УДК 616.24-002.54:577.21:615.015.8
DOI: 10.54921/2413-0346-2023-11-4-30-38

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА В ДИАГНОСТИКЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *M. TUBERCULOSIS* К ФТОРХИНОЛОНАМ И ИНЪЕКЦИОННЫМ ПРЕПАРАТАМ

А.И. Исакова, Ю.Д. Михайлова, М.А. Свириденко, А.А. Хахалина, К.Ю. Галкина, Е.Ю. Носова, С.Г. Сафонова
ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

В работе представлены данные тестирования лекарственной чувствительности (ЛЧ) клинических изолятов M. tuberculosis к фторхинолонам и инъекционным препаратам с помощью молекулярно-генетических тест-систем и фенотипических методов. Показаны диагностические возможности гибридизационных технологий «ТБ-ТЕСТ» и GenoType MTBDRsl v.2 в определении генетических детерминант устойчивости изолятов с множественной, пре-широкой и широкой лекарственной устойчивостью.

***Ключевые слова**: микобактерии туберкулеза, мутации, генетические полиморфизмы, устойчивость к фторхинолонам и инъекционным препаратам*

MOLECULAR TESTS FOR HYBRIDIZATION ANALYSIS IN THE DIAGNOSIS OF DRUG SUSCEPTIBILITY OF *M. TUBERCULOSIS* TO FLUOROQUINOLONES AND INJECTABLE DRUGS

A.I. Isakova, Yu.D. Mikhailova, M.A. Sviridenko, A.A. Khakhalina, K.Yu. Galkina, E.Yu. Nosova, S.G. Safonova
*The M*oscow Research and Clinical Center for Tuberculosis Control of the Moscow Government Department of Health

The paper presents data on testing the drug susceptibility of clinical isolates of M. tuberculosis (MTB) to fluoroquinolones and injectable drugs using molecular genetic tests and phenotypic methods. We demonstrated the diagnostic capabilities of the hybridization technologies «TB-TEST and GenoType MTBDRsl v.2 to detect the genetic determinants of resistance in MTB isolates with multidrug and extensively drug resistance (MDR, XDR), as well as in MBT with pre-XDR.

***Key words**: Mycobacterium tuberculosis, mutations, genetic polymorphisms, resistance to fluoroquinolones and injectable drugs*

Фторхинолоны и инъекционные препараты (канамицин – Km, амикацин – Am, капреомицин – Cm) являются основными препаратами резервного ряда для этиотропного лечения больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ). Развитие устойчивости *M. tuberculosis* (МБТ) к фторхинолонам (ФХ) обусловлено наличием мутаций в генах *gyrA* (в 45–85% резистентных изолятов) и *gyrB* (примерно у 7% штаммов) [23, 24]. Перекрестная устойчивость к препаратам группы аминогликозидов – Km, Am и Cm – связана с возникновением мутаций в гене *rrs*, а устойчивость только к Km – в промоторной области гена *eis* (Enhanced Intracellular Survival protein) [11, 27]. Для ускоренного выявления генетических детерминант устойчивости МБТ к этим препаратам Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) в 2016 году выпустила рекомендации по использованию у пациентов с резистентностью к рифампицину, с МЛУ МБТ и при выборе подходящей схемы лечения МЛУ-ТБ второй версии теста GenoType MTBDR*sl* v.2, отличающейся от первой включением в анализ генов *gyrB* и *eis*, [25]. В Российской Федерации (РФ) на основе гибридизационного анализа на биочипах была разработана и сертифицирована тест-система «ТБ-ТЕСТ», позволяющая одновременно определять мутации, связанные с МЛУ и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) МБТ в диагностическом материале и культурах [29]. Приказом Министерства здравоохранения РФ все гибридизационные технологии, в том числе рекомендованные ВОЗ, включены в «Методические рекомендации по совершенствованию диагностики и лечения органов дыхания» для использования в профильных лабораториях фтизиатрической службы [2]. «ТБ-ТЕСТ» позволяет идентифицировать комплекс МБТ и суммарно выявлять 116 генетических детерминант лекарственной устойчивости к основным препаратам первого (изониазид (H), рифампицин (R), этамбутол (E) и второго (ФХ, Km, Am и Cm) ряда, а также определять эндемичные для РФ генетические семейства *Beijing, Beijing B0, Haarlem, LAM, Ural* и принадлежность к Европейско-Американской линии.

Обе тест-системы основаны на способности целевых последовательностей ДНК, амплифицированных в результате полимеразной цепной реакции (ПЦР), гибридизоваться с зондами, нанесенными на соответствующую матрицу, которые при детекции на биочипе флюоресцируют, а на ДНК-стрипе проявляются в виде окрашенных полос в месте связывания зондов [1, 14]. Несмотря на диагностическую точность и широкий спектр анализируемых генов и мутаций, в некоторых случаях отмечается расхождение результатов молекулярно-генетического тестирования и фенотипического определения лекарственной чувствительности к препаратам резервного ряда [8, 9, 21].

Цель исследования

Провести сравнительный анализ результатов тестирования лекарственной чувствительности МБТ к фторхинолонам и инъекционным препаратам молекулярно-генетическими тест-системами и фенотипическими методами.

Материалы и методы исследования

Бактериальные штаммы

В исследование включено 92 клинических изолята *M. tuberculosis complex* из лабораторной коллекции микобактериальных культур Централизованной бактериологической лаборатории (хранение при -70 °С). Изоляты были выделены в жидкой среде Миддлбрука *7H9* (M7H9) в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 из диагностического материала (мокрота, промывные воды бронхов, операционный материал) пациентов, проходивших лечение в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ». Определение лекарственной чувствительности (ЛЧ) МБТ к противотуберкулезным препаратам (ПТП) проводили в жидкой среде *M7H9* в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson, США) в соответствии с руководством производителя [22]. ЛЧ МБТ к офлоксацину (Ofx), Km, Am и Cm определяли в критических концентрациях (КК) 2,0; 2,5; 1,0 и 2,5 мкг/мл соответственно [26]. Данная выборка не была связана с определенными эпидемиологическими данными и включала 53 штамма МБТ с ШЛУ, 19 – с МЛУ и устойчивостью к фторхинолонам (офлоксацину – Ofx), 18 – с МЛУ и устойчивостью к Km, Am и/или Cm, 2 штамма – только с МЛУ.

Молекулярно-генетическое тестирование

Выделение ДНК МБТ проводили с использованием роботизированной полуавтоматической станции Freedom EVO (TECAN, Швейцария) и реагентов «М-Сорб-Туб-автомат-48» (НПК «СИНТОЛ», Россия). Определение генетических детерминант устойчивости МБТ к ФХ и инъекционным препаратам проводили с помощью молекулярно-генетических тест-систем GenoType MTBDR*sl* v.2 (Hain Lifescience, Германия) и «ТБ-ТЕСТ» (ООО «Биочип», Россия). GenoType MTBDR*sl* v.2 позволяет определять наиболее распространенные типы мутаций, детерминирующие устойчивость к ФХ и Am/Km/Cm. Эти типы регистрируются при наличии специфических полос с определенными мутациями (МУТ-зонды), остальные нуклеотидные замены регистрируются по отсутствию полос с соответствующими зондами дикого типа (Wt). «ТБ-ТЕСТ» позволяет идентифицировать 28 типов мутаций в rpoB (устойчивость к Риф), 11 в katG, 5 в inhA, 5 в ahpC/oxyR (устойчивость к H), 23 в embB (устойчивость к E), 15 замен в *gyrA* и 23 в *gyrB* (устойчивость к ФХ), 4 в *rrs* и 6 в *eis* (устойчивость к инъекционным препаратам).

При расхождении результатов молекулярно-генетического и бактериологического тестирования ЛЧ дополнительно проводили секвенирование генов *gyrA* и *whiB7* 5′ UTR на секвенаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, США) и/или определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) Ofx, Km и Am методом серийных микроразведений (микрометод) в жидкой среде *M7H9* на планшетах Sensititre Myco TB (Thermo Scientific, США), согласно инструкции производителя.

Результаты исследования и обсуждения

Результаты проведенного исследования показали, что тест-система MTBDR*sl* v.2 по своей диагностической чувствительности при определении генетических детерминант устойчивости к Ofx и Km уступает, а при выявлении устойчивости к Am и Cm – сопоставима с «ТБ-ТЕСТ». Количественное распределение мутаций в генах и диагностические характеристики тестов представлены в таблице 1. В 14 из 92 (15,2%) изолятов, чувствительных к Ofx, и 16 из 92 (17,4%), чувствительных к инъекционным препаратам, мутации в генах *gyrA*/*gyrB* и *rrs*/eis обеими тест-системами не обнаружены. В 29 из 92 (31,5%) анализируемых изолятов выявлены расхождения в результатах тестирования ЛЧ молекулярно-генетическими и культуральными (Bactec-960) методами.

Выявление устойчивости к офлоксацину

Среди 72 штаммов, фенотипически устойчивых к Ofx, в 68 (94,4%) мутации были выявлены обеими тест-системами, спектр которых представлен в таблице 2. В 54/68 (79,4%) в гене *gyrA* и в 8/68 (11,8%) в гене *gyrB* мутации определены обоими тестами. В 6/68 (8,8%) штаммах замены в обоих генах *gyrA/gyrB* были выявлены только с помощью «ТБ-ТЕСТ», из которых только в двух – тестом MTBDR*sl* v.2, что обусловлено расположением замен вне анализируемой области (с 536-го по 541-й кодон). Среди мутаций в гене *gyrA* наиболее часто встречались замены в 94-м кодоне, обнаруженные в 29/68 (42,6%) штаммах, в 90-м (A90V, в 11,7%) и в 91-м (S91P, в 7,3%) кодонах. Мутации в этих же кодонах выявлены как двойные в гене *gyrA*, так и в сочетании с мутациями в *gyrB*.

Особенностью тест-системы MTBDR*sl* v.2 является выявление мутаций не только по МУТ-зондам (с определением

Таблица 1. Результаты молекулярно-генетического и бактериологического тестирования лекарственной чувствительности штаммов M. tuberculosis к офлоксацину, канамицину, амикацину и капреомицину

Table 1. Results of molecular genetic and bacteriological testing of drug susceptibility of M. tuberculosis strains to ofloxacin, kanamycin, amikacin and capreomycin

Препараты/лекарственная чувствительность МБТ (Bactec 960) Drugs/drug susceptibility of MBT (Bactec 960)	Результаты тестирования изолятов • Results of testing isolates (*n* = 92)							
	ТБ-ТЕСТ • TB TEST				MTBDR*sl* v 2.0			
	мутации • mutations			нет мутаций there are no mutations (wt)	мутации • mutations			нет мутаций there are no mutations (wt)
	gyrA	*gyrA/B*	*gyrB*		*gyrA*	*gyrA/B*	*gyrB*	
Устойчивые к Ofx 72 (78,3%) Ofx-resistant 72 (78.3%)	55	6	10	1	59	2	8	3
Чувствительные к Ofx 20 (21,7%) Ofx-susceptible 20 (21.7%)	1		5	14	1		5	14
Всего • Total	77 (83,7%)			15 (16,3%)	75 (81,5%)			17 (18,5%)
Чувствительность % (95% ДИ %-%) Susceptibility % (95% CI %-%)	98,6 (92,5-99,7)				95,8 (88,4-98,6)			
Специфичность % (95% ДИ %-%) Specificity % (95% CI %-%)	70,0 (48,1-85,5)				70,0 (48,1-85,5)			
ПЦПР % (95% ДИ %-%) PPV % (95% CI %-%)	92,2 (84,0-96,4)				92,0 (83,6-96,3)			
ПЦОР % (95% ДИ %-%) PNV % (95% CI %-%)	93,3 (70,2-98,8)				82,3 (59,0-93,8)			
	rrs	*rrs/eis*	*eis*	wt	*rrs*	*rrs/eis*	*eis*	wt
Устойчивые к Km 71 (77,2%) Km-resistant 71 (77,2%)	27	2	35	6	27	2	34	8
Чувствительные к Km 21 (22,8%) Km-susceptible 21 (22,8%)			4	18	1		4	16
Всего • Total	68 (73,9%)			24 (26,1%)	68 (73,9%)			24 (26,1%)
Чувствительность % (95% ДИ %-%) Susceptibility % (95% CI %-%)	90,1 (81,0-95,1)				88,7 (79,3-94,2)			
Специфичность % (95% ДИ %-%) Specificity % (95% CI %-%)	85,7 (65,4-95,0)				76,2 (54,9-89,4)			
ПЦПР % (95% ДИ %-%) PPV % (95% CI %-%)	94,1 (85,8-97,7)				92,6 (83,9-96,8)			
ПЦОР % (95% ДИ %-%) NPV % (95% CI %-%)	75,0 (55,1-88,0)				66,7 (46,7-82,0)			
	rrs	*rrs/eis*	*eis*	wt	*rrs*	*rrs/eis*	*eis*	wt
Устойчивые к Am 36 (39,1%) Am-resistant 36 (39,1%)	25	2	9		25	2	8	1
Чувствительные к Am 56 (60,9%) Am-susceptible 56 (60,9%)	2*		30	24	3		30	23
Всего • Total	29 (31,5%)		63 (68,5%)		30 (32,6%)		62 (67,4%)	
Чувствительность % (95% ДИ %-%) Susceptibility % (95% CI %-%)	75,0 (58,9-86,2)				75,0 (58,9-86,2)			
Специфичность % (95% ДИ %-%) Specificity % (95% CI %-%)	100,0 (93,6-100,0)				94,6 (85,4-98,2)			
ПЦПР % (95% ДИ %-%) PPV % (95% CI %-%)	100,0 (88,3-100,0)				90,0 (74,4-96,5)			
ПЦОР % (95% ДИ %-%) NPV % (95% CI %-%)	85,7 (75,0-92,3)				85,5 (74,7-92,2)			
	rrs	*rrs/eis*	*eis*	wt	*rrs*	*rrs/eis*	*eis*	wt
Устойчивые к Cm 30 (32,6%) Cm-resistant 30 (32,6%)	27	2		1	27	2		1
Чувствительные к Cm 62 (67,4%) Cm-susceptible 62 (67,4%)			39	23	1		38	23
Всего • Total	29 (31,5%)		63 (68,5%)		30 (32,6%)		62 (67,4%)	
Чувствительность % (95% ДИ %-%) Susceptibility % (95% CI %-%)	96,7 (83,3-99,4)				96,7 (83,3-99,4)			
Специфичность % (95% ДИ %-%) Specificity % (95% CI %-%)	100,0 (94,2-100,0)				98,4 (91,4-99,7)			
ПЦПР % (95% ДИ %-%) PPV % (95% CI %-%)	100,0 (88,3-100,0)				96,7 (83,3-99,4)			
ПЦОР % (95% ДИ %-%) NPV % (95% CI %-%)	98,4 (91,5-99,7)				98,4 (91,4-99,7)			

* – штаммы с мутацией c1402t, приводящей к устойчивости только к Km и Cm. ПЦПР – прогностическая ценность положительного результата, ПЦОР – прогностическая ценность отрицательного результата, ДИ – доверительный интервал.

* – strains with the c1402t mutation, leading to resistance only to Cm and Cm. PPV – positive predictive value, NPV – negative predictive value, CI – confidence interval.

Таблица 2. Спектр мутаций в устойчивых изолятах M. tuberculosis к фторхинолонам (офлоксацину) и инъекционным препаратам, выявленный тест-системами ТБ-ТЕСТ и MTBDRsl v 2.0

Table 2. The spectrum of mutations in resistant M. tuberculosis isolates to fluoroquinolones (ofloxacin) and injectable drugs detected by the TB-TEST and MTBDRsl v 2.0 test systems

Тест-системы • Test systems				Количество изолятов Number of isolates (*n*,%)
ТБ-ТЕСТ • TB TEST		MTBDR*sl* v 2.0		
Устойчивые к фторхинолонам (офлоксацину) • Resistant to fluoroquinolones (ofloxacin)				68 (100)
gyrA	***gyrB***	***gyrA***	***gyrB***	
A90V	wt	Δwt2/mut1 (A90V)	wt (536-541)	5 (7,3)
A90V (gcg>gtc)	wt	Δwt2	wt (536-541)	2 (2,9)
A90V (gcg>gtc)	wt	Δwt2/wt	wt (536-541)	1 (1,5)
A90V D94A	wt	Δwt2,3/mut1;mut3A (A90V, D94A)	wt (536-541)	2 (2,9)
A90V S91P	wt	Δwt2	wt (536-541)	1 (1,5)
A90V D94G	wt	Δwt2,3/mut1;mut3C (A90V, D94G)	wt (536-541)	2 (2,9)
D94A	wt	Δwt3/ mut3A (D94A)	wt (536-541)	4 (5,9)
D94G	wt	Δwt3/ mut3C (D94G)	wt (536-541)	15 (22,1)
D94H	wt	Δwt3/ mut3D (D94H)	wt (536-541)	3 (4,4)
D94N	wt	Δwt3/ mut3B (D94N/D94Y)	wt (536-541)	2 (2,9)
D94Y	wt	Δwt3	wt (536-541)	5 (7,3)
G88C	wt	Δwt1	wt (536-541)	5 (7,3)
G88A H70R	wt	Δwt1/ wt1	wt (536-541)	1 (1,5)
S91P	wt	Δwt2/ mut2 (S91P)	wt (536-541)	5 (7,3)
S91P D94A	wt	Δwt2/ mut2,mut3A (S91P, D94A)	wt (536-541)	1 (1,5)
Всего в *gyrA* • Total in *gyrA*	**54**	**Всего в *gyrA* • Total in *gyrA***	**54**	**54 (79,4)**
A90V	A543T	Δwt2/mut1 (A90V)	wt (536-541)	1 (1,5)
A90V	D500N	Δwt2/mut1 (A90V)	wt (536-541)	1 (1,5)
D94A	E540D	Δwt3/ mut3A (D94A)	Δwt (536-541)	1 (1,5)
D94A	D500H	Δwt3/ mut3A (D94A)	wt (536-541)	1 (1,5)
D94G	S486F	wt3/ mut3C (D94G)	wt (536-541)	1 (1,5)
S91P	T539P	Δwt2/ mut2 (S91P)	wt/Δwt (536-541)	1 (1,5)
Всего в *gyrA/gyrB*	**6**	**Всего в *gyrA* • Total in *gyrA***	**4**	**6 (8,8)**
		Всего в *gyrA/gyrB* Total in *gyrA/gyrB*	**2**	
wt	D500N E540D	wt1,2,3	Δwt (536-541)	1 (1,5)
wt	N538D	wt1,2,3	Δwt/ mut1 (N538D)	2 (2,9)
wt	N538K	wt1,2,3	Δwt (536-541)	1 (1,5)
wt	T539N	wt1,2,3	Δwt (536-541)	1 (1,5)
wt	E540D-2	wt1,2,3	Δwt (536-541)	1 (1,5)
wt	E540V	wt1,2,3	Δwt/ mut2 (E540V)	2 (2,9)
Всего в *gyrB* • Total in *gyrB*	**8**	**Всего в *gyrB* • Total in *gyrB***	**8**	**8 (11,8)**
Устойчивые к инъекционным препаратам • Resistant to injectable drugs				**55 (100)**
Устойчивые к Km, Am и Cm • Resistant to Km, Am and Cm				**27 (49,1)**
rrs	***eis***	***rrs***	***eis***	
a1401g	wt	Δwt1/ mut1 (a1401g)	wt1,2,3	25 (45,5)
a1401g	g10a	Δwt1/ mut1 (a1401g)	Δwt2	1 (1,8)
a1401g	c12t	Δwt1/ mut1 (a1401g)	Δwt2	1 (1,8)
Всего в *rrs* • Total in *rrs*	**25**	**Всего в *rrs* • Total in *rrs***	**25**	**25 (45,5)**
Всего в *rrs/eis* • Total in *rrs/eis*	**2**	**Всего в *rrs/eis* • Total in *rrs/eis***	**2**	**2 (3,6)**
Устойчивость к Km и Cm • Resistant to Km and Cm				**2 (3,6)**
c1402t	wt	Δwt1	wt1,2,3	2 (3,6)
Всего в *rrs* • Total in *rrs*	2	**Всего в *rrs* • Total in *rrs***	2	27 (49,1)
Низкий уровень устойчивости к Km • Low level of resistance to Km				
wt	c14t	wt1,2	Δwt2/ mut1 (c14t)	3 (5,5)
wt	g10a	wt1,2	Δwt2	3 (5,5)
wt	g10a	wt1,2	Δwt2/wt2	1 (1,8)
wt	g10c	wt1,2	Δwt2/wt2	1 (1,8)
wt	g37t	wt1,2	Δwt1	12 (21,8)
wt	c12t	wt1,2	Δwt2	6 (10,9)
Всего в *eis* • Total in *eis*	**26**	**Всего в *eis* • Total in *eis***	**26**	**26 (47,3)**

Таблица 3. Расхождения в результатах тестирования лекарственной чувствительности M. tuberculosis к фторхинолонам и инъекционным препаратам молекулярно-генетическими и фенотипическими методами

Table 3. Discrepancies in the results of testing the drug susceptibility of M. tuberculosis to fluoroquinolones and injectable drugs by molecular genetic and phenotypic methods

№/№	MGIT Bactec 960				ТБ-ТЕСТ TB TEST *gyrA//gyrB*	MTBDR*sl* *gyrA//gyrB*	МИК • MIC Ofx/Mfx* (мкг/мл) µg/ml	ТБ-ТЕСТ TB TEST *rrs//eis*	MTBDR*sl* *rrs//eis*	МИК • MIC Km/Am (мкг/мл) µg/ml	Секвенирование Sequencing *gyrA* и *whiB7* 5′ UTR
	Ofx	Km	Am	Cm							
1	**У**	Ч	Ч	Ч	**G88A/wt//wt**	**wt//wt**	**2,0//0,25**	wt//wt	wt//wt	1,25//0,5	н/д
2	**Ч**	Ч	Ч	Ч	**D94A//wt**	**mut3A//wt**	**4,0//1,0**	wt//wt	wt//wt	1,25//0,5	н/д
3	**У**	У	У	У	**wt//D500H**	**wt//wt**	**4,0//0,5**	A1401g//wt	mut1//wt	40,0//16,0	н/д
4	**У**	Ч	Ч	Ч	**wt//D500H**	**wt//wt**	н/д	wt//wt	wt//wt	н/д	н/д
5	**Ч**	У	Ч	Ч	**wt//E540D**	**wt//Δwt**	**8,0//4,0**	wt//g10c	wt// Δwt2/ wt2	5,0//1,0	н/д
6	**Ч**	У	Ч	Ч	**wt//N538T**	**wt//Δwt**	**2,0//0,5**	wt//g37t	wt//Δwt1	5,0//1,0	н/д
7	**Ч**	У	У	У	**wt//N538K**	**wt//Δwt**	**2,0//1,0**	A1401g//wt	mut1//wt	40,0//16,0	н/д
8	**У**	Ч	Ч	Ч	**wt//wt**	**Δwt1,2//wt**	**4,0//1,0**	wt//wt	wt//wt	1,25//0,5	***gyrA D89N***
9	**Ч**	**У**	Ч	**У**	**wt//T539N**	**wt//Δwt**	**2,0//0,5**	**wt//wt**	**wt//wt**	**2,5//0,5**	н/д
10	У	**У**	**У**	Ч	A90V//D500N	mut1//wt	16,0//8,0	**wt//c14t**	**wt//mut1**	**20,0//2,0**	н/д
11	У	**У**	**У**	Ч	D94A//wt	mut3A//wt	4,0//1,0	**wt//c14t**	**wt//mut1**	**5,0//2,0**	н/д
12	У	**У**	**У**	Ч	D94A//wt	mut3A//wt	4,0//1,0	**wt//c14t**	**wt//mut1**	**5,0//2,0**	н/д
13	У	**У**	**У**	Ч	D94G//wt	mut3C//wt	2,0//0,5	**wt//c14t**	**wt//mut1**	**10,0//1,0**	н/д
14	Ч	**Ч**	Ч	Ч	wt//wt	wt//wt	н/д	**wt//c14t**	**wt//mut1**	**5,0//1,0**	н/д
15	У	**У**	**У**	Ч	wt//T539N	wt//Δwt	2,0//0,5	**wt//g10a**	**wt//wt**	**5,0//1,0**	н/д
16	У	**Ч**	н/д	Ч	G88C//wt	Δwt1//wt	н/д	**wt//g10a**	**wt//Δwt2/ wt2**	н/д	н/д
17	У	**У**	Ч	Ч	wt//E540D-2	wt//Δwt	16,0//4,0	**wt//g10a**	**wt//wt**	**2,5//0,25**	н/д
18	Ч	**У**	Ч	Ч	wt//wt	wt//wt	1,0//0,25	**wt//g10a**	**wt//wt**	**2,5//0,12**	н/д
19	У	**У**	Ч	Ч	A90V//wt	mut1//wt	8,0//2,0	**wt//g10a**	**wt//wt**	**2,5//0,12**	н/д
20	У	**У**	Ч	Ч	A90V D94A// wt	mut1, mut3A//wt	32,0//8,0	**wt//g10a**	**wt//wt**	**2,5//0,12**	н/д
21	У	**Ч**	Ч	Ч	wt//D500N E540D	wt//Δwt	4,0//4,0	**wt//c12t**	**wt//Δwt2**	**1,2//1,0**	н/д
22	У	**Ч**	Ч	Ч	D94N//wt	mut3B//wt	н/д	**wt//c12t**	**wt//Δwt2**	н/д	н/д
23	У	**У**	Ч	Ч	G88A H70R// wt	Δwt1/wt //wt	4,0//1,0	**wt//wt**	**wt//wt**	**5,0//1,0**	*whiB7* **g298t**
24	Ч	**У**	Ч	Ч	wt//wt	wt//wt	0,5//0,06	**wt//wt**	**wt//wt**	**5,0//0,5**	*whiB7* **a237g**
25	Ч	**У**	Ч	Ч	wt//wt	wt//wt	0,25//0,06	**wt//wt**	**wt//wt**	**2,5//0,25**	*whiB7* **a237g**
26	Ч	**У**	Ч	Ч	wt//wt	wt//wt	0,25//0,06	**wt//wt**	**wt//wt**	**2,5//0,25**	*whiB7* **a237g**
27	У	**У**	Ч	Ч	D94G//wt	mut3C//wt	4,0//1,0	**wt//wt**	**wt//wt**	**5,0//0,5**	*whiB7* **g298t**
28	Ч	**У**	Ч	Ч	wt//wt	wt//wt	0,25//0,06	**wt//wt**	**wt//wt**	**2,5//0,5**	*whiB7* **a237g**
29	У	**Ч**	**Ч**	**Ч**	D94Y//wt	Δwt3//wt	8,0//2,0	**wt//wt**	**Δwt1//wt**	**0,6//0,5**	н/д

* – моксифлоксацин
* – moxifloxacin

нуклеотидной замены), но и по отсутствию одного или нескольких из трех зондов дикого типа в *gyrA* и одного в *gyrB* (без определения типа мутации), направленное на выявление менее распространенных замен в пределах участков, охваченных тестом [3, 6]. Среди 68 изолятов, устойчивых к Ofx, тестом MTBDRsl с помощью специфичных МУТ-зондов у 39 (57,3%)идентифицированы мутации в гене *gyrA* (в том числе у 5 изолятов (7,3%) – двойные); у половины (4/8, 50%) – мутации в гене *gyrB* идентифицированы тестом MTBDR*sl* v.2 с помощью специфичных МУТ-зондов. В остальных 15 из 68 изолятов (22,1%) в *gyrA* и в 6 из 68 изолятов (8,8%) в *gyrB* мутации определены тестом по отсутствию зондов дикого типа в этих генах (без определения типа мутации), что может говорить только о «предполагаемой устойчивости». Для подтверждения, связана ли мутация с устойчивостью к препарату, необходим либо результат культурального тестирования ЛЧ, либо секвенирования (определение нуклеотидной замены) [3].

Среди 29 изолятов с расхождениями в результатах тестирования ЛЧ в 9 (31,0%) (№№ 1–9) выявлены дискордантные результаты определения ЛЧ к Ofx двумя тест-системами и культуральным методом (в системе Bactec MGIT 960), см. таблицу 3.

Расхождения в результатах между «ТБ-ТЕСТ» и MTBDR*sl* v.2 среди четырех устойчивых штаммов в Bactec-960 были связаны с рядом причин.

В одном случае – с анализом разного по размеру локуса гена *gyrB* разными молекулярными тест-системами: в изолятах № 3 и № 4 «ТБ-ТЕСТ» выявил мутации в *gyrB* за пределами участка гена, охваченного тестом MTBDR*sl* v.2 (с 536-го по 541-й кодон). Во втором – с разной диагностической чувствительностью тестов при выявлении замены, определяемой обеими тест-системами. Так, в изоляте № 1 с помощью «ТБ-ТЕСТ» выявлена гетерорезистентная популяция с низким содержанием мутантных вариантов в присутствии чувствительных особей – G88A/wt, что косвенно подтверждено значением МИК офлоксацина (2,0 мгк/мл).

В третьем случае – с различиями в способе детекции мутаций: «ТБ-ТЕСТ» выявляет только те мутации, которые определяются с помощью специфических олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных в гидрогелевый субстрат на поверхности биочипа. В изоляте № 8 при тестировании «ТБ-ТЕСТ» мутаций не было обнаружено, тогда как при исследовании MTBDRsl v.2 имело место отсутствие связывания ампликонов с зондами дикого типа 1 и 2 (Δwt1,2) в регионе *gyrA*, что свидетельствует о наличии одной или нескольких мутаций.

После секвенирования в культуре была выявлена нуклеотидная замена D89N в этом гене, не представленная на биочипе и приводящая к устойчивости к ФХ [5, 16, 18].

В пяти штаммах, чувствительных к Ofx в системе Bactec MGIT 960, мутации были выявлены обеими тест-системами. В одном изоляте № 2 обнаружена замена D94A (МУТ-зондом mut3A) в *gyrA*; в изолятах №№ 5, 6, 7, 9 с помощью «ТБ-ТЕСТ» выявлены нуклеотидные замены (E540D, N538T, N538K, T539N) в *gyrB* (эти же замены определены MTBDRsl v.2 в локусе гена с 536-го по 541-й кодон по отсутствию зонда дикого типа – Δwt). Наличие устойчивости к препарату в этих изолятах подтверждено методом микроразведений, при этом МИК Ofx составил для штамма с D94A – 4,0 мкг/мл, с E540D – 8,0 мкг/мл, с заменами N538T, N538K, T539N – 2,0 мкг/мл.

Выявление устойчивости к инъекционным препаратам

Устойчивость к инъекционным препаратам, по данным культурального (Bactec MGIT 960) и молекулярно-генетических методов, была выявлена у 55 (59,8%) из 92 исследованных штаммов (таблица 2).

В 27 (49,1%) случаях резистентность МБТ к трем инъекционным препаратам (Km, Am, Cm) была обусловлена наиболее распространенной мутацией a1401g в гене *rrs*, в двух случаях в сочетании с заменами в промоторной области гена *eis* – a1401g/c12t и a1401g/g10a. Данная мутация определена по МУТ-зонду (mut1) в тесте MTBDR*sl* v.2.

С помощью этой же тест-системы у двух штаммов (3,6%) определено наличие мутации в аналогичной области гена *rrs* (1400-й кодон) по отсутствию зонда дикого типа 1 (Δwt1). Этот результат, предположительно, может указывать на устойчивость ко всем трем препаратам и действителен до получения результата культурального тестирования ЛЧ [15]. С помощью «ТБ-ТЕСТ» в этом регионе гена определена мутация c1402t, связанная с устойчивостью только к Km и Cm, что подтверждено результатом в системе Bactec MGIT 960 для этих изолятов [17, 18].

Устойчивость возбудителя только к Km установлена в 26 (47,3%) изолятах и была связана с мутациями в промоторной области гена *eis*, обнаруженными обеими тест-системами. В трех замена c14t выявлена тестом MTBDR*sl* v.2 по МУТ-зонду (mut1), остальные – по отсутствию зондов дикого типа 1 и 2 (Δwt1, Δwt2).

Расхождения в оценке ЛЧ между молекулярно-генетическими тест-системами и фенотипическим методом (Bactec MGIT 960) выявлены у 21 (22,8%) изолята (№№ 9-29). Дискордантность результатов отмечена как между молекулярными тестами (№ 15, 17–20, 29), так и между молекулярно-генетическим и бактериологическим исследованием ЛЧ к препаратам (№ 9,14,16, 21–28) (таблица 3). У 19 изолятов расхождения с результатами фенотипического тестирования ЛЧ к аминогликозидам были связаны с наличием или отсутствием мутаций в промоторной области гена *eis*.

Для микобактерий туберкулеза свойственна естественная (природная) устойчивость к аминогликозидам (Km и Am), обусловленная способностью возбудителя инактивировать препараты за счет их химической модификации с помощью фермента ацетилтрансферазы *eis* (кодируется геном *eis*) [27]. Мутации в этой части гена способствуют многократному увеличению его экспрессии, накоплению фермента и усилению эффекта ацетилирования и, как следствие, инактивации Km и Am. Для Km эффект инактивации выражен в 3 раза больше [15, 27], поэтому мутации в *eis* являются специфическими маркерами устойчивости к Km; тем не менее замену c14t связывают и с низкой степенью устойчивости к Am [12]. В нашем исследовании 3 изолята с этой заменой обладали устойчивостью к Km (таблица 2) и 4 (№№ 10–13) – к обоим аминогликозидам, что подтверждено значениями МИК Km и Am (таблица 3).

Другим механизмом проявления низкой степени устойчивости МБТ к Km является возникновение мутаций в 5′ нетранслируемой области (UTR) гена *whiB7*, который служит транскрипционным активатором гена *eis* [12, 20]. Результаты исследования показали, что резистентность изолятов №№ 23–28 к Km обусловлена мутациями в гене *whiB7* 5′ UTR, выявленными

Таблица 4. Ассоциация выявленных генетических семейств с лекарственной чувствительностью M. tuberculosis
Table 4. Association of identified genetic families with drug susceptibility of M. tuberculosis

Генотип Genotype	Количество изолятов с различной лекарственной чувствительностью Number of isolates with different drug susceptibility (*n*, %)				Всего Total (*n*, %)
	МЛУ * MDR *	МЛУ, устойчивость к фторхинолонам MDR, resistance to fluoroquinolones	МЛУ, устойчивость к инъекционным препаратам MDR, resistance to injectable drugs	ШЛУ* XDR *	
Beijing	-	10 (20,8)	12 (25,0)	26 (54,2)	48 (52,2)
Beijing, B0/W148	2 (7,7)	5 (19,2)	4 (15,4)	15 (57,7)	26 (28,2)
E-A	-	-	-	2 (100,0)	2 (2,2)
LAM	-	2 (16,6)	2 (16,6)	8 (66,8)	12 (13,0)
Ural	-	1 (33,3)	-	2 (66,7)	3 (3,2)
Haarlem	-	1 (100,0)	-	-	1 (1,2)
Всего • Total	2 (2,2)	19 (20,6)	18 (19,6)	53 (57,6)	92 (100,0)

* МЛУ – множественная лекарственная устойчивость, ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость.
* MDR – multidrug resistance, XDR – extensive drug resistance.

методом секвенирования. Также на результаты определения ЛЧ к аминогликозидам может влиять гетерорезистентность – одновременное наличие чувствительных и мутантных особей (изоляты №№ 16–22), косвенным подтверждением которой являются низкие значения МИК Km (1,2–2,5 мкг/мл), а также обнаружение обеих популяций в изоляте № 16 с помощью теста MTBDR*sl* v.2.

В изоляте № 9 обеими тест-системами мутаций в *rrs* и промоторной области гена *eis* не обнаружено, тогда как в системе Bactec MGIT 960 установлена устойчивость к Cm, значения МИК Km и Am приближены к критическим концентрациям, что соответствует чувствительности изолята к аминогликозидам. Несоответствие результатов молекулярно-генетического тестирования с фенотипической устойчивостью изолята к Cm, возможно, связано с другими генетическими механизмами резистентности, а именно мутациями в генах tlyA, gidB или 500 регионе *rrs* [7, 10, 28].

Расхождения в результатах молекулярно-генетического тестирования изолята № 29 (а также изолята № 8) связано со способом детекции мутаций в двух разных тест-системах. Тест-системой MTBDR*sl* v.2 определено присутствие мутации по отсутствию зонда дикого типа 1 (Δwt1), тогда как с помощью «ТБ-ТЕСТ» мутации в генах *rrs* и *eis* не были обнаружены, что подтверждено результатом оценки чувствительности к Am, Km и Cm в Bactec 960, а также значениями МИК Km и Am (0,6 мкг/мл и 0,5 мкг/мл соответственно), полученными методом микроразведений. Такой способ детекции мутаций, позволяя выявлять новые генетические детерминанты устойчивости, увеличивает вероятность обнаружения синонимичных, не приводящих к устойчивости замен. В таких случаях необходимо подтверждение результата с помощью бактериологического тестирования ЛЧ или секвенирования [4].

С помощью «ТБ-ТЕСТ» по анализу шести нуклеотидных полиморфизмов определена принадлежность 92 изолятов МБТ к наиболее распространенным на территории России генетическим линиям (семействам), см. таблицу 4.

Генотип Beijing являлся преобладающим; он определен в 74 (80,4%) изолятах, включая 26 (28,2%) из подсемейства *B0/W148*, характеризующегося высокой вирулентностью, трансмиссивностью и ассоциацией с ЛУ [13, 19]. В меньшей степени представлены семейства, принадлежащие к Европейско-Американскому типу – 18 изолятов (19,6%), из которых 12 (13,0%) относились к *LAM*, 3 (3,2%) к *Ural*, 2 (2,2%) – к Европейско-Американскому типу без определения семейства и 1 (1,2%) – к семейству *Haarlem*.

Заключение

Результаты тестирования лекарственной чувствительности культур *M. tuberculosis* к фторхинолонам и инъекционным препаратам молекулярно-генетическими тест-системами показали, что «ТБ-ТЕСТ» обладает наибольшей чувствительностью при определении генетических детерминант устойчивости к Ofx и Km. Результаты «ТБ-ТЕСТ» и MTBDR*sl* v.2 были сопоставимы при выявлении мутаций, ассоциированных с устойчивостью к Am и Cm. Главным преимуществом тест-системы «ТБ-ТЕСТ» является возможность одновременно определять генетические детерминанты устойчивости *M. tuberculosis* к основным антибактериальным препаратам и устанавливать принадлежность возбудителя к наиболее распространенным на территории Российской Федерации генетическим линиям (семействам). Информация, получаемая при широком скрининге культур чрезвычайно важна для эпидемиологического мониторинга – выявления очагов туберкулезной инфекции и путей ее распространения, особенно

трансмиссии мультирезистентных штаммов, как правило, связанных с семейством *Beijing*, а также разграничения случаев экзогенной инфекции и эндогенной реактивации туберкулеза, выявления лабораторной кросс-контаминации.

Литература

1 Мирзабеков А.Д. Биочипы в биологии и медицине XXI века // Вестник РАН. – 2003. – Т. 73. – № 5. – С. 412.

2. Приказ № 951 Минздрава России от 29 декабря 2014 г. «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения органов дыхания». – М., 2014. – 41 с.

3. Руководство по интерпретации и отчетности для лабораторного персонала и врачей. Тесты молекулярной гибридизации с типоспецифическими зондами для выявления лекарственно-устойчивого туберкулеза // www.stoptb.org/wg/gli

4. Ajileye A., Alvarez N., Merker M et al. Some synonymous and nonsynonymous gyrA mutations in Mycobacterium tuberculosis lead to systematic false-positive fluoroquinolone resistance results with the Hain GenoType MTBDRsl Assays // Antimicrob. Agents Chemother. – 2017. – Vol. 61, № 4. – e02169-16.

5. Aubry A., Veziris N., Cambau E. et al. Novel gyrAse mutations in quinolone-resistant and-hypersusceptible clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis: functional analysis of mutant enzymes // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – Vol. 50. – P. 104-112.

6. Brossier F., Guindo D., Pham A. et al. Performance of the new version (v. 2.0) of the GenoType MTBDRsl test for detection of resistance to second-line drugs in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis complex strains // J. Clin. Microbiol. – 2016. – Vol. 54. – P. 1573-1580.

7. Chakravorty S., Lee J.S., Cho E.J/ et al. Genotypic susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis isolates for amikacin and kanamycin resistance by use of a rapid sloppy molecular beacon-based assay identifies more cases of low-level drug resistance than phenotypic Lowenstein-Jensen testing // J. Clin. Microbiol. – 2015. – Vol. 53, № 1. – P. 43-51.

8. Coeck N., Jong B.C., Diels M. et al. Correlation of different phenotypic drug susceptibility testing methods for four fluoroquinolones in Mycobacterium tuberculosis // J. Antimicrob. Chemother. – 2016. – Vol. 71, № 5. – P. 1233-1240.

9. Gardee Y., Dreyer A.W., Koornhof H.J. et al. Evaluation of the GenoType MTBDRsl version 2.0 Assay for second-line drug resistance detection of Mycobacterium tuberculosis isolates in South Africa / J. Clin. Microbiol. – 2017. – Vol. 55. – P. 791-800.

10. Georghiou S.B., Magana M., Garfein R.S. et al. Evaluation of genetic mutations associated with Mycobacterium tuberculosis resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 3. – e33275.

11. Hillemann D., Rüsch-Gerdes S., Richter E. Feasibility of the Geno Type® MTBDRsl Assay for fluoroquinolone, amikacin/capreomycin, and ethambutol resistance testing of Mycobacterium tuberculosis strains and in clinical specimens // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47. – P. 1767-1772.

12. Kambli P., Ajbani K., Nikam C. et al. Correlating rrs and eis promoter mutations in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis with phenotypic susceptibility levels to the second-line injectables // Int. J. Mycobacteriol. – 2016. – Vol. 5, № 1. – P. 1-6.

13. Lasunskaia E., Ribeiro S.C., Manicheva O. et al. Emerging multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence // Microbes Infect. – 2010. – Vol. 12, № 6. – P. 467-475.

14. Ling D.I., Zwerling A.A., Pai M. Rapid diagnosis of drug-resistant TB using line probe assays: from evidence to policy // Expert Rev. Respir. Med. – 2008. – Vol. 2. – P. 583-588.

15. Magnet S., Blanchard J.S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance // Chem. Rev. – 2005. – Vol. 105, № 2. – P. 477-498.

16. Malik S., Willby M., Sikes D. et al. New insights into fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis: functional genetic analysis of gyrA and gyrB mutations // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 6. – e39754.

17. Maus C.E., Plikaytis B.B., Shinnick T.M. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in Mycobacterium tuberculosis // Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49, № 8. – P. 3192-3197.

18. Miotto P., Tessema B., Tagliani E. et al. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in Mycobacterium tuberculosis // Eur. Respir. J. – 2017. – Vol. 50, № 6. – 1701354.

19. Narvskaya O., Otten T., Limeschenko E. et al. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family in St. Petersburg, Russia // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 21, № 8. – P. 596-602.

20. Reeves A.Z., Campbell P.J., Sultana R. et al. Aminoglycoside cross-resistance in Mycobacterium tuberculosis due to mutations in the 5' untranslated region of whiB7 //Antimicrob. Agents Chemother. – 2013. – Vol. 57, № 4. – P. 1857-1865.

21. Schön T., Miotto P., Köser C.U. et al. Mycobacterium tuberculosis drug resistance testing: challenges, recent developments and perspectives // Clin. Microbiol. Infect. – 2017. – Vol. 23, № 3. – P. 154-160.

22. Siddiqi S. H., Rusch-Gerdes S., Alexander H. et al. MGIT Procedure Manual for BACTECTMMGITTM960 TB System (Also applicable for Manual MGIT) – 2006. [Электронный ресурс] https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf (Дата обращения 20.09.2022).

23. Takiff H., Salazar L., Guerrero C. et al. Cloning and nucleotide sequence of Mycobacterium tuberculosis gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations // Antimicrob. Agents Chemother. – 1994. – Vol. 38, № 4. – P. 773-780.

24. Wang J.-Y., Lee L.-N., Lai H.-C. et al. Fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure // J. Antimicrob. Chemother. – 2007. – Vol. 59, № 5. – P. 860-865.

25. World Health Organization. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line antituberculosis drugs. Policy guidance. – WHO.: Geneva, Switzerland, 2016. – 52 p.

26. World Health Organization. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs [Электронный ресурс]. – 2008. – Режим доступа: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70500/WHO_HTM_TB_2008.392_eng.pdf?sequence=1
27. Zaunbrecher M.A., Sikes Jr. R.D., Metchock B. et al. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106, № 47. – P. 20004-20009.
28. Zhang Z., Liu M., Wang Y. et al. Molecular and phenotypic characterization of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates resistant to kanamycin, amikacin, and capreomycin in China // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 33, № 11. – P. 1959-1966.
29. Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Antonova O.V. et al. Simultaneous drug resistance detection and genotyping of Mycobacterium tuberculosis using a low-density hydrogel microarray // J. Antimicrob. Chemother. – 2016. – Vol. 71, № 6. – P. 1520-1531.

Об авторах

Исакова Александра Ивановна *– врач клинической лабораторной диагностики Централизованной бактериологической лаборатории ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»*
Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел./факс 8 (495) 603-30-33
e-mail: isakovaaleks@gmail.com

Михайлова Юлия Дмитриевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук*
Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. 8 (495) 603-30-33
e-mail: juliaisaeva81@rambler.ru

Свириденко Мария Александровна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук*
Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел./факс 8 (495) 603-30-33
e-mail: dna77@mail.ru

Хахалина Анастасия Александровна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук*
Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел./факс 8 (495) 603-30-33
e-mail: nastec@bk.ru

Галкина Ксения Юрьевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук*
Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел./факс 8 (495) 603-30-33
e-mail: crazymare@mail.ru

Носова Елена Юрьевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор медицинских наук*
Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел./факс 8 (495) 603-30-33
e-mail: rna68@rambler.ru

Сафонова Светлана Григорьевна *– заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук*
Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел./факс 8 (499) 268-08-76
e-mail: safonova.s.g@inbox.ru