

# Генотипирование и оценка вирулентности на мышинной модели штамма *Mycobacterium tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью, выделенного в Российской Федерации

И.А.Дятлов<sup>1</sup>, В.Д.Потапов<sup>1</sup>, Т.И.Комбарова<sup>1</sup>, М.В.Фурсов<sup>2</sup>, А.Г.Богун<sup>1</sup>,  
Т.Н.Мухина<sup>1</sup>, А.А.Кисличкина<sup>1</sup>, Л.А.Кадникова<sup>1</sup>, С.А.Благодатских<sup>1</sup>,  
Е.А.Ганина<sup>1</sup>, Т.П.Морозова<sup>1</sup>, Л.В.Домотенко<sup>1</sup>, К.В.Детушев<sup>1</sup>, М.В.Храмов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН», Москва, Российская Федерация

Изучены культурально-морфологические и молекулярно-генетические особенности клинического штамма туберкулезного микроба *Mycobacterium tuberculosis* «Ростов», выделенного в России в 2013 г. из мокроты больного туберкулезом человека. Данный штамм отнесен к категории штаммов возбудителя туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ или XDR-ТБ), поскольку он устойчив к четырем противотуберкулезным препаратам первого ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу) и к четырем противотуберкулезным препаратам второго ряда (амикацину, канамицину, капреомицину, офлоксацину). На основании генотипирования методами MIRU-VNTR, сполитипирования и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов на основе IS6110-элемента определена принадлежность штамма к генетическому семейству Beijing (Пекин), которое является преобладающим на территории Российской Федерации. Экспериментально установлена высокая вирулентность штамма *M. tuberculosis* «Ростов» для мышей линии C57BL, превышающая таковую для лабораторного вирулентного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, что выражалось в более быстром и необратимом истощении животных; в большей степени обсемененности микобактериями органов экспериментальных животных; в более выраженной гистологической картине патологических изменений внутренних органов животных. Важной особенностью данного штамма является его более быстрый рост на жидких питательных средах по сравнению с лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv.

**Ключевые слова:** XDR туберкулез, ШЛУ-ТБ, *Mycobacterium tuberculosis*, модель туберкулеза, линия мышей C57BL, патогенез туберкулеза, Beijing, MIRU-VNTR-генотипирование, сполитипирование, RFLP-IS6110-типирование

**Для цитирования:** Дятлов И.А., Потапов В.Д., Комбарова Т.И., Фурсов М.В., Богун А.Г., Мухина Т.Н., Кисличкина А.А., Кадникова Л.А., Благодатских С.А., Ганина Е.А., Морозова Т.П., Домотенко Л.В., Детушев К.В., Храмов М.В. Генотипирование и оценка вирулентности на мышинной модели штамма *Mycobacterium tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью, выделенного в Российской Федерации. Бактериология. 2017; 2(1): 35–45. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-35-45

## Genotyping and assessment of virulence on a mouse model of highly drug-resistant strain *Mycobacterium tuberculosis* isolated in the Russian Federation

I.A.Dyatlov<sup>1</sup>, V.D.Potapov<sup>1</sup>, T.I.Kombarova<sup>1</sup>, M.V.Fursov<sup>2</sup>, A.G.Bogun<sup>1</sup>,  
T.N.Mukhina<sup>1</sup>, A.A.Kislichkina<sup>1</sup>, L.A.Kadnikova<sup>1</sup>, S.A.Blagodatskikh<sup>1</sup>,  
E.A.Ganina<sup>1</sup>, T.P.Morozova<sup>1</sup>, L.V.Domotenko<sup>1</sup>, K.V.Detushev<sup>1</sup>, M.V.Khramov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Russian Federation;

<sup>2</sup>Fundamental Bases of Biotechnology of RAS, Moscow, Russian Federation

### Для корреспонденции:

Потапов Василий Дмитриевич, доктор биологических наук, заведующий отделом переподготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский район, п. Оболенск

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: potapov@obolensk.org

Статья поступила 15.11.2016 г., принята к печати 15.03.2017 г.

### For correspondence:

Vasily D. Potapov, Sc.D., Head of the Department for Retraining and Improvement of Specialists of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: potapov@obolensk.org

The article was received 15.11.2016, accepted for publication 15.03.2017

Cultural-morphological and molecular genetic properties of *Mycobacterium tuberculosis* clinical strain «Rostov» collected from sputum of TB patient in Russia in 2013 were studied. This strain was classified as XDR-TB, because it was resistant to four first-line anti-TB drugs (isoniazid, rifampicin, streptomycin, and ethambutol) and four second-line anti-TB drugs (amikacin, kanamycin, capreomycin, ofloxacin). *M. tuberculosis* strain «Rostov» was attributed to prevalent in Russian Federation TB genetic family Beijing by genotyping using MIRU-VNTR, spoligotyping, and IS6110-based restriction fragment length polymorphism methods. *M. tuberculosis* strain «Rostov» is virulent for mouse line C57BL, higher than laboratory strain *M. tuberculosis* H37Rv. It was manifested in faster and irreversible depletion of animals; more mycobacteria dissemination in the bodies of experimental animals; in more severe pathological changes of animal parenchymal organs. An important feature of this strain is its faster growth on nutrient broth compared to *M. tuberculosis* H37Rv laboratory strain.

**Keywords:** XDR-TB, *Mycobacterium tuberculosis*, *tuberculosis animal model*, *mouse line C57BL*, *TB pathogenesis*, *Beijing*, *MIRU-VNTR-genotyping*, *spoligotyping*, *RFLP-IS6110-typing*

**For citation:** Dyatlov I.A., Potapov V.D., Kombarova T.I., Fursov M.V., Bogun A.G., Mukhina T.N., Kislichkina A.A., Kadnikova L.A., Blagodatskikh S.A., Ganina E.A., Morozova T.P., Domotenko L.V., Detushev K.V., Khramov M.V. Genotyping and assessment of virulence on a mouse model of highly drug-resistant strain *Mycobacterium tuberculosis* isolated in the Russian Federation. *Bacteriology*. 2017; 2(1): 35–45. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-35-45

**Т**уберкулез (ТБ, ТВ) является одной из 10 основных причин смерти во всем мире. Эпидемия туберкулеза в последние десятилетия является одной из важнейших проблем для здравоохранения во всем мире. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ, WHO), в 2015 г. в мире зафиксировано 10,4 млн случаев вновь выявленного ТБ, в том числе у 5,9 млн (56%) мужчин, 3,5 млн (34%) женщин, 1,0 млн (10%) детей. Больше половины (60%) новых случаев ТБ выявлено в шести странах: Индии, Индонезии, Китае, Нигерии, Пакистане и Южно-Африканской Республике [1]. Высокий уровень заболеваемости ТБ сочетается с высоким уровнем смертности – в среднем по миру он составляет 16%, в Африке – 46%, в Юго-Восточной Азии – 24%, в Европе – 3,7%. В 2015 г. умерли от туберкулеза 1,4 млн человек, а от туберкулеза в сочетании ВИЧ-инфекцией – еще 0,4 млн человек. Несмотря на то, что смертность от ТБ в 2015 г. снизилась на 22% по сравнению с 2000 г., туберкулез остается в списке 10 самых смертоносных инфекций в мире [2]. В отчете ВОЗ 2016 г. с удовлетворением отмечается, что в 2015 г., в результате активных действий по профилактике и лечению ТБ, достигнут прогресс, выразившийся в снижении заболеваемости ТБ на 1,5% по сравнению с 2014 г. В Российской Федерации данный показатель составил 4,2% [1].

Однако все больше нарастает значимость туберкулезной инфекции, вызванной множественно-устойчивыми вариантами возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*, которые устойчивы к противотуберкулезным препаратам первого ряда изониазиду и рифампицину. В 2015 г. в мире зафиксировано 480 тыс. случаев вновь диагностированного множественно-устойчивого ТБ (MDR-TB) и, кроме того, 100 тыс. впервые выявленного рифампицин-устойчивого ТБ (RR-TB). Вклад MDR-TB и RR-TB очень высок среди заболеваний ранее леченного туберкулеза: в целом по миру этот показатель составляет 58%, в Юго-Восточной Азии – 67%, в Западной Океании – 62%, в Европе – 52%, в Африке – 33%, в двух Америках – 32% [2]. Более 60% MDR-TB и RR-TB зарегистрировано в пяти странах: Индии, Китае, Российской Федерации, Индонезии и Нигерии. В Российской Федерации в 2016 г. у 35% госпитализированных туберкулезных пациентов выявлен MDR-TB и RR-TB, что указывает на существенный рост данного показателя по сравнению с 2014 г., когда он составлял 7% [1, 3].

Результатом продолжающейся эволюции возбудителя туберкулеза в сторону нарастания лекарственной резистентности является выявление среди штаммов MDR/RR-TB возбудителей экстремально устойчивого туберкулеза (XDR-TB), устойчивых к противотуберкулезным препаратам не только первого ряда, но дополнительно устойчивых к фторхинолонам и, по крайней мере, к одному препарату второго ряда – капреомицину, канамицину или амикацину. Наибольшее количество XDR-TB в 2015 г. зарегистрировано в Индии (2130), Украине (1206), Российской Федерации (1205) и Южной Африке (719). Средний показатель доли XDR-TB среди MDR-TB в мире существенно не изменился за последние годы – 9,7% в 2014 г., 9,0% в 2013 г. и 9,5% в 2015 г. [1].

Опасность нарастания множественной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза усугубляется тем, что она коррелирует с увеличением устойчивости данного патогена к действию иммунной системы макроорганизма. Показано, что некоторые MDR-TB штаммы вызывают патологический процесс, обладающий уникальными особенностями, а именно, отмечается отрицательное влияние на развитие иммунитета против туберкулезной инфекции [4]. Кроме того, отмечено, что MDR-TB и XDR-TB характеризуются повышенной заболеваемостью [5] и летальностью: 40% для MDR-TB и 60–70% для XDR-TB в эндемичных странах при использовании традиционных режимов лечения, что является огромной проблемой здравоохранения [6, 7].

На основании данных филогенетики ТБ, в Российской Федерации циркулируют несколько генотипов *M. tuberculosis*: (1) доминантное семейство Beijing, характеризующееся высоким уровнем вирулентности и лекарственной устойчивости [8]; (2) Латино-Американско-Средиземноморское (LAM) семейство, второе по величине в Российской Федерации и ассоциированное с MDR-TB в некоторых регионах; и (3) Уральское семейство, эндемичное для России, которое считается менее трансмиссивным и менее лекарственно устойчивым [9].

**Цель данной работы** – изучение культурально-морфологических и молекулярно-генетических особенностей клинического штамма туберкулезного микроба, выделенного в России в 2013 г., определение его уровня лекарственной устойчивости и принадлежности к генетическому семейству, сравнение его патогенетических свойств с таковыми лабораторного вирулентного штамма *M. tuberculosis* H37RV на мышинной модели туберкулеза.

## Материалы и методы

### Выделение культуры *M. tuberculosis*

Образцы мокроты обрабатывали 10% раствором фосфата натрия трехзамещенного и перемешивали со стеклянными бусами на приборе Vortex (Scientific Industries, США) в течение 10 мин, затем инкубировали при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 18–20 ч. Суспензию центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Образовавшийся осадок обрабатывали 6% раствором соляной кислоты (до pH 7,0), а затем – дистиллированной водой. Отмытый осадок высевали на питательные среды Левенштейна–Йенсена (ФБУН ГНЦПМБ, Оболенск, Россия), Финна 2 (ФБУН ГНЦПМБ, Оболенск, Россия) и среду Миддлбрук 7Н10 (BD, США). Посевы инкубировали при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 28 сут. Выросшие колонии микроскопировали, готовили мазки и окрашивали по Цилю–Нильсену.

### Штаммы бактерий и культивирование

Штамм *Mycobacterium tuberculosis* «Ростов» выделен из образца мокроты мужчины 35 лет с диагнозом «туберкулез легких», полученного из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Дагестан» в ноябре 2013 г., депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ–Оболенск» под номером В-7601. Вирулентный штамм *M. tuberculosis* H37Rv получен из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ–Оболенск». Культуры возбудителя туберкулеза выращивали на плотных питательных средах, а также в модифицированной жидкой питательной среде Middelbrook 7Н9 (Himedia, Индия) с добавкой 10% ADC (BD, США) и 0,05% Твина 80с азрацией в атмосферном воздухе в пластиковых флаконах объемом 100–500 мл в течение 21 дня при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Культуры выращивали до оптической плотности, соответствующей  $5 \times 10^7$ – $10^8$  КОЕ/мл, делили на аликвоты по 1 мл и хранили в 10% глицерине при температуре  $-70^\circ\text{C}$ . Жизнеспособность культур при хранении определяли высевками на плотную питательную среду Middelbrook 7Н11 (Himedia, Индия) с 20% сыворотки крупного рогатого скота.

### Видовая идентификация

Микобактерии идентифицировали на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Для этого использовали две методики – экстракцию белков трифторуксусной кислотой и экстракцию белков муравьиной кислотой, в сочетании с дезинтеграцией бактериальных клеток циркониевыми/кварцевыми шариками.

### Определение биохимических свойств

Нитратредуктазную активность и способность к росту на среде с тиафенкарбоксигидразидом определяли с помощью «Набора питательных сред для ускоренного определения лекарственной чувствительности и первичной идентификации микобактерий туберкулеза» (ТБ тест-набор), регистрационный № ФСР 2007/01366, с. 1/14 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

### Определение чувствительности к антибактериальным препаратам

Лекарственную чувствительность культур микобактерий к противотуберкулезным препаратам 1-го ряда изониазиду (1,0 мг/л), рифампицину (40,0 мг/л), стрептомицину (10,0 мг/л) и этамбутолу (2,0 мг/л) и к противотуберкулезным препара-

там 2-го ряда амикацину (30,0 мг/л), канамицину (30,0 мг/л), капреомицину (30,0 мг/л) и офлоксацину (3,0 мг/л) определяли с помощью «Набора питательных сред для ускоренного определения лекарственной чувствительности и первичной идентификации микобактерий туберкулеза» (ТБ тест-набор), регистрационный № ФСР 2007/01366, с. 1/14 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) и «Набора питательных сред для диагностики XDR-туберкулеза» (XDR-тест), регистрационный № РЗН 2013/902, с. 2/14 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), в соответствии с инструкцией по применению.

### Биоэтические требования

Все протоколы экспериментов на животных одобрены Биоэтическим комитетом ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (Разрешение № VP-2016/8) и приведены в соответствии с Руководством по обработке, уходу и защите лабораторных животных Европейского Союза от 02.07.2007 г. ([http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/home\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm)).

### Животные

Самки мышей линии С57BL (возраст 7–8 нед, вес 20–22 г) получены из Питомника лабораторных животных ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН. Животных содержали в поликарбонатных клетках при режиме освещения с 7:00 до 19:00 в виварном помещении уровня безопасности BSL3 с поддержанием температуры на уровне  $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$  и влажности на уровне  $(50 \pm 10)\%$ . Грызуны получали водопроводную воду и мышинный комбикорм РК-120 (Лабораторкорм, Россия) *ad libitum* на протяжении всего исследования. Состояние здоровья животных проверяли, по крайней мере, два раза в день. В экспериментах использовали минимальное количество животных, необходимое для обеспечения статистической достоверности. Животные были разделены на группы случайным образом. В данном исследовании использованы гуманные методы умерщвления инфицированных животных – эвтаназия газом  $\text{CO}_2$  с последующей цервикальной дислокацией, осуществляемые хорошо подготовленным персоналом.

### Заражение лабораторных животных

Суспензию клеток микобактерий, замороженную при температуре минус  $70^\circ\text{C}$ , размораживали при комнатной температуре и гомогенизировали инсулиновым шприцем в асептических условиях с соблюдением правил техники безопасности. Готовили десятикратные разведения суспензии в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) с 0,05% Твина 80. Концентрацию микобактерий в суспензии определяли высевом на плотную питательную среду Middelbrook 7Н11 (Himedia, Индия) с 20% сыворотки крупного рогатого скота. Заражение животных осуществляли внутривенным введением суспензии клеток микобактерий в боковую хвостовую вену в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/мышь [10].

### Определение микобактериальной нагрузки в органах животных

Патологоанатомическое вскрытие животных и макроскопическое описание проводили, соблюдая правила асептики. Паренхиматозные органы (печень, селезенку и легкие) гомогенизировали в стерильных ступках, добавляя 1 мл ЗФР на один орган, высевали 10-кратные разведения на плотную питательную среду Middelbrook 7Н11 (Himedia, Индия), со-

державшую 20% сыворотки КРС. Для подавления посторонней микрофлоры при высеве из исходного разведения гомогената в суспензию добавляли соляную кислоту до концентрации 3%. На поверхность плотной питательной среды наносили 0,1 мл суспензии соответствующего разведения и тщательно растирали шпателем. Засеянные чашки помещали в полиэтиленовые пакеты и герметизировали. Инкубацию проводили при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 25 дней. Подтверждение специфичности выросших колоний микобактерий осуществляли с помощью окрашивания по Цилю-Нильсену и световой микроскопии. Расчет концентрации колониеобразующих единиц (КОЕ) производили методом подсчета колоний в соответствующем разведении гомогената органа. Экспериментальную погрешность определяли для каждого ряда из 5 чашек. Результаты обрабатывали статистически, с указанием среднего и относительного отклонений.

#### Гистологические исследования

Паренхиматозные органы экспериментальных животных фиксировали в растворе 10% нейтрального формалина («БиоХим-НН», Россия), обезвоживали в растворах этанола и бутанола с повышающимися концентрациями, пропитывали парафином и заливали в парафиновые блоки, готовили срезы на микротоме Reichert-Jung (Reichert-Jung, Германия) и помещали на предметные стекла. Срезы депарафинировали в ксилоле, промывали в растворах спиртов с понижающимися концентрациями, окрашивали гематоксилин-эозином и заключали в бальзам. Анализ препаратов проводили на микроскопе Nikon Eclipse 80i (Nikon, Япония) с использованием цифровой камеры Nikon DS-U2 (Nikon, Япония).

#### Выделение хромосомной ДНК

Хромосомную ДНК *M. tuberculosis* выделяли с помощью СТАВ-метода. Бактериальную культуру (2–3 петли) переносили в микроцентрифужную пробирку «Eppendorf» с 400 мкл буферного раствора  $1 \times \text{TE}$  (10 mM Tris, pH 8,0 и 1 mM EDTA). Затем в пробирку добавляли 50 мкл лизоцима (10 мг/мл) и инкубировали в течение 2 ч при температуре  $37^\circ\text{C}$ . К полученной суспензии добавляли 75 мкл раствора SDS/протеиназа К (70 мкл 10% SDS и 5 мкл протеиназы К), 100 мкл 5M NaCl и 100 мкл раствора СТАВ/NaCl (4,1 г NaCl, 10 г СТАВ, 80 мл дистиллированной воды). Полученную смесь трясли до молочно-белой консистенции и инкубировали в течение 10 мин при температуре  $65^\circ\text{C}$ . После инкубации в пробирку добавляли 750 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24 : 1), трясли 10 с и центрифугировали при 30 000 g в течение 5 мин. Затем надосадочную жидкость, содержащую ДНК, отбирали в новую пробирку, добавляли 450 мкл изопропилового спирта и инкубировали в течение 10 мин на льду. Далее пробирку центрифугировали 15 мин при комнатной температуре при 30 000 g и супернатант удаляли при помощи автоматической пипетки. Далее к осадку добавляли 1 мл 70%-ного перегнанного этанола и центрифугировали в течение 15 мин при температуре  $+4^\circ\text{C}$  при 20 000 g. Супернатант удаляли, осадок высушивали при комнатной температуре и растворяли в 20 мкл дистиллированной воды.

#### MIRU-VNTR-типирование

Для генотипирования штамма *M. tuberculosis* «Ростов» использовали вариант метода MIRU-VNTR-типирования, основанный на анализе 35 локусов хромосомы возбудителя туберкулеза [11]. ПЦР проводили на амплификаторе DNA

Engine Dyad («Bio-Rad», США) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH = 8,8, 0,08% Nonidet P40, 1,5–3,0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM каждого дезоксирибонуклеотида, 0,4 мкМ каждого олигонуклеотида, 1 ед. активности рекомбинантной Taq-полимеразы (Хеликон, Россия). Режим амплификации:  $95^\circ\text{C}$  – 10 мин; 30 циклов:  $95^\circ\text{C}$  – 1 мин,  $59^\circ\text{C}$  – 1 мин,  $72^\circ\text{C}$  – 2 мин;  $72^\circ\text{C}$  – 10 мин. Размер ампликона определяли с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле при окрашивании бромистым этидием, с использованием маркеров размеров ДНК «O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder» (Fermentas, Литва) и 50 Base-Pair Ladder (Amersham Pharmacia Biotech Inc, США).

#### Филогенетический анализ

Филогенетический анализ проводили с использованием международной базы данных VNTRPLUS (<http://www.miruvntrplus.org/>), содержащей информацию о 186 штаммах *M. tuberculosis*, выделенных в разных странах мира, а также с использованием базы данных отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», содержащей данные о 330 штаммах *M. tuberculosis*, выделенных на территории Тульской области в 2002–2003 гг.

#### Сполиготипирование

Сполиготипирование штамма *M. tuberculosis* «Ростов» проводили по стандартной методике [12]. По 20 нг хромосомной ДНК амплифицировали с праймерами DRa-5'-Biotin-ggttttggtctgacgac-3' и DRb-5'-ccgagaggggacggaac-3' (Isogen Netherlands). ПЦР-смесь готовили в объеме 50 мкл: прямой и обратный праймеры – по 20 пмоль; по 0,2 mM каждого dNTP (Fermentas, Литва); 10  $\times$  Taq буфер с KCl и 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  (Fermentas, Литва); Taq ДНК-полимераза – 5 ед./мкл (Fermentas, Литва); хромосомная ДНК – 20 нг. Реакцию амплификации проводили в термоциклере DNA Engine Dyad (Bio-Rad, США) при следующем режиме: начальная денатурация при  $96^\circ\text{C}$  – 3 мин; затем 30 циклов, включающих денатурацию при  $96^\circ\text{C}$ , – 1 мин, отжиг при  $55^\circ\text{C}$  – 1 мин, элонгацию при  $72^\circ\text{C}$  – 30 с; дополнительный прогрев при  $72^\circ\text{C}$  – 5 мин. Полученные в результате реакции ПЦР-продукты прогревали с буфером  $2 \times \text{SSPE}/0,1\% \text{ SDS}$  в течение 10 мин при температуре  $99^\circ\text{C}$  и вносили в каждый слот миниблоттера Miniblotter 45 (Immunelectrics, Великобритания), в котором находилась мембрана с нанесенными на нее 43 спейсерами (Isogen, Нидерланды). Гибридизацию проводили в течение часа при температуре  $60^\circ\text{C}$ , на горизонтальной поверхности, не допуская сдвигов мембраны и смешивания образцов в соседних слотах. Затем образцы удаляли из слотов миниблоттера и мембрану дважды отмывали от непрореагировавших амплификатов при температуре  $60^\circ\text{C}$  в 250 мл буфера  $2 \times \text{SSPE}/0,5\% \text{ SDS}$ , предварительно нагретого до такой же температуры. Затем мембрану инкубировали в течение 1 ч при температуре  $42^\circ\text{C}$  в буфере  $2 \times \text{SSPE}/0,5\% \text{ SDS}$  с SA-HRP (Amersham Biosciences, Великобритания), после чего ее дважды отмывали при температуре  $42^\circ\text{C}$  в 250 мл буфера  $2 \times \text{SSPE}/0,5\% \text{ SDS}$  и при комнатной температуре в буфере  $2 \times \text{SSPE}$ . Результаты выявляли с помощью хемилюминесцентной реакции в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (Amersham Biosciences, Великобритания). В качестве контрольных образцов использовали ДНК штаммов *M. tuberculosis* H37Rv и *M. bovis* BCG.

### ДНК-фингерпринтинг на основе IS6110-элемента

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) на основе IS6110-элемента осуществляли по методу [14]. В качестве зонда использовали ПЦР-продукт инсерционного элемента IS6110 (245 п. о.) штамма H37Rv *M. tuberculosis*. Реакцию амплификации проводили в термоциклере DNA Engine Dyad (Bio-Rad, США). Наличие продукта амплификации проверяли с помощью метода электрофореза в 1 %-ном агарозном геле с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием. В качестве стандарта молекулярных масс использовали маркеры ДНК размером 100 п. о. (Amersham Biosciences, Великобритания). В результате амплификации получали ПЦР-продукт размером 245 п. о. Амплифицированный фрагмент очищали с помощью набора DNA Extraction kit (Fermentas, Литва) согласно инструкции фирмы-изготовителя. По 1–1,5 мкг образцов хромосомной ДНК, выделенных из культур *M. tuberculosis*, расщепляли с помощью фермента эндонуклеазы рестрикции PvuII (Fermentas, Литва) в течение 3 ч при температуре 37°C. Для разделения фрагментов рестрикции, различающихся по молекулярной массе, использовали метод электрофоретического разделения в 1 %-ном агарозном геле при напряжении 1,0 В/см в течение 18 ч. Затем ДНК-фрагменты переносили на нейлоновую мембрану Hybond N+ (Amersham Biosciences, Великобритания) с помощью вакуумного блоттера, модель 785 (BioRad, США) в течение 4 ч при давлении 15 см рт. ст. ДНК-фрагменты «пришивали» к мембране с помощью прибора UV Crosslinker (Crosslinker, США). Затем мембрану переносили в стакан для гибридизации с подогретым до температуры 42°C буфером (30 мл золотого гибридизационного буфера, 0,5 M NaCl и 5% блокирующего реагента (Amersham Biosciences, Великобритания). Стакан помещали в печь для гибридизации (Amersham Biosciences, Великобритания) и после инкубации в течение 1 ч добавляли меченый зонд. Мечение зонда осуществляли с помощью ECLtm системы, согласно рекомендациям фирмы-изготовителя (Amersham Biosciences, Великобритания). Гибридизацию проводили при темпе-

ратуре 42°C в течение 16 ч. По окончании гибридизации мембрану отмывали буферами (0,4 M SDS/0,1 × SSC и 2 × SSC). Хемилюминесцентную детекцию ДНК-фрагментов осуществляли согласно рекомендациям фирмы-изготовителя (Amersham Biosciences, Великобритания). Полученные ПДРФ-профили обрабатывали с помощью программы GelComparII, version 2.5 (Windows 98, Бельгия).

### Статистическая обработка данных

Среднее значение и доверительные интервалы рассчитывали с помощью статистической офисной программы Microsoft Excel, достоверность различий определяли по параметрическому критерию Стьюдента для  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

### Культурально-морфологические свойства штамма *M. tuberculosis* «Ростов»

На средах Левенштейна–Йенсена и Финна 2 штамм *M. tuberculosis* «Ростов» формировал сухие морщинистые колонии цвета слоновой кости, на среде Миддлбрук 7H10 колонии формировались более плоскими и светлыми. В мазках, окрашенных по Цилю–Нильсену, были выявлены мелкие палочки, окрашенные в красный цвет, расположенные под углом друг к другу и в виде скоплений. Видовая идентификация с помощью технологии MALDI в двух вариантах пробоподготовки – при экстракции бактериальных белков трифторуксусной кислотой и при экстракции белков муравьиной кислотой, с использованием циркониевых/кварцевых шариков, показала принадлежность выделенного штамма к микобактериям туберкулезного комплекса. Уровень достоверности (скор) составил 1,5–1,7.

Показано, что штамм *M. tuberculosis* «Ростов» характеризуется более быстрым размножением клеток по сравнению с лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. Это установлено с помощью сравнения средних показателей оптической плотности жидкой культуры двух штаммов в течение 30 дней (рис. 1) и количества КОЕ в этих культурах (рис. 2).

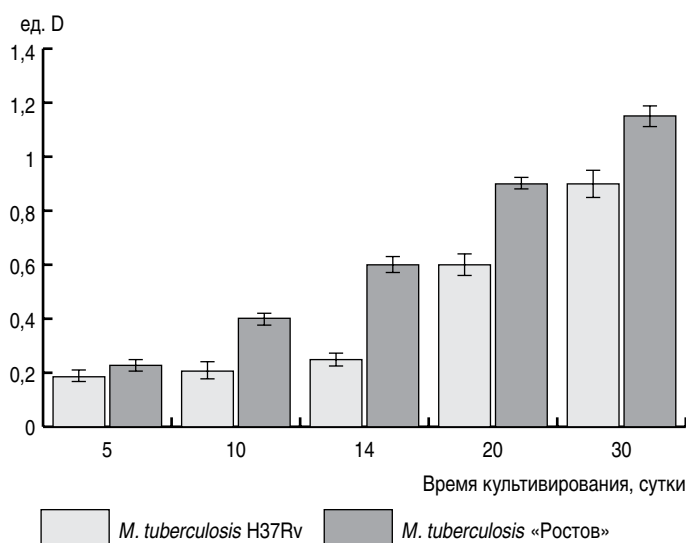


Рис. 1. Сравнение средних показателей оптической плотности при росте *M. tuberculosis* H37Rv и клинического изолята «Ростов» в жидкой питательной среде 7H9.

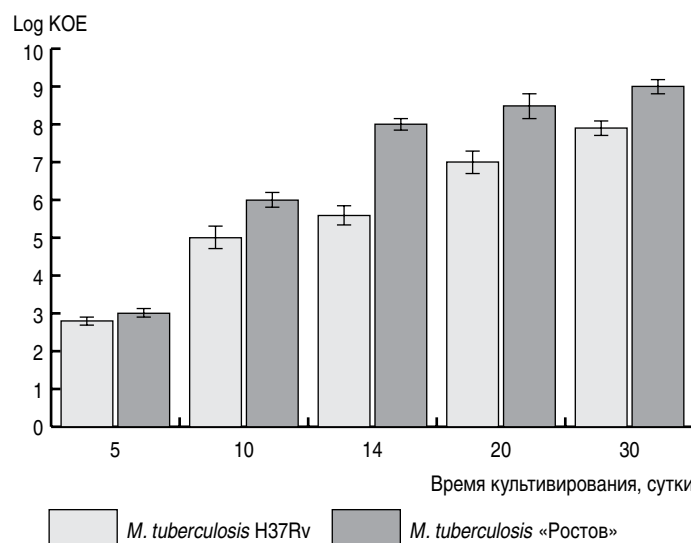


Рис. 2. Сравнение средних показателей количества КОЕ при росте клеток *M. tuberculosis* H37Rv и клинического изолята «Ростов» в жидкой питательной среде 7H9.



**Определение биохимической активности и лекарственной чувствительности штамма *M. tuberculosis* «Ростов»**

Культивирование выделенного в данном исследовании клинического штамма *M. tuberculosis* «Ростов» в течение 7 сут в реакционных емкостях ТБ тест-набора и ХDR-теста, разработанных в отделе питательных сред ФБУН ГНЦ ПМБ, показало, что данный штамм обладает нитратредуктазной активностью, свойственной возбудителю туберкулеза, а также способен расти на среде с тиафен-карбоксигидразидом, что также является характерной особенностью *M. tuberculosis*. Кроме того, выявлена устойчивость данного штамма к четырем противотуберкулезным препаратам 1-го ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу) и четырем противотуберкулезным препаратам 2-го ряда (амикацину, канамицину, капреомицину, офлоксацину). На этом основании данный штамм отнесен в категорию с широкой лекарственной устойчивостью.

**Динамика изменения веса тела зараженных мышей**

Показатель истощенности животных в мышинных моделях экспериментального туберкулеза является надежным признаком динамики патогенетического процесса. Результаты, представленные на рисунке 3, показывают необратимое и сильное истощение животных, зараженных клиническим штаммом «Ростов», по сравнению с животными, зараженными лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv (мыши групп 2 и 3). По резкому уменьшению веса животных, зараженных клиническим изолятом «Ростов», можно сделать вывод о более выраженной патогенности данного штамма, по сравнению с лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37RV.

**Изучение патогенности штаммов *M. tuberculosis* H37Rv и *M. tuberculosis* «Ростов» на мышинной модели туберкулеза**

Для изучения патогенности исследуемого клинического варианта *M. tuberculosis* в экспериментах была использована мышинная модель. Микобактерии туберкулеза патогенны

для мышей, в особенности для линии C57BL, на которой были проведены эксперименты.

На рисунке 4 приведены экспериментальные данные по сравнению гибели мышей линии C57BL при заражении контрольным *M. tuberculosis* H37Rv и клиническим вариантом *M. tuberculosis* «Ростов».

Эксперименты показали, что клинический штамм имеет большую вирулентность, и большинство зараженных им животных гибнут в течение первых 3 мес после инфицирования.

**Патоморфологическая картина внутренних органов зараженных мышей линии C57BL**

Внешний осмотр мышей на 30-е сутки после внутривенного заражения выявил, что наиболее характерные признаки туберкулеза имеются у мышей, зараженных клиническим штаммом *M. tuberculosis* «Ростов»: все мыши имели признаки крайнего истощения, их шерсть была тусклой, взъерошенной. Мыши, зараженные штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, имели слабо выраженную истощенность и гладкую шерсть. У мышей, зараженных лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, наблюдали типичное протекание туберкулезного процесса с характерным изменением внутренних органов: незначительно увеличенная селезенка, ярко окрашенная; печень гладкая, интенсивно-коричневая, объем в норме; объем легких в норме, они бледно-розового цвета, с вкраплениями бледной массы (рис. 5А). Иная картина зафиксирована у мышей, зараженных клиническим штаммом «Ростов»: на вскрытии особенно выражено истощение животного; селезенка увеличена, кровенаполнена, тусклая, дряблая; печень темно-коричневого цвета с множественными узелковыми вкраплениями; легкие интенсивно гиперемизированы, с крупными узлами (рис. 5Б).

На основании внешнего осмотра органов больных животных, инфицированных клиническим штаммом, возможно сделать вывод об отличном от классического (вызванного заражением лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv) протекании патогенеза туберкулеза у мышей. Поражения

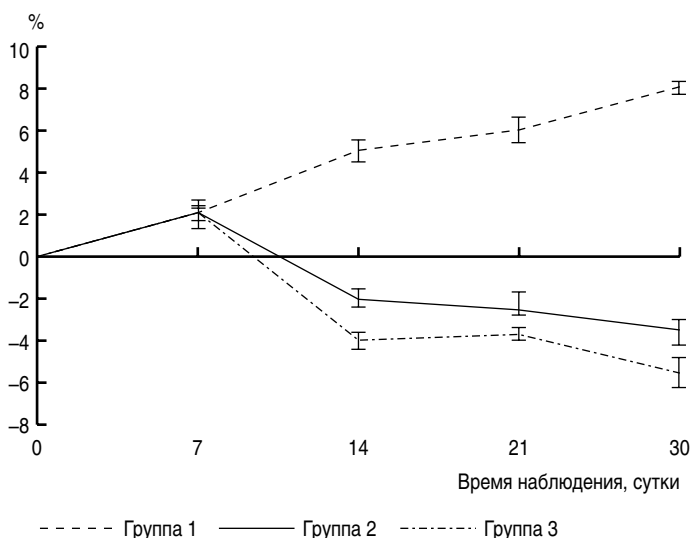


Рис. 3. Изменение веса тела мышей линии C57BL. Группа 1 – контрольная (неинфицированные мыши); группа 2 – мыши, зараженные внутривенно туберкулезным штаммом *M. tuberculosis* H37RV в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/мышь; группа 3 – мыши, зараженные внутривенно клиническим штаммом «Ростов» в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/мышь.

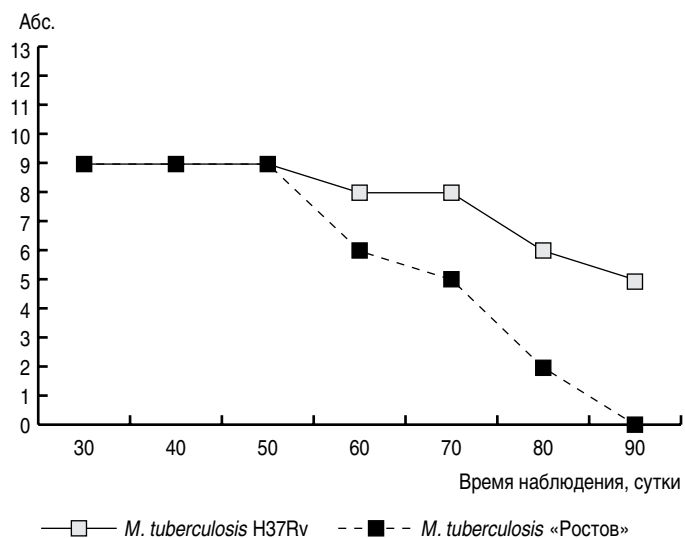


Рис. 4. Сравнение гибели мышей линии C57BL зараженных внутривенно штаммами *M. tuberculosis* H37Rv и *M. tuberculosis* «Ростов» в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/животное.

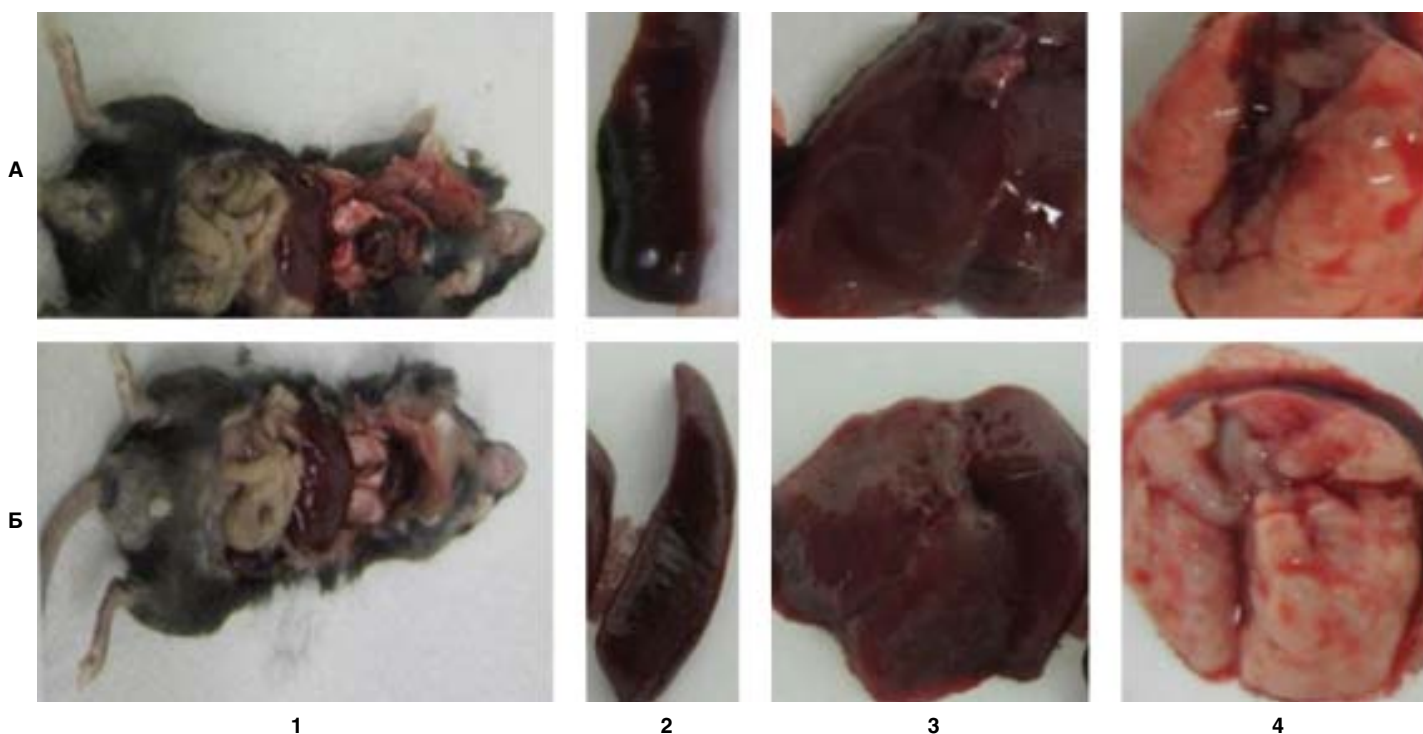


Рис. 5. Патологические изменения в органах мышей линии C57BL на 30-й день после заражения их штаммами *M. tuberculosis* H37Rv (А) и «Ростов» (Б): 1 – общий вид вскрытой мыши; 2 – селезенка; 3 – печень; 4 – легкое.

органов, вызванные этим штаммом возбудителя, выражены в большей степени.

**Обсемененность микобактериями паренхиматозных органов зараженных животных**

Наиболее важным показателем интенсивности протекания туберкулеза у мышей является показатель обсемененности легких и селезенки микобактериями туберкулеза. Экспериментальные данные по оценке количества КОЕ микобактерий в органах животных, зараженных штаммами *M. tuberculosis* H37Rv и *M. tuberculosis* «Ростов», показывают, что клинический штамм более интенсивно размножается в паренхиматозных органах экспериментальных животных (рис. 6).

**Патологические изменения паренхиматозных органов зараженных животных**

Результаты гистологического исследования мышей линии C57BL, зараженных лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ внутривенно, показали типичную для мышинной модели картину. В легких мышей патологическая картина представлена преимущественно периваскулярными плотными инфильтратами из лимфоцитов и макрофагов, что делает возможным предположить интенсивную защитную реакцию организма животного на патоген. В печени микроскопических отклонений от нормы не выявлено. В лимфатических фолликулах белой пульпы селезенки имеет место активность центров размножения, красная пульпа заполнена большим количеством лимфоцитов и плазматических клеток, что свидетельствует об активации клеточного звена иммунитета. В паховом лимфатическом узле выявлены обширные центры пролиферации лимфоцитов. Отмечается активация макрофагов, которые образуют очаговые скопления среди лимфоцитов, что может быть интерпретировано как индукция клеточного иммунитета (рис. 7А).

При заражении животных клетками клинического штамма «Ростов» наблюдали картину гистологических срезов, четко отличающуюся от описанной выше. В отдельных участках долей легких, в результате небольшого увеличения количества макрофагов, имеет место слабо выраженное диффузное утолщение межальвеолярных перегородок, в этом случае мы наблюдаем невыраженную реакцию организма на патоген. Необходимо отметить, что возбудитель туберкулеза клинического штамма выявляется на срезе легкого в большом количестве, что также можно интерпретировать как особенность патологии легких, вызванной

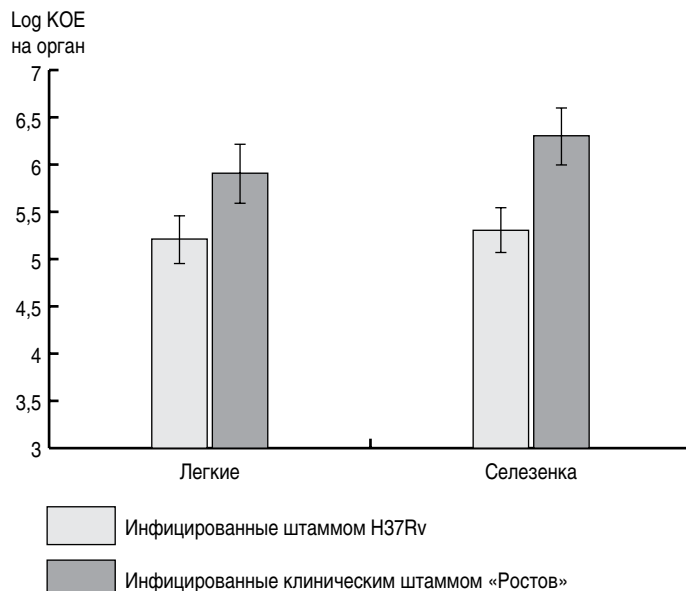


Рис. 6. Изменение количества КОЕ возбудителей туберкулеза в органах мышей линии C57BL.

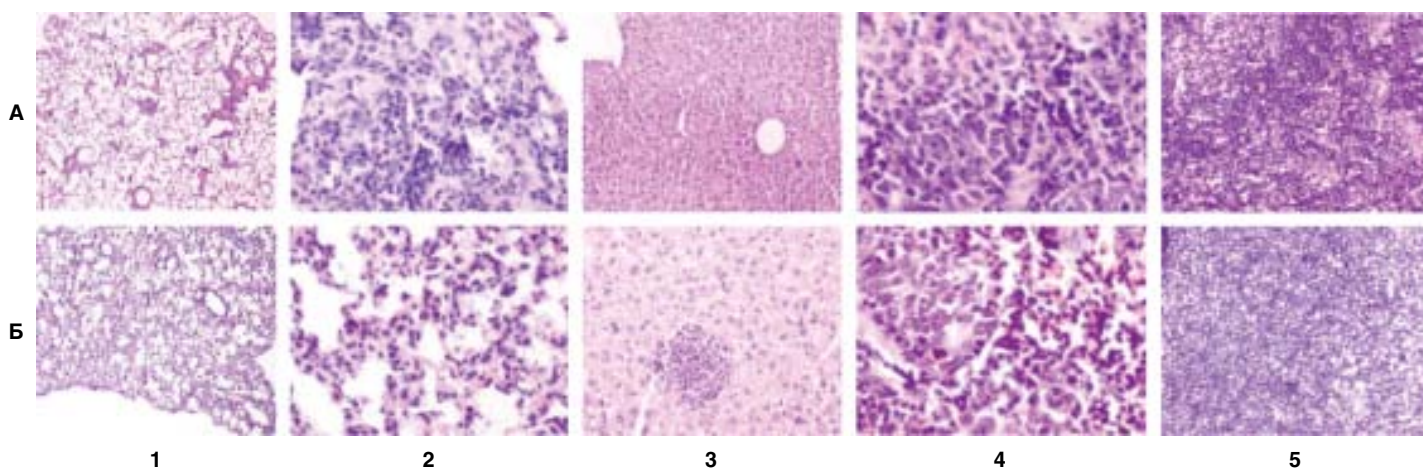


Рис. 7. Патологические изменения во внутренних органах мышей линии C57BL, инфицированных  $5 \times 10^6$  КОЕ/мышь клетками штаммов *M. tuberculosis* H37Rv (А) и «Ростов» (Б): 1, 2 – легкие, увеличение  $\times 4$  и  $\times 20$ ; 3 – печень, увеличение  $\times 10$ ; 4 – селезенка, увеличение  $\times 20$ ; 5 – лимфоузел, увеличение  $\times 20$ .

данным штаммом. В печени встречается небольшое количество гранул, в которых, наряду с макрофагами, имеется значительное количество полиморфноядерных лейкоцитов, что говорит об интенсивном размножении возбудителя и о патологическом воспалении. В красной пульпе селезенки преобладают плазматические клетки, что свидетельствует об отсутствии ответа клеточного звена иммунитета и о развитии интенсивного антительного ответа. Паховый лимфатический узел равномерно заполнен малыми лимфоцитами, т.е. не отличается от лимфатического узла интактного животного (рис. 7Б).

На основании вышеизложенных фактов можно заключить, что инфицирование мышей внутривенным введением клеток клинического штамма *M. tuberculosis* «Ростов» приводит к изменениям в легких животных, состоящим в незначительном увеличении количества макрофагов в некоторых межальвеолярных перегородках. При этом макрофаги имеют относительно узкую цитоплазму, в отличие от широкоплазменных макрофагов, инфильтрирующих легочную ткань при заражении мышей клетками штамма *M. tuberculosis* H37Rv. Инфильтрация легких мышей лимфоцитами, в случае заражения их клиническим штаммом, не выявлена. Приведенные результаты показывают, что изучаемый кли-

нический штамм возбудителя туберкулеза не активирует защитных реакций макроорганизма, в отличие от лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv.

**MIRU-VNTR-типирование**

Метод MIRU-VNTR-типирования выбран для типирования штамма *M. tuberculosis* «Ростов», т.к. данный метод может с высокой эффективностью применяться для анализа одного штамма. Был использован вариант метода, основанный на анализе 35 локусов, разработанный сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ в 2009–2010 гг. Данный набор включает 24 локуса, рекомендованных для анализа в медицинских учреждениях в США (стандартный расширенный набор), а также 11 дополнительных локусов, отличающихся высоким полиморфизмом. Данные для локуса VNTR 0569 получены не были, поскольку размер полученного ампликона не позволял установить количество повторов в локусе (таблица).

Филогенетический анализ, проведенный с использованием международной базы данных VNTRPLUS, показал, что исследуемый штамм кластеризуется с лекарственно-устойчивыми штаммами, выделенными на территории бывшего СССР, входящими в сполигосемейство Beijing, однако в базе данных VNTRPLUS отсутствуют штаммы с полностью идентичными MIRU-VNTR профилями (рис. 8). Сравнение

Таблица. Результаты MIRU-VNTR-типирования

№ ДНК	MIRU 02	MIRU 04	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40	QUB-11a	QUB-11b	QUB 26	ETR-A	ETR-B	ETR-C	ETR-F	VNTR 0424	VNTR 0569	VNTR 0595	VNTR 1443	VNTR 1895	VNTR 1955	VNTR 1982	VNTR 2347	VNTR 2401	VNTR 3171	VNTR 3292	VNTR 3336	VNTR 3690	VNTR 4120	VNTR 4156
1	2	2	3	3	2	5	1	5	3	5	3	3	9	6	8	4	2	4	2,7	2,6	н/д	1	7	2	5	8	4	4	2	14	7	3,6	9	2

Distance	ID	Species	Lineage	MLVA Mtbc15-9	IS6110	IS6111	IS6112	IS6113	IS6114	IS6115	IS6116	IS6117	IS6118	IS6119	IS6120	IS6121	IS6122	IS6123	IS6124	IS6125	IS6126	IS6127	IS6128	IS6129	IS6130	IS6131	IS6132	IS6133	IS6134	IS6135	IS6136	IS6137	IS6138	IS6139	IS6140
User Type 1				9358-25	2	2	4	2	3	3	3	3	3	3	3	5	2	6	4	4	4	4	2	5	1	5	3	2	5	3	8	2	3		
0.0833	3256/02	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	94-32	2	4	4	2	3	3	3	3	3	3	5	2	6	4	4	4	4	2	5	1	5	3	3	5	3	8	2	3			
0.0833	3277/02	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	94-32	2	4	4	2	3	3	3	3	3	3	5	2	6	4	4	4	4	2	5	1	5	3	3	5	3	8	2	3			
0.0833	3364/02	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	94-32	2	4	4	2	3	3	3	3	3	3	5	2	6	4	4	4	4	2	5	1	5	3	3	5	3	8	2	3			
0.125	3309/02	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	94-33	2	4	4	2	3	3	3	3	3	3	5	2	6	4	4	4	4	2	5	1	5	3	3	5	3	8	2	4			
0.125	4498/02	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	96-32	2	4	4	2	3	3	3	3	3	3	6	2	6	4	4	4	4	2	5	1	5	3	3	5	3	8	2	3			

Рис. 8. Результаты сравнения исследуемого образца с базой данных MIRU-VNTRplus (на сайте: <http://www.miru-vntrplus.org>.)



с базой данных, сформированной в результате собственных исследований (34 локуса, 330 штаммов), подтвердило принадлежность изучаемого штамма к штаммам группы Beijing (рис. 9).

При проведении сравнения изучаемого штамма со штаммами, внесенными в базу данных ФБУН ГНЦ ПМБ, нами также не были обнаружены штаммы, имеющие полностью идентичные профили. Местоположение штамма на дендрограмме (рис. 10) указывает на то, что он не кластеризуется со штаммами, имеющими сполиготипы 00000000003171, 000000000003771 и 000000000003371, являясь представителем обособленной филогенетической ветви. Интересно отметить, что на основании данных, полученных при расчете гомологии на основании 24 локусов (рис. 9), подобные закономерности замечены не были.

Полученные данные свидетельствуют о том, что включение в схему идентификации гипервариабельных локусов способно не только увеличить разрешающую способность метода, но также и получить более точную филогенетическую информацию. Однако тот факт, что нам не удалось получить информацию для локуса VNTR 0569, показывает необходимость проведения дополнительных исследований.

### Сполиготипирование

На основании сполиготипирования штамм *M. tuberculosis* «Ростов» отнесен к семейству Beijing. Стоит отметить, что метод сполиготипирования обладает низкой разрешающей способностью для дифференцировки штаммов данного сполигосемейства (рис. 11).

### ПДРФ-генотипирование на основе элемента IS6110

Методом ПДРФ-IS6110 показано, что клинический штамм *M. tuberculosis* «Ростов» кластеризуется со штаммами группы Beijing, обладающими лекарственной устойчивостью. Некоторые штаммы этой группы обладают устойчивостью сразу к пяти антимикробным препаратам – стрептомицину, изониазиду, рифампицину, канамицину и этамбутолу. Следует подчеркнуть, что штаммы, использованные для сравнения, были выделены от пациентов в 2002–2003 гг. За прошедшие 10 лет могли произойти значительные изменения в структуре циркулирующих штаммов. Кроме того, данная выборка штаммов была получена только из одного региона Российской Федерации – г. Тулы и Тульской области. Штаммы, циркулирующие в других регионах, могут иметь определенные отличия.

Для эффективного мониторинга изменений в структуре популяции циркулирующих в Российской Федерации, штаммов *M. tuberculosis* необходимы работы по созданию репрезентативной коллекции клинических изолятов, полученных из всех субъектов Российской Федерации и детальному ее изучению. Такая коллекция должна иметь график стабильного пополнения клиническими образцами, что позволило бы получать данные, актуальные на момент эпидемического расследования.

### Заключение

На основании проведенных микробиологических и молекулярно-генетических исследований показано, что выделенный из мокроты больного туберкулезом человека штамм *M. tuberculosis* «Ростов» относится к семейству штам-

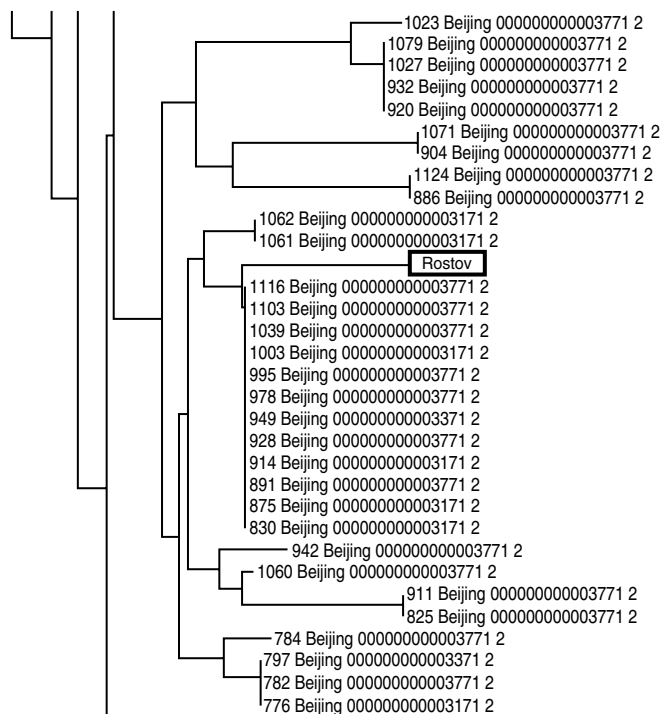


Рис. 9. Результат сравнения исследуемого образца со штаммами, выделенными в Тульской области, на основании 24 локусов MIRUVNTR.

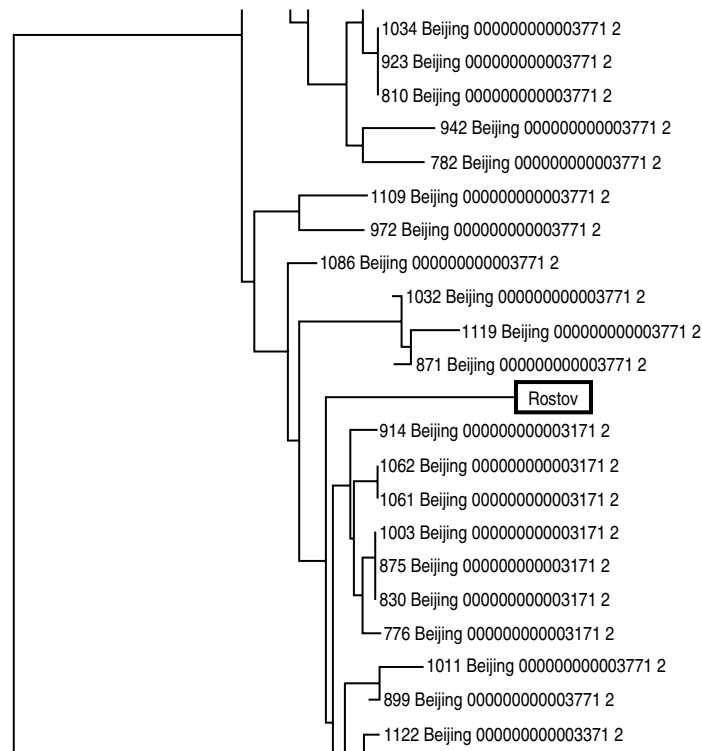


Рис. 10. Результат сравнения исследуемого образца со штаммами, выделенными в Тульской области, на основании анализа 34 локусов MIRUVNTR.

Strain #	8-digital code	Spoligo-family
№1	00000000003771	Beijing

Рис. 11. Результаты сполиготипирования штамма *M. tuberculosis* «Ростов», принадлежащего к сполигосемейству Beijing.

мов возбудителя туберкулеза Beijing (Пекин). Изученный штамм обладает широкой лекарственной устойчивостью. Экспериментально установлена более высокая вирулентность штамма *M. tuberculosis* «Ростов» для мышей линии C57BL, чем вирулентность лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, что выражается в более быстром и необратимом истощении животных; в большей степени обсемененности микобактериями органов экспериментальных животных; в более выраженной гистологической картине патологических изменений внутренних органов животных; в отсутствии защитной реакции макроорганизма в виде клеточного иммунитета на данный патоген. Важной особенностью данного штамма является его более быстрый рост на жидких питательных средах, по сравнению с лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv.

#### Финансирование

Работа выполнена за счет базового финансирования ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора.

#### Литература

1. WHO. Global Tuberculosis Report. 2016:214.ISBN 978 92 4 156539 4.
2. WHO. Available at: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_TB\\_MortalityRates\\_HIVnegative\\_2014.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_TB_MortalityRates_HIVnegative_2014.png)
3. Smirnova PA, Turkova A, Nikishova EI, Seddon JA, Chappell E, Zolotaya OA, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in children in northwest Russia: an observational cohort study. *Eur Respir J.* 2016;48(5):1496-99. DOI: 10.1183/13993003.00354-2016
4. Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol.* 2009;10(9):943-8. DOI: 10.1038/ni.1781
5. Singla N, Singla R, Fernandes S, Behera D. Post treatment sequelae of multi-drug resistant tuberculosis patients. *Indian J Tuberc.* 2009;56:206-12.
6. Ignatyeva O, Balabanova Y, Nikolayevskyy V, Koshkarova E, Radiulyte B, Davidaviciene E, et al. Resistance profile and risk factors of drug resistant tuberculosis in the Baltic countries. *Tuberculosis (Edinb).* 2015;95(5):581-8. DOI: 10.1016/j.tube.2015.05.018.
7. O'Donnell MR, Jarand J, Loveday M, Padayatchi N, Zelnick J, Werner L, et al. High incidence of hospital admissions with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis among South African health care workers. *Ann Intern Med.* 2010;153:516-522. DOI: 10.7326/0003-4819-153-8-201010190-00008.
8. Shur KV, Zaychikova MV, Mikhecheva NE, Klimina KM, Bekker OB, Zhdanova SN, et al. Draft genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* strain B9741 of Beijing B0/W lineage from HIV positive patient from Siberia. *Genom Data.* 2016;10:61-2. DOI: 10.1016/j.gdata.2016.08.001.
9. Mokrousov I. Molecular structure of *Mycobacterium tuberculosis* population in Russia and its interaction with neighboring countries. *Int J Mycobacteriol.* 2015;4(Suppl. 1):56-57. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2014.08.002.
10. Потапов ВД. Разработка и применение биологических моделей для изучения хронической туберкулезной инфекции. Дис. ... доктора биологических наук: 03.02.03, 03.01.06. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Оболенск, 2013.
11. Богун АГ, Благодатских СА, Мухина ТН, Майская НВ, Шемякин ИГ. Филогенетический анализ клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* с использованием 35 переменных тандемных повторов и шести однонуклеотидных полиморфизмов. Туберкулез и социально-значимые заболевания. 2013;(2):5-11.
12. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35(4):907-14.
13. van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(2):406-9.

#### References

1. WHO. Global Tuberculosis Report. 2016:214.ISBN 978 92 4 156539 4.
2. WHO. Available at: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_TB\\_MortalityRates\\_HIVnegative\\_2014.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_TB_MortalityRates_HIVnegative_2014.png)
3. Smirnova PA, Turkova A, Nikishova EI, Seddon JA, Chappell E, Zolotaya OA, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in children in northwest Russia: an observational cohort study. *Eur Respir J.* 2016;48(5):1496-99. DOI: 10.1183/13993003.00354-2016
4. Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol.* 2009;10(9):943-8. DOI: 10.1038/ni.1781
5. Singla N, Singla R, Fernandes S, Behera D. Post treatment sequelae of multi-drug resistant tuberculosis patients. *Indian J Tuberc.* 2009;56:206-12.
6. Ignatyeva O, Balabanova Y, Nikolayevskyy V, Koshkarova E, Radiulyte B, Davidaviciene E, et al. Resistance profile and risk factors of drug resistant tuberculosis in the Baltic countries. *Tuberculosis (Edinb).* 2015;95(5):581-8. DOI: 10.1016/j.tube.2015.05.018.
7. O'Donnell MR, Jarand J, Loveday M, Padayatchi N, Zelnick J, Werner L, et al. High incidence of hospital admissions with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis among South African health care workers. *Ann Intern Med.* 2010;153:516-522. DOI: 10.7326/0003-4819-153-8-201010190-00008.
8. Shur KV, Zaychikova MV, Mikhecheva NE, Klimina KM, Bekker OB, Zhdanova SN, et al. Draft genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* strain B9741 of Beijing B0/W lineage from HIV positive patient from Siberia. *Genom Data.* 2016;10:61-2. DOI: 10.1016/j.gdata.2016.08.001.
9. Mokrousov I. Molecular structure of *Mycobacterium tuberculosis* population in Russia and its interaction with neighboring countries. *Int J Mycobacteriol.* 2015;4(Suppl. 1):56-57. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2014.08.002.
10. Potapov VD. Development and application of biological models for the study of chronic TB infection. Doctoral Dissertation in Biology: 03.02.03, 03.01.06. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, 2013. (In Russian).
11. Bogun AG, Blagodatskikh SA, Mukhina TN, Maiskaya NV, Shemyakin IG. Phylogenetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using 35 variable tandem repeats and six single nucleotide polymorphisms. *Tuberculosis and socially significant diseases.* 2013;(2):5-11. (In Russian).
12. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35(4):907-14.
13. van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(2):406-9.

#### Информация об авторах:

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ  
 Телефон: (4967) 36-0003

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Фурсов Михаил Васильевич, младший научный сотрудник лаборатории стрессов микроорганизмов ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН»  
Адрес: 119071, Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2  
Телефон: (495) 954-5283

Богун Александр Геннадьевич, кандидат биологических наук, заведующий отделом коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Мухина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Кисличкина Ангелина Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Кадникова Лидия Александровна, аспирант ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Благодатских Станислав Александрович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Ганина Елена Анатольевна, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Морозова Татьяна Павловна, научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Домотенко Любовь Викторовна, кандидат химических наук, заведующая лабораторией разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Детушев Константин Владимирович, научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, заместитель директора по качеству и развитию ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

**Information about authors:**

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med), Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Tatiana I. Kombarova, Cand. Sci. (Biol.), senior researcher of Biological Testing Lab., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Mikhail V. Fursov, junior researcher of Microbial Stress Lab., Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences»  
Address: Leninsky prospect, 33, build. 2, 119071 Moscow, Russian Federation  
Phone: (495) 954-5283

Alexander G. Bogun, Cand. Sci. (Biol.), Head of Microbial Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Tat'yana N. Mukhina, PhD (biol.), Senior Researcher of Microbial Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Angelina A. Kislichkina, PhD (biol.), Senior Researcher of Microbial Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Lidiya A. Kadnikova, postgraduate student of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Stanislav A. Blagodatsky, junior researcher of Microbial Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Elena A. Ganina, Researcher of Immunochemistry for Pathogenic Microorganisms Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Tatiana P. Morozova, Researcher of the Lab. for development of nutrient media, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Lyubov V. Domotenko, Cand. Sci. (Chem.), Head of the Lab. for development of nutrient media, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Konstantin V. Detushev, Researcher of Microbial Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Mikhail V. Khrarov, Cand. Sci. (Med.), Deputy Director for Quality and Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003