

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ФТОРХИНОЛОНАМ У *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИС. Н. Андреевская [✉], Т. Г. Смирнова, Л. Н. Черноусова, Е. Е. Ларионова, Е. А. Киселева, А. Эргешов

Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

Фторхинолоны — основная группа препаратов, применяемых для лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ). Целью исследования было оценить разнообразие мутаций в гене *gyrA*, а также установить ассоциацию мутаций в *gyrA* с фенотипической устойчивостью к левофлоксацину и общим профилем лекарственной устойчивости возбудителя. Исследование проведено на диагностическом материале от 2836 больных туберкулезом легких. Для определения мутаций в *gyrA* использовали наборы «ТБ-БИОЧИП-2» или «Амплитуб-*FQ-RV*». Фенотипическую лекарственную чувствительность *M. tuberculosis* (МБТ) определяли в системе BACTEC MGIT 960. Показано, что у МБТ доминировали мутации D94G (41,63%; 95%ДИ: 38,03–45,32%) и A90V (21,32%; 95%ДИ: 18,44–24,50%), причем изоляты с этими мутациями были получены в том числе и от впервые выявленных больных туберкулезом легких. Установлено, что мутация D94A не являлась строго ассоциированной с фенотипической устойчивостью к фторхинолонам. Устойчивость к фторхинолонам, как правило, была ассоциирована с множественной лекарственной устойчивостью (93,52%; 95%ДИ 91,43–95,12%). В 2,31% (95%ДИ 1,78–3,00%) случаев выявлена генотипическая гетерорезистентность к фторхинолонам: смешанные популяции включали 2–4 пула МБТ с разной структурой QRDR *gyrA*. На основании полученных результатов можно заключить, что в современной популяции МБТ происходит формирование устойчивости к фторхинолонам, как правило, на фоне уже имеющейся МЛУ. Наиболее перспективными в эволюционном плане представляются МБТ с мутациями в *gyrA* D94G и A90V.

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, фторхинолоны, устойчивость, *gyrA*, мутации, преШЛУ туберкулез

Финансирование: исследование проведено в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФГБНУ «ЦНИИТ» № 122041100246-3 «Межвидовой и внутривидовой полиморфизм микобактерий у больных туберкулезом и микобактериозом на фоне специфической терапии».

Вклад авторов: А. Эргешов, Л. Н. Черноусова — разработка дизайна исследования; Е. Е. Ларионова, Е. А. Киселева — получение данных для анализа; Т. Г. Смирнова — анализ полученных данных; С. Н. Андреевская — написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи; все авторы участвовали в обсуждении результатов

✉ **Для корреспонденции:** Софья Николаевна Андреевская
Яузская аллея, д. 2, стр. 1А, г. Москва, 107564, Россия; andsofia@mail.ru

Статья получена: 10.10.2022 **Статья принята к печати:** 24.10.2022 **Опубликована онлайн:** 31.10.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.054

THE NATURE OF GENOTYPIC RESISTANCE TO FLUOROQUINOLONES IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* CIRCULATING IN RUSSIAN FEDERATIONAndreevskaya SN [✉], Smirnova TG, Chernousova LN, Larionova EE, Kiseleva EA, Ergeshov A

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

Fluoroquinolones are the main group of drugs used for treatment of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB). The study was aimed to assess the diversity of mutation in the *gyrA* gene and to evaluate the association of *gyrA* mutations with the phenotypic resistance to levofloxacin and the general drug resistance profile of the pathogen. The study involved assessment of diagnostic materials obtained from 2836 patients with pulmonary tuberculosis. TB-BIOCHIP-2 and Amplitube-*FQ-RV* kits were used for identification of the *gyrA* mutations. Phenotypic drug susceptibility of *M. tuberculosis* (MTB) was defined using the BACTEC MGIT 960 test system. It was shown that mutations D94G (41.63%; 95% CI: 38.03–45.32%) and A90V (21.32%; 95% CI: 18.44–24.50%) prevailed in MTB, although some isolates carrying these mutations were obtained from the newly diagnosed patients with pulmonary tuberculosis. It was found that mutation D94A was not strongly associated with the phenotypic resistance to fluoroquinolones. Fluoroquinolone resistance was usually associated with multiple drug resistance (93.52%; 95% CI 91.43–95.12%). In 2.31% (95% CI 1.78–3.00%) of cases, genotypic heteroresistance to fluoroquinolones was detected: mixed populations included 2–4 MTB pools with various structure of the *gyrA* QRDR. The results obtained lead to the conclusion that resistance to fluoroquinolones that is usually associated with the existing MDR arises in the modern MTB population. MTB carrying *gyrA* mutations D94G and A90V seems to be the most promising in evolutionary terms.

Keywords: *M. tuberculosis*, fluoroquinolones, resistance, *gyrA*, mutations, preXDR tuberculosis

Funding: the study was conducted as part of the State Assignment № 122041100246-3 for the Central Tuberculosis Research Institute, “Intra- and Inter- species Polymorphism of Mycobacteria in Patients with Tuberculosis and Mycobacteriosis Who Receive Specific Therapy”.

Author contribution: Ergeshov A, Chernousova LN — study design; Larionova EE, Kiseleva EA — data acquisition; Smirnova TG — data analysis; Andreevskaya SN — manuscript writing, literature review; all authors contributed to the discussion.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sofia N. Andreevskaya
Yauzskaya Alleya, 2, str. 1A, Moscow, 107564, Russia; andsofia@mail.ru

Received: 10.10.2022 **Accepted:** 24.10.2022 **Published online:** 31.10.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.054

Распространение туберкулеза с лекарственной устойчивостью возбудителя является серьезной проблемой общественного здравоохранения. Особую озабоченность вызывает широкое распространение туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ), т. е. устойчивого одновременно к двум наиболее эффективным противотуберкулезным

препаратам рифампицину и изониазиду. Эффективность терапии МЛУ-ТБ, по данным ВОЗ, составляет лишь 59% [1]. Россия входит в число стран с высоким бременем МЛУ-ТБ и, несмотря на то, что распространенность МЛУ-ТБ в стране в последние годы начала снижаться (с 20,6 на 100 000 населения в 2020 г. до 18,1 на 100 000 населения в 2021 г.), этот показатель по-прежнему остается высоким [1, 2].

В схему терапии МЛУ-ТБ обязательно включают препараты фторхинолонового ряда (препараты группы А по классификации ВОЗ, отражающей приоритетность включения препаратов в схему терапии) [3]. Мишенью фторхинолонов служит фермент ДНК-гираза, который необходим для осуществления процессов репликации и транскрипции в клетке *M. tuberculosis* (МБТ) [4, 5]. Устойчивость к фторхинолонам в 60–90% случаев связана с мутациями в области QRDR (quinolone resistance-determining region) гена *gyrA*, кодирующего α -субъединицу ДНК-гиразы [6, 7]. В базе данных TBdreamDB (<http://www.tbdreamdb.com>) описано 17 вариантов мутаций в QRDR, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, из которых 10 вариантов высокостойчивы для формирования устойчивости к этой группе препаратов [8].

Развитие дополнительной устойчивости к фторхинолонам у МБТ с МЛУ приводит к развитию туберкулеза с предширокой лекарственной устойчивостью возбудителя (преШЛУ-ТБ), для лечения которого требуется длительный и дорогостоящий курс химиотерапии. По оценкам ВОЗ, в 105 странах до 20% случаев туберкулеза относится к этой категории. Для повышения эффективности лечения преШЛУ-ТБ необходима как можно более ранняя коррекция курса химиотерапии, основанная на определении чувствительности к фторхинолонам молекулярно-генетическими методами. Однако, по данным ВОЗ, глобальный охват тестированием на чувствительность к фторхинолонам остается низким и составляет около 50% от числа выявленных случаев туберкулеза в мире [1]. В России для ускоренного определения чувствительности МБТ к фторхинолонам используют две отечественные тест-системы. Одна из них — ТБ-БИОЧИП-2 (ИМБ-Биочип; Россия) представляет собой биочипы, которые выявляют 10 вариантов точечных мутаций в QRDR, вторая — «Амплитуб-FQ-РВ» (Синтол; Россия), основана на аллель-специфичной ПЦР и выявляет шесть мутаций в QRDR *gyrA*.

Целью исследования было оценить разнообразие мутаций в гене *gyrA*, а также установить ассоциацию мутаций в *gyrA* с фенотипической устойчивостью к левофлоксацину и с общим профилем лекарственной устойчивости возбудителя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Исследовали диагностический материал от пациентов всех возрастных групп, поступивших в диагностическое и клиническое отделения ФГБНУ «ЦНИИТ» с 2011 по 2019 гг.

Дизайн исследования

Проведен ретроспективный анализ данных по изучению мутаций в QRDR *gyrA* и фенотипической лекарственной устойчивости МБТ, выделенных за 9-летний период (2011–2019 гг.) от больных туберкулезом легких, проходивших лечение в ФГБНУ «ЦНИИТ». Диагностический материал исследовали по стандартному алгоритму, принятому в отделе микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ»: каждый образец диагностического материала параллельно исследовали культуральными и молекулярно-генетическими методами. Диагностический материал подвергали стандартной деконтаминирующей обработке и проводили посев в пробирки MGIT для культивирования в системе

ВАСТЕС MGIT 960 [9]. Из оставшейся после посева порции диагностического материала выделяли ДНК и проводили ПЦР-исследование на наличие ДНК МБТ. При получении положительного результата ПЦР определяли мутации в генах, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, на биочипах или аллель-специфической ПЦР. При получении культуры МБТ определяли лекарственную чувствительность к восьми противотуберкулезным препаратам.

Выделение ДНК

ДНК выделяли из диагностического материала набором реагентов «Амплитуб-РВ» для выделения, обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР в реальном времени, комплект № 1 («Синтол»; Россия), согласно инструкции к набору.

Выявление ДНК МБТ

ПЦР на выявление ДНК МБТ проводили с использованием набора реагентов «Амплитуб-РВ» для выделения, обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР в реальном времени, комплект № 2 («Синтол»; Россия), согласно инструкции к набору. Амплификацию проводили в термоциклере с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad; США).

Генотипическая устойчивость к рифампицину и изониазиду

Определение проводили или с использованием микрочиповой технологии с набором «ТБ-БИОЧИП-1» («БИОЧИП-ИМБ»; Россия), или с использованием набора «Амплитуб-МЛУ-РВ» («Синтол»; Россия). Обе процедуры осуществляли согласно инструкциям производителей.

Генотипическая устойчивость к фторхинолонам

Определение проводили с использованием микрочиповой технологии с набором «ТБ-БИОЧИП-2» («БИОЧИП-ИМ»; Россия) — для образцов, полученных в период 2011–2015 гг., или с использованием набора «Амплитуб-FQ-РВ» («Синтол»; Россия) — для образцов, полученных в период 2015–2019 гг. Обе процедуры осуществляли согласно инструкциям производителей. Если от одного и того же пациента были получены анализы на разные сроки терапии или были исследованы разные виды диагностического материала от одного больного (например, мокрота и хирургический материал), результат определения мутаций в *gyrA*, полученный для каждого из таких образцов, сравнивали между собой.

Культуральная диагностика

Выявление МБТ проводили на жидкой среде Middlebrook 7H9 в системе ВАСТЕС MGIT 960 (BD; США) согласно стандартному протоколу производителя [9].

Фенотипическая лекарственная чувствительность

Определение проводили модифицированным методом пропорций в системе ВАСТЕС MGIT 960 (BD; США) к восьми противотуберкулезным препаратам (рифампицину,

Таблица 1. Частота встречаемости единичных мутаций в гене *gyrA* от числа всех изолятов МБТ с мутациями в *gyrA* ($n = 699$)

Кодон QRDR <i>gyrA</i>	Аминокислотная замена	Частота встречаемости, абс. (%)	95% ДИ
88	G → C	1 (0,14)	0,03–0,81
90	A → V	149 (21,32)	18,44–24,50
91	S → P	53 (7,58)	5,84–9,78
94	D → A	102 (14,59)	12,17–17,40
	D → N	54 (7,73)	5,97–9,94
	D → G	291 (41,63)	38,03–45,32
	D → H	11 (1,57)	0,88–2,80
	D → Y	38 (5,44)	3,99–7,37

изониазиду, этамбутолу, пипразинамиду, этионамиду, амикацину, капреомицину и левофлоксацину) согласно рекомендациям производителя [9, 10].

Методы статистического анализа

При оценке результатов исследования использовали описательную статистику: учитывали число наблюдений, частоту, долю (в процентах), 95%-й доверительный интервал (95%ДИ). Для сравнения различий между группами использовали χ^2 -критерий. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Весь анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего за период 2011–2019 гг. была проведена микробиологическая диагностика туберкулеза для 4451 больного. В исследование был включен материал от 2836 пациентов с положительными результатами ПЦР на наличие ДНК МБТ. Из них в 2082 случаях (73,41%, 95% ДИ: 71,76–75,01%) мутации в *gyrA* применяемыми молекулярно-генетическими методами выявлены не были (далее *gyrA* дикого типа).

От 699 пациентов (24,65%, 95% ДИ: 23,10–26,27%) были выделены МБТ с единичными мутациями в *gyrA*. У МБТ, выделенных от 55 (2,31%, 95% ДИ: 1,78–3,00%) больных, результаты определения генотипической устойчивости к фторхинолонам различались в динамике или в зависимости от вида диагностического материала. Эти случаи были обозначены нами как «гетерорезистентность» и подробно будут описаны ниже.

Таблица 2. Фенотипически устойчивые к левофлоксацину изоляты МБТ с разной структурой QRDR *gyrA* ($n = 1326$)

Мутация в QRDR <i>gyrA</i>	Фенотипически устойчивые к левофлоксацину изоляты	
	абс. (%)	95% ДИ
G88C ($n = 1$)	1 (100)	20,65–100,00
A90V ($n = 97$)	95 (97,94)	92,79–99,43
S91P ($n = 33$)	32 (96,97)	84,68–99,46
D94A ($n = 73$)	49 (67,12)	55,73–76,81
D94N ($n = 39$)	39 (100)	91,03–100,00
D94G ($n = 204$)	200 (98,04)	95,07–99,23
D94H ($n = 6$)	6 (100)	60,97–100,00
D94Y ($n = 27$)	26 (96,30)	81,72–99,34
Всего с мутациями ($n = 480$)*	448 (93,33)	90,74–95,24
WT ($n = 846$)	32 (3,78)	2,69–5,29

Примечание: WT — дикий тип *gyrA*; * — учитывали только изоляты МБТ с известной фенотипической устойчивостью к фторхинолонам.

Частота встречаемости единичных мутаций в QRDR *gyrA*

Выявленные в QRDR *gyrA* единичные мутации локализовались в кодонах 88, 90, 91 или 94 (табл. 1). Наиболее часто мутации обнаруживали в 94-ом кодоне гена (496/699, 70,96%; 95% ДИ: 67,49–74,20%) и были представлены пятью вариантами однонуклеотидных полиморфизмов, среди которых наиболее часто встречалась замена D94G (291/496, 58,67%; 95% ДИ: 54,29–62,92% среди мутаций в кодоне 94 и 291/699, 41,63%; 95% ДИ: 38,03–45,32% среди МБТ с единичными мутациями в гене *gyrA*). Второй по частоте встречаемости была замена A90V (149/699, 21,32%; 95% ДИ: 18,44–24,50%). Суммарно МБТ с мутациями D94G и A90V составляли более половины случаев от числа всех МБТ с единичными мутациями в *gyrA* — 440/699 (62,95%; 95% ДИ: 59,31–66,45%).

Фенотипическая чувствительность к левофлоксацину

Фенотипическая чувствительность к левофлоксацину была определена для МБТ, выделенных культуральным методом из диагностического материала 1326 пациентов. Определение мутаций в *gyrA* этих изолятов МБТ показало, что в 846 случаях были выявлены МБТ с *gyrA* дикого типа, в 480 случаях — с единичными мутациями в *gyrA*. МБТ с *gyrA* дикого типа преимущественно были чувствительны к левофлоксацину (814/846, 96,22%, 95% ДИ: 94,71–97,31%), а МБТ с мутациями, как правило, были устойчивы к левофлоксацину (448/480, 93,33%, 95% ДИ: 90,74–95,24%) (табл. 2).

Таблица 3. Представленность мутантных по *gyrA* вариантов МБТ в группах впервые выявленных и ранее леченых больных туберкулезом

Категория больных	Число изолятов с мутацией, абс. (%)							
	G88C	A90V	S91P	D94A	D94N	D94G	D94H	D94Y
ВВ (<i>n</i> = 239)	0 (0,00)	60 (25,10)	12 (5,02)	30 (12,55)	21 (8,79)	110 (46,03)	0 (0,00)	6 (2,51)
РЛ (<i>n</i> = 264)	1 (0,38)	44 (16,67)	25 (9,47)	41 (15,53)	16 (6,06)	117 (44,32)	6 (2,27)	14 (5,30)
<i>P</i> -value	0,341	0,038	0,066	0,375	0,26	0,776	0,02	0,117

Примечание: ВВ — впервые выявленные; РЛ — ранее леченые.

Полиморфизм мутантных по *gyrA* вариантов МБТ, выделенных от впервые выявленных и ранее леченых больных туберкулезом

Из 2836 больных туберкулезом легких, диагностический материал от которых был включен в исследование, 1253 пациента относились к категории впервые выявленных больных, 767 — к категории ранее леченых, а для 816 пациентов информации о статусе не было.

МБТ с диким типом *gyrA* чаще были выделены от впервые выявленных больных, чем от ранее леченых: из 1475 изолятов МБТ с *gyrA* дикого типа, выделенных от больных с известным статусом, 1012 (68,61%) были от впервые выявленных больных туберкулезом, а 463 (31,39%) — от ранее леченых пациентов (*p*-value ≤ 0,001). Мутантный вариант *gyrA* A90V достоверно чаще встречался в группе МБТ, выделенных от впервые выявленных больных; для остальных мутантных вариантов значимых различий выявлено не было (табл. 3).

Мутации в гене *gyrA* у МБТ с разным характером резистентности

По характеру резистентности изоляты МБТ с известной генотипической чувствительностью к фторхинолонам (в анализ не вошли случаи гетерорезистентности) были разделены на пять категорий: первая — МБТ с МЛУ, вторая — полирезистентные МБТ (устойчивые к любым сочетаниям противотуберкулезных препаратов, кроме одновременной к изониазиду и рифампицину), третья — монорезистентные к фторхинолонам, четвертая — монорезистентные к другим противотуберкулезным препаратам, кроме фторхинолонов, и пятая — чувствительные ко всем противотуберкулезным препаратам (табл. 4). МБТ с мутациями в *gyrA*, как правило, были с МЛУ или полирезистентными (суммарно 689/694,

99,28%, 95% ДИ: 98,32–99,69%). Моноустойчивость к фторхинолонам встречалась очень редко (5/694, 0,72%, 95% ДИ: 0,31–1,68); в четырех случаях такие МБТ имели мутацию в *gyrA* D94A и в одном случае — D94G. МБТ с *gyrA* дикого типа приблизительно в равных долях входили в категорию МБТ с МЛУ и в категорию МБТ, чувствительных ко всем противотуберкулезным препаратам.

Гетерорезистентность и множественные мутации

Описанные выше изоляты МБТ имели одинаковую структуру QRDR *gyrA* (дикий тип или единичная мутация) во всех образцах, полученных от одного и того же пациента в динамике. Однако у 55 пациентов данные по структуре QRDR *gyrA* при проведении динамического наблюдения различались (табл. 5).

Так, от 35 больных при исследовании диагностического материала в процессе химиотерапии выделены МБТ с различной структурой QRDR *gyrA*. Из них в 22 случаях в разных образцах, выделенных от больного, были выявлены МБТ как с *gyrA* дикого типа, так и с мутациями. У МБТ, выделенных от 15 пациентов, был обнаружен *gyrA* дикого типа и с единичными мутациями, преимущественно D94G (табл. 5, п.1.1.1). От семи больных были выделены МБТ с *gyrA* дикого типа и с множественными мутациями (табл. 5, п.1.1.2). В трех из этих семи случаев было доказано сосуществование двух разных пулов МБТ с единичными мутациями, а не одного пула со сдвоенной мутацией в *gyrA*, так как в динамике выделялись образцы и с единичной мутацией. В четырех из семи случаев наличие двух пулов с единичными мутациями или одного со сдвоенной мутацией в *gyrA* доказано не было.

От 13 больных на разные сроки были получены образцы, из которых выделялись МБТ с разными

Таблица 4. Изоляты МБТ с различным профилем резистентности с различной структурой *gyrA**

Характер резистентности/Мутация	Частота встречаемости у МБТ с мутацией в <i>gyrA</i> , абс. (%; 95% ДИ)				
	МЛУ	Поли	Моно к ФХ	Моно к др. ПТП	sens
G88C (<i>n</i> = 1)	1 (100; 20,65–100)	–	–	–	–
A90V (<i>n</i> = 149)	140 (93,96; 88,92–96,79)	9 (6,04; 3,21–11,08)	–	–	–
S91P (<i>n</i> = 53)	52 (98,11; 90,06–99,67)	1 (1,89; 0,33–9,94)	–	–	–
D94A (<i>n</i> = 102)	92 (90,20; 82,89–94,59)	6 (5,88; 2,72–12,24)	4 (3,92; 1,54–9,65)	–	–
D94N (<i>n</i> = 54)	49 (90,74; 80,09–95,98)	5 (9,26; 4,02–19,91)	–	–	–
D94G (<i>n</i> = 287)	270 (94,08; 90,72–96,27)	16 (5,57; 3,46–8,86)	1 (0,35; 0,06–1,95)	–	–
D94H (<i>n</i> = 10)	10 (100,00; 72,25–100)	–	–	–	–
D94Y (<i>n</i> = 38)	35 (92,11; 79,20–97,28)	3 (7,89; 2,72–20,80)	–	–	–
Всего с единичной мутацией (<i>n</i> = 694)	649 (93,52; 91,43–95,12)	40 (5,76; 4,26–7,75)	5 (0,72; 0,31–1,68)	–	–
WT (<i>n</i> = 1412)	779 (55,17; 52,57–57,75)	–	–	54 (3,82; 2,94–4,96)	579 (41,01; 38,47–43,59)
Всего (<i>n</i> = 2106)	1428 (67,81; 65,78–69,77)	40 (1,90; 1,40–2,58)	5 (0,24; 0,10–0,55)	54 (2,56; 1,97–3,33)	579 (27,49; 25,63–29,44)

Примечание: МЛУ — множественная лекарственная устойчивость; Поли — полирезистентность; Моно — монорезистентность; ФХ — фторхинолоны; ПТП — противотуберкулезные препараты; sens — чувствительные к ПТП; WT — дикий тип *gyrA*; * — при анализе учитывали только образцы с известным характером резистентности.

Таблица 5. Гетерорезистентность к фторхинолонам

Описание	Число (абс.)	Категория больных			Характер устойчивости к ПТП			
		ВВ	РЛ	Неизв.	МЛУ	Поли	Моно ФХ	н/д
1. Разная структура QRDR <i>gyrA</i> в разных образцах от одного больного, из них:	35	1	27	7	31	1	2	1
1.1 Последовательное выделение из разных образцов МБТ с WT <i>gyrA</i> и <i>gyrA</i> мутациями, включая	22	1	18	3	18	1	2	1
1.1.1 WT + единичные мутации (2 пула):	15	1	11	3	12	1	1	1
WT + D94G	9	–	8	1	7	1	–	1
WT + A90V	4	1	2	1	3	–	1	–
WT + D94N	1	–	–	1	1	–	–	–
WT + D94Y	1	–	1	–	1	–	–	–
1.1.2 WT + множественные мутации	7	–	7	–	6	–	1	–
1.1.2.1 (3 пула)	5	–	5	–	4	–	1	–
WT + D94G + S91P	1	–	1	–	–	–	1	–
WT + D94G + A90V	1	–	1	–	1	–	–	–
WT + D94G + D94N, потом только D94N	1	–	1	–	1	–	–	–
WT + D94G + D94N, потом только D94G	1	–	1	–	1	–	–	–
WT + D94G + A90V потом только D94G	1	–	1	–	1	–	–	–
1.1.2.2 (4 пула)	2	–	2	–	2	–	–	–
WT + A90V + S91P + D94N	1	–	1	–	1	–	–	–
WT + A90V + D94G + D94N	1	–	1	–	1	–	–	–
1.2 Последовательное выделение из разных образцов МБТ с разными мутациями в <i>gyrA</i>	13	–	9	4	13	–	–	–
1.2.1 Разные единичные мутации (2 пула)	8	–	6	2	8	–	–	–
A90V или D94G	4	–	2	2	4	–	–	–
A90V или D94A	1	–	1	–	1	–	–	–
D94H или D94Y	1	–	1	–	1	–	–	–
D94G или D94N	1	–	1	–	1	–	–	–
D94G или D94H	1	–	1	–	1	–	–	–
1.2.2 Чередувание сдвоенной и единичной	5	–	3	2	5	–	–	–
1.2.2.1 (2 пула)	4	–	2	2	4	–	–	–
D94G + A90V или A90V	1	–	1	–	1	–	–	–
D94G + A90V или D94G	1	–	1	–	1	–	–	–
A90V + S91P или A90V	1	–	–	1	1	–	–	–
D94N + D94G или D94G	1	–	–	1	1	–	–	–
1.2.2.2 (3 пула)	1	–	1	–	1	–	–	–
A90V + D94N + D94Y или A90V	1	–	1	–	1	–	–	–
2 Разные варианты QRDR в одном образце	5	1	4	–	3	1	1	–
2.1 (2 пула)	4	1	3	–	2	1	1	–
WT + D94G	1	–	1	–	1	–	–	–
WT + A90V	1	–	1	–	–	1	–	–
WT + S91P	1	–	1	–	1	–	–	–
WT + D94N	1	1	–	–	–	–	1	–
2.2 (3 пула)	1	–	1	–	1	–	–	–
WT + D94Y + A90V + (A90V и D94Y)	1	–	1	–	1	–	–	–
3. Сдвоенная мутация	15	–	9	6	11	4	–	–
A90V + D94N	3	–	–	2	2	–	–	–
S91P + D94A	5	–	4	1	3	2	–	–
S91P + D94G	1	–	–	1	1	–	–	–
A90V + D94A	2	–	1	1	2	–	–	–
A90V + D94H	3	–	3	–	1	2	–	–
A90V + D94G	1	–	–	1	1	–	–	–
S91P + D94N	–	–	1	–	1	–	–	–
Всего	55	2	40	13	45	6	3	1
Из них:	–	–	–	–	–	–	–	–
2 пула*	46	2	31	13	37	6	2	1
3 пула	7	–	7	–	6	–	1	–
4 пула	2	–	2	–	2	–	–	–

Примечание: ВВ — впервые выявленные; РЛ — ранее леченые; ПТП — противотуберкулезные препараты; ФХ — фторхинолоны; МЛУ — множественная лекарственная устойчивость; Поли — полирезистентность; Моно — монорезистентность; н/д — нет данных; WT — дикий тип *gyrA*; * — включены случаи выявления двойной мутации в *gyrA*.

единичными мутациями (восемь из 13) или чередовались образцы со сдвоенными мутациями и с единичной мутацией (пять из 13), что могло свидетельствовать о нахождении в организме нескольких пулов МБТ, мутантных по *gyrA* (табл. 5, п. 1.2).

В пяти случаях гетерорезистентность была выявлена при проверке случаев несовпадения результатов фенотипической и генотипической устойчивости: в диагностическом образце выявляли ДНК МБТ с мутациями в *gyrA*, а полученная из образца культура МБТ была фенотипически чувствительной к левофлоксацину, и наоборот. В этом случае повторно многократно (до восьми раз) определяли мутации в *gyrA* в имеющихся образцах ДНК, а также заново выделяли ДНК из диагностического образца и проводили анализ на наличие мутаций в *gyrA*. Для каждого из этих пяти случаев в серии определения мутаций в *gyrA* были получены результаты, как совпадающие с полученным изначально, так и отличающиеся от него, что могло служить доказательством наличия в одном диагностическом образце смешанной популяции МБТ (табл. 5, п. 2).

Еще в 15 случаях в одном образце (для исследования был доступен единственный образец от каждого больного) нами были зафиксированы двойные мутации (табл. 5, п. 3). Как правило, это была одна из двух наиболее часто встречающихся мутаций (D94G или A90V) в комбинации с одной из редких мутаций (девять из 15 случаев), или, в пяти из 15 случаев, одновременно обнаруживали две редкие мутации, причем только сочетание S91P + D94A. МБТ с двумя наиболее распространенными мутациями (D94G или A90V) были выделены только от одного больного. Во всех 15 случаях при повторных постановках ПЦР с ДНК, выделенной из диагностического образца, наличие двух мутаций повторялось. Это свидетельствовало о том, что от одного больного или выделялся один пул МБТ, в геноме которых была сдвоенная мутация в *gyrA*, или в равном соотношении выделялось два пула МБТ, каждый со своей единичной мутацией в *gyrA*. Так как диагностический материал от пациентов в этих случаях был получен однократно, динамические наблюдения, позволяющие уточнить полученные данные, проведены не были.

Таким образом, нами было показано, что в организме одного пациента могло быть от двух до четырех пулов МБТ с разной структурой QRDR *gyrA*. Чаще всего смешанные популяции были представлены двумя пулами МБТ (46/55, 83,64%, если включать в анализ 15 случаев со сдвоенными мутациями с недоказанной принадлежностью к двум разным пулам). Из них в 19 случаях популяция состояла из пула МБТ с *gyrA* дикого типа и пула МБТ с единичными мутациями в *gyrA*. В остальных случаях (27, если включать 15 случаев со сдвоенными мутациями, для которых не получены данные в динамике) популяция МБТ была представлена двумя пулами МБТ с разными мутациями в *gyrA*.

В семи случаях популяция МБТ в одном пациенте была представлена тремя пулами с разной структурой *gyrA*. В шести случаях один из пулов МБТ был с *gyrA* дикого типа и два — с различающимися мутациями в *gyrA*, а в одном случае — все три пула МБТ имели различающиеся мутации в *gyrA*. Сосуществование в пациенте трех пулов МБТ с разной структурой *gyrA* в пяти из семи случаев было доказано наблюдениями в динамике.

У двух пациентов можно было предположить наличие четырех пулов МБТ с разной структурой QRDR *gyrA*, когда из двух образцов диагностического материала были выделены в одном случае чувствительные МБТ,

в другом случае выявлены три мутации в *gyrA*. Так как сложно предположить, что в результате независимых последовательных процессов спонтанного мутагенеза возникнет сразу три мутации в одном участке гена, логично предположить существование трех независимых пулов МБТ с разными мутациями.

Как правило, смешанные популяции МБТ выделяли от ранее леченых больных (40/55, 72,73%, 95% ДИ: 59,77–82,72), в основном это были МБТ с МЛУ (45/55, 81,82%, 95% ДИ: 69,67–89,81). Но в 2/55 случаях смешанные популяции МБТ были выделены от впервые выявленных больных и характеризовались монорезистентностью к левофлоксацину.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для изучения разнообразия мутаций в QRDR гена *gyrA* МБТ было проведено ретроспективное исследование, охватывающее значительное число случаев туберкулеза за период 2011–2019 гг.

Из восьми выявленных мутантных вариантов семь относились к высоко достоверным для формирования устойчивости к фторхинолонам [8]. Преобладающими были мутации D94G и A90V, что характерно для мировой популяции в целом [6, 7]. Установленная нами частота встречаемости этих мутаций (40,42% для D94G и 21,26% для A90V) была несколько выше, чем в общемировой популяции (21–32% и 13–20% соответственно) [6].

В представленном исследовании показано, что наличие мутаций в QRDR *gyrA* в большинстве случаев было ассоциировано с фенотипической устойчивостью к фторхинолонам, однако в единичных случаях при выявлении мутаций в *gyrA* МБТ устойчивостью к фторхинолонам культуральным методом не установлена, что при проведении дополнительных исследований было объяснено гетерорезистентностью популяции МБТ. Известно, что, если при определении фенотипической и генотипической чувствительности к фторхинолонам доля одного из штаммов в смеси составляет менее 5%, его генотип и фенотип не определяется и результат исследования отражает характеристику доминирующего в смеси штамма [11]. Это важно учитывать при интерпретации несовпадения результатов определения чувствительности к фторхинолонам культуральным и молекулярно-генетическими методами, так как нельзя исключить или изначально низкое содержание в смеси клеток МБТ одного из генотипов, или вероятность неравномерного распределения клеток МБТ с разным генотипом между пробами, взятыми для молекулярно-генетических и культуральных исследований.

При выявлении мутации в *gyrA* D94A в 24-х из 73-х случаев (32,88%) МБТ были фенотипически чувствительны к левофлоксацину. Такой высокий процент сложно объяснить невыявленной гетерорезистентностью и ошибками культурального или генотипического тестирования. Кроме того, в других исследованиях тоже были описаны случаи, когда генотип *gyrA*_D94A соответствовал чувствительному фенотипу: в зависимости от исследованной популяции, фенотипическая чувствительность к фторхинолонам была отмечена у одного из семи и у четырех из 12 штаммов МБТ с этой мутацией [12, 13]. Следовательно, можно заключить, что мутация D94A, несмотря на то, что относится к высокодостоверным для формирования резистентности, не строго ассоциирована с устойчивостью к фторхинолонам.

Существует мнение, что широкое применение препаратов фторхинолонового ряда для терапии инфекций нетуберкулезной этиологии может приводить к возникновению устойчивости к фторхинолонам у больных с невыявленным туберкулезом [14]. В этом аспекте важно было оценить характер резистентности МБТ, устойчивых к фторхинолонам: ассоциация этого параметра с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя может служить индикатором того, что устойчивость к фторхинолонам развивается при терапии МЛУ-ТБ, а выявление случаев моноустойчивости к фторхинолонам, особенно у впервые выявленных больных, — индикатором формирования устойчивости МБТ к фторхинолонам при терапии других инфекционных заболеваний. Нами было показано, что генотипическая устойчивость МБТ к фторхинолонам в подавляющем большинстве случаев была ассоциирована с МЛУ: 649 из 694 (93,52%) изолятов с единичными мутациями в *gyrA* и 45 из 55 (81,00%) случаев смешанных популяций относились к категории МЛУ.

Полученные результаты доказывают, что формирование устойчивости к фторхинолонам у МБТ происходит в рамках терапии МЛУ-ТБ. Однако мы не можем исключить развитие устойчивости к фторхинолонам на фоне лечения нетуберкулезных заболеваний, так как МБТ с монорезистентностью к фторхинолонам тоже были выявлены. К сожалению, у нас отсутствуют данные, подтверждающие, что эти больные ранее получали терапию препаратами фторхинолонового ряда.

Изучение структуры геномов МБТ, циркулирующих в Самарской области, проведенное с использованием полногеномного секвенирования, позволило авторам заключить, что устойчивость к фторхинолонам МБТ скорее приобретает в процессе терапии, а случаи заражения человека устойчивыми к фторхинолонам клонами МБТ — редки. На основании этого наблюдения было сделано предположение, что развитие устойчивости к фторхинолонам приводит к снижению фитнеса МБТ [13]. В популяционном исследовании распространения первичной устойчивости МБТ к фторхинолонам на территории Новосибирской области также было показано, что формирование устойчивости к фторхинолонам происходит в большей степени в результате использования препаратов этой группы в химиотерапии МЛУ-ТБ [15].

Представленные здесь данные подтверждают также, что резистентность к фторхинолонам чаще возникает в процессе терапии: МБТ с мутациями в *gyrA* чаще выделяли от ранее леченых больных туберкулезом, чем от впервые выявленных. Однако нами было установлено, что и от впервые выявленных больных туберкулезом могут быть выделены устойчивые к фторхинолонам МБТ. В этом случае преобладающими мутациями в *gyrA* были D94G и A90V, причем частота встречаемости мутации A90V у МБТ, выделенных от впервые выявленных больных, была достоверно выше, чем среди ранее леченых, из чего можно заключить, что МБТ с этой мутацией достаточно активно передаются от человека к человеку.

Показанная нами возможность существования в одном пациенте нескольких популяций МБТ, различающихся мутациями в *gyrA*, указывает на процесс формирования в популяции устойчивости к фторхинолонам. В ряде исследований также было показано, что в одном диагностическом образце может присутствовать несколько клонов МБТ, различающихся структурой *gyrA*; частота встречаемости таких образцов составляла 1—3% от общего числа, что согласуется с полученными нами результатами [16–18].

Таким образом, нами было показано, что в популяции МБТ, циркулирующих в РФ, в настоящий момент формируется устойчивость к фторхинолонам, как правило, на фоне уже существующей МЛУ. Развитие устойчивости МБТ к фторхинолонам имеет хорошие эволюционные перспективы, так как формируется на благоприятном генетическом фоне в рамках терапии туберкулеза с МЛУ возбудителя, которая обусловлена комбинацией мутаций, не снижающих фитнес МБТ [19]. Тот факт, что МБТ с мутациями в *gyrA* D94G и A90V с достаточно высокой частотой встречались и у впервые выявленных больных туберкулезом, позволяет заключить, что именно эти мутанты будут играть основную роль в распространении преШЛУ-туберкулеза на территории РФ.

ВЫВОДЫ

Ретроспективный анализ спектра мутаций в QRDR *gyrA* МБТ, выделенных в 2011–2019 гг. годах показал, что генотипическая устойчивость к фторхинолонам была выявлена у 26,96% клинических изолятов МБТ, включая случаи гетерорезистентности. Преобладали мутации D94G и A90V, частота встречаемости которых суммарно составила 62,95% от числа МБТ с единичной мутацией в гене *gyrA*. Было также показано, что эти две мутации с достаточно высокой частотой встречались у МБТ, выделенных от впервые выявленных больных (D94G — у 46,03% и A90V — у 25,10% МБТ этой группы), что подтверждает успешное распространение этих мутантных вариантов МБТ в современной популяции. Наличие мутаций в *gyrA*, как правило, было ассоциировано с фенотипической устойчивостью к левофлоксацину, кроме мутации D94A, которая сопровождалась фенотипической устойчивостью к левофлоксацину только в 67% случаев. Мутации в *gyrA* встречались в основном у МБТ с МЛУ — 93,52% штаммов с мутацией в *gyrA* также были устойчивы к рифампицину и изониазиду. Полученный результат доказывает, что устойчивость к фторхинолонам возникает в процессе лечения МЛУ-ТБ. Кроме того, в 2,31% случаев были выявлены гетерорезистентные популяции МБТ, в состав которых входило два–четыре пула МБТ с разной структурой QRDR *gyrA*. Наличие гетерорезистентности к фторхинолонам свидетельствует об активном формировании устойчивости к этой группе препаратов в современных условиях.

Литература

1. Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization, 2022.
2. Васильева И. А., Тестов В. В., Стерликов С. А. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в годы пандемии COVID-19 – 2020–2021 гг. Туберкулез и болезни легких. 2022; 100 (3): 6–12.
3. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment: drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization, 2020.

4. Singh R, Dwivedi SP, Gaharwar US, Meena R, Rajamani P, Prasad T. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Appl Microbiol* 2020. 128 (6): 1547–67.
5. Miotto P, Zhang Y, Cirillo DM, Yam WC. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. *Respirology* 2018. 23 (12): 1098–1113.
6. Avalos E, Catanzaro D, Catanzaro A, Ganiats T, Brodine S, Alcaraz J et al. Frequency and geographic distribution of *gyrA* and *gyrB* mutations associated with fluoroquinolone resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review. *PLoS One*. 2015; 10 (3): e0120470.
7. Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF, Mayer C, Cambau E, Aubry A. 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.
8. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med*. 2009; 6 (2): e2.
9. Siddiqi SH, Rusch-Gerdes S. MGIT procedure manual for BACTEC MGIT 960TB System. 2006.
10. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. Geneva: World Health Organization, 2018.
11. Rigouts L, Miotto P, Schats M, Lempens P, Cabibbe AM, Galbiati S, et al. Fluoroquinolone heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*: detection by genotypic and phenotypic assays in experimentally mixed populations. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 11760.
12. Chan RC, Hui M, Chan EW, Au TK, Chin ML, Yip CK et al. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59 (5): 866–73.
13. Casali N, Nikolayevskiy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet*. 2014; 46 (3): 279–86.
14. Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3 (7): 432–42.
15. Батыршина Я. Р., Петренко Т. И., Филимонов П. Н. Лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам в Новосибирской области: результаты популяционного исследования. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013; 15 (1): 56–65.
16. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 1767–72.
17. Duong DA, Nguyen TH, Nguyen TN, Dai VH, Dang TM, Vo SK et al. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53 (11): 4835–9.
18. van Doorn HR, An DD, de Jong MD, Lan NT, Hoa DV, Quy HT, et al. Fluoroquinolone resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* with locked nucleic acid probe real-time PCR. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008; 12 (7): 736–42.
19. Эргешов А., Андреевская С. Н., Ларионова Е. Е., Смирнова Т. Г., Черноусова Л. Н. Спектр мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, у клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* отражает трансмиссивность мутантных клонов. *Молекулярная биология*. 2017; 51 (4): 595–602.

References

1. Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization, 2022.
2. Vasilyeva IA, Testov VV, Sterlikov SA. Tuberculosis Situation in the Years of the COVID-19 Pandemic – 2020-2021. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2022; 100 (3): 6–12. Russian.
3. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment: drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization, 2020.
4. Singh R, Dwivedi SP, Gaharwar US, Meena R, Rajamani P, Prasad T. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Appl Microbiol*. 2020; 128 (6): 1547–67.
5. Miotto P, Zhang Y, Cirillo DM, Yam WC. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. *Respirology*. 2018; 23 (12): 1098–1113.
6. Avalos E, Catanzaro D, Catanzaro A, Ganiats T, Brodine S, Alcaraz J et al. Frequency and geographic distribution of *gyrA* and *gyrB* mutations associated with fluoroquinolone resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review. *PLoS One*. 2015; 10 (3): e0120470.
7. Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF, Mayer C, Cambau E, Aubry A. 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.
8. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med*. 2009; 6 (2): e2.
9. Siddiqi SH, Rusch-Gerdes S. MGIT procedure manual for BACTEC MGIT 960TB System. 2006.
10. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. Geneva: World Health Organization. 2018.
11. Rigouts L, Miotto P, Schats M, Lempens P, Cabibbe AM, Galbiati S, et al. Fluoroquinolone heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*: detection by genotypic and phenotypic assays in experimentally mixed populations. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 11760.
12. Chan RC, Hui M, Chan EW, Au TK, Chin ML, Yip CK et al. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59 (5): 866–73.
13. Casali N, Nikolayevskiy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet*. 2014; 46 (3): 279–86.
14. Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3 (7): 432–42.
15. Батыршина ЯР, Петренко ТИ, Филимонов ПН. Лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам в Новосибирской области: результаты популяционного исследования. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013; 15 (1): 56–65. Russian.
16. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 1767–72.
17. Duong DA, Nguyen TH, Nguyen TN, Dai VH, Dang TM, Vo SK et al. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53 (11): 4835–9.
18. van Doorn HR, An DD, de Jong MD, Lan NT, Hoa DV, Quy HT et al. Fluoroquinolone resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* with locked nucleic acid probe real-time PCR. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008; 12 (7): 736–42.
19. Ergeshov A, Andreevskaya SN, Larionova EE, Smirnova TG, Chernousova LN. The Spectrum of Mutations in Genes Associated with Resistance to Rifampicin, Isoniazid, and Fluoroquinolones in the Clinical Strains of *M. tuberculosis* Reflects the Transmissibility of Mutant Clones. *Mol Biol (Mosk)*. 2017; 51 (4): 595–602. Russian.