



Сравнение различных методов определения лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину

Т. В. УМПЕЛЕВА, Е. А. МАЗУРИНА, Д. В. ВАХРУШЕВА, Н. И. ЕРЕМЕЕВА

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ, г. Екатеринбург, РФ

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: сопоставление результатов тестирования чувствительности/устойчивости к рифампицину молекулярно-генетическими методами и фенотипическими тестами изолятов микобактерий туберкулеза, выделенных из клинического материала больных туберкулезом.

Материалы и методы. В исследование включены 915 образцов ДНК *M. tuberculosis* и 426 культур. Используются генотипические тесты (ТВ-TEST (БИОЧИП-ИМБ, Россия), GenoType MTBDRplusV2) и фенотипические технологии (метод абсолютных концентраций, система Bactec MGIT 960, набор Sensititre Myco TB).

Результаты. Получен высокий процент (98,7%; ДИ 97,7-99,7%) подтверждения результатов молекулярно-генетического теста (ТВ-TEST) фенотипическим тестом (метод абсолютных концентраций). Показано, что в некоторых случаях система Bactec MGIT 960, а также метод абсолютных концентраций демонстрировали ложноотрицательные результаты устойчивости к рифампицину.

Ключевые слова: лекарственная устойчивость, мутации, ТВ-TEST, метод абсолютных концентраций

Для цитирования: Умпелева Т. В., Мазурина Е. А., Вахрушева Д. В., Еремеева Н. И. Сравнение различных методов определения лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину // Туберкулез и болезни лёгких. – 2022. – Т. 100, № 1. – С. 41-48. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2022-100-1-41-48>

Comparison of Different Methods for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* to Rifampicin

T. V. UMPELEVA, E. A. MAZURINA, D. V. VAKHRUSHEVA, N. I. EREMEEVA

National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Yekaterinburg, RF

ABSTRACT

The objective: to compare results of drug susceptibility testing to rifampicin by molecular genetic methods and phenotypic tests of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained from clinical specimens of tuberculosis patients.

Subjects and Methods. 915 samples of *M. tuberculosis* DNA and 426 cultures were used in this study. Genotypic tests (TB-TEST (BIOCIP-IMB, Russia), GenoType MTBDRplusV2) and phenotypic technologies (absolute concentration method, Bactec MGIT 960 system, Sensititre Myco TB kit) were used.

Results. A high percentage (98.7%; CI 97.7-99.7%) of confirmation of the results of the molecular genetic test (TB-TEST) by the phenotypic test (absolute concentration method) was demonstrated. In some cases, the Bactec MGIT 960 system as well as the absolute concentration method were shown to produce false negative results of rifampicin resistance in some cases.

Key words: drug resistance, mutations, TB-TEST, absolute concentration method

For citations: Umpeleva T.V., Mazurina E.A., Vakhrusheva D.V., Eremeeva N.I. Comparison of different methods for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicin. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2022, Vol. 100, no. 1, P. 41-48. (In Russ.) <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2022-100-1-41-48>

Для корреспонденции:

Умпелева Татьяна Валерьевна
E-mail: tumpeleva@ya.ru

Correspondence:

Tatiana V. Umpeleva
Email: tumpeleva@ya.ru

Механизм действия препарата рифампицина при туберкулезе заключается в его связывании с β -субъединицей бактериальной ДНК-зависимой РНК-полимеразы (*rpoB*). Благодаря этому происходит прерывание транскрипции, что ведет к остановке синтеза белка и, как следствие, роста *M. tuberculosis* [15]. Устойчивость к рифампицину в подавляющем большинстве случаев обусловлена наличием мутаций в участке 426-452 кодонов (по номенклатуре *M. tuberculosis*) гена *rpoB* в области, определяющей устойчивость к рифампицину (RIF resistance-determining region – RRDR). Счи-

тается, что наиболее часто мутации, приводящие к устойчивости к рифампицину, возникают в кодонах 531, 526 и 516 – от 70 до 90% случаев [10]. В редких случаях резистентность может быть вызвана мутациями в других регионах этого гена [7, 13]. Доказано, что различные мутации в гене *rpoB* приводят к разным уровням устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ) к рифампицину [16, 19, 20].

Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), устойчивость МБТ к рифампицину традиционно определяли как тест-системами, основанными на полимеразной цепной реак-

ции (ПЦР) (Cepheid Xpert MTB/RIF, Hain GenoType MTBDRplus), так и фенотипическим методом, с использованием технологии Bactec MGIT. Однако в 2018 г. в качестве референсного метода тестирования лекарственной устойчивости МБТ к рифампицину было предложено секвенирование всего гена *rpoB* (а не только RRDR-региона), а также отмечено, что технология Bactec MGIT может давать ненадежные данные для некоторых изолятов [18].

В России, согласно федеральным клиническим рекомендациям [5], помимо тестов, рекомендованных ВОЗ, для определения устойчивости к рифампицину широко используют метод абсолютных концентраций, а также молекулярно-генетические тесты – ТБ-ТЕСТ «БИОЧИП-ИМБ» (гибридизационная технология) и Амплитуб-МЛУ-РВ «НПК Синтол» (ПЦР в режиме реального времени).

Таким образом, наличие различных технологий определения чувствительности/устойчивости МБТ к рифампицину и существующие расхождения результатов, полученных с использованием этих технологий, оставляют актуальным вопрос комплексной оценки их использования и клинической интерпретации.

Цель исследования: сопоставление результатов тестирования чувствительности/устойчивости к рифампицину молекулярно-генетическими методами и фенотипическими тестами изолятов МБТ, выделенных из клинического материала больных туберкулезом.

Материалы и методы

Для исследования использовали диагностический материал (мокрота, промывные воды бронхов, операционный материал (ткань легкого, костная ткань) и другие виды биоматериала), полученный от больных туберкулезом, проходивших лечение в течение 2016-2020 гг. в стационаре Уральского НИИ фтизиопульмонологии – филиала ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России. По назначению лечащих врачей выполнялось комплексное исследование проб молекулярно-генетическими и культуральными или только культуральными методами. В исследование включено 915 образцов с 18 территорий РФ: Свердловская область – 553, Ханты-Мансийский автономный округ – 75, Курганская область – 56, Ямало-Ненецкий автономный округ – 55, Пермский край – 43, Челябинская область – 39, Тюменская область – 23, Республика Башкортостан – 18, Оренбургская область – 18, Кемеровская область – 11, Республика Татарстан – 6, Удмуртская Республика – 5, Красноярский край – 4, Саратовская область – 3, Забайкальский край – 2, Кировская область – 1, Новосибирская область – 2, Алтайский край – 1.

Выделение ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* проводили с использованием набора Амплитуб-РВ «НПК Синтол».

Спектр мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, определяли с помощью тест-системы ТБ-ТЕСТ (БИОЧИП-ИМБ, Россия) [2]. Данный метод анализа позволяет одновременно устанавливать генотип эндемичных для РФ штаммов МБТ (Beijing, Beijing B0/W148, Haarlem, LAM и Ural) и выявлять 116 мутаций, ассоциированных с устойчивостью к различным противотуберкулезным препаратам, в том числе рифампицину, в генах *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis* и *embB*. Анализ основан на амплификации 17 фрагментов генома с последующей гибридизацией на микрочипе [22]. Анализ результатов проводили с использованием программного продукта ImaGeWare, который автоматически анализирует результаты гибридизации на биочипе и выдает ответ в виде наличия или отсутствия мутации (аминокислотной замены) в определенных участках генома МБТ.

Посев деконтаминированного осадка диагностического материала выполняли на плотную питательную среду Левенштейна – Йенсена и жидкую – Миддлбрука 7Н9 для культивирования в автоматизированной системе Bactec MGIT 960. Фенотипическую чувствительность изолятов МБТ к рифампицину определяли методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна – Йенсена (критическая концентрация – 40 мг/л).

При расхождении результатов молекулярно-генетического и фенотипического тестов (рис.) дополнительно проводили исследования с использованием молекулярно-генетических технологий GenoType MTBDRplusV2 (Hain Lifescience, Германия) и Амплитуб-МЛУ-РВ (НПК Синтол, Россия) и фенотипическими технологиями, а именно: методом пропорций в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson) (концентрация рифампицина 1 мг/л) и методом, основанным на определении минимальных ингибирующих концентраций (МИК) в ходе серийных микроразведений на планшетах MYCOTBI в бактериологической тест-системе Sensititre Myco TB (Thermo Scientific) согласно инструкциям производителей.

В случае получения от одного пациента нескольких образцов ДНК МБТ в анализ включали результаты исследования только первого образца.

Статистическую обработку результатов (расчет 95%-ного доверительного интервала для доли) проводили с использованием программы BioStat LE 7.3.0.

Результаты исследования

Из 915 образцов ДНК *Mycobacterium tuberculosis* в 793 (86,6%; ДИ 84,4-88,8%) были выявлены мутации в гене *rpoB*, ассоциированные с устойчивостью к рифампицину (табл. 1). Выявлен 21 вариант мутаций, 8 из которых были сочетанными.

В подавляющем большинстве образцов была выявлена замена *rpoB*Ser531→Leu: в 683 (74,6%; ДИ 71,6-77,6% от всех образцов с мутациями) случа-

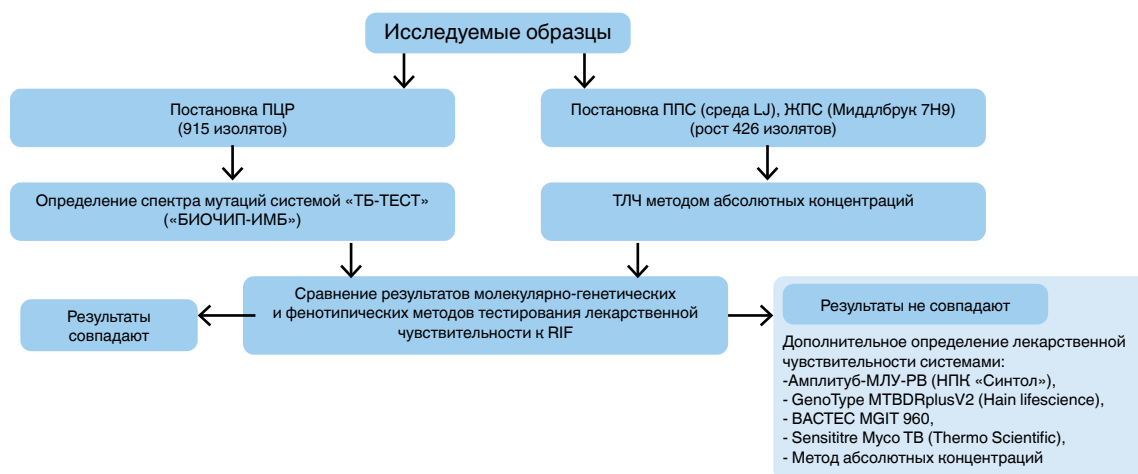


Рис. Дизайн исследования

Fig. Design of the study

ях это была единичная замена, в 4 (0,4%) образцах она встретилась в сочетании с другими заменами. В кодоне 526 мутации выявлены в 50 (6,3%; ДИ 4,6-8,0%) образцах, при этом в данном кодоне обна-

ружено наибольшее разнообразие замен – 6. Среди комбинаций мутаций наиболее часто встречалось сочетание *rpoB*Asp516→Gly, *rpoB*Leu511→Pro – в 12 (1,5% ДИ 0,7-2,3%) образцах.

Таблица 1. Спектр мутаций в ДНК *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, и результаты фенотипического исследования чувствительности изолятов МБТ

Table 1. Mutation spectrum in DNA of *Mycobacterium tuberculosis* associated with resistance to rifampicin and results of phenotypic drug susceptibility tests of MTB isolates

Показатели	Генетический тест (ТБ-ТЕСТ)								Фенотипический тест (метод абсолютных концентраций)		
	число образцов	%	Beijing	BeijingB0	Haarlem	LAM	Ural	не определен	нет роста	RIF R	RIF S
Leu511→Pro	6	0,8	2	2	0	0	1	1	6	0	0
Asn513→Leu	2	0,3	2	0	0	0	0	0	2	0	0
Asp516→Tyr	12	1,5	12	0	0	0	0	0	8	2	2
Asp516→Val	10	1,3	1	1	1	4	2	1	4	6	0
His526→Leu	22	2,8	17	2	1	2	0	0	14	6	2
His526→Asn	17	2,1	11	5	0	0	0	1	13	4	0
His526→Tyr	5	0,6	3	1	0	0	0	1	5	0	0
His526→Asp	3	0,4	2	1	0	0	0	0	2	1	0
His526→Arg	2	0,3	2	0	0	0	0	0	2	0	0
His526→Val	1	0,1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Ser531→Leu	683	86,1	187	451	3	10	12	20	328	355	0
Ser531→Trp	1	0,1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Leu533→Pro	9	1,1	3	5	0	1	0	0	8	1	0
Asp516→Gly, Leu511→Pro	12	1,5	11	1	0	0	0	0	4	8	0
Ser531→Leu, Leu533→Pro	2	0,3	0	2	0	0	0	0	2	0	0
Leu511→Pro, Asn513→Gly	1	0,1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Leu511→Pro, His526→Gln	1	0,1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Leu533→Pro, His526→Asn	1	0,1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Ser512→Thr, Leu511→Pro	1	0,1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Ser531→Leu, Asn513→Gly	1	0,1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Ser531→Leu, Asp516→Gly	1	0,1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Общее количество RIF ^R образцов	793	100,0	255	476	5	17	15	25	402	387	4
<i>rpoB</i> Wild Type	122	13,33	57	22	4	10	7	22	87	7	28
Общее количество образцов	915	100	312	498	9	27	22	47	489	394	32

Примечание: RIF R – устойчивые к рифампицину образцы; RIF S – чувствительные к рифампицину образцы

Согласно результатам генотипирования, 745 (81,4%; ДИ 78,9-83,9%) образцов отнесены к генетической линии Beijing, при этом более половины из всех образцов – 463 (54,4%; ДИ 51,2-57,6%) – принадлежали кластеру BeijingB0. Доля генотипов Haarlem, LAM, Ural составила 7 (0,8%), 21 (2,3%) и 19 (2,1%) соответственно. Для 43 (4,7%) образцов генотип не определен.

Спектр преобладающих в нашей выборке мутаций согласуется с данными о наиболее распространенных на территории РФ мутациях, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину [14]. Аминокислотная замена Ser→Leu в 531-м кодоне демонстрирует абсолютное доминирование среди изолятов выборки, что согласуется с данными о высокой вероятности возникновения этой мутации в геноме МБТ [3, 10, 11]. Данная замена выявлена у МБТ всех генотипов, однако в большинстве случаев – 451 (66,0%) – это был кластер Beijing B0.

В ходе исследования обнаружено 20 изолятов, несущих сочетанные мутации в RRDR. Наиболее распространенный вариант сочетания: Asp→Gly в 516-м кодоне и Leu→Pro в 511-м кодоне. Интересно, что в 6 из 8 представленных вариантов сочетаний встречались мутации, которые не зафиксированы вне сочетаний (Ser512→Thr, Asn513→Gly, Asp516→Gly, His526→Gln), что косвенно может указывать на их компенсаторное значение [1, 8].

При посеве на питательные среды получить культуру возбудителя туберкулеза и определить ее лекарственную чувствительность удалось для 426 (46,5%) образцов. Сопоставление результатов определения чувствительности МБТ к рифампицину молекулярно-генетически (ТБ-ТЕСТ) и фенотипически (метод абсолютных концентраций) показало высокий уровень согласованности. Для 387 (98,7%; ДИ 97,7-99,7%) изолятов наличие мутаций сопровождалось фенотипической устойчивостью.

Для 4 изолятов показана фенотипическая чувствительность, несмотря на наличие мутаций, ведущих к аминокислотной замене в RRDR: His526→Leu (2 образца) и Asp516→Tyr (2 образца). Для этих изолятов повторно проведены: молекулярно-генетическое исследование тест-системой

ТБ-ТЕСТ и фенотипические тесты для определения чувствительности МБТ к рифампицину методом абсолютных концентраций; в бактериологической тест-системе Sensititre Myco TB (Thermo Scientific) и в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson). Результаты представлены в табл. 2.

Повторное исследование с помощью ТБ-ТЕСТ подтвердило наличие мутаций, однако результаты разных фенотипических тестов оказались различными. Исследование методом абсолютных концентраций подтвердило чувствительность одного изолята, содержащего мутацию Asp516→Tyr, а у 3 изолятов наблюдался рост колониеобразующих единиц в пробирке с препаратом, однако интенсивность роста была на 70% меньше, чем интенсивность роста в контрольной пробирке без препарата. Результаты определения чувствительности изолятов МБТ к рифампицину методом пропорций в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 позволили установить чувствительность для всех 4 исследованных изолятов, в то время как результаты, полученные с помощью тест-системы Sensititre Myco TB, позволили выявить устойчивость для этих изолятов, при этом значения МИК у них варьировали от 2 до 8 мг/л (КК для этого препарата в технологии Sensititre Myco TB – 1 мг/л).

По классификации ВОЗ, мутация Asp516→Tyr ассоциирована с умеренным уровнем резистентности к рифампицину, а замена His526→Leu должна вызывать высокий уровень устойчивости к препарату [17]. Только исследование фенотипической чувствительности с помощью тест-системы Sensititre Myco TB позволило определить наличие устойчивости у всех этих изолятов. Необходимо отметить, что имеется значительное количество публикаций, подтверждающих высокий уровень согласованности результатов, полученных с помощью тест-системы Sensititre Myco TB, с золотым стандартом тестирования лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* – методом пропорций на среде Миддлбрука 7H10 [6, 9, 21].

В работе 2013 г. L. Rigouts et al. указывает на то, что в определенных случаях система Bactec MGIT 960 способна упускать устойчивость к рифампи-

Таблица 2. Результаты определения фенотипической чувствительности изолятов МБТ, имеющих мутации в гене *rpoB*, к рифампицину

Table 2. Results of phenotypic susceptibility testing to rifampicin of MTB isolates with mutations in the *rpoB* gene

Код изолята	Генотип ТБ-Тест	Метод абсолютных концентраций (40 мг/л)	Sensititre MycoTB МИК мг/л (интерпретация)	Bactec MGIT 960 (1 мг/л)
2898	rpoB_Asp516→Tyr	R*	8 (R)	S
2982	rpoB_Asp516→Tyr	S	2 (R)	S
4934	rpoB_His526→Leu	R*	4 (R)	S
7687	rpoB_His526→Leu	R*	2(R)	S
3445	WT	R*	0,5(S)	S

Примечание: * – слабый рост, но более 20 колониеобразующих единиц (интенсивность роста на ПС с RIF на 70% меньше, чем на ПС без RIF); R – устойчивость, S – чувствительность

цину, обусловленную некоторыми мутациями. Успешность выявления устойчивости зависит от аминокислотной замены [12]. Это справедливо для аминокислотных замен в 516-м и 526-м кодонах, вызывавших несогласованность результатов в нашем исследовании. Аналогичные данные о сохранении фенотипической чувствительности, тестируемой на автоматизированной системе Bactec MGIT 960, при наличии мутации Asp516→Tyr опубликованы в работе Е. Ю. Носовой и др. [4].

Кроме того, стоит обратить внимание на генетические особенности указанных 4 изолятов (табл. 3). Во всех случаях они принадлежали к генетической линии Beijing и содержали мутации, ассоциированные с устойчивостью к изониазиду (ген *katG*). У 3 изолятов выявлены замены, ассоциированные с устойчивостью к этамбутолу (ген *embB*) и аминокликозидам (ген *eis*), в 2 случаях – к фторхинолонам (ген *gyrA*). При получении противоречивых результатов в отношении устойчивости к рифампицину такой набор генетических особенностей может свидетельствовать в пользу устойчивости изолята к рифампицину.

Следует отметить, что в случае с самой распространенной заменой *rpoB*Ser531→Leu все 355 изолятов показали фенотипическую устойчивость по результатам метода абсолютных концентраций.

Для 122 (13,4%; ДИ 11,2-15,6%) из 915 изолятов при проведении молекулярно-генетического анализа с помощью системы ТБ-ТЕСТ ген *rpoB* был определен как ген «дикого» типа, т. е. не содержащий мутаций (WT). Рост культур микобактерий на питательных средах был получен для 35 (28,9%) образцов. Последующее проведение теста лекарственной чувствительности методом абсолютных концентраций подтвердило чувствительность к рифампицину 28 изолятов МБТ, а 7 оказались устойчивыми к препарату. Для уточнения результатов проведен повторный молекулярно-генетический анализ этих 7 изолятов тест-системами Амплитуб-МЛУ-РВ и GenoType MTBDRplusV2.

Тестирование системой Амплитуб-МЛУ-РВ показало результаты, согласующиеся с результатами ТБ-ТЕСТ: для всех образцов мутации устойчивости к рифампицину не обнаружены. По результатам гибридации на стрипе GenoType MTBDRplusV2

у 5 изолятов обнаружены мутации в области кодонов 514-515, у одного образца найдена замена в 522-м кодоне и у одного изолята мутаций не выявлено. Замены в 514-м и 515-м кодонах не включены в набор ТБ-ТЕСТ, а в 522-м кодоне данным набором выявляется только замена Ser→Leu, по этой причине мы увидели расхождения. Согласно единому каталогу мутаций, опубликованному ВОЗ в 2021 г., данные мутации встречаются в популяциях достаточно редко, но они, как доказано, ассоциированы с устойчивостью МБТ к рифампицину [17].

Для 6 изолятов, у которых обнаружены мутации, проанализировали наличие мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам, аминокликозидам, и определили генотип. Пять изолятов с заменами в области кодонов 514-515 принадлежали к генотипу Beijing B0 и содержали мутации, ассоциированные с устойчивостью к изониазиду [*katG*Ser315→Thr(1)] и аминокликозидам (*eis_a10g*), в 3 случаях из 5 также выявлены замены, обуславливающие устойчивость к фторхинолонам (табл. 4). Таким образом, при проведении исследований методом ТБ-ТЕСТ стоит с осторожностью интерпретировать результат об отсутствии мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, при выявлении у образца генотипа Beijing B0 и наличия мутаций, ассоциированных с устойчивостью к другим препаратам.

Для изолята (№ 3445), у которого не удалось обнаружить мутации, повторно провели тестирование фенотипической чувствительности методом абсолютных концентраций, а также с помощью тест-системы Sensititre Мусо ТВ и автоматизированной системы Bactec MGIT 960 (табл. 2). Фенотипическая резистентность к рифампицину выявлена только методом абсолютных концентраций, при этом на питательной среде с препаратом наблюдался более слабый рост (на 70% меньше), нежели в пробирке с контролем, в то время как две другие тест-системы определили культуру как чувствительную.

Заключение

Тестирование лекарственной чувствительности МБТ к рифампицину имеет критическое значение

Таблица 3. Спектр мутаций в генах, ассоциированных с резистентностью к противотуберкулезным препаратам, у изолятов МБТ, имеющих расхождения в результатах тестирования лекарственной чувствительности к рифампицину, молекулярно-генетическими и фенотипическими методами

Table 3. Mutation spectrum in genes associated with resistance to anti-tuberculosis drugs in MTB isolates with discrepancies in the results of drug susceptibility testing to rifampicin by molecular genetic and phenotypic methods

Код изолята	ТБ-ТЕСТ					
	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>gyrA</i>	<i>eis</i>	<i>embB</i>	генотип
2898	Asp516→Tyr	Ser315→Thr(1)	Asp94→Gly, Ser95→Thr	c14t	Met306→Val	Beijing
2982	Asp516→Tyr	Ser315→Thr(1)	wt	wt	wt	Beijing
4934	His526→Leu	Ser315→Thr(1)	Asp94→Gly, Ser95→Thr	g37t	Gln497→Arg	Beijing
7687	His526→Leu	Ser315→Thr(1)	wt	g37t	Gln497→Arg	Beijing

Таблица 4. Сопоставление результатов тестирования лекарственной чувствительности изолятов МБТ, полученных молекулярно-генетическими тестами ТБ-ТЕСТ, Амплитуб-МЛУ-РВ и GenoType MTBDRplusV2, с фенотипическим методом абсолютных концентраций

Table 4. Comparison of results of drug susceptibility testing of MTB isolates by molecular genetic tests of TB-TEST, Amplitube-MDR-RV and GenoType MTBDRplusV2 with the phenotypic method of absolute concentrations

Код изолята	ТБ-ТЕСТ						Амплитуб-МЛУ-РВ	GenoType MTBDRplusV2		Метод абсолютных концентраций (40 мг/л)
	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>gyrA</i>	<i>eis</i>	<i>embB</i>	генотип	<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	
5655	wt	Ser315→Thr(1)	wt	g10a	wt	BeijingB0	wt	514-515 кодоны	Ser315→Thr(1)	R
7772	wt	Ser315→Thr(1)	wt	g10a	wt	BeijingB0	wt	514-515 кодоны	Ser315→Thr(1)	R
6225	wt	Ser315→Thr(1)	Ala90→Val	g10a	wt	BeijingB0	wt	514-515 кодоны	Ser315→Thr(1)	R
1241	wt	Ser315→Thr(1)	Ala90→Val	g10a	wt	BeijingB0	wt	514-515 кодоны	Ser315→Thr(1)	R
2566	wt	Ser315→Thr(1)	Asp94→Ala, Ser95→Thr	g10a	wt	BeijingB0	wt	514-515 кодоны	Ser315→Thr(1)	R
5632	wt	Ser315→Thr(1)	wt	wt	Met306→Ile(1)	LAM	wt	522 кодон	Ser315→Thr(1)	R

для клинической практики, так как определяет терапевтическую стратегию лечения пациентов (назначение режима химиотерапии). Несмотря на наличие одобренных ВОЗ методов определения лекарственной чувствительности МБТ к этому препарату, в рутинной практике лабораторий до сих пор существует вероятность получения недостоверных данных. Это утверждение относится как к фенотипическим, так и к молекулярно-генетическим методам тестирования.

Наши исследования подтвердили, что система Bactec MGIT 960, имеющая высокий уровень валидации, как и широко используемый в России метод абсолютных концентраций, в отдельных случаях могут демонстрировать ложноотрицательные результаты тестирования резистентности МБТ к рифампицину [4, 12]. Возможно, предложенная ВОЗ коррекция значения критической концентрации рифампицина для Bactec MGIT с 1 на 0,5 мг/л позволит снизить вероятность таких событий.

Согласно полученным нами данным, использование метода, основанного на определении минимальных ингибирующих концентраций в ходе серийных разведений, для тестирования изолятов МБТ, имеющих редко встречающиеся мутации, ассоциированные с устойчивостью к рифампицину, позволяет получать более достоверные результаты. В связи с тем, что набор мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, включенный в тест-системы разных производителей, отличается, при получении сомнительных результатов определения устойчивости МБТ к рифампицину целесообразно комплексное использование нескольких тест-систем.

Накопленные разными исследователями данные о различиях в результатах генотипического и фенотипического тестирования чувствительности/устойчивости МБТ к рифампицину свидетельствуют о необходимости продолжения исследований в этом направлении для выработки консенсуса об оптимальных методах оценки чувствительности МБТ к этому препарату.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Conflict of Interests. The authors state that they have no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреевская С. Н., Андриевская И. Ю., Киселева Е. А., Ларионова Е. Е., Смирнова Т. Г., Черноусова Л. Н., Эргешов А. Э. Влияние мутаций, связанных с устойчивостью к рифампицину, на «фитнес» штаммов *M. tuberculosis* // Туб. и социально-значимые заболевания. – 2016. – № 2. – С. 33-37.
2. Вахрушева Д. В., Еремеева Н. И., Умпелева Т. В., Белоусова К. В. Опыт применения технологии «ТБ-ТЕСТ» («БИОЧИП-ИМБ», Россия) в диагностическом алгоритме // Туб. и болезни легких. – 2017. – Т. 95, № 10. – С. 29-35.
3. Исакова А. И., Носова Е. Ю., Гармаш Ю. Ю., Богданов К. А., Трусов В. Н., Сафонова С. Г. Современные молекулярно-генетические технологии в диагностике туберкулеза при исследовании операционного материала // Туб. и социально-значимые заболевания. – 2018. – № 1. – С. 12-19.

REFERENCES

1. Andreevskaya S.N., Andrievskaya I.Yu., Kiseleva E.A., Larionova E.E., Smirnova T.G., Chernousova L.N., Ergeshov A.E. The effect of mutations associated with resistance to rifampicin on the fitness of *M. tuberculosis* strains. *Tub. I Sotsialno-Znachimye Zabolevaniya*, 2016, no. 2, pp. 33-37. (In Russ.)
2. Vakhrusheva D.V., Ereemeeva N.I., Umpeleva T.V., Belousova K.V. Experience of using TB-TEST technology (BIOCHIP-IMB, Russia) within the diagnostic algorithm. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, vol. 95, no. 10, pp. 29-35. (In Russ.)
3. Isakova A.I., Nosova E.Yu., Garmash Yu.Yu., Bogdanov K.A., Trusov V.N., Safonova S.G. Modern molecular genetic technologies in the diagnosis of tuberculosis when testing surgical specimens. *Tub. I Sotsialno-Znachimye Zabolevaniya*, 2018, no. 1, pp. 12-19. (In Russ.)

4. Носова Е. Ю., Хахалина А. А., Галкина К. Ю., Краснова М. А., Крылова Л. Ю., Сафонова С. Г. Определение множественной и широкой лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* с помощью различных молекулярных тестсистем и ВАСТЕСТМ MGIT™ 960 // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2015. – № 3. – С. 11-17.
5. Черноусова Л. Н., Севастьянова Е. В., Ларионова Е. Е., Смирнова Т. Г., Андреевская С. Н., Попов С. А. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. – 2014.
6. Abuali M. M., Katariwala R., LaBombardi V. J. 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. – 2011. – № 31 (5). – P. 835–839.
7. Campbell E. A., Korzhveva N., Mustaev A., Murakami K., Nair S., Goldfarb A., Darst S. A. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase // Cell. – 2001. – № 104 (6). – P. 901-912.
8. Di A., Levin B. R. The biological cost of antibiotic resistance // Curr. Opin. Microbiol. – 1999. – № 2. – P. 489-493.
9. Hall L., Jude K. P., Clark S. L., Dionne K., Merson R., Boyer A., Parrish N. M., Wengenack N. L. Evaluation of the sensititre MycoTB plate for susceptibility testing of the *Mycobacterium tuberculosis complex* against first- and second-line agents // J. Clin. Microbiol. – 2012. – № 50 (11). – P. 3732-3734.
10. Mokrousov I., Otten T., Vyshnevskiy B., Narvskaya O. Allele-specific rpoB PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears // Antimicrob. Agents Chemother. – 2003. – № 47 (7). – P. 2231-2235.
11. Morlock G. P., Plikaytis B. B., Crawford J. T. Characterization of spontaneous, in vitro-selected, rifampin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv // Antimicrob. Agents Chemother. – 2000. – № 44 (12). – P. 3298-3301.
12. Rigouts L., Gumusboga M., De Rijk W. B., Nduwamahoro E., Uwizeye C., De Jong B., Van Deun A. Rifampin resistance missed in automated liquid culture system for *Mycobacterium tuberculosis* isolates with specific rpoB mutations // J. Clin. Microbiol. – 2013. – № 51 (8). – P. 2641-2645.
13. Siu G. K. H., Zhang Y., Lau T. C. K., Lau R. W. T., Ho P. L., Yew W. W., Tsui S. K. W., Cheng V. C. C., Yuen K. Y., Yam W. C. Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // J. Antimicrob. Chemother. – 2011. – № 66 (4). – P. 730-733.
14. Toungousova O. S., Sandven P., Mariandyshv A. O., Nizovtseva N. I., Bjune G., Caugant D. A. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia // J. Clin. Microbiol. – 2002. – № 40 (6). – P. 1930-1937.
15. Wehrli W. Rifampin: Mechanisms of action and resistance // Rev. Infect. Dis. – 1983. – № 5 (3). – P. S407–S411.
16. Williams D. L., Spring L., Collins L., Miller L. P., Heifets L. B., Gangadharam P. R. J., Gillis T. P. Contribution of rpoB mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // Antimicrob. Agents Chemother. – 1998. – № 42 (7). – P. 1853-1857.
17. World Health Organization, Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis complex* and their association with drug resistance. – 2021.
18. World Health Organization, Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. – 2018.
19. World Health Organization, Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). – 2021. 4, 38-44.
20. Yang B., Koga H., Ohno H., Ogawa K., Fukuda M., Hirakata Y., Maesaki S., Tomono K., Tashiro T., Kohno S. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and rpoB mutations of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Antimicrob. Chemother. – 1998. – № 42 (5). – P. 621-628.
21. Yu, X., Ma, Y. F., Jiang, G. L., Chen, S. T., Wang, G. R., Huang, H. R. Sensititre® MYCOTB MIC plate for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis complex* isolates // The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: the Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. – 2016. – № 20 (3). – P. 32-334.
22. Zimenkov D. V., Kulagina E. V., Antonova O. V., Zhuravlev V. Y., Gryadunov D. A. Simultaneous drug resistance detection and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using a low-density hydrogel microarray // J. Antimicrob. Chemother. – 2009. – № 71 (6). – P. 1520-1531.
4. Nosova E.Yu., Khakhalina A.A., Galkina K.Yu., Krasnova M.A., Krylova I.Yu., Safonova S.G. Diagnosis multiple and extensive drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* using various molecular test systems and ВАСТЕСТМ MGIT™ 960. *Tuberkulez i Sotsialno-Znachimye Zabolevaniya*, 2015, no. 3, pp. 11-17. (In Russ.)
5. Chernousova L.N., Sevastyanova E.V., Larionova E.E., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Popov S.A. *Federalnye klinicheskie rekomendatsii po organizatsii i provedeniyu mikrobiologicheskoy i molekulyarno-geneticheskoy diagnostiki tuberkuleza*. [Federal clinical recommendations in organization and implementation of microbiological and molecular-genetic diagnostics of tuberculosis]. 2014.
6. Abuali M.M., Katariwala R., LaBombardi V.J. 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.*, 2011, no. 31 (5), pp. 835-839.
7. Campbell E.A., Korzhveva N., Mustaev A., Murakami K., Nair S., Goldfarb A., Darst S.A. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, 2001, no. 104 (6), pp. 901-912.
8. Di A., Levin B.R. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999, no. 2, pp. 489-493.
9. Hall L., Jude K.P., Clark S.L., Dionne K., Merson R., Boyer A., Parrish N.M., Wengenack N.L. Evaluation of the sensititre MycoTB plate for susceptibility testing of the *Mycobacterium tuberculosis complex* against first- and second-line agents. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, no. 50 (11), pp. 3732-3734.
10. Mokrousov I., Otten T., Vyshnevskiy B., Narvskaya O. Allele-specific rpoB PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, no. 47 (7), pp. 2231-2235.
11. Morlock G.P., Plikaytis B.B., Crawford J.T. Characterization of spontaneous, in vitro-selected, rifampin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, no. 44 (12), pp. 3298-3301.
12. Rigouts L., Gumusboga M., De Rijk W.B., Nduwamahoro E., Uwizeye C., De Jong B., Van Deun A. Rifampin resistance missed in automated liquid culture system for *Mycobacterium tuberculosis* isolates with specific rpoB mutations. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, no. 51 (8), pp. 2641-2645.
13. Siu G.K.H., Zhang Y., Lau T.C.K., Lau R.W.T., Ho P.L., Yew W.W., Tsui S.K.W., Cheng V.C.C., Yuen K.Y., Yam W.C. Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2011, no. 66 (4), pp. 730-733.
14. Toungousova O.S., Sandven P., Mariandyshv A.O., Nizovtseva N.I., Bjune G., Caugant D.A. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, no. 40 (6), pp. 1930-1937.
15. Wehrli W. Rifampin: Mechanisms of action and resistance. *Rev. Infect. Dis.*, 1983, no. 5 (3), pp. S407–S411.
16. Williams D.L., Spring L., Collins L., Miller L.P., Heifets L.B., Gangadharam P.R.J., Gillis T.P. Contribution of rpoB mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, no. 42 (7), pp. 1853-1857.
17. World Health Organization. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis complex* and their association with drug resistance. 2021.
18. World Health Organization. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. 2018.
19. World Health Organization. Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). 2021, 4, 38-44.
20. Yang B., Koga H., Ohno H., Ogawa K., Fukuda M., Hirakata Y., Maesaki S., Tomono K., Tashiro T., Kohno S. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and rpoB mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1998, no. 42 (5), pp. 621-628.
21. Yu, X., Ma, Y.F., Jiang, G.L., Chen, S.T., Wang, G.R., Huang, H.R. Sensititre® MYCOTB MIC plate for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis complex* isolates. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: the Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 2016, no. 20 (3), pp. 32-334.
22. Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Antonova O.V., Zhuravlev V.Y., Gryadunov D.A. Simultaneous drug resistance detection and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using a low-density hydrogel microarray. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2009, no. 71 (6), pp. 1520-1531.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ,
620039, г. Екатеринбург, 22 Парксъезда, д. 50.

Умпелева Татьяна Валерьевна

ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела микробиологии и доклинических исследований.
E-mail: tumpeleva@ya.ru

Мазурина Елена Александровна

лаборант-исследователь научно-исследовательского отдела микробиологии и доклинических исследований.
E-mail: l.mazurina2011@ya.ru

Вахрушева Диана Владимировна

заведующая научно-исследовательским отделом микробиологии и доклинических исследований.
E-mail: vakhrusheva@urniif.ru

Еремеева Наталья Ивановна

ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела микробиологии и доклинических исследований.
E-mail: eremeevani@ya.ru

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases,
50, XXII Parts"ezda St.,
Yekaterinburg, 620039.

Tatiana V. Umpeleva

Leading Researcher of Research Department of Microbiology and Preclinical Studies.
Email: tumpeleva@ya.ru

Elena A. Mazurina

Laboratory Researcher of Research Department of Microbiology and Preclinical Studies.
Email: l.mazurina2011@ya.ru

Diana V. Vakhrusheva

Head of Research Department of Microbiology and Preclinical Studies.
Email: vakhrusheva@urniif.ru

Natalya I. Ereemeeva

Leading Researcher of Research Department of Microbiology and Preclinical Studies.
Email: eremeevani@ya.ru

Поступила 2.10.2021

Submitted as of 2.10.2021