

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.24-002.5-002.5[576.8:579.716.5]

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-158-167>

Поступила в редакцию 19.09.2022

Received 19.09.2022

В. В. Слипень, Л. К. Суркова, Г. Л. Гуревич<sup>1</sup>*Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии,  
Минск, Республика Беларусь*

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР С ГИДРОЛИЗНЫМИ ЗОНДАМИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ФТОРХИНОЛОНАМ У *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

**Аннотация.** Ранняя диагностика резистентности к фторхинолонам дает возможность своевременно начать адекватную терапию и повышает шансы на благоприятный исход заболевания. Использование молекулярно-генетических методов исследования позволяет получить в течение 1–2 сут результаты определения устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным лекарственным средствам, в то время как при использовании классических методов результаты становятся известны почти через 1–2 мес.

Цель работы – разработка метода детекции *M. tuberculosis* и точечных мутаций в 90, 91, 94-м кодонах *gyrA* гена, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам.

Исследовано 88 культур микобактерий: *M. tuberculosis* ( $n = 81$ ), *M. tuberculosis* H37Rv, *M. chelonae* ( $n = 1$ ), *M. gordonae* ( $n = 1$ ), *M. fortuitum* ( $n = 1$ ) и 3 изолята других нетуберкулезных микобактерий. Типы мутаций в гене *gyrA* изучены с помощью разработанного метода ПЦР в реальном времени, стандартного метода GenoType MTBDRsl (HAIN, Германия) и секвенирования по Сэнгеру. Анализ мутаций в *gyrA* гене 78 изолятов *M. tuberculosis* показал, что доминирующими были мутации p.Asp94Gly и p.Ala90Val, которые идентифицированы у 21 и 27 изолятов соответственно: в структуре мутаций на их долю приходится 64 %. У *M. tuberculosis* встречались также мутации p.ASP94ALA и p.ASP94TYR/HIS – у 6 (8,0 %) и 9 (12,0 %) изолятов соответственно. У одного штамма присутствовала мутация в 88-м кодоне и у одного штамма найдена двойная мутация (ALA90VAL и ASP94GLY). Результаты по выявлению мутаций разработанным методом ПЦР в реальном времени совпадают с результатами GenoType MTBDRsl и секвенирования.

Разработанный метод ПЦР в реальном времени демонстрирует высокую частоту совпадений с данными фенотипического определения устойчивости к офлоксацину и результатами тестирования с помощью стандартного метода GenoType MTBDRsl и секвенирования. С помощью данного метода можно выявлять возбудителей туберкулеза, дискриминировать мутации p.ALA90VAL, p.SER91PRO, p.ASP94ALA, p.ASP94TYR/HIS, p.ASP94GLY, p.ASP94ASN, что позволяет диагностировать устойчивость к фторхинолонам.

**Ключевые слова:** микобактерии туберкулеза, устойчивость к фторхинолонам, мутации в гене *gyrA*, гидролизные зонды для детекции мутаций устойчивости к фторхинолонам, диагностика форм лекарственно-устойчивого туберкулеза

**Для цитирования:** Слипень, В. В. Использование ПЦР с гидролизными зондами для выявления мутаций устойчивости к фторхинолонам у *Mycobacterium tuberculosis* / В. В. Слипень, Л. К. Суркова, Г. Л. Гуревич // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2023. – Т. 20, № 2. – С. 158–167. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-158-167>

Veronika V. Slizen, Larissa K. Surkova, Gennady L. Gurevich

*Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiatry, Minsk, Republic of Belarus*

## PCR WITH HYDROLYSIS PROBES FOR DETECTION OF FLUOROQUINOLONE RESISTANCE MUTATIONS IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

**Abstract.** Early diagnostics of resistance to fluoroquinolones facilitates early start of adequate therapy and increases the chance of a favorable outcome of the tuberculosis. Application of genetic methods permits to obtain within 1–2 days the results of *Mycobacterium tuberculosis* resistance detection to anti-tuberculosis drugs, unlike the classical methods requiring up to 1–2 month.

The aim of the study is to develop a method for the *M. tuberculosis* identification and detection of point mutations in codons 90, 91, 94 of the *gyrA* gene associated with the resistance to fluoroquinolones.

There were 88 cultures of mycobacteria studied: *M. tuberculosis* ( $n = 81$ ), *M. tuberculosis* H37Rv, *M. chelonae* ( $n = 1$ ), *M. gordonae* ( $n = 1$ ), *M. fortuitum* ( $n = 1$ ), and other three isolates of non-tuberculosis mycobacteria isolated from patients in the Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiatry. The types of mutations in the *gyrA* gene were studied by the standard GenoTypeMTBDRsl method (HAIN, Germany), Sanger sequencing, and by the developed real-time

PCR method. Based on the analysis of mutations in the *gyrA* gene in 78 isolates of *M. tuberculosis*, the dominant mutations were found to be mutations Asp94Gly and Ala90Val, which were identified in 21 and 27 isolates correspondingly: they accounted for 64 % of all mutations. *M. tuberculosis* also harbored mutations p.ASP94ALA and p.ASP94TYR/HIS in 6 (8.0 %) and 9 (12.0 %) isolates, respectively. One strain harbored a mutation at triplet 88 and one strain had a double mutation (p.ALA90VAL and p.ASP94GLY). The developed real-time PCR method demonstrated a high frequency of coincidence of results with the phenotypic determination of resistance to ofloxacin and the results testing by the standard GenoTypeMTBDRsl method and sequencing.

The developed method is accomplished to identify *M. tuberculosis*, and discriminate mutations p.ALA90VAL, p.SER91PRO, p.ASP94ALA, p.ASP94TYR/HIS, p.ASP94GLY, p.ASP94ASN providing diagnostics of resistance to fluoroquinolones.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, resistance to fluoroquinolones, mutations in the *gyrA* gene, hydrolysis probes for the detection of resistance to fluoroquinolones mutations, diagnostics of forms of drug-resistant tuberculosis

**For citation:** Slizen V. V., Surkova L. K., Gurevich G. L. PCR with hydrolysis probes for detection of fluoroquinolone resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya meditsynskikh nauk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 2, pp. 158–167 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-158-167>

**Введение.** Эпидемиология туберкулеза (ТБ) в современных условиях в Республике Беларусь характеризуется сохранением высокого уровня множественно и широко лекарственно-устойчивого (МЛУ, ШЛУ) ТБ как среди впервые выявленных, так и среди ранее леченных пациентов [1, 2]. Лекарственно-устойчивый ТБ является серьезной проблемой здравоохранения во многих регионах мира, представляя серьезную угрозу в глобальном масштабе. Показатель заболеваемости туберкулезом в Беларуси в 2021 г. составлял 12,7 на 100 000 населения, при этом на МЛУ-ТБ в 2021 г. у впервые выявленных пациентов приходилось 37,8 %, у ранее леченых – 63,2 %. В 2021 г. было зарегистрировано 617 случаев МЛУ-ТБ.

В последние годы лекарственные средства группы фторхинолонов приобретают особое значение в лечении МЛУ-ТБ. К этой группе лекарственных средств *Mycobacterium tuberculosis* могут проявлять резистентность, формируя пул *M. tuberculosis* с пре-ШЛУ и ШЛУ [3]. В Беларуси доля ШЛУ-ТБ в 2021 г. среди впервые выявленных составляла 12,8 % (в 2018 г. – 16,2 %, в 2019 г. – 17,1 %), среди ранее леченых – 39,3 % (в 2018 г. – 50,6 %, в 2019 г. – 49,8 %) [4–6]. Резистентность к фторхинолонам МБТ с МЛУ резко ограничивает возможность лечения и уменьшает шанс на успех терапии, а сочетание ВИЧ-инфекции и ШЛУ МБТ почти всегда ведет к летальному исходу [7–10].

Ранняя диагностика устойчивости к фторхинолонам позволяет своевременно скорректировать терапию и увеличить шанс на благоприятный исход заболевания. Определение спектра резистентности к противотуберкулезным лекарственным средствам с использованием классических методов занимает длительный срок (до 1 мес.), что открывает перспективы для использования молекулярно-генетических методов исследования, с помощью которых результаты могут быть получены в течение 1–2 сут. Это диктует необходимость разработки методов экспресс-диагностики устойчивости к фторхинолонам МБТ.

Фторхинолоны ингибируют ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, которая разрывает и сшивает двухцепочечную ДНК, обеспечивая тем самым появление отрицательных суперзавитков в ДНК. ДНК-гираза необходима для процессов репликации, транскрипции, рекомбинации и состоит из двух субъединиц – А и В, кодируемых генами *gyrA* и *gyrB*. Топоизомераза IV является также гетеродимером и состоит из субъединиц ParC и ParE, кодируемых у микроорганизмов генами *parC* и *parE*. У большинства бактерий есть два фермента: ДНК-гираза и топоизомераза IV, в то время как у МБТ нет ParC и ParE, а ДНК-гираза одновременно обладает функцией топоизомеразы IV. Таким образом, ДНК-гираза – единственная мишень для антибиотиков фторхинолонового ряда у МБТ [3, 11–15].

Резистентность к фторхинолонам у 60–90 % изолятов микобактерий обусловлена мутациями в 21 bp фрагменте *gyrA* гена. Согласно данным исследований, проведенных в Швеции, Голландии, Испании, Китае и России, мутации в *gyrA* отмечаются у штаммов, у которых минимальная ингибирующая концентрация офлоксацина составляет более 2 мкг/мл (уровень, предложенный в качестве порогового для определения клинической резистентности). У МБТ мутации могут встречаться и в регионах за пределами 21 bp фрагмента *gyrA* гена, а также в *gyrB* гене, но присутствие мутаций в других локусах *gyrA* и *gyrB* не всегда сопряжено с формированием устойчи-

вости к фторхинолонам. Мутации в *gyrB* могут приводить к устойчивости к фторхинолонам, но уровень резистентности, а также разновидности препаратов, к которым он формируется, зависят от типа и локализации мутаций. Большинство исследователей из разных стран отмечают доминирование среди резистентных к фторхинолонам МБТ мутаций в *gyrA* гене в кодонах 88 (p.GLY88CYS), 89 (p.ASP89GLY), 90 (ALA90VAL), 91 (SER91PRO), 94 (p.ASP94GLY, p.ASP94ALA, p.ASP94HIS, p.ASP94TYR, p.ASP94ASN), что позволяет рассматривать эти кодоны как маркеры резистентности к фторхинолонам [10, 11, 13, 15–20]. Определение полиморфизма единичных нуклеотидов (ПЕН) в *gyrA* гене МБТ является важным клиническим аспектом диагностики, прогнозирования и профилактики распространения пре-ШЛУ и ШЛУ-ТБ. Внедрение в клиническую лабораторную практику высокоспецифичных и дискриминативных молекулярно-биологических методов открывает огромные перспективы в ранней диагностике лекарственной устойчивости и своевременной коррекции химиотерапии пре-ШЛУ и ШЛУ-ТБ.

Цель работы – разработать метод детекции *M. tuberculosis* и точечных мутаций в 90, 91, 94-м кодонах *gyrA* гена *M. tuberculosis*, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, с использованием ПЦР в реальном времени.

**Объекты и методы исследования.** Объектом исследований являлись 88 культур микобактерий: *M. tuberculosis* ( $n = 81$ ), *M. chelonae* ( $n = 1$ ), *M. goodii* ( $n = 1$ ), *M. fortuitum* ( $n = 1$ ), три изолята других видов нетуберкулезных микобактерий (18087, 18353, 18109), выделенных от пациентов в ГУ «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», а также референтный штамм *M. tuberculosis* H37Rv. Типы мутаций в гене *gyrA* изучены с помощью разработанного метода ПЦР в реальном времени, GenoType MTBDRsl (HAIN, Германия) и секвенирования по Сэнгеру.

**Выделение ДНК.** ДНК микобактерий экстрагировали путем нагревания суспензии МБТ при 98 °C в течение 20 мин в 5 %-ном Chelex-100 и 1×TAE буфере с последующим центрифугированием 20 мин при 13 000 g.

**Амплификация *gyrA* гена.** При проведении ПЦР локуса *gyrA* гена размером 320 п. о. использовали праймеры 320-GyrA-F (CAGCTACATCGACTATGCGA) и 320-GyrA-R (GGGCTNCGGTGTACCTCAT), взятые в концентрации 20 пкмоль на реакцию [21]. Отдельную ПЦР проводили с помощью реакционных смесей объемом 50 мкл, содержащих: 1×PCR буфер с  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мМ каждого дНТФ, 1,25 ед. Таq-полимеразы (ОАО «Праймтех»), по 20 пкмоль каждого праймера, 6–10 мкл образца ДНК. Использовали следующий режим амплификации: 95 °C – 5 мин, 38 циклов при 95 °C (35 с), 60 °C (40 с) и 72 °C (50 с). ПЦР-продукты (10 мкл) визуализировали гель-электрофорезом (100 мА – 60 мин) в 1,5 %-ном агарозном геле и 1×TAE буфере.

**Секвенирование по Сэнгеру.** Для определения мутаций в *gyrA* гене в локусе проводили секвенирование фрагмента этого гена (320 н. т.) у 33 клинических изолятов *M. tuberculosis*. Ампликоны очищали с помощью наборов QIAquick-spin PCR clean up columns (Qiagen) или GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma, NA1020) согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили с помощью набора для секвенирования ABI PRISM BigDye® Terminator 3.1, капиллярный секвенирующий электрофорез осуществляли на секвенаторе ABI PRISM® 310. Для секвенирующей ПЦР готовили реакционную смесь: 1,1 мкл праймера GyrA320 (в концентрации 1,6 пкмоль/мкл), BigDye Terminator (1,6 мкл), 3 мкл ПЦР-продуктов. Объем пробы доводили деионизованной безнуклеазной водой до 14 мкл, после чего импульсно ультрацентрифугировали и амплифицировали в режиме: 1) быстрый подъем температуры до 96 °C; 2) 32 цикла: 96 °C – 45 с; 60 °C – 3 мин 40 с; 65 °C – 50 с. Очистку продуктов секвенирования проводили путем добавления 2 мкл 3 М ацетата натрия и 20 мкл этанола (99,7 %) с последующим центрифугированием 40 мин при 13 000 об/мин при температуре 4 °C. Секвенирующий капиллярный электрофорез для каждой пробы ставили дважды, используя следующие режимы: инъекция – 50 с и 2,5 кВ, пробег – 12,2 кВ, 50 °C; инъекция – 30 с и 3 кВ, пробег – 12,2 кВ, 42 °C. Результаты секвенирования визуально проверяли на наличие ошибок расшифровки. Анализ секвенированного олигонуклеотида проводили с использованием программы BLAST или MEGA 5 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> и <http://www.megasoftware.net/>).

**Разработка праймеров и зондов для ПЦР в реальном времени с гидролизными зондами для выявления устойчивости к фторхинолонам.** Информацию о первичной структуре генов

*gyrA* и *rrs* *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (с целью выявления родоспецифических маркеров микобактерий) получали с использованием данных международных баз геномов GenBank, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>: код доступа, GenBank, NCBI – NC\_000962.2). С помощью онлайн-программ оценивали конформацию и силу связи образуемых олигонуклеотидов, температуру плавления вторичных структур (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Quickfold>, <http://www.atdbio.com/tools/oligo-calculator>), проводили проверку специфичности праймеров (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), рассчитывали образование гетеро- и аутодимеров и энергию их связи, а также температуру плавления олигонуклеотидов, в том числе LNA (<http://eu.idtdna.com/analyzer/ApplicationsOligoAnalyzer/>). Место отжига праймеров и зондов определяли с помощью программы <http://bioinformatics.org/seqext/>.

**ПЦР в реальном времени для определения мутаций, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам.** Для детекции мутаций, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, готовили 4 реакционные смеси. В реакционной смеси 1 присутствовали праймеры и зонды для идентификации МБТ и рода микобактерий: праймер прямой и обратный для МБТ (IS6110) – по 20 пмоль каждого, зонд для детекции МБТ – 10 пмоль, праймеры прямой и обратный для определения рода микобактерий – по 20 пмоль каждого, зонд для определения рода микобактерий (*rrs*<sub>598-77</sub>) – 10 пмоль. Мутации в 90-м и 91-м кодонах определяли в реакционной смеси 2. Ее состав был следующим (в пмоль): праймер прямой и обратный для *gyrA* гена – 25 и 15 соответственно, разработанный зонд к «дикому» типу кодонов 90 и 91 – 10, зонд к мутантному типу кодона 90 – 10, зонд к мутантному типу кодона 91 – 10, зонд к гену *gyrA* – 15. Реакционная смесь 3 содержала (в пмоль): праймер прямой и обратный для *gyrA* гена – 25 и 15 соответственно, зонд для детекции «дикого» типа кодона p.94ASP – 10, зонд для детекции мутации p.94ALA – 10, зонд для детекции мутации p.94 TYR/HIS – 10, зонд для контроля амплификации *gyrA* (*gyrA*<sub>215-233</sub>) – 15. Реакционная смесь 4 включала (в пмоль): праймер прямой и обратный для *gyrA* гена – 25 и 15 соответственно, зонд для детекции «дикого» типа кодона p.94ASP – 10, зонд для детекции мутации p.94GLY – 10, зонд для детекции мутации p.94ASN – 10, зонд для контроля амплификации *gyrA* (*gyrA*<sub>215-233</sub>) – 15. Во всех пробирках присутствовали следующие реагенты: 10×ПЦР-буфер с KCl – 5 мкл, 25 mM MgCl<sub>2</sub> – 5 мкл, раствор dNTP (5 ммоль/мл dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – 7,5 мкл, бетаин 5М – 5 мкл, трегалоза 5М – 5 мкл, Taq полимеразы – 2,5 ед., свободная от нуклеазы деионизованная вода – до 40 мкл, экстрагированная ДНК микобактерий – 10 мкл.

Режим амплификации с целью определения мутаций резистентности к фторхинолонам в *gyrA* гене был следующим: 95 °C – 10 мин, 50 циклов при 95 °C (35 с) и 60 °C (70 с). Детекцию флуоресценции проводили на стадии отжига (70 с при 60 °C) на каналах R6G (возбуждение – 526 нм, экстинкция – 555 нм), FAM (возбуждение – 492 нм, экстинкция – 517 нм), ROX (возбуждение – 580 нм, экстинкция – 605 нм), Cy5 (возбуждение – 649 нм, экстинкция – 666 нм). В качестве положительного контроля без мутаций в *gyrA* гене использован референс-штамм *M. tuberculosis* H37Rv.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0, Excel (Microsoft).

**Результаты и их обсуждение.** Кодон 90 характеризуется присутствием GCG в положениях 268, 269, 270 соответственно. В этом кодоне, как правило, происходит однотипная миссенс-мутация в положении 269, сопровождающаяся заменой GCG→GTG, которая приводит к замене кодируемой аминокислоты с аланина на валин. В кодоне 91 находятся нуклеотиды TCG в положениях 271, 272, 273. Однотипная мутация в этом кодоне происходит в положении 271 и сопровождается заменой TCG→CCG, что приводит к замене кодируемой аминокислоты с серина на пролин. В 94-м кодоне *gyrA* располагается триплет GAC, кодирующий аспарагиновую кислоту. Происходящие в этом кодоне мутации могут приводить к заменам на GCC, CAC, TAC и AAC, которые кодируют аланин, гистидин, тирозин, аспарагин. Разработанный метод предполагает определение мутаций в 90, 91, 94-м кодонах *gyrA* с использованием трех реакционных смесей. В реакционной смеси 1 по флуоресценции выше пороговой проводится выявление микроорганизмов из рода микобактерий и МБТ на каналах FAM и ROX соответственно, в реакционной смеси 2 происходит детекция мутаций в 90-м и 91-м кодонах, в реакционной смеси 3 определяются



мутации p.ASP94ALA, p.ASP94TYR/HIS, а в реакционной смеси 4 – мутации p.ASP94HIS и p.ASP94ASN. В разработанном методе используется подход парных зондов, когда в реакционной смеси присутствует два зонда – к «дикому» типу кодона и к мутированному, при этом зонды к «дикому» типу мечены флуорофором FAM, а два зонда – к двум вариантам мутаций (R6G и Cy5). Таким образом, в пробах с МБТ, имеющих мутации в 90, 91, 94-м кодонах, флуоресцирует зонд, меченный R6G либо Cy5, в то время как FAM-зонд к «дикому» типу кодонов не флуоресцирует. В пробах с МБТ, не имеющих мутаций в 90, 91, 94-м кодонах, флуоресцирует FAM-зонд, специфичный к «дикому» типу кодона, в то время как R6G и Cy5 зонды к «мутантному» типу кодонов не флуоресцируют. В реакционных смесях, в которых присутствует ДНК МБТ, выявляется флуоресценция на канале ROX, что является контролем амплификации *gyrA* гена. Появление мутаций другого типа на участке *gyrA*273-289/290 сопровождается исчезновением флуоресценции как на канале FAM, так и на каналах R6G и Cy5, при этом флуоресценция на канале ROX остается, что подтверждает наличие в образце МБТ (по наличию гена *gyrA*). В случае нетуберкулезных микобактерий и отсутствия МБТ в пробе флуоресценция отсутствует на всех каналах FAM, R6G, Cy5, ROX. Но в реакционной смеси 1 выявляется флуоресценция на канале FAM, что свидетельствует о присутствии микобактерий в образце. В табл. 1 приведен состав охранных зондов и праймеров для детекции мутаций, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам у МБТ. На рисунке приведены результаты получаемых кривых флуоресценции (RFU) с помощью разработанного метода.

Т а б л и ц а 1. Разработанные праймеры и зонды, необходимые для амплификации *gyrA* гена и выявления в нем мутаций в 90, 91 и 94-м кодонах

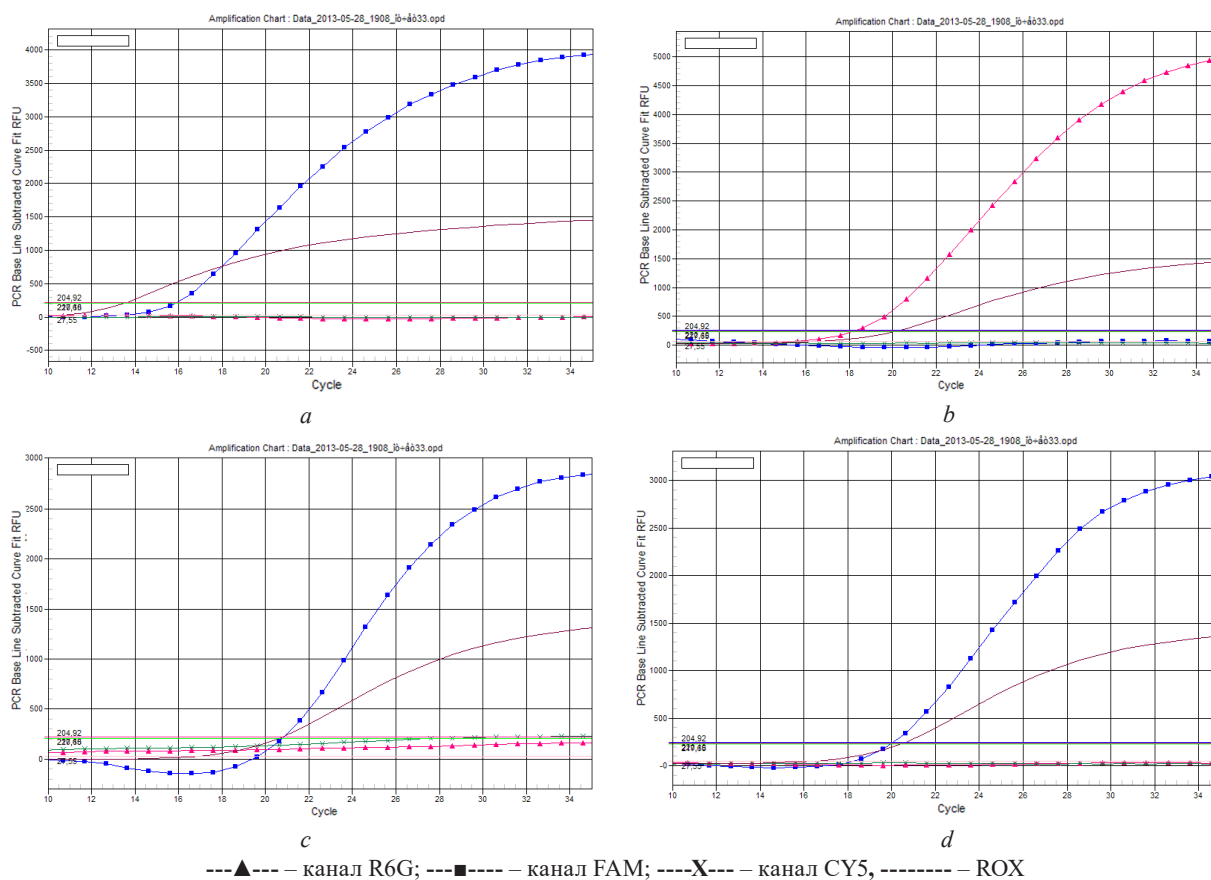
Table 1. Designed primers and probes for the *gyrA* gene amplification and detection of mutations at codons 90, 91, and 94

| Специфичность                                                             | Тип                                             | Флуорофор | Олигонуклеотид 5→3                      | Гаситель | Концентрация, пкмоль/мкл |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------|----------|--------------------------|
| Гидролизные пробы и праймеры реакционной смеси 1                          |                                                 |           |                                         |          |                          |
| Детекция <i>M. tuberculosis</i>                                           | Прямой IS 6110 F                                |           | TCGCCTACGTGGCCTTTG                      |          | 20                       |
|                                                                           | Обратный IS 6110 R                              |           | GGATAACGTCTTTCAGGTCGAGTAC               |          | 20                       |
|                                                                           | Проба                                           | ROX       | CGCTTCCACGATGGCCACCTC                   | BHQ-2    | 10                       |
| Детекция рода микобактерий                                                | Прямой <i>rrs</i> MB-F <sub>452-73</sub>        |           | ACCATCGACGAAGGTTCCGGGT                  |          | 20                       |
|                                                                           | Обратный <i>rrs</i> MB-R <sub>623-03</sub>      |           | ACGCTCACAGTTAAGCCGTGA                   |          | 20                       |
|                                                                           | Проба MB-pr <sub>598-77</sub>                   | FAM       | TCACGAACAACGCGACAAACCA                  | BHQ1     | 10                       |
| Праймеры для амплификации <i>gyrA</i> гена для реакционных смесей 2, 3, 4 |                                                 |           |                                         |          |                          |
| Праймеры для <i>gyrA</i> размером 194 п. о.                               | Прямой <i>gyrA</i> -F <sub>180-198</sub> /194   | Нет       | CGATTCGGGCTTCCGCCCG                     | Нет      | 15                       |
|                                                                           | Обратный <i>gyrA</i> -R <sub>374-353</sub> /194 | Нет       | CGGTGGGTCATTGCCTGGCG                    | Нет      | 25                       |
| Гидролизные пробы реакционной смеси 2                                     |                                                 |           |                                         |          |                          |
| Детекция GCG и TCG в 90-м и 91-м кодонах                                  | <i>gyrA</i> , 90-й и 91-й кодоны                | FAM       | ATCGACGCGTCGCCGTG                       | BHQ-1    | 10                       |
| Детекция GTG в 90-м кодоне                                                | <i>gyrA</i> , 90-й кодон                        | R6G       | TCGTAGATCGACACGTCGC                     | BHQ-1    | 10                       |
| Детекция CCG в 91-м кодоне                                                | <i>gyrA</i> , 91-й кодон                        | Cy5       | TCGTAGATCGGCGCGTCGC                     | BHQ-2    | 10                       |
| Контроль <i>gyrA</i>                                                      | <i>gyrA</i> ( <i>gyrA</i> <sub>215-233</sub> )  | ROX       | AGTCGGCCCGGTCGGTTGC                     | BHQ2     | 10                       |
| Гидролизные пробы реакционной смеси 3                                     |                                                 |           |                                         |          |                          |
| Детекция GAC в 94-м кодоне                                                | Детекция 94-го кодона «дикого» типа ASP         | FAM       | ACCAGGS[+T]G[+T]CG[+T]AGAT <sup>1</sup> | BHQ-1    | 10                       |
| Детекция GGC в 94-м кодоне                                                | Детекция 94-го кодона с мутацией GLY            | R6G       | ACCAGGS[+T]G[+C]CG[+T]AGAT <sup>1</sup> | BHQ-1    | 10                       |
| Детекция AAC в 94-м кодоне                                                | Детекция 94-го кодона с мутацией ASN            | Cy5       | CACCAGGSTGTTGTAGAT                      | BHQ-2    | 10                       |
| Контроль <i>gyrA</i>                                                      | <i>gyrA</i> ( <i>gyrA</i> <sub>215-233</sub> )  | ROX       | AGTCGGCCCGGTCGGTTGC                     | BHQ2     | 15                       |

Окончание табл. 1

| Специфичность                         | Тип                                            | Флуорофор | Олигонуклеотид 5→3                      | Гаситель | Концентрация, пкмоль/мкл |
|---------------------------------------|------------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------|----------|--------------------------|
| Гидролизные пробы реакционной смеси 4 |                                                |           |                                         |          |                          |
| Детекция gac в 94-м кодоне            | Детекция 94-го кодона «дикого» типа ASP        | FAM       | ACCAGGS[+T]G[+T]CG[+T]AGAT <sup>1</sup> | BHQ-1    | 10                       |
| Детекция gsc в 94-м кодоне            | Детекция 94-го кодона с мутацией ALA           | R6G       | CACCAGGSTGGCGTAGAT                      | BHQ-1    | 10                       |
| Детекция tac и sac в 94-м кодоне      | Детекция мутации TYR/HIS                       | Cy5       | AC[+C]AGGS[+T]GTRG[+T]AGAT              | BHQ-1    | 10                       |
| Контроль <i>gyrA</i>                  | <i>GyrA</i> ( <i>gyrA</i> <sub>215-233</sub> ) | ROX       | AGTCGGCCCCGGTCGGTTGC                    | BHQ2     | 15                       |

Примечание. В скобках приведено положение нуклеотидов с LNA (замкнутые нуклеиновые кислоты).



Пример определения мутации ALA90VAL в *gyrA* гене с помощью разработанного метода; культура *M. tuberculosis* 17801. Флуоресценция на канале R6G отмечается в реакционной смеси *b*, что свидетельствует о мутации ALA90VAL; *a* – детекция микобактерий и среди них МБТ, *b* – детекция мутаций ALA90VAL, SER91PRO; *c* – детекция мутации ASP94ALA и ASP94TYR/HIS; *d* – детекция мутации ASP94GLY, ASP94ASN. Флуоресценция на канале ROX в пробах *b, c, d* свидетельствует об амплификации *gyrA* гена

An example of results of ALA90VAL mutation detection in *gyrA* gene by the developed method; isolate *M. tuberculosis* 17801. Fluorescence at the R6G channel is observed in the reaction mixture *b*, which indicates an ALA90VAL mutation; *a* – detection of mycobacteria, including MBT; *b* – detection of mutations ALA90VAL, SER91PRO; *c* – detection of ASP94ALA and ASP94TYR/HIS mutations; *d* – detection of mutations ASP94GLY, ASP94ASN. Fluorescence at the ROX channel in samples *b, c, d* indicates amplification of the *gyrA* gene

На основании данных, полученных при секвенировании *gyrA* гена (секвенированы фрагменты размером 320 п. о. у 33 культур МБТ) и использовании стандартного метода GenoType MTBDRsl, охарактеризован профиль мутаций 78 изолятов МБТ. Результаты представлены в табл. 2.

При сравнительной оценке стандартного и разработанного методов изучены культуры *M. gordonae*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* и три культуры других нетуберкулезных микобактерий – 18087, 18353, 18109, которые проявляли фенотипическую устойчивость к фторхинолонам. При исследовании обоими методами они были идентифицированы как микобактерии, но не как МБТ. Референтный штамм *M. tuberculosis* H37Rv, согласно результатам исследования с помощью разработанного метода, идентифицирован как МБТ, не несущий мутации. Выявлены некоторые расхождения в результатах при определении методом секвенирования, стандартным и разработанным методами (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Результаты определения мутаций в *gyrA* гене с помощью разработанного метода ПЦР в реальном времени, GenoType MTBDRsl, и секвенирования по Сэнгеру

Table 2. Results of mutations detection in the *gyrA* gene by the developed real-time PCR method, GenoType MTBDRsl, and Sanger sequencing

| Изоляты<br><i>M. tuberculosis</i>                                                                 | Кол-во | Фенотип | Фенотип<br>GenoType<br>MTBDRsl | GenoType<br>MTBDRsl, HAIN   | Секвени-<br>рование | Разработанный<br>метод | Совпа-<br>дение |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------|------------------------|-----------------|
| Мутация p.ASP94GLY                                                                                |        |         |                                |                             |                     |                        |                 |
| 10952, 18628, 1499, 18413,<br>18338, 1542, 1535, 18128, 18754,<br>17928, 18112, 18023, 2305, 1602 | 14     | R       | R                              | ΔWT3, MUT3C<br>p.ASP94GLY   | 94GLY               | p.ASP94GLY             | Да              |
| 18152, 4588, 583, 2413, 6215,<br>4588, 16687                                                      | 7      | R       | R                              | ΔWT3, MUT3C<br>p.ASP94GLY   | –                   | p.ASP94GLY             | Да              |
| Мутация p.ASP94TYR/HIS                                                                            |        |         |                                |                             |                     |                        |                 |
| 18777, 5183, 633, 1481, 406                                                                       | 5      | R       | R                              | ΔWT3, MUT3D<br>p.ASP94HIS   |                     | p.ASP94TYR/HIS         | Да              |
| 18556, 18630, 1855, 18010                                                                         | 4      | R       | R                              | ΔWT3, MUT3D<br>p.ASP94HIS   | 94 TYR              | p.ASP94TYR/HIS         | Да              |
| Мутация p.SER91PRO                                                                                |        |         |                                |                             |                     |                        |                 |
| 1534, 1534, 1478, 6216                                                                            | 4      | R       | R                              | ΔWT2, MUT2<br>p.SER91PRO    |                     | p.SER91PRO             | Да              |
| 1477, 17800, 17974                                                                                | 3      | R       | R                              | ΔWT2, MUT2<br>p.SER91PRO    | 91PRO               | p.SER91PRO             | Да              |
| Мутация p.ALA90VAL                                                                                |        |         |                                |                             |                     |                        |                 |
| 17756, 17975, 18456, 16666,<br>1539, 1594, 583*, 7762, 667,<br>7562, 8190, 5995, 765, 621, 572    | 15     | R       | R                              | ΔWT2, MUT1,<br>p.ALA90VAL   |                     | p.ALA90VAL             | Да              |
| 18124, 1552, 17801, 1551, 17870,<br>18557, 1497, 18279, 1543, 1511,<br>1537, 1544                 | 12     | R       | R                              | ΔWT2, MUT1,<br>p.ALA90VAL   | 90VAL               | p.ALA90VAL             | Да              |
| Мутация p.ASP94ALA                                                                                |        |         |                                |                             |                     |                        |                 |
| 17757, 7729, 1347                                                                                 | 3      | R       | R                              | ΔWT3, MUT3A<br>p.ASP94ALA   |                     | p.ASP94ALA             | Да              |
| 17311, 18712, 1871                                                                                | 3      | R       | R                              | ΔWT3, MUT3A<br>p.ASP94ALA   | 94ALA               | p.ASP94ALA             | Да              |
| Другие мутации                                                                                    |        |         |                                |                             |                     |                        |                 |
| 1133                                                                                              | 1      | R       | R                              | C88S, A88T                  |                     | mut+, 90-, 91-         | Да              |
| Отсутствие мутаций                                                                                |        |         |                                |                             |                     |                        |                 |
| 17364, 18747, 15675, 17803,<br>536, 422, 4122                                                     | 7      | S       | S                              | wt1, wt2, wt3               | w                   | w                      | Да              |
| Расхождения при детекции фенотипическим, стандартным и разработанным методом                      |        |         |                                |                             |                     |                        |                 |
| 1547                                                                                              | 1      | S       | S                              | wt1, wt2, wt3               | 94GLY               | p.ASP94GLY             | Нет             |
| 1538                                                                                              | 1      | R       | S                              | –                           | 94ASN               | w                      | Нет             |
| 18981                                                                                             | 1      | R       | R–                             | ΔWT3, MUT3A<br>(p.ASP94ALA) | 94GLY               | p.ASP94GLY             | Нет             |

П р и м е ч а н и е. \* – две мутации в гене.

Доминирующими были мутации р.ASP94GLY и р.ALA90VAL, которые идентифицированы у 21 ( $25,9 \pm 5,0$  %) и 27 ( $33,3 \pm 5,3$  %) изолятов соответственно (в структуре мутаций микобактерий на их долю приходилось  $59,2 \pm 5,6$  %). У МБТ также встречались мутации р.ASP94ALA и р.ASP94TYR/HIS – у 6 ( $7,7 \pm 3,0$  %) и 9 ( $11,5 \pm 3,8$  %) изолятов соответственно. У одного штамма присутствовала мутация в 88-м кодоне и у одного штамма найдена двойная мутация (р.ALA90VAL и р.ASP94GLY).

Результаты по выявлению мутаций методом ПЦР в реальном времени совпадают с результатами GenoType MTBDRsl и секвенирования. Было выявлено три расхождения (табл. 2). Показатели чувствительности, специфичности, положительной предсказательной ценности, эффективности разработанного метода составили 90,5; 87,5; 97,1 и 90,0 % соответственно.

**Заключение.** Разработанный метод ПЦР в реальном времени демонстрирует высокую частоту совпадений результатов с данными фенотипического определения устойчивости к офлоксацину и результатами тестирования с помощью стандартного метода GenoType MTBDRsl и секвенирования.

Данный метод позволяет выявлять возбудителей туберкулеза, дискриминировать мутации ALA90VAL, SER91PRO, ASP94ALA, ASP94TYR/HIS, ASP94GLY, ASP94ASN и определять устойчивость *M. tuberculosis* к фторхинолонам.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список использованных источников

1. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in *gyrA* and *gyrB* / A. Von Groll [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53, N 10. – P. 4498–4500. <https://doi.org/10.1128/AAC.00287-09>
2. Population-based resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to pyrazinamide and fluoroquinolones: results from a multicountry surveillance project / M. Zignol [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2016. – Vol. 16, N 10. – P. 1185–1192. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30190-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30190-6)
3. Zhang, Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015 / Y. Zhang, W.-W. Yew // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2015. – Vol. 19, N 11. – P. 1276–1289. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0389>
4. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management challenges / K. Dheda [et al.] // Infect. Dis. Clin. – 2010. – Vol. 24, N 3. – P. 705–725. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.05.001>
5. Extensively drug-resistant tuberculosis, Italy and Germany / G. B. Migliori [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 13, N 5. – P. 780–782. <https://doi.org/10.3201/eid1305.060200>
6. Extensively drug-resistant tuberculosis in South Korea: risk factors and treatment outcomes among patients at a tertiary referral hospital / C. Y. Jeon [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 46, N 1. – P. 42–49. <https://doi.org/10.1086/524017>
7. Collins, C. H. In-vitro susceptibility of mycobacteria to ciprofloxacin / C. H. Collins, A. H. Uttley // J. Antimicrob. Chemother. – 1985. – Vol. 16, N 5. – P. 575–580. <https://doi.org/10.1093/jac/16.5.575>
8. Drlica, K. Fluoroquinolones: action and resistance / K. Drlica, M. Malik // Curr. Top Med. Chem. – 2003. – Vol. 3, N 3. – P. 249–282. <https://doi.org/10.2174/1568026033452537>
9. Epidemiology and clinical management of XDR-TB: a systematic review by TBNET / G. Sotgiu [et al.] // Eur. Resp. J. – 2009. – Vol. 33, N 4. – P. 871–881. <https://doi.org/10.1183/09031936.00168008>
10. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success / L. S. Redgrave [et al.] Trends Microbiol. – 2014. – Vol. 22, N 8. – P. 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
11. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control / A. Matteelli [et al.] // Expert Rev. Anti-infect. Ther. – 2007. – Vol. 5, N 5. – P. 857–871. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.5.857>
12. Alangaden, G. J. The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases / G. J. Alangaden, S. A. Lerner // Clin. Infect. Dis. – 1997. – Vol. 25, N 5. – P. 1213–1221. <https://doi.org/10.1086/516116>
13. Cambau, E. Amplification and nucleotide sequence of the quinolone resistance-determining region in the *gyrA* gene of mycobacteria / E. Cambau, W. Sougakoff, V. Jarlier // FEMS Microbiol. Lett. – 1994. – Vol. 116, N 1. – P. 49–54. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06674.x>
14. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations / H. E. Takiff [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 1994. – Vol. 38, N 4. – P. 773–780. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.4.773>
15. Comprehensive treatment of extensively drug-resistant tuberculosis / C. D. Mitnick [et al.] // New Engl. J. Med. – 2008. – Vol. 359, N 6. – P. 563–574. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0800106>
16. Piddock, L. J. V. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones: state-of-the-art 1992–1994 / L. J. V. Piddock // Drugs. – 1995. – Vol. 49, suppl. 2. – P. 29–35. <https://doi.org/10.2165/00003495-199500492-00006>
17. Whole-genome sequencing has the potential to improve treatment for rifampicin-resistant tuberculosis in high-burden settings: a retrospective cohort study / H. Cox [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2022. – Vol. 60, N 3. – P. e02362–21. <https://doi.org/10.1128/jcm.02362-21>



18. Multidrug-resistant tuberculosis in Europe, 2010–2011 / G. Günther [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 21, N 3. – P. 409. <https://doi.org/10.3201/eid2103.141343>
19. Yin, X. Mutation characterization of *gyrA* and *gyrB* genes in levofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guangdong Province in China / X. Yin, Z. Yu // *J. Infect.* – 2010. – Vol. 61, N 2. – P. 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.05.001>
20. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia / I. Mokrousov [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – Vol. 52, N 8. – P. 2937–2939. <https://doi.org/10.1128/AAC.00036-08>
21. Fluoroquinolone susceptibility among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the United States and Canada / L. Bozeman [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 40, N 3. – P. 386–391. <https://doi.org/10.1086/427292>

## References

1. Von Groll A., Martin A., Jureen P., Hoffner S., Vandamme P., Portaels F., da Silva P. A. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in *gyrA* and *gyrB*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, vol. 53, no. 10, pp. 4498–4500. <https://doi.org/10.1128/AAC.00287-09>
2. Zignol M., Dean A. S., Alikhanova N., Andres S., Cabibbe A. M., Cirillo D. M. [et al.]. Population-based resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to pyrazinamide and fluoroquinolones: results from a multicountry surveillance project. *Lancet Infectious Diseases*, 2016, vol. 16, no. 10, pp. 1185–1192. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30190-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30190-6)
3. Zhang Y., Yew W.-W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2015, vol. 19, no. 11, pp. 1276–1289. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0389>
4. Dheda K., Warren R. M., Zumla A., Grobusch M. P. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management challenges. *Infectious Disease Clinics*, 2010, vol. 24, no. 3, pp. 705–725. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.05.001>
5. Migliori G. B., Ortmann J., Girardi E., Besozzi G., Lange, C., Cirillo, D. M., SMIRA Extensively drug-resistant tuberculosis, Italy and Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, vol. 13, no. 5, pp. 780–782. <https://doi.org/10.3201/eid1305.060200>
6. Jeon C. Y., Hwang S. H., Min J. H., Prevots D. R., Goldfeder L. C., Lee H., Via L. E. Extensively drug-resistant, tuberculosis in South Korea: risk factors and treatment outcomes among patients at a tertiary referral hospital. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, vol. 46, no. 1, pp. 42–49. <https://doi.org/10.1086/524017>
7. Collins C. H., Uttley A. H. In-vitro susceptibility of mycobacteria to ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1985, vol. 16, no. 5, pp. 575–580. <https://doi.org/10.1093/jac/16.5.575>
8. Drlica K., Malik M. Fluoroquinolones: action and resistance. *Current Topics in Medical Chemistry*, 2003, vol. 3, no. 3, pp. 249–282. <https://doi.org/10.2174/1568026033452537>
9. Sotgiu G., Ferrara G., Matteelli A. A., Richardson M. D., Centis R., Ruesch-Gerdes S. [et al.]. Epidemiology and clinical management of XDR-TB: a systematic review by TBNET. *European Respiratory Journal*, 2009, vol. 33, no. 4, pp. 871–881. <https://doi.org/10.1183/09031936.00168008>
10. Redgrave L. S., Sutton S. B., Webber M. A., Piddock L. J. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, 2014, vol. 22, no. 8, pp. 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
11. Matteelli A., Migliori G. B., Cirillo D., Centis R., Girard E., Raviglione M. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2007, vol. 5, no. 5, pp. 857–871. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.5.857>
12. Alangaden G. J., Bone S. A. The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 1997, vol. 25, no. 5, pp. 1213–1221. <https://doi.org/10.1086/516116>
13. Cambau E., Sougakoff W., Jarlier V. Amplification and nucleotide sequence of the quinolone resistance-determining region in the *gyrA* gene of mycobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, vol. 116, no. 1, pp. 49–54. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06674.x>
14. Takiff H. E., Salazar L., Guerrero C., Philipp W., Huang W. M., Kreiswirth B., Cole S. T., Jacobs W. R. (Jr.), Telenti A. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1994, vol. 38, no. 4, pp. 773–780. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.4.773>
15. Mitnick C. D., Shin S. S., Seung K. J., Rich M. L., Atwood S. S., Furin J. J., Becerra M. C. [et al.]. Comprehensive treatment of extensively drug-resistant tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 2008, vol. 359, no. 6, pp. 563–574. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0800106>
16. Piddock L. J. V. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones: state-of-the-art 1992–1994. *Drugs*, 1995, vol. 49, suppl. 2, pp. 29–35. <https://doi.org/10.2165/00003495-199500492-00006>
17. Cox H., Goig G. A., Salaam-Dreyer Z., Dippenaar A., Reuter A., Mohr-Holland E. Whole-genome sequencing has the potential to improve treatment for rifampicin-resistant tuberculosis in high-burden settings: a retrospective cohort study. *Journal of Clinical Microbiology*, 2022, vol. 60, no. 3, p. e02362–21. <https://doi.org/10.1128/jcm.02362-21>
18. Günther G., Van Leth F., Alexandru S., Altet N., Avsar K., Bang D. [et al.]. Multidrug-resistant tuberculosis in Europe, 2010–2011. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, vol. 21, no. 3, pp. 409–416. <https://doi.org/10.3201/eid2103.141343>
19. Yin X., Yu Z. Mutation characterization of *gyrA* and *gyrB* genes in levofloxacin, resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guangdong Province in China. *Journal of Infection*, 2010, vol. 61, no. 2, pp. 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.05.001>

20. Mokrousov I., Otten T., Manicheva O., Potapova Y., Vishnevsky B., Narvskaya O., Rastogi N. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, vol. 52, no. 8, pp. 2937–2939. <https://doi.org/10.1128/AAC.00036-08>

21. Bozeman L., Burman W., Metchock B., Welch L., Weiner M. Fluoroquinolone susceptibility among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the United States and Canada. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, vol. 40, no. 3, pp. 386–391. <https://doi.org/10.1086/427292>

### Інфармацыя аб аўторах

Слизень Вероніка Вячаславаўна – канд. мед. навук, доцент. Рэспубліканскі навучна-практычны цэнтр пульмонологіі і фтызіятрыі (Долгіновскі тракт, 157, 220080, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-1846-6100>. E-mail: veronal@tut.by

Суркова Ларыса Канстанцінаўна – д-р мед. навук, прафесар, заведуючы аддзелам. Рэспубліканскі навучна-практычны цэнтр пульмонологіі і фтызіятрыі (Долгіновскі тракт, 157, 220080, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: niipulm@tut.by

Гуревич Геннадий Львович – член-корреспондент, д-р мед. навук, прафесар, дырэктар. Рэспубліканскі навучна-практычны цэнтр пульмонологіі і фтызіятрыі (Долгіновскі тракт, 157, 220080, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-5683-2322>. E-mail: niipulm@tut.by

### Information about the authors

Veronika V. Slizen – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiatry (157, Dolginovski Tract, 220080, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-1846-6100>. E-mail: veronal@tut.by

Larissa K. Surkova – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiatry (157, Dolginovski Tract, 220080, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: niipulm@tut.by

Gennady L. Gurevich – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Director. Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiatry (157, Dolginovski Tract, 220080, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-5683-2322>. E-mail: niipulm@tut.by