

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ И МЕТОДЫ ЕЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ У *M. TUBERCULOSIS*

Е.Ю. Носова, М.Б. Гикало, А.А. Хахалина, К.Ю. Галкина, С.Г. Сафонова

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

MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING EXTENSIVELY DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS, AND ASSAYS AVAILABLE FOR ITS DETECTION

E.Yu. Nosova, M.B. Gikalo, A.A. Hahalina, K.Yu. Galkina, S.G. Safonova

В условиях повсеместного распространения лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* необходимо четкое понимание молекулярных основ развития устойчивости возбудителя к различным группам противотуберкулезных препаратов. Устойчивость *M. tuberculosis* к фторхинолонам, как правило, вызвана различными мутациями в генах *gyrA* и *gyrB*, преимущественно в QRDR области. Устойчивость *M. tuberculosis* к аминогликозидам/капреомицину может быть связана с мутациями в гене *rrs*, промоторной области гена *eis*, а в редких случаях в гене *tlyA*. В клинической практике для выявления мутаций, связанных с устойчивостью *M. tuberculosis* к фторхинолонам и аминогликозидам/капреомицину могут быть использованы тест-системы ТБ-БИОЧИП2 (только для фторхинолонов) и GenoType MTBDRsl.

Ключевые слова: широкая лекарственная устойчивость, фторхинолоны, аминогликозиды, капреомицин, молекулярные механизмы.

Важной особенностью туберкулеза является тот факт, что, в отличие от многих других инфекционных заболеваний, круг лекарственных препаратов, эффективных в отношении *M. tuberculosis* (МБТ), достаточно ограничен, поэтому своевременное определение профиля лекарственной чувствительности (ЛЧ) является задачей первостепенного значения [12].

Повсеместное распространение туберкулеза с лекарственной устойчивостью (ЛУ) МБТ, особенно с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), т.е. устойчивостью к основным противотуберкулезным препаратам первого ряда – рифампицину и изониазиду – чрезвычайно обострило проблему раннего выявления и определения спектра ЛУ МБТ.

Сочетание МЛУ с устойчивостью МБТ к фторхинолонам и, по крайней мере, к одному из препаратов группы аминогликозидов / капреомицин обозначается термином «широкая лекарственная устойчивость» (ШЛУ). Туберкулез с ШЛУ МБТ требует проведения длительной дорогостоящей терапии и имеет неблагоприятный прогноз [17].

Фторхинолоны считаются краеугольным камнем терапии туберкулеза с МЛУ МБТ [5, 12, 29]. Мишенью действия этой

Considering the growing outspread of drug-resistant strains of *M. tuberculosis*, a clear understanding of the molecular mechanisms underlying drug-resistance of the pathogen to different groups of antibiotics is crucial. Fluoroquinolone-resistant *M. tuberculosis* generally harbor various mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes, mostly in the QRDR region. *M. tuberculosis* resistance to aminoglycosides/capreomycin is commonly associated with mutations in the *rrs*, gene, the *eis* promoter region, and occasionally in the *tlyA* gene. Two assays are available for the detection of mutations leading to fluoroquinolone and aminoglycoside resistance in clinical practice: the TB-BIOCHIP2 (only for fluoroquinolones) and the GenoType MTBDRsl.

Keywords: XDR-tuberculosis, fluoroquinolones, aminoglycosides, capreomycin, molecular assays.

группы препаратов в бактериальной клетке являются топоизомеразы II и IV, относящиеся к топоизомеразам II типа, временно разрезающим обе нити ДНК. Топоизомеразы – это ферменты, играющие центральную роль в архитектуре хромосом и непосредственно влияющие на такие фундаментальные процессы как репликация и рекомбинация ДНК. Они влияют на топологию ДНК, изменяя число зацеплений одной нити ДНК за другую. Основной функцией всех топоизомераз является предотвращение запутывания ДНК. У большинства видов бактерий присутствуют топоизомераза II (гираза) и топоизомераза IV. Однако у МБТ нет топоизомеразы IV, а есть только гирана. Гирана представляет собой тетрамер, состоящий из двух субъединиц А и двух субъединиц В, которые кодируются генами *gyrA* (2517 п.н.) и *gyrB* (2060 п.н.) соответственно [12, 38].

Гирана образует с молекулой ДНК комплекс, внутри которого нить ДНК находится в расщепленном состоянии. Этот комплекс является мишенью для присоединения не только различных белков, но и фторхинолонов. Формирование комплекса фторхинолон+гирана+ДНК приводит к блоку репликации ДНК, остановке РНК-полимеразы и прекращению

клеточного роста. Длительное блокирование синтеза ДНК и РНК в конечном счете приводит к гибели клетки [38].

Второй механизм бактерицидного действия, запускающийся при более высоких концентрациях фторхинолонов – это фрагментация хромосом и последующий выброс активных форм кислорода [20].

Появление мутаций в генах, кодирующих субъединицы гиразы, приводит к изменению ее пространственной структуры, что препятствует связыванию фторхинолонов с ферментом. Это основной механизм развития ЛУ МБТ к фторхинолонам, он наблюдается у 42–100% устойчивых штаммов МБТ, в зависимости от особенностей популяции [21]. В этом случае, как правило, развивается устойчивость ко всем препаратам группы. В настоящее время охарактеризовано значительное количество разнообразных мутаций в генах *gyrA* и *gyrB*, связанных с развитием ЛУ МБТ к фторхинолонам. Подавляющее большинство мутаций сосредоточено в QRDR области (*Quinolone Resistance-Determining Region* – область, ответственная за ЛУ к фторхинолонам) гена *gyrA* (320 п.н.), содержащей полиморфные кодоны 74, 88, 90, 91, 94 и 95. Кодон 95 содержит естественно-обусловленный полиморфизм Ser→Thr, не влияющий на ЛЧ МБТ к фторхинолонам [21].

Давно известны такие нуклеотидные замены в QRDR области гена *gyrA*, как Ala74Ser, Ala90Val, Ser91Pro, Asp94Gly, Asp94Ala, Asp94Tyr, Asp94Asn, Asp94His [84], Gly88Cys [30, 35, 33, 10], а недавно были описаны замены Gly88Ala и His70Arg [23, 25, 36]. Мутации в 90, 91 и 94 кодонах безусловно связаны с ЛУ ко всем препаратам группы фторхинолонов [7].

Кроме того, описаны несколько мутаций вне QRDR *gyrA*, вызывающие ЛУ к фторхинолонам [4, 17, 21, 31, 34, 36].

В литературе, особенно в последние годы, широко обсуждается вопрос о влиянии мутаций в QRDR гена *gyrB* (375 п.н.) на чувствительность МБТ к препаратам фторхинолонового ряда, а также о степени этого влияния. Замены в гене *gyrB* встречаются как самостоятельно, так и в сочетании с мутациями в *gyrA* [21, 34]. Доля таких штаммов среди всех МБТ, устойчивых к этой группе препаратов, составляет около 7% [35], однако, роль некоторых из них в развитии устойчивости остается спорной. Так, замены в кодоне Arg485Cys и Arg485Asn были обнаружены только в устойчивых к офлоксацину штаммах МБТ из разных регионов мира и никогда не встречались в чувствительных штаммах, тогда как Arg485Leu была обнаружена как в устойчивых, так и в чувствительных штаммах [6, 8]. А результаты исследования, проведенного А. Pantel и соавт. [27], поставили под сомнение роль обнаруженных ранее в устойчивых к фторхинолонам клинических изолятах МБТ замен Asp473Asn, Pro478Ala, Arg485His, Ser486Phe, Ala506Gly, Ala547Val, Gly551Arg и Gly559Ala [27].

Кроме того, остается открытым вопрос о перекрестной ЛУ штаммов МБТ с различными мутациями в генах *gyrA* и *gyrB* ко

всей группе фторхинолонов. Так, замены Asp500His и Asp500Asn в *gyrB* МБТ приводят к устойчивости только к левофлоксацину и офлоксацину, а Asn538Lys и Tre540Asp – только к моксифлоксацину. Недавно описанная мутация Ala74Ser в гене *gyrA* связана с низким уровнем ЛУ МБТ исключительно к моксифлоксацину, а сочетание этой замены с Asp94Gly в ДНК МБТ обуславливает перекрестную ЛУ ко всем фторхинолонам [21]. Такая избирательная ЛУ, описанная для отдельных мутаций в генах, кодирующих субъединицы гиразы, по всей видимости, связана с тонкими различиями в механизме действия разных препаратов из группы фторхинолонов на молекулярном уровне.

По данным, полученным в лаборатории Московского научно-практического центра борьбы с туберкулезом (МНПЦБТ), у 95% (36 из 38) офлоксацин-устойчивых изолятов МБТ были обнаружены мутации в гене *gyrA*, в 5% (два из 38) – в гене *gyrB*. Замена Arg485His была выявлена в офлоксацин-чувствительном изоляте МБТ. В четырех устойчивых образцах встречались двойные замены [26].

Можно с уверенностью сказать, что при появлении, по крайней мере, двух мутаций в гене *gyrA* или мутаций в *gyrA* и *gyrB* одновременно всегда развивается высокий уровень устойчивости МБТ к фторхинолонам. [6, 7, 34].

Даже полное секвенирование генов *gyrA* и *gyrB* не всегда дает исчерпывающий ответ о причинах развития ЛУ штамма МБТ к фторхинолонам. Очевидно, в этот процесс вовлечены также другие механизмы. В качестве возможных называют мимикрию ДНК и усиленное выведение препарата из клетки с помощью эффлюксных помп [12, 13]. Однако все исследования, касающиеся этих предполагаемых механизмов развития ЛУ МБТ к фторхинолонам, были проведены на лабораторных штаммах *in vitro*, и нет никаких сведений о том, какова их роль *in vivo*.

Поэтому, исходя из имеющихся на сегодняшний день знаний и технических возможностей, одновременное выявление мутаций в генах *gyrA* и *gyrB* может дать наиболее полную информацию об исследуемом штамме и повысить корреляцию с фенотипическим определением ЛУ МБТ к данным препаратам.

Вторая широко применяющаяся в клинической практике группа ПТП резервного ряда это – аминогликозиды (канамицин и амикацин) и антибиотик полипептидной структуры капреомицин. Эти разные по химической структуре препараты объединены общим механизмом действия, заключающимся в связывании с 16S-pPHK в составе 30S-рибосомы и блокировании синтеза белка в бактериальной клетке.

Основным механизмом развития ЛУ МБТ к аминогликозидам и капреомицину является возникновение мутаций в гене 16S-pPHK (*rrs*) [32]. Появление в геноме бактерии такой мутации неизбежно вызывает ЛУ к высоким дозам аминогликозидов, поскольку у МБТ, как и у других медленно растущих микробактерий, имеется только одна копия гена *rrs* [15]. У штаммов с мутациями в гене *rrs*, как правило, наблюдается перекрестная

ЛУ ко всем препаратам данной группы. Чаще всего встречается однонуклеотидные замены A1401G, G1484T, C1402T, C1402A. В отдельных работах упомянуты замены A1196G, T1322C (+A1401G) [3] C516T [19], C514T [16], влияние которых на ЛУ МБТ к аминогликозидам и капреомицину не вполне ясно.

Устойчивость штаммов МБТ к амикацину и капреомицину, за редкими исключениями, всегда удается объяснить возникновением мутаций в гене *rrs*. Однако примерно у 15–20% фенотипически устойчивых к канамицину штаммов мутации в гене 16S-рРНК не обнаруживаются.

В 2009 году М. Zaunbrecher и соавт. опубликовали работу, в которой показали влияние мутаций, обнаруженных в промоторной области гена *eis*, на развитие ЛУ МБТ к невысоким дозам канамицина. Ген *eis* кодирует ацетилтрансферазу, специфичную в отношении канамицина. Появление мутаций в промоторной области гена приводит к многократному увеличению его экспрессии и, следовательно, к накоплению фермента и нарастанию его эффекта, т.е., в конечном счете, к инактивации антибиотика [37]. В литературе описан целый ряд замен в промоторной области гена *eis*, однако роль некоторых из них в развитии ЛУ МБТ к канамицину дискуссионна. В ДНК МБТ обнаруживают замены G10A, C14T, G37T, C2A (+C14T) и C12T, причем C12T в большинстве случаев не приводит к развитию ЛУ МБТ к канамицину [3, 16, 37]. По данным лаборатории МНПЦБТ, мутации в промоторной области гена *eis* встречаются в 29% (10 из 34) устойчивых к канамицину изолятов МБТ, что позволяет считать эту последовательность ценным молекулярным маркером. Причем все мутации, в том числе замена C12T были найдены в устойчивых к канамицину изолятах [11].

Недавно были опубликованы данные об обнаружении мутаций внутри рамки считывания гена *eis*, которые приводили к развитию полной перекрестной ЛУ к аминогликозидам и капреомицину [3, 16]. Но в этом случае речь пока идет о единичных штаммах, и механизм развития ЛУ неизвестен.

В литературе есть сведения о том, что ЛУ к капреомицину, в абсолютном большинстве случаев связанная с мутациями в гене *rrs*, в отдельных штаммах МБТ бывает вызвана мутациями в гене *tlyA*. Ген *tlyA* кодирует метилтрансферазу TlyA, обеспечивающую метилирование нуклеотидов и связывание субъединиц рибосомы. Показано, что в отсутствие TlyA или в случае ее повреждения капреомицин не способен связываться с рибосомой и оказывать бактерицидное действие. Описано достаточно большое количество разнообразных мутаций в гене *tlyA*, однако в основном они были обнаружены в экспериментах с мутантными штаммами МБТ, отобранными *in vitro* [24]. Что касается мутаций в гене *tlyA* у клинических изолятов МБТ, то не все они изменяют чувствительность МБТ к капреомицину или же встречаются в тех штаммах, у которых ЛУ к капреомицину можно объяснить мутациями в гене *rrs*. В клинических изолятах МБТ описаны однонуклеотидные замены Asp57His, Leu164Ser,

Gly195Asp, Gly196Glu, Asn236Lys [3], Ala5Val, Ala29Val, Asn236Lys [9], Leu180Arg, Ser64Trp, Ser265Thr [15] и инсерция GCnt 202 [3]. Следует отметить, что, несмотря на большое разнообразие вариантов мутаций, в целом речь идет об очень малом проценте устойчивых к капреомицину штаммов. Исключением может служить работа J. Perdigo и соавт., в которой при анализе 26 изолятов МБТ с ШЛУ, в основном относящихся к генотипу Lisboa, были обнаружены мутации Ala205Cys, Gly223Tre, Ins521CG и Ins755GT в гене *tlyA*. Примечательно, что Ins755GT являлась непосредственной причиной возникновения ЛУ МБТ к капреомицину почти в половине случаев (11 изолятов) [28]. Противоречивость сведений о связи мутаций в гене *tlyA* с ЛУ МБТ к капреомицину указывает на необходимость продолжения исследований в этом направлении.

На сегодняшний день на российском рынке присутствуют две сертифицированные тест-системы для выявления мутаций в генах, ответственных за ЛУ МБТ к фторхинолонам («ТБ-БИОЧИП-2» и GenoType MTBDRsl), и всего одна тест-система, позволяющая выявлять мутации, приводящие к ЛУ к аминогликозидам и капреомицину (GenoType MTBDRsl).

В основе тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2», разработанной в Институте молекулярной биологии РАН, лежит технология гибридизационного анализа на основе олигонуклеотидных биочипов. Олигонуклеотидные микрочипы, представляют собой подложки с гидрогелевыми элементами и иммобилизованными в них олигонуклеотидными зондами.

Биологический микрочип «ТБ-БИОЧИП-2» содержит 33 иммобилизованных дискриминирующих зонда, три маркерные ячейки для корректного сравнения интенсивности флуоресценции с использованием программного обеспечения и две ячейки, заполненные гелем, но не содержащие олигонуклеотиды, играющие роль отрицательного контроля. На данном чипе также присутствуют ячейки, содержащие зонды к последовательности IS6110.

Гелевые ячейки с иммобилизованными нуклеотидами сгруппированы таким образом, чтобы в каждой группе один элемент соответствовал последовательности ДНК дикого типа, а остальные содержали последовательности, комплементарные известным заменам в QRDR области гена *gyrA*. В зависимости от наличия или отсутствия мутаций в анализируемом образце ДНК, в процессе гибридизации формируются совершенные или несовершенные дуплексы, которые анализируют путем сравнения интенсивности флуоресцентных сигналов в каждой группе ячеек. Захват изображения, измерение интенсивности сигналов и нормализация осуществляются с помощью аппаратно-программного комплекса, включающего анализатор Чипдетектор и компьютер с установленным программным обеспечением Imageware.

Подготовка образца к гибридизации на микрочипе заключается в проведении двухстадийной асимметричной ПЦР

с использованием флуоресцентно меченного праймера на второй стадии с целью амплификации фрагмента исследуемого гена и получения флуоресцентно меченной одноцепочечной ДНК. В качестве материала для получения ДНК может быть использована как культура МБТ, так и клинический материал, полученный от пациента. Чувствительность метода составляет 300 КОЕ/мл.

Тест-система «ТБ-БИОЧИП-2» позволяет выявлять 10 мутаций в сегменте QRDR гена *gyrA*, в 80, 88, 90, 91, 94 кодонах, а также естественный полиморфизм Ser95Thr. [1]

GenoType MTBDRsl – это один из примеров использования ДНК-стриповой технологии, которая основана на комплементарном взаимодействии иммобилизованных на бумажном носителе (стрипе, т.е. бумажной полоске) специфичных ДНК-зондов с продуктами ПЦР. Детекция результата происходит за счет оценки сочетания появляющихся на стрипе в результате цветной ферментативной реакции окрашенных полос различной интенсивности. Интерпретацию полученных результатов осуществляют визуально с помощью эталонов, имеющихся в наборе, или с помощью специального оборудования.

GenoType MTBDRsl позволяет выявлять ДНК МБТ и одновременно с этим определять наиболее распространенные мутации в генах, ответственных за ЛУ к фторхинолонам (*gyrA*), аминогликозидам и капреомоцину (*rrs*) и препарату первого ряда этамбутолу (*embB*). На стрип MTBDRsl нанесены 22 зонда, в том числе контроли амплификации и гибридизации и видоспецифическая проба на *M. tuberculosis*. Шесть ДНК-зондов обеспечивают обнаружение шести мутаций в 90, 91 и 94 кодонах гена *gyrA*; два зонда позволяют определить две замены в 1401 и 1484 положениях гена *rrs*; два зонда отвечают за выявление двух мутаций в 306 кодоне гена *embB*. Следует подчеркнуть, что GenoType MTBDRsl – это на сегодняшний день единственная сертифицированная молекулярно-генетическая тест-система для определения ЛУ МБТ к аминогликозидам и капреомоцину. Недостатком описанной технологии является ее относительно низкая чувствительность, позволяющая работать, согласно рекомендациям производителя, с ДНК, полученной либо из культур клеток, либо из респираторного материала с высоким содержанием микобактерий (при положительном результате микроскопии) [2, 14].

Литература

1. Сон И.М., Стерликов С.А., Скачкова Е.И. и др. Выявление микобактерий туберкулеза и определение лекарственной чувствительности с использованием биологических чипов. – М.: РИО ЦНИИОИЗ. – 2009. – 52 с.
2. Brossier F., Veziris N., Aubry A., et al. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex resistance mechanisms to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48. – P. 1683–1689.
3. Campbell P., Morlock G., Sikes R. et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – Vol. 55 – P. 2032–2041.
4. Chan R., Hui M., Chan E. et al. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2007. – Vol. 59. – P. 866–873.
5. Conde M., Efron A., Loreda C. et al. Moxifloxacin versus ethambutol in the initial treatment of tuberculosis: a double-blind, randomised, controlled phase II trial // *Lancet.* – 2009. – Vol. 373. – N. 9670. – P. 1183–1189.
6. Cui Z., Wang J., Lu J. et al. Association of mutation patterns in *gyrA/B* genes and ofloxacin resistance levels in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from East China in 2009 // *BMC Infect. Dis.* – 2011. – 11:78.
7. Duong D., Nguyen T., Nguyen T. et al. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53. – P. 4835–4839.
8. El Sahly H., Teeter L., Jost K. et al. Incidence of moxifloxacin resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Houston, Texas // *J. Clin. Microbiol.* – 2011. – Vol. 49. – P. 2942–2945.
9. Engström A., Perskvist N., Werngren J. et al. Comparison of clinical isolates and in vitro selected mutants reveals that *tlyA* is not a sensitive genetic marker for capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2011. – Vol. 66. – P. 1247–1254.
10. Feuerriegel S., Cox H., Zarkua N. et al. Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53. – P. 3353–3356.
11. Gikalo M., Nosova E., Krylova L., Moroz A. The role of *eis* mutations in the development of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2012. – Vol. 67. – P. 2107–2109.
12. Ginsburg A., Grosset J., Bishai W. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance // *Lancet Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 3. – P. 432–442.
13. Hegde S., Vetting M., Roderick S. et al. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA // *Science.* – 2005. – Vol. 308. – N. 5727. – P. 1480–1483.
14. Hillemann D., Rusch-Gerdes S., Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – Vol. 47. – P. 1767–1772.
15. Ji Y., Colston M., Cox R. The ribosomal RNA (*rrn*) operons of fast-growing mycobacteria: primary and secondary structures and their relation to *rrn* operons of pathogenic slow-growers // *Microbiology.* – 1994. – Vol. 140. – P. 2829–2840.
16. Jinawali H., Yoo H., Ryoo S. et al. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to aminoglycosides and cyclic peptide capreomycin antibiotics in Korea // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 29. – P. 975–982.
17. Kam K., Yip C., Cheung T. et al. Stepwise decrease in moxifloxacin susceptibility amongst clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: correlation with ofloxacin susceptibility // *Microb. Drug Resist.* – 2006. – Vol. 12. – P. 7–11.
18. Kim D., Kim H., Park S. et al. Treatment outcomes and long-term survival in patients with extensively drug-resistant tuberculosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2008. – Vol. 178. – P. 1075–1082.
19. Krüüner A., Jureen P., Levina K. et al. Discordant resistance to kanamycin and amikacin in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – Vol. 47. – P. 2971–2973.
20. Malik M., Zhao X., Drlica K. Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 61. – P. 810–825.

21. Malik S., Willby M., Sikes D. et al. New insights into fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional genetic analysis of *gyrA* and *gyrB* mutations // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – e39754.
22. Maruri F., Sterling T., Kaiga A. et al. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2012. – Vol. 67. – P. 819-831.
23. Matrat S., Veziris N., Mayer C. et al. Functional analysis of DNA gyrase mutant enzymes carrying mutations at position 88 in the A subunit found in clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2006. – Vol. 50. – P. 4170-4173.
24. Maus C., Plikaytis B., Shinnick T. Mutation of *tlyA* confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49. – P. 571-577.
25. Mokrousov I., Otten T., Manicheva O. et al. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – Vol. 52. – P. 2937-2939.
26. Nosova E., Bukatina A., Isaeva Yu. et al. Analysis of mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes and their association with the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to levofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin // *J. Med. Microbiol.* – 2013. – Vol. 62. – P. 108-113.
27. Pantel A., Petrella S., Matrat S. et al. DNA gyrase inhibition assays are necessary to demonstrate fluoroquinolone resistance secondary to *gyrB* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – Vol. 55. – P. 4524-4529.
28. Perdigão J., Macedo R., Malaquias A. et al. Genetic analysis of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Lisbon, Portugal // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2010. – Vol. 65. – P. 224-227.
29. Poissy J., Aubry A., Fernandez C. et al. Should moxifloxacin be used for the treatment of extensively drug-resistant tuberculosis? An answer from a murine model // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54. – P. 4765-4771.
30. Shi R., Zhang J., Li C. et al. Emergence of ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by *gyrA* mutation analysis using denaturing high-pressure liquid chromatography and DNA sequencing // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44. – P. 4566-4568.
31. Sulochana S., Narayanan S., Paramasivan C. et al. Analysis of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from India // *J. Chemother.* – 2007. – Vol. 19. – P. 166-171.
32. Suzuki Y., Katsukawa C., Tamaru A. et al. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – Vol. 5. – P. 1220-1225.
33. van Doorn H., An D., de Jong M., et al. Fluoroquinolone resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* with locked nucleic acid probe real-time PCR // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2008. – Vol. 12. – P. 736-742.
34. Von Groll A., Martin A., Jureen P. et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in *gyrA* and *gyrB* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53. – P. 4498-4500.
35. Wang J., Lee L., Lai H. et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2007. – Vol. 59. – P. 860-865.
36. Yin, X., Yu, Z. Mutation characterization of *gyrA* and *gyrB* genes in levofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guangdong Province in China // *J. Infect.* – 2010. – Vol. 61. – P. 150-154.
37. Zaunbrecher M., Sikes R., Metchock B. et al. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase *eis* confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106. – P. 20004-20009.
38. Zhou J., Dong Y., Zhao X. Et al. Selection of antibiotic-resistant bacterial mutants: allelic diversity among fluoroquinolone-resistant mutations // *J. Infect. Dis.* – 2000. – Vol. 182. – P. 517-525.

Сведения об авторах

Носова Елена Юрьевна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

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

Телефон (496) 603 30 33

Гикало Марина Борисовна – научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»

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

Телефон (496) 603 30 33

e-mail: m-lle-marina@rambler.ru

Хахалина Анастасия Александровна – научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»

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

Телефон (496) 603 30 33

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

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

Телефон (496) 603 30 33

Сафонова Светлана Григорьевна – заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук

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

Телефон (496) 603 30 33

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