



Тест-система для фенотипического определения лекарственной чувствительности клинических изолятов микобактерий туберкулеза на основе применения микобактериофагов

М. Б. ЛАПЕНКОВА¹, Г. А. АРУСТАМОВА¹, Ю. С. АЛЯПКИНА¹, П. Н. ФИЛИПPOB², С. В. ЛАЗЕБНЫЙ², М. А. ВЛАДИМИРСКИЙ¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский медицинский центр физиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ, Москва, РФ

²ГБУЗ МО «Московский областной клинический противотуберкулезный диспансер», Москва, РФ

Проблема ускоренного фенотипического исследования лекарственной чувствительности клинических изолятов микобактерий туберкулеза (МБТ) остается актуальной.

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: разработка новой тест-системы для ускоренного фенотипического определения лекарственной чувствительности клинических изолятов МБТ к противотуберкулезным препаратам (ПТП) первого и второго рядов на основе применения литических микобактериофагов.

Материалы и методы. Культуры МБТ (108 клинических изолятов после первичного культивирования в системе Bactec MGIT) инкубировали 48 ч в присутствии ПТП, затем 48 ч после добавления литического микобактериофага D29. Последующая мультиплексная реакция полимеразной цепной реакции в режиме реального времени позволяла провести количественный анализ ДНК МБТ и ДНК микобактериофага. Лекарственная чувствительность исследуемого образца оценивалась по величине различий пороговых уровней флюоресценции, соответствующих количеству микобактериофага, между контрольной и опытной пробой. Одновременно лекарственная чувствительность/устойчивость всех клинических изолятов МБТ после рекультивирования анализировалась в системе Bactec MGIT, который был принят в качестве эталонного метода.

Результаты исследования. Определение на основе применения литического микобактериофага лекарственной чувствительности/устойчивости 108 изолятов МБТ к четырем препаратам первого ряда и 90 изолятов к шести препаратам второго ряда ПТП продемонстрировало высокий уровень совпадения с результатами в системе Bactec MGIT. Это позволило определить 99,5%-ную чувствительность и 100%-ную специфичность метода для 3 препаратов первого ряда в целом; несколько ниже для этамбутола (86 и 96,9% соответственно), а также чувствительность 94,83% при специфичности 98,85% – для препаратов второго ряда.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, лекарственная чувствительность, микобактериофаг, полимеразная цепная реакция

Для цитирования: Лапенкова М. Б., Арустамова Г. А., Аляпкина Ю. С., Филиппов П. Н., Лазебный С. В., Владимирский М. А. Тест-система для фенотипического определения лекарственной чувствительности клинических изолятов микобактерий туберкулеза на основе применения микобактериофагов // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2020. – Т. 98, № 8. – С. 14-22. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-8-14-22>

Mycobacteriophage-based test system for phenotypic drug sensitivity of clinical isolates of tuberculous mycobacteria

M. B. LAPENKOVA¹, G. A. ARUSTAMOVA¹, YU. S. ALYAPKINA¹, P. N. FILIPPOV², S. V. LAZEBNY², M. A. VLADIMIRSKIY¹

¹National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Moscow, Russia

²Moscow Regional Clinical TB Dispensary, Moscow, Russia

ABSTRACT

The issue of rapid phenotypic drug sensitivity testing of clinical isolates of tuberculous mycobacteria remains relevant.

The objective of the study is to develop a new test system for rapid phenotypic drug sensitivity testing of MTB clinical isolates based on lytic mycobacteriophages, capable of testing resistance to first and second line drugs.

Subjects and methods. Cultures of MTB (108 clinical isolates after primary culturing in Bactec MGIT) were incubated for 48 hours with addition of anti-tuberculosis drugs, then for 48 hours more after adding lytic mycobacteriophage D29. The subsequent multiplex reaction of the polymerase chain reaction in real time allowed performing quantitative analysis of MTB DNA and mycobacteriophage DNA. The drug sensitivity of the tested sample was assessed by ranges of the differences in fluorescence threshold levels corresponding to the amount of mycobacteriophages between the control and test sample. At the same time, the drug sensitivity/resistance of all MTB clinical isolates after repeated culture was tested by Bactec MGIT which was adopted as a reference method.

Results. Lytic mycobacteriophage-based drug sensitivity testing of 108 MTB isolated to four first line drugs and 90 isolates to six second line anti-tuberculosis drugs demonstrated a high level of concordance with the results of the Bactec MGIT system. It provided 99.5% sensitivity and 100% specificity of the method for 3 first-line drugs; it was slightly lower for ethambutol (86 and 96.9%, respectively), while for second line drugs, its sensitivity made 94.83% and specificity - 98.85%.

Key words: tuberculous mycobacteria, drug sensitivity, mycobacteriophage, polymerase chain reaction

For citations: Lapenkova M.B., Arustamova G.A., Alyapkina Yu.S., Filippov P.N., Lazebny S.V., Vladimirskiy M.A. Mycobacteriophage-based test system for phenotypic drug sensitivity of clinical isolates of tuberculous mycobacteria. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2020, Vol. 98, no. 8, P. 14-22. (In Russ.) <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-8-14-22>

Для корреспонденции:

Лапенкова Марина Борисовна
E-mail: manyshik@list.ru

Correspondence:

Marina B. Lapenkova
Email: manyshik@list.ru

В связи с распространением туберкулеза с лекарственной устойчивостью возбудителя в мире и в России быстрое определение лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза (МБТ) к широкому спектру противотуберкулезных препаратов (ПТП) продолжает оставаться актуальной проблемой фтизиатрии [12, 17].

За последние два десятилетия развитие получили молекулярно-генетические технологии, обеспечивающие ускоренный анализ ДНК-мутаций, связанных с возникновением лекарственной устойчивости, в клинических изолятах МБТ. В России значительное развитие и широкое внедрение в практику микробиологических лабораторий получили методы, основанные на мультиконкурентной аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Они обнаруживают мутации ДНК с помощью флюоресцентно меченых аллель-специфичных праймеров, содержащих специфические замены [1-3].

Другие молекулярно-генетические методы основаны на гибридизации ДНК МБТ с соответствующими ДНК-зондами, обнаруживающими мутации в формате специальных окрашиваемых полосок или биочипов. Это тест-системы Line Probe Assay (LPA), или системы биочипов с флюоресцентной детекцией [5, 7, 18]. Для МБТ установлены основные гены и мутации в них, определяющие устойчивость к ПТП, и они соответствуют фенотипической устойчивости к изониазиду, рифампицину, канамицину, капреомицину, фторхинолонам, в несколько меньшей степени к этамбутолу (79%), пиразинамиду (86%), моксифлоксацину (79%) [9].

Известны также автоматизированные молекулярные методы, в частности система GeneXpert, позволяющая определить наличие МБТ и их устойчивость к рифампицину. Известно, что эффективность этой системы снижается при исследованиях биологических образцов с низким содержанием МБТ [8, 20]. В последнее время развиваются технологии ДНК- и РНК-секвенирования, особенно методы полногеномного секвенирования, которые также претендуют на воплощение в клинико-лабораторной медицине, в том числе для применения в клинической практике [11, 16, 22, 23].

Несмотря на развитие новых молекулярно-генетических технологий, которые позволяют существенно сократить сроки определения лекарственной чувствительности МБТ, фенотипические методы определения лекарственной устойчивости остаются золотым стандартом. Это обусловлено необходимостью определения активности лекарственного агента по ингибированию метаболизма МБТ конкретного клинического изолята. Эффективность молекулярно-генетических методов определяется сопоставлением с фенотипическим методом. Это традиционный метод культивирования на среде Левенштейна – Йенсена, который требует после получения первичной культуры МБТ дополнительно

2-3 нед. для определения ее лекарственной чувствительности в отношении критических концентраций ПТП. Относительно ускоренным, наиболее распространенным и надежным фенотипическим методом определения лекарственной чувствительности МБТ в клинических изолятах является метод их рекультивирования в системе Vactec MGIT в присутствии критических концентраций ПТП. Исследование образцов занимает 8-10 дней, результаты оцениваются автоматически как чувствительный (S) или устойчивый (R) [13, 15]. Недостатками являются возможность получения ложноположительных результатов при контаминации культур нетуберкулезными микобактериями и высокая стоимость исследования (около 1,5 тыс. руб. на тестирование к одному препарату).

В России на основе традиционной технологии культуральных исследований была создана и в последние годы внедрена более экономичная фенотипическая лабораторная технология (набор реагентов «ТБ тест-набор») на основе применения так называемого нитрат-редуктазного метода, или метода Грисса. В основе метода лежит окрашивание культуры МБТ, полученной после роста микобактерий на среде Левенштейна – Йенсена, в красный цвет после добавления реактива Грисса. При сравнительных исследованиях лекарственной чувствительности 182 клинических изолятов МБТ указанного метода и системы Vactec MGIT к препаратам первого ряда эффективность метода составила для изониазида, рифампицина и стрептомицина в среднем 97,5%, а для этамбутола несколько меньше – 93,5%. Этот метод является весьма экономичным и может быть реализован в среднем в течение 10 дней, однако требует использования значительного количества микробных клеток МБТ, не менее чем 5×10^8 /мл, получаемых при предварительном культивировании на среде Левенштейна – Йенсена [4].

Применение микобактериофага D29 для фенотипического определения лекарственной чувствительности клинических изолятов МБТ ранее показано в двух работах американских авторов, в которых с использованием ПЦР был реализован принцип количественного определения ДНК микобактериофага для анализа его размножения в клетках МБТ [10, 19]. Принцип метода основан на том, что размножение микобактериофага угнетается соответственно ингибированию метаболизма МБТ ПТП. Однако исследования этих авторов не привели к созданию пригодной для практического применения тест-системы и соответствующего набора реагентов в связи с использованием сложной и многоступенчатой процедуры анализа. Предварительные данные о возможности применения микобактериофага при использовании упрощенного метода исследования были показаны нами [6].

Цель исследования: разработка новой тест-системы для ускоренного фенотипического определения лекарственной чувствительности клинических

изолятов МБТ к ПТП первого и второго рядов на основе применения литических микобактериофагов.

Материалы и методы

Микобактериальные культуры и микобактериофаг. В работе использовали штамм нетуберкулезной микобактерии *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 из коллекции ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи». Культуры 108 клинических изолятов МБТ получены из бактериологической лаборатории ГБУЗ Московской области «Московский областной клинический противотуберкулезный диспансер» после их первичного культивирования в жидкой питательной среде с использованием автоматизированной системы Bactec MGIT. Микобактериофаг D29 был любезно предоставлен профессором Graham Hatful из Питтсбургского университета США.

Культивирование и определение биологической активности микобактериофага D29

Для приготовления препарата микобактериофага D29 готовили суспензию *M. smegmatis* после ее роста на плотной питательной среде Миддлбрук 7Н10 в объеме 20 мл жидкой среды 7Н9 с 2 мМ CaCl₂ с оптической плотностью 1,0. Затем эту суспензию инкубировали в течение суток при 37°С, после чего добавляли 1 мл микобактериофага D29 с концентрацией 10⁸/мл бляшкообразующих единиц (БОЕ) и инкубировали 72 ч при 37°С. Затем суспензию центрифугировали при 3 тыс. об/мин 15 мин. Супернатант фильтровали через стерильный миллипоровый фильтр 0,22 мк. Титр микобактериофага определяли при десятикратном титровании на чашках с *M. smegmatis*. Биологическую активность фага определяли, умножая число получаемых плаков (зоны лизиса) на чашках с газоном *M. smegmatis* на соответствующее разведение.

Противотуберкулезные препараты. В качестве ПТП использовали стрептомицин сульфат (STR), изониазид (INH), рифампицин (RIF), этамбутол гидрохлорид (EMB), амикацин (AMK), моксифлоксацин (MXF), левофлоксацин (LEF), этионамид (ETH), канамицин сульфат (KAN), капреомицин сульфат (CAP). STR, INH, EMB, AMK, MXF, LEF, KAN растворяли в стерильной дистиллированной воде. RIF и ETH растворяли в этиловом спирте 95%. Полученные рабочие растворы разливали в криопробирки и хранили при минус 70°С не более 6 мес.

Культивирование образцов с критическими концентрациями ПТП и микобактериофагом D29. Выделение ДНК

Культуры клинических изолятов МБТ, полученные в результате первичного культивирования в системе MGIT Bactec, вносили по 200 мкл в лунки 24-луночного культурального планшета. Количество используемых лунок определялось как (N+1), где N – количество проверяемых антибактериальных препаратов, 1 – контрольная лунка. В каждую

лунку, содержащую 200 мкл культуры клинического штамма МБТ, добавляли 800 мкл жидкой питательной среды Миддлбрук 7Н9, содержащей 10% р-стой добавки OADC и 1 мМ хлорида кальция. Далее в каждую лунку, кроме контрольной, вносили 10 мкл субстанции одного из проверяемых антибактериальных препаратов, содержащей критическую концентрацию этого препарата. После этого культуры МБТ в планшете инкубировали в течение 48 ч, а затем во все лунки, включая контрольную, вносили по 50 мкл микобактериофага D29 с активностью 10⁸ БОЕ/мл и продолжали инкубирование еще 48 ч.

На 5-е сут образцы переносили в микропробирки типа «эппендорф» объемом 1,5 мл, центрифугировали 10 мин при 13 000 об/мин. Затем аккуратно удаляли супернатант и к осадку добавляли по 200 мкл деионизированной воды, перемешивали содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе и инкубировали в термостате при 95°С в течение 30 мин. После этого раствор ДНК использовали для исследования с помощью ПЦР-РВ.

Количественный анализ микобактериофага D29 и МБТ методом ПЦР-РВ

Для обнаружения микобактериофага D29 использовали специфический фрагмент из последовательности полного генома микобактериофага D29. Из этой последовательности были выбраны праймеры: D29-F (agc-cga-tca-gaa-gca-cgg-gc); D29-R (agc-ggc-tct-tag-gag-ggg-cc) и ДНК зонд Pb_D29_up_FAM [(FAM)-ag-cca-cga-act-cgc-gac-cca-cgg-(RTQ1)]. Для обнаружения и количественного анализа МБТ использовали специфические праймеры и ДНК-зонд из последовательности фрагмента однокопийного гена regX3 МБТ. Для проведения ПЦР-РВ использовали приборы CFX96 («Bio-Rad», США) и АНК-32 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия). Реакционная ПЦР-смесь объемом 25 мкл включала: разбавитель (в составе: 10х ПЦР-буфер (KCl, 500 мМ; Трис-НСl, рН 8,8); 25 мМ MgCl₂; 50%-ный глицерол; вода для ПЦР), эквимольную смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) по 250 мкМ каждого, флюоресцентный зонд Pb_D29_up_FAM в количестве 3 пмоль, праймеры D29-F и D29-R в количестве по 5 пмоль каждого праймера, смесь праймеров и зонда СПЗ «regX_MTB_ROX» (ООО «Синтол», Россия), 2,5 ед. Таq-полимеразы (ООО «Синтол», Россия) и 5 мкл образца ДНК. Амплификацию проводили по программе: 2 мин – 95°С; 40 циклов: 15 с – 95°С, 40 с – 63°С.

Результаты исследования

Определение лекарственной чувствительности МБТ к ПТП с помощью микобактериофага D29 представляет собой фенотипический метод, в котором размножение микобактериофагов коррелирует с ингибированием метаболизма МБТ ПТП, уровень которого определяется при количественном

анализе ДНК микобактериофага с использованием ПЦР-РВ.

Культуры клинических изолятов МБТ, полученные после первичного культивирования в жидкой питательной среде с применением автоматизированной системы Vastec MGIT, определенные как «положительные» и идентифицированные как МБТ, культивируют в жидкой питательной среде в присутствии ПТП в критических концентрациях с последующим добавлением микобактериофага D29. Так как литический микобактериофаг D29 размножается в микобактериях только при их активном метаболизме, то при сохранении чувствительности МБТ к определенному ПТП метаболизм их ингибируется, соответственно, бактериофаг не размножается. И, наоборот, при устойчивости МБТ к определенному ПТП их метаболизм остается активным и бактериофаг размножается.

Технология метода, ранее описанная в работах S. Pholwat et al. 2012 [19] и S. Foongladda et al. [10], нами модифицирована и усовершенствована. Мы сократили количество необходимых процедур (этапы концентрирования культуры МБТ) и изменили формат проведения исследований (24-луночный планшет).

Обнаружение специфических фрагментов нуклеиновых кислот микобактериофага D29 и МБТ проводили методом мультиплексной ПЦР-РВ.

В разработанной мультиплексной ПЦР-РВ-системе используются две независимые реакции, которые проводятся в одной пробирке одновременно.

Первая реакция (по каналу FAM) позволяет обнаружить специфический фрагмент ДНК микобактериофага D29. Наличие положительной динамики изменения флуоресценции по отношению к отрицательному контролю для этой реакции свидетельствует о наличии в образце ДНК микобактериофага D29. Вторая реакция (по каналу ROX) позволяет обнаружить специфический фрагмент ДНК гена *regX*, представленного в геноме МБТ одной копией. Наличие положительной динамики изменения флуоресценции по отношению к отрицательному контролю для этой реакции свидетельствует о наличии в образце ДНК МБТ.

Так как в качестве анализируемого образца может быть любой образец культуры клинического изолята МБТ, то вторая реакция является генетическим маркером подтверждения присутствия МБТ и играет роль внутреннего контроля, контролируя возможное ингибирование ПЦР-РВ-реакции в целом.

Чувствительность клинических изолятов МБТ определяли путем сравнения значений пороговых циклов флуоресценции в ПЦР-РВ, соответствующих количеству микобактериофага D29 в образцах, между контрольной пробой (контролем роста культуры без ПТП) и опытной – с использованием критической концентрации ПТП. Образец интерпретировался как чувствительный, если разница

в значениях пороговых циклов между контролем без ПТП (КР) и исследуемым образцом в присутствии конкретного ПТП составляла 3 цикла и более: $\Delta Ct = |Ct_{\text{ПТП}} - Ct_{\text{КР}}| \geq 3$, образец интерпретировался как устойчивый, если $\Delta Ct = |Ct_{\text{ПТП}} - Ct_{\text{КР}}| < 3$.

Для исключения недостоверных результатов в каждый опыт обязательно включали контроль размножения фага, т. е. начальное количество фага, добавляемое к культуре МБТ. Результаты определения чувствительности/устойчивости МБТ считали достоверными только при получении разницы в пороговых циклах ПЦР-РВ (ΔCt) между контролем фага и контрольной пробой образца (КР – контроль роста культуры без ПТП) не менее 3,0-3,5 цикла. Такая разница обусловлена формулой расчета количества продукта, получаемого при ПЦР-РВ-амплификации ($Q_n = Q_0 \times (1 + E)^n$, где Q_0 – исходное количество ДНК-матрицы, E – эффективность амплификации, n – число циклов амплификации) и аналитическими характеристиками ПЦР-РВ-системы для количественного анализа фага и МБТ. Эффективность амплификации всех реакций используемой мультиплексной системы равна 0,90-1 (90-100%), что соответствует увеличению продукта за один цикл амплификации в 1,9-2,0 раза. Следовательно, разница между пороговыми циклами для образцов в 3,5 цикла ($\Delta Ct = 3,5$) будет соответствовать разнице в количестве исходной ДНК в 10 раз, то есть свидетельствовать о размножении фага в контрольной пробе образца.

Примеры интерпретации результатов представлены на рис. 1, 2, 3.

В табл. 1 представлены цифровые данные о тестировании трех культур МБТ к 8 ПТП.

Для штамма H37Rv (рис. 1) разница в пороговых циклах ПЦР-РВ между контролем без антибиотика и пробами с ПТП составляет более 10 циклов ($Ct > 10$) для любого ПТП. Контроль размножения фага, т. е. разница между пороговым циклом контроля фага ($Ct_{\text{КФ}}$), соответствующего количеству фага, добавляемому к образцу, и пороговым циклом контроля культуры без ПТП ($Ct_{\text{КР}}$) составляет 11,88 цикла ($Ct_{\text{фага}} = Ct_{\text{КФ}} - Ct_{\text{КР}} = 30,07 - 18,19 = 11,88$), что свидетельствует об увеличении количества фага в контрольной пробе без ПТП более чем в 10^3 раз. При этом количество микобактериофага D29 в образцах с ПТП не изменилось относительно начального количества фага, добавленного к образцу ($Ct_{\text{фага}} \approx Ct_{\text{ПТП}}$). Штамм H37Rv является эталоном чувствительной культуры.

В противоположность штамму H37Rv культура МБТ № 51 (рис. 2) устойчива ко всем анализируемым ПТП. Разница в пороговых циклах ПЦР-РВ ΔCt составляет от 0,49 до 1,17 при значении контроля размножения фага ($\Delta Ct_{\text{фага}}$), равном 9,33 цикла.

Культура МБТ № 25 (рис. 3) является культурой с множественной лекарственной устойчивостью, устойчива к 7 тестируемым ПТП ($\Delta Ct = 0,18 \div 2,21$) и чувствительна лишь к этамбутолу ($\Delta Ct = 3,73$).

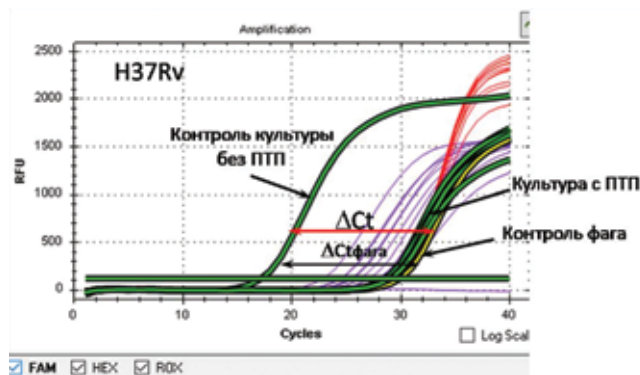


Рис. 1. Результаты анализа музейной культуры МБТ H37Rv – чувствительна ко всем тестируемым ПТП

Fig. 1. The results of testing the museum culture of MTB H37Rv – sensitive to all tested anti-tuberculosis

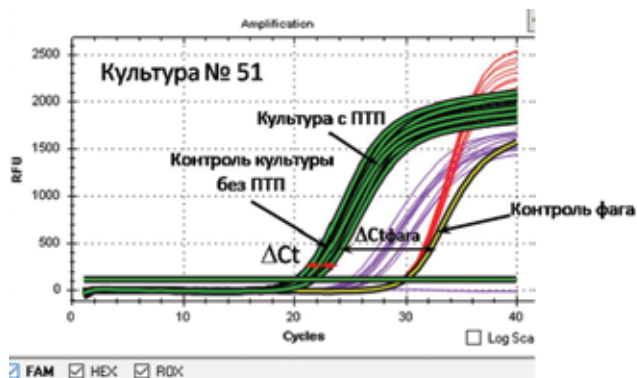


Рис. 2. Результаты анализа культуры МБТ № 51 – устойчива ко всем тестируемым ПТП

Fig. 2. The results of testing MTB culture no. 51 – sensitive to all tested anti-tuberculosis

Критериями достоверности полученных результатов являются два контроля: контроль образца без ПТП и контроль размножения фага. Пороговый цикл для контрольной пробы без ПТП должен иметь либо наименьшее значение по сравнению с пробами с ПТП, либо значение не более чем на 3 цикла больше, чем наименьшее значение порогового цикла пробы с ПТП: $Ct_{ПТП} + 3 < Ct_{КР} < Ct_{ПТП}$. Получение значения порогового цикла для контро-

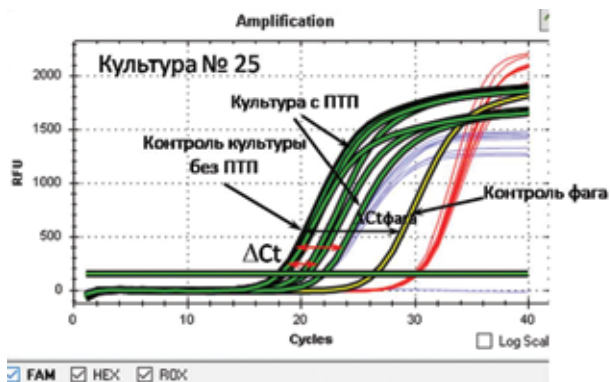


Рис. 3. Результаты анализа культуры МБТ № 25 – устойчива к нескольким тестируемым ПТП, сохранена чувствительность к одному из тестируемых ПТП

Fig. 3. The results of testing MTB culture no. 25 – resistant to several anti-tuberculosis drugs; sensitive to 1 anti-tuberculosis drug

ля без ПТП $Ct_{КР} > Ct_{ПТП} + 3$ будет свидетельствовать о некорректном анализе контрольной пробы без ПТП, и результаты по всем ПТП для этого образца признаются недостоверными. Контроль размножения фага, т. е. разница между пороговым циклом контроля фага $Ct_{КФ}$, соответствующего количеству фага, добавляемому к образцу, и пороговым циклом контроля пробы без ПТП должен составлять более 3 циклов ($\Delta Ct_{фага} = Ct_{КФ} - Ct_{КР} > 3$), что свидетельствует об увеличении количества фага в контрольной пробе без ПТП не менее чем в 10 раз.

Разработанная технология на основе применения микобактериофагов в нашем исследовании получила рабочее название «ТБ-фаг-ЛЧ». Далее было проведено сравнение результатов определения лекарственной чувствительности клинических изолятов МБТ, проведенных с помощью «ТБ-фаг-ЛЧ» и в автоматизированной системе Vactec MGIT, рассматриваемой в качестве эталонного метода сравнения [12, 14]. Совпадения оценки лекарственной чувствительности МБТ к ПТП методом «ТБ-фаг-ЛЧ» и в системе Vactec MGIT признавались «истинным» результатом: истинно-устойчивые (ИУ) или истинно-чувствительные (ИЧ). При несовпадении с данными Vactec MGIT фиксировались ложно-устойчивые (ЛУ) и ложно-чувствительные (ЛЧ)

Таблица 1. Результаты анализа методом ускоренного определения лекарственной чувствительности МБТ к 8 ПТП с помощью микобактериофага D29

Table 1. Results of rapid drug sensitivity testing of MTB to 8 anti-tuberculosis drugs using mycobacteriophage D29

№ культуры	Контр. фага, $Ct_{КФ}$	Контр. без ПТП, $Ct_{КР}$	$\Delta Ct_{фага}$	$\Delta Ct = Ct_{ПТП} - Ct_{КР} $							
				STR	INH	RIF	EMB	AMK	MXF	LEF	KAN
H37Rv	30,07	18,19	11,88	10,54	10,90	10,86	10,46	10,48	10,81	10,80	10,10
51	30,00	20,67	9,33	0,54	0,49	0,24	1,17	0,44	0,56	0,91	0,04
25	26,32	18,17	8,15	0,30	0,08	0,24	3,73	0,06	2,21	0,18	1,78

Примечание: здесь и в табл. 2 – жирным шрифтом выделены данные, свидетельствующие о наличии лекарственной устойчивости МБТ к ПТП

результаты метода «ТБ-фаг-ЛЧ». Для «ТБ-фаг-ЛЧ» определены «чувствительность» и «специфичность» с помощью следующих формул:

$$\text{Чувствительность} = \frac{ИУ}{ИУ+ЛЧ} \times 100\%$$

обозначает частоту (%) определения тестируемым методом лекарственной устойчивости среди лекарственно-устойчивых штаммов МБТ (по данным эталона);

$$\text{Специфичность} = \frac{ИЧ}{ИЧ+ЛУ} \times 100\%$$

обозначает частоту (%) отсутствия определения тестируемым методом лекарственной устойчивости среди лекарственно-чувствительных штаммов МБТ (по данным эталона).

Интервалы чувствительности и специфичности (с доверительной вероятностью 95%) определения лекарственной чувствительности МБТ с помощью «ТБ-фаг-ЛЧ» для образцов культур, истинно лекарственно-устойчивых и истинно лекарственно-чувствительных, определяли по методу Клоппера и Пирсона [7].

Всего была изучена лекарственная чувствительность: 108 клинических изолятов к стрептомицину, изониазиду, рифампицину и этамбутолу; 90 клинических изолятов к амикацину, моксифлоксацину, левофлоксацину и канамицину;

56 клинических изолятов к этионамиду и капреомицину (табл. 2).

Как видно из табл. 2, определение лекарственной чувствительности к изониазиду, рифампицину, левофлоксацину, этионамиду и капреомицину новым методом «ТБ-фаг-ЛЧ» продемонстрировало 100%-ную чувствительность при 100%-ной специфичности. Несколько ниже чувствительность к стрептомицину – 98,5% при 100%-ной специфичности и моксифлоксацину – 94,1% при 98,6%-ной специфичности. Самые низкие показатели были показаны для амикацина – чувствительность 88,2% при специфичности 94,5% и этамбутола – чувствительность 86% при специфичности 96,9%, что соответствует таковым при различных молекулярно-генетических методах [3, 14].

Важным показателем для клинического использования метода является длительность исследования до получения результата. При использовании «ТБ-фаг-ЛЧ» данные о лекарственной чувствительности клинического изолята МБТ могут быть получены через 5 сут по сравнению с 8-10 сут при определении лекарственной чувствительности изолята МБТ с помощью Vactec MGIT.

Методы полногеномного секвенирования для быстрого определения лекарственной чувствительности клинических изолятов МБТ к ПТП, анализируемые в сравнении с Vactec MGIT, позволили

Таблица 2. Результаты сравнительных исследований клинических изолятов МБТ с помощью тест-системы «ТБ-фаг-ЛЧ» и автоматизированной системы Vactec MGIT

Table 2. The results of comparative tests of MTB clinical isolates using the test system of TB-fag-LC and Vactec MGIT

ПТП	Критические концентрации, мкг/мл	Кол-во штаммов	Рез-ты Vactec MGIT	Кол-во образцов	Результаты «ТБ-фаг-ЛЧ»		Характеристики «ТБ-фаг-ЛЧ» (%)																																																																																																																																																																	
					S	R	Чувствительность	Интервал чувствительности с вероятностью 95%	Специфичность	Интервал специфичности с вероятностью 95%																																																																																																																																																														
Стрептомицин	1	108	S	43	43	(ИЧ)	0	(ЛУ)	98,5	91,7-100	100	91,8-100																																																																																																																																																												
			R	65	1	(ЛЧ)	64	(ИУ)					Изониазид	0,1	S	50	50	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	93,8-100	100	92,9-100	R	58	0	(ЛЧ)	58	(ИУ)	Рифампицин	1	S	59	59	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	92,7-100	100	93,9-100	R	49	0	(ЛЧ)	49	(ИУ)	Этамбутол	5	S	65	63	(ИЧ)	2	(ЛУ)	86	72,1-94,7	96,9	89,3-99,6	R	43	6	(ЛЧ)	37	(ИУ)	Амикацин	1	S	73	69	(ИЧ)	4	(ЛУ)	88,2	63,6-98,5	94,5	86,6-98,5	R	17	2	(ЛЧ)	15	(ИУ)	Моксифлоксацин	1	S	73	72	(ИЧ)	1	(ЛУ)	94,1	71,3-99,9	98,6	92,6-100	R	17	1	(ЛЧ)	16	(ИУ)	Левофлоксацин	1,5	S	69	69	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	83,9-100	100	94,8-100	R	21	0	(ЛЧ)	21	(ИУ)	Канамицин	2,5	S	60	60	(ИЧ)	0	(ЛУ)	86,7	69,3-96,2	100	94-100	R	30	4	(ЛЧ)	26	(ИУ)	Этионамид	5	S	31	31	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	86,3-100	100	88,8-100	R	25	0	(ЛЧ)	25	(ИУ)	Капреомицин	2,5	S	49	49	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	59-100	100	92,7-100
Изониазид	0,1		S	50	50	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	93,8-100	100	92,9-100																																																																																																																																																												
			R	58	0	(ЛЧ)	58	(ИУ)					Рифампицин	1	S	59	59	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	92,7-100	100	93,9-100	R	49	0	(ЛЧ)	49	(ИУ)	Этамбутол	5	S	65	63	(ИЧ)	2	(ЛУ)	86	72,1-94,7	96,9	89,3-99,6	R	43	6	(ЛЧ)	37	(ИУ)	Амикацин	1	S	73	69	(ИЧ)	4	(ЛУ)	88,2	63,6-98,5	94,5	86,6-98,5	R	17	2	(ЛЧ)	15	(ИУ)	Моксифлоксацин	1	S	73	72	(ИЧ)	1	(ЛУ)	94,1	71,3-99,9	98,6	92,6-100	R	17	1	(ЛЧ)	16	(ИУ)	Левофлоксацин	1,5	S	69	69	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	83,9-100	100	94,8-100	R	21	0	(ЛЧ)	21	(ИУ)	Канамицин	2,5	S	60	60	(ИЧ)	0	(ЛУ)	86,7	69,3-96,2	100	94-100	R	30	4	(ЛЧ)	26	(ИУ)	Этионамид	5	S	31	31	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	86,3-100	100	88,8-100	R	25	0	(ЛЧ)	25	(ИУ)	Капреомицин	2,5	S	49	49	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	59-100	100	92,7-100	R	7	0	(ЛЧ)	7	(ИУ)												
Рифампицин	1		S	59	59	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	92,7-100	100	93,9-100																																																																																																																																																												
			R	49	0	(ЛЧ)	49	(ИУ)					Этамбутол	5	S	65	63	(ИЧ)	2	(ЛУ)	86	72,1-94,7	96,9	89,3-99,6	R	43	6	(ЛЧ)	37	(ИУ)	Амикацин	1	S	73	69	(ИЧ)	4	(ЛУ)	88,2	63,6-98,5	94,5	86,6-98,5	R	17	2	(ЛЧ)	15	(ИУ)	Моксифлоксацин	1	S	73	72	(ИЧ)	1	(ЛУ)	94,1	71,3-99,9	98,6	92,6-100	R	17	1	(ЛЧ)	16	(ИУ)	Левофлоксацин	1,5	S	69	69	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	83,9-100	100	94,8-100	R	21	0	(ЛЧ)	21	(ИУ)	Канамицин	2,5	S	60	60	(ИЧ)	0	(ЛУ)	86,7	69,3-96,2	100	94-100	R	30	4	(ЛЧ)	26	(ИУ)	Этионамид	5	S	31	31	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	86,3-100	100	88,8-100	R	25	0	(ЛЧ)	25	(ИУ)	Капреомицин	2,5	S	49	49	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	59-100	100	92,7-100	R	7	0	(ЛЧ)	7	(ИУ)																														
Этамбутол	5		S	65	63	(ИЧ)	2	(ЛУ)	86	72,1-94,7	96,9	89,3-99,6																																																																																																																																																												
			R	43	6	(ЛЧ)	37	(ИУ)					Амикацин	1	S	73	69	(ИЧ)	4	(ЛУ)	88,2	63,6-98,5	94,5	86,6-98,5	R	17	2	(ЛЧ)	15	(ИУ)	Моксифлоксацин	1	S	73	72	(ИЧ)	1	(ЛУ)	94,1	71,3-99,9	98,6	92,6-100	R	17	1	(ЛЧ)	16	(ИУ)	Левофлоксацин	1,5	S	69	69	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	83,9-100	100	94,8-100	R	21	0	(ЛЧ)	21	(ИУ)	Канамицин	2,5	S	60	60	(ИЧ)	0	(ЛУ)	86,7	69,3-96,2	100	94-100	R	30	4	(ЛЧ)	26	(ИУ)	Этионамид	5	S	31	31	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	86,3-100	100	88,8-100	R	25	0	(ЛЧ)	25	(ИУ)	Капреомицин	2,5	S	49	49	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	59-100	100	92,7-100	R	7	0	(ЛЧ)	7	(ИУ)																																																
Амикацин	1		S	73	69	(ИЧ)	4	(ЛУ)	88,2	63,6-98,5	94,5	86,6-98,5																																																																																																																																																												
			R	17	2	(ЛЧ)	15	(ИУ)					Моксифлоксацин	1	S	73	72	(ИЧ)	1	(ЛУ)	94,1	71,3-99,9	98,6	92,6-100	R	17	1	(ЛЧ)	16	(ИУ)	Левофлоксацин	1,5	S	69	69	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	83,9-100	100	94,8-100	R	21	0	(ЛЧ)	21	(ИУ)	Канамицин	2,5	S	60	60	(ИЧ)	0	(ЛУ)	86,7	69,3-96,2	100	94-100	R	30	4	(ЛЧ)	26	(ИУ)	Этионамид	5	S	31	31	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	86,3-100	100	88,8-100	R	25	0	(ЛЧ)	25	(ИУ)	Капреомицин	2,5	S	49	49	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	59-100	100	92,7-100	R	7	0	(ЛЧ)	7	(ИУ)																																																																		
Моксифлоксацин	1	S	73	72	(ИЧ)	1	(ЛУ)	94,1	71,3-99,9	98,6	92,6-100																																																																																																																																																													
		R	17	1	(ЛЧ)	16	(ИУ)					Левофлоксацин	1,5	S	69	69	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	83,9-100	100	94,8-100	R	21	0	(ЛЧ)	21	(ИУ)	Канамицин	2,5	S	60	60	(ИЧ)	0	(ЛУ)	86,7	69,3-96,2	100	94-100	R	30	4	(ЛЧ)	26	(ИУ)	Этионамид	5	S	31	31	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	86,3-100	100	88,8-100	R	25	0	(ЛЧ)	25	(ИУ)	Капреомицин	2,5	S	49	49	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	59-100	100	92,7-100	R	7	0	(ЛЧ)	7	(ИУ)																																																																																					
Левофлоксацин	1,5	S	69	69	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	83,9-100	100	94,8-100																																																																																																																																																													
		R	21	0	(ЛЧ)	21	(ИУ)					Канамицин	2,5	S	60	60	(ИЧ)	0	(ЛУ)	86,7	69,3-96,2	100	94-100	R	30	4	(ЛЧ)	26	(ИУ)	Этионамид	5	S	31	31	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	86,3-100	100	88,8-100	R	25	0	(ЛЧ)	25	(ИУ)	Капреомицин	2,5	S	49	49	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	59-100	100	92,7-100	R	7	0	(ЛЧ)	7	(ИУ)																																																																																																							
Канамицин	2,5	S	60	60	(ИЧ)	0	(ЛУ)	86,7	69,3-96,2	100	94-100																																																																																																																																																													
		R	30	4	(ЛЧ)	26	(ИУ)					Этионамид	5	S	31	31	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	86,3-100	100	88,8-100	R	25	0	(ЛЧ)	25	(ИУ)	Капреомицин	2,5	S	49	49	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	59-100	100	92,7-100	R	7	0	(ЛЧ)	7	(ИУ)																																																																																																																									
Этионамид	5	S	31	31	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	86,3-100	100	88,8-100																																																																																																																																																													
		R	25	0	(ЛЧ)	25	(ИУ)					Капреомицин	2,5	S	49	49	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	59-100	100	92,7-100	R	7	0	(ЛЧ)	7	(ИУ)																																																																																																																																											
Капреомицин	2,5	S	49	49	(ИЧ)	0	(ЛУ)	100	59-100	100	92,7-100																																																																																																																																																													
		R	7	0	(ЛЧ)	7	(ИУ)																																																																																																																																																																	

Заключение

определить их прогноз чувствительности к изониазиду, рифампицину, амикацину, канамицину, стрептомицину в пределах 94-100% при специфичности не менее 99%. Однако прогноз чувствительности для этамбутола составил 62,6%, капреомицина – 83%, моксифлоксацина – 81% [14, 21]. При этом, по мнению экспертов, технологии полногеномного секвенирования могут проводиться только в крупных централизованных лабораториях и стоимость каждого исследования может быть в 5 раз и более выше по сравнению с фенотипическими методами.

Разработанная нами тест-система «ТБ-фаг-ЛЧ», сочетающая фенотипический и молекулярно-генетический методы, по эффективности не уступает основным используемым в настоящее время методам определения лекарственной чувствительности МБТ. Предварительные расчеты показали, что себестоимость определения чувствительности к одному препарату может быть в 8-10 раз ниже таковой при использовании системы Bactec MGIT.

На основе проведенных исследований с применением литического микобактериофага D29 и мультиплексного ПЦР-анализа разработан усовершенствованный фенотипический метод (тест-система) ускоренного до 5 дней определения чувствительности к ПТП клинических изолятов МБТ, полученных при первичном культивировании в системе Bactec MGIT.

Сравнительные исследования нового фенотипического метода определения лекарственной чувствительности с эталонным методом (Bactec MGIT) определили его чувствительность для разных препаратов на уровне 86-100% при специфичности 94,5-100%.

Предварительные расчеты себестоимости соответствующего перспективного набора реагентов предполагают его высокую экономическую эффективность.

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

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

ЛИТЕРАТУРА

REFERENCES

1. Аляпкина Ю. С., Алексеев Я. И., Варламов Д. А., Домотенко Л. В., Шипина Л. К., Владимирский М. А. Разработка технологии ПЦР в реальном времени для экспресс-определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам резервного ряда: фторхинолонам, амикацину и капреомицину // Туб. и болезни легких. – 2014. – № 12. – С. 69-75.
2. Аляпкина Ю. С., Ларионова Е. Е., Смирнова Т. Г., Алексеев Я. И., Черноусова Л. Н., Владимирский М. А. Изучение спектра и частоты встречаемости мутаций гена *embB* микобактерий туберкулезного комплекса, ассоциируемых с устойчивостью к этамбутолу, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени // Туб. и болезни легких – 2017. – Т. 95, № 11. – С. 27-35. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-11-27-35.
3. Владимирский М. А., Аляпкина Ю. С., Варламов Д. А. и др. Применение метода ПЦР в реальном времени для определения и контроля за распространением лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза // Пробл. туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 4. – С. 38-44.
4. Домотенко Л. В., Морозова Т. П., Шемьякин И. Г., Шелепин А. П. Опыт использования ТБ тест набора для ускоренного определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 2. – С. 122-130.
5. Михайлович В. М., Лапа С. А., Грядун Д. А., Владимирский М. А., Шипина Л. К. и др. Использование методов гибридизации и ПЦР на специализированном ТБ-микрочипе для обнаружения рифампицин-резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2001. – Т. 131, № 1. – С. 112-117.
6. Смирнова Н. С., Шипина Л. К., Лапенкова М. Б., Владимирский М. А. Применение литического микобактериофага D29 для разработки ускоренного фенотипического метода определения чувствительности микобактерий туберкулеза к широкому спектру противотуберкулезных препаратов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. – Т. 62, № 12. – С. 757-763.
7. Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper C., Pearson E. (1934). The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial // *Biometrika*. – Vol. 26, № 4. – P. 404-413. doi:10.2307/2331986.
8. Denking C. M., Schumacher S. G., Boehme C. C. et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis // *Eur. Respir. J.* – 2014. – Vol. 44. – P. 435-446.
9. Dicks Kr., Stout J. Molecular diagnostics for *Mycobacterium tuberculosis* infection // *Ann. Rev. Med.* – 2019. – Vol. 70. – P. 77-90.
1. Alyapkina Yu.S., Alekseev Ya.I., Varlamov D.A., Domotenko L.V., Shipina L.K., Vladimirskiy M.A. Development of real-time PCR technology for rapid drug susceptibility testing of tuberculous mycobacteria to second line drugs: fluoroquinolones, amikacin, capreomycin. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2014, no. 12, pp. 69-75. (In Russ.)
2. Alyapkina Yu.S., Larionova E.E., Smirnova T.G., Alekseev Ya.I., Chernousova L.N., Vladimirskiy M.A. Investigation of ranges and frequency of mutations in the *embB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* associated with resistance to ethambutol using real-time polymerase chain reaction. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, vol. 95, no. 11, pp. 27-35. (In Russ.) doi: 10.21292/2075-1230-2017-95-11-27-35.
3. Vladimirskiy M.A., Alyapkina Yu.S., Varlamov D.A. et al. Use of real-time PCR for detection and monitoring of transmission of drug resistant strains of tuberculous mycobacteria. *Probl. Tuberkuleza i Bolezni Legkikh*, 2008, no. 4, pp. 38-44. (In Russ.)
4. Domotenko L.V., Morozova T.P., Shemyakin I.G., Shelepin A.P. Experience of the use of TB test kit for rapid drug susceptibility testing of *M. tuberculosis*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 122-130. (In Russ.)
5. Mikhaylovich V.M., Lapa S.A., Gryadunov D.A., Vladimirskiy M.A., Shipina L.K. et al. Use of hybridization and PCR techniques on the special TB microchip for detection of Rifampicin resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Byulleten Eksperimentalnoy Biologii i Meditsiny*, 2001, vol. 131, no. 1, pp. 112-117. (In Russ.)
6. Smirnova N.S., Shipina L.K., Lapenkova M.B., Vladimirskiy M.A. The use of lytic mycobacteriophage D29 to develop the rapid phenotypic method to test sensitivity of tuberculous mycobacteria to a wide range of anti-tuberculosis drugs. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, 2017, vol. 62, no. 12, pp. 757-763. (In Russ.)
7. Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper C., Pearson E. (1934). The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika*, vol. 26, no. 4, pp. 404-413. doi:10.2307/2331986.
8. Denking C.M., Schumacher S.G., Boehme C.C. et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.*, 2014, vol. 44, pp. 435-446.
9. Dicks Kr., Stout J. Molecular diagnostics for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Ann. Rev. Med.*, 2019, vol. 70, pp. 77-90.

10. Foonglada S., Klayut W., Chinli R., Pholwat S. et al. Use of mycobacteriophage quantitative PCR on MGIT broths for a rapid tuberculosis antibiogram // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 52, № 5. – P. 1523-1528.
11. Genestet C., Hodille E., Berland J. L. et al. Whole-genome sequencing in drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in routine practice in Lyon, France // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2020. – doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105912.
12. Global tuberculosis report 2019. World Health Organisation – 2019.
13. Grace Lin S., Desmond E., Bonato D., Gross W., Siddiqi S. Multicenter Evaluation of BACTEC MGIT 960 System for Second Line Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – Vol. 47, № 11. – P. 3630-3634.
14. Heyckendorf J., Andres S., Koser Cl. et al. What is a resistance. Impact of phenotypic versus Molecular drug resistance testing on therapy for multi and extensively drug resistant tuberculosis // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2018. – Vol. 62. – P. 1-12.
15. Horne D. J., Pinto L. M., Arentz M., Lin S.-Y. G., Desmond E., Flores L. L. et al. Diagnostic accuracy and reproducibility of WHO-endorsed phenotypic drug susceptibility testing methods for first-line and second-line antituberculosis drugs // *J. Clin. Microbiol.* – 2013. – Vol. 51. – P. 393-401.
16. Hunt M., Bradley Ph., Lapierre S. et al. Antibiotic resistance prediction for *Mycobacterium tuberculosis* from genome sequence data with Mykrobe // *Wellcome Open Research.* – 2019. – Vol. 4. – P. 1-32.
17. Nathavitharama R., Cudahy P., Shumacher S et al. Accuracy of line probe assays for the diagnosis of pulmonary and multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis // *Eur. Respir. J.* – 2017. – Vol. 49. doi: 10.1183/13993003.01075-2016.
18. Nosova E., Zimenkov D., Khakhalina A. A comparison of the Sensititre MycoTB Plate, Bactec MGIT 960, and a microarray-based molecular assay for the detection of drug resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Moscow, Russia // *PLOS One* – 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0167093.
19. Pholwat S., Ehdaie B., Foonglada S., Kelly K., Houpt E. Real-time PCR using mycobacteriophage DNA for rapid phenotypic drug susceptibility results for *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiology* – 2012. – Vol. 50, № 3. – P. 754-761.
20. Rice J. P., Seifert M., Moser K. S., Rodwell T. C. Performance of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis and rifampin resistance in a low-incidence, high-resource setting // *PLOS One.* – 2017. – Vol. 12. doi: 10.1371/journal.pone.0186139.
21. Schön T., Miotto P., Köser C. U., Viveiros M., Böttger E., Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2017. – Vol. 23. – P. 154-160.
22. van Beek J., Haanpera M., Smit P. et al. Evaluation of whole genome sequencing and software tools for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* // *Clin. Microbiol. Infection.* – 2019. – Vol. 25. – P. 82-86.
23. Walker T. M., Kohl T. A., Omar S. V. et al. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study // *Lancet Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 15. – P. 1193-1202.
10. Foonglada S., Klayut W., Chinli R., Pholwat S. et al. Use of mycobacteriophage quantitative PCR on MGIT broths for a rapid tuberculosis antibiogram. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 5, pp. 1523-1528.
11. Genestet C., Hodille E., Berland J.L. et al. Whole-genome sequencing in drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in routine practice in Lyon, France. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2020, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105912.
12. Global tuberculosis report 2019. World Health Organisation, 2019.
13. Grace Lin S., Desmond E., Bonato D., Gross W., Siddiqi S. Multicenter Evaluation of BACTEC MGIT 960 System for Second Line Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, no. 11, pp. 3630-3634.
14. Heyckendorf J., Andres S., Koser Cl. et al. What is a resistance. Impact of phenotypic versus Molecular drug resistance testing on therapy for multi and extensively drug resistant tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2018, vol. 62, pp. 1-12.
15. Horne D.J., Pinto L.M., Arentz M., Lin S.-Y.G., Desmond E., Flores L.L. et al. Diagnostic accuracy and reproducibility of WHO-endorsed phenotypic drug susceptibility testing methods for first-line and second-line antituberculosis drugs. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, vol. 51, pp. 393-401.
16. Hunt M., Bradley Ph., Lapierre S. et al. Antibiotic resistance prediction for *Mycobacterium tuberculosis* from genome sequence data with Mykrobe. *Wellcome Open Research*, 2019, vol. 4, pp. 1-32.
17. Nathavitharama R., Cudahy P., Shumacher S et al. Accuracy of line probe assays for the diagnosis of pulmonary and multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.*, 2017, vol. 49. doi: 10.1183/13993003.01075-2016.
18. Nosova E., Zimenkov D., Khakhalina A. A comparison of the Sensititre MycoTB Plate, Bactec MGIT 960, and a microarray-based molecular assay for the detection of drug resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Moscow, Russia. *PLOS One*, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0167093.
19. Pholwat S., Ehdaie B., Foonglada S., Kelly K., Houpt E. Real-time PCR using mycobacteriophage DNA for rapid phenotypic drug susceptibility results for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiology*, 2012, vol. 50, no. 3, pp. 754-761.
20. Rice J.P., Seifert M., Moser K.S., Rodwell T.C. Performance of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis and rifampin resistance in a low-incidence, high-resource setting. *PLoS One*, 2017, vol. 12. doi: 10.1371/journal.pone.0186139.
21. Schön T., Miotto P., Köser C.U., Viveiros M., Böttger E., Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2017, vol. 23, pp. 154-160.
22. van Beek J., Haanpera M., Smit P. et al. Evaluation of whole genome sequencing and software tools for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Infection*, 2019, vol. 25, pp. 82-86.
23. Walker T.M., Kohl T.A., Omar S.V. et al. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.*, 2015, vol. 15, pp. 1193-1202.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

*ФГБУ «Национальный исследовательский медицинский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ,
127473, Москва, ул. Достоевского, д. 4.*

Лапенкова Марина Борисовна
*научный сотрудник лаборатории иммунопатологии и иммунодиагностики туберкулезной инфекции.
E-mail: manyshik@list.ru*

Арустамова Грета Артушевна
*лаборант-исследователь лаборатории иммунопатологии и иммунодиагностики туберкулезной инфекции.
E-mail: alueva2011@mail.ru*

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

*National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases,
4, Dostoevsky St.,
Moscow, 127473*

Marina B. Lapenkova
*Researcher of Laboratory of Immunopathology and Immunodiagnostics of Tuberculosis Infection
Email: manyshik@list.ru*

Greta A. Arustamova
*Research Assistant of Laboratory of Immunopathology and Immunodiagnostics of Tuberculosis Infection
Email: alueva2011@mail.ru*

Аляпкина Юлия Сергеевна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунопатологии и иммунодиагностики туберкулезной инфекции.
E-mail: yulisyntol@mail.ru

Владимирский Михаил Александрович

доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией иммунопатологии и иммунодиагностики туберкулезной инфекции.
E-mail: mvladimirskij@mail.ru

ГБУЗ МО «Московский областной клинический противотуберкулезный диспансер»,
127055, Москва, пл. Борьбы, д. 11.

Филиппов Павел Николаевич

врач микробиологической лаборатории.
E-mail: eldig90@yandex.ru

Лазебный Сергей Вячеславович

заведующий микробиологической лабораторией.
E-mail: nelazebnyi@mail.ru

Yulia S. Alyapkina

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of Laboratory of Immunopathology and Immunodiagnosics of Tuberculosis Infection
Email: yulisyntol@mail.ru

Mikhail A. Vladimirskiy

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Laboratory of Immunopathology and Immunodiagnosics of Tuberculosis Infection
Email: mvladimirskij@mail.ru

Moscow Regional Clinical TB Dispensary,
11, Borby Sq.,
Moscow, 127055.

Pavel N. Filippov

Doctor of Microbiological Laboratory
Email: eldig90@yandex.ru

Sergey V. Lazebny

Head of Microbiological Laboratory.
Email: nelazebnyi@mail.ru

Поступила 1.03.2020

Submitted as of 1.03.2020