

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МНОЖЕСТВЕННОЙ И ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ И BACTEC™ MGIT™ 960

Е.Ю. Носова, А.А. Хахалина, К.Ю. Галкина, М.А. Краснова, Л.Ю. Крылова, С.Г. Сафонова
 ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

DETECTION OF MULTI AND EXTENSIVELY DRUG RESISTANCE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY THE DIFFERENT MOLECULAR TEST-SYSTEMS AND BACTEC™ MGIT™ 960

E.Yu. Nosova, A.A. Khakhalina, K.Yu. Galkina, M.A. Krasnova, L.Yu. Krilova, S.G. Safonova

Изучены генетические мутации, связанные с лекарственной устойчивостью (ЛУ) микобактерий туберкулеза (МБТ) к изониазиду (H), рифампицину (R), фторхинолонам (Fq) и аминогликозидам (Ag), выявленные с помощью молекулярно-генетических методов в 85 изолятах. Результаты исследования сравнивали с микробиологическим определением ЛУ к этим препаратам в системе BACTEC™ MGIT™ 960.

Совпадение результатов определения МЛУ, МЛУ в сочетании с ЛУ к Fq, МЛУ в сочетании с ЛУ к Ag и ШЛУ молекулярными и микробиологическими методами составило 94,7, 93,3, 93,3 и 97,3%, соответственно. В 55,3% культур МБТ часто встречалось сочетание мутаций Ser531Leu в гене rpoB и Ser315Thr в katG. В двух сохранивших фенотипическую чувствительность к R штаммах выявлена мутация Asp516Tyr (в rpoB), приводящая к низкому уровню устойчивости возбудителя к этому препарату. Среди мутаций в гене gyrA, наиболее часто встречаемых, были замены в 94-м (58,8%) и 90-м (15,7%) кодонах. Мутация Asp94Gly была обнаружена в 60,0% культур. Только в gyrB мутации были выявлены в 4,0% в штаммах и в 2,0% – одновременно в двух генах. Определение мутаций в промоторной области гена eis позволило дополнительно к 18 (37,5%) культурам с заменами в гене rrs выявить 30 (62,5%) штаммов МБТ, устойчивых как к канамицину, так и к амикацину.

Быстрое определение типа мутаций в генах МБТ в сочетании с микробиологическим определением уровня устойчивости к R, H, Fq и Ag даст более полную информацию об исследуемых штаммах МБТ и поможет клиницистам контролировать развитие лекарственной устойчивости.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, лекарственная чувствительность к изониазиду, рифампицину, фторхинолонам и аминогликозидам, мутации, молекулярно-генетические методы

We carried out the investigation of genetic mutations connected with MBT drug resistance to isoniazid (H), rifampicin (R), fluoroquinolones (Fq) and aminoglycosides (Ag) detected by molecular-genetic methods in 85 isolates. The results were compared to microbiological drug susceptibility testing for that drugs performed in BACTEC™ MGIT™ 960 system. The agreement of the results of detection of MDR, MDR and Fq-resistance, MDR and Ag-resistance and XDR of MBT strains by molecular-genetic and microbiological methods achieved 94,7, 93,3, 93,3 and 97,3%, consequently. The combination of mutations Ser531Leu in rpoB and Ser315Thr in katG genes was detected in 55,3% of MTB cultures. Asp516Tyr in rpoB, leading to the low resistance level was detected in 2 H-resistant MBT cultures. Among mutations in gyrA gene the substitutions in 94th (58,8%) and 90th (15,7%) codons were detected most frequently. Asp94Gly was found out in 60,0% of MTB cultures. Mutations only in gyrB gene were detected in 4,0% of MTB strains. 2% of MBT strains had the substitutions in the both gyrA and gyrB genes simultaneously. Detection of mutations in the promoter region of eis gene revealed 30 (62,5%) kanamycin and amikacin resistant MBT strains in addition to 18 (37,5%) MTB cultures with the substitutions in rrs gene. The rapid detection of the type of mutations in the MBT genes in combination with microbiologic detection of the resistance level for rifampicin, isoniazid, fluoroquinolones and aminoglycosides gives the best information about investigated MBT strains and helps the clinicians to monitor the development of drug resistance.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, drug susceptibility to isoniazid, rifampicin, fluoroquinolones and aminoglycosides, mutations, molecular-genetic methods

Введение

Современная эпидемическая ситуация по туберкулезу характеризуется нарастанием лекарственной устойчивости (ЛУ) возбудителя не только к препаратам основного и резервного ряда, но и появлением штаммов с полной (тотальной) ЛУ ко всем противотуберкулезным препаратам (ПТП) [4]. В этих условиях для назначения пациенту оптимального и эффективного режима химиотерапии необходимо быстрое и точное исследование лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* (МБТ) к ПТП.

На сегодняшний день в микробиологических лабораториях широко применяют молекулярные технологии, позволяющие в течение суток с высокой чувствительностью и специфичностью выявить ДНК МБТ в диагностическом материале и охарактеризовать мутации в генах, связанных с возникновением устойчивости к ПТП.

Тест-системы гибридизационного анализа на стрипах и биочипах позволяют анализировать одновременно большинство или все известные мутации, связанные с развитием устойчивости МБТ, в первую очередь к изониазиду (H), рифампицину (R) («GenoType MTBDRplus», «ТБ-БИОЧИП») и ко фторхинолонам (Fq), аминогликозидам (канамицин, амикацин – Ag) и капреомицину («GenoType MTBDRsl», «ТБ-БИОЧИП-2»). Однако широкое использование Fq и Ag (основных ПТП резервного ряда) для лечения различных неспецифических заболеваний привело к формированию устойчивости к ним у МБТ с включением в механизм других генов или мутаций в кодонах, не представленных для молекулярного анализа в тест-системах «GenoType MTBDRsl» и «ТБ-БИОЧИП-2». По данным литературы, в развитии устойчивости к Fq участвуют два гена *gyrA* и *gyrB* [17]. У 42–85% клинических штаммов устойчивость к данным препаратам связана с мутациями в QRDR области гена *gyrA* [14]. Еще примерно у 7% штаммов МБТ устойчивость связана с мутациями в гене

gyrB [19]. Кроме того, описаны мутации в других кодонах гена *gyrA* (H70R, A74S, G88A), которые также не включены в данные тест-системы [7, 8, 11, 19].

В случае развития устойчивости МБТ к Ag преобладает механизм модификации мишени действия антибиотика вследствие возникновения мутаций в гене *rrs*, ответственном за синтез 16S рРНК. Установлено, что существует перекрестная устойчивость МБТ к канамицину (К), амикацину (А), капреомицину и виомицину. Наиболее частой мутацией является замена А на G в позиции 1400 гена *rrs*, которая приводит к высокому уровню устойчивости к К и А. В 60–70% случаев мутации именно в этом гене ответственны за возникновение устойчивости к Ag. Также описаны мутации в гене *eis*. Низкий уровень устойчивости МБТ к К коррелирует с мутациями в промоторной области этого гена [6, 18, 21].

В МНПЦ борьбы с туберкулезом разработаны две модификации метода конформационного полиморфизма длин одноцепочечных фрагментов («М-SSCP»), с помощью которых можно определять мутации в генах *gyrB* и *eis* (патенты на изобретение Российской Федерации № 2439162 от 10.01.2012 г. «Способ диагностики чувствительности штаммов *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам по гену *gyrB*» и № 2409158 от 10.03.2014 г. «Способ диагностики чувствительности штаммов *Mycobacterium tuberculosis* к инъекционным противотуберкулезным препаратам резервного ряда (аминогликозидам и капреомицину)»).

Цель исследования

Определить спектр мутаций в генах, ответственных за развитие множественной и широкой лекарственной устойчивости МБТ, и изучить корреляцию между генетическими мутациями и результатами исследования лекарственной чувствительности МБТ к препаратам основного и резервного ряда в ВАСТЕС™ MGIT™ 960.

Таблица 1. Определение лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* с помощью молекулярных тест-систем и ВАСТЕС™ MGIT™ 960

Спектр лекарственной устойчивости МБТ	Методы исследования:				Совпадение результатов (%)
	молекулярно-генетические		ВАСТЕС™ MGIT™ 960 (среда Middlebrook 7H9)		
	абс.	%	абс.	%	
МЛУ	19	22,4	18	21,1	94,7
ЛУ к H + ЛУ к Fq + ЛУ к Ag при сохранении ЛЧ к R	0	0	1	1,2	
ЛУ к H + ЛУ к Fq при сохранении ЛЧ к R	0	0	1	1,2	
МЛУ + ЛУ к Fq	15	17,6	14	16,5	93,3
МЛУ + ЛУ к Ag	15	17,6	14	16,5	93,3
ШЛУ	36	42,4	37	43,5	97,3
Всего исследовано штаммов	85	100,0	85	100,0	

Таблица 2. Варианты мутаций и их сочетания в генах, ответственных за устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к изониазиду и рифампицину

Генетические детерминанты лекарственной устойчивости МБТ к изониазиду и рифампицину, используемые в тест-системе ТБ-БИОЧИП		Результаты исследования в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 (среда <i>Middlebrook 7H9</i>)		Количество штаммов (n = 85)
Изониазид	Рифампицин	INH	RIF	
Ser315Thr	Ser531Leu	уст.	уст.	47
	His526Tyr			4
	His526Arg			1
	His526 Leu			1
	Asp516Val			1
Ser315Thr, T15	Ser531Leu	уст.	уст.	12
	Asp516Val			4
	His526Asp			2
	His526Arg			2
	Ser526Arg			1
	Asp516Gly, Leu511Pro			1
	Asp516Tyr		чувствит.	2
S315T, Ile335Val	Ser531Leu	уст.	уст.	2
Ser315Thr,A8	Ser531Leu	уст.	уст.	1
Ser315Thr, T10	Ser526Asp	уст.	уст.	1
Ser315Thr, G8	Ser531Leu	уст.	уст.	1
T15	His526Asn	уст.	уст.	1
	Ser531Leu	уст.	уст.	1

Материал и методы исследования

Для исследования были отобраны 85 клинических изолятов МБТ с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ и ШЛУ), выделенных из диагностического материала больных туберкулезом в жидкой среде *Middlebrook 7H9* с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD). Критерием отбора культур был первоначальный анализ МБТ, выделенных в ВАСТЕС™ MGIT™ 960, на наличие генетических детерминант МЛУ с помощью «ТБ-БИОЧИП».

Выделение ДНК МБТ проводили на роботизированной станции Freedom EVO (TECAN, Швейцария) с использованием реагентов «М-Сорб» («Синтол», Россия).

Определение мутаций, ответственных за устойчивость к Fq, проводили с помощью «ТБ-БИОЧИП-2» (*gyrA*) и модификации метода SSCP (*gyrB*) («М-SSCP»), к Ag – «GenoType MTBDRsl» (*rrs*) и «М-SSCP» (*eis*). Определение типа мутаций в генах *gyrB* и *eis* осуществляли с помощью секвенирования на автоматическом секвенаторе GS Junior («Roche», Германия).

Лекарственную чувствительность (ЛЧ) МБТ к H и R определяли в жидкой среде *Middlebrook 7H9* с использованием системы ВАСТЕС™ MGIT™ 960 в критических концентрациях 0,1 и 1 мкг/мл, соответственно [16]. ЛЧ МБТ к ПТП резервного ряда на жидких средах проводили по стандартным протоколам [1, 15].

Результаты исследования и обсуждение

Проведено сравнительное изучение генетических мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью МБТ к H, R, Fq и Ag, с помощью молекулярно-генетических методов и результатов определения ЛЧ к этим препаратам в системе ВАСТЕС™ MGIT™ 960.

С помощью «ТБ-БИОЧИП» МЛУ определена у 19 из 85 культур МБТ (22,4%), а ШЛУ – у 36 (42,4%). МЛУ МБТ сочеталась с устойчивостью только к Fq либо только к Ag одинаково часто – по 15 культур (17,6%). Две культуры с помощью биочипов были определены как МБТ с ШЛУ и как МБТ с МЛУ в сочетании с ЛУ к Fq, но фенотипически обе оказались чувствительными к R (табл. 1). Совпадение результатов определения МЛУ, сочетаний МЛУ с ЛУ к Fq или к Ag, ШЛУ МБТ молекулярными и микробиологическими методами составило 94,7, 93,3, 93,3 и 97,3%, соответственно.

С помощью тест-системы «ТБ-БИОЧИП» были определены генотипы МБТ, устойчивых к H и к R (табл. 2). У всех 85 штаммов были выявлены мутации, связанные с развитием устойчивости МБТ к H и к R. Среди мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к H, наиболее частой была замена Ser315Thr в гене *katG*. Она обнаружена в 54 (63,5%) из 85 исследуемых штаммов. Далее по частоте встречаемости было сочетание мутаций Ser315Thr (в *katG*) и T15 (в *inhA*), которые выявлены

Таблица 3. Варианты мутаций и их сочетания в генах, ответственных за устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам

Генетические детерминанты лекарственной устойчивости МБТ к фторхинолонам, используемые в системах:		Результаты исследования в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 (среда Middlebrook 7H9)	Количество штаммов (n = 52)
ТБ-БИОЧИП-2 (исследуемый ген - <i>gyrA</i>)	SSCP (исследуемый ген - <i>gyrB</i>)	OfI / Mox (критические концентрации: 2,0 / 0,25 мкг/мл)	
Asp94Gly, S95T	wt	уст./уст.	18
Ala90Val, S95T	wt	уст./уст.	8
Asp94Ala, S95T	wt	уст./уст.	6
Asp94Tyr, S95T	wt	уст./уст.	4
Ser91Pro, S95T	wt	уст./уст.	4
Ala90Val, Asp94Asn, S95T	wt	уст./уст.	2
Gly88Cys, S95T	wt	уст./уст.	2
Asp94Asn, S95T	wt	уст./уст.	1
Asp94His, S95T	wt	уст./уст.	1
Ala90Val, Asp94 Gly, S95T	wt	уст./уст.	1
Asp94Ala, Ser91Pro, S95T	wt	уст./уст.	1
Asp94Ala, S95T	Glu540Asp	уст./уст.	1
S95T	Asn538Asp	уст./уст.	1
S95T	Asp500His	уст./уст.	1
S95T	wt	уст./уст.	1

Примечание: wt – т.н. «дикий тип» МБТ с отсутствием мутаций, связанных с устойчивостью.

в 24 штаммах МБТ (28,2%). Остальные мутации обнаружены в единичных случаях.

Замены в гене *rpoB*, приводящие к устойчивости к R, также были выявлены у всех 85 штаммов. Однако в двух штаммах с заменой Asp516Tyr при культуральном исследовании определена их чувствительность к R. По данным литературы, данная мутация приводит к низкому уровню устойчивости МБТ к препарату [5]. Наиболее частой была замена Ser531Leu, выявленная в 64 (75,3%) штаммах. В девяти (10,6%) штаммах определены одиночные замены в 526-м кодоне (His526Tyr – в четырех, His526Asp – в трех и His526Arg – в двух) и в пяти (5,9%) – замена Asp516Val.

Из 85 исследуемых штаммов МБТ в 47 (55,3%) обнаружено сочетание мутаций Ser531Leu в гене *rpoB* и Ser315Thr в *katG*, приводящее к высокому уровню устойчивости возбудителя к R и H [2, 12]. В 12 (14,1%) – определено сочетание замен Ser315Thr (в *katG*), T15 (в *inhA*) и Ser531Leu (в *rpoB*).

У исследованных 85 штаммов МБТ с генотипами, ассоциируемыми с МЛУ, были изучены гены, мутации в которых обуславливают лекарственную устойчивость возбудителя к основным резервным препаратам – Fq и Ag.

Из 85 культур у 52 (61,2%) определена фенотипическая устойчивость к офлоксацину (OfI) и моксифлоксацину (Mox) в ВАСТЕС™ MGIT™ 960. В 51 (98,1%) штамме с помощью

«ТБ-БИОЧИП-2» и «М-SSCP» были выявлены мутации в генах *gyrA* и *gyrB*. В 48 (94,1%) из них – только в гене *gyrA*, в трех (5,9%) – только в *gyrB*, в одном – одновременно в двух генах (что составило 1,9%), и в одном штамме ни одним из используемых методов мутации не были обнаружены. Это, по-видимому, связано с наличием мутаций в *gyrA*, кодоны которых не включены в тест-систему. Совпадение результатов молекулярно-генетических и микробиологических исследований составило 98,2% (табл. 3).

Все исследуемые штаммы при исследовании в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 были устойчивыми и к OfI, и к Mox. Таким образом, выявленные мутации в анализируемых генах приводят к прекрестной ЛУ МБТ к Fq. Среди более часто встречающихся одиночных мутаций в гене *gyrA* были замены в 94-м (58,8%) и 90-м (15,7%) кодонах. Из 30 (58,8%) культур МБТ с мутациями в 94-м кодоне в 18 (60,0%) была определена замена Asp94Gly, в шести (20,0%) – Asp94Ala, в четырех (13,4%) – Asp94Tyr и по одному случаю (по 3,3%) – замены Asp94Asn и Asp94His. В восьми (15,7%) штаммах МБТ была выявлена мутация Ala90Val. В четырех (7,8%) культурах была определена замена в 91-м кодоне Ser91Pro, в двух (3,9%) – мутация в 88-м кодоне (Gly88Cys) и в четырех (7,8%) – двойные мутации Ala90Val, Asp94Gly, Asp94Ala, Ser91Pro и Ala90Val, Asp94Asn. В одном штамме (2,0%) были выявлены мутации сразу в двух генах Asp94Ala, S95T и Glu540Asp

Таблица 4. Варианты мутаций и их сочетания в генах, ответственных за устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к аминогликозидам

Генетические детерминанты лекарственной устойчивости МБТ к Аг, используемые в системах:		Результаты исследования в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 (среда Middlebrook 7H9)	Количество штаммов (n = 52)
GenoType MTBDRs/ (исследуемый ген - <i>rrs</i>)	SSCP (исследуемый ген - <i>eis</i>)	К / А (критические концентрации: 2,5/0,5 мкг/мл)	
A1401G	wt	уст./уст.	16
A1401G, G1484T	C12T	уст./уст.	1
G1484T	wt	уст./чувствит.	1
wt	G37T	уст./чувствит.	13
wt	G10A	уст./чувствит.	6
		уст./уст.	1
wt	C14T	уст./чувствит.	5
		уст./уст.	2
wt	C12T	чувствит./чувствит.	3
		уст./чувствит.	2
		уст./уст.	1
wt	wt	уст./чувствит.	2
		уст./уст.	1

Примечание: wt – т.н. «дикий тип» МБТ с отсутствием мутаций, связанных с устойчивостью.

и в двух (4,0%) – только в *gyrB*. Полиморфная замена Ser95Thr была выявлена во всех устойчивых к OfI штаммах МБТ.

Похожее распределение мутаций в гене *gyrA* также описано и в различных зарубежных публикациях [9, 10, 20].

В 51 (60,0%) из 85 исследуемых штаммов с помощью «GenoType MTBDRs/» и SSCP были обнаружены мутации, ответственные за устойчивость к Аг: в 18 (35,3%) штаммах – в гене *rrs* и в 33 (64,7%) – в гене *eis*. В двух штаммах, устойчивых только к К, и в одном, устойчивом к обоим препаратам, мутации не были обнаружены. Возможно, это также связано с отсутствием в тест-системе «GenoType MTBDRs/» других замен, связанных с развитием устойчивости к ним [6, 13, 18]. При микробиологическом исследовании ЛЧ к Аг в трех штаммах с заменой C12T в гене *eis* устойчивость к ним не была установлена. Совпадение результатов молекулярно-генетических и микробиологических исследований ЛЧ к Аг составило 94,4% (табл. 4).

В 16 (31,4%) из 18 культур в гене *rrs* была определена только замена A1401G, в одной – G1484T (1,9%), а еще в одной (1,9%) обнаружено сочетание мутаций в обоих генетических мишенях (генотипы A1401G, G1484T и C12T). В 33 культурах МБТ мутации в промоторной области гена *eis* распределились следующим образом: наиболее распространенной оказалась замена G37T, выявленная в 13 штаммах (25,5%), в семи штаммах (13,7%) выявлена замена G10A, также в семи – C14T и в шести (11,7%) – C12T.

Все культуры с заменой A1401G в гене *rrs* и с генотипами A1401G, G1484T и C12T в обоих мишенях были устойчивыми к К и А. МБТ с мутацией G1484T показали фенотипическую

устойчивость только к К. Для всех культур МБТ с заменами G37T и G10A, кроме одной, устойчивость к К была подтверждена культуральным методом, в то время как к А сохранялась чувствительность. Из семи штаммов МБТ с мутацией C14T в пяти была определена устойчивость только к К, в двух – к обоим препаратам. Из шести культур с мутацией C12T две были устойчивыми только к К, одна к обоим препаратам и три были чувствительными и к К, и к А. Существует мнение, что лекарственно-устойчивые, в особенности полирезистентные, штаммы МБТ хуже, чем чувствительные, выделяются на питательных средах [3]. С другой стороны, известно, что мутации в промоторной области гена *eis* ответственны за развитие ЛУ к невысоким концентрациям К [21].

Определение мутаций в промоторной области гена *eis* позволило дополнительно выявить 30 (62,5%) устойчивых штаммов МБТ в дополнение к 18 (37,5%) с заменами в гене *rrs*, что значительно повысило корреляцию результатов молекулярно-генетического и микробиологического определения ЛЧ МБТ как к К, так и к А.

Заключение

Проведенное исследование показало, что некоторые мутации связаны с разным уровнем лекарственной устойчивости и быстрое определение типа мутаций в генах МБТ, в сочетании с микробиологическим определением уровня устойчивости к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам и аминогликозидам, даст более полную информацию об исследуемых

штаммах МБТ и поможет клиницистам формировать адекватные режимы химиотерапии и контролировать развитие лекарственной устойчивости.

Кроме того, показано, что в развитии устойчивости МБТ к офлоксацину и моксифлоксацину участвуют два гена, одновременный анализ которых позволяет более точно проводить молекулярное определение лекарственной чувствительности

МБТ к этим препаратам, что, в свою очередь, значительно повышает корреляцию результатов с данными микробиологических исследований. Для быстрой и точной молекулярной диагностики чувствительности МБТ к канамицину необходимо проводить комплексное исследование двух генетических мишеней: гена *rrs* и промоторного участка гена *eis*.

Литература

1. A Canadian multicenter laboratory study for standardized second-line antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – N. 10. – P. 1128-1150.
2. Brossier F., Veziris N., Truffot-Pernot C. et al. 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 // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44. – N. 10. – P. 3659-3664.
3. Cole T., Eisenach K.D., McMurray D. et al. *Tuberculosis and tubercle bacillus.* – Washington, DS: ASM Press, 2005. – 585 p.
4. Global tuberculosis report 2013. – Geneva: WHO, 2013. [Электронный ресурс] URL: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html. (Дата обращения 25.04.2015).
5. 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.
6. Jugheli L., Bzkalava N., de Rijk P. et al. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53. – N. 12. – P. 5064-5068.
7. Lau R., Ho P., Kao R. et al. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of *gyrA* mutation at position 74 // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – Vol. 55. – N. 2. – P. 608-614.
8. Malik S., Willby M., Sikes D. New insights into fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional genetic analysis of *gyrA* and *gyrB* mutations. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – N. 6. – P. 1-10.
9. Matrat S., Veziris N., Mayer C. et al. Functional analysis of DNA *gyrA* 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. – N. 12. – P. 4170-4173.
10. Mokrousov I., Otten T., Manicheva O. et al. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – Vol. 52. – N. 8. – P. 2937-2939.
11. 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. – Pt. 1. – P. 108-113.
12. Pang Y., Lu J., Wang Y. et al. Study of the rifampin mono-resistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57. – N. 2. – P. 893-900.
13. 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. – N. 2. – P. 224-227.
14. Pitaksajjakul P., Wongwit W., Punpravit W. et al. Mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from TB patients in Thailand // *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* – 2005. – Vol. 36. – Suppl. 4. – P. 228-236.
15. Rusch-Gerdes S., Pfyffer G.E., Casal M. et al. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44. – N. 3. – P. 688-692.
16. Siddiqi S., Rüscher-Gerdes 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.* – Foundation for Innovative New Diagnostics, 2007. [Электронный ресурс] URL: <http://www.ipaqt.org/wp-content/uploads/2013/02/MGIT-Procedure-Manual.pdf>. (Дата обращения 25.04.2015).
17. Takiff H., Salazar L., Guerrero C. et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1994. – Vol. 38. – N. 4. – P. 773-780.
18. Via L.E., Cho S.N., Hwang S. et al. Polymorphisms associated with resistance and cross-resistance to aminoglycosides and capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from South Korean Patients with drug-resistant tuberculosis // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48. – N. 2. – P. 402-411.
19. Wang J., Lee L., La H. et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure. // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2007. – Vol. 59. – N. 5. – P. 860-865.
20. 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.
21. Zaunbrecher M.A., Sikes R.D. Jr, Metchock B. et al. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase *eis* confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106. – N. 47. – P. 20004-20009

Сведения об авторах

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

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

Тел. +7 (495) 603-30-33

Факс +7 (499) 785-20-82

e-mail: ma68@rambler.ru

Хахалина Анастасия Александровна – научный сотрудник отдела лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук

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

Тел. +7 (495) 603-30-33

Факс +7 (499) 785-20-82

e-mail: nastec@bk.ru

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

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

Тел. +7 (495) 603-30-33

Факс +7 (499) 785-20-82

e-mail: crazymare@mail.ru

Краснова Мария Александровна – ведущий научный сотрудник отдела лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук

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

Тел. +7 (495) 603-30-33

Факс +7 (499) 785-20-82

e-mail: dna77@mail.ru

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

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

Тел. +7 (495) 603-30-33

Факс +7 (499) 785-20-82

e-mail: mika_200417@yahoo.com

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

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

Тел. +7 (499) 268-08-76

Факс +7 (499) 785-20-82

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