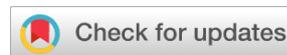


Оригинальное исследование  
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-510>



# Молекулярная характеристика фторхинолон-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* от впервые выявленных больных туберкулёзом на северо-западе России

Вязовая А.А.<sup>1</sup>, Соловьева Н.С.<sup>2</sup>, Герасимова А.А.<sup>1</sup>, Журавлев В.Ю.<sup>2</sup>, Мокроусов И.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

## Аннотация

**Введение.** Фторхинолоны остаются ключевыми противотуберкулёзными препаратами 2-го ряда.

**Цель** исследования — молекулярная характеристика фторхинолон-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* от впервые выявленных больных туберкулёзом на северо-западе России.

**Материалы и методы.** Ретроспективная коллекция исследования включала изоляты *M. tuberculosis*, выделенные в 2015–2019 гг. от ранее не леченных больных туберкулёзом, проживающих в различных областях северо-запада России. Чувствительность к противотуберкулёзным препаратам (в том числе к фторхинолону офлоксацину) определяли с применением ВАСТЕС MGIT960 или метода абсолютных концентраций. Мутации в гене *gyrA* как маркере устойчивости к фторхинолонам выявляли методом ПЦР в реальном времени. Принадлежность к генотипу Beijing и его субтипам устанавливали методами ПЦР и ПЦР в реальном времени. Штаммы других генотипов (не-Beijing) сполитоготипировали.

**Результаты и обсуждение.** Фенотипическая устойчивость к офлоксацину установлена у 6,7% (40/599) штаммов и у 17,4% (40/230) штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. К генотипу Beijing принадлежали 34 (85%) из 40 устойчивых к офлоксацину штаммов, 18 (45%) штаммов были отнесены к российскому эпидемическому субтипу Beijing B0/W148-кластер и 12 (30%) — к Beijing Central Asian/Russian. Остальные 6 офлоксацин-устойчивых штаммов принадлежали к евро-американской филогенетической линии. Мутации в *gyrA* обнаружены у 97,5% (39/40) штаммов, наиболее часто — в кодоне 94 (69,2%; 27/39). Замена Asp94Gly была выявлена в 57,5% (23/40) офлоксацин-устойчивых штаммов и доминировала среди штаммов как Beijing (19/34), так и не-Beijing (4/6). Второй по частоте была замена Ala90Val (25%; 10/40). Более половины офлоксацин-устойчивых штаммов Beijing B0/W148 (10/18) и Central Asian/Russian (7/12) несли мутацию Asp94Gly.

**Заключение.** На северо-западе России в 2016–2019 гг. первичная резистентность *M. tuberculosis* к фторхинолонам составляла 6,7% в общей популяции возбудителя туберкулёза и 17,4% у штаммов с множественной лекарственной устойчивостью и была обусловлена преимущественно мутациями *gyrA* Asp94Gly и Ala90Val. Наибольшая доля фторхинолон-резистентных штаммов *M. tuberculosis* была у генотипа Beijing B0/W148.

**Ключевые слова:** *Mycobacterium tuberculosis*, *gyrA*, лекарственная устойчивость, фторхинолоны, офлоксацин, генотип Beijing, Central-Asian/Russian, B0/W148

**Этическое утверждение.** Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протокол № 61 от 02.04.2020).

**Благодарность.** Мы благодарим коллег из региональных туберкулёзных диспансеров за предоставленные штаммы и Р.С. Мударисову за техническую помощь.

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 24-44-00004).

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи

**Для цитирования:** Вязовая А.А., Соловьева Н.С., Герасимова А.А., Журавлев В.Ю., Мокроусов И.В. Молекулярная характеристика фторхинолон-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* от впервые выявленных больных туберкулёзом на северо-западе России. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(3):342–350.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-510>

EDN: <https://www.elibrary.ru/lrtgfs>

# Molecular characteristics of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from newly diagnosed tuberculosis patients in the Northwest of Russia

Anna A. Vyazovaya<sup>1</sup>✉, Natalia S. Solovieva<sup>2</sup>, Alena A. Gerasimova<sup>1</sup>,  
Viacheslav Yu. Zhuravlev<sup>2</sup>, Igor V. Mokrousov<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russia

## Abstract

**Introduction.** Fluoroquinolones remain the key second-line anti-tuberculosis drugs.

**The aim** of the study was the molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from newly diagnosed tuberculosis patients in the Northwest of the Russian Federation.

**Materials and methods.** The retrospective study collection included *M. tuberculosis* isolates isolated in 2015–2019 from previously untreated tuberculosis patients. Susceptibility to antituberculosis drugs (including the fluoroquinolone ofloxacin) was determined using the BACTEC MGIT960 or absolute concentration method. Mutations in the *gyrA* gene as a marker of resistance to fluoroquinolones, were detected by real-time PCR. Beijing genotype and its subtypes were detected by PCR and real-time PCR methods. Non-Beijing strains were spoligotyped.

**Results and discussion.** Phenotypic resistance to ofloxacin was detected in 6.7% (40/599) of strains and in 17.4% (40/230) of MDR strains. 34 of 40 (85%) ofloxacin-resistant strains belonged to the Beijing genotype. 18 (45%) strains were assigned to the Russian epidemic subtype Beijing B0/W148 and 12 (30%) to Beijing Central Asian/Russian. The remaining 6 ofloxacin-resistant strains belonged to the Euro-American phylogenetic lineage. Mutations in the *gyrA* gene were found in 97.5% (39/40) of strains. The most common were mutations in codon 94 (69.2%, 27/39). The Asp94Gly substitution was identified in 57.5% (23/40) of ofloxacin-resistant strains and was dominant among Beijing (19/34) and non-Beijing (4/6) strains. The second most common substitution was Ala90Val (25%, 10/40). More than half of the ofloxacin-resistant strains, Beijing B0/W148 (10/18) and Central Asian/Russian (7/12), carried the Asp94Gly mutation.

**Conclusion.** In the Northwest of Russia in 2016–2019, primary resistance of *M. tuberculosis* to fluoroquinolones was 6.7% in the total collection and 17.4% of MDR strains, and was mainly caused by the *gyrA* Asp94Gly and Ala90Val mutations. Beijing B0/W148 genotype was characterized by the largest proportion of fluoroquinolone-resistant strains.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, *gyrA*, drug resistance, fluoroquinolones, ofloxacin, Beijing genotype, Central-Asian/Russian, B0/W148

**Ethics approval.** The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the St. Petersburg Pasteur Institute (protocol No. 61, 4 April, 2020).

**Acknowledgement.** We express our gratitude to colleagues from regional TB dispensaries for providing the strains and R.S. Mudarisova for technical assistance.

**Funding source.** The study was financially supported by Russian Science Foundation (grant 24-44-00004).

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Vyazovaya A.A., Solovieva N.S., Gerasimova A.A., Zhuravlev V.Yu., Mokrousov I.V. Molecular characteristics of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from newly diagnosed tuberculosis patients in the Northwest of Russia *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(3):342–350. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-510> EDN: <https://www.elibrary.ru/lrtgfs>

## Введение

Снижение заболеваемости туберкулёзом (ТБ) в России (с 57,7 на 100 тыс. населения в 2015 г. до 31,1 в 2022 г.) сопровождается сохранением распространения лекарственно устойчивых, прежде всего мультирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. Доля множественной лекарственной

устойчивости (МЛУ) среди впервые выявленных больных (первичная МЛУ) выросла с 27,5% в 2016 г. до 34% в 2022 г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний. URL: [https://nmrc.ru/for\\_specialists/main-directions/tuberculosis](https://nmrc.ru/for_specialists/main-directions/tuberculosis)

Согласно классическому многолетнему определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), МЛУ обладают штаммы, одновременно устойчивые к двум ключевым антибиотикам 1-го ряда: изониазиду и рифампицину. Лечение МЛУ-ТБ требует применения препаратов 2-го ряда, к которым микобактерии также приобретают устойчивость. В дополнение к МЛУ-ТБ в 2006 г. ВОЗ ввела определение широкой (дополнительная устойчивость к фторхинолонам и инъекционным антибиотикам; ШЛУ) и предширокой (дополнительная устойчивость к или фторхинолонам или инъекционным антибиотикам; пре-ШЛУ) лекарственной устойчивости [1]. Снижение роли инъекционных антибиотиков и более широкое применение новых препаратов привело к модификации определения ШЛУ и пре-ШЛУ ТБ, которое рекомендовано ВОЗ к использованию в клинических целях и для эпидемиологического надзора с января 2021 г. Согласно новой классификации, ТБ, вызываемый МЛУ-штаммами *M. tuberculosis*, устойчивыми к любому из фторхинолонов, обозначили как пре-ШЛУ-ТБ<sup>2</sup>. Штаммы с пре-ШЛУ, имеющие дополнительную устойчивость к бедаквилину или линезолиду, определены как ШЛУ.

Таким образом, фторхинолоны (ранее — офлоксацин, в настоящее время — левофлоксацин и фторхинолон нового поколения моксифлоксацин) сохранили своё значение при лечении МЛУ-ТБ. Развитие устойчивости к ним имеет значение для исхода лечения: исследование в Архангельске в 2005–2008 гг. показало, что неблагоприятные исходы были более вероятны среди пациентов с приобретённой устойчивостью к капреомицину (100% против 25,9%), офлоксацину (83,6% против 22,7%) или ШЛУ (100% против 24,4%) [2].

Мишенью фторхинолонов служит фермент ДНК-гираза, который необходим для осуществления репликации и транскрипции в клетке *M. tuberculosis* [3]. Устойчивость к фторхинолонам в 90% случаев связана с мутациями в генах *gyrA* и *gyrB*, кодирующих ДНК-гиразу. Мутации в горячем участке гена *gyrA* (область, определяющая устойчивость к хинолонам, кодоны 88–94) представляют основной механизм устойчивости, в то время как мутации в гене *gyrB* встречаются гораздо реже и роль некоторых из них в устойчивости к фторхинолонам не всегда очевидна [4, 5]. Наиболее распространёнными мутациями в *gyrA* являются Ala90Val, Asp94 (Gly, Ala, His, Asn или Tyr) и Ser91Pro, реже встречается мутация Gly88Cys [6–12].

Офлоксацин в настоящее время не применяется для противотуберкулёзной терапии, и существен-

ная доля штаммов, фенотипически устойчивых к офлоксацину, чувствительны к моксифлоксацину. Вместе с тем стремительное развитие лекарственной устойчивости к офлоксацину и, как следствие, значительное снижение терапевтической эффективности привело к директивному отказу от использования данного препарата в лечении ТБ. В последние годы в рекомендации ВОЗ, а также в российские методические рекомендации [13] были внесены существенные изменения в части тестирования лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* бактериологическими методами — из перечня препаратов, тестирование к которым рекомендовано, были исключены офлоксацин, циклосерин, парааминосалициловая кислота.

В то же время молекулярный механизм устойчивости ко всем фторхинолонам опосредован мутациями в генах ДНК-гиразы, и в новом каталоге ВОЗ мутаций устойчивости к противотуберкулёзным препаратам приведён перечень доказанных мутаций устойчивости в *gyrA* применительно именно к фторхинолону нового поколения — моксифлоксацину [14]. При этом ряд мутаций определён как приводящие к высокому уровню устойчивости к моксифлоксацину: *gyrA* Gly88Cys, Asp94Asn, Asp94Gly, Asp94His, Asp94Tyr.

На северо-западе России первое исследование штаммов *M. tuberculosis*, устойчивых к офлоксацину, направленное на изучение варибельности генов *gyrA* и *gyrB*, было проведено в 2008 г. и преимущественно на штаммах, выделенных от ранее леченных больных ТБ (85,4%) [15]. Анализ такой выборки не позволяет дать надёжный ответ на вопрос о том, какие штаммы активно циркулируют в настоящее время, — такой анализ требует когорты впервые выявленных больных.

*M. tuberculosis* характеризуется клональной структурой популяции, состоящей из крупных филогенетических линий, меньших генотипов и генетически компактных кластеров близкородственных штаммов. Часть генотипов или их субтипов отличаются ассоциацией с лекарственной устойчивостью, повышенная трансмиссивность или гипервирулентность что определяет их клиническую значимость и необходимость более тщательного мониторинга распространения. Для России характерно доминирование генотипа Beijing в популяции в целом, особенно сильное среди устойчивых штаммов. Ранее исследование штаммов, устойчивых к офлоксацину, на северо-западе России показало, что 73% штаммов от ранее леченных пациентов и 71% штаммов от впервые выявленных больных принадлежали генотипу Beijing [16]. Мутация в гене *gyrA* была обнаружена у 89% штаммов Beijing и 69% штаммов других генотипов. Такое доминирование штаммов Beijing среди устойчивых к офлоксацину существенно выше доли генотипа Beijing на северо-западе

<sup>2</sup> World Health Organization. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis. Geneva; 2021.  
URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018662>

России: 52–56% [16, 17] в общей популяции; 34% среди чувствительных штаммов в Санкт-Петербурге [17]. Авторы исследования 2008 г. сделали вывод о том, что, аналогично распространению МЛУ-ТБ, распространение ТБ с устойчивостью к фторхинолонам в России может быть обусловлено преобладанием генотипа Beijing в популяции *M. tuberculosis* [15].

В другом исследовании на северо-западе России [18] генотип Beijing был выявлен у 70,8% изолятов с низким уровнем резистентности к офлоксацину, 84,6% изолятов с высоким уровнем резистентности и 50% чувствительных штаммов; при этом доля Beijing была значимо выше среди штаммов, высокорезистентных к офлоксацину, в сравнении с чувствительными ( $p = 0,03$ ). Однако возможно, что в данном случае речь идёт не столько об ассоциации Beijing с высоким уровнем устойчивости к офлоксацину, сколько о доминировании Beijing среди МЛУ-штаммов.

В 2006 г. в различных регионах северо-запада России доля резистентных к офлоксацину штаммов *M. tuberculosis* находилась в диапазоне 1,1–1,6% среди впервые выявленных больных ТБ и 4,1–10,3% — среди ранее леченных больных [15]. Анализ структуры лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* среди впервые выявленных больных ТБ на северо-западе России за 2010–2021 гг. показал быстрый (в 2,5 раза) рост лекарственной устойчивости к рифампицину в сочетании с фторхинолонами (с 2,4%; 95% доверительный интервал (ДИ) 2,2–2,6 до 6,1%; 95% ДИ 5,6–6,6) [19].

В связи с распространением МЛУ-ТБ и применением препаратов 2-го ряда важным для клинической практики является тестирование чувствительности возбудителя к фторхинолонам, помимо изониазида и рифампицина.

Учитывая рост доли МЛУ-штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от впервые выявленных пациентов в России, было актуальным изучить особенности распространения мутаций в генах, обуславливающих резистентность к группе фторхинолонов, в современный период.

**Целью** настоящего исследования была молекулярная характеристика ретроспективной коллекции офлоксацин-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* от впервые выявленных больных ТБ на северо-западе России.

## Материалы и методы

Коллекция исследования включала 599 изолятов *M. tuberculosis* из рабочей коллекции бактериологической лаборатории Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, выделенных в 2015–2019 гг. от ранее не леченных больных ТБ, проживающих в различных регионах северо-запада России.

Культивирование и определение лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к основным

противотуберкулёзным препаратам проводили стандартным непрямой методом абсолютных концентраций на плотных питательных средах и с помощью модифицированного метода пропорций на жидкой среде в системе с автоматизированной детекцией роста к противотуберкулёзным препаратам «ВАСТЕС MGIT960» («Becton Dickinson»). Используемые критические концентрации препаратов составляли 1,0 мкг/мл для стрептомицина, 0,1 мкг/мл для изониазида, 5,0 мкг/мл для этамбутола, 1,0 мкг/мл для рифампицина, 100 мкг/мл для пипразинамида, 1,0 мкг/мл для амикацина, 2,5 мкг/мл для капреомицина, 2,0 мкг/мл для офлоксацина, 5 мкг/мл для этионамида<sup>3</sup>.

ДНК выделяли из чистых культур *M. tuberculosis*, как описано ранее [15]. Для определения генотипической устойчивости к фторхинолонам применяли метод мультиплексной ПЦР (наборы «Ампли-туб-МЛУ-РВ» и «Ампли-туб-ФQ-РВ» («Синтол»).

Принадлежность к генотипу Beijing и его субтипам B0/W148, Central Asian/Russian, CAO, Beijing 1071-32-кластер, 14717-15-кластер определяли методами ПЦР и ПЦР в реальном времени для выявления специфических маркеров [20]. Штаммы других генетических групп (не-Beijing) сполитотипировали [21]. Полученные сполитографы сравнивали с международной базой SITVIT<sup>2</sup> и определяли номер SIT (англ. Spoligotype International Type).

Статистический анализ проводили с использованием ресурса MedCalc<sup>5</sup>. Разницу данных между группами определяли по критерию  $\chi^2$ , статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Оценка лекарственной чувствительности 599 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от впервые выявленных больных ТБ, показала что 292 (48,7%) штамма были чувствительными ко всем противотуберкулёзным препаратам 1-го ряда (стрептомицину, изониазиду, рифампицину, этамбутолу), 230 (38,4%) изолятов обладали МЛУ. Фенотипическая устойчивость к офлоксацину установлена у 6,7% (40/599) штаммов в общей популяции и у 17,4% (40/230) МЛУ-штаммов *M. tuberculosis*. Согласно новому определению ВОЗ, все 40 устойчивых к офлоксацину штаммов были пре-ШЛУ (табл. 1).

Генотипирование показало, что в общей коллекции штаммов *M. tuberculosis* доля генотипа Beijing составила 57,8% (346/599). Остальные 253 штамма принадлежали к различным генетическим семействам евро-американской филогенети-

<sup>3</sup> Приказ Минздрава России от 29.12.2014 № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».

<sup>4</sup> SITVIT2.

<sup>5</sup> URL: <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>

<sup>5</sup> MedCalc. URL: [http://www.medcalc.org/calc/odds\\_ratio.php](http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)



нуклеотидных полиморфизмов, среди которых замена Asp94Gly выявлена в 57,5% (23/40) штаммов, устойчивых к офлоксацину, и доминировала среди штаммов как Beijing (19/34), так и не-Beijing (4/6). Второй по частоте была замена Ala90Val (25%, 10/40) которая была установлена у 23,5% (8/34) штаммов Beijing и 33,3% (2/6) штаммов не-Beijing. Суммарно штаммы *M. tuberculosis* с мутациями Asp94Gly и Ala90Val в гене *gyrA* составили 82,5% (33/40). Одновременного наличия 2 мутаций в 1 штамме не выявлено.

При анализе полиморфизма гена *gyrA* следует учитывать, что не все мутации, даже в кодонах, соседних с горячими участками, имеют отношение к устойчивости. Наиболее известной филогенетической заменой является мутация в *gyrA95*, предложенная в качестве эволюционного маркера еще в 1997 г. для самой первой схемы разделения вида *M. tuberculosis* на главные генетические группы [25]. В настоящее время в качестве современного источника информации о значимости мутаций устойчивости (или её отсутствии) можно обратиться к КATALOGУ мутаций ВОЗ, второе издание которого вышло в 2023 г. [14]. Перечисление этого кодона *gyrA95* в одном ряду с мутациями в горячем участке гена *gyrA* [7, 26] создаёт ошибочное впечатление о его корреляции с устойчивостью к фторхинолонам.

Анализ офлоксацин-устойчивых штаммов различных генотипов выявил все варианты обнаруженных мутаций в гене *gyrA* у штаммов субтипа Beijing Central Asian/Russian. Более половины офлоксацин-устойчивых штаммов Beijing B0/W148 (10/18) и Central Asian/Russian (7/12) имели мутацию Asp94Gly. Значимых различий в спектре мутаций в зависимости от генотипа *M. tuberculosis* не выявлено.

В исследованной выборке 40 больных, от которых были выделены офлоксацин-устойчивые штаммы *M. tuberculosis*, преобладали клинические формы инфильтративного и диссеминированного ТБ лёгких (16 и 14 больных соответственно; табл. 3). Сравнение клинических форм заболевания и генотипа штаммов не выявило статистически значимых различий. При этом доля диссеминированного ТБ

лёгких была больше у больных при инфицировании штаммами Central Asian/Russian (41,7%; 5/12), чем B0/W148 (27,8%; 5/18;  $p = 0,4$ ). Доля больных с инфильтративным ТБ лёгких была больше в группе B0/W148 (55,6%; 10/18), чем Central Asian/Russian (33,3%; 4/12;  $p = 0,2$ ). Возможно, статистически незначимые различия между группами обусловлены малым размером выборки или разной реактивностью макроорганизма пациентов.

Мы сравнили полученные результаты с предыдущими российскими работами [7, 8, 15, 26, 27]. Как и в нашем исследовании, наиболее частыми, независимо от региона России, были мутации *gyrA* 94Gly, 90Val, 94Ala. Во втором издании Каталога ВОЗ [15], опубликованном в 2023 г. применительно к новому фторхинолону моксифлоксацину наиболее частая из этих мутаций *gyrA* — Asp94Gly — определена как приводящая с высокой достоверностью к высокому уровню устойчивости к моксифлоксацину, наряду с *gyrA Gly88Cys*, *Asp94Asn*, *Asp94His* и *Asp94Tyr*. Другие мутации в *gyrA* и *gyrB* определены как приводящие к низкому уровню устойчивости к моксифлоксацину.

Мутации *gyrB*, которые не включены в использованную нами тест-систему, как правило, редкие [8, 15] или вообще не были выявлены в некоторых локальных коллекциях [26], хотя, например, обнаружены в 10% офлоксацин-устойчивых штаммов в Ленинградской области [18]. Некоторое количество офлоксацин-устойчивых штаммов не несёт мутаций в *gyrA* или *gyrB* [15, 18]. Их устойчивость к офлоксацину может быть гипотетически объяснена мутацией другого гена-мишени или активным эффлюксом [28, 29].

Обратная ситуация, а именно множественные мутации в одном и том же штамме, в изученной выборке не наблюдалась, но была описана ранее в других российских работах. Например, в исследовании коллекции из различных регионов России 4 изолята несли одновременно мутации *gyrA Asp94Gly* и *gyrB Asn538Asp*, 1 штамм Beijing B0/W148 имел одновременно мутации *gyrA* (Ala90Val-Ser91Pro, Asp94Asn) и мутацию *gyrB* (Ala543Val) [7]. При этом отсутствует корреляция между уровнем фенотипиче-

**Таблица 3.** Клинические формы заболевания больных туберкулезом и генотипы штаммов

**Table 3.** Clinical forms of the disease in tuberculosis patients and strain genotypes

Клинические формы ТБ Clinical forms of tuberculosis	Всего Total	B0/W148-cluster	Central Asian/ Russian	Beijing другие Beijing, other	non-Beijing
<i>n</i>	40	18	12	4	6
Диссеминированный   Disseminated	14	5	5		4
Инфильтративный   Infiltrative	16	10	4	1	1
Фиброзно-кавернозный   Fibrous-cavernous	6	2	2	1	1
Кавернозный   Cavernous	2	1		1	
Очаговый   Focal	2		1	1	

ской устойчивости и типом мутации или наличием более чем 1 мутации. В Ленинградской области в 2011 г. 54,3% изолятов с низким уровнем (2 мкг/мл) и 76,9% изолятов с высоким уровнем (10 мкг/мл) устойчивости к офлоксацину имели мутации в *gyrA* [18]. Два изолята с низким уровнем устойчивости к офлоксацину имели мутации в генах *gyrA* и *gyrB* одновременно, а основные мутации в кодонах *gyrA* 94 и 90 были обнаружены среди штаммов как с высоким, так и с низким уровнем устойчивости [18]. Это противоречит утверждению в Каталоге ВОЗ [14] о том, что «множественные генетически связанные мутации с низким уровнем устойчивости к моксифлоксацину имеют аддитивный эффект и должны рассматриваться как придающие высокий уровень устойчивости». Гипотетически множественные мутации могли возникнуть из-за мутаторных (гипермутабельных) аллелей генов репарации ДНК в таких штаммах, аналогично ситуации с устойчивостью к рифампицину и множественными мутантными аллелями *rpoB* [30].

Интересным результатом предыдущего исследования на северо-западе России стало обнаружение высокой доли гетерорезистентных изолятов, т.е. имеющих как мутантные аллели, так и аллели дикого типа *gyrA* [15]. Однако в нашем новом исследовании такие случаи не были выявлены, т.е. в настоящее время происходит активное распространение штаммов с уже стойко приобретённой устойчивостью к офлоксацину.

### Заключение

Широкое использование в прошлом фенотипического тестирования лекарственной устойчивости на основе данных метода абсолютных концентраций, возможно, привело к получению ложных результатов, что дополнительно повышает важность и необходимость генетического типирования. В новую версию методических рекомендаций [13] были включены дополнительные положения, устанавливающие приоритет метода пропорций перед методом абсолютных концентраций в фенотипическом тестировании чувствительности клинических изолятов *M. tuberculosis* к противотуберкулёзным препаратам. Согласно рекомендациям ВОЗ были изменены критические концентрации при тестировании с использованием технологии ВАСТЕС MGIT для рифампицина (0,5 мг/л вместо 1 мг/л), левофлоксацина (1,0 мг/л вместо 1,5 мг/л), моксифлоксацина (0,25 и 1 мг/л вместо 0,5 и 2,0 мг/л). Это затрудняет ретроспективное сравнение данных фенотипической лекарственной чувствительности и дополнительно усиливает роль молекулярно-генетических исследований, направленных на установление генетических маркеров устойчивости.

В изученной выборке штаммов *M. tuberculosis* из различных регионов северо-запада России в

2015–2019 гг. первичная резистентность к фторхинолонам составляла 6,7% в общей популяции и 17,4% у МЛУ-штаммов и была обусловлена преимущественно мутациями Asp94Gly и Ala90Val в гене *gyrA*. Наибольшая доля резистентных к фторхинолонам штаммов *M. tuberculosis* представлена генотипом Beijing B0/W148.

В популяции *M. tuberculosis* на северо-западе России в настоящий момент формируется устойчивость к фторхинолонам на фоне уже существующей МЛУ, и штаммы с мутациями Asp94Gly и Ala90Val в гене *gyrA* играют основную роль в распространении пре-ШЛУ-ТБ. Целесообразно проводить детекцию мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью *M. tuberculosis* к противотуберкулёзным препаратам, и слежение за циркуляцией данных генотипов для оценки их эпидемиологической значимости.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Raviglione M.C., Smith I.M. XDR tuberculosis – implications for global public health. *N. Engl. J. Med.* 2007;356(7):656–9. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmp068273>
- Smith S.E., Ershova J., Vlasova N., et al. Risk factors for acquisition of drug resistance during multidrug-resistant tuberculosis treatment, Arkhangelsk Oblast, Russia, 2005–2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2015;21(6):1002–11. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2106.141907>
- Takiff H.E., 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;38(4):773–80. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.38.4.773>
- 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;50(1):104–12. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.50.1.104-112.2006>
- Mdluli K., Ma Z. *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase as a target for drug discovery. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2007;7(2):159–68. DOI: <https://doi.org/10.2174/187152607781001763>
- Feuerriegel S., Cox H. S., Zarkua N., et al. Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(8):3353–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00050-09>
- Panova A.E., Vinokurov A.S., Shemetova A.A., et al. Molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistant isolates from HIV- and HIV+ tuberculosis patients in Russia. *BMC Microbiol.* 2022;22(1):138. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02553-7>
- Nosova E.Y., Bukatina A.A., Isaeva Y.D., et al. Analysis of mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes and their association with the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to levofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin. *J. Med. Microbiol.* 2013;62 (Pt. 1):108–13. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.046821-0>
- Maruri F., Sterling T.R., Kaiga A.W., et al. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67(4):819–31. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkr566>
- Vyazovaya A., Levina K., Zhuravlev V., et al. Emerging resistant clones of *Mycobacterium tuberculosis* in a spatiotemporal

- context. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018;73(2):325–31.  
DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkx372>
11. Mujuni D., Kasemire D.L., Ibanda L., et al. Molecular characterisation of second-line drug resistance among drug resistant tuberculosis patients tested in Uganda: a two and a half-year's review. *BMC Infect. Dis.* 2022;22(1):363.  
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07339-w>
  12. Li S, Tan Y, Deng Y, et al. The emerging threat of fluoroquinolone-, bedaquiline-, and linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in China: Observations on surveillance data. *J. Infect. Public Health.* 2024;17(1):137–42.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.11.018>
  13. Методические рекомендации «Тестирование лекарственной чувствительности клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* методом пропорций» Российское общество фтизиатров. М.;2022. Methodological recommendations “Drug sensitivity testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* using the proportion method” Russian Society of Phthisiatricians. Moscow;2022.
  14. WHO. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. Geneva;2023.
  15. Mokrousov I., Otten T., Manicheva O., et al. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008;52(8):2937–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00036-08>
  16. Mokrousov I., Narvskaya O., Otten T., et al. High prevalence of KatG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002;46(5):1417–24.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.46.5.1417-1424.2002>
  17. Narvskaya O., Mokrousov I., Otten T., Vishnevsky B. Molecular markers: application for studies of *Mycobacterium tuberculosis* population in Russia. In: Read M.M., ed. *Trends in DNA Fingerprinting Research*. N.Y.;2005:111–25.
  18. Chernyaeva E., Fedorova E., Zhemkova G., et al. Characterization of multiple and extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with different ofloxacin-resistance levels. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2013;93(3):291–5.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.02.005>
  19. Галкин В.Б., Стерликов С.А., Бельтюков М.В. Структура и динамика развития лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза в Северо-западном федеральном округе в 2010–2021 гг. *Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики*. 2023;(1):1–20. Galkin V.B., Sterlikov S.A., Beltyukov M.V. Structure and dynamics of drug resistance of *Mycobacteria tuberculosis* in the North-Western federal district of Russia in 2010–2021. *Current Problems of Health Care and Medical Statistics*. 2023;(1):1–20.  
DOI: <https://doi.org/10.24412/2312-2935-2023-1-1-20>  
EDN: <https://elibrary.ru/brnfyk>
  20. Vyazovaya A., Gerasimova A., Mudarisova R., et al. Genetic diversity and primary drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains in Northwestern Russia. *Microorganisms*. 2023;11(2):255.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020255>
  21. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35(4):907–14.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.907-914.1997>
  22. Shitikov E., Vyazovaya A., Malakhova M., et al. Simple assay for detection of the Central Asia outbreak clade of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *J. Clin. Microbiol.* 2019;57(7):e00215-19.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00215-19>.
  23. Mokrousov I. Ubiquitous and multifaceted: SIT53 spoligotype does not correlate with any particular family of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2021;126:102024.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.10.024>
  24. Coll F., McNeerney R., Guerra-Assunção J.A., et al. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Nat. Commun.* 2014;5:4812.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms5812>.
  25. Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K.E., et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1997;94(18):9869–74.  
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9869>
  26. Dymova M.A., Cherednichenko A.G., Alkhovik O.I., et al. Characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates circulating in Siberia. *BMC Infect. Dis.* 2014;14:478. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-478>
  27. Андреевская С.Н., Ларионова Е.Е., Киселева Е.А. и др. Сравнительная молекулярно-генетическая характеристика культур *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных в Европейской части Российской Федерации в 1998–2003 гг. и 2016–2021 гг. *Туберкулез и болезни легких*. 2023;101(3):27–36. Andreevskaya S.N., Larionova E.E., Kiseleva E.A., et al. Comparative molecular genetic characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* cultures isolated in the European Part of the Russian Federation in 1998–2003 and 2016–2021. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2023;101(3):27–36.  
DOI: <https://doi.org/10.58838/2075-1230-2023-101-3-27-36>  
EDN: <https://elibrary.ru/tbicipz>
  28. Huang T.S., Kunin C.M., Shin-Jung Lee S., et al. Trends in fluoroquinolone resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a Taiwanese medical centre: 1995–2003. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005;56(6):1058–62.  
DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dki353>
  29. Escribano I., Rodriguez J.C., Llorca B., et al. Importance of the efflux pump systems in the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to fluoroquinolones and linezolid. *Chemotherapy*. 2007;53(6):397–401. DOI: <https://doi.org/10.1159/000109769>
  30. Mokrousov I. Multiple rpoB mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and second-order selection. *Emerg. Infect. Dis.* 2004;10(7):1337–8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1007.030598>

#### Информация об авторах

Вязовая Анна Александровна<sup>✉</sup> — д.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, [elmtree2001@mail.ru](mailto:elmtree2001@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-9140-8957>

Соловьева Наталья Сергеевна — к.м.н., зав. бактериологической лаб. Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1509-0734>

Герасимова Алена Андреевна — м.н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5246-8658>

#### Information about the authors

Anna A. Vyazovaya<sup>✉</sup> — D. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular epidemiology and evolutionary genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, [elmtree2001@mail.ru](mailto:elmtree2001@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-9140-8957>

Natalia S. Solovieva — Cand. Sci. (Med.), Head, Bacteriological laboratory, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1509-0734>

Alena A. Gerasimova — junior researcher, Laboratory of molecular epidemiology and evolutionary genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5246-8658>

*Журавлев Вячеслав Юрьевич* — к.м.н., в.н.с., координатор направления «Лабораторная диагностика» Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6906-6225>

*Мокроусов Игорь Владиславович*<sup>✉</sup> — д.б.н., зав. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, [imokrousov@mail.ru](mailto:imokrousov@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-5924-0576>

**Участие авторов:** *Вязовая А.А.* — дизайн исследования, генетическое исследование, статистическая обработка, написание; *Соловьева Н.С.* — микробиологическое исследование; *Герасимова А.А.* — генетическое исследование; *Журавлев В.Ю.* — участие в подготовке рукописи и её редактирование; *Мокроусов И.В.* — написание и редактирование рукописи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 17.03.2024;  
принята к публикации 15.05.2024;  
опубликована 29.06.2024

*Viacheslav Yu. Zhuravlev* — Cand. Sci. (Med., leading researcher, Coordinator of the direction "Laboratory diagnostics", St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6906-6225>

*Igor V. Mokrousov*<sup>✉</sup> — D. Sci. (Biol., Head, Laboratory of Molecular epidemiology and evolutionary genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, [imokrousov@mail.ru](mailto:imokrousov@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-5924-0576>

**Author contribution:** *Vyazovaya A.A.* — study design, genetic study, statistical processing, writing; *Solovieva N.S.* — microbiological examination; *Gerasimova A.A.* — genetic research; *Zhuravlev V.Yu.* — participation in the preparation of the manuscript and its editing; *Mokrousov I.V.* — writing and editing the manuscript. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a final approval of the version to be published.

The article was submitted 17.03.2024;  
accepted for publication 15.05.2024;  
published 29.06.2024