

А.Э. Эргешов^{1, 2}, С.Н. Андреевская¹,
Т.Г. Смирнова¹, Л.Н. Черноусова¹



¹Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Российская Федерация

²Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова,
Москва, Российская Федерация

Туберкулез с лекарственной устойчивостью возбудителя: механизмы формирования и методы молекулярно-генетической диагностики

Широкое распространение туберкулеза с лекарственной устойчивостью возбудителя — важная проблема общественного здравоохранения. Для лучшего понимания этого явления в статье суммируются современные представления о механизмах формирования устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам. Особое внимание уделяется механизму приобретенной резистентности, основанному на мутациях в генах, кодирующих мишени противотуберкулезных препаратов, или ферменты, переводящие пролекарство в активную форму, рассматривается влияние этих мутаций на возбудителя. В статье сделан акцент на ведущей роли молекулярно-генетических методов для диагностики лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* и подчеркивается значимость этих методов для предотвращения расширения спектра резистентности возбудителя и профилактики распространения устойчивых клонов в популяции. Сравнение возможностей секвенирования и методов, основанных на ПЦР, позволило заключить, что на современном этапе развития технологий каждый из этих подходов целесообразно использовать для решения конкретных задач: отечественные тесты, основанные на ПЦР, — для ежедневной диагностики, а секвенирование — для фундаментальных исследований в области эволюции *M. tuberculosis* и эпидемиологического мониторинга. Предложены перспективные направления исследований резистентности *M. tuberculosis*, которые позволят выработать новые подходы для диагностики и лечения туберкулеза с лекарственной устойчивостью возбудителя и обеспечить эффективную персонализированную терапию.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, лекарственная устойчивость, мутации, секвенирование, ПЦР

Для цитирования: Эргешов А.Э., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Черноусова Л.Н. Туберкулез с лекарственной устойчивостью возбудителя: механизмы формирования и методы молекулярно-генетической диагностики. *Вестник РАМН*. 2023;78(6):609–620. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn8807>

609

Введение

Проблема устойчивости патогенных микроорганизмов к противомикробным препаратам входит в десятку основных стоящих перед человечеством глобальных угроз

здоровью населения и представляет собой серьезную общемировую угрозу, имеющую далеко идущие последствия для здравоохранения и экономики [1, 2]. Возбудитель туберкулеза не стал исключением: по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), во всем

A.E. Ergeshov^{1, 2}, S.N. Andreevskaya¹, T.G. Smirnova¹, L.N. Chernousova¹

¹Central TB Research Institute, Moscow, Russian Federation

²A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

Drug-Resistant Tuberculosis: Development Mechanisms and Methods of Molecular Genetic Diagnosis

The widespread occurrence of drug-resistant tuberculosis is an important public health challenge. To better understand this phenomenon, the article summarizes current ideas on the development of mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to antituberculosis drugs. Special attention is paid to the mechanism of acquired resistance based on mutations in the genes encoding antituberculosis drug targets or enzymes that translate pro-drug into its active form; the effect of these mutations on fitness of the pathogen is in the focus of the article. It emphasizes the leading role of molecular genetic methods for diagnosing *M. tuberculosis* drug resistance and importance of these methods for preventing the expansion of the pathogen's resistance range and the spread of resistant clones in the population. A comparison of sequencing and PCR-based methods capacities led to a conclusion that at the current stage of technological development it is reasonable to use each of these approaches for specific purposes: domestic PCR-based tests — for diagnosis, and sequencing — for basic research of *M. tuberculosis* evolution and epidemiological monitoring. Promising areas of *M. tuberculosis* resistance research were proposed to develop new approaches for diagnosis and treatment of drug-resistant tuberculosis and to provide effective personalized therapy.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, mutations, sequencing, PCR

For citation: Ergeshov AE, Andreevskaya SN, Smirnova TG, Chernousova LN. Drug-Resistant Tuberculosis: Development Mechanisms and Methods of Molecular Genetic Diagnosis. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2023;78(6):609–620. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn8807>

мире после некоторой стабилизации в период 2015–2020 гг. в 2021 г. отмечается нарастание туберкулеза с лекарственной устойчивостью возбудителя (450 тыс. новых случаев в 2021 г. по сравнению с 437 тыс. в 2020-м, рост на 3,1%) [3].

В зависимости от спектра препаратов, к которым устойчив возбудитель, выделяют несколько значимых вариантов лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* — это множественная (МЛУ), предширокая (пре-ШЛУ) и широкая (ШЛУ) лекарственная устойчивость. МЛУ характеризуется устойчивостью *M. tuberculosis* одновременно к двум наиболее эффективным противотуберкулезным препаратам — рифампицину и изониазиду независимо от наличия устойчивости к другим противотуберкулезным препаратам. При пре-ШЛУ к этой комбинации препаратов добавляется устойчивость к препаратам фторхинолонового ряда и при ШЛУ к предыдущему варианту устойчивости добавляется устойчивость к новым противотуберкулезным препаратам — линезолиду или бедаквилину [4, 5].

Россия относится к странам с высоким бременем туберкулеза с МЛУ возбудителя (МЛУ-ТБ) (показатель включает также пре-ШЛУ и ШЛУ). Несмотря на то что распространенность МЛУ-ТБ в стране в последние годы начала снижаться (с 20,6 на 100 тыс. населения в 2020 г. до 18,1 на 100 тыс. населения в 2021 г.), этот показатель по-прежнему остается высоким [3, 6]. Успешный исход терапии МЛУ-ТБ, по данным ВОЗ, составляет около 60%. Еще сложнее поддаются лечению пре-ШЛУ-ТБ и особенно ШЛУ-ТБ, возбудитель при котором устойчив, в том числе к современным эффективным противотуберкулезным препаратам [3, 7].

Таким образом, расширение спектра лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза, особенно за счет противотуберкулезных препаратов последнего поколения, представляет собой крайне опасное явление, так как существенно ограничивает эффективность существующих методов лечения и ведет к ухудшению эпидемической ситуации по туберкулезу. Понимание основ эволюции лекарственной устойчивости будет способствовать разработке эффективных стратегий предотвращения амплификации резистентности. Учитывая актуальность проблемы, в статье будут рассмотрены современные представления о возникновении лекарственной устойчивости у *M. tuberculosis* и описаны существующие подходы для быстрого и высокоэффективного определения чувствительности к противотуберкулезным препаратам как основного пути предотвращения распространения лекарственно-устойчивых *M. tuberculosis*.

Природа лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*

M. tuberculosis обладают естественной резистентностью ко многим антибактериальным препаратам [8, 9]. Главным образом естественная резистентность *M. tuberculosis* обусловлена особенностью строения клеточной стенки. Клеточная стенка *M. tuberculosis*, в отличие от грамположительных и грамотрицательных бактерий, имеет сложный состав и представлена тремя структурами: 1) наружной мембраной, которая имеет два слоя — внешний, состоящий из липидов, и внутренний, состоящий из длинноцепочечных миколовых кислот; 2) слоем арабиногалактана, ковалентно связанного с миколовыми кислотами, и 3) слоем пептидогликана. Большое количество

липидов делает оболочку клеток *M. tuberculosis* высокогидрофобной, а значительная толщина оболочки препятствует диффузии даже гидрофобных молекул. Периплазматическое пространство, отделяющее клеточную стенку от липидного бислоя мембраны, дополнительно защищает клетки от стрессов окружающей среды и проникновения антибиотиков. Кроме того, *M. tuberculosis* обладают природной устойчивостью к β-лактамам антибиотикам благодаря тому, что в геноме *M. tuberculosis* закодированы по крайней мере четыре β-лактамазы (*blaC*, *blaS*, Rv0406c и Rv3677c), которые гидролизуют β-лактамное кольцо и инактивируют препараты [8, 10].

Несмотря на такую мощную защиту микобактерий от проникновения извне различных субстанций, которые могут причинить потенциальный вред, препараты, эффективные против *M. tuberculosis*, существуют. Их принято разделять на препараты первой и второй линий: препараты первой линии, или основные, которые применяют для лечения туберкулеза, вызванного лекарственно-чувствительными микобактериями, и препараты второй линии, или резервные, которые применяют для лечения туберкулеза с МЛУ, пре-ШЛУ и ШЛУ возбудителя [4]. ВОЗ дополнительно разделяет препараты второй линии на три группы (от А до С) в зависимости от приоритетности включения в схему терапии туберкулеза с лекарственной устойчивостью возбудителя (табл. 1) [11]. Противотуберкулезные препараты воздействуют на структурные компоненты клетки и клеточные процессы, в результате оказывая бактерицидное или бактериостатическое действие на *M. tuberculosis*. Так, изониазид, этионамид/протионамид, этамбутол, D-циклосерин, деламанид/претоманид подавляют биосинтез клеточной стенки, рифампицин ингибирует синтез РНК, фторхинолоны — синтез ДНК, стрептомицин, канамицин/амикацин, капреомицин, линезолид — синтез белка, бедаквилин — синтез АТФ, пипразинамид истощает мембранный потенциал клетки и т.д. [12, 13].

В процессе адаптации к условиям химиотерапии у *M. tuberculosis* выработались механизмы, позволяющие защититься от действия противотуберкулезных препаратов. Ряд таких механизмов имеет неспецифический характер и связан с гиперпродукцией эффлюксных насосов, модификацией лекарств или с мимикрией мишени [12, 13].

Эффлюксные насосы представляют собой мембранные белки, которые осуществляют активный транспорт питательных веществ, токсинов, отходов или сигнальных молекул через клеточную оболочку. Также эффлюксные насосы могут вытеснять молекулы лекарств, попадающих в бактериальные клетки. Повышение количества эффлюксных насосов в клетке *M. tuberculosis*, которое происходит вследствие сверхэкспрессии соответствующих генов, способно снизить концентрацию противотуберкулезных препаратов в клетке вплоть до нетоксичной для *M. tuberculosis* [8, 17]. Всего у *M. tuberculosis* существует пять суперсемейств эффлюксных насосов, каждое из которых включает 10–20 белков-переносчиков, но значение для развития устойчивости к противотуберкулезным препаратам установлено пока лишь для некоторых из них. Например, было показано, что в ответ на лечение фторхинолонами повышается уровень экспрессии насоса PstB, кодируемого Rv0933c, что позволяет предположить связь гиперэкспрессии PstB с устойчивостью к фторхинолонам [14, 18]. Также отмечена повышенная экспрессия ряда генов, кодирующих эффлюксные насосы, в ответ на терапию изониазидом и рифампицином (*jefA*, *drpA*, *drpB*, *efpA*,

Таблица 1. Механизм действия препаратов и гены, ассоциированные с устойчивостью *M. tuberculosis* [12, 13, 18, 23, 28, 31]

Группа препаратов по классификации ВОЗ [7]	Препарат	Механизм действия препарата	Структуры, связанные с устойчивостью	
			Ген	Продукт
—	<i>Препараты первого ряда</i>			
	Изониазид	Ингибирование синтеза клеточной стенки (подавление синтеза миколовых кислот)	<i>katG</i>	Каталаза/пероксидаза ³
	Рифампицин	Ингибирование синтеза РНК	<i>inhA</i>	NADH-зависимая эноил-АСР редуктаза
	Пиперазид ²	Закисление цитоплазмы и истощение мембранного потенциала	<i>rpoB</i>	β-субъединица РНК-полимеразы
			<i>rpsA</i>	Пиперазидаза ³
			<i>rpsA</i>	Рибосомальный белок S1
			<i>panD</i>	Аспартадилкарбоксилаза
	Этамбутол ²	Ингибирование синтеза клеточной стенки (подавление синтеза арабиногалактана)	<i>cap3C1</i>	Протеаза
	Стрептомицин ²	Ингибирование синтеза белка (блокирует малую субъединицу рибосомы)	<i>embB</i>	Арабинозилтрансфераза
			<i>rpsL</i>	Белок S12
		<i>rrs</i>	16S рРНК	
		<i>gidB</i>	Предполагаемая 16S рРНК-метилтрансфераза	
<i>Препараты второго ряда</i>				
А	Фторхинолоны	Ингибирование синтеза ДНК	<i>gyrA</i>	α-субъединица ДНК-гиразы
	Бедаквилин	Ингибирование синтеза АТФ	<i>gyrB</i>	β-субъединица ДНК-гиразы
	Линезолид	Ингибирование синтеза белка (блокирует большую субъединицу рибосомы)	<i>atpE</i>	АТФ-синтаза
			<i>rplC</i>	Рибосомальный белок L3
В	Циклосерин	Ингибирование синтеза клеточной стенки (подавление синтеза пептидогликана)	<i>rhl</i>	23S рРНК
			<i>ald</i>	L-аланиндегидрогеназа
	Деламаид	Ингибирование синтеза клеточной стенки (подавление синтеза миколовых кислот)	<i>alr</i>	D-аланинрацемемаза
			<i>ddn</i>	Деазафлавин-зависимая нитроредуктаза ³
			<i>fgd1</i>	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
			<i>fbtA</i>	Белок FbtA для биосинтеза кофактора флавина F ₄₂₀
		<i>fbtB</i>	Белок FbtB для биосинтеза кофактора флавина F ₄₂₀	
		<i>fbtC</i>	Белок FbtC для биосинтеза кофактора флавина F ₄₂₀	
C ¹	Амикацин	Ингибирование синтеза белка (блокирует малую субъединицу рибосомы)	<i>rrs</i>	16S рРНК
	Этионамид/протионамид	Ингибирование синтеза клеточной стенки (подавление синтеза миколовых кислот)	<i>inhA</i>	NADH-зависимая эноил-АСР редуктаза
			<i>ethA</i>	Моноксигеназа ³
	Пара-аминосалициловая кислота	Ингибирование синтеза фолиевой кислоты	<i>folC</i>	Дигидрофолатсинтаза
<i>dhfrA</i>			Дигидрофолатредуктаза	
— ⁴	Канамидин	Ингибирование синтеза белка (блокирует малую субъединицу рибосомы)	<i>hlyA</i>	Тимидилатсинтаза А
			<i>rrs</i>	16S рРНК
	Капреомицин	Ингибирование синтеза белка (блокирует малую субъединицу рибосомы)	<i>rrs</i>	16S рРНК
			<i>rrs</i>	16S рРНК

¹ Прочие препараты, которые могут быть использованы в случае, если режим не может быть составлен из препаратов групп А и В.

² При лечении МЛУ-, пре-ШЛУ- и ШЛУ-туберкулеза входит в группу С.

³ Трансформирует пролекарство в активную форму препарата.

⁴ Не являются препаратами, рекомендованными ВОЗ для лечения туберкулеза.

mmr, Rv1217-Rv1218, Rv1258c (Tap)) и стрептомицином (*whiB7* и Rv1258c (Tap)) [15, 16, 19, 20]. Также доказано, что гиперпродукция насоса JefA приводит к устойчивости к изониазиду, стрептомицину и этамбутолу, насоса Tap — к фторхинолонам и канамицину, насоса P55 (Rv1410c) — к стрептомицину, насоса IniBAC — к изониазиду и этамбутолу, насоса EfrA — к изониазиду и рифампицину, насоса MmpL17 — к изониазиду [14, 15, 18, 19]. Считается, что эффлюксные насосы являются хорошей мишенью для разработки новых противотуберкулезных препаратов — ингибиторов оттока [21, 22].

Еще один механизм неспецифической адаптации *M. tuberculosis* к противотуберкулезной терапии основан на том, что активность антибактериальных препаратов может утрачиваться из-за химических модификаций, таких как метилирование и ацетилирование, которые предотвращают связывание препарата с белком-мишенью [8, 17, 23]. Лучше всего изучен механизм инактивации аминокликозидов / циклических пептидов ацетилтрансферазой Eis (enhanced intracellular survival — белок повышения внутриклеточного выживания). Такое название этот белок получил из-за того, что препятствует первичному ответу макрофага в ответ на проникновение в него *M. tuberculosis*, следовательно, защищает микобактерии от иммунитета хозяина и помогает выжить патогену в макрофагах. В дополнение к этому Eis способен ацетилировать и инактивировать канамицин (но не амикацин) и капреомицин. Избыточная экспрессия гена *eis*, которая может возникать вследствие мутаций в его промоторе, приводит к устойчивости к канамицину и, вероятно, капреомицину [20, 24].

Интересным механизмом адаптации *M. tuberculosis* в ответ на антибактериальную терапию является мимикрия мишени, т.е. имитация возбудителем молекулы — мишени препарата. Эта уникальная стратегия применяется *M. tuberculosis* для нейтрализации действия фторхинолонов. Мишенью фторхинолонов в клетке *M. tuberculosis* является ДНК-гираза в комплексе с ДНК. Белок MfrA (*Mycobacterium fluoroquinolone resistance protein A* — микобактериальный белок устойчивости к фторхинолонам) по форме и размеру похож на ДНК *M. tuberculosis*. Это сходство приводит к тому, что ДНК-гираза связывается с MfrA, и этот комплекс становится мишенью для фторхинолонов: молекулы препарата расстраиваются на ложную мишень, и синтез ДНК в клетке продолжается [25, 26].

Описанные выше неспецифические механизмы могут быть непосредственной причиной развития лекарственной устойчивости за счет полной нейтрализации того или иного препарата или, что гораздо чаще, снижать концентрацию препарата в клетке до субингибиторной концентрации, что будет способствовать формированию и отбору клонов *M. tuberculosis* с генетически закрепленной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам, возникающей за счет спонтанных мутаций в генах, которые кодируют мишени препарата или ферменты, активирующие лекарственные средства [27–29].

Мутации в геноме *M. tuberculosis* являются высокоспецифическим механизмом формирования устойчивости к тому или иному противотуберкулезному препарату и рассматриваются как основной путь возникновения резистентности. Причем в отличие от других бактерий, которые могут приобретать лекарственную устойчивость в результате горизонтального переноса генов, опосредованного плазмидами, транспозонами или фагами, устойчивость *M. tuberculosis* обусловлена мутациями исключительно в хромосомных генах [12, 13, 30]. Однону-

клеотидные полиморфизмы, вставки и делеции в целевых генах приводят к неспособности метаболизировать пролекарства до активных форм или к модификации структуры мишени лекарственного средства, в результате чего происходит снижение эффективности связывания с препаратом (см. табл. 1).

Появление устойчивых к лекарствам мутантных клонов во многом обусловлено концентрацией лекарственного средства в месте нахождения возбудителя: при концентрации препарата ниже терапевтической *M. tuberculosis* сохраняют способность к делению и, следовательно, возникновению спонтанных мутаций. В результате мутантные клоны получают адаптивное преимущество и сохраняются в организме хозяина [12, 32, 33]. Такая ситуация может возникнуть из-за неправильно назначенной химиотерапии, слабой приверженности пациента к лечению, низкого качества препаратов, а также из-за особенностей метаболизма пациента и его нутритивного статуса. В процессе эволюции мутации в геноме могут накапливаться, приводя к появлению множественной и далее широкой лекарственной устойчивости, вплоть до тотальной [8, 14, 34].

Первый случай лекарственной устойчивости у микобактерий (устойчивость к стрептомицину) был зафиксирован вскоре после начала применения этого препарата для лечения туберкулеза [35]. Исследования с использованием полногеномного секвенирования позволили проследить дальнейшее прогрессирование лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*: сначала возникла комбинированная устойчивость к стрептомицину и изониазиду, затем присоединилась устойчивость к рифампицину и этамбутолу, далее — к пиперазину и наконец — к препаратам второго ряда [36–39].

Частота возникновения спонтанных мутаций составляет 10^{-6} – 10^{-8} . Так как спонтанные мутации, приводящие к лекарственной устойчивости, возникают независимо друг от друга, то вероятность возникновения устойчивости одновременно к трем препаратам составляет лишь 10^{-18} – 10^{-20} . Следовательно, если режим химиотерапии включает комбинацию из трех и более эффективных препаратов, то теоретически вероятность формирования лекарственно-устойчивого клона отсутствует, так как каждый вновь возникающий мутант, приобретший устойчивость к одному препарату, будет уничтожаться двумя другими препаратами. Поэтому фундаментальным принципом терапии туберкулеза является полихимиотерапия [4, 40].

Для предотвращения появления лекарственной устойчивости адекватная химиотерапия должна быть начата в максимально ранние сроки. Однако из-за того, что *M. tuberculosis* — медленно растущий микроорганизм, выделение культуры из диагностического материала для проведения тестов лекарственной чувствительности занимает не менее 2–3 нед и может достигать до 3 мес [4, 41]. Затем проводится культуральное определение лекарственной чувствительности, которое занимает еще 2–3 нед. Следовательно, важно развить методы, позволяющие быстро определять чувствительность *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам.

Секвенирование как инструмент диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза

Исходя из того, что основным специфическим механизмом приобретенной лекарственной устойчивости у *M. tuberculosis* являются мутации в определенных генах,

очевидно, что выявление этих мутаций — идеальный инструмент для диагностики. «Золотой стандарт» определения структуры генов — метод секвенирования. Появление технологий секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) существенно упростило и ускорило процедуру анализа геномов и имеет большой потенциал для использования в качестве метода для быстрого определения лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* [42].

Наиболее полную характеристику возбудителя представляет полногеномное секвенирование, которое позволяет получить не только информацию о наличии или отсутствии мутаций в генах, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к тому или иному препарату, но и данные для молекулярной эпидемиологии, эволюции и филогении *M. tuberculosis* [43–47].

Для получения достоверных результатов полногеномного секвенирования подходит только чистая культура *M. tuberculosis*, поскольку при прямом тестировании клинических образцов картина может быть искажена вследствие примеси ДНК человека и комменсальных микроорганизмов. Следовательно, время получения результатов генотипической лекарственной устойчивости будет определяться сроками получения культуры *M. tuberculosis* из диагностического материала, которые, как описано выше, могут составлять несколько месяцев, поэтому на данном этапе развития технологии полногеномное секвенирование нельзя отнести к ускоренным методам определения лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*.

Поскольку устойчивость к противотуберкулезным препаратам у *M. tuberculosis* обусловлена мутациями в известных генах, для определения лекарственной устойчивости можно применять целевое секвенирование, при котором анализируется нуклеотидная последовательность не всего генома, а только интересующих генных мишеней. Эта технология позволяет работать с ДНК, выделенной непосредственно из образцов клинического материала, и получить данные о мутациях в целевых генах в течение нескольких суток [47].

ВОЗ рекомендует этот метод для определения генотипической лекарственной чувствительности с 2018 г. [48]. В настоящее время на рынке представлены два коммерческих набора для секвенирования генов *M. tuberculosis*, вовлеченных в лекарственную устойчивость. Во-первых, это набор Next Gen-RDST (Исследовательский институт трансляционной геномики, США), который выявляет мутации в 6 генах, связанных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, аминогликозидам и циклическим пептидам [49]. Во-вторых, более функциональный набор Deeplex®-MycTB (GenoScreen, Лилль, Франция), позволяющий определять мутации в 18 генах, ассоциированных с устойчивостью к 12 противотуберкулезным препаратам (рифампицину, изониазиду, этионамиду, пипразинамиду, этамбутолу, стрептомицину, амикацину, канамицину, капреомицину, фторхинолонам, линезолиду, бедаквилину). Дополнительно по анализу последовательности генов *hsp65*, *rrs*, *rplC*, *rrl* этот тест позволяет определить вид микобактерий, входящих в туберкулезный комплекс (МБТК), или нетуберкулезных микобактерий (НТМБ), получить споллиготип *M. tuberculosis* и, суммировав всю полученную информацию, провести филогенетический анализ [50, 51].

В 2021 г. ВОЗ с целью улучшения интерпретации результатов секвенирования издала каталог мутаций микобактерий туберкулезного комплекса, который позволил упорядочить знания о роли генетических поли-

морфизмов в формировании лекарственно-устойчивого фенотипа. Каталог содержит информацию о мутациях в генах, ассоциированных с устойчивостью ко всем противотуберкулезным препаратам первого ряда, а также к препаратам второго ряда: фторхинолонам, бедаквилину, линезолиду, деламамиду, амикацину, этионамиду, которые были получены при анализе почти 40 тыс. изолятов *M. tuberculosis* [52].

На основании сопоставления данных секвенирования с результатами теста фенотипической лекарственной чувствительности мутации были классифицированы на пять категорий: связанная с устойчивостью, не связанная с устойчивостью и три промежуточных варианта [52]. Набор мутаций первой категории (связанные с устойчивостью) представляет наибольший интерес при интерпретации результатов определения мутаций в целевых генах. В эту категорию вошли мутации, которые были выявлены у пяти и более изолятов *M. tuberculosis* вне зависимости от их фенотипической чувствительности к соответствующему препарату, нижняя граница 95%-го ДИ величины прогностической ценности положительного результата (ППР) была не меньше 25%, отношение шансов (ОШ) — > 1 со статистической значимостью, рассчитанной по критерию Фишера, $p < 0,05$. Число мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, и суммарная оценка диагностических характеристик метода таргетного секвенирования с использованием набора мутаций первой категории представлены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, при отсутствии в геноме *M. tuberculosis* какой-либо из мутаций, классифицированных как ассоциированные с лекарственной устойчивостью, штамм в 93,3–99,8% случаев будет фенотипически чувствительным к соответствующему препарату, т.е. метод таргетного секвенирования имеет высокую диагностическую специфичность при определении устойчивости ко всем традиционно используемым противотуберкулезным препаратам. В то же время диагностическая чувствительность метода, т.е. доля устойчивых штаммов, имеющих в геноме одну из мутаций первой категории, из всех фенотипически устойчивых штаммов, был достаточно высоким для рифампицина (92,3%) и изониазида (90,0%). Чувствительность таргетного секвенирования при определении устойчивости к остальным препаратам колебалась от 38,2 до 86,3%.

Еще один, возможно, наиболее важный с точки зрения определения генотипической лекарственной устойчивости показатель ППР оценивает, какая доля изолятов была правильно определена как фенотипически устойчивые при наличии в геноме одной из мутаций первой категории. Этот показатель был более 90% при определении устойчивости к рифампицину, изониазиду, пипразинамиду, левофлоксацину, стрептомицину, а для этамбутола, линезолида, амикацина и этионамида был недостаточно высоким.

Диагностические характеристики метода при определении устойчивости к бедаквилину и деламамиду определены не были, так как выделено мало штаммов с мутациями в целевых генах (четыре для бедаквилина и один для деламаида) и ни одна из них не была ассоциирована с фенотипической устойчивостью к этим препаратам. Для линезолида также были описаны только три мутации, из которых лишь одна была ассоциирована с фенотипической устойчивостью, чем объясняются низкие значения показателя чувствительности и ППР метода таргетного секвенирования для определения устойчивости к этому препарату.

Таблица 2. Диагностические характеристики метода таргетного секвенирования с использованием набора мутаций, определенных как «связанные с лекарственной устойчивостью», согласно каталогу ВОЗ [52]

Препарат	Исследовано штаммов	Число мутаций		Основные диагностические характеристики, %		
		Всего	Связанных с лекарственной устойчивостью	Чувствительность	Специфичность	ППР
Рифампицин	34 282	120	24	92,3	98,3	95,6
Изониазид	34 445	36	5	90,0	98,5	97,1
Этамбутол	30 708	59	14	86,3	93,3	71,1
Пиразинамид	15 902	233	105	56,8	99,1	91,9
Левифлоксацин	18 277	30	8	83,1	98,7	93,0
Бедаквилин	88	4	—	—	—	—
Линезолид	10 942	3	1	38,2	99,8	73,4
Деламанид	7778	1	—	—	—	—
Амикацин	16 978	28	2	76,4	99,1	87,4
Стрептомицин	13 984	33	12	75,2	98,0	94,8
Этионамид	13 918	27	4	47,2	95,8	75,2

Примечание. Диагностическая чувствительность метода — процент штаммов *M. tuberculosis* с одной из мутаций, входящих в число связанных с лекарственной устойчивостью по данным каталога ВОЗ, из числа штаммов *M. tuberculosis* с фенотипической устойчивостью к соответствующему препарату. Диагностическая специфичность метода — процент штаммов *M. tuberculosis*, не имеющих мутаций, входящих в число связанных с лекарственной устойчивостью по данным каталога ВОЗ, из числа штаммов *M. tuberculosis* с фенотипической чувствительностью к соответствующему препарату. Прогностическая ценность положительного результата (ППР) — процент фенотипически устойчивых штаммов из числа штаммов *M. tuberculosis*, имеющих одну из мутаций, входящих в число связанных с лекарственной устойчивостью по данным каталога ВОЗ.

614

Следовательно, методом секвенирования можно получить высокодостоверные результаты не для всех противотуберкулезных препаратов: устойчивых к новым препаратам штаммов *M. tuberculosis* мало для того, чтобы сделать заключение о значимости мутаций в целевых генах, а низкие показатели диагностической чувствительности и ППР метода секвенирования при определении устойчивости к этамбутолу, амикацину и этионамиду могут быть связаны, с одной стороны, с возможно неадекватными критическими концентрациями препаратов при проведении фенотипических тестов лекарственной чувствительности, а с другой — с недостатком изученным механизмом развития устойчивости к этим препаратам. Подобная нечеткость при интерпретации результатов таргетного секвенирования несколько снижает клиническую значимость этого теста.

Существенные ограничения для широкого внедрения этой технологии в работу диагностических лабораторий фтизиатрического профиля — высокая стоимость оборудования и реагентов, отсутствие легкодоступных решений для анализа и хранения данных, а также высокие требования к квалификации сотрудников на всех этапах проведения теста, при биоинформатической обработке и клинической интерпретации данных секвенирования.

Необходимо отметить, что при сравнении числа мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, из каталога ВОЗ с числом мутаций, полученных в результате популяционных исследований в различных мировых регионах, видно, что более 90% штаммов с резистентным генотипом несут существенно меньший набор мутаций, чем заявлен ВОЗ как связанный с лекарственной устойчивостью. Исходя из этого, можно заключить, что большинство случаев резистентности *M. tuberculosis* имеет в своей основе ограниченный набор мутаций.

Например, в Российской Федерации более 90% штаммов, устойчивых к рифампицину, имеет семь мутаций в кодонах 435(516), 445(526) и 450(531) гена *rpoB*; около 95% штаммов, устойчивых к изониазиду, — мутацию *katG_S315T*; 99% штаммов *M. tuberculosis*, устойчивых к фторхинолонам, — шесть мутаций в кодонах 90, 91 и 94 гена *gyrA* [53]. В других мировых популяциях штаммы с этими мутациями также доминируют среди устойчивых штаммов *M. tuberculosis* [52, 54].

Таким образом, можно заключить, что основным фактором резистентности является ограниченный набор мутаций, который определяется у большинства устойчивых штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих в определенном регионе. Причины этого феномена и его полезность для диагностики лекарственной устойчивости будут рассмотрены в следующем разделе.

Ограниченного набора мутаций достаточно для эффективной диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза

Вследствие того что лекарственная устойчивость ассоциирована с мутациями в генах, кодирующих важные для жизнедеятельности микобактериальной клетки белки и ферменты, изменение их структуры может негативно влиять на жизнеспособность *M. tuberculosis* и снижать шансы лекарственно-устойчивого клона быть переданным следующему хозяину. Следовательно, конкурентное преимущество будут иметь те штаммы *M. tuberculosis*, фитнес которых в результате приобретения лекарственной устойчивости снижается незначительно или совсем не снижается, т.е. «цена мутаций» низкая.

Влияние мутаций на фитнес *M. tuberculosis* изучено недостаточно хорошо: существует ограниченное число

публикаций, посвященных этому вопросу. При изучении влияния на жизнеспособность *M. tuberculosis* устойчивости к рифампицину была оценена скорость роста на питательной среде культур спонтанных мутантов по гену *rpoB*, полученных в лабораторных условиях. Было показано, что большинство мутаций существенно снижает жизнеспособность штаммов, кроме мутации *rpoB*_S450(531)L: скорость роста *M. tuberculosis* с этой мутацией была такой же, как у чувствительного предкового штамма [55–57].

Про значение мутаций, приводящих к устойчивости к изониазиду, известно мало, однако считается, что *M. tuberculosis* с мутациями *katG*_S315T и *inhA*_c15t сохраняют жизнеспособность и вирулентность, что доказано экспериментами в мышиной модели и в опытах *in vitro* [58, 59]. Также известно, что в случае мутации *katG*_S315T активность каталазы-пероксидазы сохраняется на уровне 30–40% от исходной, что считается достаточным для нормального функционирования клетки, но недостаточно для активации изониазида [60, 61].

«Цена мутаций», приводящих к устойчивости к аминогликозидам, была изучена на *M. smegmatis*. Скорость роста культуры мутантных штаммов не менялась по сравнению с чувствительным предковым штаммом, что позволило сделать вывод об отсутствии влияния этих мутаций на жизнеспособность *M. smegmatis*. Однако учитывая, что *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* не являются близкородственными видами, влияние мутаций, ассоциированных с устойчивостью к аминогликозидам, на жизнеспособность *M. tuberculosis* может отличаться [62].

Принято считать, что в процессе адаптации в геноме лекарственно-устойчивых *M. tuberculosis* могут возникать мутации, которые способны компенсировать изменение структуры белка-мишени или наладить ферментативные процессы за счет повышения экспрессии генов, участвующих в сходных метаболических путях [63]. Несмотря на то что нет прямых экспериментальных доказательств о компенсирующей роли мутаций, имеются данные, свидетельствующие, что у *M. tuberculosis*, мутантных по тому или иному гену, ассоциированному с лекарственной устойчивостью, присутствуют мутации в других областях генома, кодирующие другие субъединицы дефектных вследствие приобретения лекарственной устойчивости белков, или сходные метаболические пути. Например, компенсаторным механизмом, связанным с устойчивостью к изониазиду, считается мутация в регуляторной области *ahpC*, которая приводит к сверхэкспрессии алкилгидропероксидредуктазы (AhpC), ответственной за устойчивость *M. tuberculosis* к реактивному производному кислорода и азота: повышение уровня этого фермента способно компенсировать потерю активности каталазы-пероксидазы [32, 57, 64].

При устойчивости к рифампицину в качестве компенсаторных называют мутации в генах *rpoA* и *rpoC*, кодирующих другие субъединицы РНК-полимеразы [32, 57, 64]. Также сообщается о внутригенной компенсаторной мутации в гене *rpoB* (V534(615)M), которая приводит к увеличению скорости элонгации транскрипции, которая компенсирует дефектную активность РНК-полимеразы [12]. Однако относительно мутаций, считающихся компенсаторными при устойчивости к рифампицину, следует отметить, что описанные выше механизмы компенсации были найдены у штаммов *M. tuberculosis* с мутацией *rpoB*_S450(531)L, которая сама по себе не имеет негативного влияния на фитнес *M. tuberculosis*, поэтому, вероятно, в обоих случаях речь скорее идет о штаммовом полиморфизме, а не о компенсации.

Исходное влияние мутации на жизнеспособность и возникновение компенсаторных мутаций играют ключевую роль при возникновении лекарственной устойчивости *de novo*. При изучении распространения лекарственно-устойчивых клонов ведущую роль начинают играть законы популяционной генетики, например эффект бутылочного горлышка, т.е. совокупность неких случайных факторов, поспособствовавших отбору того или иного мутантного варианта, например региональные особенности туберкулезного контроля, глобальный генетический фон штамма, обусловленный принадлежностью к филогенетической линии *M. tuberculosis*, циркулирующих в данной местности, и т.д., обеспечивающие уникальную структуру местной популяции лекарственно-устойчивых микобактерий [65, 66]. Так, о важности генетического фона может свидетельствовать тот факт, что фитнес штаммов с мутацией *rpoB*_H445(526)D двух разных филогенетических линий отличается [55].

Тем не менее исходная «цена мутации», очевидно, первична в эпидемиологии туберкулеза с лекарственной устойчивостью возбудителя: во всем мире доминирующей мутацией, обуславливающей устойчивость к рифампицину, является мутация *rpoB*_S450(531)L, не оказывающая негативного влияния на фитнес, а мутант *rpoB*_R448(529)Q, для которого в эксперименте была показана наименьший фитнес, крайне редко выделяется от больных (6 из 9849 устойчивых штаммов *M. tuberculosis*, 0,06% [52]), возможно, вследствие того, что компенсаторные мутации, которые позволили бы этому мутантному варианту распространиться в популяции, не успевают сформироваться, так как этот мутант вследствие своей низкой жизнеспособности довольно быстро вытесняется из циркуляции другими, более приспособленными мутантами [52, 55]. В то же время для адаптации *M. tuberculosis* с мутациями, которые фитнес снижают, но не критично, весьма вероятным представляется вышеописанный механизм компенсации негативных последствий лекарственной устойчивости для жизнеспособности. Подтверждением этого предположения может служить тот факт, что частота встречаемости *M. tuberculosis* с определенными мутациями коррелирует с полученными в эксперименте данными о влиянии этих мутаций на жизнеспособность *M. tuberculosis*: чем ниже «цена мутации», тем выше частота ее выявления при популяционных исследованиях [62, 55, 33].

Таким образом, можно заключить, что в распространение туберкулеза с лекарственной устойчивостью возбудителя основной вклад вносят *M. tuberculosis* с мутациями, оказывающими минимальное влияние на жизнеспособность, которые сочетаются с благоприятным генетическим фоном. Следовательно, число эпидемиологически значимых мутаций довольно ограничено, и для обеспечения достаточного уровня диагностики устойчивости к противотуберкулезным препаратам в большинстве случаев достаточно ПЦР-тестов, применение которых не требует значительных материальных затрат и изменения существующей инфраструктуры.

Для определения генотипической лекарственной устойчивости ВОЗ рекомендует ограниченное число тестов: Xpert MTB/RIF, MTB/RIF Ultra, MTB/XDR (Cepheid, США), Truenat MTB, MTB Plus и MTB-RIF Dx (Molbio Diagnostics, Индия), GenoType MTBDRplus, MTBDRsl (Bruker, США (ранее Hain Lifescience, Германия)), Genosholar NTM+MDRTB (Nipro, Япония) (табл. 3). Тесты Xpert и Truenat представляют собой картриджные системы, работа с которыми требует минималь-

Таблица 3. Тесты для ПЦР-диагностики туберкулеза

Процедура	Тесты, рекомендованные ВОЗ [68]	Отечественные тесты
Выделение ДНК	Truenat MTB ¹ Xpert MTB/RIF ^{1,2} Xpert MTB/RIF Ultra ^{1,2} Автоматизированные платформы ³	АмплиСенс МТС-FL АмплиСенс МБТ-Ерп Амплитуб-Преп Амплитуб-РВ МИКО-ГЕН РеалБест ДНК МВТС ТБ-Биочип-1 ⁴ ТБ-БИОЧИП-2 ⁴ ТБ-ТЕСТ ⁴
Выявление МБТК и/или дифференциация видов внутри комплекса	FluoroType MTB ⁵ Loopamp MTBC detection kit Genosholar NTM+MDRTB ⁵ Truenat MTB и MTB Plus ¹ Xpert MTB/RIF ^{1,2} Xpert MTB/RIF Ultra ^{1,2} Автоматизированные платформы ³	АмплиСенс МТС-FL АмплиСенс МБТ-Ерп АмплиСенс МТС-diff-FL ⁶ Амплитуб-РВ МИКО-ГЕН ⁶ РеалБест ДНК МВТС ТБ-Биочип-1 ⁴ ТБ-БИОЧИП-2 ⁴ ТБ-ТЕСТ ⁴
Дифференциация МБТК и НТМБ	Genosholar NTM+MDRTB ⁵	МТВ-тест Амплитуб РВ+НТМБ ⁷
Видовая идентификация НТМБ	Genosholar NTM+MDRTB ⁵	Амплитуб-НТМБ-дифференциация ⁷
Генотипическая устойчивость к:		
• изониазиду	GenoType MTBDRplus ⁵ Genosholar NTM+MDRTB ⁵ Автоматизированные платформы ³	АмплиТест МБТ-Резист-1 Амплитуб-МЛУ-РВ MTB-RESIST-I-тест ТБ-Биочип-1 ⁴ ТБ-ТЕСТ ⁴
• рифампицину	GenoType MTBDRplus ⁵ Genosholar NTM+MDRTB ⁵ Truenat MTB-RIF Dx Xpert MTB/RIF ^{1,2} Xpert MTB/RIF Ultra ^{1,2} Автоматизированные платформы ³	АмплиТест МБТ-Резист-1 Амплитуб-МЛУ-РВ MTB-RESIST-I-тест ТБ-Биочип-1 ⁴ ТБ-ТЕСТ ⁴
• этионамиду	Xpert MTB/XDR ¹	Нет
• пиразинамиду	Genoscholar PZA-TB II ⁵	Нет
• стрептомицину	Нет	MTB-RESIST-II-тест ТБ-ТЕСТ ⁴
• этамбутолу	Нет	ТБ-ТЕСТ ⁴
• амикацину/канамицину	Xpert MTB/XDR ¹ GenoType MTBDRsl ^{2,5}	MTB-RESIST-II-тест ТБ-ТЕСТ ⁴
• капреомицину	GenoType MTBDRsl ^{2,5}	ТБ-ТЕСТ ⁴
• фторхинолоны	Xpert MTB/XDR ¹ GenoType MTBDRsl ^{2,5}	Амплитуб-FQ-РВ MTB-RESIST-II-тест ТБ-БИОЧИП-2 ⁴ ТБ-ТЕСТ ⁴
• линезолиду, бедаквилину, деламаниду	Нет	Нет
Сполиготипирование	Нет	Сполиго-Биочип ⁴ ТБ-ТЕСТ ⁴ Амплитуб-Beijing ⁸

¹ Картриджная технология.

² Зарегистрированы в России.

³ Платформы RealTime MTB и MTB RIF/INH (Abbott, США), BD MAX MDR-TB (Becton-Dickinson, США), FluoroType MTB and MTBDR (Bruker, США (ранее Hain Lifescience, Германия)), Cobas MTB and MTB-RIF/INH (Roche, Швейцария).

⁴ Гибридизационная технология, биочипы.

⁵ Гибридизационная технология, ДНК-стрипы.

⁶ Дифференциация *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG.

⁷ В процессе регистрации.

⁸ Только для научных исследований.

Примечание: МБТК — микобактерии туберкулезного комплекса; НТМБ — нетуберкулезные микобактерии; АмплиСенс МБТ-Ерп (ФСР 2009/04066 от 27.03.2019), АмплиСенс МТС-diff-FL (ФСР 2012/13301 от 22.03.2019), АмплиСенс МТС-FL (ФСР 2010/09556 от 13.03.2019), ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия; АмплиТест МБТ-Резист-1 (РЗН 2022/16720 от 16.05.2022), ФГБУ «ЦСП» ФМБА России; Амплитуб-МЛУ-РВ (ФСР 2010/07636 от 12.10.2017), Амплитуб-Преп-Реагент (РЗН 2017/6634 от 26.12.2017), Амплитуб-РВ (ФСР 2010/07635 от 12.10.2017), Амплитуб-Beijing, Амплитуб-FQ-РВ (РЗН 2017/5772 от 26.05.2017), «НПФ Синтол», Россия; Амплитуб-НТМБ-дифференциация, Амплитуб-РВ+НТМБ, разработчики — «НПФ Синтол» и ФГБНУ «ЦНИИТ»; МИКО-ГЕН (ФСР 2008/03849 от 25.11.2016), — «НПО ДНК-Технология», Россия; РеалБест ДНК МВТС (РЗН 2017/6051 от 04.08.2017), производитель — «Вектор-Бест», Россия; Сполиго-Биочип (ФСР 2012/13826 от 23.03.2021), ТБ-Биочип-1 (ФСР 2011/10088 от 13.07.2021), ТБ-Биочип-2 (ФСР 2010/08555 от 24.08.2021), ТБ-ТЕСТ (РЗН 2014/1709 от 11.02.2021), «БИОЧИП-ИМБ», Россия; МТВ-тест (РЗН 2022/18162 от 31.08.2022), MTB-RESIST-I-тест (РЗН 2022/18653 от 31.10.2022), MTB-RESIST-II-тест (РЗН 2022/19258 от 28.12.2022), «ТестГен», Россия; GenoType MTBDRplus, GenoType MTBDRsl, FluoroType MTB (Bruker, США (ранее Hain Lifescience, Германия)); Genosholar NTM+MDRTB, Genoscholar PZA-TB II (Nipro, Япония); Loopamp MTBC Detection Kit (Eiken Chemical Company, Япония); Truenat MTB, Truenat MTB Plus, Truenat MTB-RIF Dx (Molbio Diagnostics, Индия); Xpert MTB/RIF, Xpert MTB/RIF Ultra, Xpert MTB/XDR (Cepheid, США).

ной квалификации персонала, так как для проведения анализа достаточно поместить в картридж определенный объем диагностического материала и на выходе получить данные по устойчивости, которые предоставляет каждый вид теста. Тесты GenoType и Genosholar относятся к гибридным технологиям, являются трудоемкими и имеют высокий риск контаминации. Рекомендованные ВОЗ тестов, основанных на ПЦР в режиме реального времени, не существует [68].

В Российской Федерации из рекомендованных ВОЗ тестов применяется только Херт МТВ/RIF, однако существует много отечественных тест-систем, одобренных Росздравнадзором, позволяющих проводить высокоэффективную молекулярную диагностику туберкулеза (см. табл. 3).

Для определения генотипической лекарственной устойчивости необходимо провести ряд последовательных процедур: выделение ДНК, определение наличия в образце *M. tuberculosis* и далее — генотипической чувствительности [41]. Для выделения ДНК существует достаточно много отечественных наборов реагентов, широко внедряется автоматизация процессов выделения с использованием «открытых» автоматических станций, позволяющих использовать любые реактивы и расходные материалы. Такой подход увеличивает пропускную способность лабораторий, снижает риск контаминации и вероятность ошибок, обусловленных человеческим фактором.

Следующим шагом алгоритма определения генотипической лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* является подтверждение наличия в образце ДНК *M. tuberculosis*. Отечественные диагностические наборы, позволяющие проводить этот анализ, достаточно разнообразны, но предпочтение следует отдавать наборам с регистрацией результата реакции в режиме реального времени, так как это минимизирует риск контаминации и снижает материальные и трудовые затраты. На этом этапе целесообразно дифференцировать МБТК от НТМБ, так как недиагностированная инфекция, вызванная НТМБ, может проходить под маской ШЛУ-ТБ вследствие природной устойчивости НТМБ ко многим противотуберкулезным препаратам. До недавнего времени для видовой идентификации НТМБ применялись наборы GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Германия), но сейчас эти наборы в Россию не поставляются. Учитывая важность этого этапа диагностики, в ЦНИИТ совместно с «НПФ Синтол» разрабатываются две тест-системы, основанные на мультиплексной ПЦР в режиме реального времени, одна из которых позволяет дифференцировать НТМБ от МБТК, а вторая — проводить видовую идентификацию 12 клинически значимых видов НТМБ.

После подтверждения наличия в образце ДНК *M. tuberculosis* проводятся тесты на определение генотипической лекарственной чувствительности. Сейчас доступны ПЦР-тесты и биочипы для определения устойчивости к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, а также биочипы, позволяющие проводить исследование одновременно на установление генотипа возбудителя с определением генетических детерминант лекарственной устойчивости к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, амикацину и канамицину, капреомицину и этамбутолу, однако определение устойчивости к аминокликозидам / циклическим пептидам имеет невысокую чувствительность.

Следовательно, на данном этапе развития основанные на ПЦР тесты для определения генотипической

лекарственной чувствительности с высокой степенью достоверности способны определить резистентность к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам. В целом такого набора препаратов достаточно для того, чтобы выделять группы больных туберкулезом с МЛУ и пре-ШЛУ возбудителя, но для максимально полного охвата спектра лекарственных препаратов, к которым приобретена устойчивость, сохраняют актуальность культуральные методы определения лекарственной чувствительности.

Важно проводить исследования, направленные на поиск генетических детерминант устойчивости к новейшим противотуберкулезным препаратам — линезолиду, беквавиллину, дельтаметилу, которые лягут в основу ПЦР-тестов, позволяющих определять устойчивость к этим антибиотикам. В ЦНИИТ сейчас проводятся исследования по этому направлению.

Также важен поиск генетических детерминант устойчивости к ПАСК, циклосерину, теризидону, так как чувствительность к этим препаратам нельзя определить даже культуральным методом: критические концентрации для этих препаратов не разработаны для тестов лекарственной чувствительности методом пропорций на плотных и жидких питательных средах, которые сейчас рекомендованы для определения фенотипической чувствительности *M. tuberculosis* [4].

Для повышения диагностической значимости тестов по определению генотипической устойчивости к аминокликозидам / циклическим пептидам, возможно, требуются дополнительные исследования генетического фона штаммов, которые позволят объяснить причины, по которым одна и та же мутация ассоциирована с устойчивостью у одних штаммов и не приводит к развитию устойчивости у других.

Определение устойчивости к пиразинамиду методом ПЦР, выявляющим конкретные точечные мутации, невозможно, поскольку при устойчивости к этому препарату выявляется очень широкий спектр мутаций, поэтому теста, основанного на ПЦР, для определения генотипической устойчивости к пиразинамиду не существует.

Таким образом, внедрение в диагностический алгоритм современных методов, основанных на ПЦР, позволяет успешно разделять потоки пациентов по характеру лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза. Разработка и внедрение новых тестов, способных предоставить высокодостоверные данные по лекарственной устойчивости к широкому спектру противотуберкулезных препаратов, включая новейшие, позволяют существенно повысить эффективность терапии туберкулеза с лекарственной устойчивостью возбудителя и не допустить распространения устойчивых клонов.

Заключение

Расширение представлений о механизмах формирования устойчивости *M. tuberculosis* и биологических свойствах устойчивых вариантов является приоритетной задачей в условиях глобального распространения туберкулеза с лекарственной устойчивостью возбудителя. В процессе адаптации к противотуберкулезной терапии *M. tuberculosis* приобретают мутации в генах, кодирующих мишени препаратов или ферменты, активирующие пролекарства. Появление таких мутаций неоднозначно влияет на биологические свойства *M. tuberculosis*: если мутации не оказывают негативного влияния на жизне-

способность или их негативное влияние минимально, то *M. tuberculosis* с такими мутациями получают эволюционное преимущество и способны широко распространяться в популяции. Последовательное накопление мутаций дает возможность *M. tuberculosis* выработать устойчивость к большому спектру существующих противотуберкулезных препаратов, а специфические механизмы компенсации стабилизируют жизнеспособность и трансмиссивность возбудителя. Поэтому даже после появления новых противотуберкулезных препаратов всегда существует угроза, связанная с появлением новых устойчивых штаммов *M. tuberculosis*. Вовремя выявленная устойчивость *M. tuberculosis* и соответствующим образом скорректированная схема терапии позволяют предотвратить амплификацию лекарственной устойчивости и повысить эффективность лечения.

Благодаря достижениям в области геномики и биологии возбудителя были расширены представления о разнообразии механизмов устойчивости *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам, которые должны использоваться для разработки новых инструментов диагностики, позволяющих быстро и точно выявлять возбудителя туберкулеза и определять как можно более широкий спектр резистентности.

Широкое внедрение секвенирования для определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* в современных условиях не представляется целесообразным, так как требует слишком больших изменений инфраструктуры, но при этом не предоставляет высокодостоверных данных по устойчивости к большинству противотуберкулезных препаратов. Однако этот инструмент может и должен применяться в крупных исследовательских центрах для фундаментальных исследований, направленных на развитие представлений о механизмах возникновения лекарственной устойчивости, биологических свойствах лекарственно-устойчивых *M. tuberculosis* и особенностях их распространения.

По мере расширения представлений о биологии лекарственно-устойчивых *M. tuberculosis* и развития технологий секвенирования в сторону большей доступности и облегчения интерпретации полученных массивов данных значение секвенирования как инструмента диагностики будет возрастать.

Перспективными в области изучения биологии лекарственно-устойчивых *M. tuberculosis* представляются следующие направления исследований: мониторинг частоты мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, в различных регионах для разработки максимально адаптированных молекулярных тестов; улучшение понимания взаимосвязи между генотипом и фенотипом *M. tuberculosis* с учетом генетического фона, сопровождающего мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью; изучение влияния эпистаза нескольких мутантных генов, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, на биологические свойства *M. tuberculosis* с МЛУ, пре-ШЛУ и ШЛУ. Научные достижения в этих областях позволят выработать новые подходы для диагностики и лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза и обеспечить эффективную персонализированную терапию.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Финансирование работы осуществлено в рамках бюджетного финансирования по месту работы авторского коллектива.

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Участие авторов. А.Э. Эргешов — разработка идеи статьи, поисково-аналитическая работа с литературными источниками, формулирование заключения, редактирование статьи; С.Н. Андреевская — поисково-аналитическая работа с литературными источниками, написание текста статьи; Т.Г. Смирнова — поисково-аналитическая работа с литературными источниками, написание текста статьи; Л.Н. Черноусова — поисково-аналитическая работа с литературными источниками, редактирование статьи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию рукописи статьи и ее направление на публикацию. Все авторы согласны нести ответственность за все аспекты работы, чтобы обеспечить надлежащее рассмотрение и решение всех возможных вопросов, связанных с корректностью и надежностью любой части работы.

ЛИТЕРАТУРА

- Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022.
- Ten threats to global health in 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Available from: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-globalhealth-in-2019>
- Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022.
- Туберкулез у взрослых: клинические рекомендации. — М., 2022. — 151 с. [Tuberculosis in adults: clinical recommendations. Moscow; 2022. 151 p. (In Russ.)]
- Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, 27–29 October 2020. Geneva: World Health Organization; 2021.
- Васильева И.А., Тестов В.В., Стерликов С.А. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в годы пандемии COVID-19 — 2020–2021 гг. // *Туберкулез и болезни легких*. — 2022. — Т. 100. — № 3. — С. 6–12. [Vasilyeva IA, Testov VV, Sterlikov SA. Tuberculosis situation in the years of the COVID-19 pandemic — 2020–2021. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2022;100(3):6–12. (In Russ.)] doi: <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2022-100-3-6-12>
- Guidance for the surveillance of drug resistance in tuberculosis. 6th ed. Geneva: World Health Organization; 2020.
- Nguyen L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Arch Toxicol*. 2016;90(7):1585–5604. doi: <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1727-6>
- Luthra S, Rominski A, Sander P. The Role of Antibiotic-Target-Modifying and Antibiotic-Modifying Enzymes in *Mycobacterium abscessus* Drug Resistance. *Front Microbiol*. 2018;9:2179. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02179>
- Cook GM, Berney M, Gebhard S, et al. Physiology of mycobacteria. *Adv Microb Physiol*. 2009;55:81–182, 318–9. doi: [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(09\)05502-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05502-7)
- WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment — drug-resistant tuberculosis treatment, 2022 update. Geneva: World Health Organization; 2022.
- Singh R, Dwivedi SP, Gaharwar US, et al. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium*

- tuberculosis*. *J Appl Microbiol*. 2020;128(6):1547–1567. doi: <https://doi.org/10.1111/jam.14478>
13. Mabhula A, Singh V. Drug-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: where we stand. *Medchemcomm*. 2019;10(8):1342–1360. doi: <https://doi.org/10.1039/c9md00057g>
 14. Hameed HMA, Islam MM, Chhotaray C, et al. Molecular Targets Related Drug Resistance Mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-*Mycobacterium tuberculosis* Strains. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:114. doi: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00114>
 15. Wang JY, Sun HY, Wang JT, et al. Nine- to Twelve-Month Anti-Tuberculosis Treatment Is Associated with a Lower Recurrence Rate than 6-9-Month Treatment in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients: A Retrospective Population-Based Cohort Study in Taiwan. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144136. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144136>
 16. Liu J, Bruhn DF, Lee RB, et al. Structure-Activity Relationships of Spectinomide Antituberculosis Agents: A Dissection of Ribosomal Inhibition and Native Efflux Avoidance Contributions. *ACS Infect Dis*. 2017;3(1):72–88. doi: <https://doi.org/10.1021/acinfedcis.6b00158>
 17. Nasiruddin M, Neyaz MK, Das S. Nanotechnology-Based Approach in Tuberculosis Treatment. *Tuberc Res Treat*. 2017;2017:4920209. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/4920209>
 18. Nasiri MJ, Haeili M, Ghazi M, et al. New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in Mycobacteria. *Front Microbiol*. 2017;8:681. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00681>
 19. Liu J, Shi W, Zhang S, et al. Mutations in Efflux Pump Rv1258c (Tap) Cause Resistance to Pyrazinamide, Isoniazid, and Streptomycin in *M. tuberculosis*. *Front Microbiol*. 2019;10:216. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00216>
 20. Reeves AZ, Campbell PJ, Sultana R, et al. Aminoglycoside cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* due to mutations in the 5' untranslated region of whiB7. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(4):1857–1865. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.02191-12>
 21. Laws M, Jin P, Rahman KM. Efflux pumps in *Mycobacterium tuberculosis* and their inhibition to tackle antimicrobial resistance. *Trends Microbiol*. 2022;30(1):57–68. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.05.001>
 22. Kapp E, Malan SF, Joubert J, et al. Small Molecule Efflux Pump Inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis*: A Rational Drug Design Perspective. *Mini Rev Med Chem*. 2018;18(1):72–86. doi: <https://doi.org/10.2174/1389557517666170510105506>
 23. Smith T, Wolff KA, Nguyen L. Molecular biology of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;374:53–80. doi: https://doi.org/10.1007/82_2012_279
 24. Zaunbrecher MA, Sikes RD Jr, Metchock B, et al. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(47):20004–9. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0907925106>
 25. Drlica K, Hiasa H, Kerns R, et al. Quinolones: action and resistance updated. *Curr Top Med Chem*. 2009;9(11):981–998. doi: <https://doi.org/10.2174/156802609789630947>
 26. Tao J, Han J, Wu H, et al. *Mycobacterium* fluoroquinolone resistance protein B, a novel small GTPase, is involved in the regulation of DNA gyrase and drug resistance. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(4):2370–2381. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gks1351>
 27. Culyba MJ, Mo CY, Kohli RM. Targets for Combating the Evolution of Acquired Antibiotic Resistance. *Biochemistry*. 2015;54(23):3573–3582. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00109>
 28. Portelli S, Phelan JE, Ascher DB, et al. Understanding molecular consequences of putative drug resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. 2018;8(1):15356. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33370-6>
 29. Schön T, Miotto P, Köser CU, et al. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(3):154–160. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.10.022>
 30. Koch A, Cox H, Mizrahi V. Drug-resistant tuberculosis: challenges and opportunities for diagnosis and treatment. *Curr Opin Pharmacol*. 2018;42:7–15. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.05.013>
 31. von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, et al. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol*. 2016;7:173. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
 32. Dookie N, Rambaran S, Padayatchi N, et al. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(5):1138–1151. doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkx506>
 33. Borrell S, Gagneux S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13(12):1456–1466.
 34. Singla R. Drug-Resistant tuberculosis: Key strategies for a recalcitrant disease. *Astrocyte* 2017;4:53–62. doi: https://doi.org/10.4103/astrocyte.astrocyte_55_17
 35. Islam MM, Hameed HMA, Mugweru J, et al. Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy. *J Genet Genomics*. 2017;44(1):21–37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.10.002>
 36. Cohen KA, Abeel T, Manson McGuire A, et al. Evolution of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis over Four Decades: Whole Genome Sequencing and Dating Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from KwaZulu-Natal. *PLoS Med*. 2015;12(9):e1001880. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001880>
 37. Manson AL, Cohen KA, Abeel T, et al. Evolution of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis over Four Decades: Whole Genome Sequencing and Dating Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from KwaZulu-Natal. *PLoS Med*. 2015;12(9):e1001880. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001880>
 38. Sun G, Luo T, Yang C, et al. Dynamic population changes in *Mycobacterium tuberculosis* during acquisition and fixation of drug resistance in patients. *J Infect Dis*. 2012;206(11):1724–1733. doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jis601>
 39. Mariam SH, Werngren J, Aronsson J, et al. Dynamics of antibiotic resistant *Mycobacterium tuberculosis* during long-term infection and antibiotic treatment. *PLoS One*. 2011;6(6):e21147. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021147>
 40. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2015;19(11):1276–1289. doi: <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0389>
 41. Эргешов А.Э., Черноусова Л.Н., Андреевская С.Н. Новые технологии диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза // *Вестник Российской академии медицинских наук*. — 2019. — Т. 74. — № 6. — С. 413–422. [Ergeshov AE, Chernousova LN, Andreevskaya SN. New technologies for the diagnosis of drug-resistant tuberculosis. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2019;74(6):413–422. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1163>
 42. Bertelli C, Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(9):803–813. doi: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12217>
 43. Farhat MR, Shapiro BJ, Kieser KJ, et al. Genomic analysis identifies targets of convergent positive selection in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Genet*. 2013;45(10):1183–1189. doi: <https://doi.org/10.1038/ng.2747>
 44. Merker M, Kohl TA, Roetzer A, et al. Whole genome sequencing reveals complex evolution patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in patients. *PLoS One*. 2013;8(12):e82551. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082551>
 45. Zhang Q, Wan B, Zhou A, et al. Whole genome analysis of an MDR Beijing/W strain of *Mycobacterium tuberculosis* with large genomic deletions associated with

- resistance to isoniazid. *Gene*. 2016;582(2):128–136. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.02.003>
46. Casali N, Nikolayevskiy V, Balabanova Y, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet*. 2014;46(3):279–286. doi: <https://doi.org/10.1038/ng.2878>
 47. Mohamed S, Köser CU, Salfinger M, et al. Targeted next-generation sequencing: a Swiss army knife for mycobacterial diagnostics? *Eur Respir J*. 2021;57(3):2004077. doi: <https://doi.org/10.1183/13993003.04077-2020>
 48. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in Mycobacterium tuberculosis complex: technical guide. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO/CDS/TB/2018.19).
 49. Colman RE, Anderson J, Lemmer D, et al. Rapid Drug Susceptibility Testing of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates Directly from Clinical Samples by Use of Amplicon Sequencing: a Proof-of-Concept Study. *J Clin Microbiol*. 2016;54(8):2058–2067. doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.00535-16>
 50. Makhado NA, Matabane E, Faccin M, et al. Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis in South Africa undetected by WHO-endorsed commercial tests: an observational study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(12):1350–1359. doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30496-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30496-1)
 51. Feuerriegel S, Kohl TA, Utpatel C, et al. Rapid genomic first- and second-line drug resistance prediction from clinical Mycobacterium tuberculosis specimens using Deeplex-MycTB. *Eur Respir J*. 2021;57(1):2001796. doi: <https://doi.org/10.1183/13993003.01796-2020>
 52. Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance. Geneva: World Health Organization; 2021.
 53. Андреевская С.Н. Динамика распространенности мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, в современной популяции *M. tuberculosis* в Российской Федерации // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. — 2020. — S2. — С. 11–12. [Andreevskaya SN. Dynamics of the prevalence of mutations associated with drug resistance in the modern population of *M. tuberculosis* in the Russian Federation. *Bulletin of the Central Scientific Research Institute of Tuberculosis*. 2020;S2:11–12. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.7868/S2587667820060047>
 54. Flandrois JP, Lina G, Dumitrescu O. MUBII-TB-DB: a database of mutations associated with antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:107. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-107>
 55. Gagneux S, Long CD, Small PM, et al. The competitive cost of antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Science*. 2006;312(5782):1944–1946. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1124410>
 56. Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE, et al. Effect of rpoB mutations conferring rifampin resistance on fitness of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(4):1289–1294. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1289-1294.2004>
 57. Koch A, Mizrahi V, Warner DF. The impact of drug resistance on Mycobacterium tuberculosis physiology: what can we learn from rifampicin? *Emerg Microbes Infect*. 2014;3(3):e17. doi: <https://doi.org/10.1038/emi.2014.17>
 58. Pym AS, Saint-Joanis B, Cole ST. Effect of katG mutations on the virulence of Mycobacterium tuberculosis and the implication for transmission in humans. *Infect Immun*. 2002;70(9):4955–4960. doi: <https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.4955-4960.2002>
 59. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis. *Science*. 1994;263(5144):227–230. doi: <https://doi.org/10.1126/science.8284673>
 60. Rouse DA, DeVito JA, Li Z, et al. Site-directed mutagenesis of the katG gene of Mycobacterium tuberculosis: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol Microbiol*. 1996;22(3):583–592. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.00133.x>
 61. van Soolingen D, de Haas PE, van Doorn HR, et al. Mutations at amino acid position 315 of the katG gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of Mycobacterium tuberculosis in the Netherlands. *J Infect Dis*. 2000;182(6):1788–1790. doi: <https://doi.org/10.1086/317598>
 62. Sander P, Springer B, Prammananan T, et al. Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(5):1204–1211. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.46.5.1204-1211.2002>
 63. Comas I, Borrell S, Roetzer A, et al. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat Genet*. 2011;44(1):106–110. doi: <https://doi.org/10.1038/ng.1038>
 64. Al-Saeedi M, Al-Hajjaj S. Diversity and evolution of drug resistance mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. *Infect Drug Resist*. 2017;10:333–342. doi: <https://doi.org/10.2147/IDR.S144446>
 65. Gagneux S, Burgos MV, DeRiemer K, et al. Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog*. 2006;2(6):e61. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020061>
 66. Fenner L, Egger M, Bodmer T, et al. Swiss HIV Cohort Study and the Swiss Molecular Epidemiology of Tuberculosis Study Group. Effect of mutation and genetic background on drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(6):3047–3053. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.06460-11>
 67. Böttger EC, Springer B. Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. *Eur J Pediatr*. 2008;167(2):141–148. doi: <https://doi.org/10.1007/s00431-007-0606-9>
 68. Practical manual on tuberculosis laboratory strengthening, 2022 update. Geneva: World Health Organization; 2022.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Эргешов Атаджан Эргешович, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН [Atadzhan E. Ergeshov, MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the RAS]; **адрес:** 107564, Москва, Яузская аллея, д. 2 [address: 2 Yauzskaya alley, 107564, Moscow, Russia]; **e-mail:** ctri@ctri.ru, **SPIN-код:** 8372-1666, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2494-9275>

Андреевская Софья Николаевна, к.м.н., старший научный сотрудник [Sofya N. Andreevskaya, MD, PhD, Senior Researcher]; **e-mail:** andsofia@mail.ru, **SPIN-код:** 4775-1459, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-4589-6133>

Смирнова Татьяна Геннадьевна, к.м.н. [Tatyana G. Smirnova, MD, PhD]; **e-mail:** s_tatka@mail.ru, **SPIN-код:** 4609-2105, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-2886-1745>

Черноусова Лариса Николаевна, д.б.н., профессор [Larisa N. Chernousova, PhD in Biology, Professor]; **e-mail:** lchernousova@mail.ru, **SPIN-код:** 2267-8867, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-6288-7549>