плотной среде Л-Й описанными выше [11; 192].

Установлена высокая корреляция результатов определения ЛЧ МБТ к R и H в Bactec MGIT 960 и «ТБ-ТЕСТ», составившая 99% (95%; ДИ 94,3-99,8) и 95,8% (95%; ДИ 89,7-98,4) соответственно. Чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительного и отрицательного результатов «ТБ-ТЕСТ» для этих препаратов также были высокими.

Чувствительность теста для Emb составила 92,1% (95%; ДИ 79,2-97,3), специфичность 82,5% (95%; ДИ 70,6-90,2), в то время предсказательная ценность

положительного результата составила всего 77,8%, что заметно ниже по сравнению с результатами для R и H. Это во многом связано с известными проблемами воспроизводимости результатов бактериологического определения ЛЧ МБТ к Emb [152; 214]. Возможно генетический анализ лучше прогнозирует истинную устойчивость возбудителя туберкулёза к препарату. Совпадение результатов между методами для Emb составило 86,3% (95%; ДИ 78-91,8).

Статистические характеристики «ТБ-ТЕСТ» показали несколько сниженную конкордантность с результатами определения ЛЧ МБТ к Ofx, Km и Cm на плотной среде методом МАК. Возможность выявлять мутации в *gyrB* увеличила чувствительность теста с 92,3% до 96,2%, специфичность составила 94,2% (95%; ДИ 86-97,7). Совпадение результатов для Ofx составило 94,7% (95%; ДИ 88,3-97,7). 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. Совпадение результатов между методами для Km и Cm составило 87,4% (95%; ДИ 79,2-92,6) и 97,9% (95%; ДИ 92,7-99,4) соответственно. Полученные данные свидетельствуют о низкой эффективности МАК для определения ЛЧ МБТ к Km на плотной среде Л-Й.

«ТБ-ТЕСТ» позволяет устанавливать не только распространённые генотипы, но и определять подсемейство *Beijing* V0/W148, характеризующееся высокой вирулентностью, трансмиссивностью и ассоциацией с ЛУ [197; 240; 253]. В данной выборке образцов генотип *Beijing* был определен в 66,3% изолятов, из которых 33,3% принадлежали кластеру V0/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.

Таким образом, установлено, что «ТБ-ТЕСТ» обладает сопоставимой чувствительностью с «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» при детекции ДНК МБТ в клиническом материале и достоверно ($p < 0,001$) меньшей (на 17,8%) при определении генотипа ЛЧ. Тест-система показала высокую чувствительность,

специфичность, предсказательную ценность положительного и отрицательного результата для R и H, однако для Emb, Ofx, Km и Cm эти параметры оказались ниже. Недостаточная стандартизация отдельных методов и критериев оценки ЛЧ результатов чувствительности нередко приводят к расхождениям между различными методами и, следовательно, с молекулярными тестами [61; 191; 192; 275]. Это определяет необходимость проведения дальнейших исследований анализа результатов определения ЛЧ к этим препаратам между молекулярно-генетическими и другими бактериологическими методами.

На сегодняшний день в рутинных исследованиях бактериологических лабораторий фтизиатрической службы наиболее часто применяют три молекулярно-генетические технологии: катридная технология на основе ПЦР-РВ («Xpert MTB/RIF») и тест-системы гибридизационного анализа на стрипах («Genotype MTBDR*plus*», «GenoType MTBDR*sl*») и биочипах («ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ»). Тест-системы «ТБ-БИОЧИП-1» и «Genotype MTBDR*plus*» предназначены для быстрого определения генетических детерминант устойчивости H и R, а «Xpert MTB/RIF» только R, как маркера МЛУ непосредственно в диагностическом материале пациентов.

Каждая из технологий имеет свои преимущества и поэтому определить их эффективность в выявлении и определении ЛЧ МБТ в первую очередь в респираторном материале, а также определение их «места» в ускоренной лабораторной диагностике туберкулёза (в комплексе с бактериологическими методами) является актуальным.

Результаты сравнения трёх тест-систем по выявлению ДНК МБТ в диагностическом материале, показали, что наибольшей чувствительностью обладает тест-система «XpertMTB/RIF», которая даёт наибольшее совпадение с результатами бактериологических исследований в 92,2% и 87,5% в мокроте и бронхиальном смыве соответственно. В образцах с положительной микроскопией и ростом культуры МБТ в Bactec MGIT 960 результаты совпадают на 100%. Чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительного

и отрицательного результата для «Xpert MTB/RIF» составила 92,2% (ДИ 81,5%-96,9%), 100% (ДИ 95,7%-100%), 100% (ДИ 92,4%-100%), 95,6% (ДИ 89,1-98,3%) соответственно.

Сравнительный анализ чувствительности «ТБ-БИОЧИП-1» и «GenoType MTBDR*plus*» показал преимущество «ТБ-БИОЧИП-1», позволяющей выявлять ДНК МБТ в мокроте как с положительной, так отрицательной микроскопией. С помощью «ТБ-БИОЧИП-1» совпадение составило 96,7% в образцах с положительной микроскопией и 52,4% с отрицательной. Этот показатель для «GenoType MTBDR*plus*» в образцах с положительным результатом микроскопии составил 83,3%.

Чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительного и отрицательного результата для «ТБ-БИОЧИП-1» составили 78,4% (ДИ 65,4%-87,5%), 100% (95,7%-100), 100% (ДИ 91,2%-100%), 88,7% (ДИ 80,8%-93,5%) соответственно; для «GenoType MTBDR*plus*» - 49,0% (ДИ 35,9%-62,3%), 100% (95,7%-100%), 100% (ДИ 86,7%-100%), 79,8% (68,2%-83,6%) соответственно.

Одним из преимуществ молекулярных технологий является возможность исследования контаминированных проб в жидкой среде M7H9, используемой в автоматизированной системе Bactec MGIT 960, которая может достигать от 9,0 до 16,7% [171; 335]. В нашем исследовании 9,3% образца мокроты подверглись контаминации и в 2,6% из них (два с положительной и два с отрицательной микроскопией) только с помощью «Xpert 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 нашем исследовании определить их в выявленной ДНК МБТ с помощью каждого теста в наибольшем проценте случаев удалось с помощью «Xpert MTB/RIF» в 97,9%, «ТБ-БИОЧИП-1» в 95% и «GenoType MTBDR*plus*» в 92% образцов. Совпадение

«ТБ-БИОЧИП-1» с бактериологическим исследованием составило для чувствительных МБТ – 100%, монорезистентных к H – 85,7%, а с МЛУ – 92,8%. Расхождение связано с присутствием мутации L533P в гене *rpoB* в одном образце с фенотипической монорезистентностью МБТ к H. Среди МБТ с МЛУ чаще встречалось сочетание мутаций S531L в *rpoB* и S315T в *katG* (71,4%), а также в трёх генах – S531L в *rpoB*, S315T в *katG* и с(-15)t или t(-8)a в *inhA* (14,3%). Мутация S315T в *katG* обнаружена во всех монорезистентных МБТ к H и с МЛУ (100%), а в сочетании с с(-15)t в *inhA* в 20% образцах.

Определить ЛЧ с помощью «GenoType MTBDRplus» удалось в наименьшем количестве образцов и для этой выборки совпадение результатов составило 100% и с микробиологическими результатами, и с «ТБ-БИОЧИП-1».

В образцах бронхиального смыва отмечена низкая корреляция «ТБ-БИОЧИП-1» и «GenoType MTBDRplus» с наличием роста МБТ в Bactec MGIT 960 и составило всего лишь 31,3% и 12,5% соответственно. Результаты бактериологического определения ЛЧ МБТ к R и H полностью совпали с данными молекулярных тест-систем. Такие показатели свидетельствуют о малой эффективности тест-систем для исследования данного диагностического материала. Более рациональным будет применение «ТБ-БИОЧИП-1» в комплексе с системой Bactec MGIT 960 в выделенных культурах из этого вида материала, которое будет сокращать время получения результата чувствительности к R и H в среднем до 11,5 дней. Это значительно быстрее получения результата ЛЧ ускоренным бактериологическим методом в Bactec MGIT 960. Этот же алгоритм целесообразно применять и для образцов мокроты, в которых не удалось выявить ДНК МБТ и определить ЛЧ.

Таким образом, установлено, что тест-система «Xpert MTB/RIF» обладает высокой чувствительностью в выявлении ДНК МБТ как в мокроте, так в бронхиальном смыве, обеспечивая автоматическое выполнение всех этапов молекулярного исследования, тем самым исключая возможность контаминации образцов продуктами амплификации 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 заболевание в образцах мокроты с отрицательной микроскопией по *Ziehl-Neelsen*. Тест-система «ТБ-БИОЧИП-1» наиболее эффективна, так как с достаточной чувствительностью позволяют выявлять ДНК МБТ в мокроте независимо 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.

Сравнительный анализ эффективности исследования диагностического материала с помощью тест-систем «ТБ-БИОЧИП-2» и «GenoType MTBDRs \backslash » показал, что «ТБ-БИОЧИП-2» обладает большей чувствительностью при выявлении ДНК МБТ в мокроте по сравнению «GenoType MTBDRs \backslash », увеличивая обнаружение МБТ на 26,5%. В образцах с положительной микроскопией с помощью «GenoType MTBDRs \backslash » ДНК МБТ обнаружена в 86,1% и с отрицательной в 30,4%. Определить генетические детерминанты устойчивости к ФХ, АГ (Cm) и Emb в выявленной ДНК МБТ с помощью теста удалось только в 92,0% образцах. Преимуществом тест-системы «GenoType MTBDRs \backslash » является то, что она позволяет выявлять мутации, связанные с устойчивостью не только к ФХ, но и АГ (Cm) и Emb. Возможность определять мутации в гене *gyrA* ДНК МБТ, выделенной как из мокроты, так и культур две тест-системы продемонстрировали одинаковые статистическими характеристиками: чувствительность - 92,5% (95% ДИ 82,1%-97%), специфичность - 98% (95% ДИ 89,3%-99,6%), прогностическая значимость положительного и отрицательного

результата - 98% (95% ДИ 89,5%-99,7%) и 92,3% (95% ДИ 81,8%-97%) соответственно. Несмотря на это, преимущество биочипа очевидна, так как позволяет определять тип редко встречаемых мутаций. В нашем исследовании замена G88C, установленная с «ТБ-БИОЧИП-2», определена с помощью «GenoType MTBDR_{sl}» только по отсутствию гибридизации с зондом дикого типа ($\Delta wt1$), который перекрывает область с 85 по 90 кодон, что даёт возможность только предположить о наличии мутации в одном из этих кодонов, замены в которых не все связаны с устойчивостью. А это, в свою очередь, может привести к ложно-положительному результату [45]. Генетические детерминанты устойчивости к Km, Am и Cm с помощью теста можно определять только в гене *rrs*, связанные с перекрёстной устойчивостью к ним. В данной выборке чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительного и отрицательного результата теста для Km составила 71,4% (95% ДИ 57,6-82,1), 98,1% (95% ДИ 90,1-99,7), 97,2% (95% ДИ 85,8-99,5) и 78,8% (95% ДИ 67,5-86,9) соответственно, т.е 28,6% фенотипически устойчивые МБТ к Km не выявлялись данной тест-системой. Эти показатели для Cm значительно превышали и составили 100% (95% ДИ 90,1-100), 98,5% (95% ДИ 92-99,7), 97,2% (95% ДИ 85,8-99,5) и 100% (95% ДИ 94,5-100) соответственно. В отношении Emb тест-система продемонстрировала низкую чувствительность, специфичность, прогностическую значимость положительного и отрицательного результата, составившие 55,2% (95% ДИ 43,4-66,5), 74,3% (95% ДИ 57,9-85,8), 80,4% (95% ДИ 66,8-89,4) и 46,4% (95% ДИ 34,0-59,3) соответственно, так как с её помощью возможно определять мутации только в 306 кодоне гена *embB*. До недавнего времени в литературе обсуждалось значение мутаций в этом кодоне в развитии устойчивости к Emb. С одной стороны, некоторые авторы демонстрировали высокую корреляцию между устойчивостью и наличием мутаций в M306 кодоне и рассматривали их как маркёры устойчивости МБТ к Emb [173; 182; 325]. С другой стороны, сообщалось о наличии мутаций в этом кодоне как в чувствительных (22,9% в настоящем исследовании), так и в 30,0% — 68,0%

устойчивых изолятах (55,2% в данном исследовании). Поэтому, предлагалось рассматривать обнаруженные мутации в чувствительных МБТ, как маркёры предрасположенности к развитию устойчивости к препарату, а не как специфические маркёры устойчивости [161; 235; 284]. Позднее в литературе были описаны мутации в других кодонах (406 и 507), которые также приводили к устойчивости возбудителя к данному препарату [60]. Следует отметить, что проведённое исследование в гл.2 по определению расширенного спектра мутаций в гене *embB* с помощью «ТБ-ТЕСТ» позволили увеличить корреляцию с бактериологическим определением устойчивости МБТ к Emb до 92,1%, а специфичность до 82,5% (мутации были также обнаружены в чувствительных МБТ). Так или иначе, эти данные подчёркивают тот факт, что молекулярная основа устойчивости МБТ к препарату до сих пор недостаточно понятна и требуют дальнейших исследований.

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.

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 прежде всего в определении ЛЧ/ЛУ МБТ к АБП. В нашем исследовании включение ПЦР-РВ вместо этапа электрофореза (используется для визуализации ДНК в виде светящихся полос в геле) позволило с высокой чувствительностью и специфичностью определить количество ДНК возбудителя в диагностическом материале необходимое для оптимизации эффективного использования тест-систем «ТБ-БИОЧИП-1», «ТБ-БИОЧИП-2» и «ТБ-ТЕСТ» в алгоритме ускоренной лабораторной диагностики туберкулёза. Исследование образцов респираторного материала (мокрота n=360, бронхиальный секрет n=86) показало, что пороговые значения концентрации ДНК для получения качественной гибридизационной картины на чипах (наличие позитивных сигналов во всех группах анализируемых фрагментах) 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». 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».

Таким образом, включение в алгоритм этапа количественного определения ДНК МБТ с помощью ПЦР-РВ позволило не только устанавливать наличие возбудителя в диагностическом материале пациента, но и определить последовательность эффективного использования тест-систем гибридизационного анализа на биочипах для диагностики ЛЧ.

При диагностических операциях крайне необходима верификация диагноза ТБ и определение ЛЧ МБТ к ПТП. Исследование операционного материала у больных без бактериовыделения с операционным этапом лечения ТБ лёгких является единственным способом получения данных о ЛЧ возбудителя. Однако по данным Белоусовой К.В. (2013г.) высеваемость МБТ при исследовании операционного материала от пациентов с ТБ лёгких, составляет 22,3%, в то время

как ДНК МБТ выявляется в 97,9%. Используя разработанный алгоритм выявления и определения ЛЧ МБТ к основным АБП были исследованы образцы операционного диагностического материала от пациентов, прооперированных по поводу патологии лёгких.

Было установлено, 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).

В литературе имеется мало данных о высеваемости МБТ из резекционного материала лёгких в жидкой среде М7Н9 в системе Bactec MGIT 960. В ряде случаев вместе с резекционным материалом анализировали посевы в Bactec MGIT 960 биопсийного материала лимфатических узлов, кожи, печени, селезёнки и др., которые объединяли в группу «ткани». Высеваемость возбудителя туберкулёза из такого материала не превышала 7,9% - 9,5 % [167]. Вероятно это связано с тем, что в неблагоприятных условиях (снижение парциального давления кислорода, воздействие факторов иммунитета, условия пониженной кислотности в фагосоме) МБТ переходит в «некультивируемое» состояние посредством адаптивных изменений в профиле экспрессии генов [30; 254; 282]. Кроме того, штаммы МБТ, содержащие мутации, приводящие к развитию МЛУ и ШЛУ форм, характеризуются пониженной способностью роста в отсутствие АБП [48].

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 позволило 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 И (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 Сm и 56,3% образцах в *eis* - устойчивость к Km. Самым вариабельным по типам выявленных мутаций был ген *embB*, в котором обнаружено 11 вариантов. Наиболее распространённые из них M306V и Q497R, обнаруженные в 26,9% и 23,1% образцах соответственно. Данные мутации встречались в МЛУ и пре- и ШЛУ образцах ДНК МБТ.

В связи с трудностью получения культуры МБТ из операционного материала 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 литературными данными широкого распространения генотипа *Beijing* на территории РФ [127].

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».

Необходимость достоверной информации о ЛЧ МБТ к ПТП возрастает в связи с усилением противотуберкулёзного контроля за ЛУ и необходимостью лечения туберкулёза с МЛУ и ШЛУ, частота заболеваемости которого неуклонно растёт по всему миру [191]. Однако результаты определения ЛЧ МБТ к АБП как между различными бактериологическими методами, так и с молекулярными тестами нередко различаются [61; 143; 191; 192; 275].

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 Bactec MGIT 960 и молекулярно-генетического с помощью «ТБ-ТЕСТ» и установить связанные с этим причины.

Исследование 808 штаммов МБТ показало, что наибольшее совпадение результатов определения ЛЧ МБТ к ПТП первого ряда в Bactec MGIT 960 и тест-системой «ТБ-ТЕСТ» установлено для Н, которое составило 99,8% (95% ДИ 99,1-99,9). Мутации определены в 100% в пре-ШЛУ, МБТ-ШЛУ в монорезистентных к Н и в 99% среди МБТ-МЛУ. В большинстве штаммов (76,6%) преобладали замены в гене *katG*, в двух генах *katG* и *inhA* (20,4%) и только в *inhA* в 2,6% устойчивых изолятов. Чаще определялась (97%) замена S315T в *katG* и в сочетании с с(-15)t в *inhA* (92,1%). Расхождение результатов получены для двух (0,3%) штаммов с МЛУ, которые возможно связаны с эффлюксными механизмами, которые приводят к существенному изменению транспорта антибиотиков в клетку, а также с гетерорезистентностью популяции МБТ [89; 212; 270; 272; 360].

Совпадение между двумя быстрыми методами для R составило 96,5% (ДИ; 95%-97,6%), что совпадает с данными других авторов [228; 245; 365].

Отмечено большое разнообразие типов мутаций в 6 кодонах (511, 513, 516, 533, 526, 531) гена *rpoB*. Всего обнаружено 30 вариантов замен: 40% двойных и 60% одиночных, из которых преобладала (83%) S531L. Наибольший процент совпадений установлен среди МБТ-МЛУ, пре-ШЛУ, МБТ-ШЛУ и монорезистентных к R и составил 99,4 % (ДИ; 98,5%-99,8%). Наименьший среди моно- и полирезистентных изолятов, который в данной группе штаммов составил всего лишь 66,7% (ДИ; 55,2%-76,5%). Треть из этих штаммов содержали замены L511P, H526L, H526N, D516Y, L533P, D516G и две двойные D516G/S531W и D516G/S522L в *rpoB*, которые, по данным литературы, являются причиной дискордантных результатов между бактериологическими методами (метод пропорций на плотной среде Л-Й или агаровая М7Н11 и Bactec MGIT 960) [50; 246; 275; 323]. 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. Кроме того, отмечаются расхождения и в результатах определения ЛЧ между различными микробиологическими методами (метод пропорций на среде Л-Й или агаровой M7H11 и Bactec MGIT 960) [323]. Причиной этого является пограничный или низкий уровень устойчивости МБТ (МИК препарата близкое к значению КК), что связано либо с локализацией (сайтом) мутации или типом аминокислотой замены в кодоне (L511P, L533P, D516Y), либо с медленной скоростью роста (фитнес) некоторых мутантных МБТ в присутствии препарата, возможно в следствии снижения активности продукта гена - фермента РНК-полимеразы (H526L, H526N, D516G, S522L, S531W) [139; 176; 219; 275; 311; 323]. Это может быть связано также с гетерорезистентностью популяции МБТ, в которой присутствуют как чувствительные, так и устойчивые субпопуляции [323]. В связи с этим, для более эффективного обнаружения штаммов с низким уровнем устойчивости в Bactec MGIT 960 в литературе предлагают различные варианты модификации в детекции ЛЧ: пересмотреть КК, снизив её до 0,5 мкг/мл, увеличить сроки инкубации изолятов, увеличить объем засеваемого инокулята [321; 323]. С другой стороны, S. Hofmann-Thiel и соавт. (2017) подробно описывают варианты несоответствий в определении ЛЧ к R между молекулярными тестами и бактериологическими исследованиями и предлагают варианты их решения в лаборатории до выдачи результата [169].

Тем не менее, при получении с помощью МГМ результата устойчивости МБТ к R необходимо однозначно учитывать это при выборе схемы лечения, особенно когда штамм по культуральным данным обладает чувствительностью и к H и R [179]. 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 [352].

Наименьшее совпадение 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 выявлены в единичных случаях. Известно, что существуют проблемы при определении ЛЧ к этому препарату также классическими бактериологическими методами, что может быть связано с бактериостатической природой ЭМБ, уменьшению его активности в культуральной среде или узкой областью между МИК чувствительных и устойчивых изолятов МБТ [143; 165; 214]. Такие расхождения в результатах исследования были описаны и в ранее проводимых работах, поэтому для фенотипического определения ЛЧ предпочтительнее использовать методы микроразведений, предназначенные для определения уровня устойчивости МБТ к Emb, так как они лучше коррелируют с выявляемыми мутациями в гене *embB* по сравнению с традиционными бактериологическими методами [363].

В отношении препаратов группы ФХ (Ofx, Lfx и Mfx), КК которых для системы Vastec MGIT 960 пересматривались ВОЗ в 2008 г. [342] и 2014 г. [346], 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 изоляты к Mfx 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 Vastec MGIT 960. Кросс-резистентность ко всем ФХ, независимо от применения КК в указанных периодах, 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 двойная D500N/E540D в гене *gyrB* демонстрировали наибольшую вариабельность в чувствительности/устойчивости к ФХ, проявляя устойчивость почти в половине (43,8%) изолятов к Ofx и наименьшем в зависимости от КК к Lfx и Mfx. Все изоляты с R485C, S486F, T539P, и T539I не приводили к устойчивости к тестируемому ФХ.

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.

Наше исследование показало, что совпадение между методами 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 (91,6%) выявлены в устойчивых МБТ к Km и в чувствительных к Cm (97,3%) и Am (85,1%). Перекрёстная 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 МБТ к Km 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 [89; 130; 356]. 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 [196]. 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 [273].

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 [17; 159]. Известно, что различные типы мутаций, а также степень гетерогенности популяции влияют на уровень лекарственной устойчивости возбудителя [75; 361].

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 MусоТВ. 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 высокий уровень корреляции результатов между «ТБ-ТЕСТ» и Sensititre MусоТВ по сравнению с Bactec MGIT 960 для Emb (95,3% и 81,5% соответственно), в меньшей степени для Rif (98,1% и 96%), 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%).

Исследование показало, что высокая и умеренная степень устойчивости к R преобладала среди исследуемых изолятов (около 89,9%) и 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, чаще определяемые в Bactec MGIT 960 как чувствительные, что соответствует данным предыдущих исследований [176; 275]. Надо отметить, что около половины штаммов с H526L и 3,6% с S531L так же попали в эту область, что возможно связано с низкой скоростью роста (фитнес) или гетерогенностью изолятов, что привело к снижению МИК [75; 86].

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, что совпадает с результатами других исследований [301; 302].

«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 которых снижается одновременно с уменьшением процента 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 [75]. 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, что подтверждает данные из литературы [218]. 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* обуславливают низкую степень устойчивости к Ofx (около 81%) 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. Обосновано снижение КК с 0,5 до 0,25 мкг/мл для качественного определения ЛЧ МБТ к Mfx в Bactec MGIT 960. 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 тремя методами, составившего 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 к Km и Am, тогда как редко встречающаяся g1484t (0,4%) к умеренному к Km и низкому к Am. Полученные результаты согласуются с данными других авторов [63; 97; 128; 362]. 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, которая в нашем исследовании 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% 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 свидетельствует возможно о гетерорезистентности изолятов. Отсутствие мутаций в обоих генах в 5,5% устойчивых изолятах к Km и 0,9% к Am предполагает наличие мутаций в другом регионе гена *rrs* [362] или в 5' Untranslated region *whiB7*, не представленных в «ТБ-ТЕСТ» [273].

Включение в алгоритм лабораторной диагностики туберкулёза микробиологического теста Sensititre MycoTB, 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 МГМ, 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 (МЛУ, ШЛУ).

Алгоритмом предусмотрено обязательное определение ЛЧ с помощью молекулярно-генетических технологий («Xpert MTB/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 («ТБ-ТЕСТ») и бактериологического метода микроразведений (Sensititre MucO TB), при этом время получения результата сокращается в 2,7 раза и служит основанием для назначения адекватной химиотерапии или её оптимизации.

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 туберкулёза.

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 MucоTB 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 СОКРАЩЕНИЙ

АБП	<i>Антибактериальные препараты</i>
АГ	<i>Аминогликозиды</i>
БАЛ	<i>Бронхоальвеолярный лаваж</i>
БС	<i>Бронхиальный секрет</i>
ВИЧ	<i>Вирус иммунодефицита человека</i>
ВОЗ	<i>Всемирная организация здравоохранения</i>
ГБУЗ МНПЦ борьбы с туберкулезом	<i>Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский городской научно-практический Центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»</i>
ДЗМ	<i>Доверительный интервал</i>
ДИ	<i>Дезоксирибонуклеиновая кислота</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>
МЛУ-ТБ	<i>Туберкулёз с множественной лекарственной устойчивостью</i>
ПВБ	<i>Промывные воды бронхов</i>
ПДРФ	<i>Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов</i>
ПТП	<i>Противотуберкулезные препараты</i>
ПЦР-РВ	<i>Полимеразная цепная реакция в реальном времени</i>
ТБ	<i>Туберкулёз</i>
ФХ	<i>Фторхинолоны</i>
ШЛУ	<i>Широкая лекарственная устойчивость</i>
ШЛУ-ТБ	<i>Туберкулёз с широкой лекарственной устойчивостью</i>
Am	<i>Амикацин</i>
Vactec MGIT 960	<i>Автоматизированная система VactecTM MGITTM 960</i>
BQ	<i>Бедаквилин</i>
Cfx	<i>Ципрофлоксацин</i>
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute; Институт клинических лабораторных стандартов</i>
Cm	<i>Капреомицин</i>

Cs	<i>Циклосерин</i>
ECOFF	<i>Epidemiological cut off value; эпидемиологическая точка отсечения</i>
EUCAST	<i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; Европейский комитет по определению чувствительности</i>
Emb	<i>Этамбутол</i>
Eto	<i>Етионамид</i>
Gat	<i>Гатифлоксацин</i>
H	<i>Изониазид</i>
Km	<i>Канамицин</i>
Lfx	<i>Левифлоксацин</i>
Lzd	<i>Линезолид</i>
Mfx	<i>Моксифлоксацин</i>
M7H9	<i>Жидкая среда Middlebrook 7H9</i>
M7H10	<i>Агаровая среда Middlebrook 7H10</i>
NALC	<i>N-acetyl-L-cysteine</i>
Ofx	<i>Офлоксацин</i>
PAS	<i>ПАСК, парааминосалициловая кислота</i>
R	<i>Рифампицин</i>
Rfb	<i>Рифабутин</i>
S	<i>Стрептомицин</i>
SSCP	<i>single-strand conformation polymorphism – конформационный полиморфизм длин одноцепочечных фрагментов</i>
Vm	<i>Виомицин</i>
WHO	<i>World Health Organization; Всемирная организация здравоохранения</i>
Z	<i>Пиразинамид</i>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агаев, Ф.Ф. Молекулярно-генетические и бактериологические методы диагностики *M.tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью / Ф.Ф. Агаев, К.А. Алиев, Н.А. Салимова, Р.М. Абузаров, И.А. Гасымов, Д.А. Грядунов // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2009. – № 9. – С. 32-35.

2. Аляпкина, Ю.С. Эффективность применения технологии ПЦР в реальном времени для экспресс-анализа лекарственной устойчивости микобактерий туберкулёза к препаратам 1-го ряда в клинических образцах мокроты и биоптатах ткани лёгких, полученных во время операции / Ю.С. Аляпкина, А.А. Елов, Л.К. Шипина, М.А. Владимирский // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2018. – № 12. – С. 18-24.

3. Бастиан, И. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (перевод с англ.) / И. Бастиан // под ред. Ф. Порталс: Изд-во «Медицина и жизнь». – 2003. – 368 с.

4. Белоусова, К.В. Характеристика клинически значимых биологических свойств возбудителя туберкулеза, выделенного из резецированных участков легких больных туберкулезом: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Белоусова Ксения Валерьевна. – Е., 2013. – 148 с.

5. Богородская, Е.М. Противотуберкулезная работа в городе Москве. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу, 2018 г / Е.М. Богородская, В.И. Литвинов, Е.М. Белиловский. – М.: МНПЦБТ. – 2019. – 216 с.

6. Борисов, С.Е. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя / С.Е. Борисов, Е.М. Белиловский, И.Д. Данилова, Л.Н. Рыбка // Противотуберкулезная работа в городе Москве. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу, 2018 г. / Под ред. Е.М. Богородской, В.И. Литвинова, Е.М. Белиловского. – М.: МНПЦБТ. – 2019. – Гл. 5. – С. 95-105.

7. Васильева, И.А. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя в странах мира и в Российской Федерации / И.А.

Васильева, Е.М. Белиловский, С.Е. Борисов, С.А. Стерликов // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2017. – № 11 (95). – С. 5-18.

8. Владимирский, М.А. Применение метода ПЦР в реальном времени для определения и контроля за распространением лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза / М.А. Владимирский, Ю.С. Аляпкина, Д.А. Варламов, Я.И. Алексеев, Л.К. Шипина, М.В. Шульгина, Л.В. Домотенко, К.Р. Быкадорова, Н.Н. Гащенко, Л.Б. Ендоурова, О.В. Иванова, Е.А. Ильина, О.А. Левкова, Т.В. Маркова, В.П. Наземцева, Е.П. Павлова, А.И. Полозов, Н.В. Шишкина // Проблемы туберкулёза. – 2008. – № 4. – С. 38-44.

9. Грядунов, Д.А. Индентификация штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с одновременным определением их лекарственной устойчивости методом гибридизации на олигонуклеотидных микрочипах / Д.А. Грядунов, В.М. Михайлович, С.А. Лапа, Н.И. Рудинский, В.Е. Барский, А.В. Чудинов, А.С. Заседателей, А.Д. Мирзабеков // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. – 2003. – № 4. – С. 24-27.

10. Грядунов, Д.А. Гидрогелевые биочипы – инструменты многопараметрического анализа маркеров бактериальных, вирусных и растительных геномов: дис. ... д-ра. биол. наук: 03.01.03/ Грядунов Дмитрий Александрович. – М. – 2017. – 277 с.

11. Дорожкова, И.Р. Микробиологические исследования во фтизиатрии и централизованная микобактериологическая служба / И.Р. Дорожкова, Г.Е. Фрейман, М.В. Макарова // В кн.: Лабораторные исследования при туберкулёзе / Под ред. В.И. Литвинов, А.М. Мороз – М.: МНПЦБТ. – 2013. – С. 45-79.

12. Дорожкова, И.Р. Новая технология для скрининга туберкулеза легких / И.Р. Дорожкова, Г.Е. Фрейман, З.П. Абрамова, Т.Н. Левченко, А.М. Мороз // Рос. мед. журнал. – 2007. – № 2. – С. 12-15.

13. Исаева, Е.Л. Генетические мутации микобактерии туберкулеза, ответственные за резистентность к рифампицину у больных туберкулезом: идентификация и характеристика: дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Исаева Елена Леонидовна. – М. – 2002. – 103 с.

14. Исаева, Ю.Д. Критерии оценки лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к препаратам группы фторхинолонов культуральными методами: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Исаева Юлия Дмитриевна. – М. – 2013. – 102 с.

15. Исаева Ю.Д. Сравнительное изучение определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулёза с помощью тест-системы Sensititre МусоТВ и других культуральных методов / Ю.Д. Исаева, Л.Ю. Крылова, М.В. Макарова, А.А. Букатина, М.Б. Гикало // В кн.: Лабораторные исследования при туберкулезе / Под ред. В.И. Литвинов, А.М. Мороз – М.: МНПЦБТ. – 2013. – С. 111-120.

16. Исакова, Ж.Т. Биологические микрочипы в экспресс-идентификации штаммов *M.tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью у больных туберкулёзом в Республике Кыргызстан / Ж.Т. Исакова, З.К. Гончарова, А.А. Алдашев // Пульмонология. – 2008. – № 3. – С. 64-66.

17. Макарова, М.В. Определение лекарственной чувствительности микобактерий с помощью тест-системы «Sensititre» / М.В. Макарова, Ю.Д. Исаева, Е.Н. Хачатурьянц, В.И. Литвинов // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2013. – № 2. – С. 30-34.

18. Макарова, М.В. Изучение лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с помощью тест-системы Sensititre МусоТВ на основе определения критических концентраций химиопрепаратов / М.В. Макарова, Ю.Д. Исаева, Л.Ю. Крылова, В.И. Литвинов // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2015. – № 3. – С. 18-24.

19. Манаенкова, Е.В. Опыт применения тест-системы «ТБ-БИОЧИП» в Тамбовской области / Е.В. Манаенкова, А.А. Савин // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – № 2. – С. 59-62.

20. Мирзабеков, А.Д. Биочипы в биологии и медицине XXI века / А.Д. Мирзабеков // ВЕСТНИК РАН. – 2003. – Т. 73, № 5. – С. 412.

21. Молекулярно-генетическая диагностика туберкулеза методом ПЦР в реальном времени. Технология «АМПЛИТУБ». – Режим доступа: <http://syntol.ru/upload/iblock/668/668cfb7845b8f32a223124ad74a3a780.pdf>
22. Методические указания МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 04.03.2004. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
23. Методические рекомендации «Определение критических концентраций канамицина, капреомицина и офлоксацина, используемых для оценки лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* методом абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена» / В.Н. Степаншина, А.В. Низова, Т.Н. Мухина, Р.И. Миронова, О.Г. Николаева, И.Г. Шемякин, М.В. Храмов. – М.: ФГУН ГНЦПМБ. – 2009. – 12 с.
24. Низова, А.В. Изучение устойчивости к лекарственным препаратам первой и второй линии штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от больных с хроническим течением туберкулеза: автореф. ... дис. канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.03 / Низова Анастасия Валерьевна. – М., – 2009. – 22 с.
25. Патрушев, Л.И. Экспрессия генов / Л.И. Патрушев – М: Наука. – 2000. – 527 с.
26. Приказ №109 МЗ РФ от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской Федерации». – М., 2003. – 345 с.
27. Салина, Т.Ю. Молекулярно-генетический анализ изониазид-резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Саратовской области / Т.Ю. Салина, Т.И. Морозова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2013. – № 3. – С. 26-28.
28. Салина, Т.Ю. Молекулярно-генетические особенности лекарственной устойчивости к рифампицину и распространенность мутаций в гене *rrpV* на территории Саратовской области / Т.Ю. Салина, Т.И. Морозова // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2014. – Т. 91, № 4. – С. 22-25.

29. Салина, Т. Ю. Молекулярно-генетический анализ и спектр мутаций в генах *katG*, *inhA*, *rpoB*, кодирующих лекарственную устойчивость к изониазиду и рифампицину у больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией / Т.Ю. Салина, С. А. Чуркин, Т. И. Морозова // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2016. – № 8. – С. 54-59.
30. Скворцов, Т.А. Адаптивные изменения экспрессии генов *Mycobacterium tuberculosis* в ходе инфекционного процесса / Т.А. Скворцов, Т.Л. Ажикина // Биоорганическая химия. – 2012. – Т. 38, № 4. – С. 391-405.
31. Скотникова, О.И. Применение новых молекулярно-биологических технологий для выявления *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью: дис. ... д-ра. биол. наук: 03.00.07 / Скотникова Ольга Ивановна. – М. – 2008. – 215 с.
32. Скрягина, Е.М. Тестирование лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза с использованием различных методов / Е.М. Скрягина, О.М. Залуцкая, Х. Маух, Е.Н. Николенко, А. Рот // Проблемы туберкулёза и болезни лёгких. – 2001. – № 5. – С. 43-45.
33. Стерликов, С.А. Отраслевые и экономические показатели противотуберкулёзной работы в 2016 – 2017 гг. Аналитический обзор основных показателей и статистические материалы / С.А. Стерликов, О.Б. Нечаева, И.М. Сон, С.А. Попов, В.С. Бурыхин, С.Б. Пономарёв, В.В. Тестов, Л.И. Русакова, С.В. Корниенко, О.В. Струкова, Д.А. Кучерявая, О.В. Обухова, А.В. Дергачёв // под ред. С.А. Стерликова. – М.: РИО ЦНИИОИЗ. – 2018. – 81с.
34. Фрейман, Г.Е. Диагностика туберкулёза в современной централизованной микобактериологической лаборатории г. Москвы: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03, 14.02.03 / Фрейман Георгий Ефимович. – М. – 2012. – 28 с.
35. Хейфец, Л.Б. Микробиологические аспекты выявления больных туберкулёзом с лекарственной устойчивостью / Л.Б. Хейфец // Проблемы туберкулёза и болезней лёгких. – 2004. – № 5. – С. 3-6.

36. Черноусова, Л.Н. Роль ПЦР-анализа в комплексных бактериологических исследованиях во фтизиатрии / Л.Н. Черноусова, Е.Е. Ларионова, Э.В. Севастьянова // Проблемы туберкулеза. – 2001. – № 3. – С. 58-60.
37. Черноусова, Л.Н. Лекарственно-устойчивый туберкулёз: перспективы ускоренной диагностики и химиотерапии / Л.Н. Черноусова, С.Н. Андреевская, Т.Г. Смирнова, Е.Е. Ларионова, О.И. Ивахненко, Е.А. Новоселова, Н.А. Шевкун // Бактериология. – 2017. – № 1. – С. 25-34.
38. Шитиков, Е.А. Геномная вариабельность возбудителей лекарственно-устойчивого туберкулеза, распространенных на территории Российской Федерации: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.04 // Шитиков Егор Александрович. – М. – 2014. – 176 с.
39. Яковлев, В.П. Моксифлоксацин новый антимикробный препарат из группы фторхинолонов / В.П. Яковлев, С.В. Яковлев – М.: Информэлектро. – 2002. – 160 с.
40. Abuali, M. A comparison of the Sensititre® MYCOTB panel and the agar proportion method for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* / M. Abuali, R. Katariwala, V.J. LaBombardi // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 31(5). – P. 835-839.
41. Adams, K.N. Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism / K.N. Adams, K. Takaki, L.E. Connolly, H. Wiedenhoft, K. Winglee, O. Humbert, P.H. Edelstein, C.L. Cosma, L. Ramakrishnan // Cell. – 2011. – Vol. 145. – P. 39-53.
42. Ahmad, S. Frequency of *embB* codon 306 mutations in ethambutol-susceptible and -resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kuwait / S. Ahmad, A.A., Jaber, E. Mokaddas // Tuberculosis (Edinb.). – 2007. – Vol. 87. – P. 123–129.
43. Ahmad, S. Discordance across Phenotypic and Molecular Methods for Drug Susceptibility Testing of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in a Low TB Incidence Country / S. Ahmad, E. Mokaddas, N. Al-Mutairi, H.S. Eldeen, S. Mohammadi // PLoS One. – 2016. – Vol. 11(4). – e0153563.

44. Ainsa, J.A. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis* / J.A. Ainsa, M.C. Blokpoel, I. Otal, D.B. Young, K.A. De Smet, C. Martin // J. Bacteriol. – 1998. – Vol. 180. – P. 5836-5843.

45. Ajileye, A. Some Synonymous and Nonsynonymous *gyrA* Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Lead to Systematic False-Positive Fluoroquinolone Resistance Results with the Hain GenoType MTBDRsl Assays / A. Ajileye, N. Alvarez, M. Merker, T. M. Walker, S. Akteret, K. Brown, D. Moradigaravand, T. Schön, S. Andres, V. Schleusener, S.V. Omar, F. Coll, H. Huang, R. Diel, N. Ismail, J. Parkhill, B.C. de Jong, E.A. Peto Tim, D.W. Crook, S. Niemann, J. Robledo, Grace. Smith E, S.J. Peacock, C.U. Köser / Antimicrob. Agents Chemother. – 2017. – Vol. 61(4). – e02169-16.

46. Alcaide, F. Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria / F. Alcaide, G.E. Pfyffer, A. Telenti // Antimicrob. Agents Chemother. – 1997. – Vol. 41. – P. 2270-2273.

47. Alderwick, L. J. The Mycobacterial cell wall—peptidoglycan and Arabinogalactan / L. J. Alderwick, J. Harrison, G.S. Lloyd, H.L. Birch // Cold Spring Harb. Perspect. Med. – 2015. – Vol. 5(8). – a021113.

48. Andersson, D.I. The biological cost of antibiotic resistance / D.I. Andersson, B.R. Levin // Curr. Opin. Microbiol. – 1999. – Vol. 2. – P. 489-493.

49. Andersson, D.I. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? / D.I. Andersson, D. Hughes // Nat. Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 8. – P. 260-271.

50. Andres, S. Occurrence of *rpoB* mutations in isoniazid-resistant but rifampin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Germany / S. Andres, D. Hillemann, S. Rüscher-Gerdes, E. Richter // Antimicrob. Agents Chemother. – 2014. – Vol. 58. – P. 590-592.

51. Andriole, V.T. The quinolones: past, present, and future / V.T. Andriole // Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 41(2). – P. 113-119.

52. Ängeby, K.A. Challenging a dogma: antimicrobial susceptibility testing breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis* / K.A. Ängeby, P. Jureen, G. Kahlmeter, S.E. Hoffner, T. Schon // Bull. WHO. – 2012. – Vol. 90. – P. 693-698.
53. Ängeby, K.A. Wild-type MIC distributions of four fluoroquinolones active against *Mycobacterium tuberculosis* in relation to current critical concentrations and available pharmacokinetic and pharmacodynamic data / K.A. Ängeby, P. Jureen, C.G. Giske, E. Chryssanthou, E. Sturegard, M. Nordvall, A.G Johansson, J. Werngren, G. Kahlmeter, S.E Hoffner, T. Schön // J. Antimicrob. Chemother. – 2010. – Vol. 65. – P. 946-952.
54. Angra, P.K. Performance of tuberculosis drug susceptibility testing in U.S. laboratories from 1994 to 2008 / P.K. Angra, T.H. Taylor, M.F. Iademarco, B. Metchock, J.R. Astles, J.C. Ridderhof // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50. – P. 1233-1239.
55. Armand, S. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TagMan Real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens / S. Armand, P. Vanhuls, G. Delcroix, R. Courcol, N. Lemaître // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49. – P. 1772-1776.
56. Aubry, A. *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase: interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity / A. Aubry, X.S. Pan, L.M. Fisher, V. Jarlier, E. Cambau // Antimicrob. Agents Chemother. – 2004. – Vol. 48. – P. 1281-1288.
57. Aubry, A. Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and-hypersusceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of mutant enzymes / A. Aubry, N. Veziris, E. Cambau, C. Truffot-Pernot, V. Jarlier, L.M. Fisher // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – Vol. 50. – P. 104-112.
58. Balabanova, Y. An integrated approach to rapid diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance using liquid culture and molecular methods in Russia / Y. Balabanova, F. Drobniewski, V. Nikolayevsky, A. Kruuner, N. Malomanova, T. Simak, N. Ilyina, S. Zakharova, N. Lebedeva, H.L. Alexander, R. O'Brien, H. Sohn, A. Shakhmistova, I. Fedorin // PLoS One. – 2009. – Vol. 4(9) – e7129.

59. Baldeviano-Vidalón, G.C. Multiple infection with resistant and sensitive *M. tuberculosis* strains during treatment of pulmonary tuberculosis patients / G.C. Baldeviano-Vidalón, N. Quispe-Torres, C. Bonilla-Asalde, D. Gastiaburú-Rodríguez, J.E. Pro-Cuba, F. Llanos-Zavalaga // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2005. – Vol. 9(10). – P. 1155-1160.
60. BakuBa, Z. Mutations in the *embB* Gene and Their Association with Ethambutol Resistance in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Poland / Z. BakuBa, A. Napiórkowska, J. Bielecki, E. Augustynowicz-Kopeć, Z. Zwolska, T. Jagielski // *BioMed Res. Int.* – 2013. – doi: 10.1155/2013/167954.
61. Banu, S. Discordance across Several Methods for Drug Susceptibility Testing of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in a Single Laboratory / S. Banu, M.M Rahman, M. Khan, S. Ferdous, S. Ahmed, J. Gratz, S. Stroup, S. Pholwat, S.K. Heysell, E.R. Houptb // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 52(1). – P. 156-163.
62. Barnard, F.M. Interaction between DNA gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser83 and Asp87 / F.M. Barnard, A. Maxwell // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – Vol. 45. – P. 1994-2000.
63. Bauskenieks, M. Genotypic and phenotypic characteristics of aminoglycoside-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Latvia / I. Pole, G. Skenders, I. Jansone, L. Broka, A. Nodieva, I. Ozere, A. Kalvisa, R. Ranka, V. Baumanis // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 81(3). – P. 177-182.
64. Bemer, P. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* / P. Bemer, F.R. Palicova, S. Rüsç-Gerdes, H.B. Drugeon, G.E. Pfyffer // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – Vol. 40. – P. 150-154.
65. Bernard, C. In vivo *Mycobacterium tuberculosis* fluoroquinolone resistance emergence: a complex phenomenon poorly detected by current diagnostic tests / C. Bernard, A. Aubry, A. Chauffour, F. Brossier, J. Robert, N. Veziris // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2016. – Vol. 71. – P. 3465-3472.

66. Bhatt, A. Conditional depletion of KasA, a key enzyme of mycolic acid biosynthesis, leads to mycobacterial cell lysis / A. Bhatt, L. Kremer, A.Z. Dai, J. C. Sacchettini, W. R. Jacobs // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187. – P. 7596-7606.
67. Blair, J.M. Molecular mechanisms of antibiotic resistance / J.M. Blair, M.A. Webber, A.J. Baylay, D.O. Ogbolu, L.J. Piddock // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2015. – Vol. 13. – P. 42-51.
68. Blakemore, R. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay / R. Blakemore, E. Story, D. Helb, J. Kop, P. Banada, M.R. Owens, S. Chakravorty, M. Jones, D. Alland // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48(7). – P. 2495-2501.
69. Bloemberg, G.V. Acquired resistance to bedaquiline and delamanid in therapy for tuberculosis / G.V. Bloemberg, P.M. Keller, D. Stucki, D. Stuckia, A. Trauner, S. Borrell, T. Latshang, M. Coscolla, T. Rothe, R. Hömke, C. Ritter, J. Feldmann, B. Schulthess, S. Gagneux, E.C. Böttger // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol. 373. – P. 1986-1988.
70. Bobadilla-del-Valle, M. *rpoB* Gene mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* identified by polymerase chain reaction single-stranded conformational polymorphism / M. Bobadilla-del-Valle, A. Ponce-de-Leon, C. Arenas-Huertero, G. Vargas-Alarcon, M. Kato-Maeda, P.M. Small, P. Couary, G.M. Ruiz-Palacios, J. Sifuentes-Osornio // *Emerg. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 7 (6). – P. 1010-1013.
71. Boehme, C.C. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance / C.C. Boehme, P. Nabeta, D. Hillemann, M.P. Nicol, S. Shenai, F. Krapp, J. Allen, R. Tahirli, R. Blakemore, R. Rustomjee, A. Milovic, M. Jones, S.M. O'Brien, D.H. Persing, S. Rüesch-Gerdes, E. Gotuzzo, C. Rodrigues, D. Alland, M.D. Perkins // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – Vol. 363. – P. 1005-1015.
72. Boeree, M.J. A dose-ranging trial to optimize the dose of rifampin in the treatment of tuberculosis / M.J. Boeree, A.H. Diacon, R. Dawson, K. Narunsky, J. du Bois, A. Venter, P. P. J. Phillips, S.H. Gillespie, T.D. McHugh, M. Hoelscher, N. Heinrich, S. Rehal, D. van Soolingen, J. van Ingen, C. Magis-Escurra, D. Burger, G.

Plempers van Balen, R.E Aarnoutse // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2015. – Vol. 191. – P. 1058-1065.

73. Borrell, S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* / S. Borrell, S. Gagneux // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2009. – Vol. 13. – P. 1456-1466.

74. Borrell, S. Epistasis between antibiotic resistance mutations drives the evolution of extensively drug-resistant tuberculosis / S. Borrell, Y. Teo, F. Giardina, E.M Streicher, M. Klopper, J. Feldmann, B. Müller, T.C Victor, S. Gagneux // *Evol. Med. Public Health.* – 2013. – Vol. 1. – P. 65-74.

75. Böttger, E.C. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection* / E.C. Böttger // *Clin. Microb. Infect.* – 2011. – Vol. 17. – P. 1128-1134

76. Brandis, G. Genetic characterization of compensatory evolution in strains carrying *rpoB* Ser531Leu, the rifampicin resistance mutation most frequently found in clinical isolates / G. Brandis, D. Hughes // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2013. – Vol. 68. – P. 2493-2497.

77. British, Thoracic and Tuberculosis Association. Short-course chemotherapy in pulmonary tuberculosis. A controlled trial by the British Thoracic and Tuberculosis Association // *Lancet.* – 1975. – Vol. 18. – P. 119-124.

78. Brossier, F. Performance of the genotype MTBDR line probe assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of *Mycobacterium tuberculosis* with low- and high-level resistance / F. Brossier, N. Veziris, C. Truffot-Pernot, V. Jarlier, W. Sougakoff // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44(10). – P.3659-3664.

79. Brossier, F. Performance of the new version (v2.0) of the GenoType MTBDRsl test for detection of resistance to second-line drugs in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex strains / F. Brossier, D. Guindo, A. Pham, F. Reibel, W. Sougakoff, N. Veziris, A. Aubry // *J. Clin. Microbiol.* – 2016. – Vol. 54. – P. 1573-1580.

80. Brossier, F. Molecular Investigation of Resistance to Second-Line Injectable Drugs in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in France / F. Brossier, A. Pham, C. Bernard, A. Aubry, V. Jarlier, N. Veziris, W. Sougakoff // *Antimicrob. Agents and Chemother.* – 2017. – Vol. 61(2). – e01299-16.
81. Brossier, F. Detection by GenoType MTBDRsl Test of Complex Mechanisms of Resistance to Second-Line Drugs and Ethambutol in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates / N. Veziris, A. Aubry, V. Jarlier, W. Sougakoff // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48(5). – P. 1683-1689.
82. Brossier, F. Molecular detection methods of resistance to antituberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis* / F. Brossier, W. Sougakoff // *Med. Mal. Infect.* – 2017. – Vol. 47(5). – P. 340-348.
83. Burian, J. The mycobacterial transcriptional regulator *whiB7* gene links redox homeostasis and intrinsic antibiotic resistance / J. Burian, S. Ramón-García, G. Sweet, A. Gómez-Velasco, Y. Av-Gay, C. J. Thompson // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287. – P. 299-310.
84. Buriankova, K. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the *Mycobacterium tuberculosis complex* / K. Buriankova, F. Doucet-Populaire, O. Dorson, A. Gondran, J.C. Ghnassia, J. Weiser, J-L. Pernodet // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48. – P. 143-150
85. Cabibbe, A.M. Lab-on-Chip-Based Platform for Fast Molecular Diagnosis of Multidrug-Resistant Tuberculosis / A.M. Cabibbe, P. Miotto, R. Moure, F. Alcaide, S. Feuerriegel, G. Pozzi, V. Nikolayevskyy, F. Drobniowski, S. Niemann, K. Reither, D.M. Cirillo // *J. Clin. Microbiol.* – 2015. – Vol. 53(12). – P. 3876-3880.
86. Cambau, E. Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European multicentre study / E. Cambau, M. Viveiros, D. Machado, L. Raskine, C. Ritter, E. Tortoli, V. Matthys S. Hoffner E. Richter, M.L Perez Del Molino, D.M Cirill, D. van Soolingen, E.C Böttger // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2015. – Vol. 70. – P. 686-96.

87. Caminero, J. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis / J. Caminero, G. Sotgiu, A. Zumla, G.B. Migliori // *Lancet Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 10(9). – P. 621-629.
88. Campbell, E.A. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase / E.A. Campbell, N. Korzheva, A. Mustaev, K. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb, S.A Darst // *Cell.* – 2001. – Vol. 104(6). – P. 901-912.
89. Campbell, P.J. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* / P.J. Campbell, G.P. Morlock, R.D. Sikes, T.L. Dalton, B. Metchock, A.M. Starks, D.P. Hooks, L.S. Cowan, B.B. Plikaytis, J.E. Posey // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – Vol. 55. – P. 2032-2041.
90. Camus, J.C. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv / J.C. Camus, M.J. Pryor, C. Médigue, S.T. Cole // *Microbiology.* – 2002. – Vol. 148(Pt10). – P. 2967-2973.
91. Canetti, G. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes / G. Canetti, W. Fox, A. Khomenko, H.T. Mahler, N.K. Menon, D.A. Mitchison, N. Rist, N.A. Smelev // *Bull. WHO.* – 1969. – Vol. 41(1). – P. 21-43.
92. Canetti, G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis / G. Canetti // *Am. Rev. Respir. Dis.* – 1965. – Vol. 92. – P. 687-703.
93. Canetti, G. Mycobacteria: Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance / G. Canetti, S. Froman S, J. Grosset J, P. Hauduroy, M. Langerova, H.T. Mahler, G. Meissner, D.A. Mitchison, L. Sula. // *Bull. WHO.* – 1963. – Vol. 29(5). – P.565-578.
94. Casali, N. Evolution and transmission of drug resistant tuberculosis in a Russian population / N. Casali, V. Nikolayevskyy, Y. Balabanova, S.R. Harris, O. Ignatyeva, I. Kontsevaya, J. Corander, J. Bryant, J. Parkhill, S. Nejentsev, R.D. Horstmann, T. Brown, F. Drobniowski // *Nat. Genet.* – 2014. – Vol. 46. – P. 279-286.

95. Centers for Disease Control and Prevention. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs-worldwide, 2000-2004 / CDC // MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. – 2006. – Vol. 55(11). – P.301-305.
96. Chambers, H.F. Imipenem for treatment of tuberculosis in mice and humans / H.F. Chambers, J. Turner, G.F. Schecter, M. Kawamura, P.C. Hopewell // Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49. – P. 2816-2821.
97. Chakravorty, S. Genotypic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates for amikacin and kanamycin resistance by use of a rapid sloppy molecular beacon-based assay identifies more cases of low-level drug resistance than phenotypic Lowenstein-Jensen testing / S. Chakravorty, J.S. Lee, E.J. Cho, S.S. Roh, L.E. Smith, J. Lee, C.T. Kim, L.E. Via, S.N. Cho, C.E. Barry, D. Alland // J. Clin. Microbiol. – 2015. – Vol. 53(1). – P.43-51.
98. Chao, M.C. Letting sleeping dos lie: does dormancy play a role in tuberculosis? / M.C. Chao, E.J. Rubin // Annu. Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 64. – P. 293-311.
99. Chen, J.M. Lsr2 of *Mycobacterium tuberculosis* is a DNA-bridging protein / J.M. Chen, H. Ren, J.E. Shaw, Y.J. Wang, M. Li, A.S. Leung, V. Tran, N.M. Berbenetz, D. Kocíncová, C.M. Yip, J-M Reyrat, J. Liu // Nucleic. Acids Res. – 2008. – Vol. 36. – P. 2123-2135.
100. Cheng, A.F. Multiplex PCR amplimer conformation analysis for rapid detection of *gyrA* mutations in fluoroquinoloneresistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates / A.F. Cheng, W.Y. Yew, E.W. Chan, M. L. Chin, M.M. Hui, R.C. Chan // Antimicrob. Agents Chemother. – 2004. – Vol. 48(2). – P. 596-601.
101. Cheng, S. Diagnostic accuracy of a molecular drug susceptibility testing method for the antituberculosis drug ethambutol: a systematic review and meta-analysis / S. Cheng, Z. Cui, Y. Li, Z. Hu // J. Clin. Microbiol. – 2014. – Vol. 52. – P. 2913-2924.
102. Chernyaeva, E. Characterization of multiple and extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with different ofloxacin-resistance levels / E.

Chernyaeva, E. Fedorova, G. Zhemkova, Y. Korneev, A. Kozlov // *Tuberculosis*. – 2013. – Vol. 93(3). – P. 291-295.

103. Chien, J.Y. Mutations in *gyrA* and *gyrB* among fluoroquinolone- and multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates / J.Y. Chien, W.Y. Chiu, S.T. Chien, C.J. Chiang, C.J. Yu, P.R. Hsueh // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2016. – Vol. 60. – P. 2090-2096.

104. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved standard second edition. CLSI document M24-A2. CLSI: Wayne, PA., 2011. – 61 p.

105. Coeck, N. Correlation of different phenotypic drug susceptibility testing methods for four fluoroquinolones in *Mycobacterium tuberculosis* / N. Coeck, B.C. Jong, M. Diels, P. Rijk, E. Ardizzoni, A. Deun, L. Rigouts // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2016. – Vol. 71(5). – P. 1233-1240.

106. Cohn, D. Drug-resistant tuberculosis: review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD global surveillance project / D. Cohn, F. Bustreo, M. Raviglione // *J. Clin. Infect. Dis.* – 1997. – Vol.24. – P. 121-130.

107. Cohen, K.A. Molecular basis of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / K.A. Cohen, R.W. Bishai, A.S. Pym // *Microbiol. Spectr.* – 2014. – Vol. 2(3). – doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0036-2013.

108. Cohen, K.A. Paradoxical hypersusceptibility of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* to β -lactam antibiotics / K.A. Cohen, T. El-Hay, K.L. Wyres, O. Weissbrod, V. Munsamy, C. Yanover, R. Aharonov, O. Shaham, T.C. Conway, Y. Goldschmidt, W.R. Bishai, A.S. Pym // *EBioMedicine*. – 2016. – Vol. 9. – P. 170-179.

109. Colangeli, R. The *Mycobacterium tuberculosis iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol / R. Colangeli, D. Helb, S. Sridharan, J. Sun, M. Varma-Basil, M. H. Hazbón, R. Harbacheuski, N.J. Megjugorac, W.R. Jacobs Jr, A. Holzenburg, J.C. Sacchettini, D. Alland // *Mol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 55. – P. 1829-1840.

110. Colangeli, R. Transcriptional regulation of multidrug tolerance and antibiotic-induced responses by the histone-like protein Lsr2 in *M. tuberculosis* / R. Colangeli, D. Helb, C. Vilcheze, M.H. Hazbon, C.G. Lee, C.G. Lee, H. Safi, B. Sayers, I. Sardone, M.B. Jones, R.D. Fleischmann, S.N. Peterson, W.R. Jacobs Jr, D. Alland // PLoS Pathog. – 2007. – Vol. 3(6). – e87.

111. Cole, S.T. Tuberculosis and tubercle bacillus / S.T. Cole, K.D. Eisenach, D. McMurray, W.R. Jacobs // ASM Press. Washington, DS, 2005. – 585p.

112. Colman, R.E. Rapid drug susceptibility testing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates directly from clinical samples by use of amplicon sequencing: a proof-of-concept study / R.E. Colman, J. Anderson, D. Lemmer, E. Lehmkuhl, S.B. Georghiou, H. Heaton, K. Wiggins, J.D. Gillece, J.M. Schupp, D.G. Catanzaro, V. Crudu, T. Cohen, T.C. Rodwell, D.M. Engelthaler // J. Clin. Microbiol. – 2016. – Vol. 54. – P.2058-2067.

113. Comas, I. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes / I. Comas, S. Borrell, A. Roetzer, G. Rose, B. Malla, M. Kato-Maeda, J. Galagan, S. Niemann, S. Gagneux // Nat. Genet. – 2011. – Vol. 44(1). – P. 106-110.

114. Crofton, J. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis / J. Crofton, D.A. Mitchison // Br. Med. J. – 1948. – Vol. 2(4588). – P. 1009-1015.

115. Cui, Z. Association of mutation patterns in *gyrA/B* genes and ofloxacin resistance levels in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from East China in 2009 / Z. Cui, J. Wang, J. Lu, X. Huang, Z. Hu // BMC Infect. Dis. – 2011. – Vol. 78. – P. 1-5.

116. Da Silva, P.E.A. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / P.E.A. Da Silva, A. von Groll, A. Martin, J.C. Palomino // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2011. – Vol. 63. – P. 1-9.

117. Da Silva, P.E.A. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs / P.E.A. Da Silva, J.C. Palomino // J. Antimicrob. Chemother. – 2011. – Vol. 66. – P. 1417-1430.

118. Danilchanka, O. Role of porins for uptake of antibiotics by *Mycobacterium smegmatis* / O. Danilchanka, M. Pavlenok, M. Niederweis // Antimicrob. Agents Chemother. – 2008. – Vol. 52(9). – P. 3127-3134.

119. Daum, L.T. Next-generation ion torrent sequencing of drug resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains / L. T. Daum, J.D. Rodriguez, S.A. Worthy, N.A. Ismail, S.V. Omar, A.W. Dreyer, P.B. Fourie, A.A. Hoosen, J.P. Chambers, G.W. Fischer // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50. – P. 3831-3837.

120. De Lorenzo, S. Efficacy and safety of meropenem-clavulanate added to linezolid-containing regimens in the treatment of MDR-/XDR-TB / S. De Lorenzo, J.W. Alffenaar, G. Sotgiu, R. Centis, L. D'Ambrosio, S. Tiberi, M.S. Bolhuis, R. van Altena, P. Viggiani, A. Piana, A. Spanevello, G.B. Migliori // Eur. Respir. J. – 2013. – Vol. 41. – P.1386-1392.

121. de Vos, M. Putative compensatory mutations in the *rpoC* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* are associated with ongoing transmission / M. de Vos, B. Muller, S. Borrell, P.A. Black, P.D. van Helden, R.M. Warren, S. Gagneux, T.C. Victor // Antimicrob. Agents Chemother. – 2013. – Vol. 57. – P. 827-832.

122. Denkinger, C.M. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis / C.M. Denkinger, S.G. Schumacher, C.C. Boehme, N. Dendukuri, M. Pai, K.R. Steingart // Eur. Respir. J. – 2014. – Vol. 44. – P. 435-446.

123. Devasia, R. High proportion of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with novel gyrase polymorphisms and a *gyrA* region associated with fluoroquinolone susceptibility / R. Devasia, A. Blackman, S. Eden, H. Li, F. Maruri, A. Shintani, C. Alexander, A. Kaiga, C. Stratton, J. Warkentin, Y. Tang, T. Sterling // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50(4). – P. 1390-1396.

124. Dominguez, J. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement / J. Dominguez, E.C. Boettger, D. Cirillo, F. Cobelens, K.D. Eisenach, S. Gagneux, D.

Hillemann, R. Horsburgh, B. Molina-Moya, S. Niemann, E. Tortoli, A. Whitelaw, C. Lange // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2016. – Vol. 20. – P. 24-42.

125. Dong, Y. Fluoroquinolone action against mycobacteria: effects of C-8 substituents on growth, survival, and resistance / Y. Dong, C. Xu, X. Zhao, J. Domagala, K. Drlica // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 1998. – Vol. 42(11). – P. 2978-2984.

126. Dookie, N. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care / N. Dookie, S. Rambaran, N. Padayatchi, S. Mahomed, K. Naidoo // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2018. – Vol. 73(5). – P. 1138-1151.

127. Drobniowski, F. Drug-Resistant Tuberculosis, Clinical Virulence, and the Dominance of the Beijing Strain Family in Russia / F. Drobniowski, Y. Balabanova, V. Nikolayevsky, M. Ruddy, S. Kuznetsov, S. Zakharova, A. Melentyev, I. Fedorin // *JAMA.* – 2005. – Vol. 293(22). – P. 2726-2731.

128. Du, Q. *Mycobacterium tuberculosis rrs* A1401G mutation correlates with high-level resistance to kanamycin, amikacin, and capreomycin in clinical isolates from mainland China / Q. Du, G. Dai, Q. Long, X. Yu, L. Dong, H. Huang, J. Xie // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 77(2) – P.138-142.

129. Engström, A. Comparison of clinical isolates and in vitro selected mutants reveals that *tlyA* is not a sensitive genetic marker for capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / A. Engström, N. Perskvist, J. Werngren, S.E. Hoffner, P. Jurgen // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2011. – Vol. 66(6). – P. 1247-1254.

130. Engström, A. Detection of first- and second-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates by pyrosequencing / A. Engström, N. Morcillo, B. Imperiale, S.E. Hoffner, P. Juréen // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol. 50(6). – P. 2026-2033.

131. EUCAST Standard Operating Procedure 10.1. MIC distributions and the setting of epidemiological cut-off (ECOFF) values [Электронный ресурс]. – 2019. –

Режим

доступа:

https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_SOPs/EU

CAST_SOP_10.1_MIC_distributions_and_epidemiological_cut-off_value_ECOFF__setting_20191130.pdf

132. Fenner, L. Effect of mutation and genetic background on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / L. Fenner, M. Egger, T. Bodmer, E. Altpeter, M. Zwahlen, K. Jatun, G.E. Pfyffer, S. Borrell, O. Dubuis, T. Bruderer, H.H. Siegrist, H. Furrer, A. Calmy, J. Fehr, J.M. Stalder, B. Ninet, E.C. Böttger, S. Gagneux // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2012. – Vol. 56. – P. 3047-3053.

133. Ferber, D. Biochemistry. Protein that mimics DNA helps tuberculosis bacteria resist antibiotics / D. Ferber // *Science.* – 2005. – Vol. 308(5727). – 1480 p.

134. Feuerriegel, S. Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment / S. Feuerriegel, H.S. Cox, N. Zarkua, H.A. Karimovich, K. Braker, S. Rüsç-Gerdes, S. Niemann // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53(8). – P. 3353-3356.

135. Fillion, A. Impact of fluoroquinolone resistance on bactericidal and sterilizing activity of a moxifloxacin-containing regimen in murine tuberculosis / A. Fillion, A. Aubry, F. Brossier, A. Chauffour, V. Jarlier, N. Veziris // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57(9). – P. 4496-4500.

136. Flores, A.R. Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics / A.R. Flores, L.M. Parsons, M.S. Pavelka, Jr // *Microbiology.* – 2005. – Vol. 151. – P. 521-532.

137. Foongladda, S. Comparison of TaqMan((R)) Array Card and MYCOTB(TM) with conventional phenotypic susceptibility testing in MDR-TB / S. Foongladda, S. Banu, S. Pholwat, J. Gratz, S. O-Thong, N. Nakkerd., R. Chinli, S.S. Ferdous, S.M. Rahman, A. Rahman, S. Ahmed, S. Heysell, M. Sariko, G. Kibiki, E. Houpt // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2016. – Vol. 20(8). – P. 1105-1112.

138. Fourmy, D. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic / D. Fourmy, M.I. Recht, S.C. Blanchard, J.D. Puglisi // *Science.* – 1996. – Vol. 274(5291). – P. 1367-1371.

139. Gagneux, S. Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* / S. Gagneux, M.V. Burgos, K. DeRiemer, A. Encisco, S. Muñoz, P.C. Hopewell, P.M. Small, A.S. Pym // PLoS Pathol. – 2006. – Vol. 2(6): – e61.

140. Gagneux, S. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / S. Gagneux, C.D. Long, P.M. Small, T. Van, G.K. Schoolnik, B.J. Bohannan // Science. – 2006. – Vol. 312. – P. 1944-1946.

141. Gagneux, S. Fitness cost of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // S. Gagneux // Clin. Microbiol. Infect. – 2009. – Vol. 15. – P. 66-68.

142. Gandhi, N.R. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis / P. Nunn, K. Dheda, H.S. Schaaf, M. Zignol, D. van Soolingen, P. Jensen, J. Bayona // Lancet. – 2010. – Vol. 375. – P. 1830-1843.

143. Gangadharam, P.R. The effects of exposure time, drug concentration and temperature on the activity of ethambutol versus *Mycobacterium tuberculosis* / P.R. Gangadharam, F.P. Pratt, V.K. Perumal, M.D. Iseman // Am. Rev. Respir. Dis. – 1990. – Vol. 141. – P. 1478-1482.

144. García de Viedma, D. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches / D. García de Viedma // Clin. Microbiol. Infect. – 2003. – Vol. 9. – P. 349-359.

145. Garton, N.J. Cytological and transcript analyses reveal fat and lazy persistor-like bacilli in tuberculous sputum / N.J. Garton, S.J. Waddell, A.L. Sherratt, S.M. Lee, R.J. Smith, C. Senner, J. Hinds, K. Rajakumar, R.A. Adegbola, G.S. Besra, P.D. Butcher, M.R. Barer // PLoS Med. – 2008. – Vol. 5. – e75.

146. Gengenbacher, M. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy / M. Gengenbacher, S.H. Kaufmann // FEMS Microbiol. Rev. – 2012. – Vol. 36. – P. 514-532.

147. Georghiou, S.B. Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a

systematic review / S.B. Georghiou, M. Magana, R.S. Garfein, D.G. Catanzaro, A. Catanzaro, T.C. Rodwell // PLoS One. – 2012. – Vol. 7(3). – e33275.

148. Gillespie, S.H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective / S.H. Gillespie // Antimicrob. Agents Chemother. – 2002. – Vol. 46. – P. 267-274.

149. Ginsburg, A. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance / A. Ginsburg, J. Grosset, W. Bishai // Lancet Infect. dis. – 2003. – Vol. 3. – P. 432-442.

150. Gomez, J.E.M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance / J.E.M. Gomez, J.D. McKinney // Tuberculosis. – 2004. – Vol. 84. – P. 29-44.

151. Gong, L.I. Stability-mediated epistasis constrains the evolution of an influenza protein / L.I. Gong, M.A. Suchard, J.D. Bloom // Elife. – 2013. – Vol. 2. – e00631-1.

152. Griffith, M.E. Stability of antimycobacterial drugs in susceptibility testing / M.E. Griffith, H.L. Bodily // Antimicrob. Agents Chemother. – 1992. – Vol. 36(11). – P. 2398-2402.

153. Gryadunov, D. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* / D. Gryadunov, V. Mikhailovich, S. Lapa, N. Roudinskii, M. Donnikov, S. Pan'kov, O. Markova, A. Kuz'min, L. Chernousova, O. Skotnikova, A. Moroz, A. Zasedatelev, A. Mirzabekov // Clin. Microbiol. Infect. – 2005. – Vol. 11. – P. 531-539.

154. Gryadunov, D.A. The EIMB hydrogel microarray technology: Thirty Years Later / D.A. Gryadunov, B.L. Shaskolskiy, T.V. Nasedkina, A.Yu. Rubina, A.S. Zasedatelev // Reviews. Acta Naturae. – 2018. – Vol. 10(4). – P. 4-18.

155. Gupta, A.K. Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common antituberculous drugs / A.K. Gupta, V.M. Katoch, D.S. Chauhan, R. Sharma, M. Singh, K. Venkatesan, V.D. Sharma // Microb. Drug Resist. – 2010. – Vol. 16. – P. 21-28.

156. Gupta, A.K. *jefA* (Rv2459), a drug efflux gene in *Mycobacterium tuberculosis* confers resistance to isoniazid & ethambutol / A.K. Gupta, V.P. Reddy, M.

Lavania, D. Chauhan, K. Venkatesan, V. Sharma, A.K. Tyagi, V.M. Katoch // Indian J. Med. Res. – 2010. – Vol. 132. – P. 176-188.

157. Gygli, S.M. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives / S.M. Gygli, S. Borrell, A. Trauner, S. Gagneux // FEMS Microbiol. Rev. – 2017. – Vol. 41(3). –P. 354-373.

158. Hall, L. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex for first and second line drugs by broth dilution in a microtitre plate format / L. Hall, K.P. Jude, S.L. Clark, N.L. Wengenack // J. Vis. Exp. – 2011. – Vol. 52. – doi: 10.3791/3094.

159. Hall, L. Evaluation of the Sensititre MycoTB Plate for Susceptibility Testing of the *Mycobacterium tuberculosis* complex against First- and Second-Line Agents / L. Hall, K.P. Jude, S.L. Clark, K. Dionne, R. Merson, A. Boyer, N.M. Parrish, N.L. Wengenack // J.Clin.Microbiol. – 2012. – Vol. 50(11). – P. 3732-3734.

160. Haydel, S.E. Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: A Sign of the Times and an Impetus for Antimicrobial Discovery // Pharmaceuticals. – 2010. – Vol. 3. – P. 2268-2290.

161. Hazbón, M.H. Role of *embB* codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance / M.H. Hazbón, M. Bobadilla del Valle, M.I. Guerrero, M. Varma-Basil, I. Filliol, M. Cavatore, R. Colangeli, H. Safi, H. Billman-Jacobe, C. Lavender, J. Fyfe, L. García-García, A. Davidow, M. Brimacombe, C.I. León, T. Porras, M. Bose, F. Chaves, K.D. Eisenach, J. Sifuentes-Osornio, A. Ponce de León, M.D. Cave, D. Alland // Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49(9). – P. 3794-3802.

162. He, L. *ubiA* (*Rv3806c*) encoding DPPR synthase involved in cell wall synthesis is associated with ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / L. He, X. Wang, P. Cui, J. Jin, J. Chen, W. Zhang, Y. Zhang // Tuberculosis (Edinb.). – 2015. – Vol. 95. – P. 149-154.

163. Hegde, S.S. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA / S.S. Hegde, M.W. Vetting, S.L. Roderick, L.A.

Mitchenall, A. Maxwell, H.E. Takiff, J.S. Blanchard // *Science*. – 2005. – Vol. 308 (5727). – P. 1480-1483.

164. Heifets, L. Drug susceptibility testing in mycobacteriology / L. Heifets // *Clin. Lab. Med.* – 1996. – Vol. 16. – P. 641-656.

165. Heifets, L.B. Ethambutol MICs and MBCs for *Mycobacterium avium complex* and *Mycobacterium tuberculosis* / L.B. Heifets, M.D. Iseman, P.J. Lindholm-Levy // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1986. – Vol. 30(6). – P. 927-932.

166. Heysell, S.K. Sensititre MycoTB plate compared to Bactec MGIT 960 for first- and second-line antituberculosis drug susceptibility testing in Tanzania: a call to operationalize MICs / S.K. Heysell, S. Pholwat, S.G. Mpagama, S.J. Pazia, H. Kumburu, N. Ndusilo, J. Gratz, E.R. Houpt, G.S. Kibiki // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2015. – Vol. 59(11). – P. 7104-7108.

167. Hillemann, D. Use of the BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 Automated system for recovery of Mycobacteria from 9 558 extrapulmonary specimens, including urine samples / D. Hillemann, E. Richter, S. Rüscher-Gerdes // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44(11). – P. 4014-4017.

168. Hillemann, D. Feasibility of the Geno Type® MTBDRsl Assay for fluoroquinolone, amikacin/capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and in clinical specimens / D. Hillemann, S. Rüscher-Gerdes, E. Richter // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – Vol. 47. – P. 1767-1772.

169. Hofmann-Thiel, S. How should discordance between molecular and growth-based assays for rifampicin resistance be investigated? / S. Hofmann-Thiel, H. Hoffmann, D. Hillemann, L. Rigouts, A. Van Deun, K. Kranzer // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2017. – Vol. 21(7). – P. 721-726.

170. Huang, W.L. Rapid and accurate detection of rifampin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using an oligonucleotide array / W.L. Huang, Z.J. Hsu, Z. T.C. Chang, R. Jou // *Clin. Microbiol. Inf.* – 2014. – Vol. 20(9). – P. 542-549.

171. Huang, T-S. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460TB Systems for Detection of mycobacteria in Clinical Specimens / T-S. Huang, C.S. Chen,

S.S. Lee, W.K. Huang, Y.C. Liu // *Ann. Clin. Lab. Sci.* – 2001. – Vol. 31(3). – P. 279-283.

172. Hugonnet, J-E. Irreversible inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase by clavulanate / J-E. Hugonnet, J.S. Blanchard // *Biochemistry.* – 2007. – Vol. 46. – P. 11998-12004.

173. Isola, D. A Pyrosequencing assay for rapid recognition of SNPs in *Mycobacterium tuberculosis embB* 306 region / D. Isola, M. Pardini, F. Varaine, S. Niemann, S. Rüscher-Gerdes, L. Fattorini, G. Orefici, F. Meacci, C. Trappetti, M. Rinaldo Oggioni, G. Orrù // *J. Microbiol. Methods.* – 2005. – Vol. 62(1). – P. 113-120.

174. Jackson, M. Progress in targeting cell envelope biogenesis in *Mycobacterium tuberculosis* / M. Jackson, M. R. McNeil, P. J. Brennan // *Future Microbiol.* – 2013. – Vol. 8(7). – P. 855-875.

175. Jagielski, T. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates / T. Jagielski, Z. Bakula, K. Roeske, M. Kamiński, A. Napiórkowska, E. Augustynowicz-Kopec, Z. Zwolska, J. Bielecki // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2014. – Vol. 69. – P. 2369-2375.

176. Jamieson, F.B. Profiling of *rpoB* mutations and MICs for rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis* / F.B. Jamieson, J.L. Guthrie, A. Neemuchwala, O. Lastovetska, R.G. Melano, C. Mehaffy // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 52. – P. 2157-2162.

177. Janardhan, S. Modeling the permeability of drug-like molecules through the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*: an analogue based approach / S. Janardhan, M. Ram Vivek, G. Narahari Sastry // *Mol. BioSyst.* – 2016. – Vol. 12. – P. 3377-3384.

178. Jankute, M. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall / M. Jankute, J. A. Cox, J. Harrison, G.S. Besra // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2013. – Vol. 69. – P. 405-423.

179. Jeong, D.H. Successful Treatment with a High-dose Rifampin-containing regimen for Pulmonary Tuberculosis with a Disputed *rpoB* Mutation / D.H. Jeong, Y.W. Kang, J.Y. Kim, J.S. Han, K-W. Jo, T. Shim // *Intern. Med.* – 2018. – Vol. 57(22). – P. 3281-3284.

180. Jnawali, H.N. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to aminoglycosides and cyclic peptide capreomycin antibiotics in Korea / H.N. Jnawali, H. Yoo S. Ryoo, K.J. Lee, B.J. Kim, W.J. Koh, C.K. Kim, H.J. Kim, Y.K. Park // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – Vol. 29(6). – P.975-982.
181. Johansen, S.K. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using *tlyA*-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs / S.K. Johansen, C.E. Maus, B.B. Plikaytis, S. Douthwaite // Molecular cell. – 2006. – Vol. 23(2). – P. 173-182.
182. Johnson, R. Ethambutol resistance testing by mutation detection / R. Johnson, A.M. Jordaan, L. Pretorius, E. Engelke, G. van der Spuy, C. Kewley, M. Bosman, P.D. van Helden, R. Warren, T.C. Victor // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2006. – Vol. 10(1). – P.68-73.
183. Joob, B. Diagnostic performance of GenoType(R) MTBDRplus line probe assay / B. Joob, V. Wiwanitkit // Int. J. Mycobacteriology. – 2017. – Vol. 6(3). – P. 322.
184. Kahlmeter, G. The 2014 Garrod Lecture: EUCAST - are we heading towards international agreement? / G. Kahlmeter // J. Antimicrob. Chemother. – 2015. – Vol. 70. – P. 2427-2439.
185. Kam, K. Stepwise decrease in Moxifloxacin susceptibility amongst clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: correlation with Ofloxacin susceptibility / K. Kam, C. Yip, T. Cheung, H. Tang, O. Leung, M. Chan // Microb. Drug Resist. – 2006. – Vol. 12(1). – P. 7-11.
186. Kambli, P. Defining multidrug-resistant tuberculosis: correlating GenoType MTBDRplus assay results with minimum inhibitory concentrations / K. Ajbani, M. Sadani, C. Nikam, A. Shetty, Z. Udawadia, S.B. Georghiou, T.C. Rodwell, A. Catanzaro, C. Rodrigues // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2015. – Vol. 82(1). – P. 49-53.
187. Kambli, P. Correlating Minimum Inhibitory Concentrations of ofloxacin and moxifloxacin with *gyrA* mutations using the Genotype MTBDRsl Assay / P. Kambli, K. Ajbani, M. Sadani, C. Nikam, A. Shetty, Z. Udawadia, T.C. Rodwell, A. Catanzaro, C. Rodrigues // Tuberculosis (Edinb). – 2015. – Vol. 95(2). – P. 137-141.

188. Kambli, P. Correlating *rrs* and *eis* promoter mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with phenotypic susceptibility levels to the second-line injectables / P. Kambli, K. Ajbani, C. Nikam, M. Sadani, A. Shetty, Z. Udwardia, S.B. Georghiou, T.C. Rodwell, A. Catanzaro, C. Rodrigues // *Int. J. Mycobacteriol.* – 2016. – Vol. 5(1). – P. 1-6.
189. Kent, T.K. Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory / T.K. Kent, G.P. Kubica // CDC, Atlanta. – 1985. – 150p.
190. Kiepiela, P. Genomic mutations in the *katG*, *inhA* and *aphC* genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kwazulu Natal, South Africa / P. Kiepiela, K.S. Bishop, A.N. Smith, L. Roux, D.F. York // *Tuber. Lung Dis.* – 2000. – Vol. 80. – P. 47-56.
191. Kim, S.J. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results / S.J. Kim // *Eur. Respir. J.* – 2005. – Vol. 25. – P. 564-569.
192. Kim, S.J. Is second-line antituberculosis drug susceptibility testing reliable? / S.J. Kim, M.A. Espinal, C. Abe, G.H. Bai, F. Boulahbal, L. Fattorin, C. Gilpin, S. Hoffner, K. M. Kam, N. Martin-Casabona, L. Rigouts, V. Vincent // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2004. – Vol. 8. – P. 1157-1158.
193. Kim, H. Impact of the E540V amino acid substitution in GyrB of *Mycobacterium tuberculosis* on quinolone resistance / H. Kim, C. Nakajima, K. Yoko-yama, Z. Rahim, Y. Kim, H. Oguri, Y. Suzuki // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – Vol. 55(8). – P. 3661-3667.
194. Köser, C.U. Whole-genome sequencing for rapid susceptibility testing of *M. tuberculosis* / C.U. Köser, J.M. Bryant, J. Becq, M.E. Török, M.J. Ellington, M.A. Marti-Renom, A.J. Carmichael, J. Parkhill, G.P. Smith, S.J. Peacock // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – Vol. 369. – P. 290-292.
195. Kozhamkulov, U. Molecular characterization of rifampicin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Kazakhstan / U. Kozhamkulov, A. Akhmetova, S. Rakhimova, E. Belova, A. Alenova, V. Bismilda, L. Chingissova, S. Ismailov, E. Ramanculov, K. Momynaliev // *Jpn. J. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 64(3). – P. 253-255.

196. Lacoma, A. Pyrosequencing for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* second-line drugs and ethambutol resistance / A. Lacoma, B. Molina-Moya, C. Prat, E. Pimkina, J. Diaz, A. Dudnyk, N. García-Sierra, L. Haba, J. Maldonado, S. Samper, J. Ruiz-Manzano, V. Ausina, J. Dominguez // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 83(3). – P. 263-269.

197. Lasunskaja, E. Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence / E. Lasunskaja, S.C. Ribeiro, O. Manicheva, L.L. Gomes, P.N. Suffys, I. Mokrousov, L. Ferrazoli, M.R. Andrade, A. Kritski, T. Otten, T.L. Kipnis, W.D. da Silva, B. Vishnevsky, M.M. Oliveira, H.M. Gomes, I.F. Baptista, O. Narvskaya // *Microbes Infect.* – 2010. – Vol. 12(6). – P. 467-475.

198. Larsen, M.H. Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* / M.H. Larsen, C. Vilchèze, L. Kremer, G.S. Besra, L. Parsons, M. Salfinger, L. Heifets, M.H. Hazbon, D. Alland, J.C. Sacchettini, W.R. Jacobs, Jr // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 46(2). – P. 453-466.

199. Lau, R.W. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of *gyrA* mutation at position 74 / R.W. Lau, P.L. Ho, R.Y. Kao, W.W. Yew, T.C. Lau, V.C. Cheng, K.Y. Yuen, S.K. Tsui, X. Chen, W.C. Yam // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – Vol. 55. – P. 608-614.

200. Lee, A.S. Novel mutations within the *embB* gene in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* / A.S. Lee, S.N. Othman, Y.M. Ho, S.Y. Wong // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48. – P. 4447-4449.

201. Lee, J. Sensititre MYCOTB MIC plate for testing *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to first- and second – line drugs / J. Lee, D. Armstrong, W. Ssenooba, J.A. Park, Y. Yu, F. Mumbowa, C. Namaganda, G. Mboowa, G. Nakayita, S. Armakovitch, G. Chien, S.N. Cho, L.E. Via, C.E. Barry, J.J. Ellner, D. Alland, S.E. Dorman, M.L. Joloba // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58(1). – P. 11-18.

202. Lella, R.K. Eis (enhanced intracellular survival) protein of *Mycobacterium tuberculosis* disturbs the cross regulation of T-cells / R.K. Lella, C. Sharma // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 18671-18675.
203. Lewis, K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2008. – Vol. 322. – P. 107-131.
204. Li, G. Efflux pump gene expression in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates / G. Li, J. Zhang, Q. Guo, Y. Jiang, J. Wei, L-L. Zhao, X. Zhao, J. Lu, K. Wan // PLoS One. – 2015. – Vol. 10(2). – e0119013.
205. Li, J. Association of *gyrA/B* mutations and resistance levels to fluoroquinolones in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Emerging microbes and infections / J. Li, X. Gao, T. Luo, J. Wu, G. Sun, Q. Liu, Y. Jiang, Y. Zhang, J. Mei, Q. Gao // Emerg Microbes Infect. – 2014. – Vol. 3(3). – e19.
206. Li, X-Z. Efflux-mediated drug resistance in bacteria / X-Z. Li, H. Nikaido // Drugs. – 2004. – Vol. 64(2). – P. 159-204.
207. Ling, D.I. Rapid diagnosis of drug-resistant TB using line probe assays: from evidence to policy / D.I. Ling, A.A. Zwerling, M. Pai // Expert Rev. Respir. Med. – 2008. – Vol. 2. – P. 583-588.
208. Linger, Y. Simplified microarray system for simultaneously detecting rifampin, isoniazid, ethambutol, and streptomycin resistance markers in *Mycobacterium tuberculosis* / Y. Linger, A. Kukhtin, J. Golova, A. Perov, A. Lambarqui, L. Bryant, G.B. Rudy, K. Dionne, S.L. Fisher, N. Parrish, D.P. Chandler // J. Clinical Microbiol. – 2014. – Vol. 52(6). – P. 2100-2107.
209. Long, Q. *gyrA/B* fluoroquinolone resistance allele profiles amongst *Mycobacterium tuberculosis* isolates from mainland China / Q. Long, W. Li, Q. Du, Y. Fu, Q. Liang, H. Huang, J. Xie // Int J. Antimicrob. Agents. – 2012. – Vol. 39(6). – P. 486-489.
210. Lozovsky, E.R. Stepwise acquisition of pyrimethamine resistance in the malaria parasite / E.R. Lozovsky, T. Chookajorn, K.M. Brown, M. Imwong, P.J. Shaw, S. Kamchonwongpaisan, D.E. Neafsey, D.M. Weinreich, D.L. Hartl // Proc. Nat.l Acad. Sci. USA. – 2009. – 106(29). – P. 12025-12030.

211. Lu, J. Mechanisms of fluoroquinolone monoresistance in *Mycobacterium tuberculosis* / J. Lu, M. Liu, Y. Wang, Y. Pang, Z. Zhao // FEMS Microbiol. Lett. – 2014. – Vol. 353. – P. 40-48.
212. Machado, D. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / D. Machado, I. Couto, J. Perdigão, L. Rodrigues, I. Portugal, P. Baptista, B. Veigas, L. Amaral, M. Viveiros // PLoS One. – 2012. – Vol. 7(4). – e34538.
213. Machado, D. High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa family is associated with *inhA* double mutations / D. Machado, J. Perdigão, J. Ramos, I. Couto, I. Portugal, C. Ritter, E.C. Boettger, M. Viveiros // J. Antimicrob. Chemother. – 2013. – Vol. 68. – P. 1728-1732.
214. Madison, B. Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis by agar proportion and radiometric methods / B. Madison, B. Robinson-Dunn, I. George., W. Gross, H. Lipman, B. Metchock, A. Sloutsky, G. Washabaugh, G. Mazurek, J. Ridderhof // J. Clinical Microbiol. – 2002. – Vol. 40(11). – P. 3976-3979.
215. Madsen, C.T. Methyltransferase Erm(37) slips on rRNA to confer atypical resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / C.T. Madsen, L. Jakobsen, K. Buriánková, F. Doucet-Populaire, J-L Pernodet, S. Douthwaite // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280. – P. 38942-38947.
216. Magnet, S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance / S. Magnet, J.S. Blanchard // Chem. Rev. – 2005. – Vol. 105(2). – P. 477-498.
217. Mailaender, C. The MspA porin promotes growth and increases antibiotic susceptibility of both *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis* / C. Mailaender, N. Reiling, H. Engelhardt, S. Bossmann, S. Ehlers, M. Niederweis // Microbiology. – 2004. – Vol. 150 (4). – P.853-864.
218. Malik, S. New insights into fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional genetic analysis of *gyrA* and *gyrB* mutations / S. Malik, M. Willby, D. Sikes, O.V. Tsodikov, J.E. Posey // PLoS One. – 2012. – 7(6). – e39754.

219. Mariam, D.H. Effect of *rpoB* Mutations Conferring Rifampin Resistance on Fitness of *Mycobacterium tuberculosis* / D.H. Mariam, Y. Mengistu, S.E. Hoffner, D.I. Andersson // Antimicrob. Agents Chemother. – 2004. – Vol. 48(4). – P. 1289-1294.
220. Mariam, S.H. Dynamics of Antibiotic Resistant *Mycobacterium tuberculosis* during Long-Term Infection and Antibiotic Treatment / S.H. Mariam, J. Werngren, J. Aronsson, S. Hoffner, D.I. Andersson // PLoS One. – 2011. – Vol. 6(6). – e21147.
221. Marlowe, E. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis complex* in respiratory specimens / E. Marlowe, S.M. Novak-Weekley, J. Cumpio, S.E. Sharp, M.A. Momeny, A. Babst, J.S. Carlson, M. Kawamura, M. Pandori // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49. – P. 1621-1623.
222. Maruri, F. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system / F. Maruri, T.R. Sterling, A.W. Kaiga, A. Blackman, Y.F. van der Heijden, C. Mayer, E. Cambau, A. Aubry // J. Antimicrob. Chemother. – 2012. – Vol. 67. – P. 819-831.
223. Maus, C.E. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis* / C.E. Maus, B.B. Plikaytis, T.M. Shinnick // Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49(8). – P. 3192-3197.
224. Maus, C.E. Mutation of *tlyA* confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / C.E. Maus, B.B. Plikaytis, T.M. Shinnick // Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49(2). – P. 571-577.
225. Mayer, C. Quinolone Resistance in Tuberculosis Treatment: A Structural Overview // C. Mayer, A. Aubry // In: Understanding Tuberculosis - New Approaches to Fighting Against Drug Resistance / Ed. Dr. Pere-Joan Cardona. – 2012. – P. 291-308.

226. Mayer, C. The Molecular Genetics of Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / C. Mayer, H. Takiff // *Microbiol. Spectr.* – 2014. – Vol.2(4). – MGM2-0009-2013.

227. Mdluli, K. *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase as a target for drug discovery / K. Mdluli, Z. Ma // *Infect. Disord. Drug Targets.* – 2007. – Vol. 7. – P. 159-168.

228. Meaza, A. Evaluation of genotype MTBDRplus VER 2.0 line probe assay for the detection of MDR-TB in smear positive and negative sputum samples / A. Meaza, A. Kebede, Z. Yaregal, Z. Dagne, S. Moga, B. Yenew, G. Diriba, H. Molalign, M. Tadesse, D. Adisse, M. Getahun, K. Desta // *BMC Infect. Dis.* – 2017. – Vol. 17(1). – P. 1-8.

229. Metcalfe, J.Z. Cryptic microheteroresistance explains *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic resistance / J.Z. Metcalfe, E. Streicher, G. Theron, R.E. Colman, C. Allender, D. Lemmer, R. Warren, D.M. Engelthaler // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2017. – Vol. 196. – P. 1191-1201.

230. Migliori, G.B. Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in the West. Europe and United States: Epidemiology, Surveillance, and Control / G.B. Migliori, M.D. Richardson, G. Sotgiu, C. Lange // *Clin. Chest Med.* – 2009. – Vol. 30(4). – P. 637-665.

231. Milano, A. Azole resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by the MmpS5–MmpL5 efflux system / A. Milano, M.R. Pasca, R. Provvedi, A.P. Lucarelli, G. Manina, A.L. Ribeiro, R. Manganeli, G. Riccardi // *Tuberculosis (Edinb).* – 2009. – Vol. 89. – P. 84-90.

232. Miotto, P. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: molecular mechanisms challenging fluoroquinolones and pyrazinamide effectiveness / P. Miotto, D.M. Cirillo, G.B. Migliori // *Chest.* – 2015. – Vol. 147. – P. 1135-1143.

233. Miotto, P. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. Invited Review Series: Tuberculosis updates 2018 / P. Miotto, Y. Zhang, D.M. Cirillo, W.C. Yam // *Respirology.* – 2018. – Vol. 23(12). – P. 1098-1113.

234. Miotto, P. Genotype MTBDRplus: a Further step toward rapid identification of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* / P. Miotto, F. Piana, D.M. Cirillo, G.B. Migliori // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46(1). – 393-394.

235. Mokrousov, I. Detection of *embB306* mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing / I. Mokrousov, T. Otten, B. Vyshnevskiy, O. Narvskaya // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40. – P. 3810-3813.

236. Montero, C. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA / C. Montero, G. Mateu, R. Rodriguez, H. Takiff // Antimicrob. Agents Chemother. – 2001. – Vol. 45(12). – P. 3387-3392.

237. Morris, R.P. Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / R.P. Morris, L. Nguyen, J. Gatfield, K. Visconti, K. Nguyen, D. Schnappinger, S. Ehrt, Y. Liu, L. Heifets, J. Pieters, G. Schoolnik, C.J. Thompson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102. – P. 12200-12205.

238. Mpagama, S.G. Application of quantitative second-line drug susceptibility testing at a multidrug-resistant tuberculosis hospital in Tanzania / S.G. Mpagama, E. R. Houpt, S. Stroup, H. Kumburu, J. Gratz, G. S. Kibiki, S. K. Heysell // BMC Infect Dis. – 2013. – Vol. 13. – P. 432-441.

239. Müller, B. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* / B. Müller, S. Borrell, G. Rose, S. Gagneux // Trends Genet. – 2013. – Vol. 29. – P. 160-169.

240. Narvskaya, O. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St. Petersburg, Russia / O. Narvskaya, T. Otten, E. Limeschenko, N. Sapozhnikova, O. Graschenkova, L. Steklova, A. Nikonova, M.L. Filipenko, I. Mokrousov, B. Vyshnevskiy // Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 21(8). – P. 596-602.

241. Nasiri, M.J. New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in Mycobacteria / M.J. Nasiri, M. Haeili, M. Ghazi, H. Goudarzi, A.

Pormohammad, A.A. Fooladi, M.M. Feizabadi // *Front Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1-681p.

242. Nguyen, L. Mycobacterial subversion of chemotherapeutic reagents and host defense tactics: challenges in tuberculosis drug development / L. Nguyen, J. Pieters // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2009. – Vol. 49. – P. 427-453.

243. Niederweis, M. Mycobacterial porins—new channel proteins in unique outer membranes / M. Niederweis // *Mol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 49. – P. 1167-1177.

244. Niki, M. A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria / M. Niki, Y. Tateishi, Y. Ozeki, T. Kirikae, A. Lewin, Y. Inoue, M. Matsumoto, J.L. Dahl, H. Ogura, K. Kobayashi, S. Matsumoto // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287. – P. 27 743-27 752.

245. Nikolayevskyy, V. Performance of the Genotype® MTBDRPlus assay in the diagnosis of tuberculosis and drug resistance in Samara, Russian Federation / V. Nikolayevskyy, Y. Balabanova, T. Simak, N. Malomanova, I. Fedorin, F. Drobniowski // *BMC Clin. Pathol.* – 2009. – Vol. 9(2). – P. 1-9.

246. Ocheretina, O. Correlation between genotypic and phenotypic testing for resistance to rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Haiti: investigation of cases with discrepant susceptibility results / O. Ocheretina, V.E Escuyer, M.M. Mabou, G. Royal-Mardi, S. Collins, S.C. Vilbrun, J.W. Pape, D.W. Fitzgerald // *PloS One.* – 2014. – Vol. 9(3). – e9056.

247. O'Grady, J. New and improved diagnostics for detection of drug-resistant pulmonary tuberculosis / J. O'Grady, M. Maeurer, P. Mwaba P, N. Kapata, M. Bates, M. Hoelscher, A. Zumla // *Curr. Opin. Pulm. Med.* – 2011. – Vol. 17(3). – P. 134-141.

248. Okamoto, S. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria / S. Okamoto, A. Tamaru, C. Nakajima, K. Nishimura, Y. Tanaka, S. Tokuyama, Y. Suzuki, K. Ochi // *Mol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 63(4). – P. 1096-1106.

249. Oлару, I.D. Personalized medicine for patients with MDR-TB / I.D. Oлару, C. Lange, J. Heyckendorf // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2016. – Vol. 71. – P. 852-855.

250. Palomino, J.C. Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis* / J.C. Palomino, A. Martin // *Antibiotics (Basel)*. – 2014. – Vol. 3. – P. 317-340.

251. Pantel, A. DNA gyrase inhibition assays are necessary to demonstrate fluoroquinolone resistance secondary to *gyrB* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* / A. Pantel, S. Petrella, S. Matrat, F. Brossier, S. Bastian, D. Reitter, V. Jarlier, C. Mayer, A. Aubry // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – Vol. 55(10). – P. 4524-4529.

252. Pantel, A. Extending the definition of the GyrB quinolone resistance-determining region in *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase for assessing fluoroquinolone resistance in *M. tuberculosis* / A. Pantel, S. Petrella, N. Veziris, F. Brossier, S. Bastian, V. Jarlier, C. Mayer, A. Aubry // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2012. – Vol. 56. – P. 1990-1996.

253. Pardini, M. Characteristics of drug-resistant tuberculosis in Abkhazia (Georgia), a high-prevalence area in Eastern Europe / M. Pardini, S. Niemann, F. Varaine, E. Iona, F. Meacci, G. Orrù, H. Yesilkaya, T. Jarosz, P. Andrew, M. Barer, F. Checchi, H. Rinder, G. Orefici, S. Rüsç-Gerdes, L. Fattorini, M.R. Oggioni, M. Bonnet // *Tuberculosis (Edinb)*. – 2009. – Vol. 89(4). – P. 317-24.

254. Park, H.D. Rv3133c/*dosR* is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* / H.D. Park, K.M. Guinn, M.I. Harrell, R. Liao, M.I. Voskuil, M. Tompa, G.K. Schoolnik, D.R. Sherman // *Mol. Microbiol.* – 2003. – Vol.48. – P. 833-843.

255. Park, Y.K. Correlation of the phenotypic ethambutol susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* with *embB* gene mutations in Korea / Y.K. Park, S.W. Ryoo, S.H. Lee, H.N. Jnawali, C.-K. Kim, H.J. Kim, S.J. Kim // *J. Med. Microbiol.* – 2012. – Vol. 61(4). – P. 529-534.

256. Pasca, M.R. Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis* / M.R. Pasca, P. Gugliera, F. Arcesi, M. Bellinzoni, E. De Rossi, G. Riccardi // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48. – P. 3175-3178.

257. Pasipanodya, J.G. Serum drug concentrations predictive of pulmonary tuberculosis outcomes / J.G. Pasipanodya, H. McIlleron, A. Burger, P.A. Wash, P. Smith, T. Gumbo // *J. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 208. – P. 1464-1473.

258. Paulsen, I.T. Comparative genomics of microbial drug efflux systems / I.T. Paulsen, J. Chen, K.E. Nelson, M.H. Saier Jr // *J. Mol. Microb. Biotech.* – 2001. – Vol. 3(2). – P. 145-150.

259. Payen, M.C. Clinical use of the meropenem-clavulanate combination for extensively drug-resistant tuberculosis / M.C. Payen, S. De Wit, C. Martin, R. Sergysels, I. Muylle, Y. Van Laethem, N. Clumeck // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2012. – Vol. 16(4). – P. 558-560.

260. Perdigão, J. Genetic analysis of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Lisbon, Portugal / J. Perdigão, R. Macedo, A. Malaquias, A. Ferreira, L. Brum, I. Portugal // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2010. – Vol. 65(2). – P. 224-227.

261. Pfyffer, G.E. Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the proportion method with solid media / G.E. Pfyffer, D.A. Bonato, A. Ebrahimzadeh, W. Gross, J. Hotaling, J. Kornblum, A. Laszlo, G. Roberts, M. Salfinger, F. Wittwer, S. Siddiqi // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 37. – P. 3179-3186.

262. Pholwat, S. Integrated microfluidic card with TaqMan probes and high-resolution melt analysis to detect tuberculosis drug resistance mutations across 10 genes / S. Pholwat, J. Liu, S. Stroup, J. Gratz, S. Banu, S.M. Rahman, S.S. Ferdous, S. Foongladda, D. Boonlert, O. Ogarkov, S. Zhdanova, G. Kibiki, S. Heysell, E. Houpt // *mBio.* – 2015. – Vol. 6(2). – e02273.

263. Pitaksaijakul, P. Mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from TB patients in Thailand / P. Pitaksaijakul, W. Wongwit, W. Punprasit, B. Eampokalap, S. Peacock, P. Ramasoota // *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* – 2005. – Vol. 36(14). – P. 228-236.

264. Piton, J. Structural insights into the quinolone resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase / J. Piton, S. Petrella, M. Delarue, G. André-Leroux, V. Jarlier, A. Aubry, C. Mayer // PLoS One. – 2010. – Vol. 5(8). – e12245.

265. Plinke, C. Significance of mutations in *embB* Codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates / C. Plinke, S. Rüsç-Gerdes, S. Niemann // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – Vol. 50(5). – P. 1900-1902.

266. Poissy, J. Should Moxifloxacin be used for the treatment of extensively drug-resistant tuberculosis? An answer from a murine model / J. Poissy, A. Aubry, C. Fernandez, M. Lott, A. Chauffour, V. Jarlier, R. Farinotti, N. Veziris // Antimicrob. Agents Chemother. – 2010. – Vol. 54(11). – P. 4765-4771.

267. Poole, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria / K. Poole // Antimicrob. Agents Chemother. – 2000. – Vol. 44(10). – P. 2595-2599.

268. Post, F.A. Genetic polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with chronic multidrug-resistant tuberculosis / F.A. Post, P.A. Willcox, B. Mathema, L.M. Steyn, K. Shean, S.V. Ramaswamy, E.A. Graviss, E. Shashkina, B.N. Kreiswirth, G. Kaplan // J. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 190(1). – P. 99-106.

269. Poudel, A. Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Nepal / A. Poudel, C. Nakajima, Y. Fukushima, H. Suzuki, B. Dev Pandey, B. Maharjan, Y. Suzuki // Antimicrob. Agents Chemother. – 2012. – Vol. 56. – P. 2831-2836.

270. Ramaswamy, S. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update / S. Ramaswamy, J. Musser // Tubercle. Lung Dis. – 1998. – Vol. 79(1). – P. 3-29.

271. Ramaswamy, S.V. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis* / S.V Ramaswamy, A.G Amin, S. Göksel, C.E. Stager, S.J. Dou, H. El Sahly, S.L.

Moghazeh, B.N. Kreiswirth, J.M. Musser // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2000. – Vol. 44. – P. 326-336.

272. Ramaswamy, S.V. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / S.V Ramaswamy, R. Reich, S.J. Dou, L. Jasperse, X. Pan, A. Wanger, T. Quitugua, E.A. Graviss // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – Vol. 47(4). – P. 1241-1250.

273. Reeves, A.Z. Aminoglycoside Cross-Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Due to Mutations in the 5' Untranslated Region of *whiB7* / A.Z. Reeves, P.J. Campbell, R. Sultana, S. Malik, M. Murray, B.B. Plikaytis, T.M. Shinnick, J.E. Posey // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57(4). – P. 1857-1865.

274. Rigouts, L. Specific *gyrA* gene mutations predict poor treatment outcome in MDR-TB / L Rigouts, N. Coeck, M. Gumusboga, W. Bram de Rijk, K.J.M. Aung, M.A. Hossain, K. Fissette, H.L. Rieder, C.J. Meehan, B. de Jong, A. Van Deun // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2016. – Vol. 71. – P. 314-323.

275. Rigouts, L. Rifampin Resistance Missed in Automated Liquid Culture System for *Mycobacterium tuberculosis* Isolates with Specific *rpoB* Mutations / L. Rigouts, M. Gumusboga, W. Bram de Rijk, E. Nduwamahoro, C. Uwizeye, B. de Jong, A. Van Deun // *J. Clinical Microbiol.* – 2013. – Vol. 51(8). – P. 2641-2645.

276. Rinder, H. Significance of *ahpC* promoter mutations for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / H Rinder, A. Thomschke, S. Rüscher-Gerdes, G. Bretzel, K. Feldmann, M. Rifai, T. Löscher // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1998. – Vol. 17. – P. 508-511.

277. Rodrigues, C. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against second-line drugs using the Bactec MGIT 960 system / C. Rodrigues, J. Jani, S. Shenai, P. Thakkar, S. Siddiqi, A. Mehta // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* – 2008. – Vol. 12(12). – P. 1449-1455.

278. Rodrigues, L. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis complex* / L. Rodrigues, D. Machado, I. Couto, L. Amaral, M. Viveiros // *Infect. Genet. Evol.* – 2012. – Vol. 12. – P. 695-700.

279. Rouse, D.A. Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance / D.A. Rouse, J.A. DeVito, Z. Li, H. Byer, S.L. Morris // *Mol. Microbiol.* – 1996. – Vol. 22. – P. 583-592.

280. Rozwarski, D.A. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis* / D.A. Rozwarski, G.A. Grant, D.H. Barton, W.R. Jacobs, J.C. Sacchettini // *Science.* – 1998. – Vol. 279. – P. 98-102.

281. Rusch-Gerdes, S. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-lane drugs and newer antimicrobials / S. Rusch-Gerdes, G. Pfyffer, M. Casal, M. Chadwick, S. Siddiqi // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44, №3. – P. 688-692.

282. Rustad, T.R. The enduring hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* / T.R. Rustad, M.I. Harrell, R. Liao, D.R. Sherman // *PLoS One.* – 2008. – Vol. 3(1). – e1502.

283. Rustomjee, R. A Phase II study of the sterilising activities of ofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis / R. Rustomjee, C. Lienhardt, T. Kanyok, G.R. Davies, J. Levin, T. Mthiyane, C. Reddy, A.W. Sturm, F.A. Sirgel, J. Allen, D.J. Coleman, B. Fourie, D.A. Mitchison // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2008. – Vol. 12. – P. 128-138.

284. Safi, H. Transfer of *embB* codon 306 mutations into clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin / H. Safi, B. Sayers, M.H. Hazbón, D. Alland // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – Vol. 52(6). – P. 2027-2034.

285. Safi, H. Evolution of high-level ethambutol-resistant tuberculosis through interacting mutations in decaprenylphosphoryl-b-Darabinose biosynthetic and utilization pathway genes / H. Safi, S. Lingaraju, A. Amin, S. Kim, M. Jones, M. Holmes, M. McNeil, S.N. Peterson, D. Chatterjee, R. Fleischmann, D. Alland // *Nat. Genet.* – 2013. – Vol. 45. – P. 1190-1197.

286. Sali, M. Multicenter Evaluation of Anyplex Plus MTB/NTM MDR-TB Assay for Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis complex* and

Multidrug-Resistant Isolates in Pulmonary and Extrapulmonary Specimens / M. Sali, F. De Maio, F. Caccuri, F. Campilongo, M. Sanguinetti, S. Fiorentini, G. Delogu, C. Giagulli // *J. Clinical Microbiol.* – 2016. – Vol. 54(1). – P. 59-63.

287. Samuel, L.P. Expression, production and release of the Eis protein by *Mycobacterium tuberculosis* during infection of macrophages and its effect on cytokine secretion / L.P. Samuel, C-H. Song, J. Wei, E.A. Roberts, J.L. Dahl, C.E. Barry, E-K Jo, R.L. Friedman // *Microbiology.* – 2007. – Vol. 153. – P. 529-540.

288. Sandgren, A. Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database / A. Sandgren, M. Strong, P. Muthukrishnan, B.K. Weiner, G.M. Church, M.B. Murray // *PLoS Med.* – 2009. – Vol. 6(2). – e2.

289. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. Coulson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1977. – Vol. 74(12). – P. 5463-5467.

290. Scarpellini, P. Detection of rifampin resistance by single-strand conformation polymorphism analysis of cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis of the central nervous system / P. Scarpellini, S. Braglia, A.M. Brambilla, M. Dalessandro, P. Cichero, A. Gori, A. Lazzarin // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35(11). – P. 2802-2806.

291. Scarpellini, P. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis / P. Scarpellini, S. Braglia, P. Carrera, M. Cedri, P. Cichero, A. Colombo, R. Crucianelli, A. Gori, M. Ferrari, A. Lazzarin // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1999. – Vol. 43 (10). – P. 2550-2554.

292. Schatz, A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944 / A. Schatz, E. Bugie, S.A. Waksman // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2005. – Vol. 437. – P. 3-6.

293. Schön, T. Evaluation of wild-type MIC distributions as a tool for determination of clinical breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis* / T. Schön, P. Juréen, C.G. Giske, E. Chryssanthou, E. Sturegård, J. Werngren, G. Kahlmeter, S.E. Hoffner, K.A. Angeby // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2009. – Vol. 64. – P. 786-793.

294. Schön, T. *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance testing: challenges, recent developments and perspectives / T. Schön, P. Miotto, C.U. Köser, M. Viveiros, E. Boettger, E. Cambau // Clin. Microbiol. Infect. – 2017. – Vol. 23(3). – P. 154-160.

295. Shekar, S. Detecting novel genetic variants associated with isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* / S. Shekar, Z. X. Yeo, J.C.L. Wong, M.K.L. Chan, D.C.T. Ong, P. Tongyoo, S-Y. Wong, A.S.G. Lee // PloS One. – 2014. – Vol. 9(7). – e102383.

296. Siddiqi, S. MGIT Procedure Manual for BACTEC™MGIT™960 TB System (Also applicable for Manual MGIT) Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) Culture and Drug Susceptibility Demonstration Projects / S. Siddiqi, S. Rusch-Gerdes // – 2006. – 89p. – Режим доступа: https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf

297. Siddiqi, N. *Mycobacterium tuberculosis* isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump / N. Siddiqi, R. Das, N. Pathak, S. Banerjee, N. Ahmed, V.M. Katoch, S.E. Hasnain // Infection. – 2004. – Vol. 32(2). – P. 109-111.

298. Sirgel, F. *gyrA* mutations and phenotypic susceptibility levels to ofloxacin and moxifloxacin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* / F. Sirgel, R. Warren, E. Streicher, T. Victor, P. Helden, E. Böttger // J. Antimicrob. Chemother. – 2012. – Vol. 67(5). – P. 1088-1093.

299. Song, T. Fitness costs of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* are amplified under conditions of nutrient starvation and compensated by mutation in the b' subunit of RNA polymerase / T. Song, Y. Park, I.C. Shamputa, S. Seo, S.Y. Lee, H-S. Jeon, H. Choi, M. Lee, R.J. Glynn, S. Whitney Barnes, J.R. Walker, S. Batalov, K. Yusim, S. Feng, C-S. Tung, J. Theiler, L.E. Via, H.I.M. Boshoff, K.S. Murakami, B. Korber, C.E. Barry, S-N Cho // Mol. Microbiol. – 2014. – 91(6). – P. 1106-1119.

300. Sowajassatakul, A. Molecular characterization of amikacin, kanamycin and capreomycin resistance in M/XDR-TB strains isolated in Thailand / A. Sowajassatakul,

T. Prammananan, A. Chaiprasert, S. Phunpruch // BMC Microbiol. – 2014. – Vol. 14(165). – p. 1-7.

301. Springer, B. Tuberculosis Drug Resistance in an Area of Low Endemicity in 2004 to 2006: Semiquantitative Drug Susceptibility Testing and Genotyping / B. Springer, R. Calligaris-Maibach, C. Ritter, E. Böttger // J. Clinical Microbiol. – 2008. – Vol. 46(12). – P. 4064-4067.

302. Springer, B. Quantitative Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* by Use of MGIT 960 and EpiCenter Instrumentation / B. Springer, K. Lucke, R. Calligaris-Maibach, C. Ritter, E.C. Böttger // J. Clinical Microbiol. – 2009. – Vol. 47(6). – P. 1773-1780.

303. Sreevatsan, S. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations / S. Sreevatsan, K.E. Stockbauer, X. Pan, B.N. Kreiswirth, S.L. Moghazeh, W.R. Jacobs, A. Telenti, J.M. Musser // Antimicrob. Agents Chemother. – 1997. – Vol. 41. – P. 1677-1681.

304. Steingart, K.R. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults / K.R. Steingart, I. Schiller, D.J. Horne, M. Pai, C.C. Boehme, N. Dendukuri // Cochrane Database Syst. Rev. – 2014. (1): – CD009593.

305. Stephan, J. Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis* / J. Stephan, C. Mailaender, G. Etienne, M. Daffe, M. Niederweis // Antimicrob. Agents Chemother. – 2004. – Vol. 48. – P.4163-4170.

306. Supply, P. Proposal for standardization of optimized Mycobacterial interspersed repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis* / P. Supply, C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rüsç-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M.C. Gutierrez, M. Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht, D. van Soolingen // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44(12). – P. 4498-4510.

307. Suzuki, Y. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene / Y. Suzuki, C. Katsukawa, A. Tamaru,

C. Abe, M. Makino, Y. Mizuguchi, H. Taniguchi // J. Clin. Microbiol. – 1998. – Vol. 36(5). – P. 1220-1225.

308. Tagliani, E. Diagnostic performance of the new version (v2.0) of GenoType MTBDRsl assay for detection of resistance to fluoroquinolones and secondline injectable drugs: a multicenter study / E. Tagliani, A.M. Cabibbe, P. Miotto, E. Borroni, J. Carlos Toro, M. Mansjö, S. Hoffner, D. Hillemann, A. Zalutskaya, A. Skrahina, D.M. Cirillo// J. Clin. Microbiol. – 2015. – Vol. 53(9). – P. 2961-2969.

309. Takiff, H. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations / H. Takiff, L. Salazar, C. Guerrero, W. Philipp, W. Huang, B. Kreiswirth, S. Cole, W. Jacobs, A. Telenti // Antimicrob. Agents Chemother. – 1994. – Vol. 38(4). – P. 773-780.

310. Tan, Y. The beginning of the *rpoB* gene in addition to the rifampin resistance determination region might be needed for identifying rifampin/rifabutin cross-resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Southern China // Y. Tan, Z. Hu, Y. Zhao, X. Cai, C. Luo, C. Zou, X. Liu // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50(1). – P. 81–85.

311. Taniguchi, H. Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* / H. Taniguchi, H. Aramaki, Y. Nikaido, Y. Mizuguchi, M. Nakamura, T. Koga, S. Yoshida // FEMS Microbiol. Lett. – 1996. – Vol. 144(1). – P. 103-108.

312. Telenti, A. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level / A. Telenti, N. Honoré, C. Bernasconi, J. March, A. Ortega, B. Heym, H.E. Takiff, S.T. Cole // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol. 35 (3). – P. 719-723.

313. Telenti, A. Detection of rifampicin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* / A. Telenti, P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M.J. Colston, L. Matter, K. Schopfer, T. Bodmer // Lancet. – 1993. – Vol. 341. – P. 647-651.

314. Telenti, A. The *emb* operon, a unique gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol / A. Telenti, W.J. Philipp, S.

Sreevatsan, C. Bernasconi, K.E. Stockbauer, B. Wieles, J.M. Musser, W.R. Jacobs // Nature Med. – 1997. – Vol. 3(5). – P. 567-570.

315. Theron, G. GenoType MTBDRsl assay for resistance to secondline anti-tuberculosis drugs / G. Theron, J. Peter, M. Richardson, R. Warren, K. Dheda, K.R. Steingart // Cochrane Database Syst. Rev. – 2016. – Vol. 9(9). – CD010705.

316. Török, M.E. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a suspected tuberculosis outbreak / M.E. Török, S. Reuter, J. Bryant, C.U. Köser, S.V. Stinchcombe, B. Nazareth, M.J. Ellington, S.D. Bentley, G.P. Smith, J. Parkhill, S.J. Peacock // J. Clin. Microbiol. – 2013. – Vol. 51(2). – P. 611-614.

317. Trauner, A. Evolution of Drug Resistance in Tuberculosis: Recent Progress and Implications for Diagnosis and Therapy / A. Trauner, S. Borrell, K. Reither, S. Gagneux // Drugs. – 2014. – Vol. 74(10). – P. 1063-1072

318. Tretter, E.M. Crystal structure of the DNA gyrase GyrA N-terminal domain from *Mycobacterium tuberculosis* / E.M. Tretter, A.J. Schoeffler, S.R. Weisfield, J.M. Berger // Proteins. – 2010. – Vol. 78(2). – P. 492-495.

319. Van der Heijden, Y.F. Fluoroquinolone susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* after pre-diagnosis exposure to older- versus newer generation fluoroquinolones / Y.F. Van der Heijden, F. Maruri, A. Blackman, E. Mitchel, A. Bian, A.K. Shintani, S. Eden, J.V. Warkentin, T.R. Sterling // Int J Antimicrob Agents. – 2013. – Vol. 42(3). – P. 232-237.

320. Van Deun, A. Disputed *rpoB* mutations can frequently cause important rifampicin resistance among new tuberculosis patients / A. Van Deun, K.J.M. Aung, A. Hossain, P. de Rijk, M. Gumusboga, L. Rigouts, B.C. de Jong // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2015. – Vol. 19(2). – P. 185-190.

321. Van Deun, A. Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: challenging the gold standard / A. Van Deun, K.J.M Aung, V. Bola, R. Lebeke, M. Anwar Hossain, W. Bram de Rijk, L. Rigouts, A. Gumusboga, G. Torrea, B.C. de Jong // J. Clin. Microbiol. – 2013. – Vol. 51(8). – P. 2633-2640.

322. Van Deun, A. Diagnosis of drug-resistant tuberculosis: reliability and rapidity of detection / A. Van Deun, A. Martin, J.C. Palomino // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2010. – Vol. 14(2). – P. 131-140.

323. Van Deun, A. *Mycobacterium tuberculosis* strains with highly discordant rifampin susceptibility test results / A. Van Deun, L. Barrera, I. Bastian, L. Fattorini, H. Hoffmann, K.M. Kam, L. Rigouts, S. Rüsç-Gerdes, A. Wright // *J. Clinical Microbiol.* – 2009. – Vol. 47(11). – P. 3501-3506.

324. Van Ingen, J. Low-level rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains raise a new therapeutic challenge / J. Van Ingen, R. Aarnoutse, G. de Vries, M.J. Boeree, D. Van Soolingen // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2011. – Vol. 15(7). – P. 990-992.

325. Van Rie, A. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community / A. Van Rie, R. Warren, I. Mshanga, A.M. Jordaan, G.D van der Spuy, M. Richardson, J. Simpson, R.P Gie, D.A Enarson, N. Beyers, P.D van Helden, T.C Victor // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – Vol. 39(2). – P. 636-641.

326. Vilcheze, C. Altered NADH/NAD⁺ ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria / C. Vilchèze, T.R. Weisbrod, B. Chen, L. Kremer, M.H. Hazbón, F. Wang, D. Alland, J. C. Sacchettini, W.R. Jacobs // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – Vol.52. – P.708-720.

327. Von Groll, A. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in *gyrA* and *gyrB* / A. Von Groll, A. Martin, P. Jureen, S. Hoffner, P. Vandamme, F. Portaels, J.C. Palomino, P. Almeida da Silva // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53(10). – P. 4498-4500.

328. Wang, F. Crystal structure and activity studies of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase reveal its critical role in resistance to beta-lactam antibiotics / F. Wang, C. Cassidy, J.C. Sacchettini // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2006. – Vol. 50(8). – P. 2762-2771.

329. Wang, J-Y. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure / J-Y.

Wang, L-N. Lee, H-C. Lai, S-K. Wang, I-S. Jan, C-J. Yu, P-R. Hsueh, P-C. Yang // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2007. – Vol. 59(5). – P. 860-865.

330. Wang, K. The expression of ABC efflux pump, Rv1217c–Rv1218c, and its association with multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in China / K. Wang, H. Pei, B. Huang, X. Zhu, J. Zhang, B. Zhou, L. Zhu, Y. Zhang, F-F. Zhou // *Curr. Microbiol.* – 2013. – Vol. 66(3). – P. 222-226.

331. Warriar, T. N-methylation of a bactericidal compound as a resistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis* / T. Warriar, K. Kapilashrami, A. Argyrou, T.R. Ioerger, D. Little, K.C. Murphy, M. Nandakumar, S. Park, B. Gold, J. Mi, T. Zhang, E. Meiler, M. Rees, S. Somersan-Karakaya, E. Porras-De Francisco, M. Martinez-Hoyos, K. Burns-Huang, J. Roberts, Y. Ling, K.Y. Rhee, A. Mendoza-Losana, M. Luo, C.F. Nathan // *P. Natl. Acad. Sci USA.* – 2016. – Vol. 113(31). – E4523–30.

332. Wei, J. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene that enhances mycobacterial survival in macrophages / J. Wei, J.L. Dahl, J.W. Moulder, E.A. Roberts, P. O'Gaora, D.B. Young, R.L. Friedman // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182(2). – P. 377-384.

333. Weinreich, D.M. Darwinian evolution can follow only very few mutational paths to fitter proteins / D.M. Weinreich, N.F. Delaney, M.A. Depristo, D.L. Hart // *Science.* – 2006. – Vol. 312(5770). – P. 111-114.

334. Williams, D.L. Evaluation of a polymerase chain reaction-based universal heteroduplex generator assay for direct detection of rifampin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens / D.L. Williams, L. Spring, T.P. Gillis, M. Salfinger, D.H. Persing // *Clin. Infect. Dis.* – 1998. – Vol. 26 (2). – P. 446-450.

335. Williams-Bouyer, N. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria / N. Williams-Bouyer, R. Yorke, H.I. Lee, G.L. Woods // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol. 38(11). – P. 4167-4170.

336. Williamson, D.A. Clinical failures associated with *rpoB* mutations in phenotypically occult multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* / D.A.

Williamson, S.A. Roberts, J.E. Bower, R. Vaughan, S. Newton, O. Lowe, C.A. Lewis, J.T. Freeman // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2012. – Vol. 16(2). – P. 216-220.

337. World Health Organisation. Guidelines for drug susceptibility testing for second-line anti-tuberculosis drugs for dots-plus [Электронный ресурс]. – 2001. – Режим доступа: https://www.who.int/docstore/gtb/publications/mdrtb/tb_2001_288/guidelines.pdf

338. World Health Organisation. Towards universal access to diagnosis and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis by 2015. Progress report. – WHO.: Geneva, Switzerland, 2011. – 119p.

339. World Health Organisation. Molecular Line Probe Assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Policy statement [Электронный ресурс]. – 2008. – Режим доступа: https://www.who.int/tb/features_archive/expert_group_report_june08.pdf

340. World Health Organization. Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendations for prevention and control // *Wkly. Epidemiol. Rec.* – 2006. – Vol. 81. – P. 430-432.

341. World Health Organization. Interim recommendations for the surveillance of drug resistance in tuberculosis [Электронный ресурс]. – 2007. – Режим доступа: https://www.who.int/tb/publications/2007/who_hm_tb_2007_385.pdf

342. World Health Organization. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs [Электронный ресурс]. – 2008. – Режим доступа: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70500/WHO_HTM_TB_2008.392_eng.pdf?sequence=1

343. World Health Organization. Guidelines for the surveillance of drug resistance in tuberculosis. . – WHO.: Geneva, Switzerland, 2009. – 83p.

344. World Health Organization. Tuberculosis MDR-TB and XDR-TB 2011 progress report [Электронный ресурс]. – 2011. – Режим доступа: https://www.who.int/tb/challenges/mdr/factsheet_mdr_progress_march2011.pdf

345. World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the: diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. Policy update. – WHO.: Geneva, Switzerland, 2013. – 79p.

346. World Health Organization. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Chapter 3. Laboratory // Geneva: WHO. – 2014. – P. 39-60.

347. World Health Organization (2014a). Drug-resistant TB – surveillance and response. Supplement to global tuberculosis report 2014. – WHO.: Geneva, Switzerland, 2014. – 32p.

348. World Health Organization. Tuberculosis diagnostics technology and market landscape (4th edition). – WHO. UNITAID Secretariat.: Geneva, Switzerland, 2015. – 96p.

349. World Health Organization. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line antituberculosis drugs. Policy guidance. – WHO.: Geneva, Switzerland, 2016. – 52p.

350. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. – WHO.: Geneva, Switzerland, 2015. – 204p.

351. World Health Organization. Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. – WHO.: Geneva, Switzerland, 2018. – 132p.

352. World Health Organization. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis.– WHO.: Geneva, Switzerland, 2018. – 52p.

353. Xu, Y. Mutations Found in *embCAB*, *embR*, and *ubiA* Genes of Ethambutol-Sensitive and -Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from China / Y. Xu, H. Jia, H. Huang, Z. Sun, Z. Zhang // Biomed. Res. Int. – 2015. – 951706.

354. Yablonskii, P.K. Tuberculosis in Russia: its history and its status today / P.K. Yablonskii, A.A. Vazel, V.B. Galkin, M.V. Shulgina // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2015. – Vol. 191(4). – P. 372-376.

355. Yuan, X. Molecular characterization of multidrug and extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Jiangxi, China / X. Yuan, T. Zhang, K. Kawakami, J. Zhu, H. Li, J. Lei, S. Tu // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol. 50(7). – P. 2404-2413.

356. Zaunbrecher, M.A. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / M.A. Zaunbrecher, R.D. Sikes Jr, B. Metchock, T.M. Shinnick, J.E. Posey // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106(47). – P. 20004-20009.

357. Zaw, M.T. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of *rpoB* gene associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / M.T. Zaw, N.A. Emran, Z. Lin // *J. Infect. Public. Health.* – 2018. – Vol. 11(5). – P. 605-610.

358. Zhang, Y. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / Y. Zhang, A. Telenti, A. G. Hatfull, W.R. Jacobs // 1st ed. – ASM Press, Washington, DC, USA, 2000. – P. 235-254.

359. Zhang, Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / Y. Zhang, W-W. Yew // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2009. – Vol. 13(11). – P. 1320-1330.

360. Zhang, Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015 / Y. Zhang, W-W. Yew // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2015. – Vol. 19(11). – P. 1276-1289.

361. Zhang, Z. Automated liquid culture system misses isoniazid heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates with mutations in the promoter region of the *inhA* gene / Z. Zhang, J. Lu, Y. Wang, Y. Pang, Y. Zhao // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 34(3). – P. 555-560.

362. Zhang, Z. Molecular and phenotypic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to kanamycin, amikacin, and

capreomycin in China / Z. Zhang, M. Liu, Y. Wang, Y. Pang, K.M. Kam, Y. Zhao // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 33(11). – P. 1959-1966.

363. Zhang, Z. Ethambutol Resistance as Determined by Broth Dilution Method Correlates Better than Sequencing Results with *embB* Mutations in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates / Z. Zhang, Y. Wang, Y. Pang, K.M. Kam // J. Clin. Microbiol. – 2014. - Vol. 52(2). – P. 638-641.

364. Zimenkov, D.V. Detection of second-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using oligonucleotide microarrays / D.V. Zimenkov, O.V. Antonova, A.V. Kuz'min, Y.D. Isaeva, L.Y. Krylova, S.A. Popov, A.S. Zasedatelev, V.M. Mikhailovich, D.A. Gryadunov // BMC Infect. Dis. – 2013. – Vol. 13(240). – P. 1-8.

365. Zimenkov, D.V. Simultaneous drug resistance detection and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using a low-density hydrogel microarray / D.V. Zimenkov, E.V. Kulagina, O.V. Antonova, V.Yu. Zhuravlev, D.A. Gryadunov // J. Antimicrob. Chemother. – 2016. – Vol. 71(6). – P. 1520-1531.

366. Zuur, M.A. Intermediate susceptibility dosedependent breakpoints for high dose rifampicin, isoniazid and pyrazinamide treatment in multidrug-resistant tuberculosis programmes / M.A. Zuur, J.G. Pasipanodya, D. van Soolingen, T.S. van der Werf, T. Gumbo, J-W.C. Alffenaar // Clin. Infect. Dis. – 2018. – Vol. 67(11). – P. 1743-1749.