УДК 615.015.8:579.873.21:57083.1

ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *M. TUBERCULOSIS* С ПОМОЩЬЮ ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА НА БИОЧИПАХ

Е.Ю. Носова, А.А. Хахалина, А.И. Исакова, К.Ю. Галкина, М.А. Краснова, М.В. Макарова, Л.Ю. Крылова, С.Г. Сафонова

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

SIMULTANEIUS DETECTION OF GENETIC DETERMINANTS OF EXTENSIVELY DRUG RESISTANCE AND GENOTYPING OF *M. TUBERCULOSIS* BY HYBRIDIZATION ON BIOCHIPS

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

Проведено ретроспективное исследование генетических детерминант лекарственной устойчивости 150 изолятов МБТ с помощью «ТБ–ТЕСТ» и определена их корреляция с результатами микробиологического определения ЛЧ в BACTEC™ MGIT™ 960 и Sensititre MycoTB Plate.

Установлено, что из всего спектра мутаций с высоким уровнем устойчивости МБТ к рифампицину, как среди МЛУ, ШЛУ так и монорезистентных, наиболее часто определяется мутация S531L в гене rpoB. Напротив, «пограничным» или низким уровнем устойчивости обладают МБТ с мутациями D516Y, H526L и H526N в этом гене, которые стандартными микробиологическими методами определяются как чувствительные к препарату. Наиболее часто встречаемой мутацией как среди монорезистентных МБТ к изониазиду, так и у МБТ с МЛУ и ШЛУ является S315T в katG, приводящая к высокой степени устойчивости.

В большинстве изолятов высокий и умеренный уровень устойчивости МБТ к фторхинолонам связан с мутациями в гене gyrA или в gyrA/gyrB, а «пограничная» чувствительность и низкая устойчивость – в gyrB. Выявление мутаций в гене eis (низкий уровень устойчивости к канамицину) повышает корреляцию с фенотипическим определением ЛЧ в BACTEC™ MGIT™ 960 до 93,2%. В Московском регионе, также как и в других регионах России, преобладают МБТ с генотипом Beijing – 78,0% изолятов, из которых 20,0% относились к BO/W148 и ассоциированы с высокой лекарственной устойчивостью МБТ к противотуберкулезным препаратам.

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

We carried out a retrospective study of 150 MTB isolates to detect drug resistance genetic determinants by "TB–TEST" system and estimate their correlation with the results of the microbiological drug susceptibility testing in BACTEC MGIT 960 and Sensititre MycoTB Plate.

It was found that the substitution S531L in rpoB gene detected in MDR, XDR and monoresistant MTB isolates most frequently among all the spectrum of mutations leading to MTB resistance to high concentration of rifampicin. On the contrary, MTB with the D516Y, H526L and H526N substitutions in rpoB gene were intermediately or low-resistant and were detected as susceptible to rifampicin by standard microbiological methods. The substitution S315T in katG leading to MTB resistance to high concentration of isoniazid was detected in MDR, XDR and monoresistant MTB isolates most frequently.

In most cases high and moderate level of resistance of MTB to fluoroquinolones connected with mutations in gyrA or both in gyrA and gyrB genes and intermediate and low resistance connected with mutations only in gyrB. Detection of mutations in eis gene (low resistance to KAN) increases a correlation with phenotypic DST in Bactec MGIT 960 up to 93.2%. In Moscow region as well as in other regions of the Russian Federation Beijing genotype of MTB prevailed and were detected in 78.0% of cases. 20.0% of Beijing strains had BO/W148 genotype associated with high level of resistance of MTB to antituberculosis drugs.

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

В настоящее время можно говорить о наметившейся тенденции к снижению заболеваемости туберкулезом в Российской Федерации. Однако главной проблемой остается нарастание лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* (МБТ) к основным и резервным противотуберкулезным препаратам (ПТП) [35]. Туберкулез, вызванный возбудителем с множественной и широкой лекарственной устойчивостью, плохо поддается лечению существующими ПТП и требует проведения длительной (18–24 мес.) комплексной дорогостоящей терапии, которая сопровождается серьезными побочными эффектами [6, 14, 38]. Эффективность лечения таких пациентов в первую очередь зависит от быстрого определения профиля лекарственной устойчивости к данным препаратам. В лабораторной диагностике одними из наиболее быстрых методов, применяемых для этих целей, являются посев на жидкой питательной среде *Middlebrook 7H9 (M7H9)* в автоматизированной системе BACTEC™ MGIT™ 960 и молекулярно-генетические тест-системы, позволяющие в течение одного–двух дней определять генетические детерминанты, связанные с лекарственной устойчивостью к ПТП.

Среди молекулярных технологий, позволяющих одновременно определять наиболее значимые мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду (H), рифампицину (R), фторхинолонам (Fq), аминогликозидам (Ag) и этамбутолу (E), основными являются тест-системы гибридизационного анализа на стрипах (GenoType MTBDR*plus*, GenoType MTBDR*sl*) и биочипах («ТБ-БИОЧИП», «ТБ-БИОЧИП-2»).

Исследования последних лет в области изучения механизмов формирования лекарственной устойчивости показали, что это длительный адаптивный процесс с вовлечением все новых мутаций в известных генах-мишенях или новых бактериальных генов или межгенных регионов [35]. Так, устойчивость к фторхинолонам у 7% штаммов МБТ связана с мутациями в гене *gyrB* [20, 21, 26], а низкий уровень устойчивости возбудителя к канамицину коррелирует с мутациями в промоторной области гена *eis* [7, 10, 11, 39].

Другой немаловажной проблемой на сегодня является выявление очагов туберкулезной инфекции и путей ее распространения (особенно трансмиссии мультирезистентных штаммов), а также осуществление разграничения случаев экзогенной инфекции и эндогенной реактивации туберкулеза. Генотипирование МБТ изолятов, основанное на анализе специфических нуклеотидных последовательностей хромосомной ДНК возбудителя или олигонуклеотидных полиморфизмов (SNP), позволяет решать эти задачи [16, 34].

В связи с этим на основе технологии гидрогелевых биочипов, разработанной в Институте молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, создан принципиально новый «ТБ-ТЕСТ», позволяющий определять расширенный спектр генетических детерминант лекарственной устойчивости к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам и аминогликозидам, а также устанавливать генотип наиболее эндемичных для Российской Федерации штаммов.

Цель исследования

Оценить эффективность применения «ТБ-ТЕСТ» для одновременного определения генотипа и генетических детерминант лекарственной устойчивости МБТ к основным противотуберкулезным препаратам I и резервного ряда.

Материалы и методы исследования

Клинические изоляты M. tuberculosis. Для исследования были отобраны 150 клинических изолятов МБТ, ранее охарактеризованных с помощью «ТБ-БИОЧИП», «ТБ-БИОЧИП-2» и GenoType MTBDR*sl*. Изоляты были выделены в жидкой среде *Middlebrook 7H9* с использованием автоматизированной системы BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD) из диагностического материала больных туберкулезом, находящихся на лечении в Московском научно-практическом центре борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы (МНПЦБТ).

Лекарственную чувствительность (ЛЧ) МБТ определяли двумя методами: в тест-системах BACTEC™ MGIT™ 960 и Sensititre MycoTB (MycoTB).

В BACTEC™ MGIT™ 960 определяли ЛЧ к изониазиду (H), рифампицину (R), этамбутолу (E), офлоксацину (Ofl), моксифлоксацину (Mox), канамицину (K) и амикацину (A) согласно руководству производителя.

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) препаратов с использованием Sensititre MycoTB Plate (TREK Diagnostic Systems) определяли, как описано ранее [1, 2, 13]. Для определения МИК суспензию из исследуемой культуры МБТ, приготовленную по 0,5 стандарту мутности McFarland, в количестве 100 мкл переносили в пробирку с обогащенной жидкой питательной средой *Middlebrook 7H9* и засевали по 100 мкл в лунки планшета, содержащие лиофилизированные химиопрепараты в двукратно увеличивающихся концентрациях, и инкубировали при 37 °C. Рост *M. tuberculosis* оценивали через 7–14 дней, в зависимости от скорости роста микобактерий в контрольной лунке без препарата. МИК препарата считали наименьшую его концентрацию, подавляющую видимый рост микроорганизма в лунке. МИК, указывающие на устойчивость (*resistance breakpoints*), основаны на ранее опубликованных (установленных) значениях: H – > 0,25, R – > 1,0, E – > 4,0, A – > 1,0, K – > 5,0, Mox – > 0,5, Ofl – > 2,0 мкг/мл [8, 13, 24]. Изоляты МБТ, для которых определены значения МИК, равные пороговым или на одно разведение ниже, оценивали как «обладающие пограничной чувствительностью», а имеющие МИК на одно разведение выше порогового значения (*breakpoints*) – как «обладающие низким уровнем устойчивости» [1, 2, 13, 25].

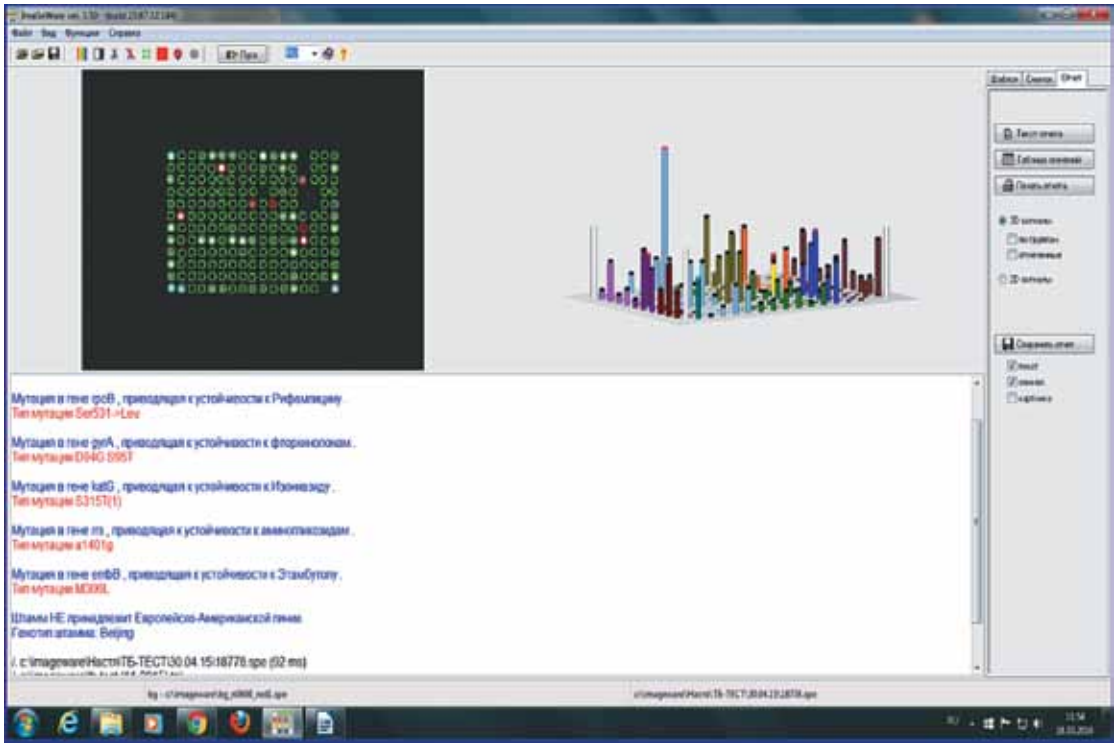

Рисунок. Генотип штамма M.tuberculosis с широкой лекарственной устойчивостью, принадлежащий к линии Beijing.

Выделение ДНК, ПЦР и гибридизация на биочипах. Выделение ДНК из культур МБТ, полученных в системе BACTEC™ MGIT™ 960 проводили на роботизированной станции Freedom EVO (TECAN, Швейцария) с использованием реагентов «М-Сорб» («Синтол», Россия). Проведение ПЦР и гибридизацию на биологических микрочипах проводили согласно прилагаемому протоколу к тест-системе «ТБ-ТЕСТ». Тест-система позволяет определять 28 мутаций в гене *rpoB*, 11 в *katG*, 5 в *inhA*, 5 в *ahpC*, 15 в *gyrA*, 23 в *gyrB*, 4 в *rrs*, 5 в *eis* и 18 в *embB*, а также генотип штаммов, наиболее эндемичных для Российской Федерации (рисунок).

Результаты исследования и обсуждение

В ретроспективном исследовании с помощью «ТБ-ТЕСТ» были охарактеризованы 150 изолятов МБТ и определена корреляция полученных данных с результатами микробиологического определения ЛЧ в BACTEC™ MGIT™ 960 и Sensititre MycoTB Plate.

Микробиологическое определение ЛЧ в BACTEC™ MGIT™ 960 показало, что среди 150 изолятов 65 (43,3%) обладали МЛУ и 40 (26,7%) – ШЛУ, 30 (20,0%) были чувствительными к H и R, 2 (1,3%) – монорезистентными к R и 13/150 (8,7%) – к H.

С помощью «ТБ-ТЕСТ» у 30 (20,0%) штаммов МБТ, чувствительных к H и R (в BACTEC™ MGIT™ 960 и MycoTB), мутации в генах *katG*, *inhA*, *oxyR* и *rpoB* не были обнаружены. У 111 из 150 (74,0%) изолятов МБТ обнаружены мутации, приводящие к устойчивости к R и в 118 (78,6%) – к H (табл. 1). 30 изолятов продемонстрировали чувствительность и к H, и к R, мутаций у них обнаружено не было, а МИК составляли для R – от 0,03 до 0,125 мкг/мл, а для H – от ≤ 0,125 до 0,5 мкг/мл.

Среди мутаций в гене *rpoB*, связанных с устойчивостью МБТ к R, наиболее часто встречалась замена S531L, выявленная у 93 из 111 (83,8%) изолятов. У всех МБТ с этой мутацией был определен высокий уровень устойчивости (у 91 МИК была ≥ 16 и у 2 МИК составила 8 мкг/мл) [18, 32]. Четыре культуры с мутациями D516Y, H526L и H526N в BACTEC™ MGIT™ 960 были чувствительными к R и обладали «пограничным» и низким уровнем устойчивости в MycoTB, что согласуется с результатами других авторов [30, 36, 37]. Два монорезистентных к R изолята с мутациями L511R и H526R также обладали высоким уровнем устойчивости (МИК = 8,0 и ≥16,0 мкг/мл, соответственно).

Наиболее часто встречаемой мутацией как среди монорезистентных к H МБТ, так и МБТ с МЛУ/ШЛУ является S315T в *katG* [18, 33]. С помощью «ТБ-ТЕСТ» она была выявлена у 76 из 118 (64,4%) изолятов. Другие замены встретились со следующей частотой: S315T и C15T (*katG* и *inhA*) – у 28 (23,7%), C15T (*inhA*) – у 8 (6,8%), S315T и Ile335Val (*katG*) – у 5 (4,2%) и один (0,9%) – с мутациями S315T, Ile335Val, C15T в обоих генах. У 115 (97,5%) изолятов была установлена МИК от 2 до ≥ 4 мкг/мл и у 3 (2,5%) – 1 мкг/мл, что соответствует высокой и умеренной степени устойчивости. В ранее опубликованных работах показано, что мутация C15T в *inhA* приводит к низкому или умеренному уровню устойчивости МБТ к H [19]. В нашем исследовании 2 из 8 изолятов с мутацией C15T в *inhA*, выявленной у монорезистентных к H МБТ, обладали «пограничной» (МИК = 0,25 мкг/мл) и низкой степенью устойчивости (МИК = 0,5 мкг/мл), однако у 6 из

Таблица 1. Корреляция между типом мутаций и уровнем устойчивости МБТ к рифампицину и изониазиду

ТБ-ТЕСТ *rpoB (R)* *katG/inhA* (H)	**МИК** > 1,0 (R) > 0,25 (H)	**Количество штаммов**	**Фенотипическая категория**
Всего изолятов МБТ с мутациями, приводящими к устойчивости к R – 111 В том числе:			
S531L	8,0 – 16,0	93	МЛУ – 60 ШЛУ – 33
S531W	≥ 16,0	1	МЛУ
H526Y	≥ 16,0	2	МЛУ – 1 ШЛУ – 1
H526P	≥ 16,0	1	МЛУ
D516G, L511P	≥ 16,0	1	МЛУ
H526R	≥ 16,0	3	МЛУ – 1 ШЛУ – 1 R^y – 1
D516V	≥ 16,0 и 2,0	3	ШЛУ
H526D	≥ 16,0	1	ШЛУ
H526L	4,0	1	ШЛУ
H526 L	1,0	1	H^y
H526N	0,5	1	H^y
D516Y	0,5 – 1,0	2	H^y
L511R	8,0	1	R^y
Всего изолятов МБТ с мутациями, приводящими к устойчивости к H – 118 В том числе:			
S315T	1,0 – ≥ 4,0	67	МЛУ – 50 ШЛУ – 17
S315T	2,0 – ≥ 4,0	9	H^y
S315T, C15T	2,0 – ≥ 4,0	26	МЛУ – 11 ШЛУ – 15
S315T, C15T	2,0 – ≥ 4,0	2	H^y
S315T, Ile335Val		5	МЛУ – 2 ШЛУ – 3
S315T, C15T Ile335Val	≥ 4,0	1	МЛУ
C15T	2,0 – ≥ 4,0	6	МЛУ – 3 ШЛУ – 3
C15T	0,25 – 0,5	2	H^y

Примечание: H^y – устойчивость к H, R^y – устойчивость к R.

8 устойчивых и к H, и к R МБТ с данной мутацией выявлен высокий уровень устойчивости [33].

Выявленные типы мутаций с помощью «ТБ-ТЕСТ» в вышеуказанных генах в 100% совпали с данными «ТБ-БИОЧИП».

С помощью «ТБ-ТЕСТ» мутации в генах *gyrA* и/или *gyrB* были обнаружены у всех 55 устойчивых изолятов МБТ: у 38 из 55 (72,7%) с ШЛУ, 14 (21,8%) с МЛУ, одного (1,8%) с устойчивостью к H, одного (1,8%) с устойчивостью к R и двух (3,6%) – чувствительных к обоим препаратам (табл. 2).

Высоким уровнем устойчивости к обоим препаратам обладали 20 изолятов с мутациями в кодоне D94 (D94G, D94Y, D94N), но не D94A, а также с редко встречающейся мутацией G88C и двойной мутацией в *gyrA* – A90V, D94N и в *gyrA/gyrB* – D94G/G509A, A90V/D500N, как описано ранее другими авторами [17, 20, 26]. Уровень устойчивости МБТ с мутациями A90V и S91P к Ofl варьировал от среднего до высокого, а к Mox – от низкого до среднего [17, 20]. Низким уровнем устойчивости или «пограничной» чувствительностью к Ofl и низкой устойчивостью к Mox обладали изоляты с заменами D94A, D94V, двойной в *gyrA* – S91P, D94A и в *gyrA/gyrB* – G88A, H70A/G509A. МБТ с мутациями, выявленными только в *gyrB* (у двух изолятов – N538K и у одного – D500H), имели «пограничную» чувствительность и низкую устойчивость к обоим препаратам. В BACTEC™ MGIT™ 960 один штамм с N538K показал устойчивость только к Mox, другой с этой заменой – к обоим препаратам, а изолят с D500H – монорезистентность к Ofl [21, 26]. Таким образом, в большинстве изолятов высокий и умеренный уровень устойчивости МБТ к Fq связан с мутациями в гене *gyrA* или в *gyrA/gyrB*, а «пограничная» чувствительность и низкая устойчивость – в *gyrB* [12, 21, 26]. Значения МИК Mox в 2–4 раза меньше по сравнению с МИК Ofl, что демонстрирует его преимущество в применении для лечения пациентов туберкулезом с МЛУ с МБТ, устойчивыми к Ofl [17, 26].

Необходимо отметить, что в исследуемых изолятах с помощью «ТБ-БИОЧИП-2» мутации были определены только у 49

Таблица 2. Корреляция между типом мутаций и уровнем устойчивости МБТ к офлоксацину и моксифлоксацину

ТБ-ТЕСТ *gyrA/gyrB* **(Fq)**	**МИК (мкг/мл)**		**Количество штаммов (*n* = 150)**	**Фенотипическая категория**
	> 2,0 (Ofl)	> 0,5 (Mox)		
A90V/wt	4,0 – 8,0	1,0 – 4,0	7	МЛУ, Fq^y – 1 ШЛУ – 4 H^y, Fq^y – 2
A90V/ D500N	16,0	8,0	1	ШЛУ
S91P/wt	4,0 – 8,0	1,0 – 4,0	4	ШЛУ – 4
D94G/wt	8,0 – 32,0	2,0 – 8,0	20	МЛУ, Fq^y – 4 ШЛУ – 14 Fq^y, K^y – 1 H^y, Fq^y, Ag^y – 1
D94G/ G509A	16,0	4,0	1	ШЛУ
D94N	8,0 – 32,0	2,0 – 8,0	6	МЛУ, Fq^y – 2 ШЛУ – 4
D94Y	8,0	4,0	1	ШЛУ
D94A	2,0 – 8,0	0,5 – 2,0	5	МЛУ, Fq^y – 2 ШЛУ – 1 Fq^y – 1 R^y, Fq^y, Ag^y – 1
D94A/E540D	4,0	2,0	1	ШЛУ
D94V	4,0	0,25; 1,0	2	ШЛУ
G88C	32,0	8,0	1	ШЛУ
S91P, D94A	2,0	0,5	1	ШЛУ
A90V, D94N	16,0	8,0	1	ШЛУ
G88A,H70A/G509A	4,0	1,0	1	МЛУ, Fq^y
wt/N538K	2,0; 4,0	1,0	2	ШЛУ
wt/ D500H	4,0	0,5	1	ШЛУ (Ofl^y)
wt/ wt	0,06 – 1,0	0,06 – 0,5	94	МЛУ – 55 H^y – 10 R^y – 1 $H^ч$, $R^ч$ – 28
wt/ R485C	0,06	0,25	1	МЛУ

Примечание: H^y – устойчивость к H, $H^ч$ – чувствительность к H, R^y – устойчивость к R, $R^ч$ – чувствительность к R, Fq^y– устойчивость к Fq, Ag^y – устойчивость к Ag, K^y – устойчивость к K, Ofl^y – устойчивость к Ofl.

из 55 (89,0%) устойчивых к Fq МБТ и у 48 (87,3%) – с помощью GenoType MTBDR*sl*. Это связано с отсутствием на чипе замен D94V, G88A, H70A в *gyrA* и G88C в GenoType MTBDR*sl*, а также региона гена *gyrB* в обоих тест-системах, что уменьшает корреляцию с микробиологическими результатами.

Устойчивость к K, A и капреомицину (Cap) связана с мутациями в гене 16S-рРНК (*rrs*) в 1400 регионе (A1401G, G1484T, C1402T, C1402A), встречающимися примерно в 60% штаммов, устойчивых к K, и 75% – к A и CAP [10]. Чаще всего встречается замена A1401G, которая приводит к высокому уровню устойчивости к K и перекрестной устойчивости к A и иногда к Cap [9]. Низкий уровень устойчивости к K связывают с мутациями в промоторной области гена *eis*, кодирующего ацетилтрансферазу *Eis* [11, 39].

В нашем исследовании (табл. 3) замена A1401G преобладала среди МБТ. устойчивых к обоим Ag и выявлена у 28 из 33 (84,8%) изолятов, большинство из которых обладали высоким уровнем устойчивости к K и A [7, 9, 40]. Один (3,0%) изолят с мутацией G1484T показал в MycoTB низкий уровень устойчивости к K и «пограничную» чувствительность к A [5]. Мутации в промоторной области гена *eis* были обнаружены в 40 изолятах, из которых три с мутацией C14T были устойчивы к обоим препаратам с умеренным уровнем устойчивости к K и «пограничной» чувствительностью или чувствительностью к A. Остальные замены (C14T, G10A, C12T, G37T) были выявлены у МБТ, устойчивых только к K с низким и умеренным уровнем. У четырех из 40 устойчивых к K изолятов и у одного из 33, устойчивых к обоим Ag, мутации в *rrs* и *eis* не были обнаружены (в таблице выделены жирным шрифтом). Возможно, это связано с мутациями в другом регионе гена *rrs* [40] или в 5′ Untranslated region *whiB7*, не представленных в «ТБ-ТЕСТ» [29].

Тест-система GenoType MTBDR*sl* позволяет определять мутации только в гене *rrs*. С помощью «ТБ-ТЕСТ» дополнительно у 39 (53,4%) изолятов из 73, устойчивых к Ag и/или K определены мутации в гене *eis*, что повышает корреляцию с фенотипическим определением ЛЧ в BACTEC™ MGIT™ 960 до 93,2%.

Таблица 3. Корреляция между типом мутаций и уровнем устойчивости МБТ к канамицину и амикацину

ТБ-ТЕСТ *rrs/eis* **(K, A)**	**МИК (мкг/мл)**		**Количество штаммов (*n* = 150)**	**Фенотипическая категория**
	> 5,0 (K)	> 4,0 (A)		
A1401G/wt	20,0 – 40,0	8,0 – 16,0	28	МЛУ, Agy – 9 ШЛУ – 17 H^y, Fq^y, Ag^y – 1 R^y, Fq^y, Ag^y – 1
G1484T/wt	10,0	2,0	1	ШЛУ
wt /C14T	10,0 – 20,0	1,0 – 2,0	6	МЛУ, K^y – 3 МЛУ, Ag^y – 2 ШЛУ – 1
wt /G10A	5,0 – 10,0	0,25 – 1,0	13	МЛУ, K^y – 2 МЛУ, Fq^y, K^y – 9 H^y, K^y – 2
wt /C12T	2,5 – 5,0	0,25 – 1,0	7	МЛУ, Fq^y, K^y – 4 H^y, Fq^y, K^y – 1 МЛУ, K^y – 2
wt /C12T	40	1	1	МЛУ, Fq^y, K^y – 1
wt /C12T	2,5	0,25	1	МЛУ – 1
wt /G37T	5,0 – 10,0	0,5 – 1,0	12	МЛУ, K^y – 8 МЛУ, Fq^y, K^y – 3 Fq^y, K^y – 1
wt /wt	**2,5**	**0,5**	**1**	**ШЛУ**
wt / wt	**2,5**	**0,5**	**1**	**МЛУ, Fq^y, K^y**
wt / wt	**5 to 10**	**0,25 to 1**	**3**	**МЛУ, K^y – 2** **ШЛУ – 1**
wt / wt	0,6 to 2,5	0,125 to 2	75	$H^ч$, $R^ч$ – 28 R^y – 1 H^y – 8 H^y, Fq^y – 1 МЛУ – 28 МЛУ, Fq^y – 8 Fq^y -1
wt / wt	5,0	1,0	1	МЛУ, Fq^y

Примечание: H^y – устойчивость к H, $H^ч$ – чувствительность к H, R^y – устойчивость к R, $R^ч$ – чувствительность к R, Fq^y– устойчивость к Fq, Ag^y – устойчивость к Ag, K^y – устойчивость к K.

Кроме основных препаратов H, R, Fq и Ag, устойчивость МБТ к которым определяется как ШЛУ, тест-система «ТБ-ТЕСТ» позволяет определять генетические детерминанты устойчивости возбудителя к E, однако роль некоторых из них до конца не ясна [27, 28]. Наиболее часто встречаются мутации в 306-м кодоне, но и они выявляются как у устойчивых, так и у чувствительных к E изолятов [4]. В нашем исследовании в BACTEC™ MGIT™ 960 ЛЧ МБТ к E была определена у 79 из 150 (52,7%) изолятов, в том числе трех (3,8%, монорезистентных к H, 42 (53,2%) с МЛУ и 34 (43,0%) с ШЛУ. С помощью «ТБ-ТЕСТ» мутации обнаружены у 96 из 150 (64,0%) изолятов, из которых 21 был чувствительным к E и 75 – устойчивыми. Наиболее часто встречалась мутация M306V, выявленная в 30,2% изолятах, в 15,6% выявлена мутация D354A, в равном количестве (по 18,8%) обнаружены мутации M306I и Q497R, остальные отмечены в единичных случаях. Достоверной корреляции между типом мутации и уровнем устойчивости МБТ к E не наблюдалось, однако у тех изолятов, в которых определены мутации, но фенотипически сохранялась чувствительность к препарату, МИК соответствовали «пограничному» уровню чувствительности (4,0 мкг/мл). Эти результаты подтверждают предыдущие данные, что методы микроразведений для определения уровня устойчивости, в данном случае с помощью теста МусоТВ, лучше коррелируют с выявленными мутациями в *embB* по сравнению с традиционными культуральными методами [41].

Определение генотипа исследуемых изолятов с помощью «ТБ-ТЕСТ» осуществляли на основе анализа олигонуклеотидных полиморфизмов (SNP) (16). Результаты исследования показали, что в московском регионе, также как и в других регионах России, преобладали МБТ с генотипом Beijing, определенные

у 78,0% изолятов, из которых 20,0% относились к BO/W148. Генотипы LAM, европейско-американская линия, Ural и Haarlem определены в значительно меньшем проценте случаев – 8,0%, 8,0%, 4,0% и 2,0% изолятов, соответственно [22, 23]. Доли МБТ с МЛУ и с ШЛУ среди всех изолятов с генотипом Beijing составили 53,8% и 24,8%, соответственно, из которых к линии BO/W148 относились 30,5% и 34,4% штаммов [3, 8, 31]. Наиболее распространенным сочетанием мутаций среди них было S315T и S531L (61,9%), приводящее к высокой степени устойчивости к H и R, из которых 47,4% принадлежали к BO/W148 [15, 24]. В нашем исследовании мутации D94G в *gyrA* и A1401G в *rrs*, приводящие к высокой степени устойчивости к Fq и Ag, определены в 43,9% и 37,0%, из которых 38,9% и 35,0% относились к генотипу BO/W148, соответственно [3, 31]. В то же время замена M306V в гене *embB*, приводящая у большинства штаммов к низкой степени устойчивости, обнаружена в 29,3% изолятов, из которых к BO/W148 принадлежали 28,6%.

Заключение

Исследование показало, что анализ генов *gyrB* (устойчивость к Fq) и *eis* (устойчивость к K), а также определение дополнительных генетических детерминант в гене *embB* (устойчивость к E) с помощью «ТБ-ТЕСТ» значительно повышает корреляцию с фенотипическим определением ЛЧ МБТ к этим препаратам по сравнению с предыдущими версиями тест-систем гибридизационного анализа. Кроме того, из-за ограниченного выбора эффективных лекарственных препаратов в лечении туберкулеза с МЛУ или ШЛУ МБТ, определение типа мутации и связанной с ней степени лекарственной устойчивости МБТ к препаратам основного и резервного ряда может дать полезную информацию для клиницистов для дальнейшей оптимизации проводимого лечения. Одновременное генотипирование изолятов позволяет проводить эпидемиологический мониторинг туберкулезной инфекции, направленный на выявление очагов и предотвращение путей ее распространения.

Литература

1. *Макарова М.В., Сафонова С.Г., Исаева Ю.Д., Крылова Л.Ю., Носова Е.Ю., Литвинов В.И. Определение критической концентрации химиопрепаратов для оценки лекарственной чувствительности Mycobacterium tuberculosis с помощью тест-системы Sensititre MycoTB. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2015. – № 3. – С. 63-67.*
2. *Abuali M., Katariwala R., LaBombardi V. A comparison of the Sensititre MYCOTB panel and the agar proportion method for the susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 31. – N. 5. – P. 835-839.*
3. *An D., Duyen N., Lan N. et al. Beijing genotype of Mycobacterium tuberculosis is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53. – N. 11. – P. 4835-4839.*
4. *BakuBa Z., Napiórkowska A., Bielecki J. et al. Mutations in the embB gene and their association with ethambutol resistance in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Poland. // BioMed. Res. Intern. – 2013. – Vol. 167954. – P. 5.*
5. *Bauskenieks M., Pole I., Skenders G. et al. Genotypic and phenotypic characteristics of aminoglycoside-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates i n Latvia // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2015. – Vol. 81.– P. 177-182.*
6. *Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of Mycobacterium tuberculosis with extensive resistance to second-line drugs-worldwide, 2000–2004. // MMWR. – 2006.– Vol. 55.– P. 301-305.*
7. *Chakravorty S., Lee J., Cho E. et al. Genotypic susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis isolates for amikacin and kanamycin resistance by use of a rapid sloppy molecular beacon-based assay identifies more cases of low-level drug resistance than phenotypic lowenstein-jensen testing. // J. Clin. Microbiol. – 2015. – Vol. 53. – N. 1. – P. 41-53.*
8. *Drobniewski F., Balabanova Y., Nikolayevsky V. et al. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. // JAMA. – 2005. – Vol. 293. – N. 22. – P. 2726-2731.*
9. *Du Q., Dai G., Long Q. et al. Mycobacterium tuberculosis rrs A1401G mutation correlates with high-level resistance to kanamycin, amikacin, and capreomycin in clinical isolates from mainland China. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2013. – Vol. 77. – P. 138-142.*
10. *Georghiou S., Magana M., Garfein R. et al. Evaluation of genetic mutations associated with Mycobacterium tuberculosis resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review. // PloS One. – 2012. – Vol. 7. – e33275.*
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. – N. 9. – P. 2107-2109.*
12. *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. – N. 10. – P. 4498-4500.*
13. *Hall L., Jude K., Clark S. et al. Evaluation of the Sensititre MycoTB plate for susceptibility testing of the Mycobacterium tuberculosis complex against first- and second-line agents. // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50. – N. 11. – P. 3732-3734.*
14. *Haydel S. Extensively drug-resistant tuberculosis: a sign of the times and an impetus for antimicrobial discovery.// Pharmaceuticals (Basel). – 2010. – Vol. 3. – N. 7. – P. 2268-2290.*
15. *Hillemann D., Kubica T., Rüsch-Gerdes S. et al. Disequilibrium in distribution of resistance mutations among Mycobacterium tuberculosis Beijing and non-Beijing strains isolated from patients in Germany. // Antimicrob Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49. – N. 3. – P. 1229-1231.*
16. *Homolka S., Projahn M., Feuerriegel S. et al. High resolution discrimination of clinical Mycobacterium tuberculosis complex strains based on single nucleotide polymorphisms. // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – N. 7. – e39855.*
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. – N. 1. – P. 7-11.*

18. Kambli P., Ajbani K., Sadani M. et al. Defining multidrug-resistant tuberculosis: correlating GenoType MTBDRplus assay results with minimum inhibitory concentrations. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2015. – doi: 10.1016/j. diagmicrobio.

19. Larsen M., Vilche`ze C., Kremer L. et al. Overexpression of inhA, but not kasA, confers resistance to isoniazid and ethionamide in Mycobacterium smegmatis, M. bovis BCG and M. tuberculosis. // Mol. Microbiol. J. – 2002. – Vol. 46. – P. 453-466.

20. Li J., Gao X., Luo T. et al. Association of gyrA/B mutations and resistance levels to fluoroquinolones in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. // Emerging. Microbes. Infect. – 2014. – Vol. 3. – e19.

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. – N. 6. – P. 1-10.

22. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of Mycobacterium tuberculosis. // Clin. Microbiol. – 2013. – Vol. 26. – P. 342-360.

23. Mokrousov I. The quiet and controversial: Ural family of Mycobacterium tuberculosis. // Infection. Genetics Evolution. – 2012. – Vol. 12. – P. 619-629.

24. Mokrousov I., Limeschenko E., Steklova L. High prevalence of katG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001. // Antimicrobial Agents Chemotherapy. – 2002. – Vol. 46. – N. 5. – P. 1417-1424.

25. Mpagama S., Houpt E., Stroup S. et al. Application of quantitative second-line drug susceptibility testing at a multidrug-resistant tuberculosis hospital in Tanzania. // BMC Infectious Dis. – 2013. – Vol. 13. – P. 432.

26. Nosova E., Bukatina A., Isaeva Y. 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. Park Y., Ryoo S., Lee S. et al. Correlation of the phenotypic ethambutol susceptibility of Mycobacterium tuberculosis with embB gene mutations in Korea. // J. Med. Microbiol. – 2012. – Vol. 61. – N. 4. – P. 529-534.

28. Plinke C., Rüsch-Gerdes S., Niemann S. Significance of mutations in embB Codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical Mycobacterium tuberculosis isolates. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2006. – Vol. 50. – N. 5. – P. 1900-1902.

29. Reeves A., Campbell P., Sultana R. et al. Aminoglycoside cross-resistance in Mycobacterium tuberculosis due to mutations in the 5=Untranslated region of whiB7. // AAC. – 2013. – Vol. 57. – N. 4. – P. 1857-1865.

30. 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. Clin. Microbiol. – 2013. – Vol. 51. – N. 8. – P. 2641-2645.

31. Shitikov E., Bespyatykh J., Ischenko D. et al. Unusual large-scale chromosomal rearrangements in Mycobacterium tuberculosis Beijing B0/W148 cluster isolates. // Plos ONE. – 2014. – Vol. 9. – N. 1. – e84971.

32. Springer B., Lucke K., Calligaris-Maibach R. et al. Quantitative drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by use of MGIT 960 and EpiCenter instrumentation. // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47. – N. 6. – P. 1773-1780.

33. Springer B., Calligaris-Maibach R., Ritter C., Böttger E. Tuberculosis drug resistance in an area of low endemicity in 2004 to 2006: semiquantitative drug susceptibility testing and genotyping. // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46. N. 12. – P. 4064-4067.

34. Supply P., Allix C. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit–variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – N. 12. – P. 4498-4510.

35. Trauner A., Borrell S., Reither K. et al. Evolution of drug resistance in tuberculosis: recent progress and implications for diagnosis and therapy. // Drugs. – 2014. – Vol. 74. – P. 1063-1072.

36. van Deun A., Barrera L., Bastian I. et al. Mycobacterium tuberculosis strains with highly discordant rifampin susceptibility test results. // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47. – N. 11. – P. 3501-3506.

37. van Ingen J., Aarnoutse R., de Vries G. et al. Low-level rifampicin-resistantMycobacterium tuberculosis strains raise a new therapeutic challenge. // Intern. J. Tub. Lung. Dis. – 2011. – Vol. 15. – N. 7. – P. 990-992.

38. World Health Organization. Global Tuberculosis Control-Epidemiology, Strategy, Financing. – World Health Organization: Geneva, Switzerland. – 2009.

39. Zaunbrecher M., Sikes J., 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.

40. Zhang. Z., Liu M., Wang Y. et al. Molecular and phenotypic characterization of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates resistant to kanamycin, amikacin, and capreomycin in China. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 33. – N. 11. – P. 1959-1966.

41. Zhang Z., Wang Y., Pang Yu. et al. ethambutol resistance as determined by broth dilution method correlates better than sequencing results with embb mutations in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates// JCM. – 2014. – Vol. 52. – N. 2. – P. 638-641.

Сведения об авторах

Носова Елена Юрьевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «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 (495) 603-30-33

Факс + 7 (499) 785-20-82

e-mail: rna68@rambler.ru

Сведения об авторах

Хахалина Анастасия Александровна *– научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский 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

Галкина Ксения Юрьевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский 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

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

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. +7 (495) 603-30-33
e-mail: dna77@mail.ru

Крылова Людмила Юрьевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «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

Макарова Марина Витальевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ «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 (495) 603-30-33
Факс + 7 (499) 785-20-82
e-mail: makarova75@yandex.ru

Сафонова Светлана Григорьевна *– заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ «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 (495) 603-30-33
e-mail: safonova.s.g.@inbox.ru