

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ОПРЕДЕЛЕНИИ ГЕТЕРОРЕЗИСТЕНТНОСТИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* К РИФАМПИЦИНУ

А.И. Исакова, Ю.Д. Михайлова, К.Ю. Галкина, Е.Ю. Носова, С.Г. Сафонова

ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом
Департамента здравоохранения города Москвы»

Для оценки эффективности молекулярно-генетических тестов и бактериологических методов по определению гетерорезистентной к рифампицину (R) популяции *M. tuberculosis* (МБТ) проанализированы бактериальные суспензии (смеси), содержащие различные пропорции устойчивых и чувствительных штаммов.

Установлено, что эффективность определения устойчивой к R популяции МБТ в смесях зависит от используемого в тест-системе способа детекции мутаций. Тест-системы Genotype MTBDRplus, «ТБ-ТЕСТ» и «ТБ-БИОЧИП-1» показали одинаковые результаты выявления устойчивой популяции с мутацией Ser531Leu. Genotype MTBDRplus эффективнее определяет замены His526Tyr, His526Asp, Asp516Val и менее эффективно, по сравнению с «ТБ-ТЕСТ» и «ТБ-БИОЧИП-1» – мутации, определяемые по отсутствию зондов «дикого» типа. Эффективность бактериологического обнаружения резистентной популяции зависит от сроков культивирования. Метод серийных микроразведений в жидкой среде Миддлбука 7H9 наиболее эффективный при выявлении устойчивости к Rif в гетерорезистентной популяции МБТ при культивировании посевов 21 день по сравнению с автоматизированной системой BACTEC™ MGIT™ 960 и методом абсолютных концентраций на плотной среде Л-Й при культивировании посевов 28 дней. Отмечено, что доля выявляемых устойчивых штаммов МБТ с помощью Bactec MGIT 960, методом абсолютных концентраций на плотной среде Л-Й при культивировании посевов 28 дней и методом серийных микроразведений при культивировании посевов 14 дней существенно не различалась и составила 45,1, 44,1 и 38,9 соответственно.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, бактериальные смеси, гетерорезистентность, устойчивость к рифампицину

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF MOLECULAR GENETICS AND BACTERIOLOGICAL METHODS FOR DETERMINATION OF THE HETERORESISTANCE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* TO RIFAMPICIN

A.I. Isakova, Yu.D. Mikhailova, K.Yu. Galkina, E.Yu. Nosova, S.G. Safonova

We analyzed bacterial suspensions (mixtures) containing various proportions of resistant and susceptible strains to assess the effectiveness of molecular genetic tests and bacteriological methods for determination of the heteroresistant population of *M. tuberculosis* (MTB) to rifampicin (RIF). We established that the efficiency of determining the RIF-resistant MTB population in mixtures depends on the method of mutation detection used in the test system. The Genotype MTBDRplus, TB-TEST, and TB-BIOCHIP-1 tests showed the same results in detecting a resistant population with the Ser531Leu mutation. Genotype MTBDRplus more effectively detected His526Tyr, His526Asp, Asp516Val substitutions and less efficiently detected mutations determined by the absence of wild-type probes compared to TB-TEST and TB-BIOCHIP-1 tests.

The efficiency of bacteriological detection of the resistant MTB population depends on the terms of cultivation. The method of serial microdilutions in the Middlebrook 7H9 liquid medium is the most effective in detecting RIF-resistance in the heteroresistant MTB population with the MTB cultivation for 21 days in comparison with the automated system Bactec MGIT 960 and the method of absolute concentrations on the L-J solid medium with the MTB cultivation for 28 days. It was noted that the proportion of resistant MTB strains detection by Bactec MGIT 960, the method of absolute concentrations on a solid L-J medium for 28 days and by the method of serial microdilutions for 14 days did not differ significantly and amounted to 45.1; 44.1 and 38.9 respectively.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, bacterial mixtures, heteroresistance, rifampicin resistance

Введение

Общемировой показатель излечения туберкулеза (ТБ) с лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* (МБТ) остается низким и составляет 55% (доклад ВОЗ 2018 г.). Причиной возникновения такого ТБ является трансмиссия устойчивых штаммов (передача от пациента пациенту) или развитие резистентности МБТ *de novo* из-за недостоверной или поздней диагностики, неадекватного или незавершенного лечения, а также отсутствия у пациентов приверженности к лечению [13]. Последние факторы способствуют появлению первоначально гетерорезистентной популяции МБТ, где одновременно присутствуют чувствительные («дикого» типа) и устойчивые (с наличием мутаций) микобактерии, а затем и полностью устойчивой бактериальной популяции в диагностическом материале больного ТБ [9, 17]. Именно наличие гетерорезистентной популяции МБТ в диагностическом материале, которая, по данным ряда авторов, может составлять от 4,7 до 28,8%, определяет не только сложность в интерпретации дискордантных результатов, но и прежде всего развитие неблагоприятного исхода заболевания вследствие недостаточной диагностики [14, 15]. Гетерорезистентность в клинических изолятах сложно определить, и это зависит не только от используемого метода, но и от биологических свойств устойчивой популяции, связанной с определенными мутациями, детерминирующими разную скорость роста и, следовательно, уровень устойчивости [27]. Устойчивость МБТ к рифампицину (R) как наиболее эффективному противотуберкулезному препарату является основным препятствием в борьбе с туберкулезом [24]. Механизм его действия основан на ингибировании синтеза мРНК (блокировка транскрипции) путем связывания с β -субъединицей фермента РНК-полимеразы, что приводит к гибели клетки [4]. Устойчивость к препарату в 96–98% штаммов обусловлена возникновением мутаций в гене *rrpV*, кодирующем РНК-полимеразу, в структурной его области размером 81 п.н. (*rifampicin resistance-determining region* – RRDR) [22]. Проблему обнаружения гетерорезистентной популяции МБТ к Rif довольно широко освещают в зарубежной литературе. По данным ряда авторов, предел обнаружения резистентной популяции в изолятах зависит от типа мутаций в гене *rrpV* и варьирует среди молекулярно-генетических тест-систем, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) для диагностики ТБ [8, 12]. В свою очередь, бактериологические методы, включая метод с использованием автоматизированной системы BACTEC™ MGIT™ 960 и колориметрический с применением индикатора Alamar Blue (Microplate alamarBlue assay – MABA), демонстрируют наилучшую способность выявлять Rif-устойчивые МБТ в гетерорезистентной популяции [27].

Цель исследования

Оценить способность молекулярных тест-систем «ТБ-БИОЧИП», «ТБ-ТЕСТ», Genotype MTBDRplus и бактериологи-

ческих методов (с помощью автоматизированной системы BACTEC™ MGIT™ 960, абсолютных концентраций на плотной среде Левенштейна-Йенсена (Л-Й) и серийных микроразведений) выявлять устойчивость МБТ к рифампицину в гетерорезистентной популяции.

Материал и методы исследования

Бактериальные штаммы. Для проведения исследования из лабораторной коллекции микобактериальных культур Централизованной бактериологической лаборатории (хранение при -70 °C) были отобраны и восстановлены клинические штаммы МБТ с различными типами мутаций в гене *rrpV*, охарактеризованные бактериологическими и молекулярно-генетическими методами («ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-ТЕСТ»). Штаммы были выделены из диагностического материала больных ТБ в 2017–2021 гг. Всего в работе использовали 18 штаммов МБТ с различными типами мутаций в гене *rrpV* и 2 штамма без мутаций («дикий» тип). Генетически устойчивые к R штаммы МБТ имели следующие типы мутаций: Ser531Leu – 2 штамма, Asp516Val – 2 штамма, His526Arg – 2 штамма, His526Asp – 2 штамма, His526Tyr – 2 штамма, His526Leu – 1 штамм, His526Cys – 1 штамм, Leu511Pro – 5 штаммов, Leu511Pro и Met515Ile – 1 штамм. Среди исследованных изолятов 14 определены в системе BACTEC™ MGIT™ 960 как устойчивые и 4 с мутацией Leu511Pro как чувствительные к R.

Для исключения возможного присутствия чувствительных особей (популяции) без мутаций в гене *rrpV* культуры одновременно выращивали на плотной среде Л-Й с препаратом в концентрации 40 мкг/мл и в жидкой среде Миддлбрука 7H9 (M7H9; BACTEC™ MGIT™ 960) в 1 мкг/мл R. Из выросших колоний накапливали чистые культуры, после чего однократно выполняли их субкультивирование на среде Л-Й без препарата. Гомогенность фенотипически чувствительных к R культур подтверждали с помощью молекулярно-генетической тест-системы Genotype MTBDRplus. Гетерорезистентные смеси (суспензии) готовили путем объединения стандартизированных по 0,5-му стандарту мутности McFarland гомогенных суспензий из устойчивых (с мутациями) и чувствительных (без мутаций) к R культур МБТ. Пропорции устойчивых и чувствительных суспензий составили: 50% и 50%; 20% и 80%; 10% и 90%; 5% и 95%; 2% и 98%; 1% и 99%; 0,5% и 99,5% соответственно. В каждый эксперимент был включен контрольный штамм *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Дизайн исследования представлен на рисунке.

Молекулярно-генетическое тестирование. Определение минорной пропорции МБТ, устойчивой к R в гетерорезистентной популяции, проводили с помощью трех молекулярно-генетических тест-систем – Genotype MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, Germany), «ТБ-ТЕСТ» и «ТБ-БИОЧИП-1» (ООО «Биочип», Россия). Genotype MTBDRplus позволяет определять

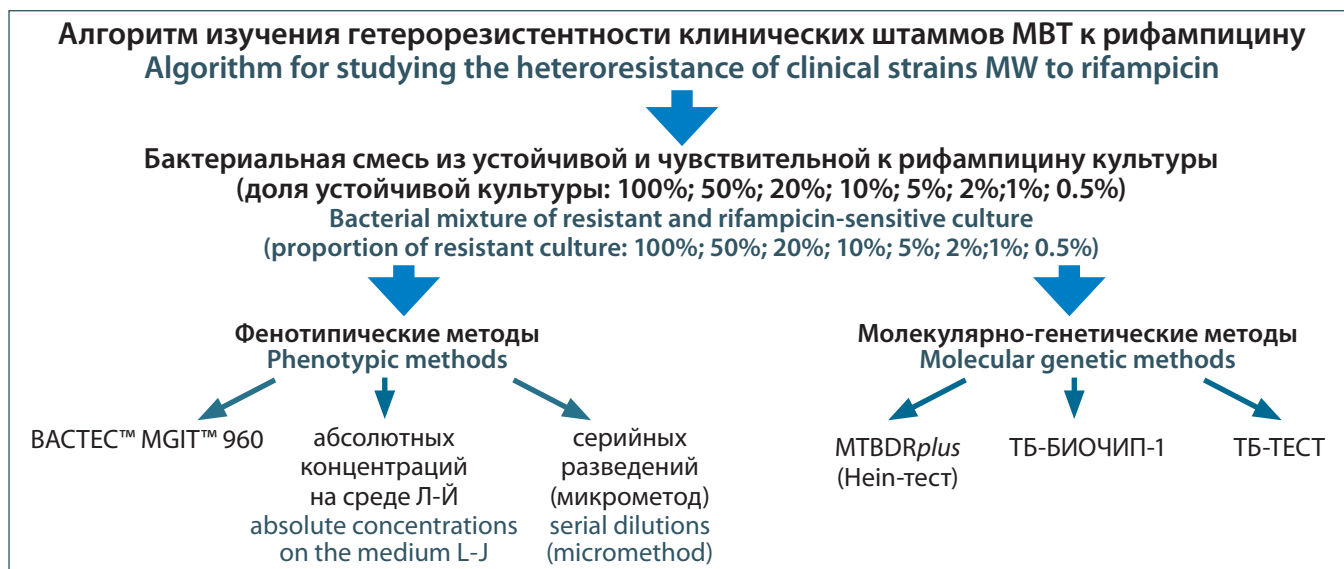


Рис. 1. Дизайн исследования

Figure 1. Research design

наиболее часто встречающиеся типы мутаций, детерминирующие устойчивость к R и изониазиду, которые регистрируются при наличии специфических полос с определенными мутациями (МУТ-зонды) и/или при отсутствии полос с соответствующими зондами дикого типа (Wt). Тест-системы «ТБ-ТЕСТ» и «ТБ-БИОЧИП-1» основаны на технологии гибридизации нуклеиновых кислот на биологических микрочипах. «ТБ-БИОЧИП-1» предназначена для определения 27 мутаций, детерминирующих устойчивость к R, и 11 мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду. «ТБ-ТЕСТ» позволяет одновременно определять расширенный спектр мутаций (суммарно 116 генетических детерминант устойчивости), ответственных за развитие лекарственной устойчивости к основным препаратам первого (изониазид, R, этамбутол) и второго (фторхинолоны, аминогликозиды и капреомицин) ряда, и устанавливать генотипы наиболее эндемичных для РФ штаммов МБТ. Секвенирование RRDR области гена *rpoB* проводили на секвенаторе GS Junior («Roche», Германия).

Фенотипическое определение чувствительности. Выявление устойчивости к R в гетерорезистентной популяции МБТ проводили тремя бактериологическими (культуральными) методами:

- 1) ускоренным методом с помощью автоматизированной системы БАСТЕС™ MGIT™ 960 в жидкой среде *M7H9* при использовании критической концентрации (КК) R 1,0 мкг/мл в соответствии с рекомендациями производителя [20];
- 2) традиционным методом абсолютных концентраций на плотной среде Л-Й при использовании КК R 40 мкг/мл согласно общепринятому стандарту [1];
- 3) методом серийных микроразведений (микрометод) в жидкой среде *M7H9* в стерильных 96-луночных планшетах при использовании 11 концентраций R в двукратных разведениях

(0,125 – 128 мкг/мл) с определением минимальной ингибирующей концентрации (МИК) препарата. МИК – самая низкая концентрация, ингибирующая видимый рост бактерий. Исследование было выполнено в соответствии с методикой, рекомендованной Европейским комитетом по определению чувствительности к антимикробным препаратам [18]. Чувствительными к R считали штаммы с МИК ≤ 1,0 мкг/мл.

Согласно методикам исследования, полученные гетерорезистентные суспензии засеивали на питательные среды и инкубировали при температуре 37 °С. Учет результатов исследования в анализаторе БАСТЕС™ MGIT™ 960 осуществлялся автоматически при максимальном времени инкубации посевов 14 дней. Результаты определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) методом абсолютных концентраций учитывали дважды – на 21-й и 28-й дни после посева. Результаты, полученные микрометодом, оценивали также дважды – на 14-й и 21-й дни с начала инкубации посевов.

Результаты исследования и обсуждение

По данным проведенного исследования гетерорезистентных бактериальных смесей (табл. 1), среди молекулярных тест-систем Genotype MTBDRplus показала наибольшую эффективность в обнаружении устойчивой популяции МБТ с наиболее часто встречаемыми мутациями Ser531Leu (mut3), His526Tyr (mut2A), His526Asp (mut2B), Asp516Val (mut1), которые идентифицируются с помощью специфических МУТ-зондов и детерминируют высокий уровень устойчивости к R [3, 21]. Предел обнаружения устойчивой популяции в изолятах составил 2% и 5% с мутацией Asp516Val, 5% – с заменами Ser531Leu и His526Tyr, 10% и 50% – для двух изолятов с His526Asp соответственно.

Остальные замены в RRDR области гена *rpoB* тест-системой определяются по отсутствию одного и/или нескольких из

Таблица 1. Эффективность обнаружения устойчивой популяции *M. tuberculosis* в бактериальной смеси различными микробиологическими методами (%)

Table 1. Efficiency of detection of a stable *M. tuberculosis* population in a bacterial mixture by various microbiological methods (%)

Номер смеси Mixture number	Тип мутации / семейство Mutation type / family	Результаты определения доли рифампицин-устойчивых штаммов в бактериальной смеси (%) Results of determining the proportion of rifampicin-resistant strains in the bacterial mixture (%)					
		MTBDRplus	ТБ-ТЕСТ	ТБ-БИОЧИП-1	БАСТЕС™ MGIT™ 960	Метод микроразведений* Micro-exploration method*	МАК** среда Л-Й MAC** environment L-J*
TB1	Ser531Leu / Beijing	10% – Δwt8/ mut3	5,0 Ser531Leu	5,0 Ser531Leu	2,0	0,5	10,0
TB1A	Ser531Leu / B0/ W148	5% – Δwt8/ mut3	5,0 Ser531Leu	5,0 Ser531Leu	0,5	0,5	0,5
TB2	Asp516Val / LAM	2% – Δwt3,4/ mut1	50,0 Asp516Val	50,0 Asp516Val	2,0	0,5	0,5
TB2A	Asp516Val / LAM	5% – Δwt3,4/ mut1	50,0 Asp516Val	50,0 Asp516Val	20,0	0,5	0,5
TB3	His526Arg / B0/ W148	100% – Δwt7	100,0 His526Arg	100,0 His526Arg	10,0	10,0	2,0
TB3A	His526Arg / B0/ W148	100% – Δwt7	50,0 His526Arg	50,0 His526Arg	5,0	5,0	5,0
TB4	His526Asp / Beijing	50% – Δwt7/ mut2B	100,0 His526Arg	100,0 His526Arg	1,0	0,5	5,0
TB4A	His526Asp / B0/ W148	10% – Δwt7/ mut2B	100,0 His526Arg	100,0 His526Arg	5,0	10,0	5,0
TB5	His526Tyr / B0/ W148	5% – Δwt7/ mut2A	100,0 His526Tyr	100,0 His526Tyr	2,0	1,0	0,5
TB5A	His526Tyr / Beijing	5% – Δwt7/ mut2A	100,0 His526Tyr	100,0 His526Tyr	2,0	2,0	нет результата*** no result***
TB6	His526Leu / E-A	100% – Δwt7	100,0 His526Leu	100,0 His526Leu	50,0	0,5	20,0 R
TB7	His526Cys / Ural	100% – Δwt7	50,0 His526Cys	50,0 His526Cys	100,0	0,5	S
TB8	Leu511Pro / Beijing	100% – Δwt2	50,0 Leu511Pro	100,0 Leu511Pro	S	S	S
TB8A	Leu511Pro / M515I / B0/W148	100% – Δwt2,3,4	50,0 Leu511Pro	20,0 Leu511Pro/ M515I	100,0 R	20,0	S
TB8B	Leu511Pro / Beijing	100% – Δwt2	100,0 Leu511Pro	100,0 Leu511Pro	S	S	S
TB8C	Leu511Pro / Beijing	100% – Δwt2	100,0 Leu511Pro	20,0 Leu511Pro	S	S	S
TB8D	Leu511Pro / E-A	100% – Δwt2	100,0 Leu511Pro	50,0 Leu511Pro	S	S	S
TB8E1	Leu511Pro / B0/ W148	100% – Δwt2,3,4	50,0 Leu511Pro	50,0 Leu511Pro	5,0	2,0	S

Примечание: * – при учете результатов определения ЛЧ на 21-й день инкубации посевов.

** – метод абсолютных концентраций, при учете результатов определения ЛЧ через 28 дней после посева.

*** – микробная контаминация посева, 1 – мутации Asp516Tyr, Asn518Asp выявлены после секвенирования.

В столбцах, содержащих результаты молекулярно-генетических методов (MTBDRplus, ТБ-ТЕСТ и ТБ-БИОЧИП-1) указаны минимальные доли популяции МБТ с наличием мутаций, ассоциируемых с устойчивостью к рифампицину.

В столбцах, содержащих результаты бактериологического исследования с помощью БАСТЕС™ MGIT™ 960, микрометода и метода абсолютных концентраций, указана минимальная доля фенотипически устойчивых МБТ; буквой S обозначены результаты в случае бактериологического определения наличия чувствительности культур к рифампицину.

Note: * – when taking into account the results of the determination of HP on the 21st day of incubation of crops.

** – the method of absolute concentrations, when taking into account the results of the determination of HP 28 days after sowing.

*** – microbial contamination of sowing, 1 – mutations Asp516Tyr, Asn518Asp were detected after sequencing.

The columns containing the results of molecular genetic methods (MTBDRplus, TB-TEST and TB-BIOCHIP-1) indicate the minimum proportions of the MBT population with the presence of mutations associated with resistance to rifampicin.

The columns containing the results of a bacteriological study using BASTES™ MGIT™ 960, micromethod and the method of absolute concentrations indicate the minimum proportion of phenotypically stable MBT; the letter S indicates the results in the case of bacteriological determination of the presence of sensitivity of cultures to rifampicin.

Таблица 2. Эффективность молекулярно-генетических тест-систем в обнаружении устойчивой к рифампицину популяции МБТ в гетерорезистентных бактериальных смесях (%)

Table 2. Effectiveness of molecular genetic test systems in detecting rifampicin-resistant MBT populations in heteroresistant bacterial mixtures (%)

Мутация в гене Mutation in the gene <i>rpoB</i>	Предел обнаружения резистентной популяции Limit of detection of a resistant population					
	Результаты проведенного исследования The results of the study			Результаты научной литературы Results of scientific literature		
	Genotype MTBDRplus	ТБ-ТЕСТ	ТБ-БИОЧИП-1	Genotype MTBDRplus	GeneXpert MTB/Rif	GeneXpert MTB/Rif Ultra
Ser531Leu	5-10	5	5	5	20-40	20-30
Asp516Val	2-5	50	50	5-10	70-80	40-50
His526Asp	10-50	100	100	5-10	40-60	40-60
His526Tyr	5	100	100	5-10	70-80	60-70

восьми зондов «дикого» типа, то есть без определения типа мутации. При этом наряду с несинонимичными мутациями (ассоциированными с устойчивостью) увеличивается вероятность обнаружения синонимичных, не приводящих к устойчивости, замен. Следовательно, для подтверждения, связана ли мутация с устойчивостью к препарату, необходим либо результат бактериологического тестирования ЛЧ, либо секвенирования (для определения типа мутации). Согласно проведенному исследованию в смесях, содержащих штаммы с мутациями His526Arg (TB3, TB3A), His526Leu (TB6) и His526Cys (TB7), отсутствовали зонды «дикого» типа Δwt7, в четырех смесях с мутацией Leu511Pro (TB8, TB8B, TB8C и TB8D) – Δwt2. В двух смесях TB8A и TB8E с этой же мутацией (Leu511Pro) отсутствовали три зонда «дикого» типа Δwt2, wt3, wt4. Секвенирование RRDR области гена *rpoB* подтвердило наличие в смеси TB8A замены Met515Ile и выявило в TB8E дополнительно две мутации Asp516Tyr и Asn518Asp, последняя из которых не приводит к устойчивости МБТ к Rif [2, 7]. Предел обнаружения резистентной популяции в смесях с отсутствием Δwt7 и Δwt2 или одновременно Δwt2, Δwt3 и Δwt4 зондов составил 100%.

В отличие от Genotype MTBDRplus, тест-системы «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-ТЕСТ» позволяют определять нуклеотидные замены (тип мутации), но только те, которые включены в мультиплексную ПЦР с последующей гибридизацией с соответствующими иммобилизованными зондами на биочипе. Обе тест-системы, как и Genotype MTBDRplus, показали наилучшие результаты для двух изолятов с мутацией Ser531Leu (встречается в 81–83% среди всех Rif-устойчивых штаммов), продемонстрировав способность выявлять 5% устойчивой популяции. Для обнаружения резистентной популяции МБТ с другими наиболее часто встречаемыми мутациями – Asp516Val (TB2, TB2A) и заменами His526Asp (TB4, TB4A), His526Tyr (TB5, TB5A) – для тестов необходимо присутствие более высокого содержания мутантов по сравнению с Genotype MTBDRplus, предел которых варьировал от 50 до 100%. Для смесей с редко встречаемыми мутациями His526Arg (TB3, TB3A), His526Leu (TB6) и His526Cys (TB7) необходимо их 100%-ное присутствие, что

сопоставимо с полученными данными с помощью Genotype MTBDRplus.

В четырех из шести бактериальных смесей с мутацией Leu511Pro получены переменные результаты: для тест-системы «ТБ-БИОЧИП-1» необходимо присутствие 20% (TB8C), 50% (TB8D) и 100% (TB8, TB8B) мутантной популяции, для «ТБ-ТЕСТ» – 50% (TB8) и 100% (TB8B, TB8C, TB8D). В смеси TB8A обе мутации Leu511Pro и Met515Ile определены только тестом «ТБ-БИОЧИП-1», так как замена Met515Ile не включена в «ТБ-ТЕСТ». Предел обнаружения мутантной популяции составил для «ТБ-БИОЧИП-1» 20%, для «ТБ-ТЕСТ» – 50%.

В бактериальной смеси TB8E, в которой тест-системой Genotype MTBDRplus «косвенно» определены и подтверждены секвенированием замены Leu511Pro, Asp516Tyr и Asn518Asp, обоими тестами определена только замена Leu511Pro. Мутация Asp516Tyr определяется обоими тестами, и ее отсутствие в смесях с разным соотношением мутантных популяций связано, вероятно, с недостаточным их количеством для ее детекции. Напротив, замена Asn518Asp не включена в мультиплексную ПЦР с последующей гибридизацией на биочипе в обоих тест-системах. Вместе с тем предел обнаружения резистентной популяции в бактериальной смеси составил 50% для «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-ТЕСТ», что в два раза выше по сравнению с результатами Genotype MTBDRplus.

Нами были сопоставлены полученные результаты с данными из литературы, посвященной эффективности молекулярно-генетических тест-систем, одобренных ВОЗ, в обнаружении устойчивости к Rif в гетерорезистентных бактериальных смесях (таблица 2). Следует отметить, что среди представленных в таблице тест-систем только Genotype MTBDRplus и GeneXpert MTB/Rif Ultra заявлены как тесты для диагностики гетерорезистентности. В отличие от GeneXpert MTB/Rif, тест-система GeneXpert MTB/Rif Ultra основана на анализе кривых плавления, благодаря чему возможна детекция устойчивости к Rif в гетерорезистентных популяциях МБТ.

Данные настоящего исследования и из литературы [12], представленные в таблице 2, демонстрируют сопоставимые

результаты обнаружения резистентной популяции с помощью Genotype MTBDRplus для всех четырех замен, а также ее преимущество в сравнении с GeneXpert MTB/Rif и GeneXpert MTB/Rif Ultra. Тест-системы «ТБ-ТЕСТ» и «ТБ-БИОЧИП-1» показали одинаковые результаты с Genotype MTBDRplus для мутации Ser531Leu (наличие 5% устойчивой популяции в смеси) и преимущество по сравнению с GeneXpert MTB/Rif и GeneXpert MTB/Rif Ultra. Предел обнаружения резистентной популяции с мутацией Asp516Val соотносится с результатами GeneXpert MTB/Rif и GeneXpert MTB/Rif Ultra, но уступает при обнаружении устойчивой популяции с мутациями в 526 кодоне His на Asp и Tyr.

Таким образом, можно констатировать, что эффективность молекулярно-генетического определения гетерорезистентности МБТ к Rif варьирует среди тест-систем. Это связано со способом детекции мутаций, направленным либо на выявление в первую очередь наиболее распространенных типов замен по МУТ-зондам в тесте Genotype MTBDRplus, либо одновременно всех типов мутаций, ассоциированных с резистентностью, в сложном многопараметрическом анализе на биочипе («ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-ТЕСТ»).

Результаты бактериологического исследования гетерорезистентных смесей показывают, что методы с использованием жидкой среды M7H9 в BACTEC™ MGIT™ 960 и серийных микро-разведений способны выявлять устойчивую популяцию МБТ лучше молекулярно-генетических тест-систем (табл. 1).

Из 18 клинических штаммов с различными типами мутаций в гене *rpoB*, 12 с заменами Ser531Leu, Asp516Val, His526Arg, His526Asp, His526Tyr, His526Leu, His526Cys и два в сочетании с Leu511Pro мутаций Met515Ile, Asp516Tyr, Asn518Asp (по данным секвенирования) были устойчивыми в системе BACTEC™ MGIT™ 960. Четыре штамма только с так называемой «спорной» заменой Leu511Pro в системе были чувствительными. По данным ряда авторов, «спорные» замены, выявляемые в МБТ, стали причиной расхождений как между молекулярными и фенотипическими, так и между различными бактериологическими результатами определения ЛЧ [2, 16, 19, 23]. Причина диссонанса результатов определения ЛЧ связана 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 [10, 19].

Были отмечены случаи неблагоприятных результатов лечения при использовании Rif в стандартном режиме у больных, выделяющих подобные штаммы [26]. J. van Ingen и соавт. (2011) на основе фармакокинетических расчетов оценки потенциала R для лечения туберкулеза было показано, что МИК препарата до 1 мкг/мл можно безопасно преодолеть, применяя дозу в 20 мг/кг в схемах лечения [25]. D.H. Jeong и соавт. (2018) в своей работе описали два случая излечения легочного туберкулеза у пациентов, выделяющих МБТ с мутацией Leu511Pro в *rpoB*,

в режим терапии которых был включен Rif в повышенной дозе – 20 мг/кг в сутки [11].

Известно, что один процент устойчивых клеток в микобактериальной популяции является критическим уровнем, сверх которого клинический эффект химиотерапии будет отрицательным или маловероятным [5]. В бактериологии критическую пропорцию 1% (10% для пиразинамида) используют для дифференциации чувствительных и устойчивых штаммов МБТ при тестировании методом пропорций на среде, содержащей противотуберкулезный препарат в КК. Превышение порогового значения 1% характеризует штамм как устойчивый. На плотных средах Л-Й и агаровых с помощью метода пропорций возможно определять гетерорезистентность. Однако из-за трудоемкости этот метод не используют в повседневной практике микобактериологических лабораторий нашей страны. Для традиционного в России метода абсолютных концентраций обнаружение более 20 колониеобразующих единиц МБТ (что соответствует пропорции 1%) к моменту оценки роста на плотной питательной среде Л-Й, содержащей препарат в КК, свидетельствует о наличии лекарственной устойчивости. Тем не менее при тестировании ЛЧ этим методом о присутствии гетерорезистентной популяции можно судить косвенным образом путем сравнения интенсивности роста МБТ в контрольной пробирке с питательной средой Л-Й без препарата и в опытной пробирке – с препаратом. Отметим, что принцип определения ЛЧ с помощью автоматизированной системы BACTEC™ MGIT™ 960 разработан на основе метода пропорций.

Результаты изучения чувствительности гетерорезистентных суспензий МБТ к R бактериологическими методами представлены в таблице 3. При использовании автоматизированной системы BACTEC™ MGIT™ 960 только в двух гетерорезистентных смесях с заменами Ser531Leu (TB1A) и His526Asp (TB4) обнаружен 1% устойчивых особей. Для устойчивой популяции с мутациями также с Ser531Leu (TB1) и двумя Asp516Val (TB2) и His526Tyr (TB5 и TB5A) предел обнаружения составил 2%. Таким образом, у значительной части – 9 (64,3%) из 14 (с подтвержденной фенотипической устойчивостью) гетерорезистентных смесей – устойчивость была определена при наличии 5% и менее резистентных бактерий, что в целом обеспечивает высокий уровень выявления таковых в BACTEC™ MGIT™ 960. В суспензии TB6 со «спорной» мутацией His526Leu в системе BACTEC™ MGIT™ 960 устойчивость выявлена только при наличии 50% и более мутантных МБТ, а с заменой His526Cys (TB7) – только в присутствии 100% этой популяции. В двух смесях TB8A и TB8E, также со «спорной» мутацией Leu511Pro, но с дополнительными заменами, устойчивость обнаружена при наличии разных долей мутантных особей: в одной суспензии только при наличии 100% популяции с Leu511Pro и Met515Ile, а в другой – уже при 5% с тремя заменами Leu511Pro, Asp516Tyr

Таблица 3. Результаты определения доли устойчивой популяции *M. tuberculosis* к рифампицину в гетерорезистентных суспензиях бактериологическими методами

Table 3. Results of determination of the proportion of *M. tuberculosis* resistant population to rifampicin in heteroresistant suspensions by bacteriological methods

Рифампицин- устойчивые МБТ Rifampicin- resistant MBT	Результат исследования чувствительности The result of the sensitivity study																	
	Ser531Leu		Asp 516Val		His526								Leu511Pro					
	TB1	TB1A	TB2	TB2A	Arg		Asp		Tyr		Leu	Cys	TB8	M515I	TB8B	TB8C	TB8D	TB8E1
					TB3	TB3A	TB4	TB4A	TB5	TB5A	TB6	TB7		TB8A				
БАСТЕС™ MGIT™ 960, n = 144																		
Доля устойчивых культур составила 65 (45,1%; ДИ 37,2–53,4) The part of sustainable crops was 65 (45,1%; CI 37,2–53,4)																		
100%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R
50%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	–	S	–	–	–	R
20%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	–	S	–	–	–	R
10%	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	–	S	–	–	–	R
5%	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	–	S	–	–	–	R
2%	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	–	S	–	–	–	S
1%	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	–	S	–	–	–	S
0,5%	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	–	S	–	–	–	S
Метод абсолютных концентраций (учет результатов на 21-й день инкубации), n = 136 The method of absolute concentrations (taking into account the results on the 21st day of incubation), n = 136																		
Доля устойчивых культур составила 24 (17,7%; ДИ 12,2–24,9) The part of sustainable crops was 24 (17,7%; CI 12,2–24,9)																		
100%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	S	S	S	S	S	S	S
50%	S	R	R	R	R	S	S	R	R	X	S	S	–	S	–	–	–	S
20%	S	R	R	S	S	S	S	S	R	X	S	S	–	S	–	–	–	S
10%	S	S	R	S	S	S	S	S	R	X	S	S	–	S	–	–	–	S
5%	S	S	R	S	S	S	S	S	R	X	S	S	–	S	–	–	–	S
2%	S	S	S	S	S	S	S	S	R	X	S	S	–	S	–	–	–	S
1%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	S	S	–	S	–	–	–	S
0,5%	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	S	S	–	S	–	–	–	S
Метод абсолютных концентраций (учет результатов на 28-й день инкубации), n = 136 The method of absolute concentrations (taking into account the results on the 28st day of incubation), n = 136																		
Доля устойчивых культур составила 60 (44,1%; ДИ 36,1-52,5) The part of sustainable crops was 60 (44,1%; CI 36,1-52,5)																		
100%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	S	S	S	S	S	S	S
50%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	S	–	S	–	–	–	S
20%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	S	–	S	–	–	–	S
10%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	S	S	–	S	–	–	–	S
5%	S	R	R	R	R	R	R	R	R	X	S	S	–	S	–	–	–	S
2%	S	R	R	R	R	S	S	S	R	X	S	S	–	S	–	–	–	S
1%	S	R	R	R	S	S	S	S	R	X	S	S	–	S	–	–	–	S
0,5%	S	R	R	R	S	S	S	S	R	X	S	S	–	S	–	–	–	S

и Asn518Asp. Это обстоятельство свидетельствует об увеличении степени устойчивости в присутствии более одной мутации в гене *groV*, что подтверждается значениями МИК при исследовании методом микроразведений (смеси TB8A и TB8E) и позволяет выявлять резистентность в системе БАСТЕС™ MGIT™ 960.

По данным Z. Zhang и соавт., пределы обнаружения резистентной популяции к R для суспензий с мутацией Ser531Leu составили 2–20%, Asp516Val – 10% и His526Arg – 0,5–10%, что является близким к нашим результатам исследования [27].

Методом абсолютных концентраций на плотной питательной среде Л-Й способность обнаруживать 1% устойчивой популяции МБТ к Rif в смесях, по сравнению с результатами в БАСТЕС™ MGIT™ 960, зависит от времени инкубации посевов. При учете результатов на 21-й день ни у одной из изученных суспензий не был обнаружен 1% устойчивых МБТ. Увеличение времени инкубации до 28 дней позволило выявить резистентную популяцию с мутациями в четырех смесях: TB1A с Ser531Leu, TB2 и TB2A с Asp 516Val, TB5 с His526Tyr. При разных сроках учета результатов в смесях TB7 с мутацией His526Cys

Таблица 3. Продолжение

Table 3. Continuation

Рифампицин- устойчивые МБТ Rifampicin- resistant MBT	Результат исследования чувствительности The result of the sensitivity study																		
	Ser531Leu				Asp 516Val				His526						Leu511Pro				
	TB1	TB1A	TB2	TB2A	Arg		Asp		Tyr		Leu	Cys	TB8	M515I	TB8B	TB8C	TB8D	TB8E1	
					TB3	TB3A	TB4	TB4A	TB5	TB5A	TB6	TB7		TB8A					
Метод серийных микроразведений (учет результатов на 14-й день инкубации), n = 144 Serial micro-breeding method (accounting for results on the 14th day of incubation), n = 144																			
Доля устойчивых культур составила 56 (38,9%; ДИ 31,3–47,0) The part of sustainable crops was56 (38,9%; CI 31,3–47,0)																			
100%	>128	128*	128	32	64	64	128	16	128	32	16	4	0,5	2	0,25	0,25	0,25	32	
50%	128	128	128	16	0,25	1	128	0,25	128	8	16	4	0,25	2	0,25	0,25	0,25	0,5	
20%	128	64	64	16	0,25	1	32	0,25	128	8	8	2	0,25	0,5	0,25	0,25	≤0,12	0,5	
10%	128	32	64	8	0,25	0,5	32	0,25	128	0,5	8	2	0,25	0,12	0,25	0,25	≤0,12	0,25	
5%	128	8	64	8	0,25	0,5	2	0,25	64	0,5	4	2	0,25	0,12	0,25	0,25	≤0,12	0,25	
2%	64	0,5	16	2	0,25	0,25	1	0,25	64	0,5	2	1	0,25	0,12	0,25	0,25	≤0,12	0,25	
1%	8	0,5	0,5	1	0,25	0,25	1	0,25	0,5	0,5	1	1	0,25	0,12	0,25	0,25	≤0,12	0,25	
0,5%	8	0,5	0,5	1	0,25	0,25	1	0,25	0,25	0,5	1	1	0,25	0,12	0,25	0,25	≤0,12	0,25	
Метод серийных микроразведений (учет результатов на 21-й день инкубации), n = 144 Serial micro-breeding method (accounting for results on the 21th day of incubation), n = 144																			
Доля устойчивых культур составила 91 (63,2%; ДИ 55,2–70,6) The part of sustainable crops was 91 (63,2%; CI 55,2–70,6)																			
100%	>128	128	128	32	>128	>128	128	64	>128	32	32	8	0,5	4	0,5	0,5	0,5	64	
50%	>128	128	128	32	16	128	128	16	>128	32	32	8	0,5	4	0,25	0,5	0,5	32	
20%	>128	64	128	32	16	64	32	16	>128	16	16	8	0,25	2	0,5	0,5	0,5	32	
10%	>128	32	64	16	8	8	32	4	>128	16	16	4	0,25	0,12	0,25	0,5	0,25	32	
5%	>128	8	64	16	0,5	8	32	0,5	>128	2	16	4	0,25	0,12	0,25	0,5	0,25	16	
2%	>128	8	64	16	0,5	1	8	0,5	>128	2	8	4	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	8	
1%	>128	8	64	16	0,5	1	4	0,5	>128	1	8	4	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	
0,5%	>128	8	64	8	0,5	1	4	0,5	1	1	2	2	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	

Примечание: R – устойчивый, S – чувствительный, * – значение МИК, X – микробная контаминация посева, 1 – мутации Asp516Tyr, Asn518Asp выявлены после секвенирования.
Note: R – resistant, S – sensitive, * – MIC value, X – microbial contamination, 1 – mutations Asp516Tyr, Asn518Asp were detected after sequencing.

и TB8A, TB8E с Leu511Pro и дополнительными заменами устойчивости обнаружена не была даже при содержании 100% мутантной популяции, тогда как определена с помощью Bactec MGIT 960 и микрометода, значения МИК Rif которых составили 4, 2 и 32 мкг/мл при минимальном количестве дней инкубации (14 дней). Эти данные показывают, что с помощью метода абсолютных концентраций у штаммов с данными мутациями возможны ложно чувствительные результаты. Исследование также продемонстрировало, что в отношении бактериальных смесей, содержащих 10% и менее устойчивых особей, с самой распространенной и часто выявляемой в РФ мутацией Ser531Leu, получить результаты устойчивости на 21-й день не удалось. Стоит заметить, что первоначально результаты чувствительности МБТ учитывали через 4–6 недель после посева [6]. Данные о ЛЧ для суспензии TB5A с мутацией His526Tyr получить не удалось из-за контаминирования посева посторонней микрофлорой.

Определение методом серийных микроразведений также показало, что недельная отсрочка учета чувствительности по-

ложительно сказывалась на результатах исследования. Продление времени культивирования посевов позволило размножиться менее многочисленной резистентной популяции. Так, рекомендованный как критерий 1% устойчивых особей обнаружен только в одной смеси TB1 с мутацией Ser531Leu (МИК 8 мкг/мл) при учете результатов на 14-й день, тогда как при учете на 21-й день в 8 смесях: TB1, TB1A, TB2, TB2A, TB4, TB5, TB6, TB7 с мутациями Ser531Leu, Asp516Val, His526Asp, His526Tyr, His526Leu, His526Cys (МИК от 4 до >128 мкг/мл). При максимальном количестве дней инкубации посевов (21 день) у 13 (92,8%) из 14 (с подтвержденной фенотипической устойчивостью) гетерорезистентных смесей с МИК от 4 до >128 устойчивость была обнаружена при наличии в популяции 10% и менее резистентных особей, а у 7 суспензий с МИК – от 2 до >128 мкг/мл – даже при 0,5%. Как видно из таблицы 3, чем меньше процент устойчивых бактерий в суспензии, тем меньше значение МИК препарата, что свидетельствует о присутствии большего количества чувствительной популяции МБТ в гетерорезистентной культуре и наоборот. Поэтому в клинической практике

нередко значения МИК среди штаммов с одной и той же мутацией, например, с часто встречаемой Ser531Leu, варьируют от минимальных (примерно 3,6% штаммов) до максимальных значений, что свидетельствует о гетерорезистентности МБТ в образце пациента [3].

Следует отметить, что при тестировании гетерорезистентных смесей тремя бактериологическими методами Bactec MGIT 960, абсолютных концентраций при учете ЛЧ на 28-й и серийных микроразведений на 21-й день культивирования (таблица 1) у 9 (69,2%) из 13 смесей (ТБ5А не учитывали из-за контаминации) с фенотипической устойчивостью были получены близкие результаты выявления резистентной популяции МБТ (от 0,5 до 10% бактерий).

Заключение

Эффективность определения гетерорезистентности МБТ к Rif зависит от используемого в тест-системе способа детекции мутаций. Тест-системы Genotype MTBDRplus, «ТБ-ТЕСТ» и «ТБ-БИОЧИП-1» показали одинаковые результаты выявле-

ния устойчивой популяции с мутацией Ser531Leu. Genotype MTBDRplus эффективнее определяет замены His526Tyr, His526Asp, Asp516Val и менее эффективно мутации, определяемые по отсутствию зондов «дикого» типа по сравнению с «ТБ-ТЕСТ» и «ТБ-БИОЧИП-1». Среди бактериологических методов метод серийных микроразведений в жидкой среде Миддлбука 7H9 показал наибольшую эффективность при выявлении устойчивости к Rif в гетерорезистентной популяции МБТ при культивировании посевов 21 день, по сравнению с автоматизированной системой Bactec MGIT 960 и методом абсолютных концентраций на плотной среде Л-Й при культивировании посевов 28 дней: доля выявленных устойчивых культур МБТ к Rif составила 63,2; 45,1 и 44,1% соответственно. Доля выявляемых устойчивых штаммов МБТ с помощью Bactec MGIT 960, методом абсолютных концентраций на плотной среде Л-Й при культивировании посевов 28 дней и методом серийных микроразведений при культивировании посевов 14 дней существенно не различалась и составила 45,1, 44,1 и 38,9% соответственно.

Литература

1. Определение лекарственной чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам / Приказ № 109 Минздрава России от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». – М., 2003. – С. 186-198.
2. Andres S., Hillemann D., Rüscher-Gerdes S. et al. Occurrence of *rpoB* mutations in isoniazid-resistant but rifampin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Germany // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58. – P. 590-592.
3. Cambau E., Viveiros M., Machado D. et al. Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European multicentre study // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2015. – Vol. 70. – P. 686-696.
4. Campbell E.A., Korzheva N., Mustaev A. et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase // *Cell.* – 2001. – Vol. 104. – N. 6. – P. 901-912.
5. Canetti G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis // *Am. Rev. Resp. Dis.* – 1965. – Vol. 5. – P. 687-703.
6. Canetti G., Froman S., Grosset J. et al. *Mycobacteria: Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance* // *Bull WHO.* – 1963. – Vol. 29. – P. 565-578.
7. Cavusoglu C., Karaca-Derici Y., Bilgic A. In-vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2004. – Vol. 10. – N. 7. – P. 662-665. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.00917.x.
8. Folkvardsen D.B., Thomsen V.O., Rigouts L. et al. Rifampin heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* cultures as detected by phenotypic and genotypic drug susceptibility test methods // *J. Clin. Microbiol.* – 2013. – Vol. 51. – N. 12. – P. 4220-4222.
9. Hofmann-Thiel S., van Ingen J., Feldmann K. et al. Mechanisms of heteroresistance to isoniazid and rifampin of *Mycobacterium tuberculosis* in Tashkent, Uzbekistan // *Eur. Respir. J.* – 2009. – Vol. 33. – N. 2. – P. 368-374.
10. Jamieson F.B., Guthrie J.L., Neemuchwala A. et al. Profiling of *rpoB* mutations and MICs for rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 52. – P. 2157-2162.
11. Jeong D.H., Kang Y.W., Kim J.Y. et al. Successful Treatment with a High-dose Rifampin-containing regimen for Pulmonary Tuberculosis with a Disputed *rpoB* Mutation // *Intern. Med.* – 2018. – Vol. 57(22). – P. 3281-3284.
12. Kamela C.S.Ng., Supply Ph., Cobelens F.G.J. et al. How well do routine molecular diagnostics detect rifampin heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*? // *J. Clin. Microbiol.* – 2019. – Vol. 57. – N. 11: e00717-19. doi: 10.1128/JCM.00717-19.
13. Kao C.Y., Lee A.Y., Huang A.H. et al. Heteroresistance of *Helicobacter pylori* from the same patient prior to antibiotic treatment. // *Infect. Genet. Evol.* – 2014. – Vol. 23. – P.196-202.
14. Kumar P., Balooni V., Kumar B. et al. High degree of multi-drug resistance and hetero-resistance in pulmonary TB patients from Punjab state of India // *Tuberculosis (Edinb.)*. – 2014. – Vol. 94. – N. 1. – P. 73-80.
15. Mekonnen D., Admassu A., Mulu W. et al. Multidrug-resistant and heteroresistant *Mycobacterium tuberculosis* and associated gene mutations in Ethiopia. // *Intern. J. Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 39. – P. 34-38.
16. Ocheretina O., Escuyer V. E., Mabou M.M. et al. Correlation between genotypic and phenotypic testing for resistance to rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Haiti: investigation of cases with discrepant susceptibility results // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – N. 3. – e9056.
17. Post F.A., Willcox P.A., Mathema B. et al. Genetic polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with chronic multidrug-resistant tuberculosis // *J. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 190. – N. 1. – P. 99-106.

18. Reference protocol for MIC determination of anti-tuberculous agents against isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in Middlebrook 7H9 broth. EUCAST. Version 6.1. 4th of July, 2019. [Электронный ресурс] URL: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Mycobacteria/Methods_in_AMST/Technical_protocol_AMST_MIC_reference_method_190719.pdf (Дата обращения 20.09.2022).
19. Rigouts L., Gumusboga M., Bram de Rijk W. et al. Rifampin resistance missed in automated liquid culture system for *Mycobacterium tuberculosis* isolates with specific *rpoB* mutations // *J. Clinical Microbiol.* – 2013. – Vol. 51. – N. 8. – P. 2641-2645.
20. Siddiqi S. H., Rusch-Gerdes S., Alexander H. et al. MGIT Procedure Manual for BACTEC™MGIT™ 960 TB System (Also applicable for Manual MGIT) – 2006. [Электронный ресурс] URL: https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf (Дата обращения 20.09.2022).
21. Springer B., Calligaris-Maibach R., Ritter C. et al. Tuberculosis drug resistance in an area of low endemicity in 2004 to 2006: semiquantitative drug susceptibility testing and genotyping // *J. Clinical Microbiol.* – 2008. – Vol. 46. – N. 12. – P. 4064-4067.
22. Telenti A., Imboden P., Marchesi F. et al. Detection of rifampicin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* // *Lancet.* – 1993. – Vol. 341. – P. 647-651.
23. Van Deun A., Barrera L., Bastian I. et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains with highly discordant rifampin susceptibility test results // *J. Clinical Microbiol.* – 2009. – Vol. 47. – N. 11. – P. 3501-3506.
24. Van Deun A., Decroo T., Piubello A. et al. Principles for constructing a tuberculosis treatment regimen: the role and definition of core and companion drugs // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2018. – Vol. 22. – P. 239-245.
25. Van Ingen J., Aarnoutse R., de Vries G. et al. Low-level rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains raise a new therapeutic challenge // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2011. – Vol. 15. – N. 7. – P. 990-992.
26. Williamson D.A., Roberts S.A., Bower J.E. et al. Clinical failures associated with *rpoB* mutations in phenotypically occult multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2012. – Vol. 16. – N. 2. – P. 216-220.
27. Zhang Z., Wang Y., Pang Yu. et al. Comparison of different drug susceptibility test methods to detect rifampin heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2014. – Vol. 58. – N. 9. – P. 5632-5635.

Об авторах

Исакова Александра Ивановна – врач клинической лабораторной диагностики Централизованной бактериологической лаборатории туберкулеза ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Строммынка, д. 10

Тел. +7 (499) 268-70-33, тел./факс +7 (499) 785-20-82

e-mail: isakovaaleks@gmail.com

Михайлова Юлия Дмитриевна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Строммынка, д. 10

Тел. +7 (499) 268-70-33, тел./факс +7 (499) 785-20-82

e-mail: juliaisaeva81@rambler.ru

Галкина Ксения Юрьевна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Строммынка, д. 10

Тел./факс +7 (499) 785-20-82

e-mail: crazytare@mail.ru

Носова Елена Юрьевна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Строммынка, д. 10

Тел. +7 (495) 603-30-33, тел./факс +7 (499) 785-20-82

e-mail: rna68@rambler.ru

Сафонова Светлана Григорьевна – заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулеза ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Строммынка, д. 10

Тел. +7 (499) 268-08-16, тел./факс +7 (499) 785-20-82

e-mail: safonova.s.g@inbox.ru