

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук  
(ИМБ РАН)

*На правах рукописи*

ГРЯДУНОВ Дмитрий Александрович

**Гидрогелевые биочипы – инструменты многопараметрического  
анализа маркеров бактериальных, вирусных и растительных  
геномов**

03.01.03 – молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

**Научный консультант**

доктор физико-математических наук

профессор А.С. Заседателев

Москва

2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	Введение. Общая характеристика работы	6
	Актуальность темы исследования и степень ее разработанности	6
	Цель исследования	10
	Задачи исследования	11
	Научная новизна	12
	Практическая значимость	14
	Методология и методы исследования	16
	Положения, выносимые на защиту	17
	Степень достоверности и апробация результатов исследования	18
	Публикации	19
1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	20
1.1	Технологии биологических микрочипов: ключевые аспекты, проблемы, перспективы	20
1.1.1	Типы биологических микрочипов и способы нанесения зондов	21
1.1.2	Иммобилизация молекулярных зондов на подложке микрочипа	25
1.1.3	Некоторые аспекты гибридизационного анализа на микрочипах	31
1.1.4	Регистрация сигналов на микрочипах	34
1.1.5	Применение микрочипов. Проблемы и перспективы	35
1.2	Возбудитель туберкулеза и его лекарственная устойчивость	40
1.2.1	Механизмы формирования устойчивости возбудителя туберкулеза к противотуберкулезным препаратам	42
1.2.1.1	Приобретенная резистентность	42
1.2.1.2	Естественная резистентность	47
1.2.1.2.1	Пассивная резистентность возбудителя туберкулеза	47
1.2.1.2.2	Специализированные механизмы природной резистентности <i>M. tuberculosis</i>	49
1.2.1.2.3	Эпигенетическая лекарственная толерантность <i>M. tuberculosis</i>	57
1.2.2	Методы анализа лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза	58
1.3	Инфекции репродуктивного тракта: терапия, антибиотикорезистентность и методы анализа	69

1.3.1	Краткая характеристика наиболее распространенных микроорганизмов - возбудителей ИРТ и современные препараты для их лечения	71
1.3.2	Лекарственная устойчивость возбудителей ИРТ	75
1.3.2.1	<i>Treponema pallidum</i>	75
1.3.2.2	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	77
1.3.2.3	<i>Chlamydia trachomatis</i>	82
1.3.2.4	<i>Mycoplasma</i> и <i>Ureaplasma spp</i>	82
1.3.2.5	Лекарственная устойчивость возбудителей бактериального вагиноза	84
1.3.3	Методы анализа лекарственной устойчивости возбудителей ИРТ	87
1.4	Вирус гепатита С: методы анализа и актуальные режимы терапии	90
1.5	Генетически модифицированные источники растительного происхождения: состояние проблемы, методы идентификации	96
1.6	Заключение по обзору литературы	105
2	<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	
2.1	Клинические образцы, изоляты, препараты растительной ДНК	106
2.2	Определение фенотипической чувствительности к антимикробным препаратам	107
2.3	Экстракция нуклеиновых кислот	108
2.4	Синтез олигонуклеотидов и праймеров	108
2.5	Изготовление гидрогелевых биочипов	109
2.6	Аmplификация и флуоресцентное маркирование исследуемых фрагментов геномов	110
2.7	Гибридизация и отмывка на биочипах, регистрация результатов	111
2.8	Секвенирование фрагментов геномов	112
2.9	Статистическая обработка результатов	112
3	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	
3.1	Создание методики, обеспечивающей полный цикл многопараметрического анализа биологического образца	113
3.1.1	Разработка унифицированной процедуры выделения НК и ее реализация в микрофлюидной системе	113
3.1.2	Хранение реагентов для выделения и очистки нуклеиновых кислот	116

	внутри микрофлюидного модуля	
3.1.3	Сменный микрофлюидный модуль для выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологического образца	117
3.1.4	Реализация микрофлюидной системы при одновременном выделении нуклеиновых кислот из нескольких биологических образцов	123
3.1.5	Мультиплексная амплификация исследуемых сегментов геномов с их одновременным флуоресцентным маркированием	132
3.1.6	Ключевые аспекты гибридизационного анализа на гидрогелевых биочипах	137
3.1.7	Регистрация и интерпретация результатов анализа на биочипе	143
3.2	Разработка и внедрение методов выявления клинически значимых маркеров геномов возбудителей туберкулеза и микобактериозов	148
3.2.1	Биочип для идентификации мутаций в геноме возбудителя туберкулеза, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду	148
3.2.2	Оценка диагностической и клинической эффективности набора «ТБ-Биочип-1»	153
3.2.3	Идентификация мутаций в гене <i>gyrA</i> , определяющих устойчивость к фторхинолонам	159
3.2.4	Анализ генетических детерминант резистентности ТБ к фторхинолонам и инъекционным препаратам	163
3.2.5	Разработка метода обнаружения ДНК возбудителя туберкулеза с одновременным генотипированием и идентификацией генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости	168
3.2.6	Установление корреляций между генетическими детерминантами резистентности и уровнем фенотипической чувствительности <i>M. tuberculosis</i>	183
3.2.7	Генотипирование микобактерий туберкулезного комплекса на основе анализа региона прямых повторов	200
3.2.8	Видовая идентификация и дифференциация микроорганизмов рода <i>Mycobacterium</i> – возбудителей туберкулеза и микобактериозов	208
3.3	Анализ генетических детерминант резистентности к антимикробным препаратам возбудителей инфекций	224

	репродуктивного тракта	
3.3.1	Фенотипическая чувствительность и генетические детерминанты резистентности изолятов <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	224
3.3.2	Биочип для идентификации генетических детерминант резистентности к антимикробным препаратам возбудителей инфекций репродуктивного тракта	239
3.4	Определение генотипа и подтипа вируса гепатита С на основе анализа области NS5B вирусного генома	249
3.5	Идентификация генетических детерминант трансгенности растительного происхождения на гидрогелевых биочипах	258
	Заключение	269
	Выводы	270
	Благодарности	273
	Список сокращений и условных обозначений	275
	Список литературы	277

*Посвящается*

*Академику*

*Андрею Дарьевичу Мирзабекову.*

*К 80-летию со дня рождения*

## **Введение. Общая характеристика работы**

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

В последнее десятилетие накоплено большое количество знаний о молекулярных механизмах биохимических процессов, определяющих основы функционирования живых систем и позволяющих оценивать вероятность возникновения заболевания до проявления у пациента клинических симптомов, прогнозировать тяжесть протекания патологических или инфекционных процессов, выбирать эффективные и рациональные режимы терапии. В основе таких исследований лежит анализ данных, полученных при определении нуклеотидных последовательностей геномов человека, микроорганизмов или вирусов.

Для идентификации и одновременного количественного определения множества последовательностей нуклеиновых кислот (НК) разработано немало методов и технологий. В целом, все они могут быть объединены в три группы: технологии амплификации НК, в первую очередь, полимеразная цепная реакция (ПЦР), а также методики гибридизации НК и технологии секвенирования нового поколения (NGS). Простота и высокая чувствительность делают методы ПЦР наиболее доступными для моноплексной идентификации геномных мишеней. Последнее поколение данной технологии – цифровая эмульсионная ПЦР существенно расширяет спектр одновременно анализируемых мишеней, обладает повышенной устойчивостью к ингибиторам, обеспечивает эффективный количественный анализ НК в сравнении с традиционной ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Чувствительность цифровой ПЦР ограничена точностью работы Taq-полимераз, поскольку состав буферов, используемый в эмульсионной системе

амплификации, ограниченно совместим с высокоточными ферментами, обладающими корректирующей активностью (Q5, Fusion и т.д.) (Didelot et al., 2013).

Несмотря на сложность и все еще дороговизну анализа технологии NGS, безусловно, являются инструментом будущего в скрининге и профилировании популяций, метагеномных исследованиях. Успех внедрения технологий NGS во многом зависит от миниатюризации платформ, примером которых может быть система MinION (Votintseva et al., 2017), усовершенствования этапа пробоподготовки образца и выделения НК, упрощения и ускорения процедуры анализа в условиях потоковых тестов клиничко-диагностической лаборатории (Khodakov et al., 2016).

Альтернативной технологией, успешно зарекомендовавшей себя при анализе профилей транскрипции для оценки экспрессии генов, в сравнительной геномной гибридизации, при одновременной идентификации множества специфичных мишеней в геномах человека, растений, микроорганизмов и вирусов, является технология олигонуклеотидных биологических микрочипов (биочипов, microarrays) (Marzancola et al., 2016). Ключевым элементом ДНК-биочипа является матрица ячеек, каждая из которых содержит молекулярные зонды, нуклеотидные последовательности которых специфичны к фрагментам анализируемых геномов. Одновременно проводимые в каждом из элементов биочипа реакции гибридизации и/или амплификации НК обеспечивают параллельную идентификацию множества геномных мишеней, тем самым реализуя принцип многопараметрического анализа биологического образца, что позволяет использовать биочипы в качестве эффективного молекулярного инструмента выявления клинически значимых маркеров возбудителей и причин социально-значимых заболеваний, мониторинга пищевых продуктов, растительного сырья, возможных агро- и природных биоценозов.

В основе проведения анализа на ДНК-микрочипах лежит гибридизация НК. Преимуществами гибридизации являются простота, мультиплексность и воспроизводимость. В отличие от ферментативных реакций, гибридизацию

возможно проводить в широком диапазоне температур и композиций буферов. В то же время, гибридизация не обеспечивает непосредственной амплификации НК и должна быть сочетана с технологиями усиления сигналов, либо с высокочувствительными инструментами для регистрации дуплексов НК. В этой связи микрочипы используются для прямой (безамплификационной) количественной детекции РНК, выделенной из больших объемов образца, или для регистрации гибридизационных дуплексов, образованных иммобилизованными зондами и ампликонами, полученными в предварительной стадии амплификации НК, как правило, с использованием мультиплексной ПЦР. Таким образом, чувствительность анализа с использованием ДНК-чипов определяется исходным количеством НК, эффективностью амплификации исходного препарата НК и способом регистрации гибридизационных дуплексов. В случае наиболее распространенной флуоресцентной детекции взаимодействий в элементах биочипа чувствительность метода зависит, в том числе, и от прибора-анализатора флуоресценции.

В теории, ДНК-чипы должны обеспечивать количественное определение НК. Реальные эксперименты показывают значительные количественные отклонения при оценке экспрессии генов разными платформами микрочипов и даже разными микрочипами одного и того же производителя (Eklund and Szallasi, 2008). Во-первых, кинетика гибридизации нелинейно определяется плотностью иммобилизованных зондов на поверхности матрицы: иммобилизованные или синтезированные на подложках чипов высокой плотности олигонуклеотиды неспецифично гибридизуются друг с другом в зависимости от степени гомологии. Во-вторых, на кинетику гибридизации влияют длина и последовательность целевых молекул ДНК. В третьих, квантовый выход используемого для регистрации флуорофора зависит как от последовательности прилегающей НК, так и от близости других флуорофоров. В связи с этим, экспрессионные микрочипы используются для воспроизводимого анализа относительного содержания НК, нежели для точного определения концентрации (Salazar et al., 2011).



Помимо применения микрочипов для оценки экспрессии генов в клеточных системах, ряд тестов на основе биочипов был одобрен для диагностики *in vitro* национальными регуляторными ведомствами. В частности, FDA (Food and Drug administration, США) разрешены к применению системы MammaPrint (Agendia, Нидерланды) для оценки профилей экспрессии ~70 генов, ассоциированных с рецидивом рака молочной железы; INFINITI CYP2C19 (Autogenomics, США) для идентификации однонуклеотидного полиморфизма, определяющего ответ на терапию антидепрессантами; CytoScan Dx (Affymetrix, США) для определения мутационного профиля, характеризующего задержку в развитии и интеллекте и другие врожденные аномалии. Быстрый рост приложений, в основном на основе биочипов низкой плотности, наблюдается в области клинической микробиологии и вирусологии (Nsofor, 2014, Schulze et al., 2015).

Одним из ключевых параметров, характеризующих микрочипы низкой плотности, является тип субстрата матрицы: подложки с гидрогелевым покрытием, например, из полиакриламида или агарозы, и матрицы с функциональными группами, такими как альдегиды, эпокси- или аминогруппы (полилизин) и др (Damin et al., 2016). В силу природных гидрофобных свойств полимерные гидрогели являются приоритетным субстратом для иммобилизации биомолекул. Традиционным подходом к изготовлению микрочипов являются покрытие стеклянной или пластиковой подложки однородным слоем гидрогеля с последующим нанесением зондов либо синтезом олигонуклеотидов *in situ*. В качестве сшивающих агентов для формирования гидрогелевых подложек используются как синтетические поли-2-гидроксиэтилметакрилат (pHEMA), полиэтиленгликоль-метакрилат, полиакриламиды, так и несинтетический полимер коллаген (xU)(Le Goff et al., 2015). В результате такого подхода емкость иммобилизации зондов на подложке микрочипа возрастает на несколько порядков (Beyer et al., 2014).

Принципиальным отличием технологии биочипов, созданной в ИМБ РАН под руководством академика Андрея Дарьевича Мирзабекова (1937-2003) и

используемой в настоящей работе, является иммобилизация молекулярных зондов в трехмерных элементах полусферической формы, закрепленных на плоской подложке (Yershov et al., 1996). Исследование кинетики и термодинамики гибридизации фрагментов ДНК на гидрогелевых биочипах показало, что использование коротких (до 25 н.о.) олигонуклеотидов позволяет лучше дискриминировать точечные нуклеотидные замены, а иммобилизация в трехмерных гелевых элементах позволяет значительно увеличить интенсивность положительных гибридизационных сигналов и уменьшить статистический разброс по сравнению с двумерными микрочипами (Ramakrishnan et al., 2002; Sorokin et al., 2007). Таким образом, биочипы низкой плотности на основе гидрогеля обладают значительным потенциалом для идентификации клинически значимых мутаций и однонуклеотидного полиморфизма в геномах человека, бактерий и вирусов, что позволяет их использовать для разработки методов и диагностических систем для многопараметрического анализа возбудителей и причин социально-значимых заболеваний (Грядун и др., 2009; Gryadunov et al., 2011).

К числу приоритетных мишеней, анализируемых в настоящей работе с использованием технологии олигонуклеотидных гидрогелевых биочипов, относят полиморфизм бактериальных и вирусных геномов, обеспечивающий генотипирование и видовую идентификацию инфекционных агентов, генетические детерминанты, вовлеченные в формирование лекарственной устойчивости микроорганизмов, трансгенные элементы (промоторы, терминаторы и маркерные гены) в геномах растений, характеризующие генно-модифицированные источники (ГМИ) растительного происхождения.

### **Цель исследования**

Разработка и внедрение методов многопараметрического анализа бактериальных, вирусных и растительных геномов на основе гидрогелевых биочипов для установления детерминант лекарственной устойчивости и

транскрипции, видовой идентификации и эпидемиологического генотипирования.

### **Задачи исследования**

1. Создание методик, обеспечивающих полный цикл многопараметрического анализа биологического образца, в том числе:

- унифицированной процедуры обработки биологического образца и выделения НК, включая реализацию данной процедуры в микрофлюидных системах с целью ее автоматизации;

- мультиплексной амплификации сегментов бактериальных, вирусных либо растительных геномов с их одновременным флуоресцентным маркированием;

- гибридизации полученных ПЦР-фрагментов на гидрогелевых биочипах;

- интерпретации результатов анализа на биочипах.

2. Разработка методов анализа специфичных нуклеотидных последовательностей бактериальных, вирусных и растительных геномов, включая:

- идентификацию генетических детерминант резистентности возбудителя туберкулеза (ТБ) к препаратам первого и второго ряда;

- генотипирование микобактерий туберкулезного комплекса (МТВС);

- видовую идентификацию и дифференциацию микроорганизмов рода *Mycobacterium*;

- определение генотипа и подтипа вируса гепатита С (ВГС);

- идентификацию возбудителей инфекций репродуктивного тракта (ИРТ) с одновременным анализом детерминант резистентности к широкому спектру антимикробных препаратов (АМП);

- обнаружение генно-модифицированных источников растительного происхождения в пищевых продуктах и сырье.

3. Исследование коллекций возбудителей туберкулеза и микобактериозов на предмет выявления доминирующих семейств и видов, оценки их

мутационного профиля, установления корреляций между генетическими детерминантами и уровнем фенотипической устойчивости.

4. Изучение генетического разнообразия вируса гепатита С в коллекциях, изолированных в РФ и Франции.

5. Анализ характера распространения генетических детерминант антибиотикорезистентности облигатных патогенов - возбудителей ИРТ, таких как *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* и др.

6. Исследование образцов растительной ДНК, выделенных из разнообразных пищевых и других источников, с использованием разработанного метода идентификации маркеров трансгенности для оценки возможности его применения для быстрого массового скрининга на наличие ГМИ продуктов питания и кормов.

### **Научная новизна**

Впервые предложена реализация процедуры выделения и очистки НК в оригинальных микрофлюидных модулях, изолированных от внешней среды и обеспечивающих полный цикл обработки образца и выделения НК, включая комбинированный химический и ферментативный лизис бактериальных клеток и/или вирусных частиц, очистку НК на твердофазном сорбенте с последующей элюцией.

Созданы методики многопараметрического анализа бактериальных, вирусных и растительных НК на основе олигонуклеотидных гидрогелевых биочипов, включающие мультиплексную амплификацию с последующей гибридизацией на биочипах, регистрацию флуоресцентных картин гибридизации и интерпретацию результатов.

Предложена процедура одностадийной мультиплексной ПЦР, обеспечивающая в едином реакционном объеме одновременную амплификацию и флуоресцентное маркирование десятков независимых сегментов геномов с получением преимущественно одноцепочечных флуоресцентно-меченных ПЦР-продуктов.

Разработаны подходы к повышению величин полезного сигнала и дискриминационного отношения между совершенными и несовершенными гибридизационными дуплексами на биочипе, включающие выбор последовательностей дискриминирующих олигонуклеотидов, оценку влияния концентраций иммобилизованных зондов, состава гибридизационного буфера и температуры, нормировку сигналов от флуоресцентно-меченных иммобилизованных зондов.

Впервые разработаны методы идентификации генетических детерминант множественной (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) ТБ, генотипирования МТВС, видовой идентификации и дифференциации туберкулезных и атипичных микобактерий. Исследование различных коллекций *M. tuberculosis* позволило оценить вклад различных генетических детерминант в формирование лекарственной устойчивости ТБ, описать мутационный профиль семейств возбудителя туберкулеза, установить доминирующие генотипы *M. tuberculosis* и виды атипичных микобактерий.

Создан биочип, позволяющий одновременно обнаруживать 12 возбудителей ИРТ с одновременной идентификацией 39 генетических детерминант резистентности к АМП, включая пенициллины, тетрациклины, фторхинолоны, макролиды, нитроимидазолы, спектиномицин. Исследование коллекции изолятов *N. gonorrhoeae* показало одновременное присутствие в бактериальной хромосоме множественных детерминант резистентности, обусловленное вертикальным характером наследования соответствующих хромосомных мутаций, подтверждая накопление в популяции генетически связанных клонов с признаками множественной устойчивости к АМП.

Впервые разработан метод определения нуклеотидной последовательности высокополиморфной области NS5В генома ВГС на основе гидрогелевого биочипа, обеспечивающий точную идентификацию генотипов и подтипов ВГС, являющихся ключевыми детерминантами при выборе режима противовирусной терапии.

Предложен метод мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на гидрогелевом биочипе для идентификации различных трансгенных элементов (промоторов, терминаторов, маркерных генов) растительной ДНК в пищевых продуктах и сырье.

### **Практическая значимость**

Практический аспект настоящей работы связан с проведением всего цикла испытаний, предусмотренных процедурой государственной регистрации в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения РФ (Росздравнадзор), с последующим внедрением созданных тест-систем на основе гидрогелевых биочипов в учреждения практического здравоохранения и масштабным анализом клинического материала с целью оценки диагностической и клинической эффективности разработанных тестов.

Наборы реагентов на основе гидрогелевых биочипов «ТБ-Биочип-1» (Регистрационное удостоверение (РУ) ФС 03262004/0889-04) и «ТБ-БИОЧИП-2» (РУ ФС 01012006/3527-2006) для выявления микобактерий туберкулеза и определения их лекарственной чувствительности к рифампицину/ изониазиду и фторхинолонам, соответственно, стали первыми молекулярными системами на основе биочипов для диагностики *in vitro*, официально разрешенными Росздравнадзором для применения в практике учреждений противотуберкулезной службы. В ходе эксплуатации наборов серии «ТБ-Биочип» более чем в 20 учреждениях противотуберкулезной службы РФ и стран СНГ, семи бактериологических лабораториях ФСИН РФ доказана их клиническая эффективность. Так, число излеченных больных с МЛУ-формами ТБ увеличилось по меньшей мере в 3 раза при ранней постановке диагноза с использованием биочипов в отличие от диагностики лекарственной устойчивости традиционными методами культивирования (Васильева и др., 2012). Экономическая эффективность подтверждена МЗ и СР РФ, в частности «...экономия бюджетных средств при внедрении технологии биочипов для диагностики туберкулеза и определения лекарственной чувствительности

возбудителя составляет не менее 70 рублей на каждый вложенный рубль» (Методические рекомендации «Оценка социально-экономической эффективности применения метода биочип-диагностики во фтизиатрии», МЗ и СР РФ, Москва, 2009 г). Наборы реагентов «ТБ-Биочип» включены в Приказы Министерства здравоохранения РФ, Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза Российского общества фтизиатров.

С целью выявления причин поствакцинальных осложнений у детей, обусловленных штаммом *M. bovis BCG*, эпидемиологического генотипирования МТВС разработан, зарегистрирован и активно применяется набор «СПОЛИГО-БИОЧИП» (РУ ФСР 2010/09159).

Для выявления ШЛУ-форм ТБ разработан и внедрен в медицинскую практику набор реагентов «ТБ-ТЕСТ» (РУ РЗН 2014/1709), обеспечивающий одновременное установление генотипа эндемичных для РФ штаммов и определение генетических детерминант устойчивости к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, канамицину, амикацину, капреомицину и этамбутолу. Установленные корреляции между генетическими маркерами резистентности и уровнем фенотипической устойчивости ТБ к основным и резервным препаратам позволяют дифференцированно назначать высокие дозы лекарств или наоборот, удалять конкретные препараты из схем терапии МЛУ и ШЛУ ТБ.

Набор реагентов «НСV-БИОЧИП» (РУ ФСР 2011/10135) для определения генотипа и подтипа ВГС, созданный на основе метода определения последовательности области NS5B, испытан в лабораториях Франции и РФ. Доза и длительность терапии новейшими противовирусными препаратами прямого действия, необходимость добавления в схему рибавирина, возникновение резистентных вариантов вируса определяются генотипами и подтипами ВГС (Cento et al, 2013; Nezode, 2016).

Разработан и зарегистрирован в Росздравнадзоре аппаратный комплекс с 24 одноразовыми микрофлюидными модулями, в каждом из которых

происходит автоматизированное выделение и очистка НК из биологического образца (РУ ФСР 2012/13097). Автоматизация длительной и трудоемкой стадии выделения НК позволяет сократить время подготовки пробы для дальнейшего анализа, снизить вероятность контакта исследователя с патогенным материалом и кросс-контаминации изучаемых образцов, а также сократить количество операций, выполняемых человеком.

Разработанный гидрогелевый биочип для анализа маркеров резистентности возбудителей ИРТ к широко применяемым АМП послужит базисом для создания тест-системы, позволяющей проводить персонализированную терапию больных, основанную на рациональном назначении АМП, уменьшающей число осложнений при лечении воспалительных заболеваний урогенитального тракта, вызванных разнообразной и резистентной к терапии группой микроорганизмов.

Разработанный совместно с Институтом физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН метод идентификации генетических детерминант трансгенности в растительной ДНК утвержден в качестве национального стандарта (ГОСТ Р 52174-2003 «Биологическая безопасность. Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа») с последней актуализацией в 2014 г.

### **Методология и методы исследования**

В работе использован комплекс современных молекулярно-биологических, биохимических, микробиологических, статистических подходов, а также методы полимерной химии и флуоресцентной оптической микроскопии. Методологические подходы и решения, описанные в настоящей работе и направленные на создание высокотехнологичных методов анализа последовательностей нуклеиновых кислот, были разработаны автором лично и при его непосредственном руководстве в Лаборатории технологий молекулярной диагностики ИМБ РАН. Проведенные испытания разработанных



методик выполнены на выборках значительного объема образцов, что позволило получить статистически значимые результаты.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Комбинированное применение микрофлюидных технологий для получения препарата НК с последующей амплификацией и гибридизацией на олигонуклеотидных гидрогелевых биочипах обеспечивает эффективную идентификацию последовательностей полиморфных локусов бактериальных, вирусных и растительных геномов.

2. Процедура мультиплексной ПЦР с использованием циклического изменения температуры элонгации в течение короткого (до 2 с) времени позволяет проводить высокочувствительную амплификацию с одновременным флуоресцентным маркированием десятков сегментов геномов, в том числе, с высоким (> 70%) содержанием GC.

3. Величины полезного сигнала элементов гидрогелевого биочипа превышают аналогичные на поверхностном микрочипе в 2-10 раз, значения достигнутых дискриминационных отношений между совершенными и несовершенными гибридизационными дуплексами выше в 2-5 раз, что позволяет оптимизировать набор иммобилизуемых олигонуклеотидов и количество элементов биочипа, разработать простые алгоритмы интерпретации результатов идентификации значимых ДНК-маркеров.

4. Разработанный, запатентованный и внедренный в медицинскую практику комплекс молекулярно-генетических методов на основе гидрогелевых биочипов решает широкий спектр задач лабораторной диагностики туберкулеза, включая одновременную идентификацию генетических детерминант резистентности возбудителя к препаратам первого и второго ряда, генотипирование микобактерий туберкулезного комплекса, видовую идентификацию и дифференциацию туберкулезных и атипичных микобактерий.

5. Созданный метод определения нуклеотидной последовательности области NS5B генома ВГС на основе гидрогелевого биочипа позволяет идентифицировать 6 генотипов и 36 различных подтипов ВГС, включая клинически значимые подтипы 1a, 1b, 4a, 4d, 3a с эффективностью, близкой к 100%.

6. Идентификация сочетаний генетических детерминант резистентности к АМП у возбудителей ИРТ существенно повышает предсказательную ценность определения резистентного фенотипа, что показано на примере анализа выборки изолятов *N. gonorrhoeae* с использованием специализированного гидрогелевого биочипа.

7. Разработанный метод идентификации 10 детерминант трансгенности с пределом чувствительности 0,5% трансгенной ДНК может быть использован для скрининга продуктов питания и кормов на наличие ГМИ растительного происхождения.

### **Степень достоверности результатов и апробация работы**

Выносимые на защиту положения и выводы подкреплены фактическим материалом и отражают основные достижения соискателя по теме работы. Достоверность результатов определяются достаточным объемом выборки анализируемых данных и их адекватной статистической обработкой. Разработанные на основе созданных методов и зарегистрированные в Росздравнадзоре при непосредственном участии соискателя восемь медицинских изделий для диагностики *in vitro* (6 наборов реагентов и 2 изделия медицинской техники) выпускаются ООО «БИОЧИП-ИМБ» - дочерней компанией ИМБ РАН на условиях лицензионных договоров об использовании прав на изобретения – патенты, автором которых является соискатель.

Результаты работы были представлены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Туберкулез и сочетанные инфекции: вызовы и перспективы» (Москва, 2017), на VIII и IX Всероссийских научно-практических конференциях с международным

участием «Молекулярная диагностика» (Москва, 2014, 2017); на II Российском Конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2016); на XVIII-XX Форумах «Национальные дни лабораторной медицины» (Москва, 2014-2016); на III и IV Конгрессах Национальной ассоциации фтизиатров (Санкт-Петербург, 2014-2015); на XIV-XVI Всероссийских съездах дерматовенерологов и косметологов (Москва, 2014-2016); на Юбилейном конгрессе Федерации Европейских биохимических обществ и Европейской организации по молекулярной биологии (FEBS-EMBO 2014 Conference, Париж); на VII Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 2013); на Всероссийской конференции «Актуальные проблемы физики полимеров и биополимеров» (Москва, 2012); на Международной конференции «Биология – наука XXI века» (Москва, 2012); на Европейском Конгрессе по автоматизации лабораторных технологий (European Lab Automation Congress, Гамбург, 2011); на Европейской конференции по молекулярной диагностике (Molecular diagnostics Europe, Лондон, 2011); других конференциях, форумах и конгрессах (всего – более 40 устных и стендовых докладов).

Апробация диссертационной работы состоялась 21 августа 2017 г. на Межлабораторном коллоквиуме Лаборатории биологических микрочипов и Лаборатории технологий молекулярной диагностики ИМБ РАН.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 48 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ (из них 20 - в зарубежных журналах, 28 – в отечественных журналах); две главы в монографиях, изданных в РФ; получено 20 патентов, включая 4 зарубежных; 1 свидетельство о регистрации программы для ЭВМ.

## **1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 Технологии биологических микрочипов: ключевые аспекты, проблемы, перспективы**

Популярность технологии биологических микрочипов в фундаментальных биомедицинских исследованиях и клинической лабораторной диагностике не требует сегодня особых доказательств. Десятки компаний продвигают различные платформы микрочипов, включая микроматрицы с иммобилизованными олигонуклеотидами, белками, пептидами, антигенами и антителами различной природы, одно- и двуцепочечными фрагментами ДНК, гликанами, низкомолекулярными соединениями, микрочипы высокой и низкой плотности с зондами, синтезированными *in situ*, матрицы и суспензии на основе микросфер высокой плотности, электронные ДНК-микрочипы, капельные (droplet) и клеточные микрочипы и т.д (Li et al., 2016).

В свете стремительного развития методов и платформ секвенирования следующего поколения (NGS) технология олигонуклеотидных микрочипов столкнулась с серьезной конкуренцией в применении к анализу последовательностей нуклеиновых кислот. Тем не менее, достоинства микрочипов в виде высокой производительности, универсальности и возможности одновременной идентификации множества биомолекул различной природы являются неоспоримыми, что делает данную технологию надежным инструментом многопараметрического анализа. Целью данной главы является обзор ключевых методических и прикладных аспектов технологии, в основном, применительно к нуклеиновым кислотам, с выделением преимуществ и недостатков микрочипов и перспектив их применения в медицинской диагностике.

#### **1.1.1 Типы биологических микрочипов и способы нанесения зондов**

Традиционные (матричные) варианты биочипов с иммобилизованными зондами-биомолекулами можно разделить на планарные, в которых зонды

размещаются в определенном порядке на плоской подложке формата предметного стекла, и трехмерные, в которых иммобилизация зондов осуществляется на поверхности и/или в объеме элементов разнообразной геометрической формы (микро- и наносферы, цилиндры, колодцы, вытравленные в полимерных подложках и т.д.). Способы размещения зондов преследуют одни и те же задачи: (а) равномерное нанесение молекул на подложку чипа в заданных геометрических пропорциях; (б) уменьшение расхода дорогостоящих растворов иммобилизуемых проб; (в) минимизация риска контаминации в процессе нанесения. Технологии нанесения зондов в настоящее время полностью роботизированы и могут быть «контактными» и «бесконтактными» (Barbulovic-Nad et al., 2006).

Для контактной печати планарных биочипов применяются наконечники-пины (цельные или полые), либо микроштампы, формирующие заданную конфигурацию элементов матрицы посредством касания подложки. При использовании цельных пинов необходимо их повторное заполнение при нанесении каждого нового зонда. Полые наконечники, например, в форме рейсфедера, заполняются композициями наносимых молекул под действием капиллярных сил, а касание подложек может быть проведено многократно до истощения раствора. Обязательным этапом процедуры является промывка пинов до загрузки следующего раствора. Диаметр элементов, получаемых при контактной печати, зависит от свойств поверхности, вязкости проб и геометрии пинов. Основным преимуществом такого способа нанесения на подложки являются простота изготовления чипов. К недостаткам следует отнести риски контаминации пинов и повреждения поверхности подложки.

При использовании микроштампов многоканальная конструкция сперва заполняется композициями зондов, а матрица элементов формируется при однократном физическом контакте штампа с подложкой. Для изготовления микроштампов используются мягкая литография и эластичные материалы, такие как ПДМС (полидиметисилоксан) (Qin et al., 2010). Одновременное

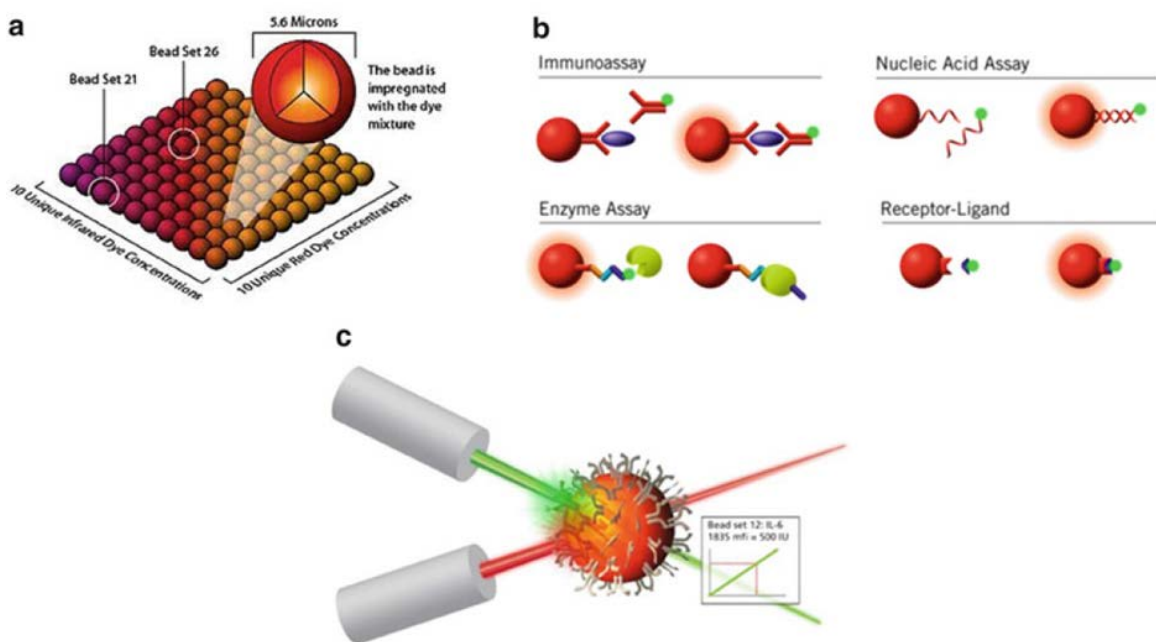
формирование сотен элементов на подложке позволяет использовать данный метод для высокопроизводительных приложений.

Классическим способом, лежащим в основе бесконтактного нанесения молекул на подложки, является электроспрей или ионизация распылением в электрическом поле. Считается, что такой метод позволяет сохранить структуру большинства иммобилизуемых белков, поскольку печатаемые белки лиофилизуются на поверхности. Другим известным способом бесконтактной нанесения растворов объемом 100-300 пиколитров на подложку является технология термической печати, заимствованная из струйных принтеров, при которой композиции зондов нагреваются до 200°C с испарением небольшого объема раствора из дюзы печатающей головки и выбросом капли на поверхность чипа. В данном случае отсутствует риск контаминации и повреждения подложки. Наконец, достаточно распространены схожие с термической технологии пьезоэлектрической печати, в которой выброс капли достигается посредством вибраций пьезоэлектрической мембраны в наконечнике или дюзе печатающей головки. В отличие от термической печати, такая технология позволяет избежать перегрева растворов зондов. Основным ограничением всех способов бесконтактной печати является сложность нанесения растворов высокой вязкости, например композиций гидрогеля.

Другим направлением создания биологических микрочипов является синтез олигонуклеотидов *in situ* посредством фотолитографической депротекции 5'-ОН-групп в определенных точках микроматрицы, что ведет к наращиванию нуклеотидных цепей в заданных позициях при использовании стандартного фосфорамидитного метода синтеза. Плотность олигонуклеотидов при таком способе составляет несколько миллионов на 1 см<sup>2</sup>. Недостатком этой технологии является необходимость использования литографических масок и сложных и дорогих рефлекторных устройств. Более того, методология изготовления таких чипов вносит ограничения на процентное содержание целевых синтезируемых таким образом олигонуклеотидов, в силу невозможности очистки от недосинтезированных зондов. Данную технологию

при разработке своих продуктов использует компания Affymetrix (США) (Fodor et al., 1991).

Помимо матричных (планарных) чипов распространенным форматом являются суспензионные микрочипы, состоящие из микросфер с оптическим «наноштрихкодом» и специфичными рецепторами (Рис.1), способными связываться с целевыми молекулами-мишенями в анализируемом образце. Различные оптические свойства мишени и микросфер позволяют регистрировать реакции связывания посредством флуоресцентной проточной цитометрии (Nolan and Sklar, 2002). Технология суспензионных чипов X-MAP компании Luminex, состоящих из множества оптически кодированных микросфер, обеспечивает мультиплексный анализ сотен мишеней в образце (Sha et al., 2006).



**Рис. 1.** Принцип анализа с использованием технологии суспензионных микросфер Luminex. (a) Матрица микросфер, кодированных смесью флуоресцентных красителей красного и инфракрасного спектральных диапазонов. (b) различные типы связывания «зонд – мишень» на микросферах. (c) идентификация микросферы и реакции связывания на ней с использованием двухканальной проточной цитометрии – иммунофлуоресцентный анализ интерлейкина IL-6 (репродукция с вебсайта <http://www.ebioscience.com/>).

Высокое соотношение «поверхность/объем» делает микросферы предпочтительным элементом биочипа, обеспечивая большую емкость иммобилизации зондов и площадь реакции с молекулами-мишенями, чем в случае планарного чипа. В связи с этим разработан ряд биочипов, содержащих

микросферы сефарозы или латекса в структурированной поверхности ПДМС (Epstein et al., 2002). Описаны варианты размещения микросфер с иммобилизованными фрагментами ДНК на концах оптоволоконных жгутов (Epstein et al., 2003). Компанией ILLUMINA выпускаются коммерческие микрочипы BeadArray, представляющие собой матрицы силиконовых шариков диаметром 3 мкм, самособирающихся в микроколодцах, полученных методом травления в оптоволоконных пучках или на слайдах с силикагелем (Рис. 2).

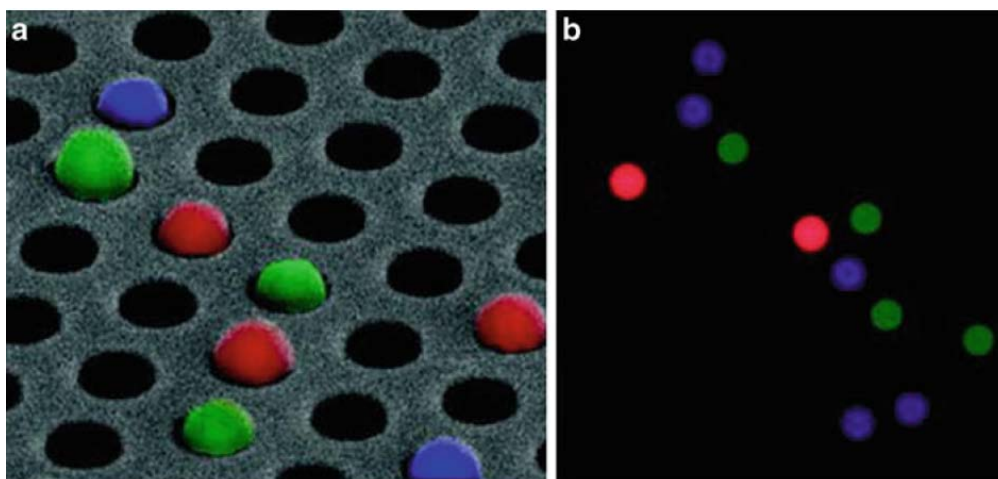


Рис. 2. Технология компании ILLUMINA с оптически кодированными микросферами, иммобилизованными на структурированной матрице. (a). изображение части чипа, полученное методом электронной микроскопии. (b) флуоресцентное изображение чипа, позволяющее легко отследить локализацию микросфер на матрице (Репродукция с вебсайта компании ILLUMINA [www.illumina.com](http://www.illumina.com)).

Широко используемые магнитные микросферы также нашли свое применение в изготовлении биочипов, формируемых под действием магнитного поля. Примером такой работы является создание матрицы магнитных микрочастиц на никелевой подложке в градиенте магнитного поля с целью детекции онкомаркеров в микрофлюидном чипе (Yu et al., 2013). Данный подход продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность, поскольку все неспецифично сорбировавшиеся примеси вымывались буферами, размещенными в резервуарах микрофлюидного чипа, в то время как зонды и связанные с ними мишени на микросферах удерживались магнитным полем.



### 1.1.2 Иммуобилизация молекулярных зондов на подложке микрочипа

Иммуобилизация зондов является ключевым аспектом технологии биочипов, определяющим успешное взаимодействие зонда и молекулы-мишени. Методика иммуобилизации определяется как типом зондов (олигонуклеотиды, белки, клетки, низкомолекулярные соединения и т.д.), так и способом регистрации реакций связывания в элементах биочипа (флуоресцентный, оптический, электрохимический).

Процесс закрепления зондов на поверхности посредством адсорбции может происходить как за счет электростатических, полярных, гидрофобных взаимодействий, так и под действием сил Ван-дер-Ваальса и водородных связей между молекулой иммуобилизуемого зонда и функциональными группами подложки. Тип взаимодействия зависит от выбираемого субстрата подложки. Иммуобилизация посредством адсорбции проста, быстра и позволяет осуществлять нековалентное присоединение белков или низкомолекулярных проб к субстрату. Случайная физическая сорбция проб на гидрофобных полимерных поверхностях микропланшетов широко используется для иммуобилизации белков в иммуноферментном анализе. Адсорбционные подходы также подходят для трехмерных субстратов подложек. Так, модифицированные полиаминами полипропиленовые мембраны, применяющиеся для адгезии белков за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий, показали высокую аффинность и совместимость с различными типами белков (Piletsky et al., 2003). Широко используются также и нитроцеллюлозные мембраны, адсорбция на которых обусловлена преимущественно гидрофобными, в меньшей степени, электростатическими взаимодействиями. К недостаткам данного типа иммуобилизации следует признать риск десорбции из-за изменений pH, температуры, ионной силы, что сильно ограничивает стабильность и срок хранения таких микрочипов. Не менее существенной является высокая вероятность неспецифической адсорбции, требующей обработки поверхности блокирующими агентами (как

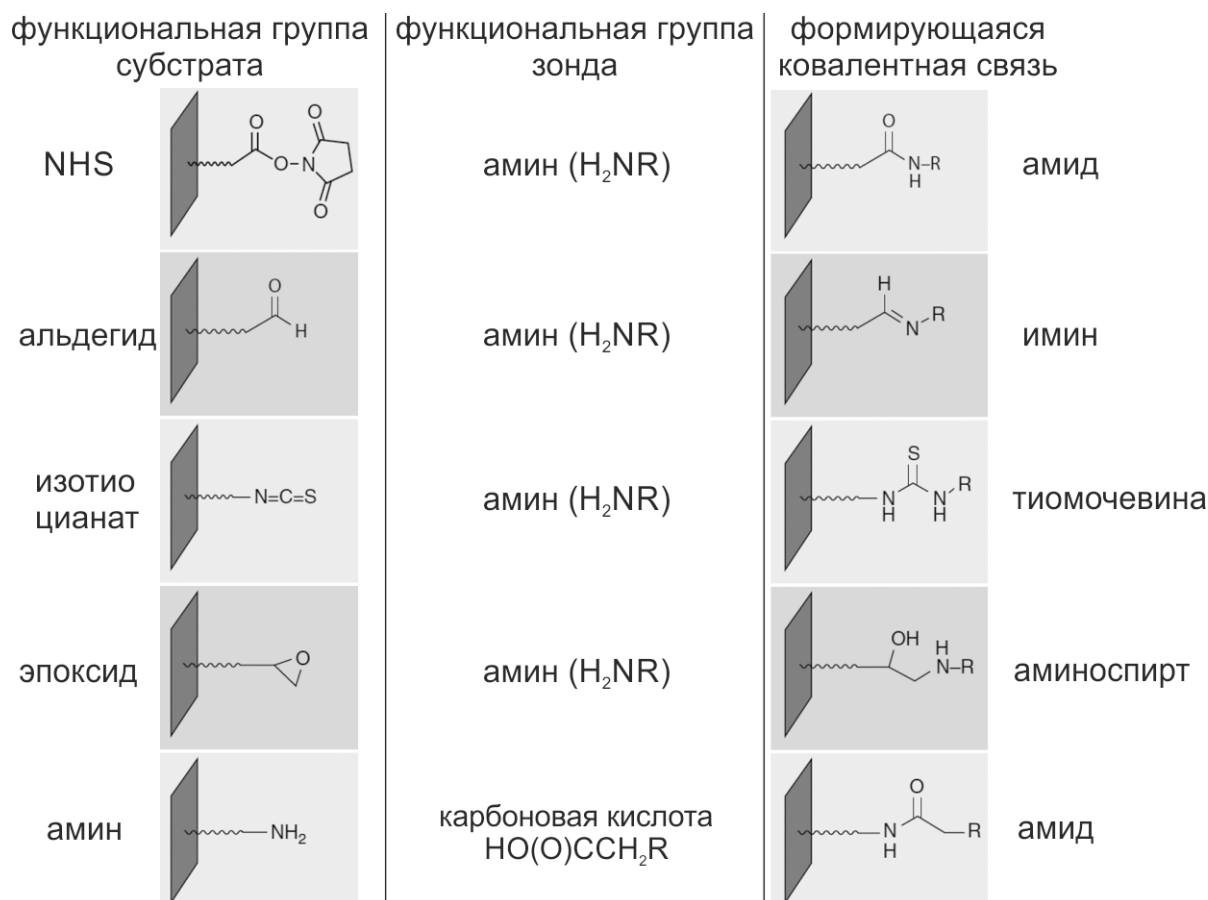
правило, неактивными белками и неденатурирующими поверхностно-активными веществами), с целью получения максимального полезного сигнала.

К другим нековалентным способам иммобилизации относят инклюзию посредством удерживания молекул в нерастворимых гелях, таких как полиакриламид или агароза, что позволяет сохранить конформацию и активность белковых молекул. Вместе с тем, количественная иммобилизация низкомолекулярных соединений данным методом существенно затруднена.

Распространенным способом иммобилизации является подход с использованием аффинных взаимодействий, возникающих между молекулами, фиксированными на подложке и иммобилизуемыми зондами. Такая технология позволяет проводить направленную иммобилизацию. Среди способов аффинной иммобилизации широко применяют авидин-биотиновое взаимодействие, полигистидиновые метки, олигонуклеотидно-белковые конъюгаты (Wacker and Niemeyer, 2004).

Стратегия иммобилизации, основанная на формировании ковалентной связи, как правило, требует функционализации субстрата для генерации активных групп, обеспечивающих высокую стабильность соединения зонда и подложки. Наиболее часто применяют аминную химию в иммобилизации молекул, в которой фрагменты ДНК – олиго/полинуклеотиды получают аминогруппу на 5' или 3' конце в ходе фосфорамидитного синтеза или в постсинтетических модификациях, а в случае белков, как правило, задействуют аминогруппу в остатке лизина. Далее реакция проводится на субстратах, содержащих карбоксигруппы, активированные карбодиимидом в присутствии N-гидроксисукцинимидом, давая на выходе ковалентную связь. Выход иммобилизации зависит от pH, концентрации зондов, ионной силы и времени реакции. Такая реакция проста и эффективна для иммобилизации ДНК-зондов, в то время как в случае белковых молекул требуется подбор условий. Например, предложена эффективная иммобилизация ферментов посредством карбодиимидной реакции в самособирающихся монослоях 3-меркаптопропионовой и 11-меркаптодекановой кислот, размещенных на

золотой подложке (Patel et al., 1997). В качестве альтернативного применения аминогруппы белков предложена их иммобилизация на субстратах, функционализированных альдегидными группами (MacBeath and Schreiber, 2000). Аминогруппа белков реагирует с альдегидной группой через образование основания Шиффа с последующим формированием ковалентной связи. Варианты образования ковалентной связи в зависимости от типа субстрата и активной группы иммобилизуемого зонда иллюстрированы на Рис. 3.



**Рис. 3.** Функциональные группы субстрата и зондов и типы формирующейся ковалентной связи на подложке микрочипа.

Для иммобилизации зондов в основном используют стеклянные подложки, к основным недостаткам которых можно отнести следующие.

- недостаточная химическая однородность поверхности стекла. Данное свойство стекла при химической модификации приводит к образованию поверхности в виде участков с различной гидрофобностью (гидрофильностью),

что сильно влияет на воспроизводимость физических параметров биочипа, в том числе объема и формы ячеек, а также их взаимного расположения;

- относительная сложность в технологии переработки стекла и изготовлении биочипов с заданной конфигурацией поверхности;

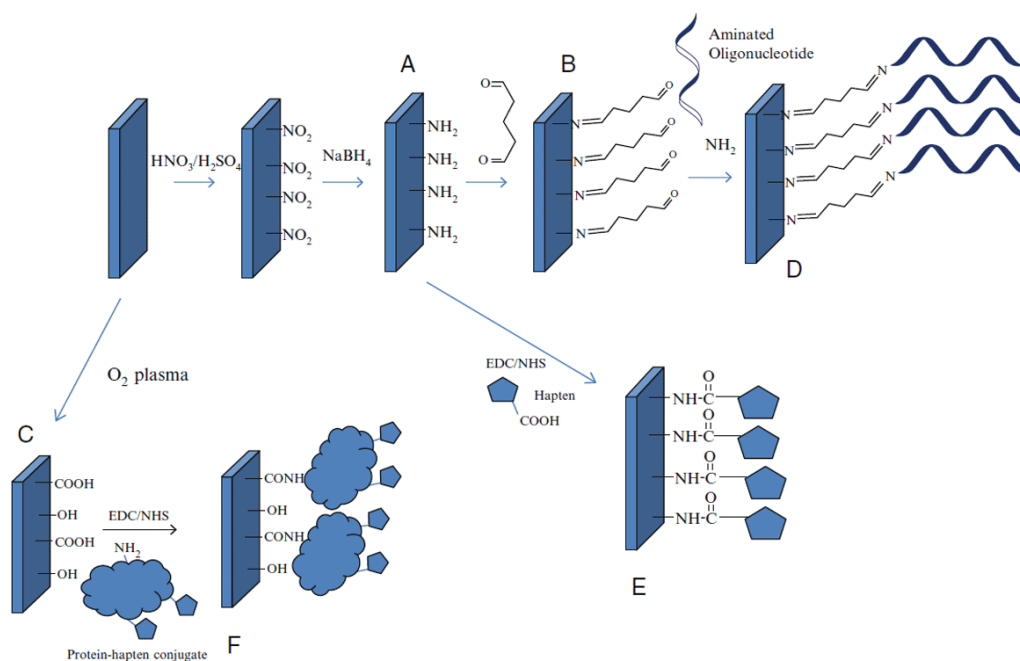
- недостаточная механическая прочность, хрупкость;

- сравнительно высокая стоимость подложки с необходимым качеством поверхности;

- обязательная химическая обработка поверхности стекла для эффективной иммобилизации биологически активных молекул.

В отличие от стеклянных подложек, требующих многостадийной рутинной функционализации, влияющей на стоимость эксперимента на биочипе, полимерные субстраты обладают рядом преимуществ для использования их в качестве недорогих подложек микрочипа, обеспечивая различные варианты иммобилизации в зависимости от природы зондов и совместимость с большинством методов регистрации сигналов, особенно, с флуоресцентной оптической микроскопией. Полимерные (пластиковые) подложки подходят для использования в качестве одноразовых расходных материалов для диагностики *in vitro*, а также могут быть интегрированы с микрофлюидными структурами.

Среди различных полимеров в качестве субстратов подложек микрочипов наиболее часто используют нейлоновые мембраны, поликарбонат, полиметилметакрилат и полистирол (Hook et al., 2010). Поликарбонат обладает интересными физическими свойствами, возможностью литься под давлением и низкой ценой. Разработан ряд химических модификаций поверхности поликарбоната для использования в качестве подложки микрочипа в зависимости от типа иммобилизуемого зонда (Рис.4).



**Рис.4.** Схемы подходов к иммобилизации различных проб на поликарбонате. **(А).** Аминомодификация подложки. **(В)** Модификация подложки с альдегидными группами. **(С).** Модификация подложки с карбоксильными группами. **(D).** Иммобилизация олигонуклеотидов с аминогруппами на альдегид-модифицированной подложке. **(Е).** Иммобилизация гаптенных на аминомодифицированной подложке. **(F).** Иммобилизация конъюгатов белков с гаптенами на подложке с карбоксильными группами (Vanuls et al., 2008; Tamarit-Lopez et al., 2010).

Помимо матриц с функциональными группами, такими как альдегиды, эпокси- или аминогруппы (полилизин) и др., еще одним уровнем субстрата для иммобилизации зондов может быть дополнительное покрытие матрицы, например, гидрогелем, состоящим из полиакриламида или агарозы (Damin et al., 2016). В силу природных гидрофобных свойств полимерные гидрогели являются приоритетным субстратом для иммобилизации биомолекул. Традиционным подходом к изготовлению микрочипов являются покрытие стеклянной или пластиковой подложки однородным слоем гидрогеля с последующим нанесением зондов либо синтезом олигонуклеотидов *in situ*. В качестве сшивающих агентов для формирования гидрогелевых подложек используются как синтетические поли-2-гидроксиэтилметакрилат (pHEMA), полиэтиленгликоль-метакрилат, полиакриламиды, так и несинтетический полимер коллаген (xU) (Le Goff et al., 2015). В результате такого подхода емкость иммобилизации зондов на подложке микрочипа возрастает на несколько порядков (Beyer et al., 2014), что позволяет регистрировать сигналы в

элементах чипа, в 10-100 раз превышающие таковые при иммобилизации на планарных матрицах с функционализированными группами.

Технология биочипов, созданная в ИМБ РАН под руководством академика Андрея Дарьевича Мирзабекова (1937-2003) и используемая в настоящей работе, основана на иммобилизации молекул в трехмерных элементах полусферической формы, закрепленных на плоской подложке (Yershov et al., 1996; Колчинский и др., 2004). Молекулярные зонды – олигонуклеотиды, кДНК, белки и пр. модифицируют посредством присоединения amino- или сульфогрупп, используемых как агентов в дальнейшей полимеризации. Макропористая структура гидрогелевых элементов формируется за счет сополимеризации мономера – производного метакриловой кислоты, O- или N-замещенного сахара, водорастворимого кроссшивающего агента и модифицированного молекулярного зонда. Капли полимеризационной смеси наносят на немодифицированную поверхность полимерной подложки с использованием с помощью игольчатых растров (пинов) механического робота. Далее под действием ультрафиолетового излучения происходит совместная полимеризация молекулярных зондов (олигонуклеотидов, белков и др.) с основными компонентами гидрогеля. В отличие от акриламида, полимеризация метакриламида не требует добавления дополнительных фотоактиваторов. В ходе реакции молекулярные зонды ковалентно присоединяются к растущим полимерным цепям и равномерно распределяются по всему объему геля. Выход такой иммобилизации составляет 50-80% в зависимости от молекулярного зонда. Контроль качества нанесения осуществляется с помощью специализированной оптики и компьютерного анализа изображения. Биочипы с отклонением геометрических параметров элементов внутри чипа, не превышающим 10%, также с отклонениями параметров чипов между сериями (партиями), составляющими не более 20%, используют для дальнейших экспериментов (Rubina et al., 2008). Данные характеристики соответствуют критериям, применяемым для лучших коммерческих микроматриц, таких как слайды NEXTERION® (Schott AG,

Германия), гидрогелевые подложки серии HC (ArrayIt, США), стекла для микрочипов CX DNA Microarray slides (Xantek bioanalytics GmbH, Германия).

Ячейки с иммобилизованными зондами располагаются упорядоченными рядами, причем каждая ячейка содержит уникальный индивидуальный зонд. В зависимости от типа биочипа диаметры гелевых ячеек варьируют от 50 до 300 мкм, а расстояния между ячейками от 100 до 500 мкм. Количество ячеек на биочипе зависит от сложности анализируемой мишени(ей) и задач эксперимента и составляет от нескольких десятков до нескольких тысяч. Разработанная технология является универсальной, оптимальной и недорогой в изготовлении гидрогелевых трехмерных биочипов низкой плотности, содержащих ограниченный набор зондов ДНК- и белковых мишеней.

### **1.1.3 Некоторые аспекты гибридизационного анализа на микрочипах**

В основе работы всех биологических микрочипов с иммобилизованными зондами лежит способность макромолекул к молекулярному узнаванию - высокоспецифичному избирательному связыванию друг с другом. Образование дуплексов ДНК происходит согласно правилам Уотсона и Крика:  $A = T$  и  $G = C$ , а рецепторы антител способны различать специфичные эпитопы на поверхности белков. Если соответствие между иммобилизованными зондами и молекулами-мишенями в растворе точно удовлетворяет условиям молекулярной комплементарности, то образующиеся комплексы будут термодинамически устойчивы. В результате в определенных условиях их будет больше, чем комплексов, образованных с нарушением условий комплементарности, соответственно, совершенным гибридизационным дуплексам будет отвечать более сильный сигнал в элементе микрочипа.

В идеале образование совершенных и несовершенных дуплексов в ячейке с конкретными зондами должно в точности отвечать бинарным значениям 1 и 0 для ячеек электронных микрочипов. В реальной ситуации влияние неспецифичного связывания может оказаться не столь малым, и конструирование зондов, обеспечивающих: (а) чувствительность, т.е. способность идентификации малых количеств мишени в сложных смесях; (б)

специфичность (отсутствие кросс-гибридизации с неспецифическими последовательностями); (в) однородность (зонды должны обеспечивать достаточно равномерные гибридационные сигналы), является важной и трудоемкой задачей (He et al., 2005). На дискриминационное отношение между совершенными и несовершенными дуплексами оказывает значительное влияние вторичные структуры как в гибридизуемой ДНК, так и в последовательности зондов, а также G/C-состав иммобилизованных олигонуклеотидов.

Величина сигнала и способность ячеек к дискриминации между специфичным и неспецифичным связыванием существенно зависит от плотности зондов в ячейке. При малых и промежуточных значениях плотностей зондов величина сигнала приблизительно пропорциональна плотности. Однако при большой плотности зондов возникают стерические препятствия связыванию, в результате чего сигналы выходят на насыщение, а дискриминирующая способность начинает быстро ухудшаться. Для поверхностных биочипов предельные плотности иммобилизованных зондов отвечают значениям  $\sim 10^{13}$  молекул/см<sup>2</sup>, а для чипов с гидрогелевыми элементами предельные концентрации зондов в ячейке составляют  $\sim 10^{-2}$  М (Чечеткин и др., 2006). В частности, для планарных олигонуклеотидных чипов с длиной зондов 20 нуклеотидов при плотности  $\sim 10^{13}$  молекул/см<sup>2</sup> для гибридизации доступно только  $\sim 10\%$  зондов (Peterson et al., 2001; Jayaraman et al., 2007). Типичные значения плотностей зондов для планарных чипов составляют  $\sim 10^{11}$ – $10^{12}$  молекул/см<sup>2</sup>, а объемные концентрации зондов в ячейках микрочипов лежат в пределах  $\sim 10^{-4}$ – $10^{-6}$  М. Из сопоставления данных параметров следует, что суммарное количество зондов в расчете на единицу площади примерно в  $10^3$  раз выше для объемных гелевых ячеек по сравнению с поверхностными ячейками. Длины зондов олигонуклеотидных микрочипов находятся в пределах  $\sim 12$ – $60$  нуклеотидов, а длины фрагментов гибридизуемой ДНК составляют  $\sim 100$  –  $600$  нуклеотидов (более длинные фрагменты, как правило, фрагментируются).



Наилучшая дискриминация между совершенными и несовершенными дуплексами достигается в условиях полного термодинамического равновесия и выхода сигналов на насыщение. При сокращении времени гибридизации (типичные значения составляют 0,5–8 часов) существенную роль начинают играть кинетические эффекты. Теоретические и экспериментальные исследования показывают, что кинетика гибридизации при неспецифичном связывании оказывается более быстрой, чем кинетика специфичного связывания (Sorokin et al., 2006). Поэтому в промежуточном режиме гибридизации дискриминация между совершенными и несовершенными дуплексами оказывается существенно меньше, чем после выхода на термодинамическое равновесие. Благоприятным обстоятельством является то, что не только гибридизация, но и диссоциация неспецифичных комплексов при отмывке происходит более быстро по сравнению со случаем точного молекулярного узнавания. Поэтому использование постгибридизационной отмывки позволяет улучшить дискриминацию между совершенными и несовершенными комплексами (Sorokin et al., 2005).

Как в планарных, так и в гидрогелевых микрочипах гибридизация происходит в результате диффузии анализируемых молекул из раствора в ячейку с последующим образованием гибридизационных комплексов (Zhang et al., 2003). Характерные значения для коэффициентов диффузии биологических макромолекул в растворе лежат в пределах  $10^{-5}$ – $10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с (Borden et al., 2005), а соответствующие значения в геле примерно в 4–5 раз меньше (Pluen et al., 1999). Поскольку диффузия является медленным процессом, для ускорения кинетики гибридизации используют поперечное к поверхности чипа электрическое поле или индуцируют гидродинамические потоки с помощью перистальтического насоса, поверхностных акустических волн, а также электрокинетических эффектов (Oddy et al., 2001; Borden et al., 2005). На масштабах ~100 микрон доминируют вязкие силы, и число Рейнольдса, отвечающее индуцированным гидродинамическим потокам, обычно меньше единицы. Использование механизмов, заимствованных из теории

динамического хаоса, позволяет существенно ускорить перемешивание потока (McQuain et al., 2004). Так, применение стенок со стреловидным рифлением (herringbone protrusions) позволяет в 3 - 4 раза ускорить перемешивание в ламинарном потоке или примерно во столько же раз увеличить сигнал за идентичное время гибридизации (Liu et al., 2006).

#### **1.1.4 Регистрация сигналов на микрочипах**

Флуоресцентная детекция является общепринятым методом регистрации реакций в элементах микрочипа, при этом достигнут значительный прогресс в чувствительности благодаря синтезу новых красителей и оптимизации процедур флуоресцентного маркирования (Kuznetsova et al., 2016; Shershov et al., 2017; Spitsyn et al., 2017). Для достижения высокого разрешения и чувствительности необходимо использовать громоздкие сканеры, что препятствует миниатюризации систем в целом. На воспроизводимость результатов влияет эффективность маркирования и эффект тушения флуоресценции (Sassolas et al., 2008). Применение молекулярных маяков (molecular beacons) позволяет, с одной стороны, снизить фоновые сигналы и повысить специфичность, с другой – использовать технологии непрямого маркирования, без включения флуоресцентной метки непосредственно в гибридизационную пробу (Kim et al., 2008).

Альтернативные технологии регистрации гибридизационных комплексов, позволяющие избежать флуоресцентного маркирования, основаны на оптических, электрохимических и микроволновых свойствах анализируемых молекул (Nelson et al., 2001, Koehne et al., 2003, Lee et al., 2013). Для высокопроизводительного анализа однонуклеотидных полиморфизмов разработан вариант оптического интерферометрического биосенсора, позволяющего дискриминировать совершенные и несовершенные дуплексы посредством динамического накопления данных в ходе стадии отмывки в низкосолевого буфере (Ozkumur et al., 2010). С целью идентификации немеченных ПЦР-продуктов созданы наноэлектродные сенсоры на основе многостенных углеродных нанотрубок. В этой системе гуаниновые основания в

молекуле-мишени работают как передатчики сигнала, формируя усиливаемый анодный ток, ассоциированный с окислением гуанина на поверхности нанoeлектрода. Избыток гуанинов в анализируемой цепи ДНК позволяет достичь чувствительности ~ 1000 молекул на элемент микрочипа (Koehne et al., 2003). Еще одной технологией нефлуоресцентной детекции является ближнепольная сканирующая микроволновая микроскопия, мониторящая микроволновые отражения, зависящие от длины и силы связывания цепей ДНК в элементах микрочипа (Lee et al., 2013).

### **1.1.5 Применение микрочипов. Проблемы и перспективы**

С момента первых экспериментов по секвенированию с помощью гибридизации на олигонуклеотидных микроматрицах в ИМБ РАН под руководством академика Мирзабекова (Khrapko et al., 1991, Mirzabekov, 1994) и мониторинга дифференциальной экспрессии 45 генов в геноме *Arabidopsis* с использованием подложек с иммобилизованными фрагментами кДНК под руководством Марка Шена (Mark Schena) (Schena et al., 1995) биологические микрочипы прошли долгий и успешный путь от фундаментальных исследований к клинической лабораторной диагностике. В биомедицинских исследованиях с применением микрочипов можно выделить три направления. Во-первых, платформы микрочипов, особенно в первые годы разработок, использовались для получения клинически значимой информации об уровнях экспрессии генов (Alizadeh et al., 2000). В частности, данные транскриптомного профилирования многократно использовали для дифференциации вариантов злокачественных опухолей, получая прогностическую (вероятность рецидива или метастазов) и предиктивную информацию (эффективность химиотерапии) (Wadlow and Ramaswamy, 2005, Virtanen and Woodgett, 2008). Во-вторых, изрядная доля разработок с использованием микрочипов была посвящена типированию однонуклеотидного полиморфизма в геноме человека и клинически значимых мутаций в ДНК патогенных бактерий и вирусов (Call, 2005). Наконец, микрочипы нашли свое применение в сравнительной геномной гибридизации, обеспечивая высокоразрешающий скрининг всего генома на

предмет вариаций числа копий отдельных его сегментов (Shaw-Smith et al., 2004).

Вместе с тем, доминирования микрочиповых технологий в лабораторной диагностике высокоразвитых стран в настоящее время не наблюдается – в 2015 доля тестов на соответствующем рынке не превышала 15% (Marzancola et al., 2016). Связано это, как полагают, не столько с техническими проблемами, сколько с вопросами биологической статистики – воспроизводимость результатов и достоверность интерпретации данных, приведенных в заметных исследованиях с использованием микрочипов, неоднократно подвергались критике в силу отсутствия надлежащей стандартизации, адекватных контролей и надежных инструментов обработки данных (Simon et al., 2003, Dupuy and Simon, 2007). Неопределенность в достоверности интерпретации данных анализа на микрочипах препятствует утверждению регулирующими организациями масштабных клинических испытаний, а также последующему восприятию результатов тестов клиническим сообществом. Проблемы обоснованности интерпретации данных являются более значимыми в исследованиях, связанных с поиском новых биомаркеров, например, в транскриптомном профилировании, нежели в таких приложениях как генотипирование, где анализ проводится по уже известным детерминантам.

Так, метаанализ воспроизводимости данных семи крупномасштабных исследований экспрессии генов в опухолевых тканях показал, что результаты пяти исследований были невоспроизводимы, а прогностическая значимость результатов двух других экспериментов была ниже, чем исходные данные (Michiels et al., 2005). В попытке разработать инструмент для валидации результатов анализа на микрочипах был предложен стандарт MIAME (минимальная информация о эксперименте с микрочипами), обеспечивающий возможность независимой проверки данных экспрессионного анализа на микрочипах (Rayner et al., 2006). В сотрудничестве с Food and drug administration (FDA, США) был разработан проект контроля качества микрочипов MAQC, устанавливающий пороги и метрики для

межплатформенного сравнения данных микрочипов (Chen et al., 2007). Однако далеко не все производители микрочипов и исследователи публикуют соответствующие данные для проведения независимых проверок. Между тем, в масштабном транскриптомном профилировании, где генерируется огромное количество информации, решающее значение в интерпретации имеет статистическая обработка. Для доказательств вовлеченности конкретного гена в проблему (болезнь) его уровень экспрессии сравнивают с контрольным, получая значение кратного изменения мРНК (fold-change, FC) и проводя кластерный анализ. При этом уровни экспрессии одного и того же гена могут варьировать как у здоровых и больных людей, так и между разными образцами одного и того же пациента (Michiels et al., 2005). Следовательно, простая статистика, основанная на кратных изменениях величины мРНК конкретного гена, не учитывает вариабельность между образцами и может привести к ложно-положительным результатам.

В этой связи совсем малое число диагностических тестов на основе микрочипов для оценки экспрессии генов получили официальное разрешение на применение в медицинской практике. Среди таковых следует выделить MammaPrint (Agendia, Нидерланды) для оценки профилей экспрессии ~70 генов, ассоциированных с рецидивом рака молочной железы (van de Vijver et al., 2002). Однако данный тест имеет серьезного конкурента в виде ПЦР-набора Oncotype (Genomic Health, США), в основном, в силу большей технологичности последнего и возможности анализировать образцы FFPE (фиксированные формалином и заключенные в парафин). В подтверждение важности данных анализов новый тест на основе биочипов Tissue of origin (Pathwork Diagnostics, США), способный анализировать FFPE-образцы, был выведен недавно на рынок (Parkash et al., 2012). Неменьшая конкуренция ожидает микрочипы со стороны NGS-технологий, цены на которые в западных странах неуклонно снижаются (Goodwin et al., 2016; Ke et al., 2016). Методики секвенирования транскриптома более надежны и информативны, обеспечивая выдачу данных в цифровом, а не в «аналоговом» (FC) формате.

В отличие от экспрессионных микрочипов биочипы для генотипирования имеют существенно меньше препятствий на пути к получению разрешения от регуляторных агентств на применение в диагностике *in vitro*. Генотипированию, целью которого является характеристика ранее установленных вариаций последовательностей генома, не нужно доказывать корреляцию с клиническими данными. Тем не менее, такие тесты должны быть технически надежными и конкурентоспособными в ценовом отношении. Высокопроизводительные генотирующие микрочипы высокой плотности обеспечивают одновременную идентификацию большого количества параметров. Например, тест AmpliChip CYP450 от Affymetrix (одобрен FDA в 2004 г, первый разрешенный клинический тест на основе микрочипов в США) идентифицирует ~ 15000 полиморфных вариантов двух генов, участвующих в метаболизме многих психоактивных препаратов.

С другой стороны, наблюдается быстрый рост приложений на основе биочипов низкой плотности, в том числе, в клинической микробиологии и вирусологии (Nsofor, 2014; Schulze et al., 2015). Так, ядром набора PapilloCheck, разработанного компанией Greiner Bio-One (Германия) и одобренного FDA в 2009 г., является биочип из 140 олигонуклеотидов для определения подтипов папилломавируса человека в образцах (мазках) из цервикального канала.

В настоящей работе с использованием гидрогелевых биочипов низкой плотности также представлен анализ приоритетных объектов инфекционной природы, лечение которых требует персонализированного подхода в выборе препаратов, их дозы и длительности. Среди них следует отметить чрезвычайно актуальные для России туберкулез, гепатит С, инфекции репродуктивного тракта, включая заболевания, передающиеся половым путем. Другой актуальной задачей является создание метода идентификации генетически модифицированных источников, направленного на пресечение использования несанкционированных в РФ генно-модифицированных растений в пищевых продуктах и сырье, способных оказать негативный эффект на здоровье человека, агробиоценозы и природную среду.

Перспективы дальнейшего развития микрочиповых технологий неразрывно связаны с миниатюризацией и интеграцией в замкнутые системы анализа полного цикла биологического образца (ЛОС, 'Laboratory-on-a-chip'). Весьма распространенным в ЛОС-системах является применение микрофлюидных технологий как на преаналитическом этапе, включающем обработку образца, выделение НК и их амплификацию, так и на последующей стадии гибридизации и отмывки на чипе. В частности, описана система, способная экстрагировать и концентрировать нуклеиновые кислоты из образцов крови, проводить амплификацию и последовательные ферментативные реакции (фрагментацию, дефосфорилирование и мечение), дозирование и смешивание буферов, гибридизацию НК на микрочипе для идентификации мутаций в геноме ВИЧ (Anderson et al., 2000). Применение микрофлюидных технологий для гибридизации позволяет ускорить реакцию и повысить чувствительность за счет большого соотношения поверхности к объему в микроканалах нанолитрового объема. Генерация жидкостных потоков столь малых объемов осуществляется различными технологиями, включая электрокинетический контроль, вакуумное всасывание и создаваемое микрошприцами давление. Все большую популярность в микрофлюидных системах приобретает система разделения и движения жидкостных потоков под действием центробежных сил, возникающих при центрифугировании. Силы, возникающие при вращении, также обеспечивают простоту проведения параллельных гибридизаций (Wang and Li, 2011; Kong et al., 2016).

Таким образом, биологические микрочипы в настоящее время занимают промежуточную нишу в области методов анализа нуклеиновых кислот, подпираемую снизу разнообразными тестами на основе технологий амплификации, в первую очередь, ПЦР, и испытывая все большее давление сверху со стороны высокопроизводительных технологий секвенирования нового поколения. Вместе с тем, все еще высокая стоимость NGS, а также трудоемкость определенных этапов, связанных как с подготовкой образцов, так и с интерпретацией данных, оставляет микрочипам хорошие шансы в

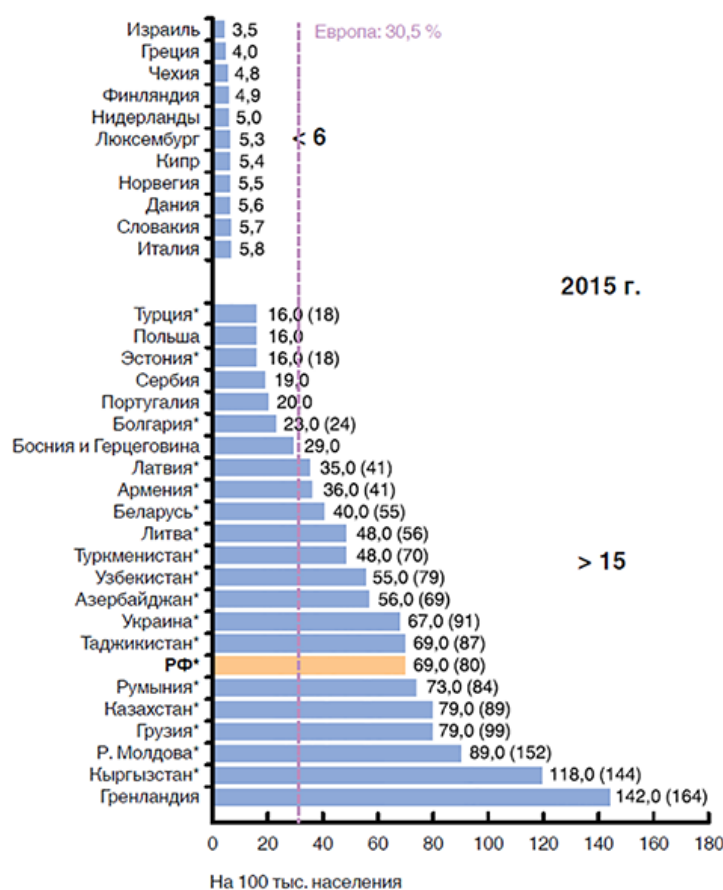
стремительно расширяющемся рынке молекулярной диагностики. Комплексные автономные LOC-системы, содержащие платформу микрочипов и согласованные с ней поддерживающие модули, обеспечивающие все этапы обработки образца, позволят получать результаты быстрее, информативнее и точнее, чем в настоящее время, и будут играть ключевую роль в персонализированной медицине будущего.

## **1.2 Возбудитель туберкулеза и его лекарственная устойчивость**

Возбудитель туберкулеза заражает людей с античных времен. В «доантибиотиковую эпоху» чахотка считалась безнадежной болезнью, подобно распространенному в настоящее время мнению о многих онкологических заболеваниях. Открытие антибиотиков, получивших название «магических пуль», привело к революции в ТБ-химиотерапии. Введение в «золотой век антибиотиков» (40-60-е годы XX века) серии мощных антимикробных препаратов, начиная со стрептомицина в 1943 г, привело к резкому снижению заболеваемости туберкулезом и, фактически, к ощущению контроля над этой инфекцией.

Болезнь вернулась в 1980-х годах с появлением лекарственно-устойчивых форм, часто сочетанных с синдромом приобретенного иммунодефицита. Согласно последней оценке ВОЗ (WHO, 2016), в мире в 2015 г. туберкулезом заболело 10,4 млн человек (8,7-12,2 млн), что составляет 142 (119-166) на 100 тыс. населения. Среди лиц, заболевших туберкулезом, около 11% (9,1-14,0) являются больными ВИЧ-инфекцией (1,0-1,3 млн). В Российской Федерации в 2015 г. было зарегистрировано новых случаев и рецидивов туберкулеза 69 на 100 тыс. населения (Васильева и др., 2017) (Рис. 5).





**Рис. 5.** Регистрируемая заболеваемость туберкулезом в странах Европейского региона ВОЗ в 2015 г. (WHO's global TB database <http://www.who.int/tb/country/data/download/en/>). Показатель включает новые случаи и рецидивы туберкулеза. Указаны страны, имеющие наименьшие и наибольшие значения показателя в регионе. Знаком \* отмечены 18 наиболее приоритетных по туберкулезу стран Европейского региона ВОЗ, для которых в скобках даны значения заболеваемости по оценке ВОЗ. На рисунке приведены только страны с населением более 200 тыс. человек, за исключением Гренландии (56 тыс.), где уже в течение нескольких лет наблюдаются наибольшие значения показателя в регионе. Данные по Туркменистану приведены за 2014 г (Васильева и др., 2017).

Помимо умения персистировать в организме человека, вырабатывая эффективные механизмы защиты от иммунной системы, что обеспечивает широкое распространение инфекции, *M. tuberculosis* способен противостоять большинству доступных АМП (Smith et al., 2013). В результате существующие варианты химиотерапии ТБ строго ограничены, а повторное использование одних и тех же АМП в течение длительных режимов привело к появлению штаммов, которые все чаще устойчивы к основным противотуберкулезным препаратам. Последовательное накопление мутаций, ассоциированных с резистентностью, сформировало популяции ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ, MDR TB), с широкой лекарственной

устойчивостью (ШЛУ-ТБ, XDR TB) и возбудителей с полной устойчивостью ко всем известным противотуберкулезным препаратам (тотально-устойчивый ТБ, XXDR TB). МЛУ-ТБ определяется микобактериями, устойчивыми, по крайней мере, к двум наиболее эффективным препаратам первого ряда - изониазиду и рифампицину. ШЛУ-ТБ – это форма туберкулеза, возбудитель которого устойчив к этим двум, а также к одному из препаратов фторхинолонового ряда и, как минимум, к одному из трех инъекционных противотуберкулезных препаратов второй линии терапии – амикацину, канамицину или капреомицину. Распространение таких штаммов ТБ представляет сегодня серьезную проблему.

Для борьбы с текущей эпидемией лекарственно-устойчивого ТБ, помимо усилий по созданию новых противотуберкулезных препаратов, действующих на иные, не затронутые существующими АМП, бактериальные мишени или на процессы в клетке-хозяине (Alexandrova et al., 2017), необходимо глубокое понимание механизмов формирования устойчивости *M. tuberculosis* с целью разработки диагностических инструментов, эффективно выявляющих генетические детерминанты резистентности.

## **1.2.1 Механизмы формирования лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза к антимикробным препаратам**

### **1.2.1.1 Приобретенная резистентность**

Патогенные бактерии, включая *M. tuberculosis*, способны приобретать резистентность к определенному антибиотику, к которому они были ранее восприимчивы. Концепция, обозначаемая как «приобретенная резистентность», отличается от естественной (природной) устойчивости, обсуждаемой в следующей главе. Приобретенная устойчивость может возникать посредством мутации, либо в результате горизонтального переноса гена(ов). К настоящему моменту отсутствуют данные о возможности горизонтального переноса генов резистентности через плазмиды или транспозонные элементы в *M. tuberculosis*. Напротив, все известные в настоящее время механизмы приобретенной устойчивости опосредуются хромосомными мутациями, которые возникают при селективном давлении АМП. Перечень генов *M. tuberculosis*, в которых

обнаружены мутации, ассоциированные с устойчивостью к противотуберкулезным препаратам, представлен в таблице 1.

**Таблица 1.** Спектр генов и генетических детерминант, вовлеченных в формирование приобретенной резистентности *M. tuberculosis* к препаратам первой и второй линий терапии

Препарат	Механизм действия препарата	Ген	Функция гена	Характерные мутации
<b>Препараты первого ряда</b>				
Изониазид	Ингибирование биосинтеза миколовых кислот и других метаболических процессов	<i>katG</i>	Каталаза-пероксидаза	Ser315Thr
		<i>inhA</i>	Редуктаза еноил-АПБ	c-15t (промоторная область)
		<i>ndh</i>	НАДН-дегидрогеназа II типа	Arg13Cys, Val18Ala
		<i>ahpC</i>	Алкилгидропероксид редуктаза	g-9a, c-12t
Рифампицин	Ингибирование транскрипции	<i>kasA</i> <i>rpoB</i>	$\beta$ -кетоацил-АПБ синтаза $\beta$ -субъединица РНК-полимеразы	Gly269Ser Ser531Leu
Пиразинамид	Ингибирование транс-трансляции	<i>pncA</i>	Пиразинамидаза	Asp12Ala, мутации по всей рамке считывания гена
		<i>rpsA</i>	Рибосомный белок S1	DelAla438, Thr5Ala
		<i>panD</i>	Аспаратдекарбоксилаза	Ala128Ser, Val138Ala
Этамбутол	Ингибирование мембраносвязанной арабинозилтрансферазы, подавление синтеза арабиногалактанов	<i>embCAB</i>	Арабинозилтрансфераза	Met306Val/Ile/Leu
Стрептомицин	Ингибирование трансляции	<i>rpsL</i>	Рибосомный белок S12	Lis43Arg
		<i>rrs</i>	16S рРНК	a513t/c, c516t
		<i>gidB</i>	Метилтрансфераза 16S рРНК	Leu16Arg
<b>Препараты второй линии терапии</b>				
Амикацин / Канамицин	Ингибирование трансляции	<i>rrs</i>	16S рРНК	a1401g
Капреомицин	Ингибирование трансляции	<i>eis</i>	Ацетилтрансфераза	g-37t, g-10-a, g-14-t
		<i>rrs</i>	16S рРНК	a1401g
		<i>eis</i>	Ацетилтрансфераза	g-37t, g-10-a, g-14-t
		<i>tlyA</i>	Метилтрансфераза рРНК	g223t, мутации по всей рамке считывания гена
Этионамид	Ингибирование биосинтеза миколовых кислот	<i>ethA</i>	Флавин монооксигеназа	Leu397Arg, Leu328Met
		<i>inhA</i>	Редуктаза еноил-АПБ	Ile21Thr/Val, Ser94Ala
		<i>ndh</i>	НАДН-дегидрогеназа II типа	Arg13Cys, Val18Ala
		<i>mshA</i>	Гликозилтрансфераза	Val171Gly, Ala187Val
Фторхинолоны	Ингибирование ДНК-гиразы	<i>gyrA</i>	$\alpha$ -субъединица ДНК-гиразы	Ala90Val, Asp94Gly/Tyr
		<i>gyrB</i>	$\beta$ -субъединица ДНК-гиразы	Asn533Thr
ПАСК (пара-Аминосалициловая кислота)	Ингибирование фолатного синтеза	<i>thyA</i>	Тимидилатсинтаза	Thr202Ala, Val261Gly
		<i>folC</i>	Дигидрофолатсинтаза	Glu153Ala, Asn73Ser
		<i>ribD</i>	Дигидрофолатредуктаза	g-11a

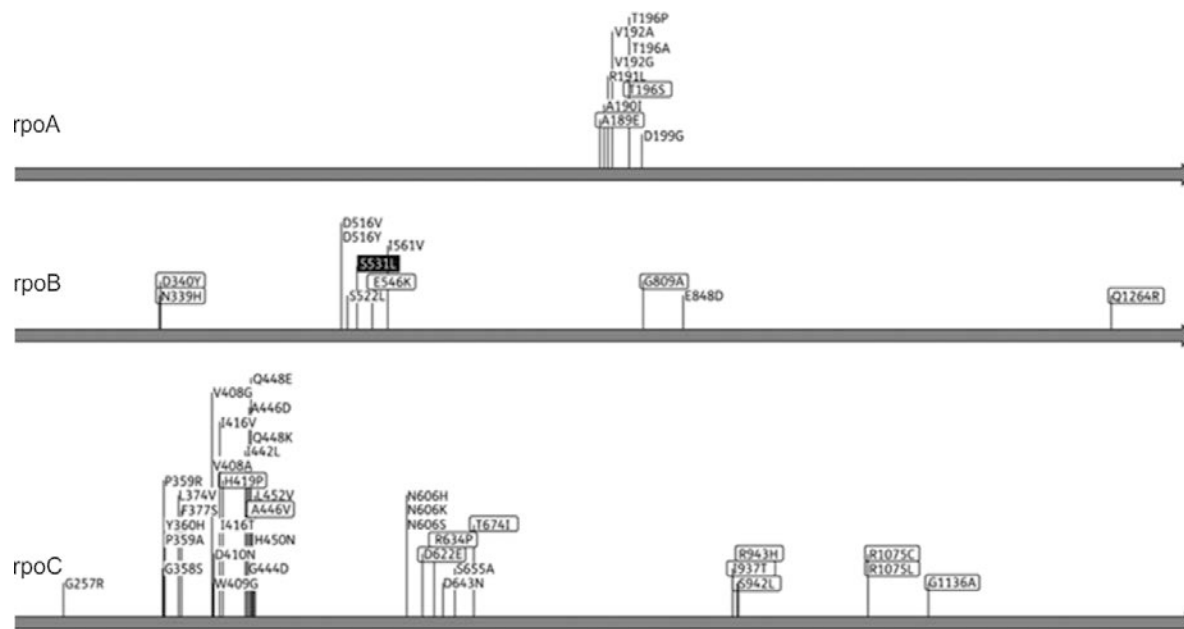
Циклосерин	Ингибирование синтеза пептидогликанов	<i>alr</i>	Аланинацетилтрансфераза	g-10t	
		<i>cusA</i>	Протонный симпортер D-серина/L-D-аланина/глицина/D-циклосерина	Gly122Ser	
		<i>Ald</i>	L-аланиндегидрогеназа	-	
Клоfazимин	Подавление редокс-системы	<i>rv0678</i>	Транскрипционный регулятор	мутации по всей рамке считывания гена	
	Дестабилизация мембраны, генерация реактивного кислорода	<i>rv2535c</i>	Пептидаза	g265t	
		<i>rv1979c</i>	Пермеаза	t1052c	
Линезолид	Ингибирование трансляции	<i>Rrl</i>	23S рРНК	g2061T, g2814t	g2576t,
		<i>rplC</i>	50S рибосомный белок L3	t460c	
		<i>atpE</i>	C-субъединица АТФ-синтазы	Ala63Val, Asp28Asn	
Бедаквилин	Ингибитор АТФ-синтазы	<i>rv0678</i>	Транскрипционный регулятор	мутации по всей рамке считывания гена	

Распространение лекарственно-устойчивых форм *M. tuberculosis* является прекрасным подтверждением теории эволюции Чарльза Дарвина. Подобно любым новым признакам, возникающим в ходе избирательной эволюции, резистентные к антибиотикам штаммы становятся преобладающими в популяциях *M. tuberculosis*, если устойчивые фенотипы обеспечивают мутантам преимущества в выживаемости по сравнению с их чувствительными аналогами. Длительное лекарственное воздействие в значительной степени способствует непрерывному прогрессированию селективной эволюции резистентных штаммов, которые в противном случае вряд ли доминировали бы в силу их пониженного фитнеса в сравнении с чувствительными изолятами. Постоянно растущее потребление АМП в ответ на рост заболеваемости туберкулезом привело к устойчивой эволюции штаммов *M. tuberculosis*, которые резистентны к доступным лекарственным средствам. Недавние исследования свидетельствуют о том, что воздействие сублетальных уровней бактерицидных препаратов на микроорганизм способствует клеточному мутагенезу, приводящему к накоплению мутаций в других генах, вовлеченных в резистентность к лекарственным средствам (Kohanski et al., 2010). Это явление, возможно, обусловлено ростом активных форм кислорода, продуцируемых

бактерицидными антибиотиками (Kohanski et al., 2007), может сыграть ключевую роль в быстром появлении фенотипов с множественной лекарственной устойчивостью в патогенных бактериях, таких как *M. tuberculosis*. В этой связи многие современные противотуберкулезные препараты вполне могут стать обоюдоострым оружием. Так, и изониазид, и этионамид для проявления своих ингибирующих функций требуют активации окислительно-восстановительными ферментами в микобактериальной цитоплазме. Этот процесс продуцирует реактивный кислород и/или радикалы, обладающие микобактерицидной активностью. Однако по мере появления, а затем и выживания мутантного изолята под действием реактивного кислорода и радикалов, эти же химические вещества повышают его изменчивость, что приводит к появлению дополнительных мутаций (Smith et al., 2013). Тем не менее, связь механизма действия реактивного кислорода и радикалов с накоплением мутаций, ассоциированных с резистентностью, в геноме *M. tuberculosis* требует дальнейшего исследования.

Приобретенную лекарственную устойчивость часто характеризуют сниженным бактериальным фитнессом (Andersson and Hughes, 2010), влияющим на стабильность и доминирование резистентных фенотипов. Изначально полагали, что основной резервуар циркулирования лекарственно-устойчивых форм ТБ составляют ВИЧ-позитивные пациенты. Однако широкое распространение резистентных изолятов и среди впервые выявленных больных, характеризующихся относительно нормальным состоянием иммунитета (Mokrousov, 2016), свидетельствует о наличии физиологических механизмов патогена, корректирующих состояние пониженного фитнесса (Li et al., 2016). Такая компенсаторная эволюция стабилизирует резистентные фенотипы. Полногеномное секвенирование выявило набор компенсаторных мутаций в генах *rpoA* и *rpoC* резистентных к рифампицину штаммов *M. tuberculosis* (Comas et al., 2011; Brandis and Hughes, 2013). Обнаружены «горячие точки» – места локализации таких мутаций в генах оперона, кодирующего микобактериальную РНК-полимеразу (Рис.6). Темпы роста *in vitro* данных

изолятов подтвердили, что эти мутации восстанавливают жизнеспособность штаммов *M. tuberculosis*, устойчивых к рифампицину, до уровня их чувствительных аналогов (Brandis and Hughes, 2013). Более того, данные мутации были картированы в ~30% МЛУ-изолятов, полученных из регионов с доминированием лекарственно-устойчивого ТБ (Comas et al., 2011).



**Рис. 6.** Распределение вторичных мутаций в генах оперона *rpoA-rpoB-rpoC*, кодирующего РНК-полимеразу *M. tuberculosis*. Положение ключевой мутации в гене *rpoB* S531L, характеризующей основную популяцию ТБ с высоким уровнем устойчивости к рифампицину, выделено черным. 37 вторичных мутаций, ассоциированных с восстановлением бактериального фитнеса и, возможно, с нарастанием темпов трансмиссивности (de Vos et al., 2013), локализованы в «горячих точках» генов *rpoA* (кодоны 189–199), *rpoB* (кодоны 516–561, 848) и *rpoC* (кодоны 257, 358–452, 606–674). Обведены мутации, найдены в работе Brandis&Hughes (Brandis and Hughes, 2013).

Изоляты *M. tuberculosis*, характеризующиеся тотальной лекарственной устойчивостью, были зарегистрированы в Индии (Udwadia et al., 2012). Подобно МЛУ- и ШЛУ-штаммам, распространение таких форм – всего лишь вопрос времени при сохранении старых режимов терапии, без детального геномного анализа существующего спектра генетических детерминант у изолятов, выделяемых от каждого пациента. И здесь важным вопросом является способность компенсаторной эволюции стабилизировать такие тотально-устойчивые фенотипы, тем самым еще повысив скорость трансмиссии резистентных штаммов ТБ. Таким образом, коэволюция резистентности к

лекарственным средствам и особенностей бактериального фитнеса *M. tuberculosis* представляют собой смертельную угрозу для людей.

### **1.2.1.2 Естественная резистентность**

Помимо способности формировать устойчивость посредством приобретения хромосомных мутаций, *M. tuberculosis* наделен множеством внутренних механизмов резистентности, которые позволяют активно нейтрализовать воздействия АМП. Такие механизмы формируют высокорезистентный фон, который не только ограничивает применение доступных антибиотиков для лечения ТБ, но также препятствует разработке новых лекарств. Естественную устойчивость ТБ можно разделить на две категории: пассивная резистентность и специализированные механизмы формирования устойчивости.

#### **1.2.1.2.1 Пассивная резистентность возбудителя туберкулеза**

Несмотря на то, что микобактерии классифицируются как грамположительные бактерии, их клеточная стенка, характеризующаяся толщиной и множеством слоев с разнообразной гидрофобностью, функционирует как эффективный барьер для проникновения АМП. Межслойное пространство микобактериальной клетки подобно периплазме грамотрицательной клеточной стенки. Пептидогликановый экзоскелет покрыт гидрофильным слоем арабиногалактана, предотвращающим перенос гидрофобных молекул. Эти два слоя ковалентно связаны с внешним слоем миколовых длинноцепочечных жирных кислот, которые образуют воскообразный нежидкий барьер, ограничивающий проникновение как гидрофобных, так и гидрофильных молекул (Liu et al., 1995). Например, диффузия  $\beta$ -лактамов через микобактериальную клеточную стенку в сотни раз медленнее, чем проникновение через стенку *Escherichia coli* (Chambers et al., 1995).

Участие клеточной стенки микобактерий в природной резистентности хорошо иллюстрируется исследованиями штаммов с мутациями, приводящими к нарушению биосинтеза клеточной стенки. Так, дефектный по биосинтезу

миколовых кислот штамм *M. smegmatis* был чувствителен к эритромицину, хлорамфениколу, новобиоцину и рифампицину (Liu and Nikaido, 1999). Кроме того, исследования с использованием транспозонного мутагенеза подтвердили роль целостности клеточной стенки в резистентности к АМП (Philalay et al., 2004). Например, вставки транспозона в *kasB* или оперон *virS-mymA* (Rv3082 - Rv3089) – гены, контролирующие синтез миколовых кислот, приводили к ускорению проникновения препаратов и к повышению чувствительности к различным АМП (рифампицину, ципрофлоксацину, изониазиду и пиразинамиду) (Singh et al., 2005). Лигирование миколовых кислот с арабиногалактаном или трегалозой в клеточной стенке катализируется семейством миколитрансферазных ферментов, первоначально известным как комплекс антигенов Ag85 (Belisle et al., 1997). Удаление гена *fbpA*, кодирующего одну из миколитрансфераз, приводило к снижению уровней димиколатов трегалозы и повышенной чувствительности к АМП (Nguyen et al., 2005). Эти наблюдения подтверждают, что микобактериальная клеточная стенка играет важную роль в резистентности. Однако, поскольку клеточный цикл *M. tuberculosis* характеризуется чрезвычайной длительностью, замедленное проникновение АМП в некоторых случаях может быть достаточным для накопления ингибирующего уровня препарата задолго до деления клеток, тем самым делая проницаемость клеточной стенки важной, но не решающей детерминантой лекарственной устойчивости (Chambers et al., 1995, Quinting et al., 1997).

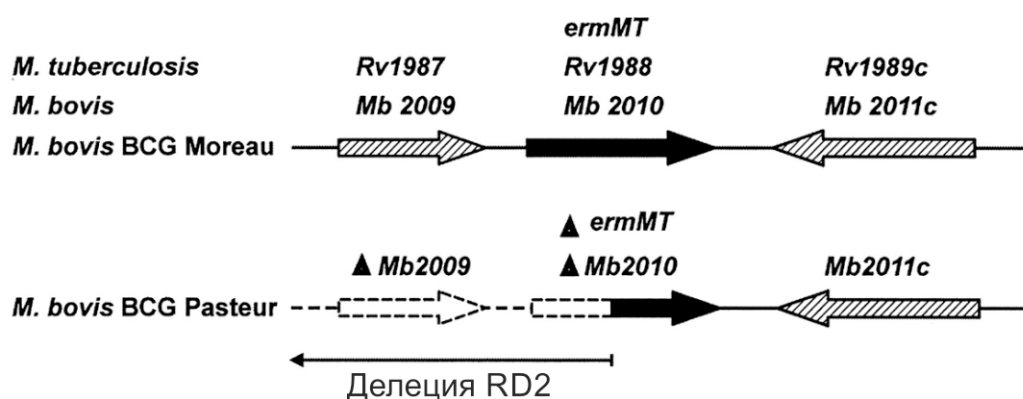
Аналогично клеточной стенке грамотрицательных бактерий белки-порины, расположенные во внешних слоях микобактериальной клеточной стенки, позволяют импортировать питательные вещества и необходимые для роста низкомолекулярные соединения (Niederweis, 2003). Порины также играют важную роль в импорте антибиотиков через внешний слой микобактериальной клеточной стенки (Danilchanka et al., 2008). В результате транс-экспрессии основного порина MspA от *M. smegmatis* к *M. tuberculosis* и *M. bovis* у последних отмечено повышение чувствительности к  $\beta$ -лактамам, изониазиду,



этамбутолу и стрептомицину (Stephan et al., 2004). Напротив, делеция *mspA* или *mspC* в *M. smegmatis* приводит к повышенной резистентности не только к гидрофильным, но и к гидрофобным и крупным антибиотикам, таким как ванкомицин, эритромицин и рифампицин (Stephan et al., 2004; Danilchanka et al., 2008). Хотя *M. tuberculosis* обладает по меньшей мере двумя пориноподобными белками OmpA и Rv1698, участие поринов в изменении чувствительности к АМП непосредственно у *M. tuberculosis* доказано не было.

#### **1.2.1.2.2 Специализированные механизмы природной резистентности *M. tuberculosis***

**Модификация лекарственных мишеней.** Патогенные бактерии способны уменьшать активность АМП посредством структурных модификаций собственных мишеней, тем самым снижая аффинность связывания с антибиотиками. Примером устойчивости такого типа является механизм, обеспечивающий естественную резистентность *M. tuberculosis* к макролидам и линкозамидам. Эти антибиотики останавливают рост бактериальных клеток за счет ингибирования трансляции, обратимо связываясь со специфичным сайтом рибосомной РНК в 50S-субъединице рибосомы и препятствуя транслокации пептидил-тРНК (Buriankova et al., 2004). Показано, что вакцинный штамм *M. bovis* BCG Pasteur чувствителен ко многим макролидам и линкозамидам, в то время как его родительский штамм *M. bovis* наряду с другими вакцинными штаммами резистентны к этим классам препаратов. Исследования с использованием сравнительной геномики показали, что чувствительность BCG Pasteur к макролидам и линкозамидам обусловлена хромосомной делецией гена *erm37*, кодирующего рибосомную РНК-метилтрансферазу (Buriankova et al., 2004) (Рис.7).



**Рис. 7.** Схема региона *ermMT*, кодирующего 23S рРНК-метилтрансферазу семейства Erm у *M. tuberculosis*, *M. bovis* и *M. bovis* BCG Moreau в сравнении с штаммом *M. bovis* BCG Pasteur (делеция региона RD2) (Buriankova et al., 2004).

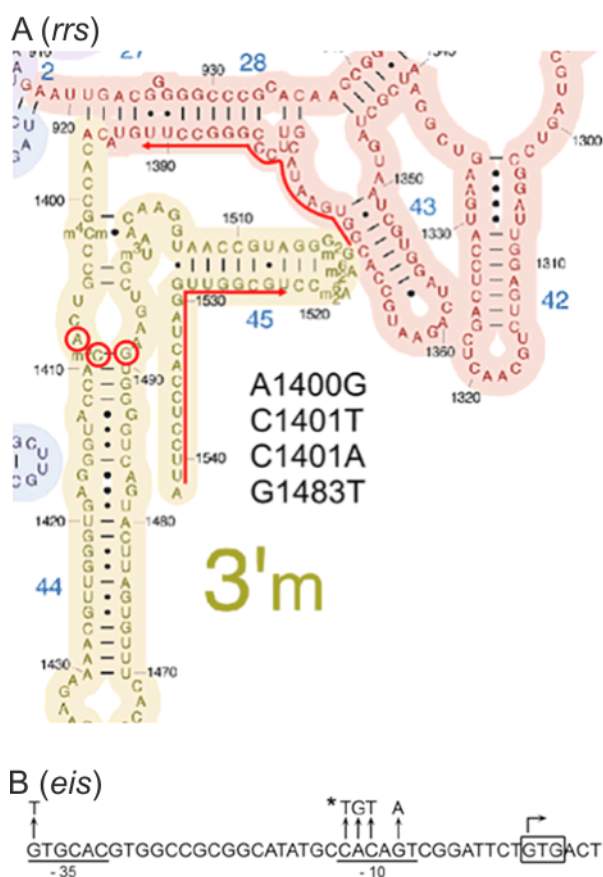
Ген *erm37* локализован в локусе RD2, удаленном из генома BCG в ходе культивирования. Генетические эксперименты показали, что устойчивость BCG к макролидам и линкозамиду может быть восстановлена до уровня родительского штамма *M. bovis* путем транс-экспрессии гена *erm37* из *M. tuberculosis* (Buriankova et al., 2004). Химический анализ позволил установить функцию данного фермента в *M. tuberculosis*, заключающуюся в метилировании 23S рРНК с целью изменения структуры рибосом (Madsen et al., 2005). Анализы связывания макролидов *in vitro* также подтвердили, что Erm37 уменьшает сродство макролидов к рибосомам, тем самым снижая ингибирующую активность макролидов при синтезе белка (Buriankova et al., 2004). Гены, ассоциированные с устойчивостью к макролидам и линкозамидам, также были идентифицированы у *M. smegmatis* и *M. fortuitum* (Nash et al., 2005). Интересно, что экспрессия генов кластера *erm* в микобактериях индуцируется под воздействием макролидов и линкозамидов (Nash et al., 2005), что указывает на их специализированную функцию по формированию резистентности к данным АМП. Индуцибельная экспрессия Erm37, скорее всего, контролируется регулятором транскрипции WhiB7 (Burian et al., 2012).

Еще одним примером, демонстрирующим способность *M. tuberculosis* нейтрализовать действие лекарственного препарата посредством ферментативной модификации его мишени, является метилирование рибосомной РНК, которое опосредует устойчивость к циклическим пептидам.

Капреомицин и виомицин используются в качестве препаратов второй линии терапии МЛУ-ТБ, однако были найдены клинические изоляты, устойчивые к данным АМП. Исследования резистентных к капреомицину изолятов *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* позволили выявить мутации в гене *tlyA*, кодирующем 2'-О-метилтрансферазу (Maus et al., 2005). TlyA метилирует 16S рРНК и 23S рРНК в позициях С1409 и С1920, соответственно (Johansen et al., 2006). Такие метилирования делают микобактериальные рибосомы восприимчивыми к связыванию капреомицина и виомицина (Maus et al., 2005, Johansen et al., 2006). Инактивация *tlyA* приводила к повышенной резистентности к циклическим пептидам, в то время как в транс-комплементации происходило восстановление чувствительности (Maus et al., 2005).

**Химическая модификация АМП.** Микобактерии также способны инактивировать антибиотики посредством прямых химических модификаций. Недавние исследования показали важность ацетилирования в формировании резистентности микобактерий к аминогликозидам - препаратам широкого спектра действия, способным действовать как бактерицидные или бактериостатические в зависимости от концентрации. Инъекционные препараты - канамицин и амикацин - в настоящее время используются в качестве второй линии терапии МЛУ-ТБ. Помимо описанного механизма действия этих АМП в качестве ингибиторов биосинтеза белка, в ранних исследованиях в *M. smegmatis* и *M. fortuitum* были идентифицированы гомологи 2'-N-ацетилтрансферазы (ААС), обеспечивающей устойчивость к гентамицину, дибекацину, тобрамицину и нетилмицину. Несмотря на возможное наличие ААС у *M. tuberculosis* (Vetting et al., 2003), вклад данного фермента в устойчивость к аминогликозидам доказан не был. Природная резистентность *M. tuberculosis* к данным АМП была впоследствии объяснена действием другой ацетилтрансферазой Eis (Enhanced Intracellular Survival) (Zaunbrecher et al., 2009), впервые обнаруженной в качестве детерминанты выживаемости микобактерий в макрофагах хозяина.

Устойчивость высокого уровня *M. tuberculosis* к канамицину ассоциирована с заменами в гене 16S рРНК (Рис. 8А). Однако большинство изолятов с низкими уровнями устойчивости к данному препарату не имели замен в гене *rrs*. Было обнаружено, что у ~ 80% таких изолятов существуют мутации в промоторной области локуса *eis* (Рис. 8В), увеличивающие транскрипцию данного гена в 180 раз (Zaunbrecher et al., 2009; Campbell et al., 2011; Engstrom et al., 2011).



**Рис. 8.** Схема локализации мутаций в гене 16S рРНК (А) и промоторной области гена *eis* (В), ассоциированных с устойчивостью к канамицину, амикацину и капреомицину (Zaunbrecher et al., 2009; Campbell et al., 2011).

Исследования *in vitro* показали, что Eis ацетирует несколько аминогрупп аминогликозидов с использованием ацетил-кофермента А в качестве донора ацетила (Chen et al., 2011), тем самым инактивируя АМП. Двойственная функция Eis в защите *M. tuberculosis* от микобактерицидных действий иммунитета хозяина и химиопрепаратов указывает на зловещую коэволюцию этих двух признаков под давлением недавнего использования аминогликозидов.

**Ферментативная деградация АМП.** Еще один механизм разрушения бактериями антибиотиков с использованием гидролаз, наиболее хорошо

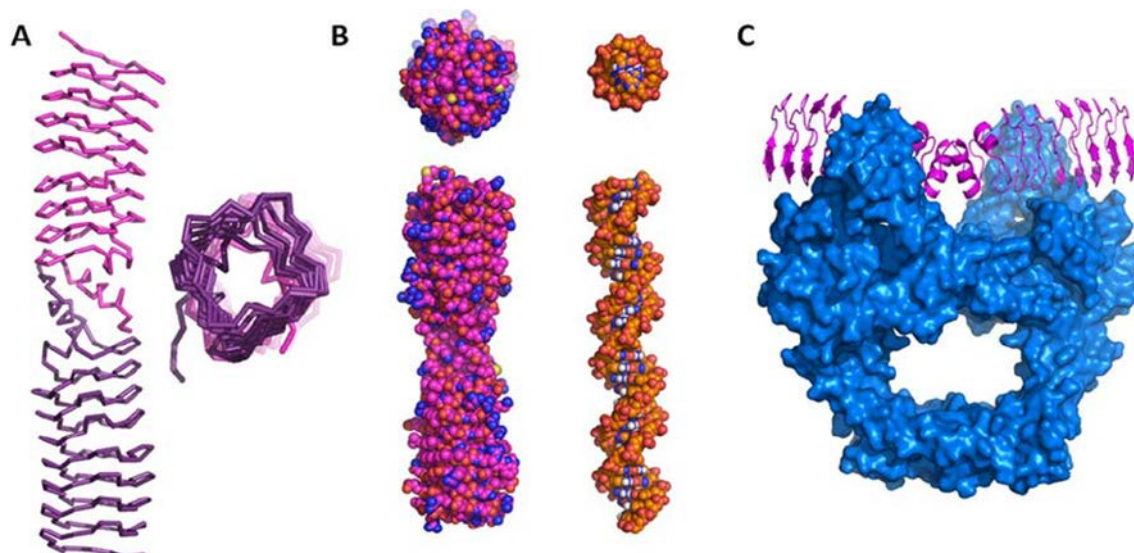
изученный на примере  $\beta$ -лактамовых препаратов. Эти антибиотики связывают и ингибируют активность пенициллин-связывающих белков (РВР), участвующих в сборке пептидогликана, тем самым нарушая биосинтез клеточной стенки и приводя к гибели клеток. В геноме *M. tuberculosis* найдены гены, кодирующие, по меньшей мере, четыре основных РВР. Эти белки связывают  $\beta$ -лактамы в клинически достижимых концентрациях (Chambers et al., 1995), что указывает на то, что аффинность мишени не является ключевым маркером резистентности к  $\beta$ -лактамам в микобактериях. Клеточная стенка микобактерий очевидно способствует уменьшению доступности  $\beta$ -лактамов для действия их мишеней. В связи с этим медленный рост *M. tuberculosis* служит как отрицательным, так и положительным фактором, способствующим проявлению резистентности. Например, карбапенемы относительно нестабильны и, следовательно, теряют активность намного быстрее, чем темпы роста микобактерий. Вместе с тем, ежедневное поглощение АМП может привести к летальным концентрациям, достаточным для ингибирования медленного клеточного деления микобактерий. Поэтому барьер клеточной стенки является важной, но не основной детерминантой резистентности к  $\beta$ -лактамам.

Приоритетным механизмом устойчивости к  $\beta$ -лактамам в микобактериях являются ферменты  $\beta$ -лактамазы, гидролизующие  $\beta$ -лактамовое кольцо в данных АМП (Chambers et al., 1995). Наиболее изученной по своей структуре и функциям  $\beta$ -лактамазой в *M. tuberculosis* является BlaC, которая относится к  $\beta$ -лактамазам класса А (Wang et al., 2006). BlaC проявляет широкую субстратную специфичность, возможно, из-за большого и гибкого сайта связывания субстрата (Wang et al., 2006). Кроме того, BlaC *M. tuberculosis* проявляет повышенную активность в отношении карбапенемов, которые, как правило, устойчивы к действию  $\beta$ -лактамаз у других патогенных бактерий (Tremblay et al., 2010). Кроме того, ингибиторы  $\beta$ -лактамазы, такие как клавулановая кислота, менее эффективны против BlaC по сравнению с другими ферментами класса А. Помимо BlaC, в геноме *M. tuberculosis* найдены по меньшей мере еще три гена  $\beta$ -лактамаз: *blaS*, *rv0406c* и *rv3677c*, которые, как было показано,

обеспечивают резистентность *M. tuberculosis* при более низкой активности данных  $\beta$ -лактамаз (Nampoothiri et al., 2008). Экспрессия гена *rv1846c*, кодирующего BlaC, в *M. tuberculosis* индуцируется  $\beta$ -лактамами (Sala et al., 2009), что указывает на специализированную систему защиты от данного класса АМП. Показано, что индукция BlaC опосредуется через BlaI, фактор транскрипции семейства «winged helix», являющийся транскрипционным репрессором экспрессии *rv1846c*. В отсутствие  $\beta$ -лактамов BlaI образует гомодимеры, которые связывают промотор гена *rv1846c*, тем самым ингибируя его транскрипцию. При воздействии  $\beta$ -лактамов на микобактериальную клетку BlaI диссоциирует от сайта связывания ДНК, инициируя транскрипцию *rv1846c*, что приводит к повышению резистентности к  $\beta$ -лактамным препаратам (Sala et al., 2009).

**Молекулярная мимикрия мишеней действия препаратов.** Данный механизм используется возбудителем туберкулеза для нейтрализации действия фторхинолонов. Эти АМП взаимодействуют с ДНК-гиразой или топоизомеразой в комплексах с ДНК, стабилизируя разрывы ДНК и одновременно предотвращая восстановление уровня сверхспирализации ДНК, что приводит к деградации ДНК и гибели клеток. Как в других бактериях, приобретенная устойчивость к фторхинолонам в *M. tuberculosis* обычно ассоциирована с мутациями в генах *gyrA* и *gyrB* (Таблица 1). Однако существуют и другие молекулярные механизмы, объясняющие резистентность ТБ к фторхинолонам. В *M. smegmatis* был обнаружен белок MfrA, вовлеченный в формирование устойчивости к FQ низкого уровня. Суперэкспрессия *mfrA* из многокопийной плазмиды приводила к повышенной резистентности к ципрофлоксацину и спарфлоксацину у *M. smegmatis* и *M. bovis* (Montero et al., 2001). Напротив, делеция *mfrA* приводила к снижению устойчивости к FQ и, таким образом, уровень резистентности зависел от экспрессии *mfrA*. Установлено, что последовательность белка MfrA высокогомологична последовательности пентапептида, в котором каждая пятая аминокислота представляет собой лейцин или фенилаланин. В то же время, структура MfrA в

*M. tuberculosis* напоминает трехмерную структуру двойной спирали ДНК (Ferber, 2005; Hegde et al., 2005) с тандемом пентапептидных повторов, формирующих правозакрученную спираль той же ширины, что и ДНК (Hegde et al., 2005) (Рис. 9).



**Рис. 9.** (А) Вид сбоку и сверху димера MfrA *M. tuberculosis* (PDB #2BM5). (В) Сравнение структур MfrA (слева) с 30-нуклеотидным фрагментом В-формы ДНК (справа). (С) Модель взаимодействия каталитического центра ДНК-гиразы (структура показана синим цветом) и MfrA (розовый цвет) (Mayer and Takiff, 2014).

Было высказано предположение, что MfrA имитирует структуру ДНК, чтобы уменьшить концентрацию фторхинолонов в цитоплазме, тем самым предотвращая действие фторхинолонов на комплекс «гираза – ДНК» (Ferber, 2005). Однако прямой корреляции между степенью экспрессии MfrA и уровнем устойчивости к фторхинолонам в клинических изолятах пока установлено не было. Тем не менее, это наблюдение свидетельствует об удивительных возможностях патогенных бактерий в развитии новых механизмов резистентности к антибиотикам.

**Вывод АМП из клетки посредством эффлюксных насосов.** Активным механизмом, обеспечивающим защиту от АМП в патогенных бактериях, является вывод препаратов посредством эффлюксных систем, состоящих из комплекса мембранных белков. Большинство из них важны для физиологии или метаболизма бактерий, например, для транспорта питательных веществ, токсинов, отходов или сигнальных молекул через клеточную стенку. Таким

образом, функции формирования резистентности к АМП для многих эффлюксных насосов могут быть вторичными и обусловлены неспецифической транспортировкой. Действительно, изменение экспрессии 20 из 36 генов, кодирующих мембранные транспортные белки в геноме *E. coli*, приводит к повышению уровня устойчивости к одному или нескольким антибиотикам (Nishino and Yamaguchi, 2001). В свою очередь эти транспортеры контролируются регулонами (транскрипционными репрессорами, активаторами и т.д.), включающимися при определенном специфическом воздействии АМП и тем самым смещая приоритет транспортной активности мембранных белков в сторону вывода антибиотиков, повышая уровень резистентности клетки.

Для микроорганизмов рода *Mycobacterium* описано, по меньшей мере, 18 белков-транспортеров, вовлеченных в изменение чувствительности к АМП, в основном формирующих устойчивость низкого уровня (Viveiros et al., 2012). Как было отмечено выше, большинство из них находится под контролем регуляторов, активация которых происходит в ответ на воздействие АМП. Так, транспортеры, кодируемые генами *iniBAC* и *efpA*, контролируются транскрипционным регулятором Lsr2 (Colangeli et al., 2005). В то время как IniBAC обеспечивает резистентность к изониазиду и этамбутолу, EfpA, скорее всего, отвечает за неспецифический эффлюкс препаратов первого ряда в МЛУ-изолятах (Colangeli et al., 2005). Важно отметить, что транскрипционный контроль IniBAC и EfpA индуцибелен изониазидом или этамбутолом (Colangeli et al., 2005), что указывает на функциональную эволюцию устойчивости к антибиотикам. Другим примером является позитивная регуляция Tar, транспортера аминогликозидов и тетрациклина, посредством транскрипционного репрессора WhiB7 (Morris et al., 2005). Экспрессия WhiB7 и его регулона, включая Tar, индуцируется под воздействием тетрациклина, стрептомицина или эритромицина (Morris et al., 2005; Burian et al., 2012). Интересно, что одновременная активация нескольких эффлюксных насосов, включая Tar, индуцируется в микобактериях, находящихся в гранулемах хозяина, что может быть свидетельством приобретения возбудителем



туберкулеза базального уровня резистентности в латентном периоде инфекции (Adams et al., 2011).

### **1.2.1.2.3 Эпигенетическая лекарственная толерантность *M. tuberculosis***

Помимо приобретенных и естественных механизмов резистентности, опосредованных генетическими детерминантами, у возбудителя туберкулеза наблюдается феномен лекарственной толерантности, проявляющейся в латентный или рецидивирующий период. Эта фенотипическая толерантность связана с наличием небольшой персистирующей популяции клеток с иными, пока неизвестными метаболическими или физиологическими состояниями. Такие клетки генетически идентичны с восприимчивыми к АМП клетками и способны функционировать как чувствительные при нормализации среды (Lewis, 2008). В то время как механизмы резистентности обеспечивают затрудненный доступ АМП к мишени, толерантность к лекарственным средствам, проявляемая персистирующими клетками, может быть связана с низкой метаболической активностью или делением клеток в состоянии покоя. Это приводит к снижению потребности в белках или механизмах, являющихся мишенью действия препарата (Lewis, 2008). Следовательно, связывание АМП с мишенями может происходить обычным образом, однако данный процесс уже не является летальным для микроорганизма (Lewis, 2008). Неактивные метаболические пути, такие как замедленный цикл трикарбоновых кислот, могут предотвратить гибель клеток под воздействием химиопрепарата (Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2010). По мере активного роста микроорганизма клеточная потребность в целевых белках возобновляется, делая клетку чувствительной к действию АМП. Так, латентная инфекция, вызванная находящейся в состоянии покоя микобактерией, характеризуется остановкой большей части ее метаболизма, что приводит к повышенной устойчивости к антибиотикам (Gengenbacher and Kaufmann, 2012). Изоляты *M. tuberculosis*, полученные от пациентов с ТБ с рецидивами или отрицательной клинической динамикой, демонстрировали повышенную толерантность к

изониазиду, этамбутолу и рифампицину в сравнении с изолятами от обычных больных, при этом такая толерантность была строго фенотипической (Askart et al., 2014). Кроме того, из клинического материала были выделены популяции микобактериальных клеток, реплицирующихся крайне медленно и даже полностью останавливающих свой рост. Анализ транскриптома этих клеток показал, что их толерантность к АМП обусловлена низкими метаболическими показателями, а не генетическими детерминантами резистентности (Garton et al., 2008).

Молекулярные механизмы, лежащие в основе формирования толерантных к лекарственным средствам клеток микобактерий, остаются в значительной степени неизвестными. Полагают, что данное явление носит многофакторный характер, затрагивая разнообразные физиологические процессы клетки, включая метаболизм фосфатов (Thayil et al., 2011), действие эффлюксных насосов (Adams et al., 2011), систем «токсин-антитоксин» (Han et al., 2010), изменение структуры клеточной стенки (Islam et al., 2012) и активации транскрипционных регулонов (Walter et al., 2015), связанных с переводом клетки в метаболически неактивную форму.

Таким образом, механизмы резистентности и толерантности возбудителя туберкулеза препятствуют не только клиническому применению доступных химиопрепаратов, но и разработке новых лекарств. Тем не менее, знание генетических детерминант резистентности и эффективные методы их выявления в каждом клиническом образце обеспечат рациональное применение существующего ограниченного набора противотуберкулезных препаратов, тем самым ослабляя селективное давление на мутаторный фенотип и снижая темпы распространения лекарственно-устойчивых форм ТБ.

### **1.2.2 Методы анализа лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза**

Многие годы золотым стандартом определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к АМП являлось культивирование на специфических плотных средах, содержащих химиопрепарат. В отличие от

среды Левенштейна-Йенсена (LJ) агаровые среды являются прозрачными, позволяя регистрировать рост колоний в начале их формирования. Применение агаровых сред обеспечивает получение данных по фенотипической чувствительности для большинства изолятов в течение 2-3 недель, в сравнении с 4-6 неделями на среде LJ. В настоящее время используется два типа агаровых сред, обеспечивающих прямой, либо косвенный результат: Middlebrook 7H10 и Middlebrook 7H11. Среда Middlebrook 7H11 обеспечивает лучший рост лекарственно-устойчивых штаммов ТБ в сравнении с 7H10.

В настоящее время наиболее распространенным является выращивание изолятов в флаконах с жидкими средами, содержащими АМП, инсталлированных в автоматизированные системы, такие как Bactec MGIT 960 и VersaTREK. В системе MGIT детекция бактериального роста основана на оценке потребления кислорода, что контролирует флуоресцентный индикатор, встроенный в нижнюю часть каждой пробирки со средой с АМП. Сравнение роста в контрольной пробирке чувствительного штамма с пробирками, содержащими анализируемый материал, позволяет классифицировать культуры как устойчивые и чувствительные. Система VersaTREK использует манометрическую детекцию, измеряя давление, меняющееся в процессе потребления кислорода растущими бактериями. Для описанных выше культуральных методик подобраны значения критических концентраций по каждому из противотуберкулезных препаратов, представленные в Таблице 2 (WHO & Merieux Foundation, 2012).

**Таблица 2.** Значения критических концентраций (мг/л), используемых на плотных и жидких средах для фенотипического определения чувствительности изолятов *M. tuberculosis*.

Препарат	L-J	Агар 7H10	Агар 7H11	Bactec MGIT 960	VersaTREK
Рифампицин	40,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Изониазид*	0,2	0,2 / 1,0	0,2 / 1,0	0,1 / 0,4	0,1 / 0,4
Этамбутол	2,0	5,0	7,5	5,0	5,0
Пиразинамид	-	-	-	100,0	300,0
Стрептомицин	4,0	2,0	2,0	1,0	-
Амикацин	30,0	4,0	-	1,0	-
Канамицин	30,0	5,0	6,0	2,5	-
Капреомицин	40,0	4,0	-	2,5	-
Этионамид	40,0	5,0	10,0	5,0	-
ПАСК	1,0	2,0	8,0	4,0	-

Циклосерин	30,0	-	-	-	-
Офлоксацин	4,0	2,0	2,0	2,0	-
Левифлоксацин	-	1,0	-	1,5	-
Моксифлоксацин	-	0,5	-	0,5	-
Линезолид	-	-	-	1,0	-

Примечание: \* две различные концентрации по INH используются для дифференциации изолятов с низким и высоким уровнем устойчивости.

Выдаваемый при использовании критических концентраций отчет в виде формулировки «чувствителен/устойчив» несмотря на свою простоту сегодня уже не является достаточным для назначения адекватной схемы АМП при терапии МЛУ- и ШЛУ-форм ТБ. Очевидно, что для пациентов с лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза необходима дополнительная информация (Somoskovi and Salfinger, 2015), включающая характеристику генетических детерминант и значения МИК по препаратам, получаемые в системах, использующих культивирование штаммов на средах с различными разведениями АМП, примером которых может быть Sensititre MycoTB Plate (Hall et al., 2012).

Традиционные подходы анализа фенотипической чувствительности, занимают изрядное время (до 4 недель) в силу медленного роста *M. tuberculosis*. Молекулярные методы, основанные на идентификации точечных мутаций, ассоциированных с резистентностью, ускоряют процесс до 1-2 дней и обеспечивают клиницистов точной информацией, необходимой для начала терапии противотуберкулезными препаратами. Вместе с тем, ключевой проблемой в определении таких генетических маркеров является сложный мультилокусный характер резистентности. Необходимо четкое понимание клинической значимости идентифицируемых генетических детерминант резистентности и их вклада в формирование устойчивости различного уровня. В Таблице 3 представлены данные о связи ключевых мутаций в геноме *M. tuberculosis* с истинной устойчивостью, их значимости и распространенности.

**Таблица 3.** Клиническая значимость и распространенность мутаций в геноме *M. tuberculosis*, ассоциированных с устойчивостью к основным препаратам первого и второго ряда

Препарат / локус / мутации	Ассоциация с фенотипической устойчивостью <i>in vitro</i>	Клиническая значимость	Распространенность в резистентных штаммах
<b>Рифамицины (рифампицин (RMP), рифабутин (RFB)) (<i>rpoB</i>)</b>			
Замены в кодонах 531 и 526	Ассоциация мутаций S531L и H526D/Y с высоким уровнем устойчивости ко всем рифамицинам Ассоциация замен H526L и H526N/S с низким уровнем устойчивости к RMP, возможно, с чувствительностью к RFB	Доказана ассоциация с клинической резистентностью, терапия рифамицинами исключена	Более 95% мутаций, ассоциированных с устойчивостью к RMP, локализованы в фрагменте гена <i>rpoB</i> длиной 81 п.н. Замены в 531 и 526 кодонах встречаются в 40-60% и 10-40% RMP-резистентных изолятов
Замены в кодонах 516, 511-513	Мутации в данных кодонах ассоциированы с устойчивостью низкого уровня к RMP, встречаются в чувствительных к RFB изолятах. Исключение составляют сочетанные мутации в данных кодонах	Возможна терапия RFB	5-32% (мутации в кодоне 516) 1-10% (мутации в кодонах 511-513)
Замены в кодоне 533	Ассоциация с устойчивостью низкого уровня	Терапия RMP и RFB рассматривается как возможная опция	2-5%, однако частоты изолятов могут быть скорректированы, поскольку такие штаммы фенотипически часто характеризуют как чувствительные
Замена I572F	Мутация локализована вне локуса <i>rpoB</i> длиной 81 п.н.	Показана связь данной мутации с устойчивостью к RMP и кросс-резистентностью к RFB (Van Deun et al., 2009)	Данных нет в силу незначительного количества молекулярных методов, способных идентифицировать данную замену (Микулович et al., 2017)
<b>Изониазид (INH)</b>			
<i>katG</i> замена S315T и другие мутации в кодоне 315	Ассоциация мутаций S315T с высоким уровнем устойчивости к INH (МИК > 1 мг/л)	Доказана строгая ассоциация с МЛУ-изолятами туберкулеза, плохим прогнозом при лечении. Терапия INH исключена	5-98%
<i>katG</i> замены в кодонах 328, 335	Ассоциация с высоким уровнем устойчивости к INH. Выявлены разнообразные сочетанные мутации в данных кодонах и в кодоне 315	Терапия INH исключена	1-10%
<i>inhA</i> промоторная область: -16G, -15T, -8A/C	Ассоциация одиночных мутаций в <i>inhA</i> с низким уровнем устойчивости (МИК < 1 мг/л), с высоким – при сочетанных мутациях в <i>katG</i>	Отсутствуют данные об эффективности терапии пациентов с изолятами,	12-42%, суммарно, единичные мутации и сочетанные с заменами в <i>katG</i>

обладающими только мутациями в промоторной области *inhA*. В отличие от S315T в *katG*, мутации в *inhA* не ассоциированы с МЛУ-изолятами, однако, возможно, являются маркером ШЛУ (Muller et al., 2011)

**Этамбутол (*embB*)**

Замены в кодоне 306  
306  
Ассоциация мутаций в кодоне 306 гена *embB* с умеренным или низким уровнем устойчивости. В целом, информация весьма противоречива  
Отсутствуют исследования о роли мутаций в 306 кодоне в клинической резистентности (эффективности терапии больных) к этамбутолу 20-88%

**Инъекционные препараты (амикацин (АМК), канамицин (КАН), капреомицин (САР))**

*rrs* a1401g  
Ассоциация замены a1401g с высоким уровнем устойчивости к КАН и АМК и с низким – к САР  
Доказана ассоциация с клинической резистентностью к КАН и АМК, САР является опцией в химиотерапии в комбинации с другими препаратами ~78% of АМК-устойчивых изолятов  
~76% of САР-устойчивых изолятов  
~56% of КАН-устойчивых изолятов

*rrs* c1402t  
Ассоциация замены c1402t с высоким уровнем устойчивости к САР, умеренным и низким - к КАН, встречается в чувствительных к АМК изолятах  
АМК является опцией в химиотерапии в комбинации с другими препаратами 1-2% изолятов, устойчивых ко всем инъекционным препаратам

*rrs* g1484c/t  
Ассоциация замены g1484c/t с устойчивостью высокого уровня ко всем инъекционным препаратам  
Точные данные о клинической резистентности отсутствуют. Показана отмена инъекционных препаратов 1-2% изолятов, устойчивых ко всем инъекционным препаратам

*eis* промоторная область: g-37t, c-  
Ассоциация мутаций в промоторной области гена *eis* с низким уровнем устойчивости к КАН. Ассоциация  
Возможна терапия САР g-10a - 22% КАН-резистентных изолятов  
c-14t - 11% КАН-резистентных изолятов

12t, g-10a, c-14t	замены c-14t с низким уровнем устойчивости к KAN и АМК		c-12t - 13% KAN-резистентных изолятов g-37t – 5% KAN-резистентных изолятов
<b>Фторхинолоны (офлоксацин (OFX), левофлоксацин (LVX), моксифлоксацин (MFX))</b>			
<i>gyrA</i> замены в кодоне 90, 91, 94	Ассоциация замен в кодоне 94 с высоким уровнем устойчивости к фторхинолонам. Противоречивые данные по мутациям в кодонах 90, 91	Доказана ассоциация мутаций в кодоне 94 с клинической резистентностью к OFX, терапия другими фторхинолонами, скорее всего, также исключена	Замены D94 и A90 - 40–58% OFX-резистентных изолятов Замены D94 и A90 - 20–30% MFX-резистентных изолятов
<i>gyrB</i> замены в кодонах 485, 500, 509, 525, 539, 540, 543	Ассоциация замен в кодоне 485 с чувствительностью к фторхинолонам. Ассоциация одиночных замен в кодонах 500-543 с устойчивостью низкого уровня, в сочетании с мутациями в <i>gyrA</i> – с умеренным и высоким уровнем устойчивости	Данных нет	1-10%, суммарно одиночных и сочетанных с мутациями в <i>gyrA</i> в резистентных к фторхинолонам изолятах

Данные, приведенные в Таблице 3, свидетельствуют о необходимости идентификации широкого спектра детерминант в различных локусах, характеризующихся разнообразной клинической значимостью. При этом для ряда генетических маркеров их вклад в формирование устойчивости к определенному противотуберкулезному препарату еще предстоит выяснить.

Разнообразие методов идентификации генетических детерминант резистентности *M. tuberculosis* в настоящее время вполне соответствует упомянутому выше разделению методов молекулярной диагностики на три основные группы, включающие технологии амплификации НК, в первую очередь, ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ); гибридизационные подходы и технологии секвенирования нового поколения (NGS). Современные требования к методам должны включать информативность – максимальный спектр исследуемых локусов, высокие диагностические характеристики и возможность анализа ДНК из клинического материала (Таблица 4).

Приведенный в Таблице 4 обзор современных молекулярно-генетических подходов для анализа возбудителя туберкулеза свидетельствует об отсутствии идеального генетического теста, решающего проблему выбора эффективных противотуберкулезных препаратов посредством получения карты детерминант устойчивости к самому полному спектру АМП. Безусловно, на эту роль могли бы подойти технологии NGS (Votintseva et al., 2017). Однако полное отсутствие отечественных разработок, как в области приборной базы, так и в наборах реагентов, обеспечивающих цикл полногеномного/таргетного анализа клинического материала, не позволяет пока снизить цену до приемлемого уровня (в настоящее время – стоимость NGS-анализа более 20 тыс руб/образец). В свете сложной политической обстановки зависимость от импорта таких критических технологий может оказаться чрезвычайно чувствительной для отечественного здравоохранения.



**Таблица 4.** Перечень актуальных (опубликованных за последние 5 лет) методик анализа генетических детерминант резистентности *M. tuberculosis*.

Продукт / Исследование / автор, год, ссылка	Используемая технология	Анализируемые мишени	Особенности	Недостатки / замечания
Xpert MTB/RIF (WHO, 2016)	Полностью автоматизированная система на основе ПЦР-РВ	<i>rpoB</i>	Рекомендована ВОЗ. Эффективный анализ AFB+ и AFB- образцов Характеристики анализа RMP-устойчивого фенотипа: Чувствительность 90-95% Специфичность 89-97%	Анализ только мутаций в локусе <i>rpoB</i> , ассоциированных с устойчивостью к RMP.
Genedrive (Castan et al., 2014)	Автоматизированная система на основе асимметричной ПЦР и гибридизации	<i>rpoB</i>	Эффективный анализ AFB+ образцов Характеристики анализа RMP-устойчивого фенотипа: Чувствительность 65,9-85,7% Специфичность 100%	Плохая чувствительность при анализе AFB- образцов. Анализ только мутаций в локусе <i>rpoB</i> , ассоциированных с устойчивостью к RMP
TaqMan array card (Pholwat et al., 2015)	Интегрированная микрофлюидная система на основе ПЦР-РВ	<i>rpoB, katG, inhA, embB, rpsL, rrs, eis, gyrA, gyrB, pncA</i>	Широкий спектр анализируемых мишеней. Надежная идентификация точечных мутаций за счет методы высокоразрешающего плавления Точность идентификации резистентного фенотипа: 70-99% (Foongladda et al., 2016)	Ограниченный набор мутаций по каждому локусу. Показана принципиальная возможность анализа ДНК клинических изолятов. Данные анализа клинических образцов отсутствуют.
Amplicplex Plus MTB/NTM MDR-TB (Sali et al., 2016)	Мультиплексная система на основе ПЦР-РВ	<i>rpoB</i> (15 мутаций), <i>katG/inhA</i> (6 мутаций)	Показан эффективный анализа ДНК из AFB+ и AFB- образцов Быстрая идентификация МЛУ-штаммов Характеристики анализа INH-устойчивого фенотипа: Чувствительность 83,3% Специфичность 100%	Анализ мутаций в локусах <i>rpoB, katG, inhA</i> ассоциированных с устойчивостью к RMP, INH. Данные о чувствительности и специфичности при анализе RMP-устойчивых фенотипов отсутствуют
Амплитуб-МЛУ-РВ, Амплитуб-FQ-РВ (Аляпкина и др., 2014)	Мультиплексные системы на основе ПЦР-РВ	<i>rpoB, katG, inhA, gyrA</i>	Идентификация МЛУ-штаммов Данные по чувствительности и специфичности в публикациях не найдены	Анализ мутаций в локусах <i>rpoB, katG, inhA, gyrA</i> ассоциированных с устойчивостью к RMP, INH, FQ (частично). Раздельные тесты на RMP/INH и FQ. Последовательный анализ ДНК на различные мутации.
GenoType MTBDRplus, GenoType	Мультиплексная ПЦР с последующей гибридизацией на стрипах	<i>rpoB, katG, inhA, gyrA, gyrB, eis, rrs</i>	Идентификация МЛУ- и ШЛУ-штаммов. Чувствительность и специфичность при анализе RMP и INH-устойчивого фенотипа >90%.	Плохая чувствительность (невозможность работы) при анализе AFB- образцов.

MTBDRsl (Joob and Wiwanitkit, 2017; Theron et al., 2014)					При анализе FQ-резистентного фенотипа: чувствительность 83,1 – 85,1 %; специфичность 97,7-98,2% При анализе SLID-резистентных фенотипов: Чувствительность 76,9%; специфичность – 99,5%	Раздельные тесты на RMP/INH и FQ/SLID.
Aid resistance (Molina-Moya et al., 2015)	TB	Мультиплексная последующей гибридизацией на стрипах	ПЦР с	<i>rpoB, katG, inhA, gyrA, rrs, embB</i>	Широкий спектр анализируемых локусов и мутаций в них. Данные по чувствительности и специфичности в публикациях не найдены (совпадения с секвенированием при анализе десятков образцов)	Невозможность анализа AFB-образцов. Раздельные тесты на RMP/INH, SLID/STR, FQ/EMB
Vereplex Biosystem (Cabibbe et al., 2015)		Интегрированная система в формате LOC, сочетающая мультиплексную ПЦР с гибридизацией на микрочипе	ПЦР с	<i>rpoB, katG, inhA</i>	Идентификация МЛГУ-штаммов с высокой (>90%) чувствительностью и специфичностью как при анализе ДНК из культур, так и AFB+ образцов	Анализ мутаций в локусах <i>rpoB, katG, inhA</i> ассоциированных с устойчивостью к RMP, INH. Отсутствуют данные анализа AFB-образцов.
Akonni TrueArray (Linger et al., 2014)		Мультиплексная последующей гибридизацией на микрочипе	ПЦР с	<i>rpoB, katG, inhA, embB, rpsL</i>	Идентификация МЛГУ-штаммов с высокой (>90%) чувствительностью и специфичностью При идентификации EMB-резистентного фенотипа Чувствительность 70% (7 совпадений из 10) Специфичность 98,6% (141 из 143) – много больше, чем у любого другого молекулярного теста на EMB	Данные анализа клинического материала (AFB+/AFB-) отсутствуют. Анализ детерминант резистентности только к препаратам первого ряда
BluePoint MtbDR (Huang et al., 2014)		Мультиплексная последующей гибридизацией на микрочипе	ПЦР с	<i>rpoB, katG, inhA</i>	Идентификация МЛГУ-штаммов с высокой (>90%) чувствительностью и специфичностью	Данные анализа клинического материала (AFB+/AFB-) отсутствуют. Анализ мутаций в локусах <i>rpoB, katG, inhA</i> ассоциированных с устойчивостью к RMP, INH.
TB-DzT (Bengtson et al., 2017)		Мультиплексная последующим продуктом на бинарном дезоксирибозимном сенсоре	ПЦР анализом	<i>rpoB, katG, inhA, gyrA, 23pPHK</i>	Принципиальная возможность анализа как известных, так и неизвестных мутаций в анализируемых локусах благодаря комбинаторике, заложенной в сенсоре.	Данные по чувствительности и специфичности, возможности анализа ДНК клинических образцов и изолятов отсутствуют. Неясны перспективы мультиплексирования.
TB-Sprint (Gomgnimbou et al., 2013; Molina-Moya et al., 2017)		Мультиплексная лиганд-зависимая амплификация на микросферах	лиганд-зависимая амплификация на микросферах	<i>rpoB, katG, inhA</i> , регион прямых повторов (сполиготипирование)	Идентификация МЛГУ-штаммов с высокой (>90%) чувствительностью и специфичностью Одновременное установление сполиготипа	Данные анализа клинического материала (AFB+/AFB-) отсутствуют. Анализ мутаций в локусах <i>rpoB, katG, inhA</i> ассоциированных с устойчивостью к RMP, INH.
Next Gen	Таргетное секвенирование			<i>rpoB, katG, inhA, gyrA</i>	Быстрое установление последовательностей	Отсутствие отечественных

RDST assay (Colman et al., 2016)	нового поколения	<i>rrs, ei, ...</i>		анализируемых локусов и установление мутаций в AFB+ образцах. Перспективы мультиплексирования	технологий (оборудования и наборов реагентов) – высокая (> 20000 руб / образец) стоимость анализа. Отсутствие готовых наборов реагентов и/или утвержденных регуляторами разработанных технологических процессов применения таргетного секвенирования в рутинной практике клинико-диагностических лабораторий
MinION WGS (Votintseva et al., 2017)	Полногеномное секвенирование в системе MinION	Полный <i>M.tuberculosis</i>	геном	Получение данных об известных клинически значимых и неаннотированных мутациях в течение 12 часов для клинических изолятов и AFB+ образцов. Полное совпадение данных с результатами фенотипической чувствительности.	Результаты идентификации генетических детерминант были получены для 24/40 в AFB+ образцов. Чувствительность к методам обработки клинического материала и выделения микобактериальной ДНК. Отсутствие отечественных технологий (оборудования и наборов реагентов) – высокая (> 20000 руб / образец) стоимость анализа. Отсутствие готовых наборов реагентов и/или утвержденных регуляторами стандартных операционных процедур применения таргетного секвенирования в рутинной практике клинико-диагностических лабораторий.

Рекомендованная ВОЗ автоматизированная система «Xpert MTB/RIF» (Cepheid, США), несмотря на превосходные диагностические характеристики, в том числе, при анализе бактериоскопически отрицательных образцов, решает узкую задачу по выявлению ДНК возбудителя туберкулеза и определения его чувствительности к рифампицину (Helb et al., 2010) и ограничено пригодна даже для выявления монорезистентных и МЛУ-изолятов. Так, последние исследования свидетельствуют о том, что монорезистентность к изониазиду регистрируется у 5-15% штаммов, при этом такая форма ТБ характеризуется наихудшей клинической картиной и плохим прогнозом (Baez-Saldana et al., 2016; van der Heijden et al., 2017). В то же время, устойчивость к рифампицину более чем в 10% случаев не ассоциирована с устойчивостью к изониазиду (Kurbatova et al., 2012). Изучение резистентных свойств микобактерий у пациентов с выявленным МЛУ-ТБ показывает, что более 40% из них устойчивы по меньшей мере к одному из препаратов второй линии терапии (Dalton et al., 2012).

Также рекомендованные ВОЗ наборы GenoType® MTBDRplus и GenoType® MTBDRsl (Hain Lifescience, Германия) в основе которых лежит гибридизация на стрипах, позволяют в отдельных тестах идентифицировать детерминанты устойчивости к рифампицину/изониазиду, фторхинолонам/инъекционным препаратам. Аналогичный методический подход применен в системе AID TB resistance line probe assay (Molina-Moya et al., 2015), выявляющей генетические детерминанты МЛУ и ШЛУ-туберкулеза, а также маркеры резистентности стрептомицина и этамбутола, однако, уже в трех отдельных реакциях. При этом данные тесты строго рекомендованы для анализа ДНК, выделенной из AFB+ - образцов и клинических изолятов (Theron et al., 2014), а их повышенная чувствительность к кросс-контаминации ПЦР-продуктами является предметом для дискуссий (Luetkemeyer et al., 2014).

Перспективный метод мультиплексной лиганд-зависимой амплификации на микросферах (Molina-Moya et al., 2017), несмотря на возможность одновременного генотипирования и идентификации детерминант устойчивости

к широкому спектру препаратов, требует многостадийной процедуры подготовки образца (лигирование, амплификация, две последовательных очистки продуктов реакций) и сложной интерпретации результатов, что делает данный подход трудоемким и рекомендованным только для лабораторий, обладающих персоналом высокой квалификации.

Исследования генома возбудителя туберкулеза, направленные на создание диагностических тестов для анализа генетических детерминант резистентности на основе технологии гидрогелевых биочипов, проводятся в ИМБ РАН совместно с ведущими учреждениями противотуберкулезной службы РФ с начала 2000 года. В настоящей работе представлены основные результаты данных исследований, полученные непосредственно автором и под его руководством, и раскрывающие существующий уровень отечественных разработок на основе биочипов, в целом не уступающий перечисленным выше лучшим мировым достижениям в данной области.

### **1.3 Инфекции репродуктивного тракта: терапия, антибиотикорезистентность и методы анализа**

Инфекционные заболевания репродуктивного тракта являются одними из самых быстро распространяющихся и опасных инфекций. По данным ВОЗ, во всём мире ежегодно происходит около полумиллиарда случаев заболеваний, передающихся половым путём (WHO, 2014), из них 105,7 млн. вызваны хламидийной инфекцией, 78 млн. – гонореей, 10,6 млн. – сифилисом, 276,4 млн. – трихомониазом (WHO, 2013). ИРТ приводят к снижению фертильности и вредят здоровью потомства: у 40% женщин с невылеченной гонококковой и хламидийной инфекцией развиваются воспалительные заболевания органов малого таза, что в 25% случаев приводит к бесплодию. Беременности с невылеченными ранними формами сифилиса заканчивались мертворождением в 25% случаев, а в 14% — смертью новорожденного (CDC, 2015). Очевидно, что своевременное выявление ИРТ и проведение адекватной антимикробной терапии являются ключевыми факторами, определяющими как успешное

лечение, так и предотвращение распространения заболеваний.

Патологические состояния мочеполовой системы часто носят полимикробный характер, представленный не только облигатными патогенами (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Mycoplasma genitalium*), но и различными условно-патогенными микроорганизмами. Полимикробный характер изменяет клиническую картину заболевания, отягощает течение воспалительного процесса, а также снижает эффективность выявления этиологического агента, вызвавшего заболевание, что может привести к назначению неадекватной терапии (Josey and Schwebke, 2008).

Огромной проблемой во всем мире является рост лекарственной устойчивости возбудителей заболеваний, что вызывает значительные затруднения при выборе методов лечения пациентов. Опубликованный в апреле 2014 г. доклад ВОЗ «Устойчивость к противомикробным препаратам: глобальный доклад по эпиднадзору» (WHO, 2014) подчеркивает опасность роста устойчивости к антибактериальным препаратам, где наряду с туберкулезом, малярией, стафилококковой инфекцией, указана *N. gonorrhoeae*, в силу появления изолятов, резистентных к сульфонидами, пенициллинам, тетрациклинам, макролидам, фторхинолонам и цефалоспорином ранних поколений. Таким образом, для выяснения этиологии инфекционно-воспалительного процесса органов мочеполовой системы и последующей успешной терапии необходимо не только выявление в клинических образцах инфекционных агентов, включая одновременную идентификацию большого количества возбудителей, но также анализ чувствительности микроорганизмов к основным противомикробным препаратам.

### 1.3.1 Краткая характеристика наиболее распространенных микроорганизмов - возбудителей ИРТ и современные препараты для их лечения

**Сифилис.** Инфекционное заболевание, вызываемое *T. pallidum*, передаваемое половым путем и характеризующееся поражением кожи, слизистых оболочек, нервной системы, внутренних органов, опорно-двигательного аппарата. Вызывает внутриутробное инфицирование плода. Заболевание может протекать как в манифестной, так и в скрытой формах. В силу особенностей течения и многообразия клинических проявлений сифилис является актуальной проблемой современного здравоохранения, несмотря на существенные достижения в борьбе с этим заболеванием.

Для лечения сифилиса рекомендованы пенициллины, в первую очередь, бензилпенициллин G (Workowski and Bolan, 2015), тетрациклины (доксциклин), макролиды (эритромицин и азитромицин), цефалоспорины (цефтриаксон). Некоторые препараты, например, азитромицин, по данным клинических испытаний оказались более эффективными, чем пенициллин при лечении раннего сифилиса (Bai et al., 2008).

**Гонококковая инфекция.** Одна из наиболее частых ИРТ, вызываемая грамотрицательными диплококками *N. gonorrhoeae*, поражающая, в первую очередь, половые органы, а именно, цилиндрический и железистый эпителий. Для лечение гонококковой инфекции в разное время применяли ципрофлоксацин, офлоксацин, спектиномицин,  $\beta$ -лактамы антибиотики. Широкое распространение фторхинолон- и пенициллин-резистентных форм *N. gonorrhoeae* привело к сокращению применения  $\beta$ -лактамов первого и второго поколения (аминопенициллинов, защищенных пенициллинов, ранних цефалоспоринов) и, практически, отмене фторхинолонов. В настоящее время рекомендуемым режимом лечения является инъекционный цефтриаксон в монорежиме либо двойная терапия цефтриаксоном (250-500 мг) и азитромицином (1-2 г) (Workowski and Bolan, 2015).

При устойчивости возбудителя к АМП других групп или аллергии к  $\beta$ -

лактамам также рекомендовали спектиномицин из класса аминоциклитолов. В нашей стране наблюдается стойкая тенденция роста устойчивости гонококков к спектиномицину (до 15% в 2010 г.), что снижает ценность этого препарата как альтернативного средства лечения гонореи (Kubanova et al., 2010; Kubanova et al., 2014).

**Урогенитальный трихомониаз.** Инфекционное, высококонтагиозное воспалительное заболевание, возбудителем которого является простейший одноклеточный паразит *T. vaginalis*. Трихомониаз является наиболее частым невирусным возбудителем, передаваемым половым путем в комплексе с другими патогенами, такими как микоплазмы, гонококки, уреаплазмы и хламидии, вызывая вагиниты, цервициты и уретриты, повышая риски передачи ВИЧ и ранних выкидышей у беременных (Kissinger, 2015).

Для лечения урогенитального трихомониаза применяют препараты группы нитроимидазолов (метронидазол, тинидазол, орнидазол). Метронидазол остается наиболее часто используемым АМП, вызывая ряд побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта, центральной и периферической нервной систем. Доля устойчивости возбудителя к метронидазолу составляет 2-5%, однако альтернативных режимов терапии в настоящее время не разработано. Данные клинического применения нитроимидазолов в США показывают, что в случае неудачного применения метронидазола в терапии вагинитов его замена на тинидазол может оказаться эффективной в силу преодоления устойчивости низкого уровня к метронидазолу (Kissinger, 2015).

**Хламидийная инфекция.** Возбудитель – грамотрицательная внутриклеточная бактерия *Chlamydia trachomatis*, насчитывающая 15 серотипов, из которых А, В, Ва, С вызывают трахому; D-K – урогенитальный хламидиоз, уретриты, простатиты, вагиниты, цервициты; L1, L2, L3 – венерическую лимфогранулему и генитальные язвы (Workowski and Bolan, 2015). Социально-экономическое значение урогенитальной хламидийной инфекции объясняется не только высокими показателями заболеваемости, но и значительным процентом осложнений, в частности, развитием вторичного



бесплодия у женщин и мужчин (Vasilevsky et al., 2014).

Препаратами выбора для лечения хламидийной инфекции являются тетрациклины (доксциклин) и макролиды (джозамицин, азитромицин), в качестве альтернативы могут быть использованы фторхинолоны (левофлоксацин, офлоксацин) (Workowski and Bolan, 2015). Несмотря на доступность широкого спектра АМП в отношении хламидий их терапия далеко не всегда приводит к успеху как в силу наличия коинфекции – урогенитального уреоплазмоза, вызываемого *U. urealyticum*, так и собственной гетеротипической резистентности - фенотипической толерантности небольшой доли популяции *S. trachomatis* к широкому кругу антибиотиков (Shkarupeta et al., 2007)

**Микоплазмоз и уреоплазмоз.** Заболевания, вызываемые условно-патогенными микроорганизмами рода *Mycoplasma* (*Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*) и *Ureaplasma* (*U. parvum* and *U. urealyticum*). Микоплазмы и уреоплазмы выявляются у ~40% пациентов с воспалительными заболеваниями органов репродукции. Наибольшей клинической значимостью обладают *M. genitalium*, *U. urealyticum* и *M. hominis*. Микоплазмы и уреоплазмы способны вызывать уретрит у лиц обоего пола и, вероятно, цервицит, цистит, а также затруднения течения беременности, послеродовые и послеабортные осложнения у женщин. Препаратами выбора для лечения этой инфекции являются макролиды (джозамицин, азитромицин) и тетрациклины (доксциклин), в качестве альтернативы применяют фторхинолоны (левофлоксацин, офлоксацин) (Workowski and Bolan, 2015).

**Бактериальный вагиноз (БВ)** является инфекционным невоспалительным процессом полимикробного происхождения, преимущественно возникающим у женщин репродуктивного возраста. Болезнь не является опасной для жизни, но существенно повышает риск осложнений при беременности и воспалительных заболеваний таза. Более того, БВ связан с повышенным риском заражения инфекциями, передаваемыми половым путем (Martin, 2012). БВ возникает в результате резкого дисбаланса в нормальной вагинальной микрофлоре, когда защитная популяция лактобацилл замещается

большим количеством анаэробов (Margolis and Fredricks, 2015). К наиболее часто встречающимся при БВ микроорганизмам относят *G. vaginalis*, облигатные анаэробные грамположительные бактерии (*Mobiluncus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*), факультативные анаэробные бактерии *Atopobium vaginae*, облигатные грамотрицательные бактерии *Prevotella spp.*, *Bacteroides spp.* и *Fusobacterium spp.* (Menard, 2011). Список микроорганизмов, ассоциированных с БВ, постоянно расширяется, в частности, в клинических образцах выявлены *Dialister spp.*, *Prevotella spp.* и *Megasphaera spp.* (Margolis and Fredricks, 2015).

Бактерии *G. vaginalis* присутствуют в небольших количествах в нормальной микрофлоре влагалища, не вызывая симптомов бактериального вагиноза. Однако замещение лактобактерий на *G. vaginalis* создаёт благоприятные условия для роста анаэробов, а частое обнаружение генитальных микоплазм вместе с анаэробной микрофлорой связано со способностью *G. vaginalis* выделять янтарную кислоту, которая метаболизируется другими микроорганизмами. В свою очередь, уреоплазма и микоплазма, активно поглощающие кислород, стимулируют пролиферацию анаэробных бактерий (Africa et al., 2014). К антибактериальным средствам, активным в отношении *G. vaginalis*, относят метронидазол и клиндамицин.

Встречаемость *A. vaginae* при бактериальном вагинозе варьирует от 50% до 95%. *A. vaginae* может присутствовать совместно с *G. vaginalis* в составе слоя микроорганизмов, прикрепленных к слизистой оболочке влагалища (Verhelst et al., 2004). Доминантный рост *A. vaginae* также подавляется метронидазолом и клиндамицином.

*Mobiluncus* – подвижный анаэробный микроорганизм, принадлежащий семейству *Actinomycetaceae*. В мочеполовых органах человека встречается два представителя рода *Mobiluncus*: *M. curtisii* и *M. mulieris*. Полагают, что патогенность *M. curtisii* значительно выше, чем *M. mulieris*. Бактерии чувствительны к клиндамицину, хлорамфениколу, рифампицину, а также к β-лактамным антибиотикам и устойчивы, главным образом, к метронидазолу

(Spiegel, 1987). В последнее время для лечения инфекций, вызванных видами *Mobiluncus*, применяют, в основном, клиндамицин (Verstraelen and Verhelst, 2009).

*B. fragilis* - грамотрицательные анаэробные бактерии, являющиеся компонентом нормальной микрофлоры влагалища и вульвы. *B. fragilis* могут быть причиной пиелонефрита, цистита, уретрита, простатита и других ИРТ женщин и мужчин. Основным препаратом для лечения инфекций, вызванных *B. fragilis*, является метронидазол (Löfmark et al., 2010). Также применяются  $\beta$ -лактамы антибиотики в комбинации с ингибиторами  $\beta$ -лактамаз, клиндамицином и хлорамфениколом.

Принимая во внимание ведущую роль облигатных анаэробных бактерий лекарственную терапию БВ проводят препаратами с антианаэробной активностью, например, клиндамицином и производными 5-нитроимидазола. Залогом эффективной терапии возбудителей БВ должен служить дифференциальный диагноз в отношении других ИРТ, вызванных патогенными микроорганизмами *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis* и *M. genitalium* (Workowski and Bolan, 2015).

### **1.3.2 Лекарственная устойчивость возбудителей ИРТ**

#### **1.3.2.1 *T. pallidum***

Несмотря на достигнутый прогресс в диагностике и лечении сифилиса болезнь остается эндемичной для многих стран. Масштабные эпидемии сифилиса были зарегистрированы в России в 1990-х годах (Stamm, 2010) и позднее в Китае (Tucker and Cohen, 2011). Повышение заболеваемости сифилисом отмечено у женщин и детей в США (CDC, 2015)

Хотя пенициллины применяют для лечения сифилиса с 70-х годов прошлого века, форм возбудителя, устойчивых к данному классу препаратов, до настоящего момента обнаружено не было, как и не зарегистрировано клинически доказанных случаев неудач лечения больных препаратами пенициллинового ряда. Вместе с тем, возможность формирования

приобретенной устойчивости к пенициллинам у *T. pallidum* остается предметом для дискуссий (Stamm, 2010). Недавний анализ резистентности российских изолятов *T. pallidum* показал полную чувствительность к  $\beta$ -лактамам, в частности, отсутствовали значимые мутаций в генах *tp47* и *tromp*, кодирующих мишени действия данный АМП (Кубанова и др., 2013).

Изоляты *T. pallidum*, резистентные к тетрациклинам, к настоящему моменту описаны не были. Выявлены клинические случаи возникновения устойчивости возбудителя к макролидам, в частности, к эритромицину, азитромицину и кларитромицину (Stamm, 2010). Описан случай неудачной терапии клиндамицином, однако эти данные не подтвердились и, по-видимому, *T. pallidum* обладает природной устойчивостью к данному препарату.

Первый штамм, резистентный к эритромицину и азитромицину, был изолирован в 1977 г. (*T. pallidum* Street strain 14, (Stamm, 2012)). Секвенирование генома показало отсутствие у возбудителя генетических элементов, ответственных за горизонтальный перенос генов (плазмид и транспозонов). Таким образом, устойчивость к макролидам в *T. pallidum* Street strain 14 была сформирована эндогенно спонтанными хромосомными мутациями A2058G и A2059G в гене 23S рРНК. Мутация A2058G регистрируется повсеместно (Stamm, 2012), в том числе, в российской популяции патогена (Khairullin et al., 2016); замена A2059G встречается реже, но также не является географически изолированной. Сообщается о штаммах *T. pallidum*, которые имели мутацию A2059G, изолированных в Чехии (Matějková et al., 2009), Великобритании и Колумбии (Cruz et al., 2013). Следует отметить, что общая доля штаммов *T. pallidum*, устойчивых к макролидам, растёт, что делает мониторинг резистентности возбудителя сифилиса к данному классу АМП актуальной задачей (Stamm, 2015).

### 1.3.2.2 *N. gonorrhoeae*

Возбудитель гонококковой инфекции характеризуется необычайной способностью быстро накапливать мутации и приобретать резистентность к используемым АМП в течение десяти-двадцати лет, включая множественную лекарственную устойчивость (Dona et al., 2017). В настоящее время описаны изоляты *N. gonorrhoeae*, которые устойчивы ко всем основным лекарственным средствам, применяемым для лечения гонореи, включая  $\beta$ -лактамы, фторхинолоны, макролиды, тетрациклины, спектиномицин, цефалоспорины и азитромицин (Unemo et al., 2016). Учитывая масштабы распространения резистентных форм гонококковой инфекции, некоторые случаи гонореи могут стать неизлечимыми к 2021 году, поскольку темп нарастания устойчивости *N. gonorrhoeae* явно превышает скорость разработки вакцин или новых препаратов (Unemo, 2015). Таким образом, крайне важно разработать быстрые методы генетического анализа для мониторинга моделей резистентности патогена во всем мире и применения этих данных для лечения пациентов (Low and Unemo, 2016; Dona et al., 2017).

Как и возбудитель туберкулеза, гонококки используют большинство известных механизмов для формирования резистентности: инактивация препарата, изменения сайта связывания, уменьшение проницаемости мембраны и задействование эффлюксных насосов (Рис.10, Таблица 5). Однако в отличие от ТБ, *N. gonorrhoeae* приобретает новые резистентные свойства не только посредством хромосомных мутаций, но и активно использует другие генетические средства, например, плазмиды *TEM-1*, *TEM-135*, обеспечивающие устойчивость к пенициллинам, *TetM*-кодирующие плазмиды для резистентности к тетрациклинам, а также горизонтальный перенос генов от других видов, главным образом от микроорганизмов рода *Neisseria*. Особенно эффективно возбудитель гонореи задействует мутации, влияющие на изменение проницаемости мембран и увеличивающие активность эффлюксных помп, поскольку эти механизмы обладают свойством формировать резистентность одновременно ко многим АМП.

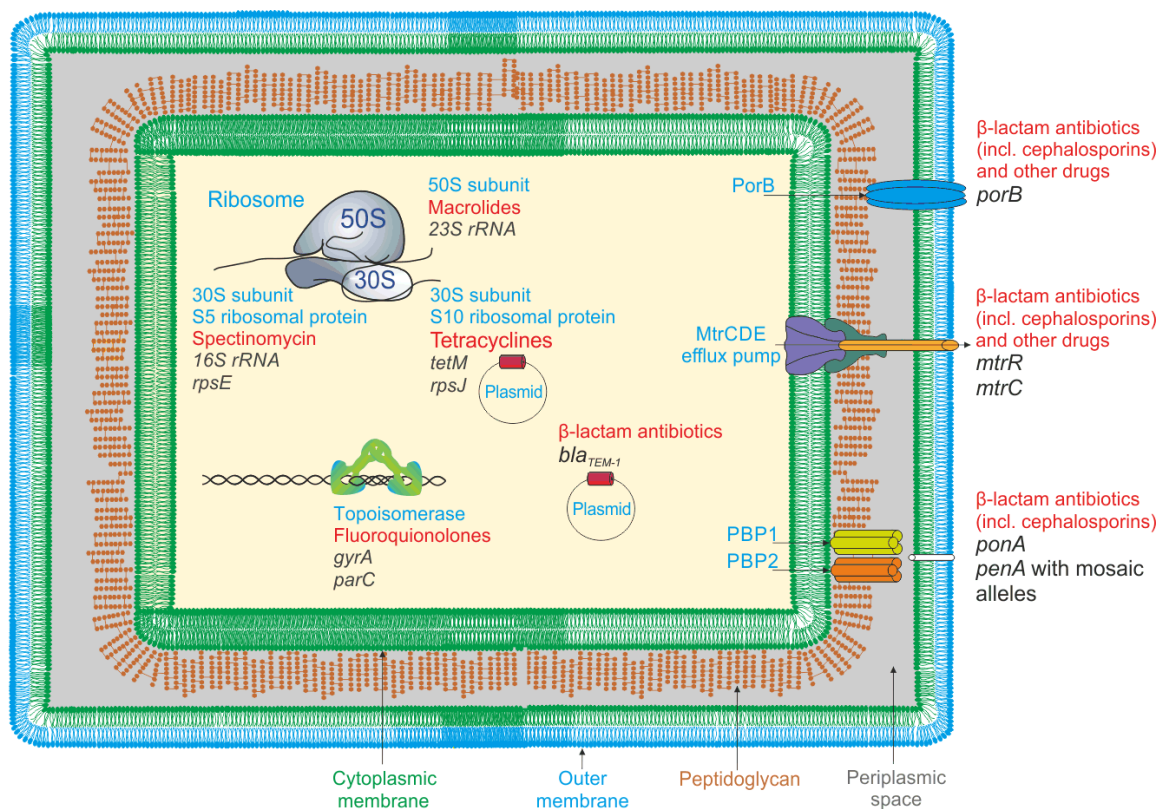


Рис. 10. Схематичное изображение детерминант резистентности *N. gonorrhoeae* к используемым в настоящее время АМП (Shaskolskiy et al., 2016).

Таблица 5. Перечень основных детерминант резистентности *N. gonorrhoeae* к ранее использованным и актуальным АМП.

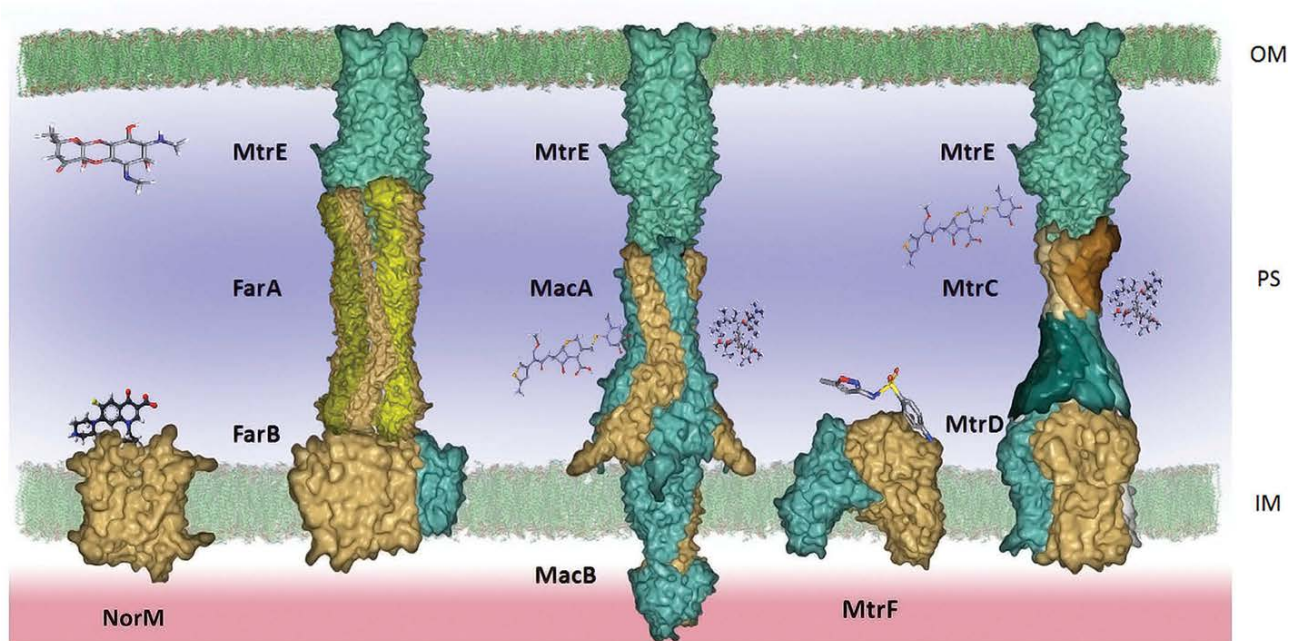
Препарат	Генетическая детерминанта
Сульфаниламиды	<ul style="list-style-type: none"> <li>Разбавление антибиотика посредством избытка синтеза р-аминобензойной кислоты</li> <li>мутации в гене <i>folP</i>: однонуклеотидный полиморфизм или мозаичный ген <i>folP</i></li> </ul>
Пенициллины	<ul style="list-style-type: none"> <li>мутации в гене <i>penA</i>: инсерция D345 в PBP2 с одновременным изменением 4-8 аминокислот в карбоксильном концевом регионе PBP2 либо мозаичные аллели <i>penA</i>, кодирующие до 70 измененных аминокислот в PBP2, включая последовательности из негонококковых видов <i>Neisseria</i>.</li> <li>мутации в гене <i>mtrR</i>: в промоторной области, например делеция аденина в 13-нуклеотидном инвертированном повторе, либо в кодирующей области (типично G45D).</li> <li>мутации в гене <i>porB1b</i> (<i>penB</i>): замены аминокислот G120K и A121D в PorB1b.</li> <li>мутация в гене <i>pilQ</i>: E666K, найдена только в штаммах, селективированных <i>in vitro</i></li> <li>мутация в гене <i>penA</i>: замена L421P.</li> <li>Пенициллиназа: плазмиды TEM-1 или TEM-135, кодирующие фермент.</li> </ul>

<b>Тетрациклины</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• мутации в гене <i>rpsJ</i>: типичная замена V57M</li> <li>• мутации в гене <i>mtrR</i>, как описано выше.</li> <li>• мутации в гене <i>porB1b (penB)</i>, как описано выше.</li> <li>• мутации в гене <i>pilQ</i>, как описано выше.</li> <li>• <i>tetM</i>: ген плазмидной локализации</li> </ul>
<b>Спектиномицин</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• мутация в гене <b>16S rRNA</b>: замена c1192t</li> <li>• мутации в гене <i>rpsE</i>: T24P, K26E, делеция V25</li> </ul>
<b>Фторхинолоны</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• мутации в гене <i>gyrA</i>: типично S91F, D95N и D95G</li> <li>• мутации в гене <i>parC</i>: типично D86N, S88P и E91K</li> </ul>
<b>Макролиды</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• мутации в гене <b>23S rRNA</b>: замены C2611T и A2059G, ассоциированные с устойчивостью низкого и высокого уровня, соответственно.</li> <li>• мутации в гене <i>mtrR</i>, как описано выше.</li> </ul>
<b>Цефалоспорины III поколения</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>мозаичные аллели гена <i>penA</i></b>: кодирующие до 70 измененных аминокислот в PBP2, включая последовательности из негонококковых видов <i>Neisseria</i>. Аминокислотные замены, ассоциированные с резистентностью: A311V, I312M, V316T, V316P, T483S, A501P, A501V, N512Y и G545S.</li> <li>• мутации в гене <i>penA</i>: замены A501V и A501T alterations в немозаичных аллелях</li> <li>• мутации в гене <i>mtrR</i>, как описано выше.</li> <li>• мутации в гене <i>porB1b (penB)</i>, как описано выше.</li> </ul>

Из всего разнообразия генетических детерминант резистентности *N. gonorrhoeae* следует отметить формирующие устойчивость одновременно к нескольким АМП. Таковая возникает, во-первых, в результате модификаций порина PorB, переносящего антибиотика через наружную мембрану. Анализ резистентных к пенициллину и тетрациклину изолятов выявил замены G120D, A121D и G121K в PorB. Дальнейшие исследования показали, что эти мутации в порине приводят к замедлению диффузии антибиотиков в клетку (Olesky et al., 2006). Мутации в генах, кодирующих порины, были обнаружены в резистентных к тетрациклину изолятах в России (Iina et al., 2008), Швейцарии (Endimiani et al., 2014) и Канаде (Thakur et al., 2014). Примечательно, что описанные в гене *porB* замены не повышают резистентность *N. gonorrhoeae* к β-лактамам если они не сочетаны с мутациями в гене *mtrR* (транскрипционный репрессор оперона *mtrCDE*). Таким образом, совместное действие

эффлюксного насоса MtrC-MtrD-MtrE и порина PorB1b снижает концентрацию  $\beta$ -лактамных препаратов и тетрациклина в периплазме микроорганизма и повышает уровень устойчивости к данным препаратам (Olesky et al., 2006).

Для *N. gonorrhoeae* описано пять эффлюксных систем MtrCDE, MacAB, NorM, MtrF, and FarAB, принадлежащих суперсемействам RND, ABC, MATE и MFS (Рис.11) (Shafer et al., 2016). Эффлюкс-насос MtrCDE ответственен за транспорт препаратов  $\beta$ -лактамного ряда, макролидов, рифампицина, а также детергентов, жирных кислот, стероидных гормонов и катионных пептидов (Veal et al., 2002), в то время как NorM и MacAB обеспечивают преимущественный вывод фторхинолонов и макролидов, соответственно (Rouquette-Loughlin et al., 2003; Rouquette-Loughlin et al., 2005).



**Рис. 11.** Мембранная организация эффлюксных систем MtrCDE, MacAB, NorM, MtrF, и FarAB в *N. gonorrhoeae*, обеспечивающих резистентность к АМП. Обозначения: OM – внешняя мембрана, PS – периплазматическое пространство, IM – внутренняя мембрана (Dona et al., 2017)

Инактивация MtrCDE в клинических МЛУ-изолятах вызывала значительное снижение уровня устойчивости к азитромицину, пенициллину и тетрациклину (Golparian et al., 2014). Мутации в гене *mtrR* приводят к увеличению экспрессии насоса MtrC-MtrD-MtrE, повышая уровень резистентности к пенициллину. Такие мутации расположены как в кодирующей части, приводя к аминокислотным заменам A39T, R44H, G45D и L47P, так и в



промоторном регионе, например, инсерции тимина в позиции -10 или делеция аденина в позиции -35 (-35delA). Наиболее частыми заменами в данных локусах являются -35delA и G45D (Таблица 5). Обе они приводят к резкому увеличению устойчивости к фторхинолонам (Zarantonelli et al., 1999).

Наличие замены в промоторной области оперона *macAB*, кодирующего соответствующую эффлюксную систему, приводит к увеличению его транскрипции, повышая устойчивость к макролидам (Rouquette-Loughlin et al., 2005). Инактивация Na/катионного антипортера NorM понижает МИК *N. gonorrhoeae* к тетрациклину в восемь раз (Golparian et al., 2014). Показано, что мутация в промоторной области гена *norM* снижает чувствительность к ципрофлоксацину и норфлоксацину (Rouquette-Loughlin et al., 2003). Кроме того, в геноме *N. gonorrhoeae* был идентифицирован ген *mef*, кодирующий белок системы эффлюкса, обеспечивающий вывод макролидов из клетки, тем самым сверхэкспрессия *mef* повышает устойчивость к макролидам (Luna et al., 2000). Доказано, что в клетке гонококка существует синергия между изменением проницаемости мембраны и активностью эффлюксных насосов. Например, одновременные мутации в порине и эффлюксной системе суперсемейства RND приводят к значительному повышению уровня резистентности патогена к пенициллинам и цефтриаксону (Shafer and Folster, 2006).

В существующих масштабах распространения резистентных форм *N. gonorrhoeae* необходимым является идентификация максимально широкого спектра генетических маркеров устойчивости с целью обнаружения МЛУ-изолятов. Так, у изолята, выделенного в ЮАР, и характеризующегося резистентностью к цефиксиму, ципрофлоксацину, пенициллину, тетрациклину, промежуточной устойчивостью к азитромицину, чувствительностью к цефтриаксону, аминогликозидам и спектиномицину, был обнаружен следующий спектр детерминант: мутация в промоторной области гена *mtrR* (-35delA); мутации в гене *porB1b* (*penB*), приводящие к заменам G101K и A102N; мутация в гене *ponA1* L421P; а также мозаичный аллель гена *penA*, тип XXXIV.

### 1.3.2.3 *C. trachomatis*

Сведения о клинической значимости резистентности *C. trachomatis* к АМП немногочисленны и весьма противоречивы (Kohlhoff and Hammerschlag, 2015). Описаны клинические случаи неудачной терапии хламидийной инфекции макролидами и доксициклином, макролидами и фторхинолонами (Shkarupeta et al., 2007; Sandoz and Rockey, 2010). Несмотря на установленные молекулярные детерминанты резистентности к данным АМП, функциональные связи между присутствием таких маркеров у конкретных изолятов и эффективностью антибактериальной терапии для хламидий не выявлены. Так, в клинических изолятах *C. trachomatis*, полученных от пациентов после неэффективного лечения урогенитального хламидиоза фторхинолонами и азитромицином, последовательности генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* (маркеры устойчивости к FQ) относили к дикому типу по результатам секвенирования, не было найдено мутаций и в V-домене 23S рРНК, ассоциированных с устойчивостью к макролидам (Shkarupeta et al., 2007). Для хламидий типично приобретать так называемую гетеротипическую резистентность, при которой небольшая часть популяции находится в персистирующем состоянии, метаболически неактивна и нечувствительна к действию АМП. Штаммы, выделенные у пациентов после неудач лечения, демонстрировали абсолютную чувствительность к тем же препаратам *in vitro*, однако менее 1% клеток выживали в присутствии высоких концентраций антибиотиков (Shkarupeta et al., 2007).

### 1.3.2.4 *Mycoplasma* и *Ureaplasma spp.*

Отсутствие клеточной стенки у микроорганизмов родов *Mycoplasma* и *Ureaplasma* делает их природно нечувствительными ко всем типам  $\beta$ -лактамных антибиотиков. Сульфаниламид в физиологических концентрациях также не влияет на эти бактерии из-за отсутствия метаболического пути по синтезу фолиевой кислоты. Высокие уровни резистентности к эритромицину и тетрациклину были описаны у клинических изолятов *U. parvum* и *M. hominis*. Были выделены изоляты, устойчивые к макролидам, а также описаны случаи

неудачного лечения уреаплазмоза моксифлоксацином (Redelinghuys et al., 2014). В Японии у мужчин с негонококковым уретритом зафиксирован рост устойчивых к фторхинолонам штаммов *M. genitalium*, в которых обнаружены мутации, ассоциированные с резистентностью к макролидам и фторхинолонам (Kikuchi et al., 2014).

Устойчивость микоплазм и уреаплазм к АМП опосредована мутациями в гене 23S рРНК (макролиды); в генах *gyrA*, *gyrB*, *parC* или *parE* (фторхинолоны) (Таблица 6). Гены, кодирующие белки системы эффлюкса, а также ген *erm*, также ассоциированные с устойчивостью *Ureaplasma spp.* к макролидам, были описаны только в одной работе (Lu et al., 2010) и не подтверждены другими исследованиями.

**Таблица 6.** Молекулярные детерминанты резистентности и фенотипическая чувствительность микоплазм и уреаплазм.

Препарат	Генетически детерминанты резистентности	Диапазон МИК для резистентных изолятов (мг/л)
<b><i>M. genitalium</i></b>		
Макролиды, линкозамиды, стрептограминны, кетолиды	Мутации в гене 23S рРНК в позициях 2058 и 2059*	16-64 для эритромицина
	Мутации в рибосомном белке L4	
Тетрациклины	В изолятах, выделенных после неудачного лечения, детерминанты обнаружены не были	Нет данных
Фторхинолоны	Мутации в генах <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> или <i>parE</i>	Нет данных
<b><i>M. hominis</i></b>		
Макролиды, линкозамиды, стрептограминны, кетолиды	Мутации в гене 23S рРНК в позициях 2610, 2611, 2057, 2059 и 2062*	16-64 для клиндамицина
Тетрациклины	<i>tet(M)</i>	8-64 для тетрациклина
Фторхинолоны	Мутации в генах <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> или <i>parE</i>	2-32 для левофлоксацина
		4-8 для ципрофлоксацина
<b><i>U. urealyticum</i>, <i>U. parvum</i></b>		
Макролиды, линкозамиды, стрептограминны, кетолиды	Делеции и инсерции в рибосомном белке L4	64-128 для эритромицина
	Мутации в гене 23S рРНК в позициях 2056, 2057 and 2058	
	Ribosomal methylation mediated by the <i>ermB</i> gene	
	<i>mrsA/mrsB/mrsD</i> efflux pumps	
Тетрациклины	<i>tet(M)</i>	2-32 для тетрациклина

Фторхинолоны	Мутации в генах <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> или <i>parE</i>	2-16 для левофлоксацина
--------------	---	-------------------------

\* приведена нумерация относительно генома *E. coli*

Чувствительность *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* к тетрациклинам была исследована в южноафриканских штаммах (Redelinghuys et al., 2014). Высокий уровень фенотипической резистентности к тетрациклинам обусловлен наличием белка TetM, обеспечивающего защиту рибосомы от действия антибиотика. В настоящее время данный механизм приобретенной резистентности к тетрациклинам является единственным найденным в клинических изолятах микоплазм человека (Dégrange et al., 2008). В изолятах *M. genitalium*, выделенных в случаях неудачного лечения тетрациклином, генетических маркеров резистентности обнаружить не удалось (Waites and Xiao, 2015).

### **1.3.2.5 Лекарственная устойчивость возбудителей бактериального вагиноза**

**1.3.2.5.1** Терапия *G. vaginalis* осуществляется с использованием клиндамицина и метронидазола, однако устойчивость некоторых клинических изолятов была обнаружена только к последнему (Tomusiak A. et al., 2011). Механизмы формирования резистентности к данному препарату включают (Löfmark et al., 2010):

- уменьшение скорости активации препарата в клетке;
- повышение активности систем репарации ДНК;
- повышенную активность ферментов антиоксидантной защиты (каталаза, пероксидазы и супероксиддисмутаза);
- ускоренный вывод препарата из клетки за счет работы эффлюксных систем.

Наиболее хорошо описанным механизмом устойчивости к метронидазолу является инактивация или делеция генов семейства *nit*, регулирующих активность нитроредуктазы (Dhand and Snyderman, 2009). Вместе с тем, корреляция между наличием генов и резистентностью отдельных изолятов к метронидазолу не является строгой. Полногеномное секвенирование изолятов

*G. vaginalis* выявило гетерогенную популяцию, насчитывающую четыре монофилетических линии, из которых только две (1-я и 3-я) ассоциированы с клиническими проявлениями бактериального вагиноза. Чувствительность к метронидазолу, как оказалось, также варьировала между различными линиями. Изоляты 3-й и 4-й линий демонстрировали 100% резистентность к данному АМП, в то время как доля устойчивых штаммов в 1-й и 2-й линии составила 35% и 7,1%, соответственно (Harwich et al., 2010).

#### 1.3.2.5.2 *B. fragilis*

Микроорганизмы группы *Bacteroides* обладают разнообразными системами защиты от действия антибиотиков. Повышение доли изолятов *B. fragilis*, устойчивых к различным АМП, зарегистрировано в странах ЕС и США (Eitel et al., 2013). Штаммы, обладающие одновременной резистентностью к имипенемам, амоксициллину, метронидазолу и клиндамицину, обнаружены и в России (Shilnikova, 2015). *B. fragilis* активно использует системы горизонтального переноса генов антибиотикорезистентности, локализованных в конъюгативных или мобилизуемых плазмидах, транспозоны и другие мобильные генетические элементы (Eitel et al., 2013).

Наиболее эффективный механизм резистентности *B. fragilis* к  $\beta$ -лактамным препаратам основан на продукции  $\beta$ -лактамаз (Edwards, 1997). Ген *serA* кодирует  $\beta$ -лактамазу, способную гидролизовать пенициллины и большинство цефалоспоринов, за исключением цефокситина. В свою очередь, устойчивость к последнему объясняют присутствием гена *cfxA*, расположенного в транспозоне MTn4555. Уровень устойчивости к карбапенемам зависит от дифференциальной экспрессии гена *cfiA* хромосомной локализации.

Несмотря на описанные метронидазол-резистентные изоляты *B. fragilis* этот препарат остается приоритетным при лечении инфекций, вызываемых данной группой микроорганизмов (Brook, 2009). Устойчивость к нему опосредована генами *nimA-nimG* хромосомной или плазмидной локализации.

Резистентность *B. fragilis* к тетрациклину связана с наличием гена *tetQ*, продукт которого вовлечен в механизм защиты рибосомы, а также генов *tetX* и *tetX1*, кодирующих ФАД-зависимые дегидрогеназы, способные расщеплять тетрациклин.

Устойчивость *B. fragilis* к клиндамицину опосредована двумя механизмами. Во-первых, в формирование резистентности вовлечен кластер генов *erm* (*ermB*, *ermF* и *ermG*), кодирующих разнообразные N<sup>6</sup>-метилтрансферазы, модифицирующие 23S рНК. Ген *ermF* обнаружен в транспозонах плазмидной локализации Tn4351 (pBF4), Tn4400 (pBFTM10) и Tn4551 (pB1136). Вторым механизмом резистентности связан с эффлюксными системами, кодируемыми генами *msrSA* и *mefA*. Показано, что триада генов *ermG-mefA-msrSA* *B. fragilis* обеспечивает высокий уровень устойчивости к клиндамицину (Eitel et al., 2013).

#### 1.3.2.5.3 *A. vaginae* и *M. mulieris*

Согласно результатам отдельных исследований *in vitro* *A. vaginae* может проявлять высокий уровень устойчивости к метронидазолу (Geißdörfer et al., 2003), что было подтверждено на клинических изолятах, чувствительных к клиндамицину и устойчивых к метронидазолу (De Backer et al., 2006), при этом МИК к последнему находился в диапазоне от 2 до 256 мг/л. Авторы заключили, что устойчивость к метронидазолу не является природным свойством *A. vaginae*, одновременно подчеркивая необходимость дальнейших исследований активности кластера генов *nim*, продукт которых – редуктаза - ответственна за конверсию нитроимидазолов в нетоксичное производное (Löfmark et al., 2010).

Доля резистентных к метронидазолу изолятов *M. mulieris* варьирует от 50 до 81% при высоком значении МИК, составляющем 128 мг/л (Spiegel, 1987; Bahar et al., 2005).

Таким образом, механизмы формирования устойчивости микроорганизмов к АМП являются естественным следствием эволюционного процесса под давлением лекарственной терапии. Сегодня устойчивость

возбудителей ИРТ наблюдается не только к природным АМП, таким как  $\beta$ -лактамы антибиотики, но и к полностью синтетическим препаратам - фторхинолонам. В продолжающейся войне между болезнью и человеком детальное представление о механизмах действия антибиотиков и возникновении резистентности поможет модифицировать существующие и разработать новые, действующие на иные мишени, лекарственные средства, а рациональная терапия, опирающаяся на данные мониторинга детерминант устойчивости, позволит дольше и эффективнее применять уже используемые препараты, уменьшая число полирезистентных штаммов возбудителей.

### **1.3.3 Методы анализа лекарственной устойчивости возбудителей ИРТ**

Как уже отмечалось выше, при разработке молекулярных методов анализа лекарственной чувствительности возбудителей ИРТ следует принимать во внимание как полимикробный характер инфекции, так и чрезвычайное многообразие генетических детерминант резистентности.

Фенотипические методы анализа, основанные на культивировании микроорганизмов на плотных и жидких средах, обладают несомненными достоинствами, такими как высокая чувствительность и специфичность при анализе лекарственной чувствительности, возможность количественного установления уровня устойчивости к АМП, способность фенотипической характеристики микроорганизма с неизвестными детерминантами резистентности. Вместе с тем, низкая, в сравнении с молекулярными методами, чувствительность идентификации возбудителя, особенно при анализе экстрагенитальных образцов, сложность и трудоемкость культивирования ряда микроорганизмов (*M. genitalium*, *Mobiluncus*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* и др.), обусловленная требовательностью к питательным средам и длительностью роста (до 5 месяцев), а для *T. pallidum* - и невозможность выращивания *in vitro*, являются лимитирующими факторами в применении таких подходов.

Разработанные в России и за рубежом молекулярные методы идентификации возбудителей ИРТ, включая облигатных патогенов,

передающихся половым путем, и возбудителей БВ, основанные на ПЦР, обладают превосходными диагностическими характеристиками, включая чрезвычайно высокую аналитическую чувствительность, достаточную для анализа неинвазивного клинического материала, например, мочи, скоростью проведения теста (несколько часов) и возможностью одновременной количественной идентификации нескольких возбудителей с одновременным контролем уровня *Lactobacillus* (<http://dna-technology.ru/information/for-doctors/diagnosticsipp/>). Наряду с этим, анализ детерминант устойчивости, в силу своей многофакторности, для ПЦР-тестов остается серьезным вызовом.

Достигнут значительный прогресс в разработке методов анализа генетических детерминант отдельных возбудителей ИРТ, включая *N. gonorrhoeae* (Dona et al., 2017) и *M. genitalium* (Couldwell and Lewis, 2015) (Unemo and Jensen, 2017). Как и в случае с ТБ, клиническая значимость выявляемых генетических детерминант резистентности должна быть доказана фенотипическими и молекулярно-генетическими методами, а также подтверждена клиническими наблюдениями динамики лечения пациентов с изолятами установленного генотипа.

Так, применительно к гонококковой инфекции, в странах с умеренным уровнем устойчивости к фторхинолонам, исключая показатели Юго-Восточной Азии с резистентностью к FQ 90-100%, идентификация детерминант устойчивости к ципрофлоксацину будет весьма полезной, в силу возможности назначения/отмены данного препарата в первую линию терапии при наличии в резерве двойной схемы лечения цефтриаксоном и азитромицином. Идентификация замены S91F в гене *gyrA* свидетельствует о FQ-резистентном фенотипе, что было подтверждено в ряде клинических и эпидемиологических исследований (Buckley et al., 2016; Pond et al., 2016; Trembizki et al., 2016). Такой анализ уже внедрен в диагностическую практику CLSI в США, что привело к значительному сокращению применения цефтриаксона в качестве первой линии терапии с сопутствующим назначением ципрофлоксацина как



таргетного препарата (Allan-Blitz et al., 2017).

Для идентификации мутаций C2611T и A2059G в гене 23S рРНК, ассоциированных, соответственно, с умеренной (МИК > 2 мг/л) и высокой (МИК ≥ 256 мг/л) резистентностью к азитромицину, к настоящему моменту разработан только один ПЦР-тест (Trembizki et al., 2015). Однако устойчивость низкого уровня *in vitro* и в клинических изолятах может быть опосредована другими механизмами, например, мутациями в промоторной или кодирующей области гена *mtrR* (Таблица 5). Разработанный метод может предоставить клинически релевантные данные для дополнения и улучшения мониторинга резистентности *N. gonorrhoeae* к азитромицину. Однако, поскольку распространенность целевых мутаций в гене 23S рРНК в анализируемой выборке штаммов была очень низкой, для надлежащей оценки чувствительности метода и клинической значимости выявляемых детерминант необходимо дальнейшее тестирование изолятов и клинических образцов *N. gonorrhoeae*, содержащих эти мутации.

Появление в 1990-х г. изолятов с мозаичными аллелями гена *penA*, характеризующими пониженную чувствительность и резистентность к цефалоспорином III поколения, привело к разработке нескольких методов анализа таких молекулярных детерминант. Однако ни один из них не охватывал все разнообразие мозаичных аллелей, эндемичных для географических регионов и ассоциированных с разными значениями МИК по цефалоспорином. В свою очередь, другие детерминанты резистентности, такие как немозаичные аллели *penA* с аминокислотными заменами в РВР2, мутации в генах *penB* и *mtrR* вносят свой вклад в повышение МИК к цефалоспорином (Whiley et al., 2007; Unemo and Shafer, 2014).

Таким образом, только для анализа лекарственной чувствительности *N. gonorrhoeae* требуется разработка метода, охватывающего немалый спектр детерминант резистентности. Потребность же создания комплексного подхода для одновременной идентификации ряда наиболее распространенных возбудителей ИРТ, а также молекулярных детерминант их устойчивости к

широкому спектру актуальных АМП, включая антибиотики пенициллинового ряда, цефалоспорины, тетрациклины, фторхинолоны, макролиды, метронидазол, спектиномицин, следует оценить как чрезвычайно высокую. Существующие ограничения в использовании таргетных и полногеномных технологий NGS, описанные в разделе «1.2.2 Методы анализа лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза», сегодня применимы и к анализу геномов возбудителей ИРТ. В этой связи реализация технологии олигонуклеотидных микрочипов низкой плотности для решения поставленных задач в среднесрочной перспективе выглядит вполне многообещающей.

#### **1.4 Вирус гепатита С: методы анализа и актуальные режимы терапии**

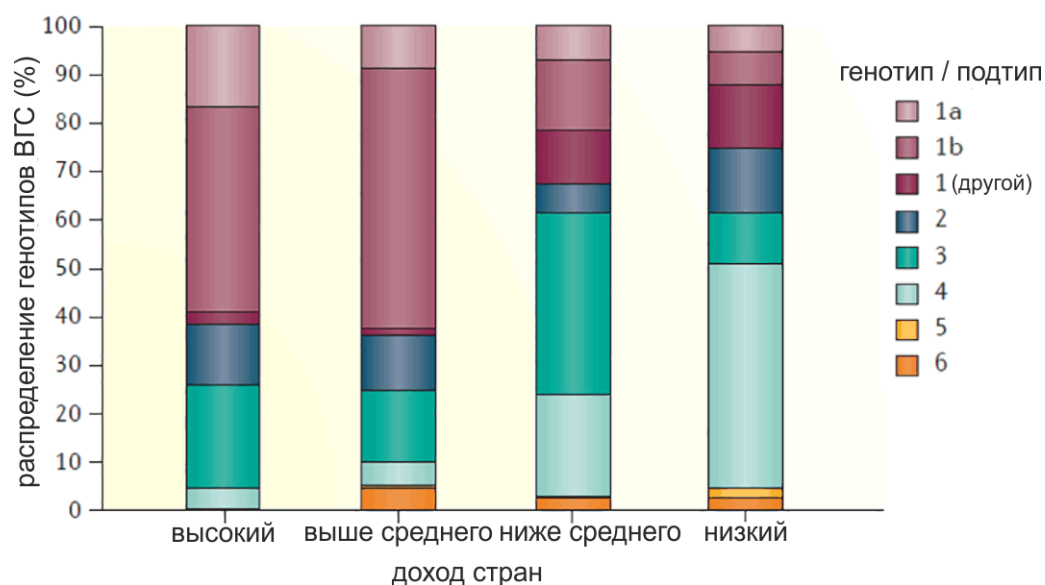
Гепатит С является инфекционным заболеванием, вызываемым РНК-вирусом гепатита С, принадлежащим семейству *Flaviviridae*. После острой фазы инфекции, вызываемой ВГС, у 50-80% не получавших терапию пациентов наступает хронизация процесса. Хроническая инфекция ВГС приводит к фиброзу печени, циррозу, гепатоцеллюлярной карциноме и, в конечном итоге, к смерти. Присутствие ВГС в организме также является приоритетным индикатором в назначении трансплантации печени.

Количество инфицированных ВГС, согласно эпидемиологическим данным на основе положительного результата на анти-НСV антитела, сегодня оценивают в 1,6% (диапазон 1,3 – 2,1%) от всего населения Земли, что составляет ~ 115 миллионов человек. Однако далеко не все из этой когорты в настоящее время являются носителями инфекции, у части популяции вирус мог исчезнуть спонтанно или в результате лечения. Таким образом, глобальная распространенность вируса (положительная по РНК ВГС) ниже и оценивается сегодня в 1% (диапазон: 0,8-1,14%) или 71 миллион (диапазон: 62-79 миллионов) человек с инфекцией ВГС. В Российской Федерации количество инфицированных составляет более 3,5 млн. чел. (Polaris Observatory, 2017).

Вирионы ВГС имеют диаметр 45-65 нм и обернуты липидным бислоем, в котором закреплены гликопротеины Е1 и Е2. Оболочка окружает неикосаэдрический нуклеокапсид, состоящий из нескольких копий корового

белка (core-protein) и содержащий одноцепочечную молекулу РНК с положительной полярностью длиной ~ 9,6 тыс. нк. Геном ВГС имеет открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин, насчитывающий приблизительно 3000 аминокислот. Структурные белки (коровый, E1 и E2) кодируются аминоконцевой частью открытой рамки считывания, тогда как остальные части кодируют неструктурные белки p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B. В крови инфицированных пациентов могут присутствовать безоболочечные вирусные нуклеокапсиды.

ВГС характеризуется чрезвычайной гетерогенностью. Филогенетический анализ вариантов вируса, изолированных в различных географических регионах, к настоящему времени позволил классифицировать 7 (1-7) основных генотипов и 67 (1a, 1b..., 2a, 2b, 2c и т.д.) подтипов (Рис. 12) (Smith et al., 2013). Генотип ВГС, а в последнее время и подтип, являются ключевыми детерминантами, определяющими режим противовирусной терапии.



**Рис. 12.** Распределение генотипов ВГС в зависимости от доходов стран согласно классификации Мирового Банка. Подтипы генотипа 1 доминируют в Северной и Южной Америке, Европе, Австралии, Новой Зеландии, Центральной и Восточной Азии. Генотип 3 распространен в Индии и Пакистане, в то время как генотип 4 доминирует в Египте и западной Африке (зона Сахары). ВГС с генотипом 5 составляет более трети популяции в ЮАР, а генотип 6 найден в Юго-Восточной Азии. Генотип 7 (не показан на рис. 12) выявлен в 2014 г в Центральной Африке (Smith et al., 2014; Murphy et al., 2015).

Диагностический алгоритм обследования на предмет ВГС включает в себя несколько последовательных молекулярных тестов, не считая оценки

показателей состояния печени, общих биохимических анализов и выявления сопутствующих инфекций. Для скрининга ВГС в сыворотке или плазме применяют ИФА-тесты третьего поколения на предмет выявления анти-НСV антител. Такие тесты обладают высокой чувствительностью и специфичностью и являются полностью автоматизированными. Серологическое окно между инфекцией и сероконверсией, когда анти-НСV антитела достигают детектируемого уровня, составляет в среднем от 2 до 8 недель, что может привести к пропуску ранней инфекции. Анти-НСV антитела сохраняются у хронических больных. У пациентов с элиминированным вирусом анти-НСV-антитела могут детектироваться в крови в течение многих лет или даже десятилетий. Идентификация и количественное определение вирусной РНК посредством ПЦР с детекцией в режиме реального времени является стандартным тестом для диагностики активной инфекции и оценки ответа на противовирусной терапии, включая развитие резистентности к препаратам прямого противовирусного действия (ПППД).

Идентификация генотипа и подтипа (как минимум, подтипов генотипа 1) является приоритетной клинической задачей, необходимой для определения курса лечения (режим терапии – выбор препаратов, длительность и необходимость добавления рибавирина). Золотой стандарт генотипирования ВГС сегодня включает секвенирование области NS5B с последующим филогенетическим анализом (Murphy et al., 2007; Quer et al., 2015). В диагностических лабораториях для определения генотипа применяют методы ПЦР с детекцией в режиме реального времени (Mohamed et al., 2014), обратную транскрипцию, совмещенную с ПЦР, с последующей гибридизацией на стрипах (Chevaliez et al., 2012) и полногеномное секвенирование (Rodriguez-Frias et al., 2017). Последнее позволяет идентифицировать мутации в геноме ВГС, ассоциированные с резистентностью к препаратам прямого противовирусного действия (Quer et al., 2016).

Рекомендации по лечению острого и хронического гепатита С постоянно обновляются с вводом в практику новых противовирусных препаратов

(AASLD-IDSA, 2015; EASL, 2017). Острые формы гепатита С успешно лечатся коротким курсом интерферона-альфа (IFN) с продолжительным ответом на противовирусную терапию (SVR), составляющим более 90%. Применение рекомбинантного IFN замещается монотерапией пегилированным интерфероном, продемонстрировавшим даже лучшие показатели SVR, чем 12-недельный курс IFN в сочетании с рибавирином (Wiegand et al., 2006).

Лечение хронического гепатита С на протяжении более 15 лет осуществлялось комбинацией пегилированного IFN с рибавирином в различных режимах (длительность/доза), зависящих от генотипа ВГС; подтипы 1a и 1b также обладали разными режимами терапии. Введение в клиническую практику в 2013 г. ПППД произвело революцию в лечении хронического гепатита С, значительно повысив качество жизни больных. Исследования жизненного цикла ВГС привели к созданию серии препаратов, направленных на подавление функций ключевых ферментов ВГС – NS3/4A сериновой протеазы, NS5B РНК-зависимой РНК-полимеразы и репликационного комплекса NS5A (Таблица 7). Комбинация этих препаратов с добавлением или исключением рибавирина в зависимости от генотипа и подтипа (Таблица 8) позволяет элиминировать вирус у 90-100% пациентов (Manns et al., 2017).

**Таблица 7.** Перечень препаратов прямого противовирусного действия для терапии ВГС

Ингибиторы протеазы NS3/4A	Ингибиторы РНК-полимеразы NS5B	Ингибиторы репликационного комплекса NS5A
Боцепревивр, телапревивр – I поколение ПППД	Софосбувир – генотип-неспецифичный нуклеотидный ингибитор, связывается с активным центром РНК-полимеразы и терминирует транскрипцию вируса	Даклатасвир
Паритапревивр	Дасабувир – генотип-специфичный ненуклеотидный ингибитор, не связывается с активным центром РНК-полимеразы, но изменяет ее конформацию, ингибируя ключевую функцию	Элбасвир
Симепревивр		Омбитасвир
Асунапревивр		Велпатасвир
Гразопревивр		Ледипасвир

**Таблица 8.** Актуальные режимы противовирусной терапии в зависимости от генотипа ВГС

Режим	Генотип					
	1	2	3	4	5	6
Софосбувир + рибавирин*, ‡	X§	X	X§	X§	X§	X§
Софосбувир + пегилированный IFN + рибавирин	X	X	X	X	X	X
Софосбувир / ледипасвир*, ‡, ¶, #	X§,   , #	NA	NA	X	X	X
Софосбувир / велпатасвир‡, **	X	X	X  , ¶	X	X	X
Софосбувир + симепревир*, ¶	X	NA	NA	X	NA	NA
Софосбувир + даклатасвир*, ‡, ¶	X§,	X	X§,	X  , ‡‡	X  , ‡‡	X  , ‡‡
Омбитасвир / паритапревир + дасабувир (с/без рибавирина §§)*	X§,   , §§,	NA	NA	NA	NA	NA
Омбитасвир / паритапревир+ рибавирин	NA	NA	NA	X	NA	NA
Эбасвир / grazoprevir Elbasvir/grazoprevir	X  , ¶¶	NA	NA	X  , ¶¶	NA	NA
Даклатасвир + асунапревир	X§, ##	NA	NA	NA	NA	NA

**Примечания:**

‘/’ в режимах означает терапию фиксированной дозой единым препаратом (одной лекарственной формой);

‘+’ в режимах означает комбинацию двух и более приемов препаратов в различных лекарственных формах;

X – режим эффективен в отношении конкретного генотипа;

NA – режим неэффективен в отношении конкретного генотипа;

\* - режим доступен для пациентов с трансплантацией печени;

‡ режим доступен для пациентов с градацией состояния печени А-С по системе Чайлда-Пью;

§ 24-недельный режим терапии;

|| 12-недельный режим терапии;

¶ добавление рибавирина в режим зависит от состояния пациента (наличие цирроза и мутаций в регионе NS5A генома ВГС);

# 8-недельный режим терапии пациентов, ранее не получавших лечение и не имеющих цирроза с нагрузкой РНК ВГС <6 млн IU/мл;

\*\* данные в процессе накопления. Для пациентов, инфицированных ВГС любого генотипа с градацией состояния печени А-В по системе Чайлда-Пью;

‡‡ данные ограничены;

§§ Рибавирин рекомендован для пациентов с подтипом 1a и циррозом в течение 24 недель;

|||| 8-недельный режим терапии пациентов с подтипом 1b и отсутствием цирроза, ранее не получавших лечение;

¶¶ 16-недельный режим терапии, включающий рибавирин, для пациентов с подтипом 1a или генотипов 4, с нагрузкой РНК ВГС > 800000 IU/мл и/или мутациями в регионе NS5A;  
## одобрен для пациентов с подтипом 1b в некоторых странах (Япония, Корея) с доминированием подтипа 1b.

Приведенные в Таблице 8 (см. также примечания) данные показывают важность точной идентификации генотипа и, по меньшей мере, подтипов 1a и 1b ВГС. Недавнее клиническое исследование режима «Викиракс» (паритапревир/ритонавир + омбитасвир) с добавлением и исключением рибавирина в отношении пациентов, инфицированных ВГС генотипа 4, показало высокую эффективность такого режима терапии при включении в схему рибавирина. Однако в контрольной группе больных, не принимавших рибавирин, у трех пациентов результаты лечения были неудачными (у одного зафиксировано повышение титра вируса, отмечено два рецидива). Все эти пациенты были инфицированы ВГС подтипа 4d (3 из 16, 18,75%) с мутациями в NS3и NS5A (Hezode et al., 2015). Таким образом, пациенты с подтипом 4d должны иметь в схеме рибавирин и, если это невозможно, необходима смена режима терапии. В другом исследовании эффективности режима «Harvoni» (ледипасвир + софосбувир) на 44 пациентах с ВГС генотипа 4 было достигнуто превосходное значение SVR (93%). Однако терапия двух из трех пациентов, обладавших ВГС с подтипом 4r, была неудачной (Abergel et al., 2014). Полученные результаты предполагают, что пациенты с ВГС подтипа 4r должны получать режим «Harvoni» в сочетании с рибавирином и/или ингибитором сериновой протеазы NS3, в противном случае, необходима смена схемы лечения. Зависимость SVR при различных режимах лечения от редких подтипов ВГС начинает становиться предметом исследования только в настоящее время и в этой связи чрезвычайно актуальны методы субтипирования ВГС с высокой разрешающей способностью. Более того, не вызывает сомнений значимость идентификации подтипа ВГС для целей эпидемиологии и дальнейшего уточнения классификации вируса (Welzel et al., 2017).

Ранее было показано, что идентификация генотипа и подтипа ВГС с точностью, близкой к 100%, возможна при установлении последовательности области NS5B генома ВГС (Sandres-Saune et al., 2003; Tong et al., 2015; Chueca et al., 2016). В настоящей работе в качестве альтернативы секвенированию впервые предложен олигонуклеотидный биочип для анализа генотип- и подтип-специфичных последовательностей области NS5B генома ВГС.

### **1.5 Генетически модифицированные источники растительного происхождения: состояние проблемы, методы идентификации**

Согласно данным Международной службы мониторинга использования сельскохозяйственных биотехнологий (ISAAA) по состоянию на начало 2017 г. на территории РФ разрешены к использованию после проверки на биобезопасность 24 линии генноинженерно-модифицированных культур (ГМ-культур), включая 8 линий сои, 12 – кукурузы, 2 – картофеля (созданы Центром «Биоинженерия» РАН, входящим в ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук) и по одной – риса и сахарной свеклы (Staff, 2016) (Таблица 9). При этом в мире создано и коммерчески используется более 500 ГМ-линий культурных растений (лента новостей на вебсайте ISAAA <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/updates/default.asp>). Такая ситуация создает опасность проникновения на территорию РФ несанкционированных ГМ-культур, безопасность которых для человека и животных не обоснована. Вступление в силу с 4 июля 2016 г. Федерального закона № 358-ФЗ, направленного на защиту экологии страны от возможного вторжения несанкционированных ГМ-культур, которые могут представлять серьезную угрозу как здоровью людей, так и развитию органического сельского хозяйства РФ, подчеркивает актуальность методов эффективного выявления растительной ДНК, содержащей генетические детерминанты трансгенности.

Неоходимость оценки возможных биологических и экологических рисков при быстром распространении генно-модифицированных источников и полученных на их основе продуктов питания и сырья ставит неотложный вопрос о контроле потоков ГМИ посредством их идентификации (Verriere,



2015). Для организации и проведения эффективного надзора за пищевыми продуктами, содержащими ГМИ-компоненты, в РФ и странах ЕС законодательно введены строгие ограничения по выращиванию трансгенных культур и обязательная маркировка продуктов питания на присутствие трансгенных добавок, если их доля в составе продукта превышает 0,9% (№ 234-ФЗ от 25.10.2007 г., Regulation (EC) No 1829/2003).

«Классические» генно-модифицированные линии сельскохозяйственных культур, такие как соя Roundup Ready (GTS 40-3-2), кукуруза MON810 и кукуруза Bt-176, используемые для изготовления кормов (соевая/кукурузная мука, силос) и пищевых продуктов (соевое/кукурузное масло, белковые фракции и пищевые волокна сои), продолжают составлять более 80% всех применяемых ГМИ в биотехнологии и пищевой промышленности.

Так, создание линии GTS 40-3-2 проведено компанией Monsanto посредством введения гена толерантной к глифосату формы фермента 5-энолпирувилшिकимат-3-фосфат-синтазы (EPSPS), выделенного из штамма CP4 *Agrobacterium tumefaciens* (Bruderer and Leitner, 2003). Ген EPSPS находится под контролем сильного конститутивного промотора из вируса мозаики цветной капусты (Cauliflower Mosaic Virus – 35Sp CaMV) и терминатора нопалин синтазы (nopaline synthase terminator – nos\_t) из *A. tumefaciens*.

Линия кукурузы MON810 была получена посредством баллистической трансформации кукурузы генотипа Hi-II плазмидой PV-ZMBK07, включающей единичную копию гена *cryIA(b)*, кодирующего форму природного инсектицидного  $\delta$ -эндотоксина CRYIA(B), активного по отношению к кукурузному мотыльку. Ген *cryIA(b)* находился под контролем промотора 35S CaMV; конструкция включала также HSP70 интрон 1 кукурузы и терминатор нопалин синтазы (Bruderer and Leitner, 2003).

Наконец, линия кукурузы Bt-176 была получена методом баллистической трансформации нативной линии *Zea mays* CG00526 с участием двух плазмид (Bruderer and Leitner, 2003). Две синтетические конструкции гена *cryIA(b)*, обеспечивающие защиту от кукурузного мотылька, были клонированы

совместно в одном плазмидном векторе. Одна из конструкций находилась под транскрипционным контролем промотора гена фосфоэнолпируват-карбоксилазы (P-PEPC) кукурузы и экспрессировалась в зеленых тканях. Во второй конструкции *cryIA(b)* находился под контролем промотора гена кальций-зависимой протеинкиназы (P-CDPK) кукурузы и специфически экспрессировался в пыльце. Обе конструкции содержали интрон 9 из гена фосфоэнолпируват-карбоксилазы кукурузы и терминатор вируса мозаики цветной капусты (*35St CaMV*). Вторая плазида включала конструкцию из промотора и терминатора *35Sp CaMV* и *35St CaMV*, соответственно, регулирующих экспрессию гена *bar*, кодирующего фосфинотрицин-ацетилтрансферазу (PAT), определяющую толерантность к гербициду глюфосинату аммония. Таким образом, казалось бы, что для обнаружения ДНК ГМ-культур достаточно точной и количественной идентификации ограниченного набора детерминант трансгенности, таких как промотор *35S CaMV*, терминаторы *35S CaMV* и *nos*. Однако современные методы выявления ГМИ должны учитывать постоянное появление трансгенного растительного материала, использующего новые генетические конструкции, в связи с чем необходимо в одном эксперименте идентифицировать широкий набор трансгенных мишеней (Fraiture et al., 2015).

Приведенные в Таблице 9 данные на примере линий ГМ-культур, разрешенных к использованию в пищевой промышленности на территории РФ, свидетельствуют о необходимости идентификации расширенного спектра детерминант трансгенности, включая промоторы *35Sp FMV* и гена актина риса, терминатор гена *rbcS1* гороха, маркерные гены *bar* и *nptII*, в дополнение к перечисленным выше *35Sp CaMV*, *35St CaMV*, *nos\_t*. Такой набор позволит охватить, по меньшей мере, 22 из 24 разрешенных в РФ ГМ-линий.

**Таблица 9.** Детерминанты трансгенности в ГМ-линиях, разрешенных для применения в пищевой промышленности на территории РФ

№ п/п	Культура, наименование ГМ-линии, признак	Разработчик /Производитель	Основные детерминанты трансгенности		
			промотор	трансген /маркерный ген	терминатор
1	Соя GTS 40-3-2, устойчивая к глифосату	Monsanto (США)	<i>35Sp CaMV</i>	<i>CP4 EPSPS</i>	<i>nos_t</i>
2	Соя MON 89788, устойчивые к глифосату	Monsanto (США)	<i>35Sp FMV</i> (промотор вируса мозаики норичника)	<i>CP4 EPSPS</i>	<i>rbcS_t</i> терминатор гена <i>rbcS1</i> гороха
3	Соя SYHT0H2, устойчивая к глюфосинату аммония и к гербицидам, ингибирующим гидроксифенилпируват диоксигеназу	Syngenta Seeds (США) Bayer CropScience LP (США)	<i>35Sp CaMV</i> Промотор <i>P-CmYLCV</i> вируса желтых листовых завивок цеструма (пасленовых)	<i>Pat</i> <i>Pds1/Pds2</i> , кодирующие р-гидроксифенилпируват диоксигеназу	<i>nos_t</i>
4	Соя FG72, устойчивая к гербицидам изоксафлютолу и глифосату	MS Technologies, США	Промотор H4 <i>Arabidopsis thaliana</i> ; транзитный пептид TPotp C из кукурузы и подсолнуха	<i>mEPSPS</i>	<i>nos_t</i>
5	Соя MON 87701, устойчивая к чешуекрылым насекомым-вредителям	Monsanto (США)	Промотор гена <i>RbcS4 A. thaliana</i>	<i>cryIAc</i> , кодирующий δ-эндотоксин	терминатор <i>T-7S α</i> гена <i>Sphas1 G. max</i>
6	Соя BPS-CV127-9, устойчивая к имидазолинон-содержащим гербицидам	BASF S.A. (Бразилия)	-	<i>Csr1-2</i> модифицированная большая субъединица синтазы ацетооксикислот	-
7	Соя A2704-12, устойчивая к глюфосинату аммония	Bayer CropScience (Германия)	<i>35Sp CaMV</i>	<i>Pat</i>	<i>35St CaMV</i>
8	Соя A5547-127, устойчивая к глюфосинату аммония	Bayer CropScience (Германия)	<i>35Sp CaMV</i>	<i>Pat</i>	<i>35St CaMV</i>
9	Кукуруза MON 89034, устойчивая к чешуекрылым насекомым-вредителям	Monsanto (США)	<i>35S CaMV/ 35S FMV</i>	Химерный <i>cryI</i> , кодирующий δ-эндотоксин <i>cry2Ab</i> , кодирующий δ-	<i>nos_t</i> , 3'-нетранслируемый регион белка

				эндотоксин	теплового шока пшеницы 17.3
10	Кукуруза 5307, устойчивая к жесткокрылым насекомым-вредителям рода <i>Diabrotica</i>	Syngenta Biotechnology (США)	Промотор <i>P-CmYLCV</i> вируса желтых листовых завивок цеструма (пасленовых)	Химерный ген <i>cry3A</i> и <i>cry1Ab</i> , кодирующий δ-эндотоксин  <i>pmi</i> из <i>E.coli</i> , кодирующий изомеразу фосфоманнозы	<i>nos_t</i>
11	Кукуруза T25, устойчивая к глюфосинату аммония	Bayer CropScience (Германия)	35Sp CaMV	<i>Pat</i>	35St CaMV
12	Кукуруза 3272, синтезирующая фермент альфа-амилазу	Syngenta Seeds (США)	<i>pUbiZm</i> Промотор и первый интрон гена полиубиквитина <i>Z. mays</i>  Промотор гена зеина	<i>pmi</i>  <i>amy797E</i> , кодирующий термостабильную альфа-амилазу	<i>nos_t</i>  35St CaMV
13	Кукуруза MIR604, устойчивая к жуку диабротика ( <i>Diabrotica spp.</i> )	Syngenta Crop Protection (Швейцария)	<i>pUbiZm</i> Промотор и первый интрон гена полиубиквитина <i>Z. mays</i>	<i>pmi</i>  <i>cry3A</i> , кодирующий δ-эндотоксин	<i>nos_t</i>
14	Кукуруза GA21, устойчивая к глифосату	Syngenta Crop Protection (Швейцария)	<i>Act1_p</i> промотор гена актина риса	<i>mEPSPS</i>	<i>nos_t</i>
15	Кукуруза Bt11, устойчивая к глюфосинату аммония и кукурузному бурильщику <i>Ostrinia nubilalis</i>	Syngenta Crop Protection (Швейцария)	35Sp CaMV	<i>cry1Ab</i> , кодирующий δ-эндотоксин	<i>nos_t</i>
16	Кукуруза MIR162, устойчивая к чешуекрылым насекомым-вредителям	Syngenta Seeds (США)	<i>pUbiZm</i> Промотор и первый интрон гена полиубиквитина <i>Z. mays</i>	<i>pmi</i>  <i>vip3A(a)</i> , кодирующий вегетативный инсектицидный белок	<i>nos_t</i>  35St CaMV
17	Кукуруза MON 88017, устойчивая к глифосату и жуку диабротика ( <i>Diabrotica</i> )	Monsanto (США)	35Sp CaMV	<i>cry3Bb1</i> , кодирующий δ-	<i>nos_t</i>

	spp.)		<i>Act1_p</i>	эндотоксин <i>CP4 EPSPS</i>	
18	Кукуруза линии MON863, устойчивая к жуку диабротика ( <i>Diabrotica</i> spp.)	Monsanto (США)	<i>35Sp CaMV</i>	<i>cry3Bb1</i> , кодирующий δ-эндотоксин <i>nptII</i> , кодирующий неомизинфосфотрансферазу	<i>nos_t</i> , 3'-нетранслируемый регион белка теплового шока пшеницы 17.3
19	Кукуруза MON810, устойчивая к кукурузному (стеблевому) мотыльку <i>Ostrinia nubilalis</i>	Monsanto (США)	<i>35Sp CaMV</i>	<i>cry1Ab</i> , кодирующий δ-эндотоксин	-
20	Кукуруза NK603, устойчивая к глифосату	Monsanto (США)	<i>35Sp CaMV</i> <i>Act1_p</i>	<i>CP4 EPSPS</i>	<i>nos_t</i>
21	Рис LL62, устойчивый к глюфосинату аммония	Bayer CropScience (США)	<i>35Sp CaMV</i>	<i>bar</i>	<i>35St CaMV</i>
22	Сахарная свекла Н7-1, устойчивая к глифосату	Monsanto (США)	<i>35Sp FMV</i>	<i>CP4 EPSPS</i>	<i>rbcS_t</i> терминатор гена <i>rbcS1</i> гороха
23	Картофель, устойчивый к колорадскому жуку, сорт "Луговской 1210 амк"	ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Россия	<i>35Sp FMV</i>	<i>nptII</i> <i>cry3A</i> , кодирующий δ-эндотоксин	<i>nos_t</i>
24	Картофель, устойчивый к колорадскому жуку, сорт "Елизавета 2904/1 kgs"	ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Россия	<i>35Sp FMV</i>	<i>nptII</i> <i>cry3A</i> , кодирующий δ-эндотоксин	<i>nos_t</i>

В основу методов выявления ГМИ может быть положена как идентификация трансгенной ДНК, так и обнаружение рекомбинантных белков, экспрессируемых в ГМ-культурах. Для выявления мишеней белковой природы используют, как правило, иммуноферментный анализ (ELISA), латеральный проточный иммуноанализ и вестерн-блоттинг. Диагностика на основе иммуноанализа обладает высокой специфичностью, простотой и быстротой выполнения теста, экономичностью. Вместе с тем, применимость таких подходов ограничена возможностью анализа только сырых продуктов, поскольку белки деградируют в обработанной пище и сырье (Kamle et al., 2011; Zhu et al., 2011). Методы, основанные на идентификации ДНК-мишеней, являются куда более надежными для анализа сильно деградированных образцов, обладают большей чувствительностью и специфичностью.

В соответствии с организацией специфичной конструкции, интегрируемой в геном растения, методы идентификации трансгенной ДНК можно классифицировать по нескольким уровням специфичности в зависимости от спектра выявляемых мишеней (Рис. 13).



**Рис. 13.** Схема трансгенной конструкции, используемой при трансформации линии культурного растения, мишени для идентификации ГМИ и уровни анализа в зависимости от анализируемых мишеней. Позиции праймеров, используемых в различных уровнях, отмечены стрелками соответствующего цвета. Обозначения «пг» и «лг» - правая и левая границы встраиваемой в растительный геном конструкции, соответственно.

Скрининг по элементам – генетическим детерминантам трансгенности, таким как промоторы и терминаторы, является самым распространенным методом анализа на предмет выявления ГМИ. В случае выявления таких детерминант, как правило, с использованием мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени, далее может быть проведено установление

специфичного события трансформации. В случае получения отрицательного результата при скрининге по элементам дальнейший анализ на присутствие ГМИ в образце не проводится. В качестве мишеней для праймеров используют последовательности промоторов *35S CaMV*, *35S FMV*, гена актина риса, *pUbiZm* полиубиквитина *Z. mays*, терминаторов гена *rbcS1* гороха, *35S CaMV*, *nos* (Randhawa et al., 2016).

Гено-специфичный анализ, нацеленный на идентификацию конкретных трансгенов, присутствующих в геноме трансформированного растения и обеспечивающих его характерные признаки, обладает большей специфичностью, чем скрининг по элементам. Пример такого анализа может быть одновременное обнаружение фрагментов генов *cry3Bb1*, ответственного за продукцию  $\delta$ -эндотоксина, детерминирующего устойчивость к насекомым, и *nptII*, кодирующего неоминифосфотрансферазу, обеспечивающую устойчивость к канамицину линии MON863 кукурузы. Такие тесты можно использовать для проверки наличия специфичных генов в геноме реципиента после скрининга на детерминанты трансгенности (Kamle et al., 2017).

Конструкционно-специфичный анализ позволяет идентифицировать позиции контакта между двумя элементами, например, область вставки между промотором и трансгеном, тем самым проверяя корректность конструкции. Разработаны ПЦР-методы для идентификации областей соединения сигнального пептида и гена фитазы в линии BVLA430101 ГМ-кукурузы (Su et al., 2011), химерного гена *cryIAc-cryIAb* и терминатора *nos* в ГМ-рисе (Made et al., 2006).

Событие-специфичный анализ, обеспечивающий идентификацию области соединения между локусом интеграции трансгенной конструкции и геномом реципиента, является наиболее специфичным при идентификации ГМИ. Вместе с тем, для разработки методов, направленных на выявление специфичного трансформационного события, необходимы точные паспортные данные ГМ-культур, далеко не всегда предоставляемые производителем. Валидированные ПЦР-протоколы, позволяющие однозначно детектировать трансформационные

события более чем 50 ГМ-линий кукурузы, сои, хлопка, масличного рапса, картофеля, риса и сахарной свеклы доступны в базе данных ЕС GMOMETHODS (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>).

В целом, для идентификации ГМИ растительного происхождения разработано и валидировано множество ПЦР-тестов, в т.ч., ведущими российскими компаниями ООО «НПО «ДНК-технология», ЗАО «Синтол», Центральным научно-исследовательским институтом эпидемиологии (наборы серии «Амплисенс») и др. Как правило, эти тесты нацелены на быстрое количественное определение содержания трансгенных элементов в пищевых продуктах и сырье. С другой стороны, молекулярная характеристика трансформационного события на уровне хромосомы должна включать оценку числа копий и установление точной локализации интегрированной трансгенной конструкции, определение последовательности вставки и фланкирующих ее геномных областей. Такую информацию в настоящее время могут предоставлять технологии NGS, эффективно выявляющие последовательности геномов со сложными / перестроенными модификациями, либо недокументированные ГМ-линии (Guttikonda et al., 2016; Holst-Jensen et al., 2016).

С целью первичного высокопроизводительного скрининга ГМИ разработан ряд приложений на основе олигонуклеотидных микрочипов, в т.ч. мультиплексная ПЦР с последующей гибридизацией для идентификации линий ГМ-кукурузы, лигазная детектирующая реакция на универсальном микрочипе для анализа вариантов ГМ-кукурузы линии Vt11, микрочип на основе пептидо-нуклеиновых кислот для детекции пяти трансформационных событий в двух видах растений, а также микрочип, обеспечивающие событие-специфичный анализ 19 вариантов ГМИ, в т.ч. двух линий сои, 13 линий кукурузы, 3 линий рапса и одной линии хлопка в обработанных пищевых продуктах (Rudi et al., 2003; Randhawa et al., 2016; Kamle et al., 2017).

В настоящей работе также представлен метод мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на олигонуклеотидном гидрогелевом биочипе,



выявляющем последовательности различных детерминант трансгенности и маркерных генов, и обеспечивающий производительный и чувствительный скрининг пищевых продуктов и сырья на предмет выявления генетически модифицированных источников растительного происхождения.

### **1.6 Заключение по обзору литературы**

Установление молекулярных механизмов действия различных ферментов, структуры геномов человека, животных и растений явилось основополагающей революцией в биологии, которая окажет решающее влияние на развитие медицины и биотехнологии XXI века. Открываются тысячи генов, устанавливается их функциональное значение и роль при различных заболеваниях, исследуются сигнальные пути передачи информации различными белками, обеспечивающими управление процессами деления, развития и программируемой смерти клеток, появляются уникальные возможности для выяснения причин и для разработки эффективных методов лечения многих инфекционных, наследственных и онкологических заболеваний.

В применении к диагностике каждого конкретного пациента, для индивидуального анализа множества генов, белков клетки и клеточных секретов возникла необходимость в создании специальных методов многопараметрической молекулярной диагностики, которая могла бы стать повсеместно доступной для исследовательских групп и клиник. Перспективной основой для реализации таких методов, позволяющих в обычных медико-диагностических лабораториях проводить многопараметрический анализ биологических образцов, может стать технология гидрогелевых олигонуклеотидных биочипов низкой плотности. Настоящая работа посвящена созданию и реализации чувствительных мультиплексных методик молекулярного профилирования ДНК-маркеров социально-значимых инфекционных заболеваний, включая исследование молекулярно-генетических и эпидемиологических аспектов патогенеза, а также идентификации ГМИ растительного происхождения на основе технологии гидрогелевых биочипов.

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Клинические образцы, изоляты, препараты растительной ДНК

В работе использовали лабораторные штаммы *Escherichia coli* K12, *Bacillus thuringiensis* sp. Sotto TO 4001, ДНК музейного штамма *M. tuberculosis* H37Rv.

За период с 2001 г. по 2016 г. в Лаборатории биологических микрочипов и Лаборатории технологий молекулярной диагностики ИМБ РАН проанализировано, суммарно, 1850 образцов ДНК клинических изолятов МТВС, 650 образцов ДНК МТВС, выделенных из клинического материала (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, экссудат, биоптаты и пр.), 485 образцов ДНК изолятов нетуберкулезных микобактерий (NTM). Штаммы МТВС и NTM были охарактеризованы в Московском научно-практическом центре борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения г. Москвы (МНПЦБТ), Санкт-Петербургском НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ (СПб НИИФ), Научно-исследовательском институте фтизиопульмонологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (НИИ ФП), Центральном научно-исследовательском институте туберкулеза (ФГБНУ «ЦНИИТ»), других учреждениях противотуберкулезной службы РФ и стран СНГ.

Исследование генома ВГС проводили с использованием 345 образцов РНК, выделенных из плазмы крови в Лаборатории вирусологии Госпиталя Университета г. Тулузы (Франция), 119 образцов РНК ВГС, полученных в Гематологическом научном центре МЗ РФ и Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М. П. Чумакова.

В работе было проанализировано, суммарно, 215 образцов ДНК возбудителей ИРТ, в том числе, 128 ДНК клинических изолятов *N. gonorrhoeae*, 32 образца ДНК *T. pallidum*, 29 образцов ДНК *Mycoplasma spp./ Ureaplasma spp.*, 1 образец ДНК *T. vaginalis*. 25 образцов ДНК были получены из клинического материала (отделяемое уретры или цервикального канала) от пациентов с подозрением на инфекции, передающиеся половым путем,

проходивших обследование в ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» МЗ РФ (ГНЦДК).

Для анализа генетических детерминант трансгенности на биочипе в качестве контрольных образцов использовали ДНК картофеля линии 1/2 (ИФР РАН), калибровочные стандарты ЗАО «Синтол», содержащие различное количество (0-5%) ДНК ГМ кукурузы линии MON810 и сои Roundup Ready™ линии GTS 40-3-2, 20 образцов ДНК, выделенных из различных пищевых продуктов и растительного сырья.

## **2.2 Определение фенотипической чувствительности к антимикробным препаратам**

Получение культур из клинического материала больных туберкулезом проводили с использованием как плотных сред Левенштейна-Йенсена, Middlebrook 7H10 и 7H11, так и жидкой Миддлбрук 7H9 в автоматизированной системе BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, США). Определение лекарственной чувствительности изолятов *M. tuberculosis* к изониазиду (INH), рифампицину (RMP), этамбутолу (EMB), фторхинолонам FQ, в т.ч. офлоксацину (OFX), левофлоксацину (LVX), моксифлоксацину (MFX), инъекционным препаратам второго ряда (SLID/ID2) - канамицину (KAN), амикацину (AMK), капреомицину (CAP) выполняли с использованием системы Bactec MGIT 960, либо методом абсолютных концентраций на плотных средах

Видовую идентичность штаммов *N. gonorrhoeae* подтверждали в ФГБУ ГНЦДК Минздрава РФ по совокупности биохимических активностей с использованием карт идентификации NH на анализаторе VITEK 2 Compact (bioMérieux, Франция). Чувствительность к 6 АМП анализировали анализировали методом серийных разведений в агаре с добавлением 1% ростовой добавки ISOVitalex (Becton Dickinson, США) в соответствии с критериями CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institution, США), к азитромицину – в соответствии с критериями EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, [www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints)).

### **2.3 Экстракция нуклеиновых кислот**

Деконтаминацию клинических образцов, содержащих клетки микобактерий, проводили, используя реагент BBL MycoPrep (Becton Dickinson, США), содержащий N-ацетилцистеин и NaOH, в течение 40 минут при комнатной температуре. Клетки промывали TE-буфером (10 mM Трис-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 8.0), осаждали центрифугированием при 10,000 g в течение 10 мин при 4°C и прогревали в TE-буфере, содержавшем 1% Triton X-100 при 95°C в течение 30 мин. Очистку микобактериальной ДНК из лизатов проводили с использованием набора «Проба-НК» («ДНК-Технология», Россия), либо на автоматизированной станции Freedom EVO® Clinical (Tecan Group Ltd., Германия).

РНК ВГС выделяли с использованием наборов QIAamp RNA Blood Mini Kit и QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Германия). Выделение ДНК возбудителей ИРТ проводили с использованием набора «ДНК-Экспресс» (Литех, Россия). Выделение растительной ДНК из сырья и продуктов питания осуществляли с использованием наборов «ДНК-Экстран» (ЗАО «Синтол», Россия), «Проба-ЦТАБ» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия).

Процедура выделения НК в разработанных микрофлюидных системах детально описана в главах 3.1.1 – 3.1.4 настоящей работы.

### **2.4 Синтез олигонуклеотидов и праймеров**

Синтез олигонуклеотидов для иммобилизации в гелевых элементах биочипа и праймеров для амплификации проводили на автоматическом синтезаторе ABI-394 DNA/RNA synthesizer («Applied Biosystems», США) с использованием стандартного фосфорамидитного метода и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (комплекс «Gilson», Франция). Олигонуклеотиды содержали спейсер со свободной аминогруппой, введенной в процессе синтеза с использованием 3'-аминомодификатора С6 («Glen Research», США). Контроль молекулярной массы олигонуклеотида выполняли с использованием матрично-активированной лазерной десорбции / ионизации времяпролетной масс-спектрометрии (Compact MALDI4, Kratos Analytical, США).

## 2.5 Изготовление гидрогелевых биочипов

Микрочипы с олигонуклеотидами, иммобилизованными в гидрогеле, изготавливали согласно описанной процедуре (Rubina et al., 2004) со следующими модификациями. В настоящей работе использовали подложки из полибутилентерефталата (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия), не требующие, в отличие от стеклянных, специальных модификаций, например силанизации. Композиция для приготовления сополимеризационных микрочипов включала растворы 4,75% метакриламида, 0,25% *N,N'*-метиленбисакриламида, 50% глицерина, 5% *N,N,N',N'*-Тетраметилэтилендиамина (TEMED), водные растворы олигонуклеотидов в концентрации 500 – 2000 пмоль/мкл, содержащих аминогруппу на 5'-конце, и 0,1 пмоль красителя Texas Red (Thermo Fischer Scientific, США). Композиции переносили в колодцы 384-луночного микротитровального планшета (Genetix, Великобритания), перемешивали и наносили на полимеризационные пластины в виде массива капель объемом ~0,1 нл с помощью автоматического микродозатора – установки для переноса гидрогелей ИМБ РАН. Полимеризацию гелевых элементов индуцировали УФ-облучением с длиной волны 350 нм и интенсивностью 0,06 мкВ/см<sup>2</sup> в течение 40 минут при 20°C. По окончании полимеризации пластины промывали 0,1М PBS-буфером, содержащим 0,1% Tween 20, при 65°C в течение 2 часов, затем деионизованной водой и высушивали. Разрезание полимеризационных пластин на индивидуальные подложки микрочипов выполняли с использованием лазера, фиксированного на двухкоординатном позиционере, после чего подложки вкладывали в пластиковые держатели формата предметного стекла и проводили технологический контроль качества. В зависимости от типа биочипа диаметры гидрогелевых элементов варьировали от 50 до 200 мкм, а расстояния между ячейками составляли от 100 до 500 мкм. Технологический контроль качества включал проверку каждого микрочипа с использованием портативного флуоресцентного микроскопа, оснащенного CCD-камерой и программным обеспечением, распознающим элементы биочипа и обчисляющим основные параметры (диаметр, объем, отклонения от заданных геометрических

параметров матрицы) с последующей статистической обработкой и выдачей информации о пригодности микрочипа для дальнейшего использования. В случае положительного заключения проводили окончательную сборку биочипа посредством монтажа составной гибридизационной камеры объемом 30 мкл (ООО «БИОЧИП-ИМБ»).

## **2.6 Амплификация и флуоресцентное маркирование исследуемых фрагментов геномов**

Для анализа последовательностей ДНК гибридизационную пробу – смесь целевых фрагментов генома(ов) – готовили методом мультиплексной ПЦР с одновременным включением флуоресцентного субстрата IMD-dU – конъюгата красителя индодикарбоцианинового ряда и дезоксиуридинтрифосфата (Kuznetsova et al., 2016).

Реакционная смесь (30 мкл) для амплификации сегментов микобактериального генома содержала 3 ед фермента HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen, Германия), 3 мкл буфера для ПЦР (Qiagen, Германия), 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ каждого dNTP (ЗАО «Евроген», Россия), 8 мкМ флуоресцентного субстрата dUTP-ImD#49 (ИМБ РАН), 20-100 мкмоль прямого и обратного праймеров, 100-2000 мкмоль адаптерных праймеров и 3 мкл раствора геномной микобактериальной ДНК. Использовали следующий профиль амплификации: 95°C - 4 мин; 30 циклов денатурации при 95°C в течение 40 сек, 8 вложенных циклов - 72°C (2 сек)/ 77°C (2 сек); 30 циклов денатурации при 95°C в течение 40 сек, отжига при 53°C в течение 30 сек, 8 вложенных циклов - 72°C (2 сек)/ 77°C (2 сек); финальная достройка при 72°C в течение 5 мин. Амплификацию исследуемых фрагментов геномов возбудителей ИРТ проводили по аналогичному протоколу.

Амплификацию области NS5B генома ВГС проводили в две стадии. Стадию ОТ-ПЦР выполняли согласно описанному ранее протоколу (Sandres-Saune et al., 2003). 1 мкл продукта стадии ОТ-ПЦР использовали реакционной смеси (25 мкл), содержащей 5 ед. HS Taq ДНК-полимеразы, 2.5 мкл 10-

кратного буфера для ПЦР, 200 мкМ каждого dNTP (все реагенты – ЗАО «Евроген»), 1 мкл 100 мМ dUTP-ImD#2 (ИМБ РАН), 10 мкмоль прямого и 100 мкмоль обратного праймеров. Стадию ПЦР проводили согласно следующему протоколу: 95°C – 4 мин; 36 циклов: 95°C – 20 сек, 60°C – 20 сек, 72°C – 30 сек; заключительная элонгация в течение 5 мин при 72°C.

Реакционная смесь для амплификации сегментов растительной ДНК (20 мкл) включала 10 ед. HS Taq ДНК-полимеразы, 2 мкл 10-кратного буфера для ПЦР, 200 мкМ каждого dNTP (все реагенты – ЗАО «Евроген»), 1 мкл 100 мМ dUTP-ImD#2 (ИМБ РАН), 5-20 мкмоль прямых и 25-100 мкмоль обратных праймеров, 5 мкл тотальной растительной ДНК. ПЦР проводили в соответствии со следующим режимом: 95°C -12 мин; затем 55 циклов (95°C - 30 сек, 51°C - 30 сек, 72°C - 30 сек); окончательная достройка при 72°C в течение 10 мин.

## **2.7 Гибридизация и отмывка на биочипах, регистрация результатов**

По окончании амплификации в реакционную камеру биочипа добавляли 20 мкл гибридизационного буфера (1,5 М гуанидинтиоцианат, 75 мМ HEPES-буфер, pH 7,5, 7,5 мМ EDTA, все реагенты – Sigma, США) и 10 мкл ПЦР-смеси и инкубировали в течение 8-16 ч при 37°C. Если мультиплексную ПЦР проводили в двух пробирках, то в камеру биочипа добавляли 10 мкл более концентрированного буфера (3 М гуанидинтиоцианат, 0,15 мМ HEPES-буфер, pH 7,5, 15 мМ EDTA) и по 10 мкл раствора ПЦР-продуктов из каждой пробирки. По окончании гибридизации биочип промывали два раза (по 30 с) водой (30 мкл), прогретой до 37°C, и высушивали при комнатной температуре.

Результаты гибридизации регистрировали и интерпретировали, используя Универсальный аппаратно-программный комплекс (УАПК) для анализа биочипов (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия), оснащенный программным обеспечением (ПО) «ImaGeWare», которое позволяет вычислять и нормировать флуоресцентные сигналы ячеек биочипа.

## 2.8 Секвенирование фрагментов геномов

Секвенирование ДНК проводили в ЦКП «Геном» ИМБ РАН с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

При анализе генома возбудителей туберкулеза и микобактериозов определяли нуклеотидную последовательность генов *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis*, *embB*, используя последовательность лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv в качестве референсной.

При анализе геномов возбудителей ИРТ определяли нуклеотидную последовательность генов *rrs*, *rhl*, *gyrA*, *parC*, *mefA*, *mtrR*, *penA*, *ponA*, *porB*, *rpsJ*, *ntr4tv*, *ntr6tv*, *blaSHV*, *blaTEM*.

Установление генотипа и подтипа ВГС проводили, используя «золотой стандарт» генотипирования – секвенирование области NS5B с последующим филогенетическим анализом. Выравнивание последовательностей выполняли посредством ПО [ClustalX](#), построение филогенетических деревьев – методом присоединения соседей с порогом бутстрэп-анализа, составляющим более 70% для достоверного установления генотипа и подтипа ВГС, и последующей визуализацией дерева в ПО [Treeview 1.66](#).

## 2.9 Статистическая обработка результатов

Взаимосвязи между генотипическими и фенотипическими характеристиками микроорганизмов оценивали в программе Statistica 10 (StatSoft, США) с использованием модулей «кластерный анализ» и «факторный анализ». Коэффициент каппа Коэна использовали для оценки корреляций между разработанным гибридным подходом и микробиологическими тестами/секвенированием. Полученные результаты обрабатывали также методами дискриминантного анализа с использованием критерия  $\chi^2$  в программе MatLab (MathWorks Inc, США), учитывали значения с достоверностью  $P < 0,05$ .



### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **3.1 Создание методики, обеспечивающей полный цикл многопараметрического анализа биологического образца**

Анализ биологического образца с использованием ДНК-микрочипа включает ряд стадий, в т.ч. лизис клеток и/или вирусных частиц, получение очищенного препарата НК, амплификация с последующей гибридизацией на биочипе и обработкой полученных результатов. В условиях интенсивного развития технологий молекулярной диагностики актуальной является автоматизация процесса получения генетического материала из биологического образца. Особое внимание при этом уделяется увеличению числа одновременно обрабатываемых проб, качеству получаемых на выходе препаратов НК, а также простоте процедуры обработки, безопасности персонала и устойчивости к внутрилабораторной кросс-контаминации. В настоящей работе предложена методика, сочетающая автоматизированное выделение НК с их последующей мультиплексной амплификацией и гибридизацией на гидрогелевых биочипах.

##### **3.1.1 Разработка унифицированной процедуры выделения НК и ее реализация в микрофлюидной системе**

При разработке процедуры выделения и очистки НК принималось во внимание то, что она должна удовлетворять следующим требованиям:

- выделение ДНК и/или РНК должно производиться из биологических образцов различного типа, включая бактериальные клетки и вирусные частицы;
- выделение ДНК и РНК должно осуществляться с высоким выходом из образцов, содержащих  $10^4$  и более клеток и/или вирусных частиц;
- все стадии обработки образца и выделения НК должны проводиться в автоматическом режиме внутри микрофлюидного модуля;
- микрофлюидные модули, содержащие реагенты для обработки образца и выделения НК, должны храниться в течение длительного времени (6 месяцев и более).

Первой стадией обработки биологического образца является разрушение (лизис) клеточных стенок бактерий и оболочек вирусов с высвобождением НК. Для проведения ферментативного лизиса обычно используют такие ферменты, как лизоцим, субтилизин, протеиназа К. При химическом лизисе применяют солюбилизующие и дестабилизирующие агенты: поверхностно-активные вещества (SDS, тритон X-100, *N*-лаурилсаркозинат натрия) и хаотропные агенты, например, гуанидинтиоцианат (гидрохлорид) или перхлорат натрия в концентрации 3-6 М. Поскольку выделение ДНК и РНК должно производиться из биологических образцов, имеющих различное строение (бактериальные клетки и вирусные частицы), нами был выбран комбинированный двухстадийный ферментативный и химический лизис. Первая стадия лизиса включала обработку образца лизоцимом в концентрации 50 мг/мл, гидролизующим компоненты бактериальных клеточных стенок (пептидогликаны). Вторую стадию лизиса проводили в растворе, содержащем протеиназу К, хаотропный агент и детергент. Протеиназа К гидролизует белки, расщепляя пептидные связи, быстро инактивирует экзонуклеазы, а хаотропный агент способствует разрушению мембран и капсидных оболочек, в основном, за счет разрушения водородных связей и ослабления гидрофобных взаимодействий (солюбилизации водонерастворимых молекул). Кроме того, присутствие хаотропного агента в высокой концентрации является необходимым условием сорбции НК на силикагелевых носителях на последующем этапе выделения и очистки.

Условия проведения двухстадийного лизиса были отработаны при проведении экспериментов с клетками *E. coli* и *B. thuringiensis*, а также с клетками *E. coli*, инфицированными бактериофагами MS2 или  $\lambda$ . Первую стадию лизиса проводили при 37°C – температуре, оптимальной для действия лизоцима, на второй стадии температуру повышали до 60°, чтобы избежать выпадения кристаллов гуанидингидрохлорида из раствора. Таким образом, быстрое и эффективное разрушение клеточных мембран и оболочек вирусов достигалось при проведении лизиса в следующих условиях:

- первая стадия – инкубация образца в 1-м лизирующем буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА и 50 мг/мл лизоцима, рН 8,0, в течение 10 мин при 37°С и перемешивании;

- вторая стадия – инкубация образца в 2-м лизирующем буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 4,5М гуанидингидрохлорида, 1 мг/мл протеиназы К, 0,5% *N*-лаурилсаркозината натрия, рН 6,5, в течение 10 мин при 60°С и перемешивании.

Для получения высокоочищенного препарата НК был выбран метод экстракции НК на твердофазном сорбенте. Твердофазная экстракция НК является предпочтительным методом, так как, помимо простоты и скорости выполнения, данная процедура легко адаптируется в формат микрофлюидной системы. Для проведения сорбции нами были испытаны стекловолоконные фильтры серии GF и силикагель G-60. В экспериментах использовали лизаты бактериальных клеток и/или фаговых частиц, полученные после описанной выше процедуры двухстадийного лизиса.

Эффективная экстракция как ДНК, так и РНК на твердофазном носителе достигалась только в присутствии этанола в сорбционном буферном растворе. В отсутствие этанола происходила сорбция и последующая элюция только ДНК (но не РНК). Концентрация этанола 30 об. % оказалась оптимальной для эффективного выделения и очистки ДНК и РНК из лизата на данных носителях.

Из всех исследуемых сорбентов наиболее подходящим оказался стекловолоконный фильтр GF/C (Whatman, Великобритания), позволяющий количественно сорбировать и десорбировать с микроколонки  $10^3$  и более геном-эквивалентов ДНК и РНК. Для удаления соединений, неспецифически связавшихся с сорбентом, колонку с фильтром и сорбированными на нем НК последовательно промывали смесью буфера, содержащего 0,15 М трис-НСl, 0,05 М ЭДТА, 3 М гуанидингидрохлорида, рН 8,0, с этанолом (до 50%) и далее – 80%-м этанолом. При такой промывке нерастворимые в этаноле нуклеиновые кислоты оставались связанными с сорбентом. Элюцию нуклеиновых кислот

проводили низкосолевым буфером (TE буфер) или водой. Процедура селективной экстракции НК в колонке с фильтром занимала не более 10 минут.

Таким образом, для выделения и очистки НК бактериальных клеток и/или фаговых (вирусных) частиц была разработана унифицированная процедура, включающая двухстадийный лизис с последующей твердофазной сорбцией-десорбцией НК на колонке, содержащей стекловолоконный фильтр.

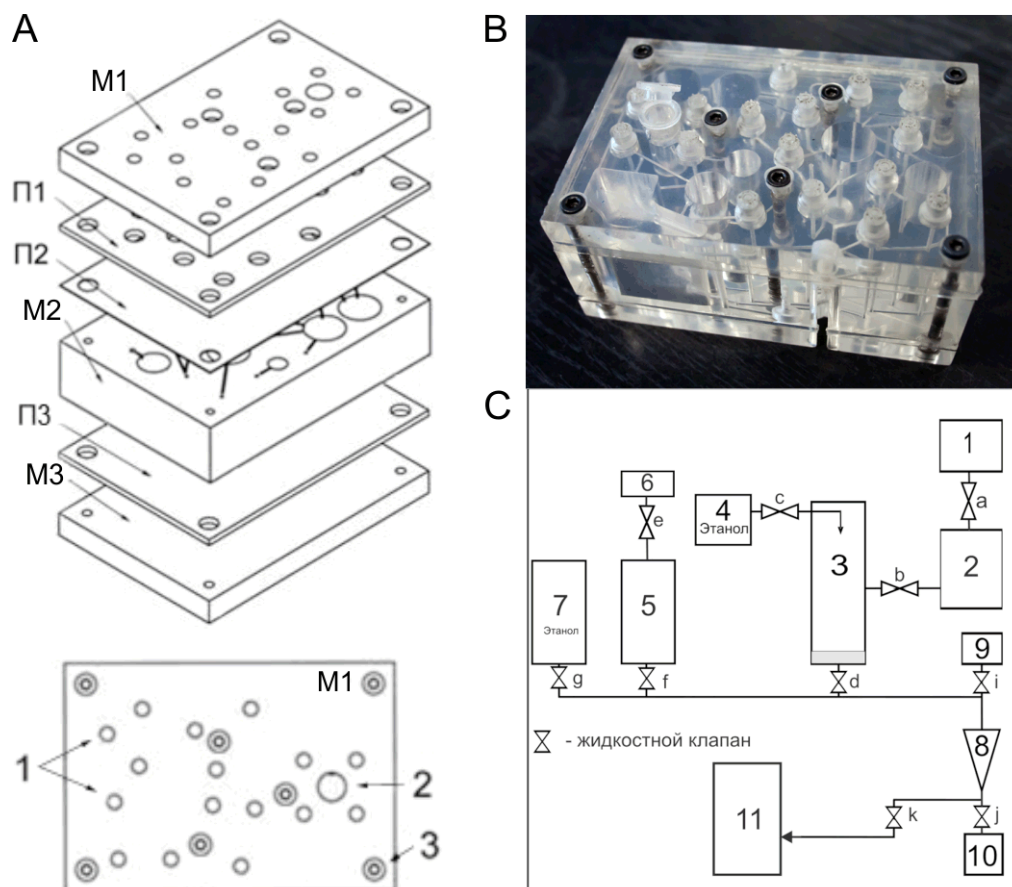
### **3.1.2 Хранение реагентов для выделения и очистки нуклеиновых кислот внутри микрофлюидного модуля**

Общей проблемой для всех разработчиков микрофлюидных систем, в которых происходят химические и биохимические реакции и растворение реагентов и реакционных смесей, является хранение реагентов внутри устройств (Hoffmann et al., 2010; Tijero et al., 2015). Данная проблема была решена нами следующим образом. Необходимые для обработки образца растворы, которые помещают в резервуары модуля, содержат ферменты для проведения лизиса (лизоцим и протеиназа К), буферы для лизиса и промывки с высокой концентрацией хаотропного агента (гуанидингидрохлорид в концентрации 3 М и выше). Для того, чтобы избежать потери активности ферментов, готовые к работе модули с реагентами должны храниться при температуре не выше 10°C, однако при этих условиях происходит кристаллизация хаотропного агента. Чтобы исключить инактивацию ферментов и кристаллизацию солей нами предложено хранить реагенты для приготовления лизирующих буферов и промывочного буфера в виде лиофилизированных смесей. Таким образом, в одних резервуарах микрофлюидного модуля содержались сухие реагенты, а в других – их растворители – водно-спиртовые смеси, которые также можно хранить в течение длительного времени. Растворение сухих смесей происходило в ходе процедуры выделения и очистки. Растворение лиофилизированных компонентов 1-го лизирующего буфера, содержащего лизоцим, происходило при введении жидкого биологического образца в соответствующий резервуар, а растворителем компонентов 2-го лизирующего буфера, содержащего гуанидингидрохлорид, протеиназу К и N-

лаурилсаркозинат натрия, являлась реакционная смесь после прохождения первой стадии лизиса. Использование буферов в виде сухих реакционных смесей в составе микрофлюидного модуля позволило осуществлять его хранение при температуре от +4 до +8 С в течение не менее 6 месяцев без снижения активности какого-либо реакционного компонента.

### 3.1.3 Сменный микрофлюидный модуль для выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологического образца

Для выделения НК из одного образца модуль представлял собой параллелепипед, выполненный из материалов (полипропилен, силикон), инертных по отношению к используемым реагентам и не сорбирующих НК, и содержащий резервуары, микроканалы и клапаны, осуществляющие перемещение реакционных жидкостных объемов в процессе выделения НК (рис. 14).



**Рис.14.** (А) Конструктивные элементы сменного микрофлюидного модуля. М1 – верхняя панель (крышка, вид сверху), полипропилен, 2 мм. На верхней панели расположены: 1 – отверстия для штоков соленоидов (16 шт.); 2 – отверстие для приемной камеры образца; 3 – отверстия для фиксирующих винтов; П1, П3 – прокладки, силикон, 2 мм; П2– прокладка,

полиэтилен, 50 мкм; М2 – основная рабочая платформа, полипропилен, 20 мм; М3 – нижняя панель, полипропилен, 7 мм. **(В)** Фотография микрофлюидного модуля. **(С)** Принципиальная схема основной рабочей платформы модуля М2: 1 - приемная камера для образца, 2 - резервуар с лиофилизованной реакционной смесью 1-го лизирующего буфера, 3 - резервуар с лиофилизованной реакционной смесью 2-го лизирующего буфера, 4 - резервуар, содержащий 96%ный этанол для добавления к лизату биологического образца, 5 - резервуар с лиофилизованной смесью промывочного буфера. 6 - резервуар со смесью этанол-вода (1 : 1, об.) для растворения лиофилизованной смеси промывочного буфера, 7 - резервуар, содержащий 80%ный этанол для промывки микроколонки с твердофазным сорбентом, 8 - микроколонка с твердофазным сорбентом, 9 - резервуар с раствором для элюции нуклеиновых кислот с микроколонки, 10 - резервуар для сбора очищенного продукта, 11 - резервуар для сбора отходов, а – к клапаны, регулирующие перемещение жидкостных реакционных смесей и реагентов в резервуарах и каналах модуля.

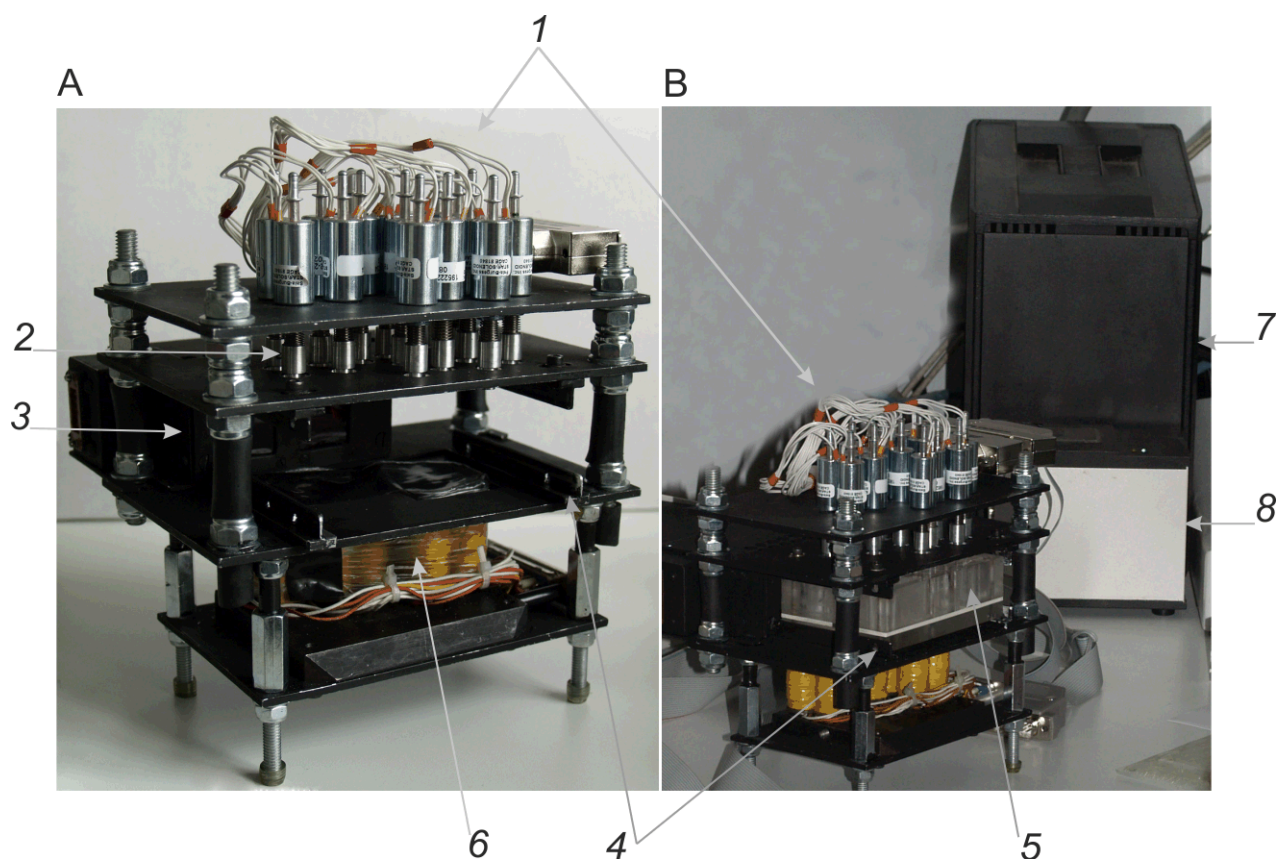
Микрофлюидный модуль состоял из нескольких конструктивных элементов (рис. 14А). Резервуары для хранения реакционных смесей и растворителей, обработки образца, микроколонка с сорбентом и каналы были сформированы внутри основной рабочей платформы. Модуль закрывался верхней и нижней крышками (панелями) через эластичные прокладки. На верхней панели расположены 16 отверстий для штоков соленоидов, отверстие для приемной камеры образца, семь отверстий для фиксирующих винтов. Линейные размеры модуля (длина × ширина × высота) составляли 94 × 64 × 40 мм. Модуль рассчитан на обработку 100-500 мкл биологического образца.

Перемещение реакционных смесей и реагентов в резервуарах модуля осуществлялось подачей давления в соответствующие резервуары с помощью компрессора по системе каналов и клапанов (клапаны **а – к** на рис. 14С), выполненных с использованием эластичных прокладок модуля. Необходимое избыточное давление составляло 1,5-2,0 атм. Открытие и закрытие клапанов, регулирующих перемещение реакционных смесей и реагентов в каналах и резервуарах модуля, подача давления в резервуары модуля, нагревание и перемешивание реакционных смесей происходило с помощью устройств, входящих в состав блока управления. Для перемешивания растворов в резервуарах модуля, где это необходимо, в основании резервуаров имеются ниши для магнитных мешалочников (стальные стержни в тефлоновой оболочке).

Готовый к работе модуль устанавливали в блок управления. Биологический образец помещали в приемную камеру модуля, и далее все

стадии лизиса клеток, микроорганизмов и вирусных частиц, очистки и элюции нуклеиновых кислот осуществлялись последовательно в резервуарах модуля, изолированных от внешней среды. Процесс обработки биологического образца с использованием данного устройства управлялся компьютером с соответствующим ПО.

Ввод сменного микрофлюидного модуля в блок управления происходил вдоль верхних и нижних направляющих салазок (Рис. 15), которые обеспечивали его точное позиционирование. Коммутация воздушных и жидкостных потоков в модуле выполнялась 16 клапанами с электрическим управлением. После помещения модуля в блок управления и срабатывания запорного механизма модуль занимал положение, при котором штоки всех 16 соленоидов оказывались точно над соответствующими запорными головками клапанов модуля. Нагревание резервуаров модуля, в которых происходит лизис и растворение сухих реакционных смесей буферов, осуществлялся элементами Пельтье, расположенными под гнездом установки сменного модуля в блоке управления; там же установлены магнитные устройства для перемешивания растворов и реакционных смесей. Для общего управления элементами Пельтье, клапанами, перемешивающими устройствами и др. был разработан единый микропроцессорный блок.



**Рис. 15.** Блок управления установки для автоматизированного выделения и очистки нуклеиновых кислот (**А** – без микрофлюидного модуля, **В** – готовая к работе установка с помещенным в нее микрофлюидным модулем). **1** – блок соленоидов для управления клапанами микрофлюидного модуля, **2** – штоки соленоидов, **3** – блок нагревателей, **4** – направляющие салазки для помещения микрофлюидного модуля в блок управления, **5** – микрофлюидный модуль, **6** – блок электромагнитных мешалок, **7** – компрессор, **8** – блок электронного управления.

Процедура выделения и очистки НК в микрофлюидном модуле состояла из следующих этапов (см. схему на Рис. 14С):

*Первая стадия лизиса.* Биологический образец помещали в приемную камеру **1** с помощью пипетки или любого дозирующего устройства. При открытии клапана (остальные клапаны закрыты) образец поступал в резервуар **2**, содержащий лиофилизованные компоненты 1-го лизирующего буфера. В резервуаре **2** одновременно происходило растворение компонентов реакционной смеси 1-го лизирующего буфера и первая стадия лизиса, причем растворителем для сухой смеси буфера являлся сам жидкий биологический образец. Первая стадия лизиса проводилась при интенсивном перемешивании и нагревании до 37°C в течение 10 мин.



*Вторая стадия лизиса.* Через открытый клапан **b** (остальные клапаны закрыты) реакционная смесь после первой стадии лизиса поступала в резервуар 3, содержащий лиофилизованную смесь 2-го лизирующего буфера. Растворение сухой смеси 2-го лизирующего буфера и вторая стадия лизиса происходили одновременно, а растворителем для сухой смеси являлась реакционная смесь после первой стадии лизиса. Вторая стадия лизиса проводилась также при интенсивном перемешивании и нагревании до 60°C в течение 10 мин.

*Подготовка промывочного буфера.* Одновременно с проведением второй стадии лизиса водно-спиртовая смесь из резервуара 6 поступала в резервуар 5, содержащий сухую реакционную смесь буфера для промывки твердофазного сорбента (клапан **e** открыт, клапан **f** закрыт). Растворение сухой смеси буфера проводилось при интенсивном перемешивании.

*Создание оптимальных условий связывания нуклеиновых кислот с твердофазным сорбентом.* В резервуар 3 с лизатом биологического образца после второй стадии лизиса добавляли этанол из резервуара 4 до концентрации 30 об. % (клапан **c** открыт, остальные клапаны закрыты).

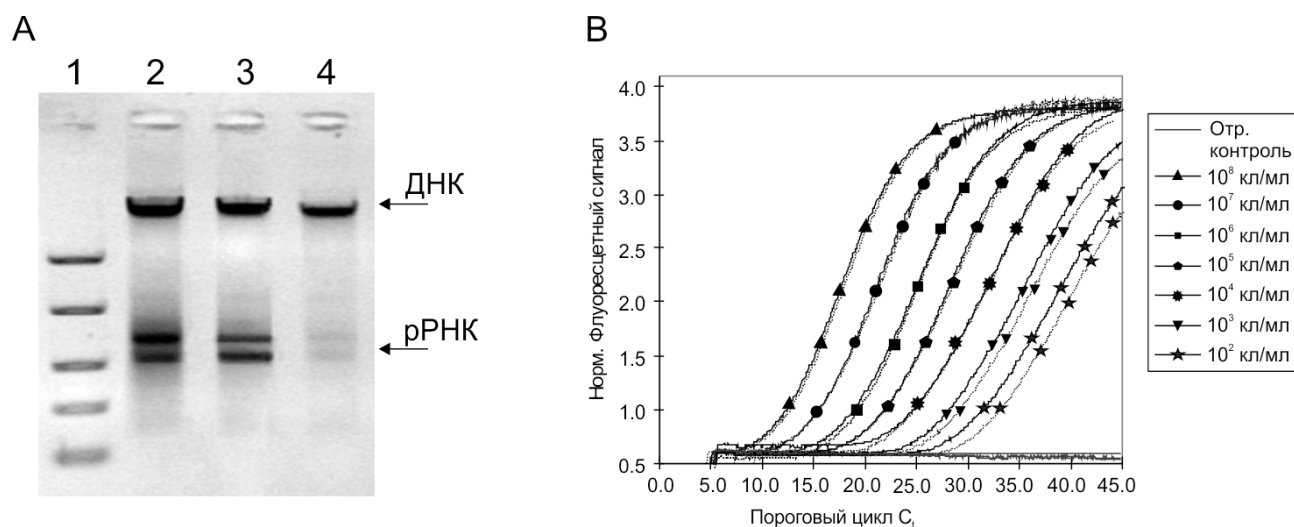
*Сорбция нуклеиновых кислот на твердофазном сорбенте.* Реакционная смесь из резервуара 3 поступала на микроколону 8 со стекловолоконным фильтром. Нуклеиновые кислоты сорбировались на фильтре, а вещества, не связавшиеся с сорбентом, удалялись в резервуар для сбора отходов 11 (клапаны **d** и **k** открыты, остальные закрыты).

*Отмывка твердофазного сорбента.* На микроколону 8 подавался промывочный буфер из резервуара 5 и затем 80%-й этанол из резервуара 7. Растворы после промывки поступали в резервуар для сбора отходов 11 (открывались клапаны **f**, **k** и клапаны **g**, **k** соответственно).

*Элюция НК с микроколони.* Нуклеиновые кислоты элюировали с твердофазного сорбента пропусканием раствора для элюции (вода или низкосолевого ТЕ-буфер) из резервуара 9 (клапаны **i**, **j** открыты, остальные закрыты). Очищенный препарат поступал в резервуар для сбора продукта 10. Выходной порт модуля совместим со стандартной микропробиркой объемом

0,2 мл, которую можно использовать для проведения ПЦР. Весь процесс выделения и очистки с момента введения образца занимал не более 40 мин.

Разработанное устройство на основе микрофлюидных модулей позволяет проводить в автоматическом режиме эффективное выделение как ДНК, так и РНК из бактерий и/или вирусных (фаговых) частиц (рис. 16А).



**Рис. 16.** (А) Результаты выделения НК с использованием микрофлюидного модуля и стандартных методов выделения. 1 – Молекулярный маркер «FastRuler Medium Range»; 2 – выделение НК из культуры *B.thuringiensis* ( $\sim 10^8$  КОЕ/мл) с использованием микрофлюидного модуля; 3 – выделение НК из культуры *B.thuringiensis* ( $\sim 10^8$  КОЕ/мл) стандартным методом лизиса с последующей фенол-хлороформной экстракцией и переосаждением НК этанолом, 4 - выделение НК из культуры *B.thuringiensis* ( $\sim 10^8$  КОЕ/мл) с помощью набора реагентов для выделения геномной ДНК «Genomic DNA Purification Kit» («Fermentas», Литва). (В) Результаты проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени с ДНК фага  $\lambda$  в качестве матрицы, выделенной из различных разведений клеток *E.coli*, инфицированных фагом ( $10^8$ - $10^2$  в 1 мл исходного образца), с использованием стандартного метода выделения (сплошная линия) и микрофлюидных модулей (прерывистая точечная линия). Кривые получены при различных разведениях клеток: 1 –  $10^8$ , 2 -  $10^7$ , 3 -  $10^6$ , 4 -  $10^5$ , 5 –  $10^4$ , 6 -  $10^3$ , 7 -  $10^2$  кл/мл, 8 – отрицательный контроль реакции.

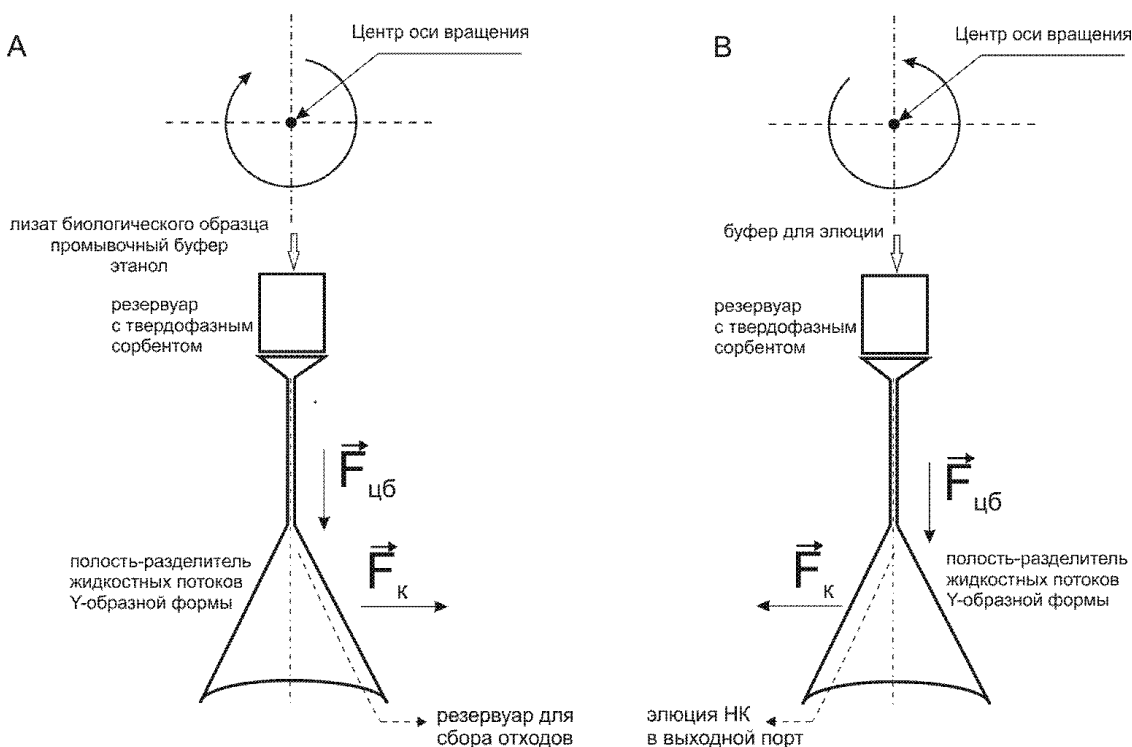
Количественную оценку автоматизированного выделения НК из разведений культур клеток в сравнении со стандартными методами проводили с использованием метода ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Результаты амплификации фрагмента генома фага  $\lambda$  с ДНК фага в качестве матрицы, выделенной из различных разведений клеток *E.coli*, инфицированных фагом ( $10^8$ - $10^2$  в 1 мл исходного образца) представлены на рис. 16В. Концентрации препаратов ДНК, выделенных автоматизированным и стандартным методом из культур, содержащих  $10^4$  -  $10^8$  КОЕ/мл, отличались не более чем на 20%.

Сконструированное устройство на основе микрофлюидного модуля позволяет проводить быстрое (до 40 мин) выделение нуклеиновых кислот из клеток микроорганизмов и/или вирусов в автоматическом режиме с низкими потерями (Khodakov et al., 2010; Mamaev et al., 2011). Процедура выделения и очистки осуществляется внутри картриджа, изолированного от внешней среды, что сводит к минимуму риск заражения персонала. Полученные препараты НК могут быть использованы в амплификации или гибридизации на биочипах для непосредственной идентификации инфекционного агента в исследуемом образце или для проведения дальнейшего молекулярно-генетического анализа.

#### **3.1.4 Реализация микрофлюидной системы при одновременном выделении нуклеиновых кислот из нескольких биологических образцов**

Описанное выше устройство позволяло проводить выделение ДНК и РНК из одного биологического образца. В то же время, простое мультиплицирование такой системы в условиях одновременной обработки десятков образцов потребовало бы значительного усложнения механической части блока управления, реализации системы подачи высоких (от 1 атм.) давлений в резервуары модулей. Параллельное перемещение газожидкостных потоков внутри модулей через разветвленную сеть пневматических клапанов привело бы к неизбежным потерям НК при выделении за счет значительных остаточных объемов реагентов в резервуарах и каналах модулей. Еще одной проблемой, влияющей на снижение выхода НК при параллельной работе нескольких модулей, является низкая эффективность осушения связанных на твердофазном сорбенте НК посредством пропускания воздуха через каналы малого диаметра. Решением данных задач стала иная реализация устройства для одновременного автоматизированного выделения и очистки НК из нескольких биологических образцов, основанная на использовании сил, возникающих при вращении объектов (Рис. 17), что обеспечивает ряд преимуществ, в число которых входят:

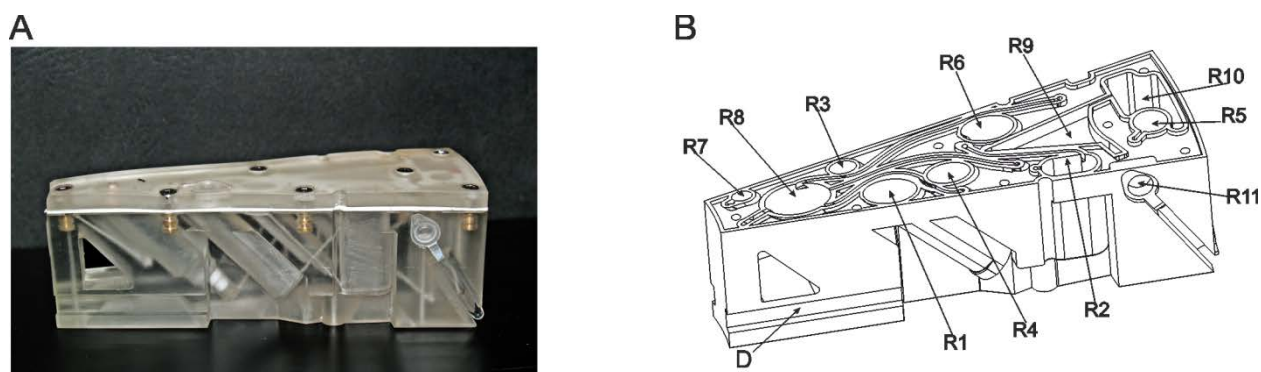
- простота и высокая скорость (от 1 нл/сек до 1 мл/сек) перемещения газожидкостных потоков, не зависящая от pH, ионной силы, химического состава жидкости;
- отсутствие необходимости использовать высокие давления для перемещения реакционных смесей внутри устройств;
- отсутствие остаточных продуктов от промежуточных стадий выделения в каналах и резервуарах;
- возможность миниатюризации при создании устройств для одновременной обработки нескольких биологических образцов.



**Рис. 17.** Системы на основе центрифугирования контролируют перемещение жидкостных потоков, используя силу Кориолиса  $F_k$ . «Переключатель» Кориолиса представляет собой Y-образную структуру с одним входом и двумя выходными портами, размещенную на вращающемся диске. При вращении диска вокруг центральной оси по часовой стрелке (А) поток жидкости направляется в один выходной порт (например, «резервуар для отходов»), а при вращении против часовой стрелки (В) – в другой («выходной порт») под действием центробежной силы ( $F_{цб}$ ) и силы Кориолиса ( $F_k$ ).

Устройства для выделения и анализа НК на основе центрифугирования являются весьма популярными, однако подавляющее большинство из них представлены в виде микрофлюидных систем на поликарбонатных CD дисках (Kong et al., 2016). В предложенной нами реализации выделение НК происходило одновременно в 24-х одноразовых микрофлюидных модулях,

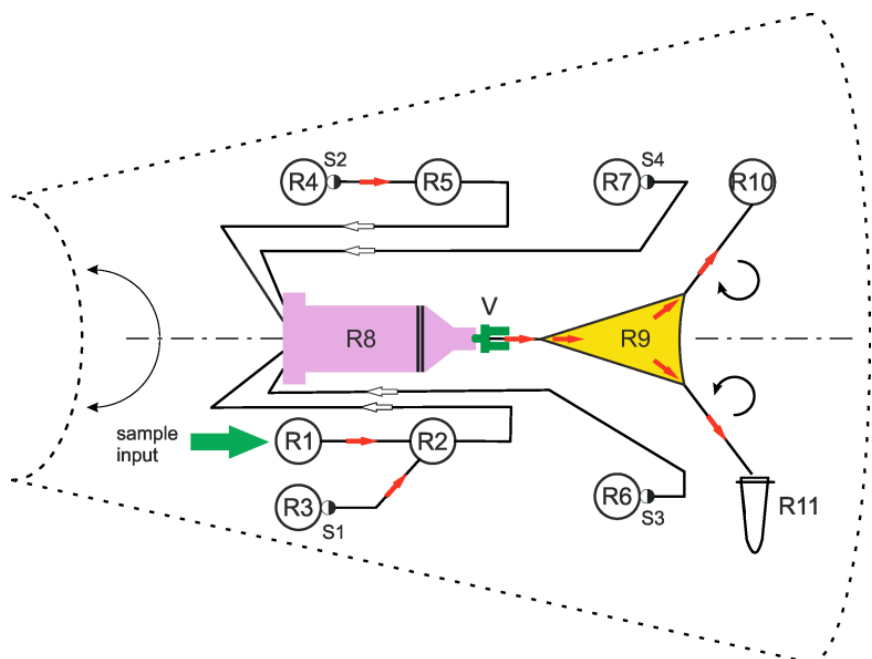
расположенных на вращающейся платформе, закрепленной на валу электродвигателя. Одноразовый модуль представляет собой сегмент кругового цилиндра (Рис. 18), изготовленный из полиуретана методом литья под давлением, и содержащий герметично закрывающуюся приемную камеру для ввода биологического образца и выходной порт для очищенного раствора НК с подсоединенной стандартной микроцентрифужной пробиркой. Перемещение жидкостей в резервуарах модулей осуществлялось либо при вращении платформы, либо при подаче незначительного (не более 0,1 атм) избыточного давления в соответствующие резервуары модулей. Такая конструкция позволяет одновременно проводить обработку 24-х образцов, осуществлять перемещение реагентов без остаточных объемов, обеспечивать эффективную сушку твердофазного носителя (стекловолоконный фильтр).



**Рис. 18.** Фотография (А) и схема размещения резервуаров микрофлюидного модуля (В). Обозначения: R1 - приемная камера для ввода жидкого биологического образца, содержащая сухую смесь первого лизирующего буфера, включая лизоцим; R2 – резервуар с сухой смесью второго лизирующего буфера, содержащего хаотропный агент, протеолитический фермент и детергент; R3 – 96% этанол; R4 - 65% этанол; R5 - резервуар с сухой смесью промывочного буфера, содержащего хаотропный агент; R6 – 80% этанол; R7 – буфер для элюции; R8 – микроколонка для сорбции НК, содержащая стекловолоконный фильтр GF/C; R9 – полость-разделитель реакционных смесей; R10 – резервуар для сбора отходов; R11 – резервуар для сбора очищенных НК; D – магистраль (канал) для горячего воздуха, обеспечивающий нагрев реакционных смесей в резервуарах R1, R2 и R5. Конфигурация и размеры каналов, резервуаров и полостей оптимизированы таким образом, чтобы минимизировать «мертвые объемы» смесей, исключить возможность смешивания продуктов выделения и компонентов разных стадий, уменьшить потери в выходе НК.

Функциональная схема процедуры лизиса бактериальных клеток/вирусных частиц с последующей очисткой и элюцией НК в модуле приведена на Рис. 19. Биологические образцы вводятся в приемные камеры модулей R1. Диапазон объемов жидкого образца, из которого проводится

выделение НК составляет от 50 до 500 мкл, в работе использовали образцы объемом 300 мкл.



**Рис. 19.** Функциональная схема выделения и очистки НК в модуле. Обозначения: R1-R10 - резервуары модуля. S1-S4 – запорные пробки. V – клапан в микроколонке. Красные стрелки обозначают направление движения реакционных смесей при вращении платформы, белые – при подаче избыточного давления в соответствующие резервуары модуля. Направление вращения указано черными стрелками.

Процесс выделения и очистки нуклеиновых кислот включал следующие стадии, происходящие одновременно внутри каждого модуля:

*Первая стадия лизиса.* При поступлении образца в приемную камеру R1 происходит растворение сухой смеси 1-го лизирующего буфера и 1-я стадия лизиса под действием лизоцима. Лизис производится при нагревании резервуара R1 до 37°C и перемешивании, длительность стадии – 5 минут. Стадия заканчивается закручиванием платформы модулей с частотой 540 об/мин в течение 30 сек, в результате чего происходит перемещение жидкости из резервуара R1 в резервуар R2. Запорная пробка S1 в резервуаре R3, содержащем этанол, на этой частоте вращения остается на месте, удерживая этанол от перетекания в резервуар R2.

*Вторая стадия лизиса.* После остановки платформы в резервуаре R2 происходит растворение сухой смеси 2-го лизирующего буфера, причем растворителем служит реакционная смесь после 1-ой стадии лизиса, и далее 2-я

стадия лизиса под действием протеиназы К, гуанидингидрохлорида и детергента. Процесс происходит при нагревании резервуара R2 до 60°C и перемешивании. Длительность стадии – 12 мин.

*Создание оптимальных условий связывания нуклеиновых кислот с твердофазным носителем.* После завершения 2-стадии лизиса платформа закручивается до частоты 6600 об/мин на 30 сек. При этом открывается пробка S1, и этанол перетекает из резервуара R3 в R2, содержащий лизат биологического образца. Одновременно при этой частоте вращения открываются пробки S2, S3 и S4, открывая каналы для перетекания реагентов. Смесь этанол/вода перемещается из резервуара R4 в R5, растворяя сухую смесь промывочного буфера. Растворение происходит при нагревании резервуара R5 до 60°C и перемешивании. Следует отметить, что перемещение жидкостей из резервуаров R6 и R7 при вращении не происходит даже при открытых пробках S3 и S4: для их перемещения требуется подача избыточного давления в резервуары R6 и R7.

*Сорбция нуклеиновых кислот на твердофазном носителе.* При подаче давления в резервуар R2 (0,1 атм., 30 сек) подготовленная реакционная смесь перемещается в резервуар R8 с фильтром, на котором происходит сорбция нуклеиновых кислот. Дальнейший путь жидкости перекрыт установленным на выходе из резервуара R8 клапаном V, который открывается при вращении платформы на частоте 6600 об/мин и закрывается при торможении платформы. Далее платформа раскручивается по часовой стрелке до частоты 6600 об/мин на 30 сек. На этой частоте открывается клапан V, и жидкость попадает в полость-разделитель потоков R9 треугольной формы. Под действием силы Кориолиса жидкостной поток отклоняется к левой (по направлению потока) стенке полости и попадает в резервуар для отходов R10. По окончании стадии платформа модулей останавливается, и при торможении на частотах ниже 5000 об/мин. клапан V закрывается. Длительность стадии – 4 мин.

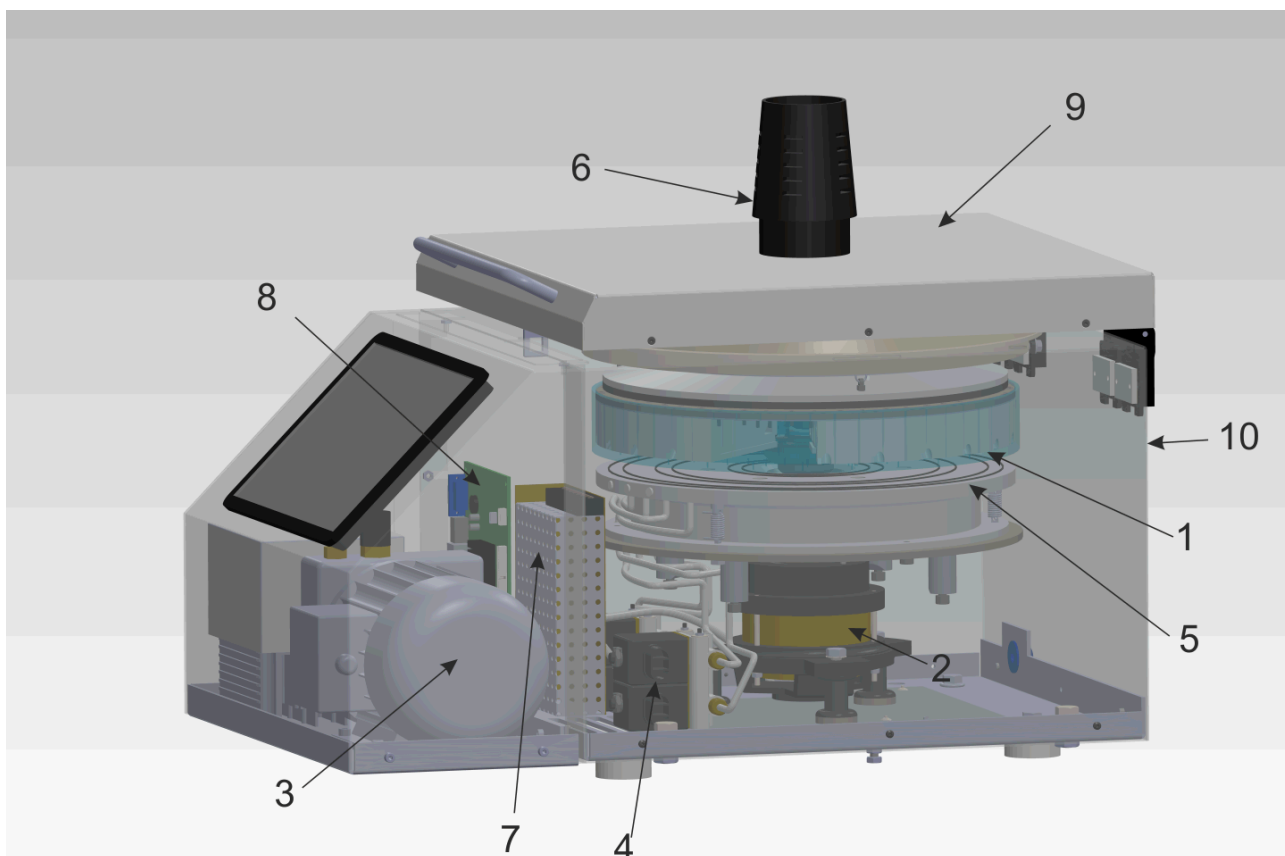
*Отмывка и сушка твердофазного носителя.* После остановки платформы и подачи давления 0,1 атм. в резервуар R5 ранее подготовленный промывочный

буфер перемещается из R5 в R8. Платформа модулей снова раскручивается по часовой стрелке до 6600 об/мин на 30 сек. Аналогично предыдущей стадии, жидкость после промывки фильтра попадает в полость-разделитель потоков R9 и далее в резервуар для отходов R10. После прекращения вращения платформы давление 0,1 атм. подается в резервуар R6, и аналогичным образом проводится отмывка фильтра 80% этанолом. После перемещения всего промывочного раствора в сборник отходов платформа модуля продолжает вращаться 1 мин. с частотой 6600 об/мин, и при этом происходит сушка стекловолоконного фильтра. Длительность стадий промывки и сушки – 10 мин.

*Элюция нуклеиновых кислот.* В резервуар R7, содержащий элюирующий раствор (вода), подается давление 0,1 атм., и раствор перемещается в R8. Далее платформа модулей раскручивается против часовой стрелки до частоты 6600 об/мин. Под действием силы Кориолиса жидкостной поток в полости-разделителе R9 отклоняется к правой (по направлению потока) стенке полости и попадает в приемную пробирку R11. Длительность стадии элюции – 7 мин. Общее время обработки образца в модулях составляет 40 мин.

Перемещение реагентов в каналах модулей при вращении платформы происходит, в основном, на высоких оборотах (~ 6600 об./мин), что полностью удаляет остаточные количества жидких реагентов из каналов модулей. На таких же высоких скоростях вращения осуществляется и сушка стекловолоконных фильтров в модулях, что существенно упрощает процедуру очистки с использованием твердофазного носителя. Разработан аппаратный комплекс для одновременного автоматизированного выделения и очистки нуклеиновых кислот из нескольких биологических образцов (АК ВНК), включающий ротор с 24 одноразовыми флюидными модулями, функциональные элементы, обеспечивающие вращение, подачу давления, нагрев, перемешивание, балансировку, управление электронными компонентами в процессе выделения (Mamaev et al., 2015) (Рис. 20).



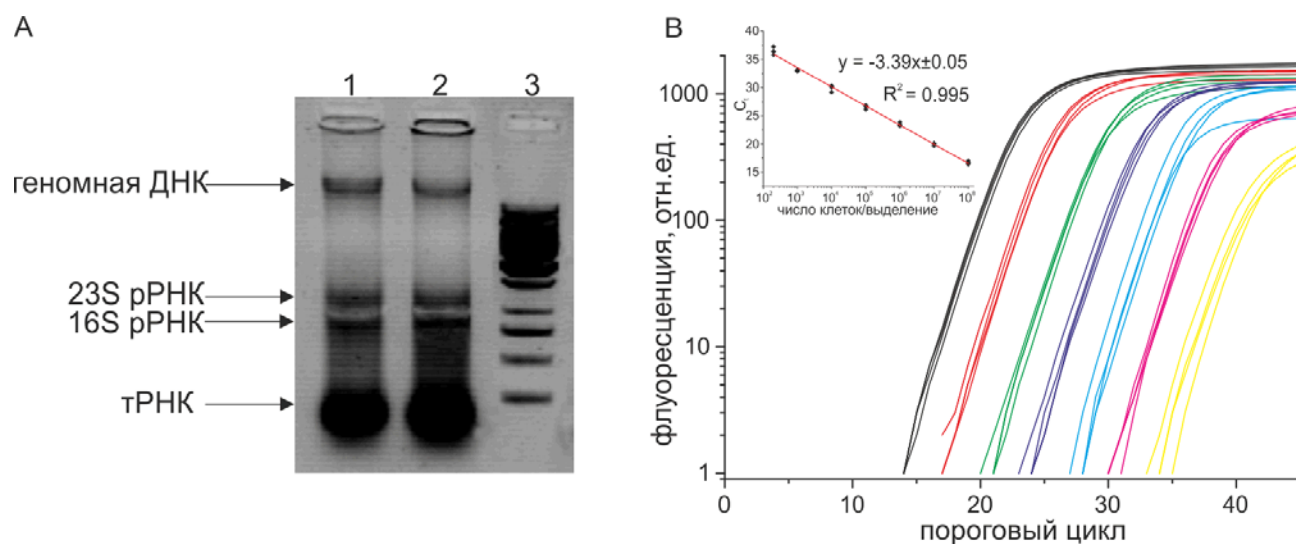


**Рис. 20.** Функциональные элементы аппаратного комплекса для автоматизированного выделения нуклеиновых кислот из нескольких (до 24) биологических образцов. 1 – ротор с модулями; 2 – электродвигатель, обеспечивающий вращение; 3 – компрессор; 4 – блок воздушных клапанов; 5 – распределитель воздушных потоков; 6 – нагреватель (фен); 7 – блоки питания; 8 – контроллер; 9 – крышка; 10 – корпус комплекса.

Эффективность разработанной платформы оценивали, проводя выделение нуклеиновых кислот из бактериальных клеток и вирусных частиц в автоматическом режиме и с использованием референс-наборов с последующим их анализом методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

На рис. 21А представлен пример автоматизированного выделения нуклеиновых кислот из клеток *B. thuringiensis* ( $10^8$  клеток/мл). В качестве метода сравнения использовали стандартную процедуру выделения и очистки ДНК в «ручном» режиме с использованием коммерческого набора. На электрофоретической картине во всех препаратах наблюдали наличие специфичных полос, соответствующих геномной ДНК и двойной (или размытой) полосы на уровне 1500-2200 п.н., соответствующих рибосомной РНК (рРНК). Таким образом, предложенная процедура автоматизированного

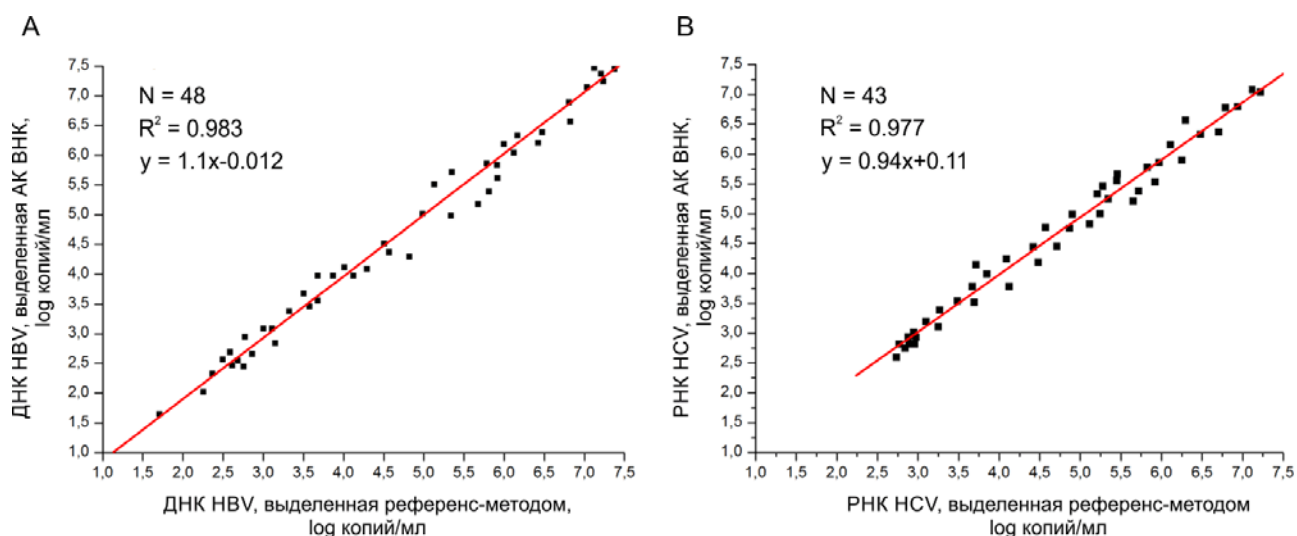
выделения позволяет получать как интактные высокомолекулярные препараты ДНК (~40 тыс. п.н), так и различные типы РНК. Для оценки воспроизводимости проводили автоматизированное выделение из клеток *B. thuringiensis* в разведениях от  $10^8$  до  $10^2$  клеток/мл одновременно в 4 повторностях. Концентрацию выделенных нуклеиновых кислот оценивали по пороговому циклу  $C_t$  с использованием ПЦР в реальном времени (Рис. 21В). Коэффициент вариации порогового цикла по четырем повторностям для каждого разведения не превышал 3%, что подтверждало воспроизводимость выделения в микрофлюидных модулях. Выход НК был линейным по всему динамическому диапазону разведений от  $10^2$  to  $10^8$  кл/мл (см. врезку на Рис. 21В).



**Рис. 21.** Оценка эффективности выделения бактериальных НК с использованием АК ВНК. (А) Электрофоретическая картина НК в 0,8% агарозном геле. Дорожки: 1 – образец НК, полученный в микрофлюидном модуле АК ВНК; 2 – образец НК, полученный с использованием ручного метода выделения; 3 – молекулярный маркер  $\lambda$ /Hind III. (В) Результаты проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени с ДНК с ДНК *B. thuringiensis*, изолированной из разведений клеток ( $10^8$ - $10^2$  в 1 мл исходного образца) с использованием АК ВНК. На врезке: зависимость медианы порогового цикла  $C_t$  от количества клеток.

Для оценки эффективности выделения вирусных НК проводили анализ 91 образца цельной крови и плазмы крови, в которых серологическими методами было установлено наличие вируса гепатита В (HBV) (48 образцов) и ВГС (43 образца). Нуклеиновые кислоты выделяли в автоматическом и ручном режимах с использованием референс-набора, концентрации определяли по пороговому циклу ПЦР. Результаты представлены в виде корреляций при определений концентраций HBV ДНК (Рис. 22А) и HCV РНК (Рис. 22В), выделенных в

автоматическом режиме АК ВНК и с использованием референс-наборов в ручном режиме.



**Рис. 22.** Корреляции концентраций ДНК ВГВ (А) и РНК ВГС (В), выделенных из образцов крови и плазмы с использованием АК ВНК и референсных наборов.

Среди 48 HBV-положительных образцов 10 были с концентрацией менее 1000 копий/мл, 5 – более  $10^7$  копий /мл. Минимальная определённая концентрация составила 70 копий /мл. Среди 41 образцов плазмы крови и цельной крови, содержащей вирус гепатита С, минимальная обнаруженная концентрация составила 750 копий/мл, 9 образцов имели концентрацию менее 1000 копий/мл, 2 образца – более  $10^7$  копий/мл.

Коэффициенты регрессии  $R^2$  для корреляции по HBV и HCV составили 0.983 и 0.977, соответственно, что свидетельствует о хорошей сходимости результатов выделения вирусных НК в автоматическом и ручном режимах. При этом динамический диапазон концентраций выделенных препаратов вирусной ДНК составил 7 порядков, для вирусной РНК это значение 6 порядков на данной выборке анализируемых образцов.

Как показывают результаты, разработанная процедура на основе микрофлюидных модулей для одновременной автоматизированной обработки 24-х биологических образцов позволяет эффективно выделять бактериальные и вирусные нуклеиновые кислоты из образцов, содержащих  $10^2$ - $10^8$  клеток и/или частиц. Полученные препараты НК далее использовали в различных приложениях, включая мультиплексную амплификацию фрагментов геномов с

последующим многопараметрическим анализом на биочипах.

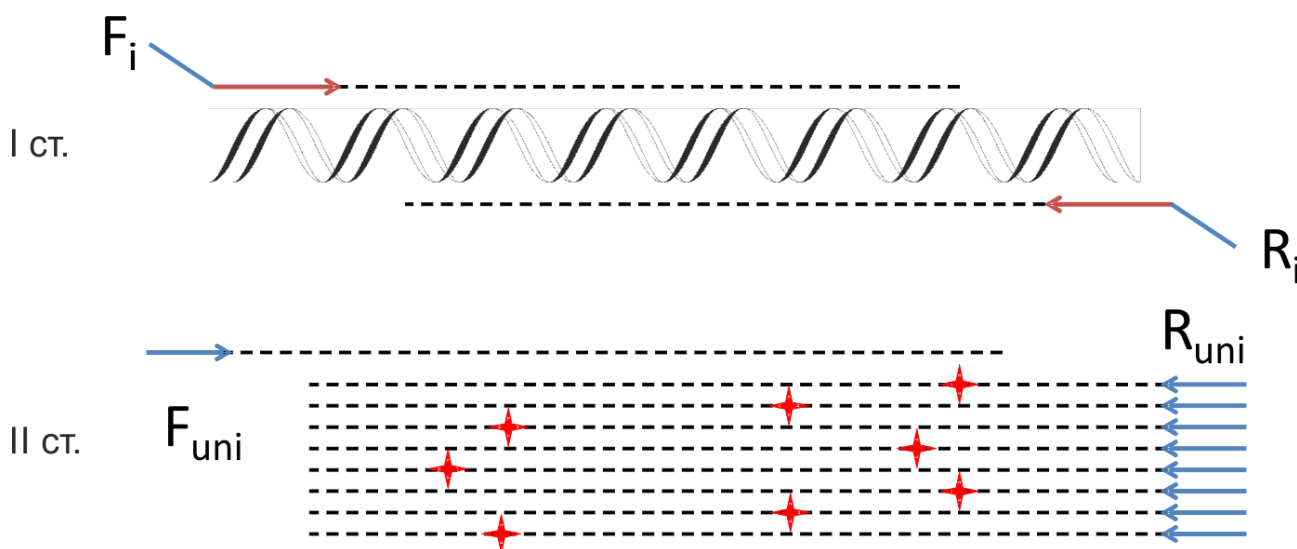
### **3.1.5 Мультиплексная амплификация исследуемых сегментов геномов с их одновременным флуоресцентным маркированием**

Эффективность амплификации НК является ключевым фактором, определяющим чувствительность процедуры многопараметрического анализа геномов. Наряду с высокой аналитической чувствительностью, необходимой для анализа ДНК, выделенной из клинического материала, приоритетным является максимальный охват одновременно амплифицируемых специфичных мишеней. Проведена экспериментальная оценка различных моделей мультиплексной амплификации НК. Применение изотермических вариантов амплификации сегментов генома с вытеснением цепи, либо по принципу катящегося кольца (Кашкин и др., 2005), ограничено невысокой аналитической чувствительностью (от 10000 геном-эквивалентов геномной ДНК/реакцию) и доступностью в РФ соответствующих ферментов. Мультиплексная твердофазная ПЦР с праймерами, иммобилизованными через аминокислотную группу на 5'-конце в гидрогелевых элементах биочипа, продемонстрировала высокую чувствительность при идентификации специфичных мишеней в бактериальных и вирусных геномах (Gryadunov et al., 2001; Remov et al., 2005; Remov and Bavykin, 2008), возможность количественной идентификации вирусных ДНК и РНК (Khodakov et al., 2008). Вместе с тем, невысокий уровень дискриминации (соотношение между сигналами от достроенных совершенных  $I_p$  и несовершенных  $I_m$  дуплексов 1,2 и менее) при идентификации однонуклеотидных замен в варианте мультиплексной ПЦР с иммобилизованными аллель-специфичными праймерами (Khodakov and Ellis, 2014) ограничивает применение данного подхода для одновременной детекции десятков и сотен точечных мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, анализа протяженных полиморфных локусов либо видоспецифичного полиморфизма.

Мультиплексная ПЦР с последующей гибридизацией на биочипе обеспечивает приемлемый уровень ( $I_p/I_m \geq 2,0$ ) дискриминации при детекции точечных мутаций и аналитическую чувствительность, достаточную для анализа клинических образцов (Gryadunov et al., 2005). В зависимости от объекта исследований применяли различные варианты амплификации: двухстадийную ПЦР (ОТ-ПЦР) с использованием продуктов реакции первой стадии на второй в качестве матрицы посредством переноса (Gryadunov et al., 2005; Antonova et al., 2008; Gryadunov et al., 2010); одностадийную мультиплексную ПЦР, проводимую по асимметричному типу (Грядунув et al., 2011); двухстадийную ПЦР в едином реакционном объеме с адаптерными праймерами (Zimenkov et al., 2013) и циклической элонгацией (Zimenkov et al., 2016). Во всех случаях на выходе получали преимущественно одноцепочечные фрагменты, последовательности которых комплементарны последовательностям олигонуклеотидов, иммобилизованных на биочипе.

Создана мультиплексная система, обеспечивающая одновременную амплификацию и флуоресцентное маркирование десятков фрагментов геномов с учетом их высокого (60-70%) GC-состава в едином реакционном объеме, за счет специально сконструированных праймеров и стадии циклической элонгации. Последовательность каждого добавляемого в реакционную смесь праймера  $F_i$ ,  $R_i$  состояла из двух частей – 3'-специфичной, т.е. комплементарной последовательности исследуемого фрагмента генома, и 5'-универсальной (адаптерной), различавшейся для прямых и обратных праймеров, и не имевшей гомологии (менее 10%) с анализируемыми геномами (Hayden et al., 2008) (Рис. 23). Помимо таких праймеров, содержащих и специфические, и адаптерные последовательности, в реакционную смесь добавляли два праймера,  $F_{uni}$ ,  $R_{uni}$  последовательности которых были комплементарны последовательностям адаптерной части составных праймеров. Данные адаптерные праймеры присутствовали в реакционной смеси в количественном соотношении 1:40, с целью наработки преимущественно одноцепочечных фрагментов. Расчетные температуры плавления специфичных

и адаптерных последовательностей были выбраны равными 75°C и 56°C, соответственно, а профиль амплификации включал две стадии по 30 циклов каждая, с температурами отжига 72°C на первой, и 53°C на второй стадии.



**Рис. 23.** Схема двухстадийной мультиплексной ПЦР, проводимой в едином реакционном объеме, с использованием «составных» и адаптерных праймеров.

Таким образом, в ходе ПЦР в едином реакционном объеме на первой стадии за счет гибридизации и элонгации составных праймеров при использовании геномной ДНК в качестве матрицы происходила наработка двуцепочечных ПЦР-продуктов, содержащих на концах последовательности, специфичные к адаптерным праймерам, а затем, в ходе второй стадии, полученные ПЦР-продукты служили матрицей для наработки одноцепочечных фрагментов при использовании адаптерных праймеров с меньшей температурой отжига (Рис. 23). В ходе ПЦР проводили флуоресцентное маркирование амплифицируемых фрагментов посредством встраивания Taq-ДНК-полимеразой флуоресцентного субстрата - конъюгата дезоксиуридинтрифосфата и красителя индодикарбоцианинового ряда dUTP-ImD515, длина волны возбуждения которого равна  $640 \pm 5$  нм, а длина волны флуоресценции --  $665 \pm 5$  нм (Kuznetsova et al., 2016).

Ключевым аспектом оптимизации мультиплексной ПЦР являлся экспериментальный подбор концентраций и сочетаний праймеров в реакционной смеси, критерием оценки которого выступала аналитическая

чувствительность. В этой работе следует выделить следующие основные этапы:

а) проверка системы амплификации в моноплексных реакциях с подбором позиций праймеров и длин нарабатываемых фрагментов;

б) оценка эффективности амплификации парных фрагментов в едином реакционном объеме с последующей корректировкой концентраций праймеров в случае неравномерной амплификации фрагментов, либо разнесением праймеров в различные реакционные объемы в случае полной несовместимости;

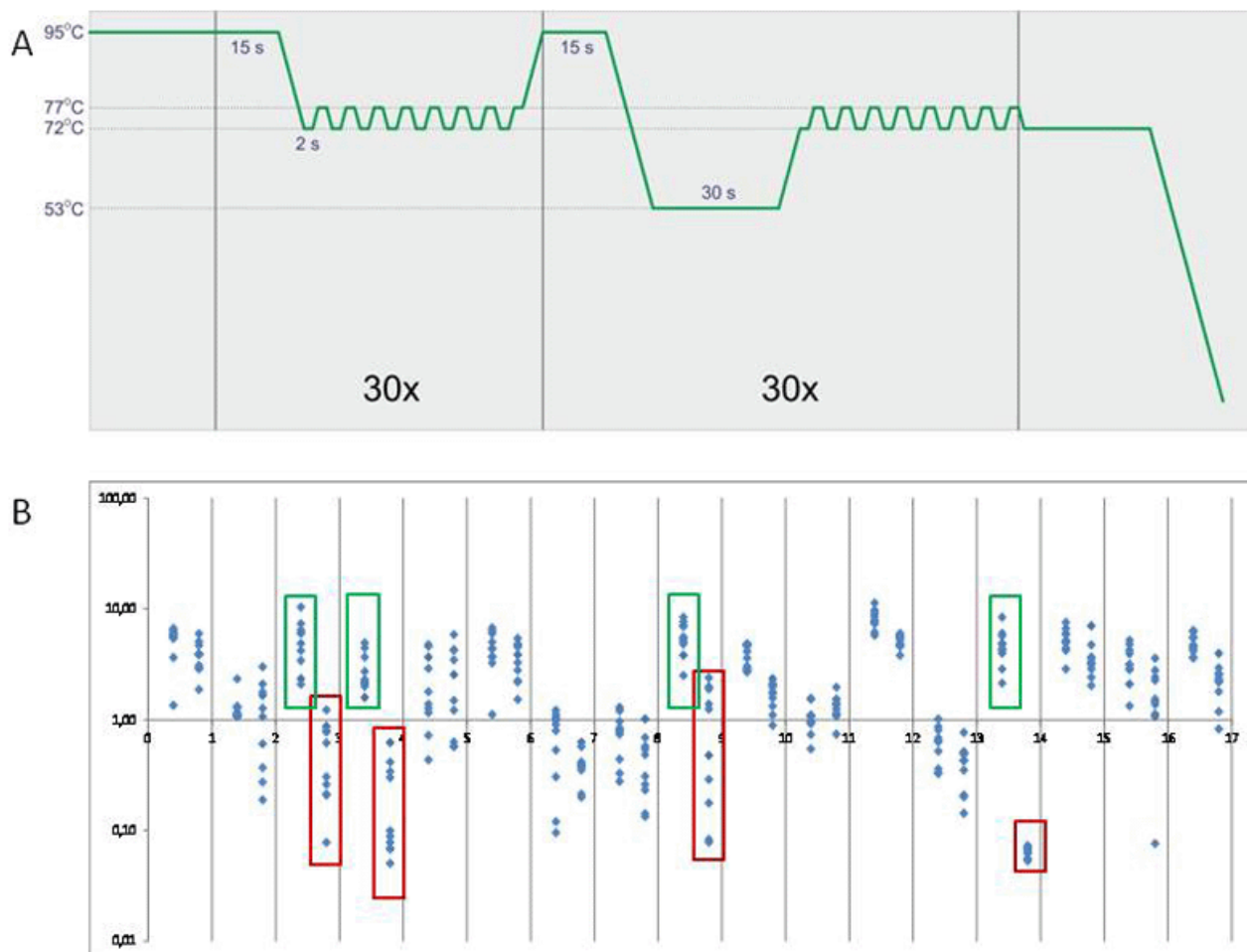
в) добавление пар праймеров в выбранные реакционные смеси в пошаговом режиме. Дальнейший подбор концентраций праймеров и компонентов ПЦР;

г) окончательное доведение компонентов полученных реакционных смесей, включая корректировку концентраций праймеров для ПЦР-фрагментов, продуцирующих слабые гибридизационные сигналы.

В ходе оптимизации был протестирован ряд компонентов и добавок для амплификации GC-богатых матриц, включая Q-solution (Qiagen, Германия), бетаин, диметилсульфоксид, этиленгликоль, 1,2-пропандиол, 1,3-пропандиол, 1,3-бутандиол, 2,3-бутандиол, 1,4-бутандиол (Sigma-Aldrich, США). Присутствие данных компонентов в реакционной смеси не приводило к повышению, либо наоборот снижало чувствительность мультиплексной ПЦР.

Наряду с адаптерной системой праймеров предложено использование в мультиплексной ПЦР циклического изменения температуры элонгации с 72°C до 77°C в течение короткого (до 2 с) времени – т.н. множественных «пульсов» (Orpana et al., 2012) (Рис. 24А), что позволило дестабилизировать высокоплавкие вторичные структуры генома, уменьшить количество образующихся неспецифических дуплексов, проводить эффективную достройку и включение флуоресцентно-меченных конъюгатов в целевые амплифицируемые фрагменты генома. Экспериментальным путем был определен оптимум числа пульсов в цикле, составивший 8, большее их число

не оказывало значительного эффекта на выход ПЦР, в то время как 4-6 пульсов в цикле приводили к меньшей чувствительности амплификации.



**Рис. 24.** (А) Профиль ПЦР при использовании стадии циклической элонгации. (В) Гистограмма, демонстрирующая обеспечение амплификации 17 сегментов микобактериального генома при использовании циклической элонгации в ходе мультиплексной ПЦР. Синими точками в логарифмическом масштабе показаны средние нормированные сигналы элементов ДНК-чипов при анализе соответствующих ампликонов (каждый в 10 повторностях). Каждая секция от 1 до 17 соответствует отдельному ампликону. Левая колонка в секции – результат анализа при использовании циклической элонгации, правая – без нее (элонгация только при 72С). Прямоугольниками выделены наиболее заметные результаты, полученные при использовании циклической элонгации (зеленым цветом) и без нее (красным).

Разработанная процедура мультиплексной ПЦР с адаптерной системой праймерой и циклической элонгацией с последующей гибридизацией на гидрогелевом биочипе позволила проводить одновременный анализ по меньшей мере 17 сегментов генома *M. tuberculosis* с аналитической чувствительностью около 500 геном-эквивалентов ДНК/реакцию (Zimenkov et al., 2016) (Рис. 24В).



### 3.1.6 Ключевые аспекты гибридного анализа на гидрогелевых биочипах

Основными характеристиками олигонуклеотидного микрочипа являются значения полезного сигнала и достигнутых дискриминационных отношений между совершенными и несовершенными дуплексами  $I_p/I_m$ . Эти величины определяются последовательностями и концентрациями иммобилизованных зондов, составом гибридного буфера, композицией гидрогеля, а также кинетикой гибридизации и отмывки биочипов.

При выборе дискриминирующих олигонуклеотидов для иммобилизации на биочипе с учетом размера и сложности анализируемой последовательности, в частности, наличия повторов, определяли длину дискриминирующих олигонуклеотидов, обеспечивающую их специфичность в отношении анализируемой последовательности. Для каждой позиции, для которой известны мутации либо однонуклеотидный полиморфизм, подбирали набор специфичных дискриминирующих олигонуклеотидов, способный выявлять известные варианты замен. Используя специализированное ПО ([Oligo](#), [Molecular Biology Insights](#); [Vector NTI](#), [Thermo Fischer Scientific](#), США) рассчитывали температуры плавления олигонуклеотидов  $T_m$  и, варьируя их длину, добивались того, чтобы разброс  $T_m$  составлял не более 2-3°C. Длины олигонуклеотидов, зависящие от GC-состава исследуемого фрагмента генома, находились в диапазоне от 14 до 20 нк, при этом расчетная  $T_m$  составляла от 50 до 53°C (в 1M NaCl). Большая длина зондов, как правило, приводила к снижению дискриминационного отношения  $I_p/I_m$ . Избегали таких олигонуклеотидов, которые способны формировать вторичные структуры типа шпильки с высокими температурами плавления (расчетная свободная энергия образования структуры  $\Delta G \leq -6$  ккал/моль). Положение определяемых переменных нуклеотидов и других нуклеотидных перестроек выбирали по возможности не далее 1-4 нуклеотида от середины соответствующего олигонуклеотида.

Гибридизацию проводили в растворе, содержащем буферный компонент для поддержания рН, соль для создания ионной силы и хаотропный агент, в герметичной гибридизационной камере при температуре, зависящей от температуры плавления иммобилизованных на микрочипе дискриминирующих олигонуклеотидов. Нами было показано, что применение 1М гуанидинтиоцианата (GuSCN) в гибридизационном буфере снижает температуры плавления дуплексов в ячейках биочипа в среднем на 8-10°C (Mikhailovich et al., 2001), что позволяет проводить гибридизацию при 37°C. Данная температура удобна тем, что большинство клинических лабораторий оснащены термостатами, поддерживающими эту температуру.

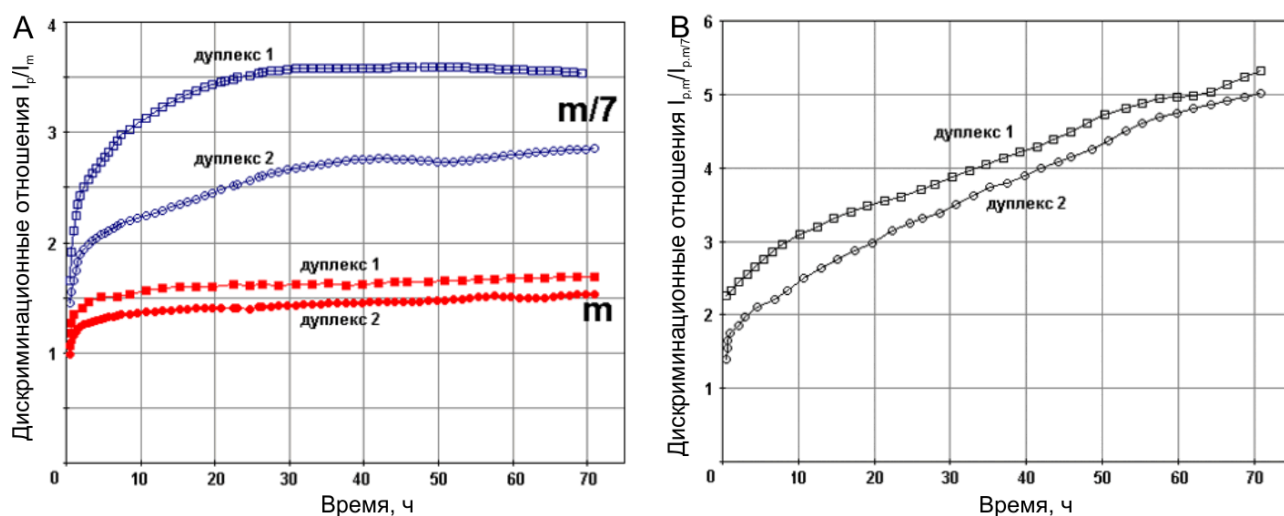
Кинетика гибридизации может существенно влиять на отношение сигналов  $I_p/I_m$  в переходном кинетическом режиме, что в свою очередь определяет надежность идентификации специфичных мишеней с помощью олигонуклеотидных микрочипов. Время насыщения сигнала флуоресценции в элементах биочипа определяется формулой:

$$\tau_H = \tau_D m \frac{K}{1 + Kh_{sol}} \quad (1)$$

где  $m$  – концентрация иммобилизованных олигонуклеотидов,  $K$  – термодинамическая константа ассоциации,  $h_{sol}$  – концентрация анализируемой ДНК в растворе,  $\tau_D \cong R^2 / D$  – характерное время диффузии ДНК в гелевой ячейке в отсутствие иммобилизованных олигонуклеотидов.

Уменьшение времени насыщения, которое достигается путем вариации любого из факторов, перечисленных в ур. (1), позволяет улучшить дискриминационное отношение в переходном кинетическом режиме. Чем больше концентрация иммобилизованных зондов, тем выше константа ассоциации и тем больше концентрация дуплексов в ячейках и, соответственно, сильнее флуоресцентный сигнал, но, в то же время, большее время требуется для достижения насыщения. Поскольку несовершенные дуплексы могут формироваться быстрее совершенных на начальном (переходном) этапе гибридизации (Sorokin et al., 2006), соотношение  $I_p/I_m$  ниже в переходном

режиме, поэтому короткое (30 – 60 мин) время гибридизации может быть недостаточным для надежной идентификации мишени на гидрогелевом биочипе. Время насыщения может быть сокращено уменьшением концентрации иммобилизованных олигонуклеотидов или изменением состава геля в части увеличения его пористости. Показано, что снижение концентрации иммобилизованных олигонуклеотидов в 7-10 приводит, по меньшей мере, к двукратному увеличению соотношения  $I_p/I_m$  при снижении общего сигнала в ячейках биочипа в 1,5-2,5 раза в течение 3-12 часовой гибридизации (Рис. 25). Вместе с тем, следует отметить, что тотальное уменьшение концентрации всех иммобилизованных олигонуклеотидов могло привести к существенному снижению сигнала ниже порога регистрации, в частности, для олигонуклеотидов, последовательность которых способна формировать высокоплавкие вторичные структуры, препятствующие образованию дуплексов с анализируемым одноцепочечным фрагментом.



**Рис. 25.** (А) Кинетика нарастания отношения  $I_p/I_m$  со временем при двух различных концентрациях иммобилизованных зондов ( $m=10^{-4}$  М - красные символы;  $m=m/7 \sim 1.4 \times 10^{-5}$  М - синие символы) в элементах биочипа, детектирующих мутации Leu511>Pro (дуплекс 1; квадраты) и Met515>Pе (дуплекс 2; круги) в гене *rpoB* *M. tuberculosis*. (В) Кривые роста отношения сигналов совершенных дуплексов в элементах с разными концентрациями иммобилизованных зондов  $I_{p,m}/I_{p,m/7}$ , предназначенных для идентификации замен Leu511>Pro (квадраты) и Met515Pе (круги).

Важным фактором, влияющим на время гибридизации на гидрогелевых биочипах, является замедленная диффузия фрагментов ДНК в элементы с иммобилизованными олигонуклеотидами. Было проведено исследование

зависимости флуоресцентного сигнала элементов биочипа при гибридизации фрагментов ДНК различной длины от концентраций основных компонентов геля – мономера (Т) и кросс-сшивки (С) посредством изготовления серий микрочипов с зондами, специфичными в отношении последовательности гена 16S рРНК, различающихся составом основных компонентов гидрогеля:

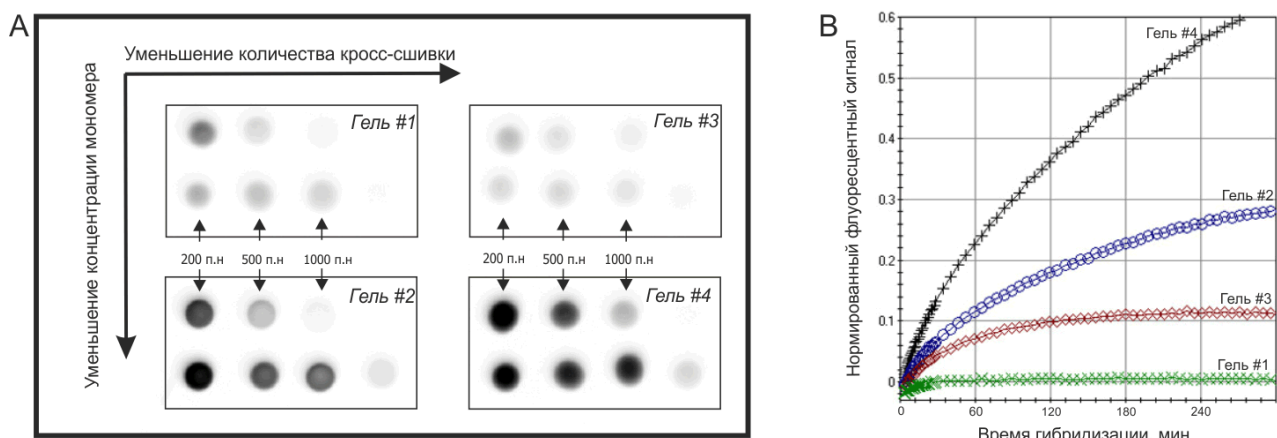
Гель 1 – Т5%/С25%, здесь и далее указана концентрация в % основных компонентов;

Гель 2 – Т5%/С5%;

Гель 3 – Т4%/С25%;

Гель 4 – Т4%/С5%.

Меньшие концентрации мономера и сшивки приводили к нестабильности элементов биочипа как в ходе полимеризации, так и при гибридизации. С использованием праймеров, специфичных к гену 16S рРНК, амплифицировали фрагменты разной длины от 200 до 1000 п.н., которые гибридизовали на специализированном биочипе (Рис. 26).

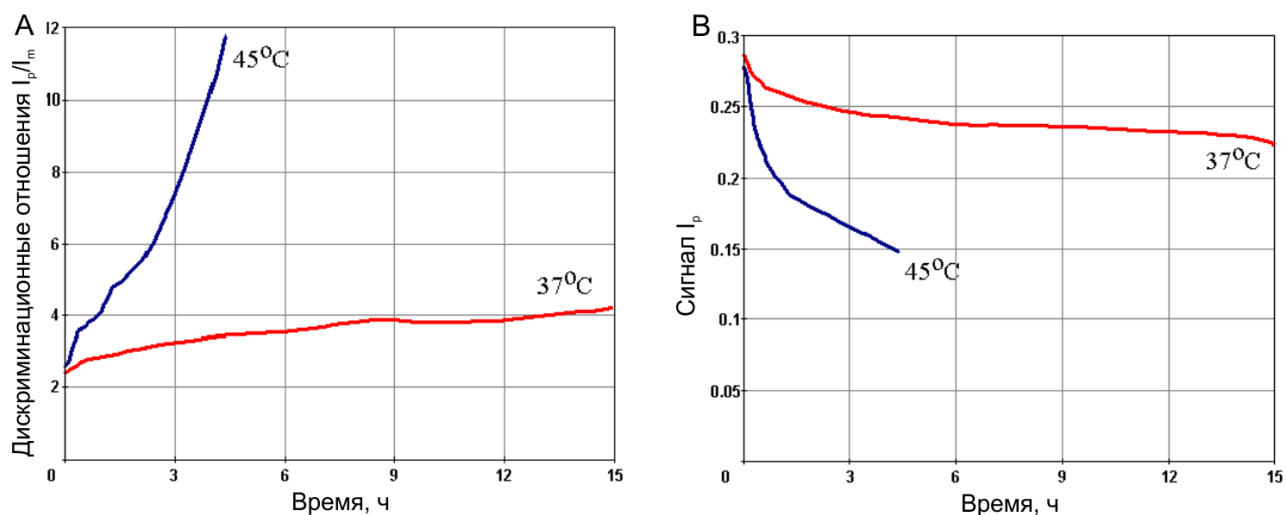


**Рис. 26.** (А) Флуоресцентная картина гибридизации на биочипе фрагментов ДНК длиной 200, 500, 1000 п.н., содержащем кластеры гелевых элементов разного состава. (В) Кривые накопления сигнала в ячейках биочипа, содержащего кластеры гелевых элементов различного состава.

Как свидетельствуют результаты, представленные на Рис. 26А, одновременное уменьшение концентраций мономера и кросс-сшивки в гелевых элементах приводит к эффективной гибридизации фрагментов ДНК большей длины (1000 п.н. и более). В дальнейшей работе использовали биочипы с гелевыми элементами данного состава (гель #4).

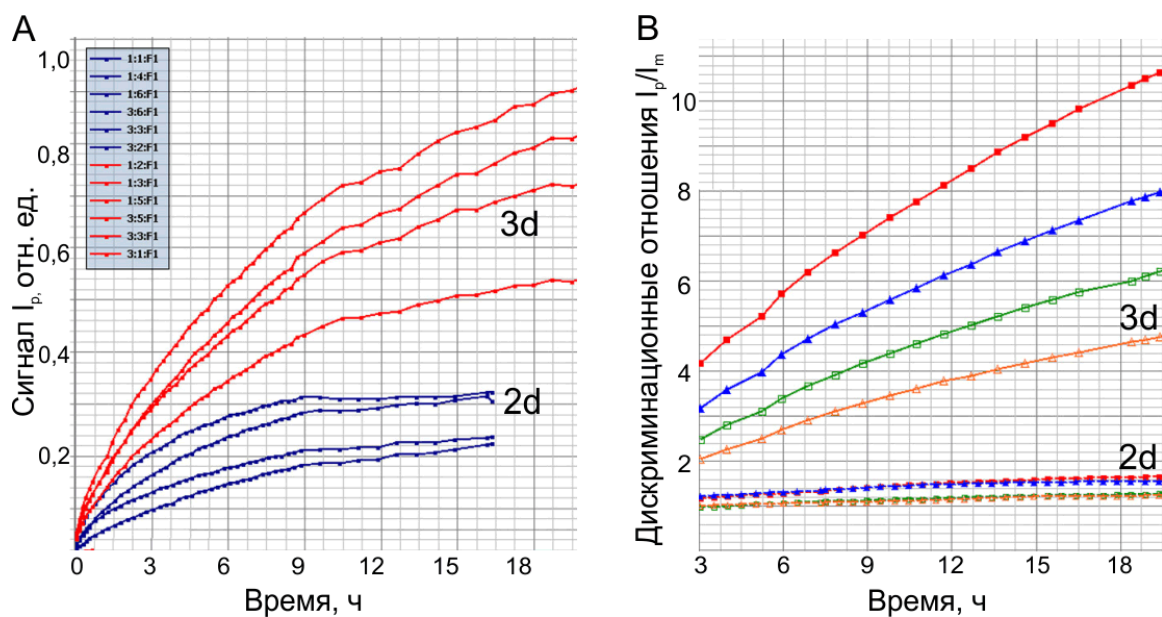
Состав геля существенно влияет как на уровень сигналов, так и на отношения  $I_p/I_m$  в переходном режиме, определяющих надежность детектирования мишеней с помощью гидрогелевых биочипов. Оценку времени гибридизации проводили путем мониторинга кривых накопления флуоресцентного сигнала в ячейках биочипа в процессе гибридизации (Рис 26В). Уменьшение количества мономера и кросс-сшивки в составе геля позволяет не только проводить эффективную гибридизацию более длинных фрагментов, но и существенно ускорять диффузию этих фрагментов в поры геля, уменьшая время гибридизации в целом. Увеличение пористости геля приводит к ускорению кинетики гибридизации, росту сигналов и увеличению дискриминационного отношения. Однако, начиная с некоторого порога, дальнейшее увеличение пористости приводит к ухудшению механических свойств (стабильности при полимеризации и гибридизации) гидрогеля.

Для увеличения дискриминационного отношения  $I_p/I_m$  можно также использовать процедуру постгибридизационной отмывки биочипа. На рис. 27 представлены кривые изменения отношения  $I_p/I_m$  и сигнала в ячейках в зависимости от времени отмывки водой. Скорость вымывания, как и скорость гибридизации может быть увеличена не только снижением концентрации иммобилизованных олигонуклеотидов, но и повышением температуры (Sorokin et al., 2005) (Рис. 27В). Денатурирующие агенты, такие как формамид, также могут использоваться при отмывке для увеличения дискриминации (Nielsen et al., 2003), однако влияние таких реагентов на стабильность гидрогелевых ячеек ограничивает их применение.



**Рис. 27.** Влияние процедуры отмывки биочипов по окончании гибридизации на рост дискриминационного отношения  $I_p/I_m$  (А) и падение сигнала (В) со временем при температурах  $t = 37^\circ\text{C}$  и  $45^\circ\text{C}$ .

Сравнение кинетики нарастания сигнала и дискриминационных отношений гидрогелевых (3d) и поверхностных (2d) биочипов при одних и тех же концентрациях иммобилизованных зондов приведено на Рис. 28. Величина гибридизационного сигнала для поверхностных чипов выходила на насыщение в среднем за 6-9 часов, уступая аналогичному значению сигнала на гидрогелевых биочипах в 2 и более раза. В то же время, значение дискриминационных отношений для поверхностных чипов слабо зависело от времени и составляло  $1,2 \pm 0,4$ , в то время как гидрогелевые чипы демонстрировали эффективную дискриминацию ( $I_p/I_m \geq 2,0$ ) уже через 3 часа. Уменьшение концентрации иммобилизованных зондов на поверхностном чипе приводило, с одной стороны, к повышению  $I_p/I_m$ , с другой – к падению абсолютного сигнала до недетектируемого уровня.



**Рис. 28.** (А) Кинетика нарастания полезного сигнала в элементах планарного (синие кривые) и гидрогелевого (красные кривые) биочипов. (В) Рост значений дискриминационных отношений от времени (3 и более часа) для 2d и 3d-чипов (цветом обозначены элементы биочипа, предназначенные для регистрации мутаций в кодонах 511, 512, 513, 515 гена *rpoB* *M. tuberculosis*).

Таким образом, исследованные аспекты гибридизационного анализа на гидрогелевых олигонуклеотидных микрочипах позволили повысить уровень сигналов, сократить время гибридизации и добиться дискриминационного соотношения  $I_p/I_m \geq 2,0$  между двумя ячейками, содержащими зонды, различающиеся на один нуклеотид, что дало возможность применять данные инструменты для эффективной дискриминации точечных мутаций.

### 3.1.7 Регистрация и интерпретация результатов анализа на биочипе

Флуоресцентные сигналы каждого элемента биочипа, полученные в результате накопления гибридизационных дуплексов флуоресцентно-меченных ПЦР продуктов и иммобилизованных олигонуклеотидов, регистрируются ПЗС-камерой УАПК и подвергаются оцифровке.

Нормированная интенсивность ( $I$ ) флуоресценции ячеек биочипа рассчитывается по формуле:

$$I = \frac{S - I_{mm}}{I_{kc} - I_{mm}} \quad (2)$$

где  $S$  – интегральный флуоресцентный сигнал, получаемый от совокупности пикселей, составляющих элемент биочипа;  $I_{mm}$  – сигнал

темнового тока, измеренный при нулевой интенсивности возбуждаемого света;  $I_{кс}$  – сигнал красного стекла. Для учета возможной пространственной неравномерности освещения от источника возбуждающего света в держатель УАПК вместо биочипа помещали слайд из красного стекла и измеряли интегральную интенсивность флуоресценции от красного стекла на участках, соответствующих ячейкам чипа.

В общем случае для каждой группы ячеек биочипа  $i$ , соответствующих уникальному генетическому маркеру (специфичной ДНК-мишени, вариабельному нуклеотиду/аминокислоте, маркерному гену), вычисляли дискриминационное отношение  $K_i = I_{ip}/\langle I_{im} \rangle$ , где  $I_{ip}$  – максимальный сигнал в группе ячеек;  $I_{im}$  – остальные сигналы в группе (в всех случаях используются нормированные согласно формуле (2) сигналы). Если  $K_i \geq 2.0$ , то считали, что в ячейке, имеющей максимальный сигнал  $I_{ip}$ , зарегистрирован совершенный гибридизационный дуплекс. Для каждого конкретного биочипа создавали свой алгоритм интерпретации на основе распределения сигналов от совершенных дуплексов, обеспечивающий обнаружение специфичных мишеней (наличие бактериальной, вирусной, растительной ДНК в образце) с одновременной идентификацией точечных мутаций, однонуклеотидного полиморфизма, функционально значимых сегментов генома.

С целью получения более точного значения дискриминационного отношения и снижения коэффициента вариации для измеряемых сигналов предложено использование внутреннего флуоресцентного контроля посредством введения в иммобилизуемые олигонуклеотиды флуоресцентного красителя индодикарбоцианинового ряда IMD301 (ИМБ РАН) с длиной волны возбуждения  $595 \pm 5$  нм; длиной волны флуоресценции  $615 \pm 5$  нм. Алгоритм нормировки на количество олигонуклеотида в ячейке биочипа включал регистрацию флуоресцентной картины на двух каналах, отвечающих спектральным диапазонам красителей IMD515 и IMD301, вычисляя интенсивности сигналов ячеек  $I_r$  и  $I_{gr}$  по формуле (2), соответственно.



Стандартное дискриминационное соотношение сигналов после гибридизации с фрагментом ДНК, меченным флуоресцентным красителем IMD515, определяли, как:

$$K_i = I_{r,p} / \langle I_{r,m} \rangle \quad (3)$$

С учетом внутреннего флуоресцентного контроля иммобилизованных олигонуклеотидов, содержащих флуоресцентную метку IMD301, для оценки влияния вариабельности концентраций, использовали нормированные сигналы:

$$I_n = I_r / I_{gr} \quad (4)$$

В этом случае дискриминационное соотношение рассчитывали как:

$$K_n = I_{n,p} / I_{n,m} \quad (5)$$

Поскольку в переходном режиме гибридизации в гидрогелевых элементах биочипа несовершенные дуплексы образуются быстрее, чем совершенные, то нормированные дискриминационные соотношения отклоняются от истинных значений в переходном режиме гибридизации и значения  $K_i$  определяются формулой (3) только при достижении равновесия, т.е. режима насыщения. В переходном режиме гибридизации вариации в концентрации иммобилизованного зонда приводят к тому, что и  $K_i$  (стандартное соотношение), и  $K_n$  (соотношение после нормировки) отклоняются от истинного значения: одно из них преувеличивает, а другое преуменьшает его. Таким образом, в данном случае истинное значение определяли путем суперпозиции стандартного и нормированного соотношений.

Истинное соотношение можно оценить по следующей схеме. Поскольку априори неизвестно, какое из двух значений  $K$  больше, ранжировали  $K$  следующим образом:

$$K_{pos} = \max(K_i, K_n); K_{neg} = \min(K_i, K_n) \quad (6)$$

Оптимальное значение дискриминационного соотношения оценивали как:

$$K = \sigma * K_{pos} + (1 - \sigma) * K_{neg}; 0 < \sigma < 1 \quad (7),$$

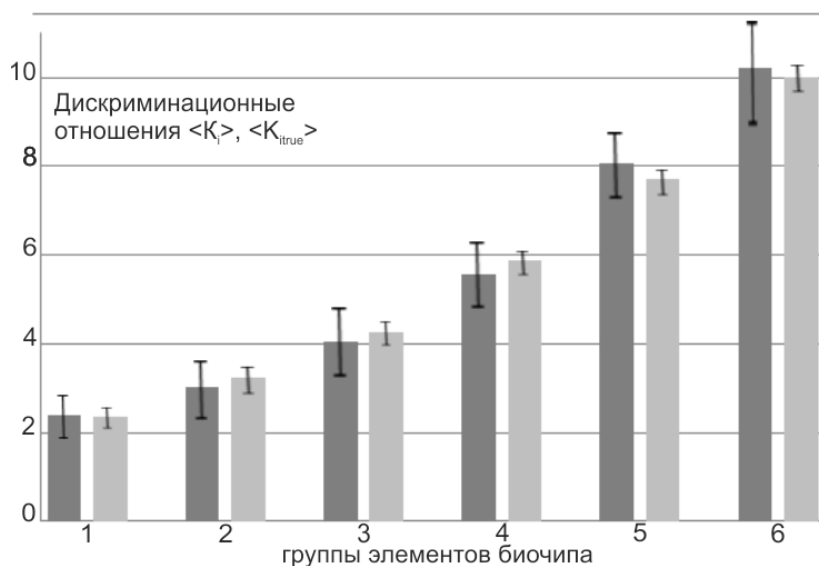
где величина  $\sigma$  определяется минимизацией коэффициента вариации (CV) концентраций иммобилизованных олигонуклеотидов для полученной серии экспериментальных данных. Принимали, что концентрации иммобилизованных

олигонуклеотидов, формирующих и совершенные, и несовершенные дуплексы находятся в диапазоне от 1000 до 2000 пмоль/мкл, т. е. относительная вариация составляет 50%. Тогда стандартное соотношение  $K_i$ , определяемое формулой (3), равно  $K_i = 2,41 \pm 0,49$ , в то время как нормированное соотношение  $K_n$  (ур-е 5) равно  $K_n = 2,20 \pm 0,37$ , при этом в то время как  $\sigma$ -нормировка составила  $K_{true} = 2,39 \pm 0,06$  при  $\sigma = 0,55$ . Таким образом,  $\sigma$ -нормировка дает более точную оценку истинного значения дискриминационного соотношения и подавляет разброс данных, связанный с вариациями в концентрации иммобилизованного зонда.

Для проверки теоретических расчетов нами были отобраны 100 биочипов после проведения гибридизации с образцами ДНК, в которых наблюдались относительно большие отклонения в концентрациях иммобилизованных зондов, т.е.

$$I_{gr,p} / I_{gr,m} > 1,1 \quad \text{и} \quad I_{gr,p} / I_{gr,m} < 0,9,$$

и для этих микрочипов были рассчитаны средние дискриминационные соотношения  $\langle K_i \rangle$ ,  $\langle K_{itru} \rangle$  для двух типов нормировки. Для всех мутаций наблюдали уменьшение разброса дискриминационного соотношения при использовании  $\sigma$ -нормировки (Рис. 29). Следует отметить, что экспериментально наблюдаемый разброс (CV) был практически во всех случаях выше теоретически рассчитанного, что означает, что наблюдаемые вариации дискриминационных соотношений связаны не только с разбросом в концентрациях иммобилизованных олигонуклеотидов, но также и с другими факторами. Тем не менее полученные данные позволяют сделать вывод, что,  $\sigma$ -нормировка обеспечивала более точную оценку дискриминационных соотношений (Pan'kov et al., 2009).



**Рис. 29.** Средние дискриминационные отношения  $\langle K_i \rangle$ ,  $\langle K_{true} \rangle$  для гидрогелевых ячеек, содержащих IMD301-меченные олигонуклеотиды после гибридизации с IMD515-меченными фрагментами генов *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, элемента IS6110. Первая колонка для каждой группы элементов относится к стандартному методу обсчета, вторая – обсчету с учетом  $\sigma$ -нормировки. Группы элементов предназначены для детекции мутаций: 1 - Met515Pе; 2 - Ser522Leu; 3 – Ser315Thr(1); 4 – Asp516Val; 5 –Ser531Leu; 6 –C15T.

Таким образом, был разработан ряд методических подходов, позволяющих выполнять эффективную обработку биологических образцов и выделение НК, мультиплексную амплификацию десятков сегментов геномов с аналитической чувствительностью, достаточной для анализа клинического материала, гибридизацию на гидрогелевых биочипах в условиях, обеспечивающих разрешение в один нуклеотид между образующимися в совершенными и несовершенными дуплексами. Разработанные методики позволили создать и внедрить в практику ряд актуальных социально-значимых приложений для многопараметрического анализа бактериальных, вирусных и растительных геномов на гидрогелевых биочипах.

## 3.2 Разработка и внедрение методов выявления клинически значимых маркеров геномов возбудителей туберкулеза и микобактериозов

### 3.2.1 Биочип для идентификации мутаций в геноме возбудителя туберкулеза, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду

Разработан метод мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на олигонуклеотидном гидрогелевом биочипе для идентификации ДНК изолятов МТВС с одновременным определением их чувствительности к препаратам первого ряда – рифампицину и изониазиду. Процедура анализа включала двухстадийную мультиплексную ПЦР с пятью парами праймеров на каждой стадии, специфичных к генам *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, фрагменту инсерционного элемента IS6110, с последующей гибридизацией на биочипе (Gryadunov et al., 2005).

Биочип состоял из 77 гелевых элементов (Рис. 30А), 72 из которых содержали иммобилизованные зонды, позволяющие устанавливать принадлежность анализируемой ДНК МТВС (IS6110), идентифицировать 27 мутаций в гене *rpoB*, ответственных за устойчивость к RMP, 11 мутаций в гене *katG*, 5 мутаций в промоторной области гена *inhA* и 5 мутаций в межгенной регуляторной области *ahpC–oxyR*, ассоциированных с устойчивостью к INH (Таблица 10).

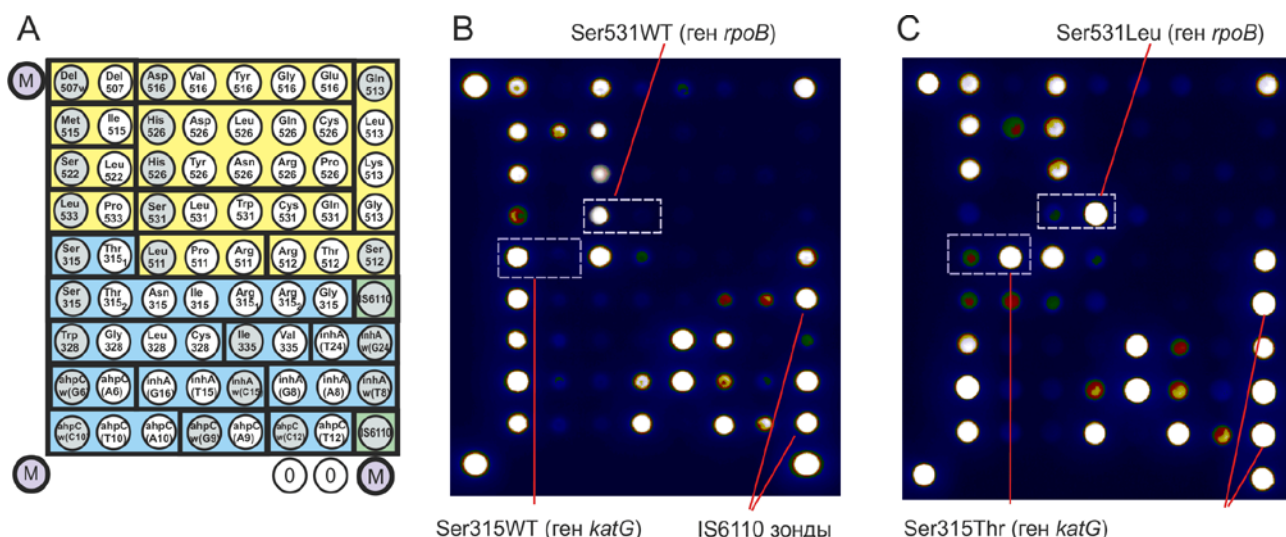
**Таблица 10.** Перечень последовательностей иммобилизованных олигонуклеотидов

#	Позиция амино- кислоты/ нуклеотида	Замена амино- кислоты	Замена нуклеотида	Последовательность 5'→3'	Положение зонда в после- довательности гена
Последовательность гена <i>rpoB</i> (Genbank Acc.No L27989)					<i>rpoB</i> / (Acc.No L27989)
1	507	WT	-	TGG CTG GTG CCG AAG A	2370-2353
2	507	DEL	GGCACC	CTC AGC TGG CTG AAG AA	2376-2352
3	511	Leu (WT)	CTG	TTG GCT CAG CTG GCT G	2380-2364
4	511	Leu>Pro	CTG>CCG	TTG GCT CGG CTG GCT	2380-2364
5	511	Leu>Arg	CTG>CGG	TTG GCT CCG CTG GCT	2380-2364
6	512	Ser (WT)	AGC	AAT TGG CTC AGC TGG C	2383-2365
7	512	Ser>Thr	AGC>ACC	AAT TGG GTC AGC TGG	2383-2365
8	512	Ser>Arg	AGC>CGC	AAT TGG CGC AGC TG	2383-2367
9	513	Gln (WT)	CAA	TCC ATG AAT TGG CTC AGC T	2386-2368
10	513	Gln>Leu	CAA>CTA	CAT GAA TAG GCT CAG CT	2386-2368

11	513	Gln>Lys	CAA>AAA	CAT GAA TTT GCT CAG CT	2386-2368
12	513	Gln>Pro	CAA>CCA	CAT GAA TGG GCT CAG CT	2386-2368
13	515	Met (WT)	ATG	TTC TGG TCC ATG AAT TGG	2396-2374
14	515	Met>Ile	ATG>ATA	GTT CTG GTC TAT GAA TTG G	2396-2374
15	516	Asp (WT)	GAC	TT GTT CTG GTC CAT GAA T	2397-2376
16	516	Asp>Val	GAC>GTC	TT GTT CTG GAC CAT GAA T	2397-2376
17	516	Asp>Tyr	GAC>TAC	TT GTT CTG GTA CAT GAA T	2397-2376
18	516	Asp>Gly	GAC>GGC	TT GTT CTG GCC CAT GAA T	2397-2376
19	516	Asp>Glu	GAC>GAG	TT GTT CTG CTC CAT GAA T	2397-2376
20	522	Ser (WT)	TCG	T CAA CCC CGA CAG CG	2414-2398
21	522	Ser>Leu	TCG>TTG	T CAA CCC CAA CAG CG	2414-2398
22	526	His (WT)	CAC	G GCG CTT GTG GGT CAA C	2424-2408
23	526	His>Asp	CAC>GAC	G GCG CTT GTC GGT CAA C	2424-2408
24	526	His>Leu	CAC>CTC	G GCG CTT GAG GGT CAA C	2424-2408
25	526	His>Gln	CAC>CAA	G GCG CTT TTG GGT CAA C	2424-2408
26	526	His>Cys	CAC>TGC	G GCG CTT GCA GGT CAA C	2424-2408
27	526	His>Tyr	CAC>TAC	G GCG CTT GTA GGT CAA C	2424-2408
28	526	His>Asn	CAC>AAC	G GCG CTT GTT GGT CAA C	2424-2408
29	526	His>Arg	CAC>CGC	G GCG CTT GCG GGT CAA C	2424-2408
30	526	His>Pro	CAC>CCC	G GCG CTT GGG GGT CAA C	2424-2408
31	531	Ser (WT)	TCG	CAG CGC CGA CAG TCG	2438-2424
32	531	Ser>Leu	TCG>TTG	C CAG CGC CAA CAG TCG	2439-2424
33	531	Ser>Trp	TCG>TGG	CAG CGC CCA CAG TCG	2438-2424
34	531	Ser>Cys	TCG>TGT	CAG CGC ACA CAG TCG	2438-2424
35	531	Ser>Gln	TCG>CAG	CAG CGC CTG CAG TCG	2438-2424
36	533	Leu (WT)	CTG	TG CCC CAG CGC CGA CAG	2443-2427
37	533	Leu>Pro	CTG>CCG	TG CCC CGG CGC CGA CAG	2443-2427
Последовательность гена <i>katG</i> (Genbank Acc.No U06262)					<i>katG</i> / (Acc.No U06262)
38	315	Ser (WT)	AGC	CG ATC ACC AGC GGC AT	1004-1019
39	315	Ser>Thr <sub>1</sub>	ACC	CG ATC ACC ACC GGC AT	1004-1019
40	315	Ser>Thr <sub>2</sub>	ACA	CG ATC ACC ACA GGC ATC	1004-1020
41	315	Ser>Asn	AAC	G ATC ACC AAC GGC ATC	1005-1020
42	315	Ser>Ile	ATC	G ATC ACC ATC GGC ATC	1005-1020
43	315	Ser>Arg <sub>1</sub>	CGC	G ATC ACC CGC GGC AT	1005-1020
44	315	Ser>Arg <sub>2</sub>	AGA	ATC ACC AGA GGC ATC G	1006-1021
45	315	Ser>Gly	GGC	G ATC ACC GGC GGC AT	1005-1019
46	328	Trp(WT)	TGG	CG AAA TGG GAC AAC A	1046-1060
47	328	Trp>Gly	GGG	CG AAA GGG GAC AAC A	1046-1060
48	328	Trp>Leu	TTG	CG AAA TTG GAC AAC AG	1046-1060
49	328	Trp>Cys	TGC	CG AAA TGC GAC AAC A	1046-1060
50	335	Ile(WT)	ATC		1064-1081
<i>TC CTC GAG ATC CTG TAC G</i>					
51	335	Ile>Val	GTC	TC CTC GAG GTC CTG TAC G	1064-1081
Последовательность гена <i>inhA</i> (Genbank Acc.No AY192027)					<i>inhA</i> / (Acc.No AY192027)
52	24	-	G(WT)	CCG GCC GCG GCG	164-175
53	24	-	G>T	CCG GCC TCG GCG	164-175
54	8	-	T(WT)	GAT AGG TTG TCG GGG	180-194
55	8	-	T>A	GAT AGG ATG TCG GGG	180-194
56	8	-	T>G	GAT AGG GTG TCG GGG	180-194
57	15	-	C(WT)	CGG CGA GAC GAT AGG	171-185
58	15	-	C>T	CGG CGA GAT GAT AGG	171-181

59	16	-	C>G	GG CGA GGC GAT AGG	172-185
Последовательность гена <i>ahpC</i> (Genbank Acc.No U16243)					<i>ahpC</i> / (Acc.No U16243)
60	6	-	G(WT)	GCA CGA TGG AAT GTC GC	680-696
61	6	-	G>A	GCA CGA TAG AAT GTC GCA	679-696
62	10	-	C(WT)	TCA CGG CAC GAT GGA A	686-701
63	10	-	C>T	TCA CGG CAT GAT GGA A	686-701
64	10	-	C>A	TCA CGG CAA GAT GGA A	686-701
65	9	-	G(WT)	CAC GGC ACG ATG GAA T	685-700
66	9	-	G>A	CAC GGC ACA ATG GAA T	685-700
67	12	-	C(WT)	CT TCA CGG CAC GAT GG	688-703
68	12	-	C>T	ACT TCA CGG TAC GAT GGA	687-704
Последовательность элемента IS6110 (Genbank Acc.No AF189827)					IS6110/ (Acc.No AF189827)
69	-	-	WT	CCG GAG CTG CGT GAG CG	1359-1375

Элементы биочипа объединены в группы, в каждой из которых присутствует элемент (выделен серым фоном), содержащий олигонуклеотид, последовательность которого специфична к ДНК дикого типа (WT), и элементы с зондами, специфичными в отношении мутаций по определенной аминокислотной/нуклеотидной позиции. По значению дискриминационного отношения  $I_p/I_m$  между ячейками «дикого типа» и ячейками «мутантных вариантов» определяли наличие/отсутствие мутаций в ДНК и, соответственно, чувствительность/устойчивость изолята к RMP и INH (Рис. 30 В, С).



**Рис. 30.** Идентификация изолятов *M. tuberculosis*, резистентных к рифампицину и изониазиду, на гидрогелевом биочипе. (А) Схема биочипа. (В) Гибридационная картина ДНК изолята *M. tuberculosis* дикого типа. (С) Гибридационная картина ДНК изолята *M. tuberculosis*, обладающего заменой Ser531Leu в гене *rpoB* и заменой Ser315Thr в гене *katG*, характеризующих множественную лекарственную устойчивость.

Первичную оценку диагностических характеристик разработанного метода проводили с использованием образцов ДНК, выделенных из образцов мокроты, охарактеризованных методом люминесцентной микроскопии (ЛЮМ). Всего было исследовано 133 клинических образца, включая 113 бактериоскопически положительных (AFB+) и 20 отрицательных (AFB-), в т.ч. 6 образцов от пациентов с хронической формой ТБ и 14 – от лиц с подозрением на ТБ. Каждый образец после деконтаминации делили на 2 части, одну из которых использовали для определения фенотипической чувствительности к RMP и INH методом пропорций (Kent and Kubica, 1985), вторую – для идентификации генетических детерминант резистентности в локусах *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC* посредством выделения ДНК, двухстадийной мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на биочипе. Результаты анализа бактериоскопических образцов двумя методами приведены в Таблице 11.

**Таблица 11.** Результаты определения чувствительности к рифампицину и изониазиду в бактериоскопически-положительных мокроты культуральным методом и разработанным способом гибридизации на биочипах

Препарат/локус Фенотипическая чувствительность	Число изолятов		Специфичность, (95% CI), %	Чувствительность, (95% CI), %	Предсказательная ценность положительного результата, (95% CI), %	Предсказательная ценность отрицательного результата, (95% CI), %
	Наличие мутации	Отсутствие мутации				
<b>Рифампицин/ <i>rpoB</i></b>						
Чувствительные к RMP	0	95	100 (96,1; 100)	94,4 (74,2; 99,0)	100 (81,6; 100)	98,9 (94,3; 99,8)
Устойчивые к RMP	17	1				
<b>Изониазид/ <i>katG</i>, <i>inhA</i>, <i>ahpC</i></b>						
Чувствительные к INH	0	88	100 (95,8; 100)	84 (65,4; 93,6)	100 (84,5; 100)	95,7 (89,4; 98,3)
Устойчивые к INH	21	4				

Сравнение полученных данных выявило пять ложно-отрицательных результатов: в одном устойчивом к RMP и четырех резистентных к INH изолятах молекулярно-генетическим методом мутаций обнаружено не было. Секвенирование соответствующих генов также позволило отнести последовательности данных локусов к дикому типу. Полученные результаты не входят в противоречие с ранее опубликованные данными, поскольку устойчивость к RMP обусловлена минорным полиморфизмом в

последовательности фрагмента гена *proV* длиной 81 п.о. в ~96% случаев, а 5-15% INH-резистентных изолятов могут обладать мутациями в иных, отличных от локусов *katG*, *ahpC*, *inhA*, сегментах микобактериального генома (Somoskovi and Salfinger, 2017).

Исследование шести бактериоскопически-отрицательных образцов от хронических пациентов выявило идентичную для всех образцов гибридизационную картину, соответствующую представленной на Рис. 30С. Наличие лекарственно-устойчивых изолятов ТБ было подтверждено культивированием на селективных средах, содержащих RMP и INH. В 14 АFB-образцах, полученных от пациентов с подозрением на ТБ, только в двух удалось получить гибридизационные картины ДНК дикого типа (Рис. 30В), что совпало с результатами микробиологического анализа. В остальных образцах было зарегистрировано отсутствие роста на среде Левенштейна-Йенсена при отрицательном результате анализа на биочипах.

Таким образом, результаты анализа на биочипах хорошо коррелировали с микробиологическим определением фенотипической чувствительности в образцах клинического материала. Специфичность методики (способность выявлять истинную чувствительность) составила 100% для обоих препаратов, в то время как чувствительность (способность определять истинную резистентность) составила 94,4% для рифампицина и 84% для изониазида. Результаты анализа бактериоскопически-отрицательных образцов также показали хорошую корреляцию с референсными культуральными методами.

Аналитическую чувствительность метода оценивали, анализируя посредством мультиплексной ПЦР и гибридизации десятикратные разведения ДНК, выделенной из штамма *M. tuberculosis* H37Rv. Гибридизационная картина, соответствующая ДНК дикого типа, была воспроизводимо получена при анализе 1 пг ДНК, что соответствовало 200 геном-эквивалентам микобактериальной ДНК. Способность метода специфично идентифицировать МТВС была оценена тестированием образцов ДНК, выделенных из изолятов нетуберкулезных микобактерий, в т.ч. *M. avium* (пять штаммов); *M.*



*intracellulare* (пять штаммов); *M. kansasii* (три штамма); *M. fortuitum* (три штамма), из одного штамма *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum*. Ложноположительных результатов при идентификации IS6110 на биочипе зарегистрировано не было (Грядун и др., 2003).

На основе созданного метода был разработан и зарегистрирован в Росздравнадзоре набор реагентов «ТБ-Биочип-1» (РУ ФС 03262004/0889-04 от 12.11.2014 г.), ставший первым в мире разрешенным к применению в медицинской практике молекулярно-генетическим тестом для анализа лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза. Начиная с 2005 г. при непосредственном участии соискателя проводилось внедрение набора «ТБ-Биочип-1» в учреждения противотуберкулезной службы РФ и стран СНГ.

### **3.2.2 Оценка диагностической и клинической эффективности набора «ТБ-Биочип-1»**

Диагностические характеристики разработанного метода идентификации генетических маркеров устойчивости к рифампицину и изониазиду в ДНК ТБ были уточнены по результатам мета-анализа 16 статей, опубликованных в 2005 – 2015 г. пользователями набора «ТБ-Биочип-1» - сотрудниками учреждений противотуберкулезной службы РФ, Кыргызстана, Азербайджана. В целом, суммарное количество анализов с использованием набора «ТБ-Биочип-1» за указанный период превысило 200000, однако в настоящем мета-исследовании учитывали статьи, содержащие данные сравнения выявленных детерминант резистентности с фенотипом *M. tuberculosis*, установленным референсными микробиологическими тестами (метод абсолютных концентраций, метод пропорций), выращивание в автоматизированной системе Bactec MGIT 960) (Таблица 12).

**Таблица 12.** Оценка диагностической чувствительности и специфичности набора «ТБ-Биочип-1» в сравнении с микробиологическими методами по результатам мета-исследования статей, опубликованных в 2005-2015 г. пользователями набора.

#	Авторы исследования	Регион	Результат анализа, число образцов*					Чувствительность (95% CI), %	Специфичность (95% CI), %	Анализируемые образцы	
			Всего	TP	FP	FN	TN			Клинические изоляты	Клинический материал
<b><i>Рифампицин/ groB</i></b>											
1	(Скотникова и др., 2005)	Москва	184	60	2	6	116	<b>90,9</b> (81,6; 95,8)	<b>98,3</b> (94,0; 99,5)	+	-
2	(Татьков и др., 2007)	Новосибирская обл., Томская обл.	272	95	7	12	158	<b>88,8</b> (81,4; 93,5)	<b>95,8</b> (91,5; 97,9)	+	-
3	(Исакова и др., 2007)	Кыргызстан	278	101	1	6	170	<b>94,4</b> (88,3; 97,4)	<b>99,4</b> (96,8; 99,9)	+	-
4	(Агаев и др., 2009)	Азербайджан	60	26	3	3	28	<b>89,7</b> (73,6; 96,4)	<b>90,3</b> (75,1; 96,7)	-	+
5	(Барило и др., 2009)	Центральный регион РФ	162	78	2	8	74	<b>90,7</b> (82,7; 95,2)	<b>97,4</b> (90,9; 99,3)	+	-
6	(Гаева и др., 2010)	Липецкая обл.	72	25	2	8	37	<b>75,8</b> (59,0; 87,2)	<b>94,9</b> (83,1; 98,6)	-	+
7	(Смазнова и др., 2010)	Брянская обл.	74	27	0	3	44	<b>90,0</b> (74,4; 96,5)	<b>100</b> (92,0; 100)	-	+
8	(Исакова и др., 2011)	Кыргызстан	633	190	13	24	406	<b>88,8</b> (83,9; 92,4)	<b>96,9</b> (94,8; 98,2)	+	-
9	(Журавлев и др., 2011)	Санкт-Петербург, Ленинградская обл.	92	37	0	0	55	<b>100</b> (90,6; 100)	<b>100</b> (93,5; 100)	-	+
10	(Ломова, Иванова, 2011)	Кемеровская обл.	56	27	1	5	23	<b>84,4</b> (68,3; 93,1)	<b>95,8</b> (79,8; 99,3)	-	+
11	(Михеева и Иванова, 2011)	Кемеровская обл.	571	212	28	22	309	<b>90,6</b> (86,2; 93,7)	<b>91,7</b> (88,3; 94,2)	-	+
12	(Павлова и др., 2011)	Санкт-Петербург	87	68	0	5	14	<b>93,2</b> (84,95; 97,0)	<b>100</b> (78,5; 100)	+	-
13	(Носова и др., 2011)	Москва	337	97	5	11	224	<b>89,8</b> (82,87; 94,2)	<b>97,8</b> (94,9; 99,1)	-	+
14	(Бобровская и др., 2013)	Екатеринбург, Свердловская обл.	239	161	2	7	69	<b>95,8</b> (91,7; 97,9)	<b>97,2</b> (90,3; 99,2)	-	+
15	(Салина, Морозова, 2014)	Саратов, Саратовская обл.	167	74	2	5	86	<b>93,7</b> (86,02; 97,3)	<b>97,7</b> (92,1; 99,4)	-	+
16	(Манаенкова, Савин, 2015)	Тамбовская обл.	254	95	3	3	153	<b>96,9</b> (91,4; 98,9)	<b>98,1</b> (94,5; 99,3)	-	+
<b><i>Изониазид/ katG, inhA, ahpC</i></b>											
1	(Скотникова и др., 2005)	Москва	184	72	4	7	101	<b>91,1</b> (82,8; 95,6)	<b>96,2</b> (90,6; 98,5)	+	-
2	(Татьков и др., 2007)	Новосибирская обл., Томская обл.	272	144	2	18	108	<b>88,9</b> (83,1; 92,9)	<b>98,2</b> (93,6; 99,5)	+	-
3	(Исакова и др., 2007)	Кыргызстан	278	136	6	13	123	<b>91,3</b> (85,7; 94,8)	<b>95,4</b> (90,2; 97,8)	+	-
4	(Агаев и др., 2009)	Азербайджан	60	26	1	4	29	<b>86,7</b> (70,3; 94,7)	<b>96,7</b> (83,3; 99,4)	-	+
5	(Барило и др., 2009)	Центральный	162	94	4	12	52	<b>88,7</b> (81,3; 93,4)	<b>92,9</b> (83,0; 97,2)	+	-

		регион РФ									
6	(Гаева и др., 2010)	Липецкая обл.	72	22	4	9	37	<b>71,0</b> (53,4; 83,9)	<b>90,2</b> (77,5; 96,1)	-	+
7	(Смазнова и др., 2010)	Брянская обл.	74	36	1	6	31	<b>85,7</b> (72,2; 93,3)	<b>96,9</b> (84,3; 99,4)	-	+
8	(Исакова и др., 2011)	Кыргызстан	633	283	23	21	306	<b>93,1</b> (89,7; 95,4)	<b>93,0</b> (89,7; 95,3)	+	-
9	(Журавлев и др., 2011)	Санкт-Петербург, Ленинградская обл.	92	39	0	0	53	<b>100</b> (91,0; 100)	<b>100</b> (93,2; 100)	-	+
10	(Ломова и Иванова, 2011)	Кемеровская обл.	56	35	0	8	13	<b>81,4</b> (67,4; 90,3)	<b>100</b> (79,2; 100)	-	+
11	(Михеева и Иванова, 2011)	Кемеровская обл.	571	296	38	16	221	<b>94,9</b> (91,8; 96,8)	<b>85,3</b> (80,5; 89,1)	-	+
12	(Павлова и др., 2011)	Санкт-Петербург	87	68	0	5	14	<b>94,3</b> (86,2; 97,8)	<b>100</b> (94,5; 100)	+	-
13	(Носова и др., 2011)	Москва	337	115	5	10	207	<b>92,0</b> (85,9; 95,6)	<b>97,6</b> (94,6; 98,9)	-	+
14	(Бобровская и др., 2013)	Екатеринбург, Свердловская обл.	239	157	4	5	73	<b>96,9</b> (92,9; 98,7)	<b>94,8</b> (87,4; 97,9)	-	+
15	(Салина, Морозова, 2013)	Саратов, Саратовская обл.	120	45	6	6	63	<b>88,2</b> (76,6; 94,5)	<b>91,3</b> (82,3; 95,9)	-	+
16	(Манаенкова, Савин, 2015)	Тамбовская обл.	254	100	9	11	134	<b>90,1</b> (83,1; 94,4)	<b>93,7</b> (88,5; 96,7)	-	+

\* Примечание.

ТР (истинно-положительный результат) – при идентификации специфичной генетической детерминанты в образце ДНК возбудителя туберкулеза, устойчивого к соответствующему химиопрепарату;

ФР (ложно-положительный результат) – при идентификации специфичной генетической детерминанты в образце ДНК возбудителя туберкулеза, чувствительного к соответствующему химиопрепарату;

FN (ложно-отрицательный результат) – при идентификации дикого типа в соответствующем гене в образце ДНК возбудителя туберкулеза, устойчивого к соответствующему химиопрепарату.

TN (истинно-отрицательный результат) – при идентификации дикого типа в соответствующем гене в образце ДНК возбудителя туберкулеза, чувствительного к соответствующему химиопрепарату

Согласно данным, приведенным в Таблице 12, диагностическая чувствительность метода при идентификации устойчивого к рифампицину фенотипа возбудителя туберкулеза в целом находится в диапазоне 88,8 – 96,9%, специфичность - 90,3 - 99,4%; при анализе изониазид-устойчивых штаммов диапазон чувствительности метода находился в интервале 85,7 – 96,9%, специфичности - 85,3 – 98,2%. Низкие значения чувствительности (75,8% для RMP и 71,0% для INH) были получены при анализе клинического материала в Липецком областном ПТД (Гаева и др., 2010). Однако в данной работе отсутствовали сведения о применяемом в качестве метода сравнения культуральном подходе, равно как и значения критических концентраций по рифампицину и изониазиду, что не дает возможность объективно оценить фенотип анализируемых изолятов. Кроме того, как отмечено авторами работы «...неабсолютное совпадение сравниваемых методов можно объяснить тем, что применение тест-системы «ТБ-Биочип (МЛУ)» в нашем лечебном учреждении находится на стадии становления и отбор больных проводился в общем потоке...». В целом, разработанный подход продемонстрировал высокую эффективность выявления лекарственно-устойчивых фенотипов ТБ как при тестировании ДНК изолятов *M. tuberculosis*, так и при анализе образцов ДНК, выделенных из разнообразного клинического материала.

Сравнение результатов, полученных с использованием набора «ТБ-Биочип-1» и рекомендуемой ВОЗ референсной автоматизированной системой «Xpert MTB/RIF» (Cepheid, США) было проведено CDC (США) совместно с ФГБНУ «ЦНИИТ». При идентификации ДНК ТБ в 109 образцах мокроты чувствительность «Xpert MTB/RIF» составила 95,3% (95% CI, 90,0 – 98,3%), специфичность 86,0% (95% CI, 78,9 – 91,3%); чувствительность набора «ТБ-Биочип-1» - 97,3 % (95 % CI, 91,0 – 99,5 %); специфичность – 78,1% (95% CI, 61,5–89,9%). В сравнении с данными фенотипической чувствительности, полученными в системе Bactec MGIT 960, «Xpert MTB/RIF» корректно идентифицировал 98,2 % (95 % CI, 91,5 – 99,9%) of RMP-устойчивых и 95,5% (95% CI, 85,8 – 99,2%) RMP-чувствительных изолятов. Характеристики

разработанного нами набора на данной выборке составили 100% (95% CI, 94,2 – 100%) при идентификации of RMP-резистентных, 94,7% (95% CI, 76,7 – 99,7%) of RMP-чувствительных, 98,2% (95% CI, 91,4 – 99,9%) of INH-резистентных и 78,6% (95% CI, 52,1 – 94,2%) INH-чувствительных изолятов (Kurbatova et al., 2013).

В другой работе сотрудниками МНПЦБТ проведено исследование 278 респираторных образцов (151 образцов мокроты и 127 бронхиальных смывов) с помощью люминесцентной микроскопии, молекулярных тестов «ТБ-БИОЧИП», «Xpert MTB/RIF», «GenoType MTBDRplus» (Hain Lifescience, Германия) и автоматизированной бактериологической системы Bactec MGIT 960 (Nosova et al., 2013). Результаты, полученные с использованием молекулярных тестов, приведены в Таблице 13.

**Таблица 13.** Сравнение диагностических характеристик молекулярных методов для идентификации ДНК возбудителя туберкулеза и анализа генетических детерминант резистентности к рифампицину и/или изониазиду.

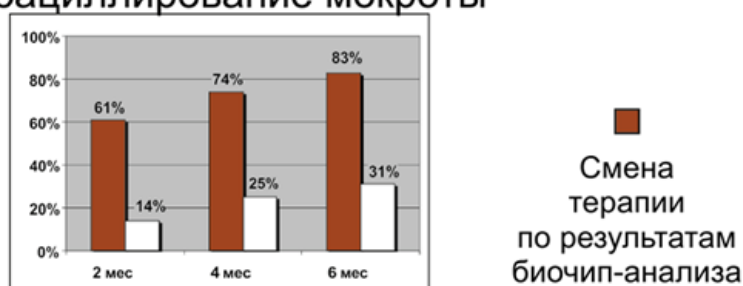
Показатель	ТБ-Биочип1	Xpert MTB/RIF	GenoType MTBDRplus
Чувствительность при идентификации ДНК ТБ в AFB+ образцах, %	78	92	49
Чувствительность при идентификации ДНК ТБ в AFB- образцах, %	52,4	80,9	-
Идентификация RMP-резистентного фенотипа в образцах, %	96,1	92,2	84,4
Идентификация INH-резистентного фенотипа в образцах, %	88,9	-	75,7

Полученные данные сравнения с референсными микробиологическими и рекомендованными ВОЗ молекулярно-генетическими системами свидетельствуют о том, что разработанный метод на основе биочипа для идентификации рифампицин- и изониазид-устойчивых изолятов ТБ не уступает зарубежным аналогам, а по количеству одновременно идентифицируемых детерминант резистентности – существенно их превосходит.

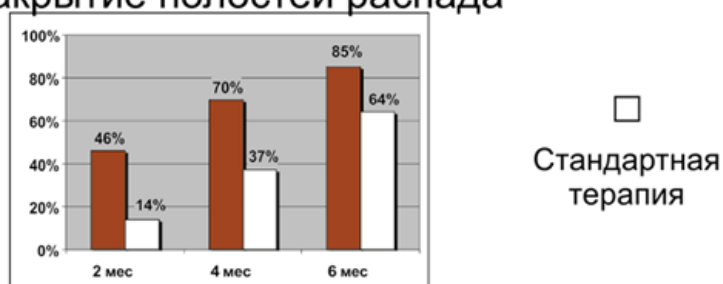
Важным результатом применения набора «ТБ-Биочип-1» стала оценка его клинической эффективности при лечении пациентов с деструктивным легочным туберкулезом в зависимости от времени коррекции схемы терапии (Кузьмин et al., 2006). Группа пациентов (n = 208) была разделена на две

когорты, в первой из которых химиотерапию назначали и изменяли по результатам анализа на биочипах, во второй пациенты получали стандартное лечение препаратами первого ряда с последующей коррекцией по результатам двух-трехмесячного культивирования на плотных средах (оценка устойчивости по методу абсолютных концентраций). Результаты представлены на Рис. 31.

### Абациллирование мокроты



### Закрытие полостей распада



**Рис. 31.** Эффективность терапии больных с МЛУ при использовании результатов анализа на биочипах. Число (%) пациентов с положительной динамикой в зависимости от времени и смены режима терапии (Gryadunov et al., 2011).

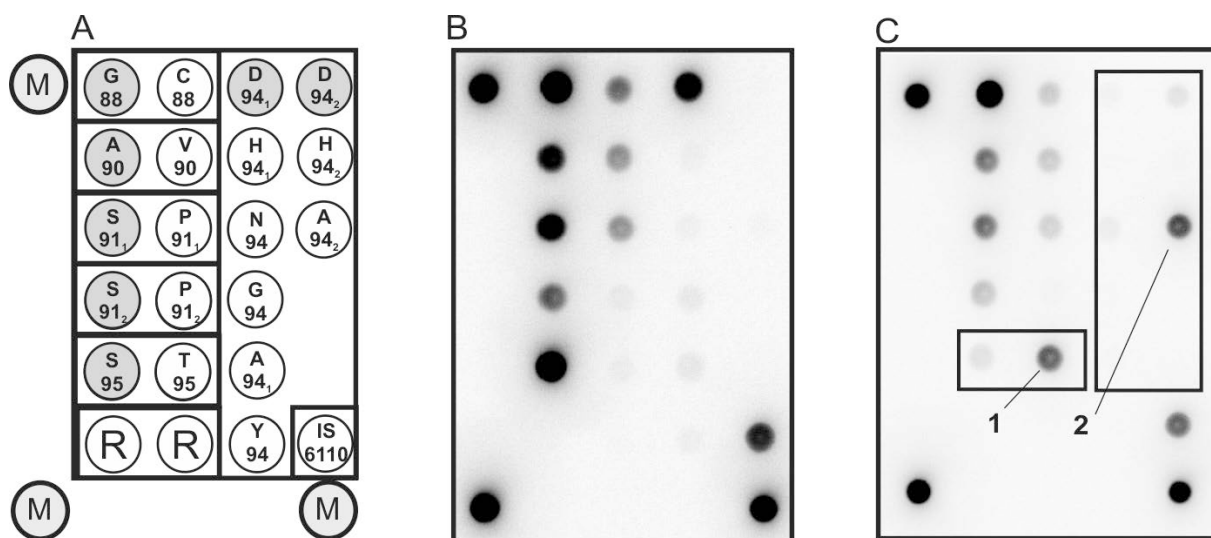
Число пациентов с положительной динамикой абациллирования мокроты и закрытием полостей распада в легких по результатам анализа изолятов в системе «ТБ-Биочип-1» в несколько раз превышало таковое при стандартном режиме терапии и его смене по результатам микробиологии. Аналогичные результаты, подтверждающие клиническую значимость анализа с использованием набора «ТБ-Биочип-1», были получены независимо в Саратовском государственном медицинском университете им. В.А. Разумовского Минздрава России (Кричевская, 2014) и подтверждены главным внештатным фтизиатром Минздрава РФ И.А. Васильевой (Дауров и др., 2010; Васильева и др., 2012).

В настоящее время набор «ТБ-Биочип-1» продолжает активно применяться в лабораторной диагностике туберкулеза, оперативно выявляя МЛУ-ТБ и позволяя переводить таких пациентов на более эффективные режимы терапии.

### **3.2.3 Идентификация мутаций в гене *gyrA*, определяющих устойчивость к фторхинолонам**

В дополнение к способу идентификации мутаций, ответственных за устойчивость ТБ к RMP и INH, разработан метод мультиплексной ПЦР с последующей гибридизации на специализированном олигонуклеотидном биочипе для идентификации восьми мутантных вариантов гена *gyrA* (кодоны 88, 90, 91, 94), встречающихся в устойчивых к фторхинолонам штаммах (~80% всех FQ-резистентных форм) (Antonova et al., 2008).

Схема биочипа и примеры гибридизационных картин представлены на Рис. 32. Серым цветом на Рис. 32А обозначены гелевые ячейки, содержащие олигонуклеотиды (Antonova et al., 2008), способные формировать совершенные гибридизационные дуплексы с ДНК, не имеющей мутаций (т.е. с ДНК дикого типа (WT)), в позициях, соответствующих следующим аминокислотным остаткам гена *gyrA*: G88; A90; S91; D94; S95. Белым цветом на Рис. 32А обозначены гелевые ячейки, содержащие олигонуклеотиды, которые соответствуют следующим аминокислотным остаткам – возможным вариантам замен в гене *gyrA*: C88; V90; P91; T95; H94; N94; G94; A94; Y94. При конструировании зондов учитывали естественный полиморфизм S95T гена *gyrA*, присутствующий в ДНК как чувствительных, так и резистентных к FQ изолятов. По этой причине для идентификации замен в кодонах 91 и 94 создавали и синтезировали 2 варианта зондов (ячейки с нижними индексами '1' и '2' на Рис. 32А), соответствующих дикому типу по 95 кодону и варианту с заменой Ser на Thr.



**Рис. 32.** Схема размещения дискриминирующих олигонуклеотидов на микрочипе (А) и гибридизационные картины, полученные при анализе образцов ДНК дикого типа (В) и ДНК, содержащей естественный полиморфизм S95T (1) и мутацию, приводящую к аминокислотной замене D94A в гене *gyrA* (2) (С).

Разработанным методом было проанализировано 107 образцов ДНК, выделенной из клинических изолятов *M.tuberculosis*, охарактеризованных на плотной среде Левенштейна-Йенсена методом абсолютных концентраций по офлоксацину. Штамм считали устойчивым, если регистрировали 20 КОЕ и более на среде с концентрацией OFX  $\geq 2$  мг/л при обильном росте в контрольной пробирке, не содержащей химиопрепарат. Каждый штамм высевали на средах, содержащих OFX в концентрации 2 и 10 мг/л. По результатам культурального анализа 55 штаммов были отнесены к чувствительным и 52 – к устойчивым по OFX (Таблица 14).

**Таблица 14.** Результаты идентификации мутаций в гене *gyrA* у клинических изолятов ТБ с разной чувствительностью к офлоксацину.

Дикий тип / мутации в гене <i>gyrA</i> , по результатам анализа на биочипе	Число штаммов, определенных методом абсолютных концентраций, как		
	Чувствительные	Устойчивые к OFX в концентрации	
		2 мг/л	10 мг/л
Дикий тип <sup>1</sup>	10	-	-
S95T <sup>2</sup>	42	3	1
G88C <sup>3</sup>	-	-	1
A90V <sup>3</sup>	3	6	2
S91P <sup>3</sup>	-	3	-
D94G <sup>3</sup>	-	13	5
D94Y <sup>3</sup>	-	3	-
D94A <sup>3</sup>	-	4	2



D94N <sup>3</sup>	-	2	3
D94H <sup>3</sup>	-	-	1
A90V, S91P <sup>3</sup>	-	1	-
S91P, D94G <sup>3</sup>	-	1	-
Всего	55	36	16

Примечание: <sup>1</sup> мутации и полиморфизм S95T отсутствуют; <sup>2</sup> выявлен нуклеотидный полиморфизм S95T; <sup>3</sup> идентифицированы мутации, сцепленные с полиморфизмом S95T.

Методом гибридизации на биочипах среди чувствительных изолятов было выявлено 10 образцов ДНК (9,3%), не имевших замен в анализируемом участке гена *gyrA*. Остальные OFX-чувствительные штаммы содержали естественный полиморфизм в 95 кодоне. Отдельную группу составили 3 штамма, фенотипически относящиеся к чувствительным, но по результатам гибридизации содержащие замену A90V и полиморфизм S95T в гене *gyrA*. Данные результаты были отнесены к ложноположительным, несмотря на наличие данных о заменах в кодоне 90, сцепленных с мутациями в других областях гена *gyrA*, например, в кодоне 80, или других генах, встречающихся и у чувствительных к FQ штаммов (Li et al., 2014). Такие штаммы изучали в дальнейшем с использованием расширенного варианта биочипа для детекции мутаций, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам.

Среди штаммов, являющихся устойчивыми по результатам культурального анализа, (Таблица 14), было выявлено четыре образца ДНК, содержащих только естественный полиморфизм S95T. Для этих изолятов было проведено секвенирование фрагмента гена *gyrA*, подтвердившее наличие данного полиморфизма и отсутствие других замен в исследуемом фрагменте. Устойчивость штаммов, не имеющих мутаций в исследуемом участке *gyrA*, может быть обусловлена детерминантами в других генах, ассоциированными с устойчивостью к FQ или иными механизмами защиты, например эффлюксом клеткой препаратов или снижением проницаемости клеточной стенки для фторхинолонов (Li et al., 2014). Наибольшее количество резистентных штаммов (31%) содержали мутации в 94 кодоне; штаммы, имеющие замены в этом кодоне, характеризовались высоким уровнем устойчивости к OFX (рост был зарегистрирован на среде, содержащей 10 мг/л OFX). У 10 штаммов (10,3%),

содержащих замену в 90-м кодоне (A90V), 7 были устойчивы к высоким концентрациям офлоксацина.

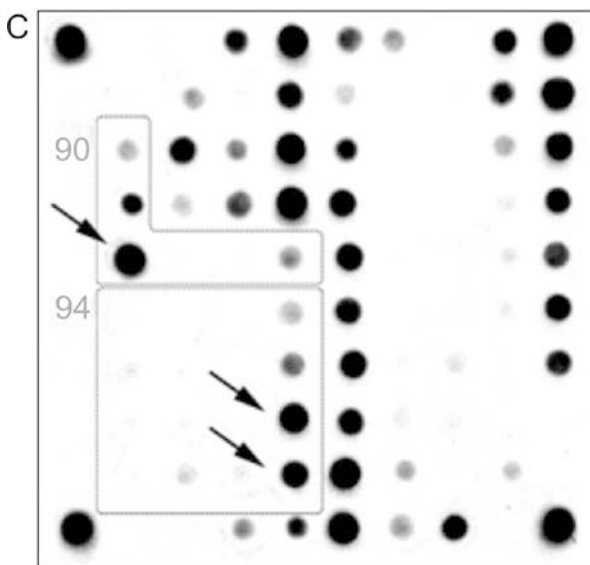
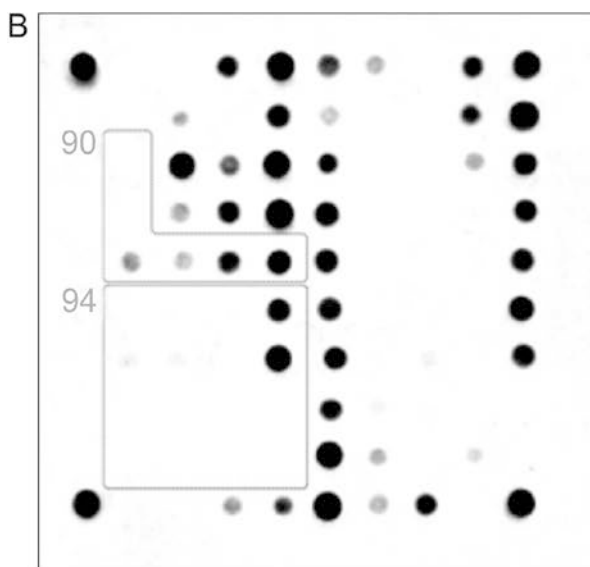
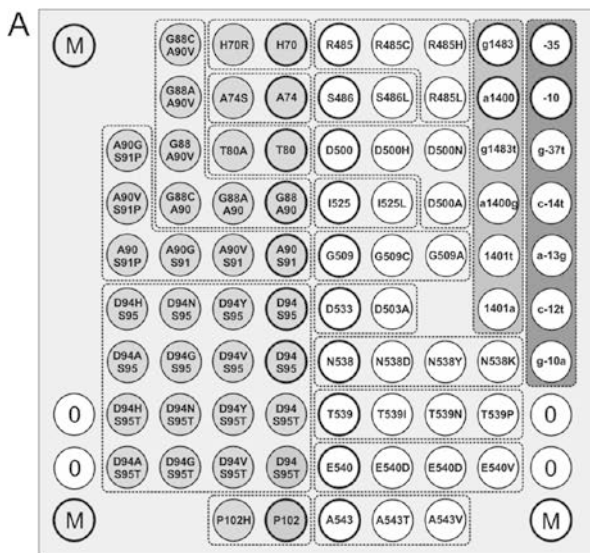
Оценку чувствительности и специфичности разработанного метода выявления FQ-устойчивых штаммов МБТ в клинических образцах проводили, используя 78 образцов мокроты. Анализ клинических образцов методом гибридизации на специализированных биочипах показал следующие результаты: 1) 8 образцов ДНК (9,1%) не содержали замен в исследуемом фрагменте; 2) 56 образцов (63,7%) обладали естественным полиморфизмом S95T; 3) 14 образцов (17,5%) имели мутации, приводящие к устойчивости к FQ, среди них 3 образца содержали замены A90V-S95T; 5 образцов - D94G-S95T; 2 образца - D94Y-S95T; 3 образца - D94N-S95T; 1 образец - D94A-S95T. Исследование мокроты методом абсолютных концентраций позволило выявить 63 образца, чувствительных к OFX и 15 устойчивых штаммов. Совпадение результатов составило 98,7%, при расхождении в одном образце, содержащем только естественный полиморфизм S95T при анализе ДНК из мокроты, и замену A90V-S95T при анализе ДНК соответствующего изолята. Подобное несоответствие может быть связано с присутствием в мокроте гетерогенной популяции штаммов, количества одного из которых, несущего дополнительную мутацию, при значительном преобладании другого, было недостаточно для обнаружения методом гибридизации непосредственно в клиническом материале. Таким образом, чувствительность и специфичность метода составили 94% и 100%, соответственно.

Созданный метод и набор реагентов на его основе «ТБ-БИОЧИП-2» был испытан в МНПЦБТ и ФГБНУ «ЦНИИТ» на клинических образцах (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, экссудат, промывные воды бронхов) и культурах ТБ, выделенных от больных туберкулёзом, и в 2006 году был зарегистрирован в Росздравнадзоре (№ ФС 01012006/3527-06) как медицинское изделие для диагностики *in vitro*. Чувствительность и специфичность набора «ТБ-БИОЧИП-2» по результатам испытаний в МНПЦБТ составили 93% и 96,4%, соответственно (Носова и др., 2007; Носова и др., 2008).

### 3.2.4 Анализ генетических детерминант резистентности ТБ к фторхинолонам и инъекционным препаратам

Введение новых режимов терапии, включающих совместное применение фторхинолонов (левофлоксацина (LVX) и моксифлоксацина (MFX)) и инъекционных препаратов – канамицина (KAN), амикацина (AMK) и капреомицина (CAP) потребовало углубленного изучения генетических детерминант устойчивости и их корреляции с фенотипической чувствительностью к данным препаратам. Для повышения чувствительности при анализе устойчивости к FQ необходимым представлялось включение помимо расширенного сегмента гена *gyrA* (кодоны 70-102), как минимум, пяти мутаций в гене *gyrB* (D500A, N538D, N538T, T539P, E540V), обнаруженных в клинических образцах, для которых было показано снижение ингибирования FQ очищенной ДНК-гиразы *in vitro* и, таким образом, установлено их безусловное участие в формировании устойчивости *M.tuberculosis* (Pantel et al., 2012). В случае инъекционных препаратов помимо мутаций в позициях 1401, 1484 гена *rrs*, для оценки устойчивости к KAN актуальным представлялся анализ локуса *eis* (Gikalo et al., 2012).

С использованием разработанного биочипа, идентифицирующего спектр мутаций в генах *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis* (Рис. 33А), проведено исследование лекарственной устойчивости 66 изолятов ТБ к различным классам фторхинолонов (OFX, LFX, MVX), KAN и CAP, охарактеризованных по уровням фенотипической устойчивости (Zimenkov, et al, 2013). Резистентность к OFX была определена методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена (критические концентрации - 2 и 10 мг/л). Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) к KAN, CAP, LVX, MFX для всех штаммов были определены в системе Bactec MGIT 960. Для KAN и CAP критическая концентрация составила 2,5 мг/л. Для LVX и MFX критические концентрации составили 2 мг/л и 0,25 мг/л, соответственно. Результаты определения уровня устойчивости к препаратам сравнивали с данными по мутациям, обнаруженным на биочипах.



**Рис. 33.** Биочип для идентификации генетических детерминант резистентности к фторхинолонам и инъекционным препаратам. (А) Схема биочипа. Биочип предназначен для идентификации 16 и 23 мутаций в генах *gyrA* и *gyrB*, соответственно; 4 мутаций в локусе *rrs*, 5 мутаций в промоторной области гена *eis*.

Элементы объединены в группы (обведены прямоугольниками), каждая из которых соответствует вариабельной аминокислоте или нуклеотиду. Одна ячейка в каждой группе содержала олигонуклеотид, специфичный к дикому типу (обведена толстым контуром). Последовательности олигонуклеотидов и праймеров для амплификации фрагментов генов *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis* были опубликованы в работе Д.В. Зименкова и соавторов (Zimenkov et al., 2013). Интерпретацию результатов и идентификацию точечных мутаций проводили согласно приведенному выше алгоритму.

(В) Гибридационная картина образца ДНК дикого типа.

(С) Гибридационная картина образца ДНК, содержащего мутацию S91P (TCG>CCG) и однонуклеотидный полиморфизм S95T, AGC>ACC) (выделены стрелками) в гене *gyrA*.

Из 66 исследованных изолятов 42 были устойчивы к OFX. Большинство из них - 37 и 40 культур, также были устойчивы к LVX и MFX (Табл. 15). В устойчивых изолятах значения МИК по этим двум препаратам демонстрировали хорошую корреляцию. Так, при устойчивости к 32 мг/л LVX, МИК данного изолята по MFX составляла 8 мг/л, что являлось максимально обнаруженным уровнем резистентности. Для остальных устойчивых изолятов МИК составляла 4-16 мг/л и 0,5-4 мг/л для LVX и MFX, соответственно.

В 90% (38 из 42) устойчивых к FQ штаммов были обнаружены мутации в гене *gyrA*, из них наиболее частыми мутациями являлись замены D94G и A90V. Данные изоляты не обладали мутациями в сегменте гена *gyrB* (кодоны с 475 до 585), что было подтверждено секвенированием. Все 12 штаммов с мутацией D94G устойчивы к LVX (МИК – 4-16 мг/л), напротив, все штаммы с D94A (6 случаев) – чувствительны к LVX (МИК – 0,5-2 мг/мл).

**Таблица 15.** Корреляция обнаруженных мутаций в генах *gyrA* и *gyrB* с уровнем фенотипической устойчивости к различным фторхинолонам.

Мутация		Число изолятов	Уровень фенотип. устойчивости (мг/л)	МИК Bactec MGIT 960 (мг/л)	
<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>		OFX	LVX	MFX
D94G	wt	1	10	<b>8</b>	<b>2</b>
D94G <sup>a</sup>	wt	12	2-10	<b>4-16</b>	<b>2</b>
D94A <sup>a</sup>	wt	6	2	2	<b>0,5-2</b>
D94N <sup>a</sup>	wt	1	2	<b>8</b>	<b>4</b>
D94H <sup>a</sup>	wt	1	10	<b>4</b>	<b>2</b>
D94Y <sup>a</sup>	wt	1	2	<b>4</b>	<b>1</b>
A90V <sup>a</sup>	wt	9	2-10	2-8	<b>0,5-2</b>
S91P <sup>a</sup>	wt	1	2	2	<b>1</b>
G88C	wt	1	10	<b>8</b>	<b>4</b>
A90V+D94G <sup>a</sup>	wt	1	10	> <b>32</b>	<b>8</b>
A90V+D94Y <sup>a</sup>	wt	1	2	2	<b>1</b>
H70R+G88A <sup>a</sup>	wt	2	2	2	<b>1-2</b>
H70R+A90V <sup>a</sup>	wt	1	2	<b>8</b>	<b>2</b>
S95T	D500H	1	2	<b>4</b>	<b>0,5</b>
S95T	R485H	1	2	1	0,25
S95T	N538D	1	2	2	<b>0,5</b>
S95T	wt	1	2	1	0,125
S95T	wt	17	S	≤0,5	≤0,25
Дикий тип	wt	7	S	≤1	≤0,25

<sup>a</sup>обнаружен естественный полиморфизм S95T, встречающийся как в устойчивых, так и в чувствительных к FQ штаммах. Жирным шрифтом выделены значения МИК, подтверждающие устойчивость. Обозначения: wt – дикий тип, S – чувствительный изолят.

Обнаружен устойчивый ко всем трем препаратам штамм с редкой мутацией в гене *gyrA* – G88C (на фоне полиморфизма S95T). Три штамма содержали также редкую мутацию H70R в сочетании G88A или A90V. Из двух изолятов с двойными мутациями в 90 и 94 кодонах гена *gyrA* штамм A90V+D94G показывал более высокие уровни устойчивости к LVX и MFX, в сравнении с изолированными D94G или A90V; в то же время, изолят с заменами A90V+D94Y при сравнении с D94Y – напротив, несколько более низкие уровни устойчивости к LVX, и не отличался по уровням устойчивости от изолированного A90V. В отличие от нашего предыдущего исследования (Antonova et al., 2008), замена A90V в чувствительных к любому из фторхинолонов изолятах обнаружена не была.

Три штамма из 41 обладали мутациями в гене *gyrB*, при этом в области QRDR гена *gyrA* присутствовал только полиморфизм S95T, что было подтверждено секвенированием (кодоны 59 – 132). Все три штамма были устойчивы к 2 мг/л OFX. Штамм с изолированной мутацией D500H обладал низким уровнем устойчивости по LVX и MFX, что совпадает с предыдущим наблюдением (Malik et al, 2012). Мутация R485H была найдена у изолята, устойчивого к OFX и чувствительного к двум другим фторхинолонам, при этом по данным оценки ингибирования активности ДНК-гиразы *in vitro* данная мутация не ассоциирована с устойчивостью к FQ (Malik et al., 2012). Третий штамм с хорошо охарактеризованной мутацией N538D также обладал низким уровнем устойчивости к MFX.

Таким образом, суммарно было выявлены мутации в 41 из 42 устойчивых к фторхинолонам изолятах, в 24 чувствительных штаммах не было получено ложноположительных результатов.

Изучение фенотипической чувствительности к инъекционным препаратам показало, что из 66 культур 34 были устойчивы к канамицину, из которых 18 культур были устойчивы к максимальной использованной

концентрации 80 мг/л, при этом 17 из 18 изолятов также были устойчивы к капреомицину, МИК капреомицина варьировала от 2,5 до 20 мг/л (Табл. 16). Штаммы, обладавшие промежуточной устойчивостью к KAN (5-80 мг/л), были чувствительны к CAP.

**Таблица 16.** Корреляция обнаруженных мутаций в генах *eis* и *rrs* с уровнем фенотипической устойчивости к канамицину и капреомицину.

Ген (мутация)	Число изолятов	Bactec MGIT 960 (мг/л)	
		KAN	CAP
<i>rrs</i> (a1401g)	17	> <b>80</b>	<b>3-20</b>
<i>eis</i> (g-10a)	10	<b>5</b> – (> <b>80</b> )	0,6-2,5
<i>eis</i> (c-12t)	2	1,3- <b>5</b>	1,3
<i>eis</i> (c-14t)	2	<b>20</b>	1,3
	1	0,63	1,3
<i>eis</i> (g-37t)	3	<b>10-20</b>	1,3-2,5
	29	0,3-2,5	0,6-2,5
Дикий тип	1	<b>5</b>	1,3
	1	1,3	2,5

Из 34 изолятов, устойчивых к KAN, в 33 были обнаружены мутации: в 17 штаммах – a1401g в гене *rrs* и в 16 – в различных позициях промотора *eis*, причем 10 из них несли мутацию g-10a). У 30 чувствительных штаммов и одного KAN-устойчивого штамма мутации не были выявлены по данным анализа на биочипах и секвенирования фрагментов *rrs* и *eis*. В CAP-устойчивых штаммах в 17 случаях из 17 была выявлена мутация a1401g в локусе *rrs*. МИК изолятов варьировал от 3 до 20 мг/л. В 49 чувствительных к CAP изолятах мутаций выявлено не было.

Полученные данные свидетельствуют, что штаммы с мутацией a1401g в гене *rrs* были устойчивы к канамицину и капреомицину. МИК KAN для таких изолятов составляла >80 мг/л, для CAP – от 3 до 20 мг/л. Штаммы с мутациями g-10a и g-37t в промоторной области гена *eis* были устойчивы к KAN и чувствительны к CAP. Среди штаммов с мутациями c-12t и c-14t в *eis* встречались как устойчивые, так и чувствительные к KAN штаммы, что согласуется с данными других исследований (Pholwat et al., 2016). МИК канамицина для штаммов с мутациями в гене *eis* варьирует в больших пределах (от 0,63 до >80 мг/л), что может свидетельствовать о вкладе иных локусов в формирование устойчивости к данному препарату, например, 5'-

нетранслируемого региона транскрипционного активатора *whib7* (Reeves et al., 2013; Kaur et al., 2016).

Таким образом установлено, что мутации в гене *gyrB* (D500H, N538D) ассоциированные с устойчивостью к офлоксацину и левофлоксацину, присутствуют у изолятов с низким уровнем устойчивости к моксифлоксацину. Следовательно, для штаммов возбудителя туберкулеза, несущих мутации только в гене *gyrB*, терапия моксифлоксацином может быть эффективна. В то же время, мутации в гене *gyrA* приводят к перекрестной устойчивости ко всему спектру фторхинолонов, и, таким образом, применение фторхинолонов в отношении штаммов, обладающих мутациями в данном гене, не является рациональным. Ассоциация мутации D94A в гене *gyrA* с чувствительностью к офлоксацину и левофлоксацину требует дальнейшего подтверждения на большей выборке изолятов.

Показана ассоциация мутаций в генах *eis* и *rrs* с различным уровнем устойчивости к канамицину и капреомицину. Так, мутация a1401g в гене *rrs* встречается у штаммов с высоким уровнем устойчивости как к канамицину, так и капреомицину. Мутации в гене *eis* ассоциированы с устойчивостью различного уровня к канамицину, но не к капреомицину, при этом часть замен с-12t, с-14t обнаружены также и в чувствительных к канамицину изолятах. Тем самым в отношении штаммов *M. tuberculosis*, характеризующихся мутациями только в гене *eis*, может быть использована терапия капреомицином.

### **3.2.5 Разработка метода обнаружения ДНК возбудителя туберкулеза с одновременным генотипированием и идентификацией генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости**

Нарастающий уровень лекарственно-устойчивых форм ТБ требует разработки и внедрения молекулярных методов, охватывающих максимально широкий спектр детерминант резистентности с возможностью их идентификации в геномной ДНК, выделенной из клинического материала. Недавно научные сообщества [TBNET](#) и [RESIST-TB](#) заявили о необходимости скрининга каждого клинического изолята ТБ на



предмет идентификации мутаций в генах *rpoB*, *katG*, *inhA*, *embB*, *rrs*, *rpsL*, *gyrA*, в дополнение к фенотипическому анализу чувствительности (Dominguez et al., 2016).

Актуальной проблемой является определение структуры популяции ТБ, что важно не только для эпидемиологического мониторинга, но и для назначения адекватной терапии. Доминирующие на территории РФ штаммы семейства Beijing Восточно-азиатской линии ассоциированы с МЛУ-формами ТБ и характеризуются первичной и приобретенной устойчивостью к FQ (Yuen et al., 2013) . Изоляты данного семейства обладают высокой скоростью репликации и мутирования, эффективными эффлюксными системами и адаптационными механизмами (Fonseca et al., 2015). Кластер Beijing B0/W148, составляющий от 8 до 22% популяции ТБ в России, характеризуется исключительно лекарственно-устойчивыми формами. Стойкая ассоциация с МЛУ показана и для других эндемичных для РФ генетических семейств LAM и Ural (Mokrousov, 2012).

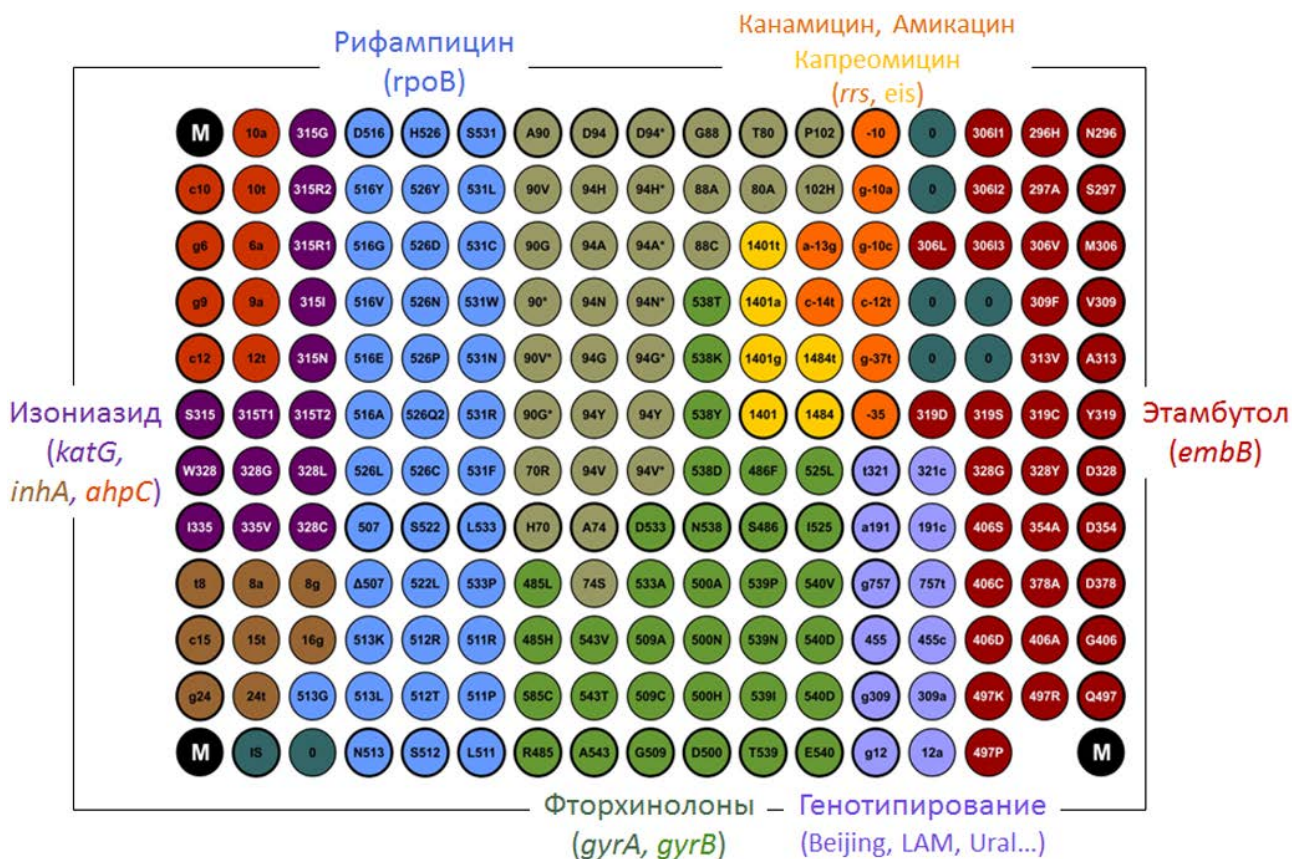
Для решения данных задач нами был разработан метод выявления ДНК возбудителя туберкулеза, с одновременным установлением генотипа эндемичных для РФ штаммов и определением генетических детерминант МЛУ и ШЛУ. Процедура анализа включала мультиплексную ПЦР с адаптерными праймерами и циклической элонгацией с целью одновременной амплификации и флуоресцентного маркирования 17 локусов генома *M. tuberculosis*, с последующей гибридизацией. Биочип (Рис. 34), являющийся ключевым компонентом разработанного подхода, позволяет идентифицировать ДНК МТВС, устанавливать принадлежность к Евро-Американской линии, определять семейства Haarlem, LAM, Ural, Beijing, Beijing B0, и выявлять, суммарно, 116 генетических детерминант лекарственной устойчивости, в том числе:

- 28 мутаций в гене *rpoB*, ответственных за устойчивость к RMP;
- 11 мутаций в гене *katG*, 5 мутаций в гене *inhA*, 5 мутаций в гене *ahpC*, приводящих к устойчивости к INH;

- 15 мутаций в гене *gyrA*, 23 мутации в гене *gyrB*, ответственных за устойчивость к FQ;

- 4 мутации в гене *rrs*, 6 мутаций в гене *eis*, приводящих к устойчивости к KAN, АМК, CAP;

- 23 мутации в гене *embB*, ответственные за устойчивость к этамбутолу (EMB).



**Рис. 34.** Структура биочипа для идентификации ДНК возбудителя туберкулеза, определения его генотипа и анализа генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости. Различными цветами показаны группы ячеек с иммобилизованными зондами, специфичными к последовательностям дикого типа и мутантным вариантам генов, ассоциированных с лекарственной устойчивостью. Ячейка с индексом 'IS' содержит зонд, комплементарный последовательности фрагмента IS6110, характерного для МТВС. Ячейки с индексом '0' не содержат зондов и выполняют роль отрицательного контроля. Элементы с индексом 'M' предназначены для захвата флуоресцентного изображения биочипа.

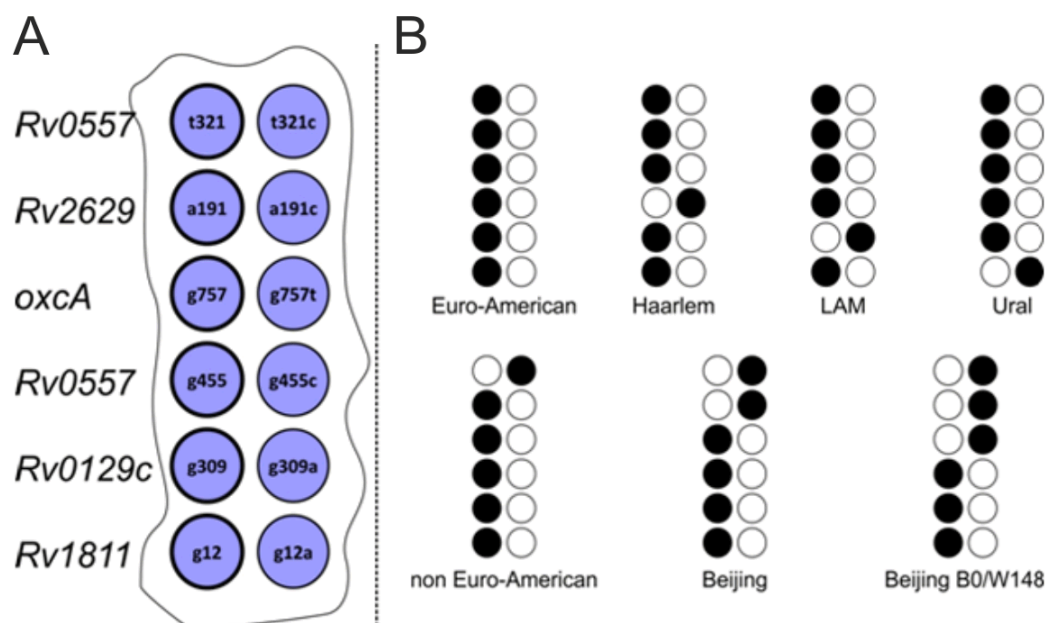
Установление семейства ТБ проводили посредством анализа сигналов в группах ячеек, содержащих олигонуклеотиды, последовательности которых комплементарны фрагментам, содержащим генотип-специфические однонуклеотидные полиморфизмы Rv0557, Rv0129с, Rv1811, Rv2629, Rv0118с. (Nomolka et al., 2012). Для идентификации полиморфизма Rv0557 предназначены ячейки **t321, 321c, 455, 455c**; Rv0129 - **g309, 309a**; Rv1811 - **g12,**

**12a**; Rv2629 - **a191, 191c**; Rv0118c - **g757, 757t** (Рис. 34). Интенсивности сигналов внутри данных групп ячеек сравнивали и в случае, если максимальный сигнал в одной из ячеек превосходил сигналы в других более, чем в 2 раза, т.е. выполнялось соотношение  $I_p / I_m \geq 2,0$  между ячейками, принадлежащими одной группе, делали следующие заключения:

- в случае установления дикого типа по полиморфизму Rv0557\_321 штамм относили к Евро-Американской линии, с дальнейшей идентификацией генотипа Haarlem (по полиморфизму Rv0557\_455G>C), либо генотипа LAM (по полиморфизму Rv0129c\_309G>A), либо Ural (по полиморфизму Rv1811\_12G>A);

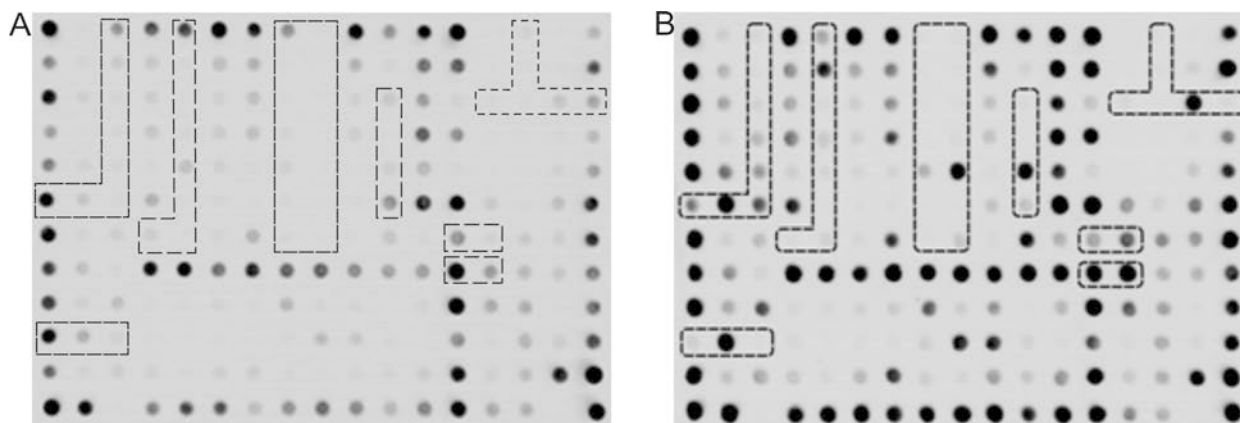
- при выявлении замены T>C полиморфизма Rv0557\_321 штамм относили к иной, не Евро-Американской линии, и при наличии полиморфизма Rv2629\_191A>C определяли семейство Beijing.

- в случае выявления семейства Beijing, анализировали группу ячеек **g757, 757t**. При выявлении замены Rv0118c G>T в гене *oxcA* (Shitikov et al., 2014) устанавливали генотип B0/W148 для семейства *Beijing*. Предложенный алгоритм сравнения сигналов в элементах для установления семейства ТБ схематично представлен на Рис. 35.



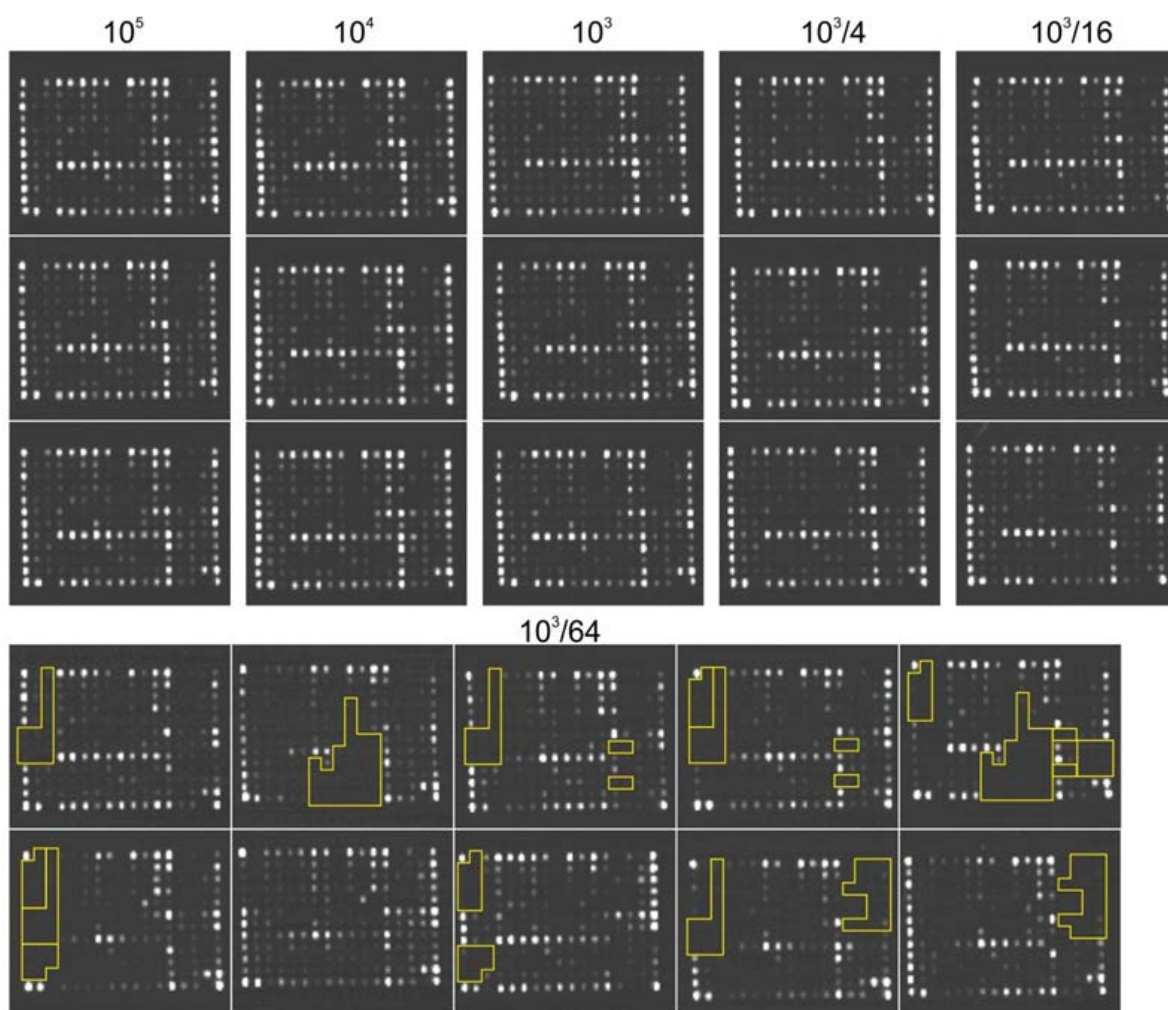
**Рис. 35.** Схема идентификации семейств ТБ. (А) Фрагмент см микрочипа с группами элементов, предназначенными для идентификации семейство-специфичного однонуклеотидного полиморфизма. (В) Возможные варианты результатов гибридизации и их интерпретация. Ячейки черного цвета соответствуют позитивным сигналам от совершенных дуплексов, белого – отрицательным.

Последовательности олигонуклеотидов и праймеров были запатентованы (Грядунов и Зименков, 2015) и опубликованы (Zimenkov et al., 2016). Примеры гибридизационных картин при анализе ДНК изолятов МТВС, характеризующихся различными профилями устойчивости, приведены на Рис. 36.



**Рис. 36.** Идентификация генотипов и маркеров лекарственной устойчивости в ДНК *M. tuberculosis* методом гибридизации на гидрогелевом биочипе. Группы с мутациями обведены контурами. (А) Анализ ДНК изолята дикого типа *M. tuberculosis* H37Rv. Штамм принадлежит Евро-Американской линии. (В) Анализ образца ДНК *M. tuberculosis*, обладающего следующими мутациями: *rpoB* (H526Y), *katG* (S315T1), *inhA* (c15t), *embB* (M306V), *gyrA* (D94G, S95T), *rrs* (a1401g). Изолят не принадлежит Евро-Американской линии. Генотип: Beijing.

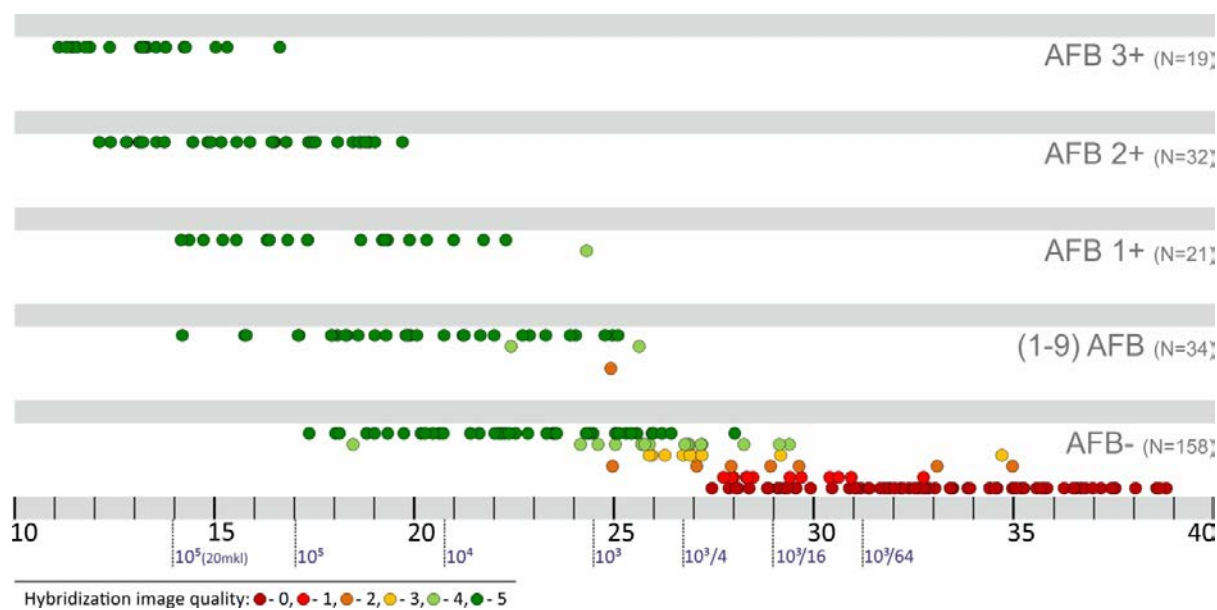
Аналитическую чувствительность метода оценивали посредством анализа серийных разведений геномной ДНК штамма *M. tuberculosis* H37Rv в концентрациях  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^3/4$ ,  $10^3/16$ ,  $10^3/64$  геном-эквивалентов/ мкл (в трех повторностях каждое). Для низшего разведения ( $10^3/64$  гэк/реакцию или ~50 копий геномной ДНК) были получены невоспроизводимые результаты из-за возникающих в ходе амплификации стохастических эффектов. Гибридизационные картины со всеми 17 ПЦР-продуктами были получены в 70% случаев, в остальных профили содержали 1-4 группы с низкими интенсивностями сигналов, неподдающиеся интерпретации (Рис. 37).



**Рис. 37.** Гибридизационные картины, полученные от разведений ДНК *M. tuberculosis* H37Rv. Анализ разведения  $10^3/64$  геном-эквивалентов/ мкл был проведен в десяти повторностях. Группы с отрицательными сигналами выделены желтым контуром.

Оценку применимости разработанного метода для анализа клинического материала проводили с использованием 264 препаратов ДНК, выделенных из образцов мокроты, охарактеризованных методом люминесцентной микроскопии. Параллельно с анализом на биочипах выделенные образцы ДНК оценивали методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени, фиксируя пороговый цикл  $C_t$ . Качество гибридизационных картин оценивали по шкале от 0 (отсутствие сигналов во всех группах элементов) до 5 (наличие позитивных сигналов в группах от 17 анализируемых фрагментов). Результаты анализа приведены на Рис. 38. Как видно на данной картине, результаты количественной ПЦР и гибридизации на биочипах хорошо коррелируют друг с другом: 95% гибридизационных картин высшего качества (уровень 5) были получены для образцов ДНК, значение  $C_t$  которых не

превышало 25. Для 142 из 264 образцов получены гибридизационные картины высшего качества.

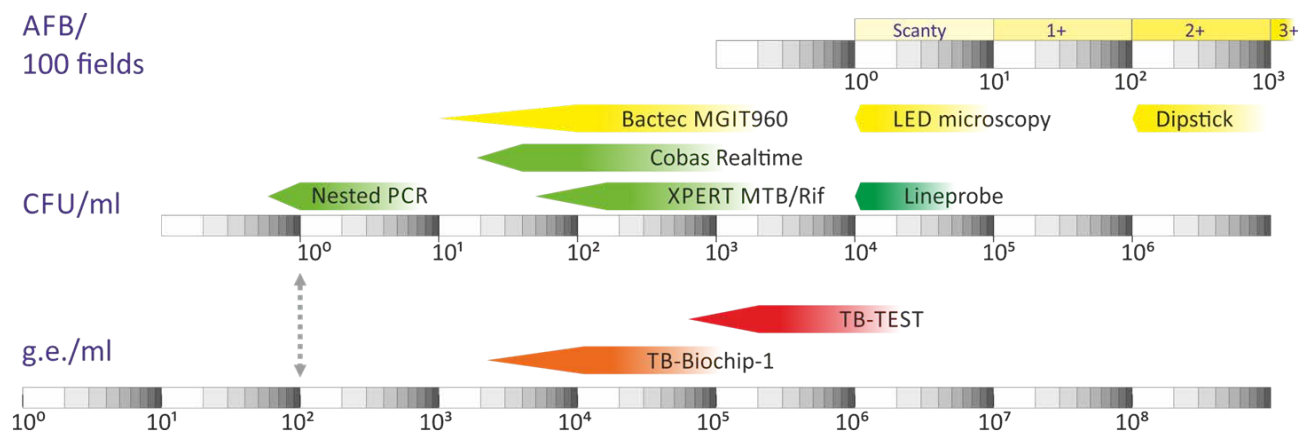


**Рис. 38.** Корреляция результатов, полученных методами ЛЮМ, ПЦР с детекцией в реальном времени ДНК *M. tuberculosis* и гибридизации на биочипах, при анализе 264 клинических образцов. Значения горизонтальной оси соответствуют пороговому циклу  $C_t$ . Значения  $C_t$ , полученные для серийных разведений геномной ДНК, приведены ниже оси. Цвет точек (от темно-красного до темно-зеленого) соответствует качеству анализа на биочипах. Результаты гибридизации на биочипах сгруппированы для каждой из степеней градации мокроты (AFB), полученных методом ЛЮМ.

Для бактериоскопически положительных образцов ('AFB+' и '(1-9) AFB') число положительных результатов с гибридизационной картиной высшего качества составило 96,2% (102 из 106). Снижение эффективности анализа на чипах для четырех образцов возможно объясняется наличием ингибиторов в образцах мокроты, не влияющих на выход моноплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени, но снижающих эффективность мультиплексной амплификации. Гибридизационные картины высшего уровня были также получены для 40 из 158 (25%) бактериоскопически отрицательных образцов. Еще для 24 (15%) отрицательных образцов, содержащих ДНК *M. tuberculosis*, были получены частично интерпретируемые результаты. Предельное значение порогового цикла  $C_t$ , характеризующего получение идеальных гибридизационных картин, составило 27 для данных экспериментальных условий (метод выделения ДНК, модель термоциклера, набор для ПЦР с детекцией в режиме реального времени). Большие значения  $C_t$  и, соответственно, меньшие концентрации ДНК, могли привести к

частично интерпретируемой гибридизационной картине. В этом случае, подращивание в жидкой среде в автоматизированной системе с последующим анализом ДНК и получением мутационного профиля с использованием биочипа все равно занимает существенно меньшее время, чем вторичное культивирование изолята на селективной среде с противотуберкулезным препаратом.

Сводная оценка чувствительности различных методов при идентификации возбудителя туберкулеза приведена на Рис. 39 (данные доктора Д.В. Зименкова).



**Рис. 39.** Оценка молекулярно-генетических, микробиологических и микроскопических методов для анализа возбудителя туберкулеза при различных степенях градации мокроты (AFB/100 fields), числе колониеобразующих единиц в объеме клинического материала (CFU/ml), количестве ДНК (геном-эквивалентов, g.e./ml). Обозначение TB-TEST (ТБ-ТЕСТ) – набор реагентов на основе описанного в настоящем разделе метода.

В целом, несмотря на несколько меньшую, чем у набора «ТБ-Биочип-1» аналитическую чувствительность, разработанная методика амплификации исключает двухстадийную ПЦР с обязательным электрофоретическим контролем продуктов обеих стадий, что повышает устойчивость процедуры к контаминации ПЦР-продуктами и существенно снижает трудоемкость анализа.

С использованием разработанного метода проведено исследование коллекции СПб НИИФ, насчитывающей, суммарно, 264 охарактеризованных изолята, в т.ч. 91 ШЛУ- и 108 МЛУ-штаммов, 24 штамма с моно- или полирезистентностью и 41 чувствительный изолят (Zimenkov et al., 2016). Для всех изолятов были получены гибридизационные картины высшего качества, при этом результаты гибридизации при анализе соответствующих ДНК клинических образцов и изолятов совпали во всех случаях, где анализ ДНК из клинического материала привел к положительному

результату. Данные по обнаруженным детерминантам резистентности приведены в Таблице 17.

**Таблица 17.** Генетические детерминанты резистентности, выявленные в 264 устойчивых и чувствительных изолятах из коллекции СПб НИИФ.

Препарат / локус	Найденные мутации	Число изолятов с мутацией	
		Устойчивые	Чувствительные
<b>Рифампицин</b>			
<i>rpoB</i>	L511P	3	2
	D516V	10	
	D516Y	4	1
	D516F <sup>a</sup>	1	
	H526D	1	
	H526N	1	
	H526L	2	
	H526R	3	
	S531L	175	
	L533P		2
	D516G L533P	1	
	Всего с мутацией	201	5
	Всего без мутации	1	57
<hr/>			
<b>Изониазид</b>			
<i>katG</i>	S315T1	160	3
	S315T2	1	
	S315T1 I335V	4	
<i>inhA</i>	c15t	5	
	<i>katG + inhA</i>	S315T1 t8a	5
S315T1 c15t		37	
	Всего с мутацией	212	3
	Всего без мутации	4	45
<hr/>			
<b>Этамбутол</b>			
<i>embB</i>	N296H	3	4
	S297A	1	2
	M306V	53	9
	M306L	1	2
	M306I1	15	12
	M306I2		1
	Y319C	1	
	Y319S	1	3
	D328Y	1	
	D354A	13	7
	G406A	9	2
	G406C		1
	G406D		7
	G406S	2	1
	Q497K	1	
	Q497P		2
	Q497R	9	5
	M306I1 G406D	3	
	M306I2 G406A	1	

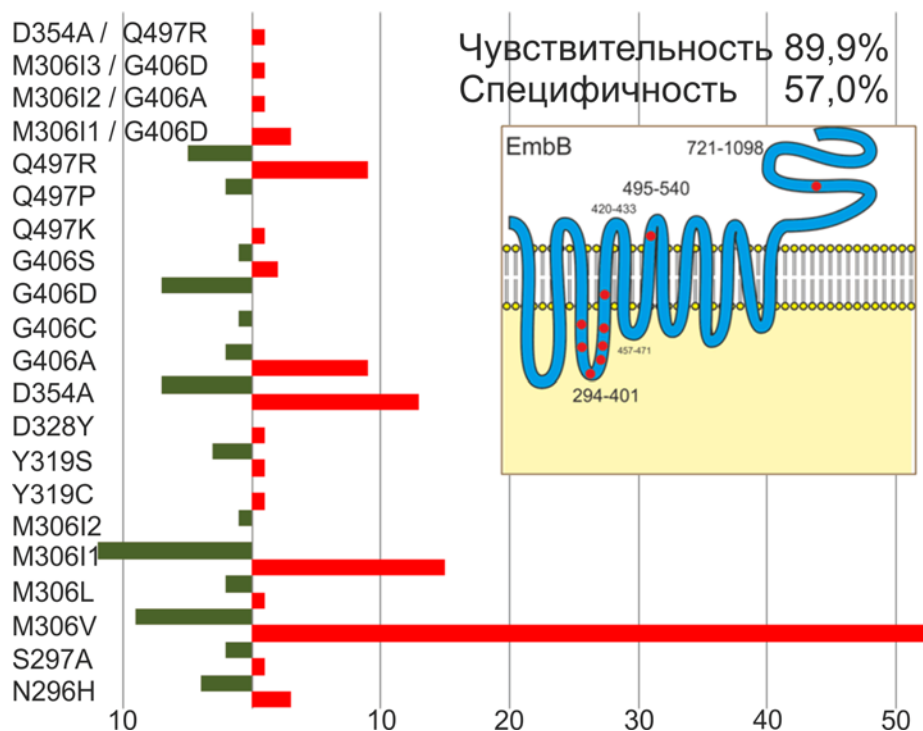


	M306I3 G406D	1	
	D354A Q497R	1	
	Всего с мутацией	116	58
	Всего без мутации	13	77
<b>Офлоксацин</b>			
<i>gyrA</i>	G88C	1	
	A90V	14	
	S91P	3	2
	D94A	12	2
	D94G	27	7
	D94N	7	
	D94Y	5	
	A90V D94A	1	
	A90V D94G	4	
	A90V S91P	1	
	S91P D94N	2	
	S91P D94A	2	
	S91P D94G	5	
	<i>gyrB</i>	D500H	1
G509A		1	
N538D		1	
E540D2		1	
A543V		2	3
<i>gyrA + gyrB</i>	A90V T539A	1	
	A90V E540V	1	
	A90V A543V	1	
	A90V D500N	2	
	S91P A543V	2	
	D94G E540D2	1	
	D94G T539I	1	
	Всего с мутацией	99	14
Всего без мутации	11	140	
<b>Инъекционные препараты (канамицин + капреомицин)</b>			
<i>eis</i>	c12t	5	3
	c14t	22	2
	g10a	31	4
	g37t	21	1
<i>rrs</i>	a1401g	66	
<i>rrs + eis</i>	a1401g c12t	4	
	a1401g g10a	6	
	Всего с мутацией	155	10
	Всего без мутации	7	92
<b>Канамицин</b>			
<i>eis</i>	c12t	5	3
	c14t	22	2
	g10a	30	5
	g37t	21	1
<i>rrs</i>	a1401g	64	2
<i>rrs + eis</i>	a1401g c12t	4	0
	a1401g g10a	6	0
	Всего с мутацией	152	13
	Всего без мутации	5	94

Наиболее распространенной мутацией в гене *rpoB* являлась замена S531L, найденная у 87% устойчивых изолятов. Замены L511P, D516Y и L533P были найдены в 12 из 264 штаммах, в т.ч., в 5 чувствительных. Данные мутации ассоциированы с низким уровнем резистентности, т.е. обладают МИК ниже или равной критической концентрации. Необходимость детекции данных детерминант можно объяснить возможностью назначения повышенных доз рифампицина при слабой положительной динамике пациентов, выделяющих такие штаммы. В исследуемой выборке нами идентифицировано 16 из 202 (8%) устойчивых изолятов с мутациями в кодоне 516.

160 изолятов с мутацией в гене *katG* S315T1 (agc>acc) были охарактеризованы как устойчивые, и три штамма были чувствительны к изониазиду. Четыре из них имели дополнительную замену I335V и 42 обладали двойными мутациями в генах *katG* и *inhA*. Мутации в промоторной области гена *inhA* были идентифицированы в 35% ШЛУ- и 13% МЛУ-штаммов и при этом отсутствовали в изониазид-устойчивых, моно- или полирезистентных изолятах. Данное обстоятельство говорит о серьезной ассоциации таких мутаций с широкой лекарственной устойчивостью. В отличие от наших предыдущих исследований (Gryadunov et al., 2005) ИН-резистентные изоляты с изолированными или сочетанными мутациями в области *ahpC-oxuR* обнаружены не были. По видимому, бактериальный фитнес таких изолятов не позволяет им выживать в условиях распространения мощной популяции изолятов семейства Beijing, характеризующейся мутациями в генах *rpoB* и *katG*. Так, сочетание замен в гене *rpoB* S531L и S315T1 в гене *katG* было выявлено в 55 (60%) ШЛУ и 84 (78%) МЛУ изолятов.

Разработанный биочип предназначен для идентификации 22 мутаций в кодонах 296-497 гена *embB*. В анализируемом локусе мутации были обнаружены как в устойчивых (116 из 129, 90%), так и в чувствительных (58 из 135, 43%) изолятах. Шесть изолятов с двойными мутациями имели резистентный фенотип. Замена M306V была найдена в 53 из 129 (41%) устойчивых штаммов (Рис. 40).



**Рис. 40.** Идентификация мутаций в гене *embB* в изолятах, чувствительных (зеленые столбцы) и устойчивых (красные столбцы) к этамбутолу. Высота столбца характеризует число штаммов с конкретной мутацией. На врезке схематично представлена локализация аминокислотных замен в арабинозилтрансферазе EmbB, приводящих к резистентности к этамбутолу.

Чувствительность и специфичность при анализе устойчивости к EMB составили 89,9% and 57,0%, соответственно (Таблица 18). Было показано, что микробиологическое определение чувствительности к этамбутолу обладает низкой воспроизводимостью (Madison et al., 2002), в то время как генетический анализ позволяет лучше предсказать истинную резистентность: в данной выборке 97% изолятов с мутациями в гене *embB* относились к МЛУ или ШЛУ-изолятам; 3 из 5 полирезистентных изолята с мутантным геном *embB* также были фенотипически устойчивы к этамбутолу. Полученное значение чувствительности теста по EMB существенно превосходит опубликованное ранее 58% (Ноек et al., 2009). Невысокое значение специфичности следует объяснить необходимостью анализа культур в системе Bactec при концентрации EMB менее 5 мг/л, что позволит лучше дифференцировать фенотипически устойчивые и чувствительные изоляты.

Исследование устойчивости *M. tuberculosis* к офлоксацину показало доминирование мутаций в гене *gyrA* (93 из 110, 85%), включая двойные

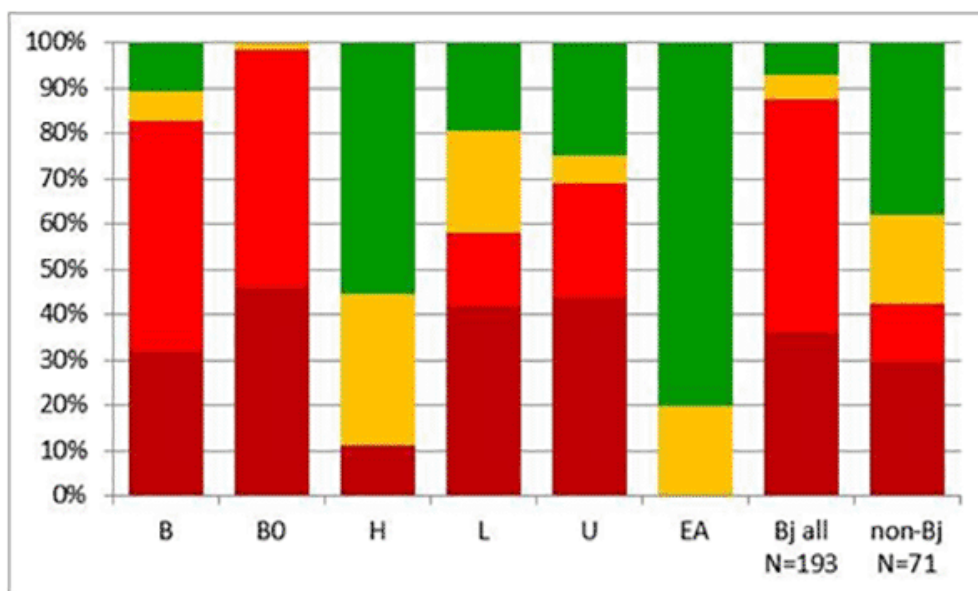
мутации в данном локусе (14%) и сочетанные замены *gyrA/gyrB* (8%). Единичные мутации в гене *gyrB* были найдены только в 6 изолятах, тем самым, добавление данного локуса для идентификации фторхинолон-устойчивых изолятов повысило чувствительность теста на 5%. Замена A543V в гене *gyrB* была обнаружена в устойчивых и чувствительных изолятах. Несмотря на то, что данная мутация незначительно повышает МИК по FQ (Malik et al., 2012), ее вклад в развитие устойчивости к фторхинолонам остается существенным (Eldholm et al., 2015). Интересно, что все изоляты с заменой A543V, включая штаммы с сочетанными мутациями в *gyrA*, были устойчивы к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, по меньшей мере, одному из инъекционных препаратов, вариабельность проявлялась только с резистентностью по офлоксацину. Аналогично ситуации с локусом *embB*, штаммы с мутациями в *gyrA* и/или *gyrB* были преимущественно ассоциированы с МЛУ- или ШЛУ-фенотипом: 74% устойчивых штаммов относились к ШЛУ-вариантам (81 изолят) и 26% - к МЛУ (29 изолятов).

51 из 76 (67%) изолятов с заменой a1401g в гене *rrs* были устойчивы ко всем трем инъекционным препаратам. 62 из 80 и 62 из 86 штаммов, устойчивых к САР и АМК, были корректно идентифицированы благодаря найденной мутации a1401g. У 74 из 157 (46%) КАН-устойчивых изолятов была найдена замена 1401g в гене *rrs*. Десять из них также имели замены в промотере гена *eis*. Остальные 78 из 157 изолятов содержали мутации только в *eis*, которые были обнаружены и в 11 чувствительных штаммах (Таблица 17). Таким образом, включение локуса *eis* в панель анализируемых маркеров дает прирост с 47% до 97% в чувствительности теста, однако данные мутации найдены и в чувствительных изолятах. Помимо стохастических ошибок в культуральном определении чувствительности вклад в развитие устойчивости к канамицину могут давать и различные эпистатические факторы (Reeves et al., 2013). Значения предсказательной ценности положительного результата также варьировали для *eis*-мутаций: наибольшее было получено для g(-37)t, наименьшее – для замены с(-12)t (Таблица 18).

**Таблица 18.** Диагностические характеристики разработанного метода по результатам анализа 264 клинических изолятов ТБ

Препарат/локус Фенотипическая Чувствительность*	Число изолятов		Специфичность, % (CI 95%)	Чувствительность, % (CI 95%)	Предсказательная ценность положит. результата, % (CI 95%)	Предсказательная ценность отр.результата, % (CI 95%)
	Наличие мутации	Отсутствие мутации				
<b>Рифампицин/ rpoB</b>			99,5 (97,3, 99,9)	91,9 (82,5, 96,5)	97,6 (94,4, 98,9)	98,3 (90,9, 99,7)
Чувствительные к RMP	5	57				
Устойчивые к RMP	201	1				
<b>Изониазид/ katG, inhA, ahpC</b>			98,2 (95,3, 99,3)	93,8 (83,2, 97,9)	98,6 (95,9, 99,5)	97,4 (80,8, 96,8)
Чувствительные к INH	3	45				
Устойчивые к INH	212	4				
<b>Фторхинолоны (офлоксацин) / gyrA, gyrB</b>			90,9 (85,3, 94,5)	90,0 (83,0, 94,3)	87,6 (80,3, 92,5)	92,7 (87,4, 95,9)
Чувствительные к OFX	14	140				
Устойчивые к OFX	99	11				
<b>Амикацин, канамицин, капреомицин / rrs, eis</b>			90,2 (82,9, 94,6)	95,7 (91,4, 97,9)	93,9 (89,2, 96,7)	92,9 (86,1, 96,5)
Чувствительные к SLID	10	92				
Устойчивые к SLID	155	7				
<b>Канамицин / rrs, eis</b>			87,9 (80,3, 92,8)	96,8 (92,7, 98,6)	92,1 (86,9, 95,3)	95,0 (88,7, 97,8)
Чувствительные к KAN	13	94				
Устойчивые к KAN	152	5				
<b>Этамбутол / embB</b>			57,0 (48,6, 65,1)	89,9 (83,5, 94,0)	66,7 (59,4, 73,2)	85,6 (76,8, 91,4)
Чувствительные к EMB	58	77				
Устойчивые к EMB	116	13				

\* Фенотипическая чувствительность изолятов была определена в системе Bactec MGIT 960 (RMP, INH, EMB) и методом абсолютных концентраций (OFX, SLID)



**Рис. 41.** Ассоциация выявленных семейств с лекарственной устойчивостью. Профиль лекарственной устойчивости отмечен цветами: бордовый – ШЛУ, красный – МЛУ, желтый – моно- или полирезистентный штамм, зеленый – чувствительные изоляты.

Анализ коллекции на предмет установления семейств *M. tuberculosis* с использованием разработанного метода показал преобладание штаммов генотипа Beijing (73,1%); в значительно меньшей степени представлены семейства LAM (12,1%), Ural (~7%) и штаммы, относящиеся к «Европейско-Американскому типу» (7,2%) (Рис. 41). Из всех изолятов, принадлежащих к генотипу Beijing, более 30% составил кластер B0/W148. Установление принадлежности к данному генотипу фактически означало выявление МЛУ- или ШЛУ-фенотипа, что подтверждает клиническую значимость идентификации данного семейства. Наоборот, изоляты Евро-Американской линии, не входящие в семейства LAM или Ural, были преимущественно ассоциированы с чувствительным фенотипом.

Таким образом, был создан чувствительный и специфичный метод, охватывающий широкий спектр детерминант лекарственной устойчивости ТБ и позволяющий одновременно выявлять эндемичные для РФ семейства ТБ. На основе метода разработан, испытан, зарегистрирован в Росздравнадзоре (РУ РЗН 2014/1709) и внедрен в клиническую практику учреждений противотуберкулезной службы РФ Набор реагентов «ТБ-ТЕСТ», в настоящее время входящий на смену наборам серии «ТБ-Биочип».

### **3.2.6 Установление корреляций между генетическими детерминантами резистентности и уровнем фенотипической чувствительности *M. tuberculosis***

Последние исследования механизмов формирования устойчивости *M. tuberculosis* показывают, что приобретение резистентности является достаточно длительным адаптивным процессом селекции успешных генетических вариантов, обладающих мутациями в сегментах генома, напрямую участвующих в процессе взаимодействия с препаратом, либо в локусах, вовлеченных в формирование компенсаторного механизма, уменьшающего негативное влияние препарата на физиологию бактерий. При этом уровень фенотипической резистентности зависит как от типа генетической детерминанты устойчивости, так и от степени гетерогенности популяции микобактерий (Bottger, 2011).

Определение лекарственной чувствительности ТБ посредством установления критической концентрации по каждому препарату как на плотных средах, так и в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 является качественным методом, разделяющим микобактерии на чувствительные и устойчивые. В действительности уровень лекарственной устойчивости изолята может варьировать от низкого и умеренного, когда возможна коррекция дозы препарата, до высокого, при котором препарат неэффективен. В силу ограниченного выбора терапевтических средств для лечения МЛУ- и ШЛУ-форм ТБ, информация об уровне лекарственной устойчивости является важной для дальнейшей оптимизации лечения. Вместе с тем, быстрая идентификация генетических детерминант, ассоциированных с разным уровнем устойчивости, эффективно дополняет микробиологические методы определения чувствительности ТБ.

Для выявления корреляций между генетическими детерминантами и уровнем фенотипической чувствительности проведено исследование 144 клинических изолятов ТБ, выделенных в системе Bactec MGIT 960 из диагностического материала больных туберкулёзом, находящихся на лечении в

МНПЦБТ. Характеризацию фенотипической чувствительности изолятов к препаратам первого и второго ряд проводили в системах Bactec MGIT 960 и Sensititre MycoTB.

Согласно результатам культурального анализа в системе Bactec MGIT из 144 изолятов 40 были отнесены к ШЛУ-штаммам, 65 – к МЛУ, 18 штаммов были поли- и монорезистентными и 21 – чувствительные (Таблица 19).

**Таблица 19.** Паттерны фенотипической чувствительности 144 изолятов в системе Bactec MGIT 960.

	Паттерн чувствительности по RMP-INH-FQs-SLID	Число изолятов	Дополнительный паттерн по STR-PZA-EMB и число соответствующих изолятов					
			R-R-R	R-R-S	R-S-R	R-S-S	S-R-S	S-S-S
ШЛУ, N=(40)	R-R-R-R	40	32	5	2	1		
	R-R-R-S	9	5	2	2			
МЛУ, N=(65)	R-R-S-R	28	12	5	8	2		1
	R-R-S-S	28	14	5	1	6		2
Поли- и монорезистентные, N=(18)	R-S-R-R	1						1
	S-R-R-R	2		1			1	
	S-R-R-S	1	1					
	S-R-S-R	2	1			1		
	S-S-R-R	1						1
	R-S-S-S	1				1		
	S-R-S-S	9	1	1		6		1
	S-S-R-S	1						1
Чувствительные N=(21)	S-S-S-S	21				2		19

Обозначения. R – устойчивость. S – чувствительность.

Дальнейший анализ фенотипической чувствительности к препаратам первого ряда стрептомицину (STR), пиперазину (PZA) и этамбутолу выявил следующий уровень гетерогенности в изолятах, сгруппированных по классам МЛУ, ШЛУ и т.д. (Таблица 19). Наибольшая вариабельность наблюдалась в группе поли- и монорезистентных изолятов, в которой три штамма были устойчивы к 4 из 5 препаратов первого ряда, но чувствительны к RMP, и два изолята были монорезистентны к INH и FQ. Два штамма из группы чувствительных по RMP-INH-FQs-SLID оказались устойчивы к стрептомицину.



Всего было в данной выборке было определено 32 различных паттерна фенотипической чувствительности по 7 противотуберкулезным препаратам.

Сравнение результатов определения фенотипической чувствительности изолятов в системах MGIT и МусоТВ приведено в Таблице 20. Из 12 противотуберкулезных препаратов, доступных в планшете МусоТВ, не приведены данные для рифабутина (RFB) и циклосерина (оба отсутствуют в системе MGIT). Для большинства препаратов корреляция результатов составила более 90%. Основные расхождения были получены среди изолятов с пограничным или низким уровнем резистентности. Худшая корреляция наблюдалась для канамицина и этионамида, однако если использовать значение критической концентрации менее 5 мг/л по KAN в системе МусоТВ для 20 изолятов, устойчивых согласно Bactec MGIT, и считать их также устойчивыми в системе МусоТВ, то коэффициент корреляции и коэффициент каппа Коэна составят 0,97 и 0,93, вместо 0,83 и 0,65, соответственно.

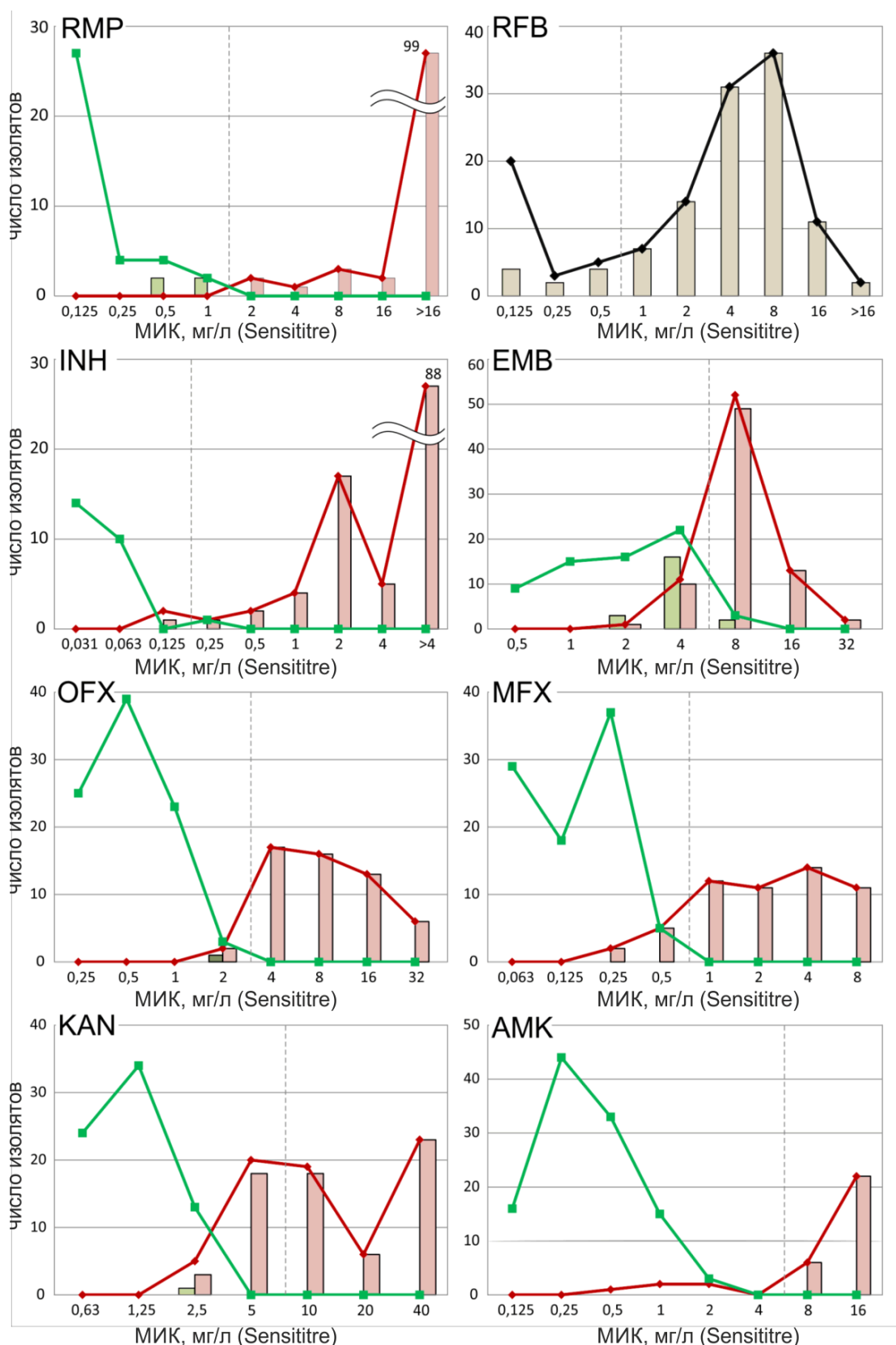
Таким образом, данные по паттернам фенотипической чувствительности 144 изолятов, полученные двумя культуральными методами, считали достоверными и использовали их для сравнения с генетическими детерминантами резистентности, определенными с использованием набора «ТБ-ТЕСТ». Корреляция результатов, полученных тремя методами по каждому препарату, отражена на Рис. 42.

**Таблица 20.** Значения МИК, полученные в системе МусоТВ и результаты в системе Bactec MGIT 960 для 144 изолятов.

MGIT 960			МУСОТВ								Всего устойчивых	Всего чувствительных	Крит. к-ция на средах 7Н10/7Н11, мг/л	Кoeff. корреляции	Кoeff. каппа Коэна	
Критическая концентрация	X-ка	Число штаммов	Установленное значение МИК (мг/л) и число изолятов <sup>a</sup>													
			0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32					
<b>Стрептомицин</b>																
1 мг/л	R	117			2	3	13	14	5	7	73	112	5	2	0,97	0,89
	S	27	16	6	4	1						0	27			
<b>Рифампицин</b>			0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16					
1 мг/л	R	107					2	1	3	2	99	107	0	1	1,00	1,00
	S	37	27	4	4	2						0	37			
<b>Изониазид</b>			0,03	0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4	>4					
0,1 мг/л	R	119			2	1	2	4	17	5	88	117	2	0,2	0,98	0,93
	S	25	14	10		1						1	24			
<b>Этамбутол</b>			0,5	1	2	4	8	16	32	>32						
5 мг/л	R	79			1	11	52	13	2			67	12	5	0,90	0,79
	S	65	9	15	16	22	3				3	62				
<b>Офлоксацин</b>			0,25	0,5	1	2	4	8	16	32						
2 мг/л	R	54				2	17	16	13	6		52	2	2	0,99	0,97
	S	90	25	39	23	3					0	90				
<b>Моксифлоксацин</b>			0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8						
0,25 мг/л	R	55			2	5	12	11	14	11		48	7	0,5	0,95	0,89
	S	89	29	18	37	5					0	89				
<b>Канамицин</b>			0,63	1,25	2,5	5	10	20	40	>40						
2,5 мг/л	R	73			5	20	19	6	23			48	25	5	0,83	0,65
	S	71	24	34	13						0	71				
<b>Амикацин</b>			0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16					

1 мг/л	R	35			1	2	4		6	22		28	7			
	S	109	16	44	33	15	1					0	109	4	0,95	0,86
<b>ПАСК</b>			0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64					
4 мг/л	R	31			3	3	8	9	3	3	2	28	3			
	S	98	51	32	10	4		1				5	93	2	0,94	0,83
<b>Этионамид</b>			0,31	0,63	1,25	2,5	5	10	20	40	>40					
5 мг/л	R	71				7	16	26	6	9	7	48	23			
	S	58	1	5	14	10	24	3	1			4	54	5	0,79	0,59

<sup>a</sup> Вертикальными прерывистыми линиями обозначена граница раздела между чувствительными (S) и устойчивыми (R) изолятами по критическим концентрациям, установленным методом пропорций на агаровых средах 7Н10 /7Н11.



**Рис. 42.** Распределение изолятов по значениям МИК, полученным в системе Sensititre МусоТВ, данные по чувствительности в системе Vastec MGIT и по детерминантам устойчивости, обнаруженным с использованием набора «ТБ-ТЕСТ». Устойчивые и чувствительные изоляты, установленные в системе MGIT, приведены, соответственно, красными и зелеными линиями. Светло-красные и светло-зеленые столбцы отражают количество устойчивых и чувствительных штаммов с установленными мутационными

профилями. Система MGIT не позволяет определять устойчивость к рифабутину (RFB), поэтому на диаграмме показано только распределение изолятов с мутациями в зависимости от значения МИК.

Исследуемые изоляты обладали 10 типами различных мутаций в кодонах 516, 526 и 531 гена *rpoB*, приводящих к устойчивости к рифампицину, один штамм обладал двойной заменой L511P D516G (Таблица 21а). Мутации были найдены в 111 изолятах, их них 4 штамма были чувствительны согласно результатам обоих микробиологических методов. Замена S531L идентифицирована в 93/111 (83,8%) изолятах. Большинство штаммов с данной мутацией обладали резистентностью к рифампицину высокого уровня (МИК  $\geq$  4 мг/л). Только один штамм имел пограничную МИК= 2 мг/л. Шесть изолятов с мутациями в кодонах 516 и 526 обладали промежуточными МИК 0,5-1,0 мг/л и низким уровнем устойчивости 2-4 мг/л, в то время как другие 9 изолятов имели максимальную детектируемую МИК >16 мг/л.

**Таблица 21а.** Распределение мутаций в гене *rpoB* в чувствительных и устойчивых изолятах с установленными значениями МИК по рифампицину и рифабутину

Мутации в <i>rpoB</i>	MGIT 960	Число изолятов МИК в МУСОТВ, мг/л								
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
L511R	R (N=1)							1		
	S (N=0)									
D516V	R (N=3)					1				2
	S (N=0)									
D516Y	R (N=0)									
	S (N=2)			1	1					
H526R	R (N=3)									3
	S (N=0)									
H526Y	R (N=2)									2
	S (N=0)									
H526D	R (N=1)									1
	S (N=0)									
H526P	R (N=1)									1
	S (N=0)									
H526L	R (N=1)						1			
	S (N=1)				1					
H526N	R (N=0)									
	S (N=1)			1						
S531L	R (N=93)						1	2	1	89
	S (N=0)									
S531W	R (N=1)									1

	S (N=0)									
L511P D516G	R (N=1)									1
	S (N=0)									
Всего с мутациями	R (N=107)				2	1	3	2		99
	S (N=4)			2	2					
Дикий тип	R (N=0)									
	S (N=33)	27	4	2						
<b>Рифабутин</b>		<b>Число изолятов</b>								
Мутации в <i>groB</i>	Всего	МИК в МУСОТВ, мг/л								
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
L511R	(N=1)			1						
D516V	(N=3)	1				1				1
D516Y	(N=2)	1					1			
H526R	(N=3)						1			2
H526Y	(N=2)						2			
H526D	(N=1)									1
H526P	(N=1)						1			
H526L	(N=2)		2							
H526N	(N=1)	1								
S531L	(N=93)	1		3	7	11	26	36	7	2
S531W	(N=1)					1				
L511P D516G	(N=1)					1				
Всего с мутациями	(N=111)	4	2	4	7	14	31	36	11	2
Дикий тип	(N=18)	16	1	1						

В случае рифабутина распределение МИК обладало пиком на 4-8 мг/л (Рис. 42RFB), два изолята с заменами S531L имели МИК >16 мг/л. Десять штаммов с мутациями в гене *groB* были определены как чувствительные в системе МусоТВ (критическая концентрация 0,5 мг/л и менее), из них 4 обладали заменой S531L. Три штамма с заменами в 526 кодоне (H/L/N) обладали промежуточной или низкой устойчивостью к рифампицину (0,5-4 мг/л) и были чувствительны к рифабутину (0,125 – 0,25 мг/л). Семь изолятов с заменами в 526 кодоне (H/R/Y/D/P) имели высокие МИК как по рифампицину (>16 мг/л), так и по рифабутину (4-16 мг/л). Расхождения по резистентности к RMP и RFB были получены при анализе изолятов с заменами в 516 кодоне. Штаммы с двойной мутацией L511P D516G обладали резистентностью к RMP и промежуточной устойчивостью к RFB (МИК = 2 мг/л). Таким образом, наиболее распространенная мутация S531L, ассоциированная с высоким

уровнем устойчивости, была найдена среди большинства изолятов с высокими значениями МИК по RMP и RFB. С другой стороны, часть изолятов с промежуточной чувствительностью и мутациями в 516 и 526 кодонах были определена как чувствительная в системе Bactec, подтверждая результаты предыдущих исследований (Rigouts et al., 2013). Стандартный режим терапии (Williamson et al., 2012; Van Deun et al., 2013) для таких пациентов характеризуется неблагоприятным клиническим исходом и применение высоких доз рифампицина или его замена рифабутином может изменить течение заболевания.

Среди мутаций, характеризующих резистентность к изониазиду, замена S315T (вариант agc>acc) в гене *katG* была идентифицирована в 110 из 118 (93%) устойчивых изолятов. 84 таких штамма обладали высоким уровнем устойчивости (МИК > 4 мг/л) (Таблица 21b). 35 из 110 штаммов обладали другими мутациями в генах *katG* или *inhA*, в дополнение к замене S315T1. Сочетание мутаций S531L в *rpoB* и S315T в *katG* было найдены в 75% ШЛУ-88% МЛУ-изолятов. Двойные и тройные мутации, приводящие к устойчивости к ИН, были идентифицированы в 14% изониазид-устойчивых, 23% МЛУ- и 45% ШЛУ-изолятов, тем самым подтверждая сделанное нами ранее предположение о мутациях в гене *inhA*, как суррогатном маркере широкой лекарственной устойчивости.

**Таблица 21b.** Распределение мутаций в генах *katG* и *inhA* в чувствительных и устойчивых изолятах с установленными значениями МИК по изониазиду.

Изониазид	Число изолятов									
	Мутации в <i>katG</i> , <i>inhA</i>	MGIT 960	МИК в МУСОТВ, мг/л							
			0,031	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4
S315T1	R (N=75) S (N=0)			1			4	12		58
c(-15)t	R (N=8) S (N=0)				1	1		2		4
S315T1 c(-15)t	R (N=28) S (N=0)					1		2	2	23
S315T1 I335V	R (N=5) S (N=0)								3	2
S315T1 W328C	R (N=1) S (N=0)							1		

S315T1 I335V c(-15)t	R (N=1)								1
	S (N=0)								
Всего с мутациями	R (N=118)	1	1	2	4	17	5	88	
	S (N=0)								
Дикий тип	R (N=1)	1							
	S (N=25)	14	10						1

Распределение МИК по этамбутолу среди чувствительных и резистентных изолятов, охарактеризованных в системе MGIT, имело два широких перекрывающихся пика с максимумами на 4 и 8 мг/л (Рис. 42ЕМВ). 61% штаммов (81 из 144) имели МИК от 4 до 8 мг/л, 15 изолятов обладали высоким уровнем устойчивости (МИК от 16 до 32 мг/л) (Таблица 21с). Все эти штаммы были резистентными в системе MGIT и все они обладали заменами в кодонах 306, 319, 354, 406 и 497 гена *embB*. Штаммы с мутациями в данном гене обладали различными МИК по ЕМВ (от 2 до 32 мг/л); 22% из них были чувствительными. Замена M306V была идентифицирована в 29 изолятах. 9 из них были чувствительными согласно МусоТВ (МИК = 2-4 мг/л), при этом в системе MGIT 6 из них были охарактеризованы как устойчивые и 3 – как чувствительные. Замена D354A была второй по частоте встречаемости (15 изолятов) и была найдена у 3 чувствительных штаммов.

**Таблица 21с.** Распределение мутаций в гене *embB* в чувствительных и устойчивых изолятах с установленными значениями МИК по этамбутолу.

Этамбутол	Мутации в <i>embB</i>	MGIT 960	Число изолятов						
			МИК в МУСОТВ, мг/л						
			0.5	1	2	4	8	16	32
N296H	R (N=1)					1			
	S (N=1)				1				
M306I1	R (N=7)				2	5			
	S (N=2)			1	1				
M306I2	R (N=0)								
	S (N=3)				2	1			
M306I3	R (N=0)								
	S (N=1)				1				
M306L	R (N=4)					3	1		
	S (N=0)								
M306V	R (N=26)			1	5	18	1	1	
	S (N=3)				3				



Y319S	R (N=1)					1	
	S (N=0)						
Y319C	R (N=1)						1
	S (N=1)		1				
Y319D	R (N=0)						
	S (N=1)		1				
D354A	R (N=12)		1	9	2		
	S (N=3)	1	2				
G406A	R (N=7)		1	6			
	S (N=2)		2				
G406D	R (N=1)					1	
	S (N=0)						
G406S	R (N=3)						3
	S (N=0)						
Q497K	R (N=1)		1				
	S (N=0)						
Q497P	R (N=0)						
	S (N=1)		1				
Q497R	R (N=10)			4	6		
	S (N=3)		2	1			
Q497R M306V	R (N=1)					1	
	S (N=0)						
Всего с мутациями	R (N=75)	1	10	49	13	2	
	S (N=21)	3	16	2			
Дикий тип	R (N=4)			1	3		
	S (N=44)	9	15	13	6	1	

Результаты определения чувствительности к этамбутолу показали хорошую корреляцию между микробиологическими методами. В то же время наличие мутаций в кодонах 296-497 гена *embB* приводило к повышению резистентности к ЕМВ в различной степени, в том числе, ниже достигаемой концентрации 5 мг/л препарата в плазме (McIlleron et al., 2006). Полученные данные свидетельствуют о том, что идентификация единичных мутаций не является основанием для однозначного исключения этамбутола из схемы терапии. К примеру, 9 из 29 изолятов с заменами М306V обладали МИК ниже значения критической концентрации, при этом 3 из них были чувствительны в системе MGIT.

Характерные различия между чувствительными и устойчивыми изолятами были получены при анализе устойчивости к офлоксацину с

использованием системы МусоТВ. 52 из 54 устойчивых по MGIT изолятов имели МИК от 4 до 32 мг/л, а 87 из 90 чувствительных штаммов обладали МИК в диапазоне 0,25 – 1 мг/л. Из пяти изолятов с пограничной МИК = 2 мг/л (чувствительные согласно МусоТВ) два идентифицированы в системе MGIT как устойчивые и три – как чувствительные (Таблица 21d). В устойчивых изолятах обнаружены замены D94A и S91P/D94A. Мутация N538K в гене *gyrB* была найдена в одном из чувствительных изолятов, в то время как в двух других чувствительных штаммах замены обнаружены не были.

Суммарно, восемь OFX-резистентных изолятов обладали заменами в гене *gyrB*, при этом три штамма характеризовались диким типом по гену *gyrA*. В дополнение к штамму, описанному выше, замена N538K была также идентифицирована в изоляте, устойчивом согласно результатам анализа в системах MGIT и МусоТВ (МИК = 4 мг/л). В другом штамме с МИК = 4 мг/л была обнаружена мутация D500H. Пять других изолятов, имевших сочетанные мутации в *gyrA/gyrB*, обладали МИК от 4 до 16 мг/л.

**Таблица 21d.** Распределение мутаций в генах *gyrA*, *gyrB* в чувствительных и устойчивых изолятах с установленными значениями МИК по офлоксацину и моксифлоксацину.

Офлоксацин	Число изолятов									
	Мутации в <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i>	MGIT 960	МИК в МУСОТВ, мг/л							
			0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
G88C	R (N=1)									1
	S (N=0)									
A90V	R (N=7)					3	4			
	S (N=0)									
S91P	R (N=4)					3	1			
	S (N=0)									
D94A	R (N=5)				1	3	1			
	S (N=0)									
D94N	R (N=6)						1	3	2	
	S (N=0)									
D94G	R (N=19)					2	8	6	3	
	S (N=0)									
D94Y	R (N=1)						1			
	S (N=0)									
D94V	R (N=2)					2				
	S (N=0)									
D500H	R (N=1)						1			
	S (N=0)									

N538K	R (N=1)						1			
	S (N=1)		1							
A90V D500N	R (N=1)								1	
	S (N=0)									
D94A E540D	R (N=1)						1			
	S (N=0)									
D94G G509A	R (N=1)								1	
	S (N=0)									
D94G T539P	R (N=1)								1	
	S (N=0)									
D94N A90V	R (N=1)								1	
	S (N=0)									
H70A G88A G509A	R (N=1)						1			
	S (N=0)									
S91P D94A	R (N=1)		1							
	S (N=0)									
Всего с мутациями	R (N=54)		2	17	16	13	6			
	S (N=1)		1							
Дикий тип	R (N=0)									
	S (N=89)	25	39	23	2					

### Моксифлоксацин

### Число изолятов

Мутации в <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i>	MGIT 960	МИК в МУСОТВ, мг/л								
		0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	
G88C	R (N=1)								1	
	S (N=0)									
A90V	R (N=7)					3	3	1		
	S (N=0)									
S91P	R (N=4)					1	1	2		
	S (N=0)									
D94A	R (N=5)			1	2	1	1			
	S (N=0)									
D94N	R (N=6)						1	2	3	
	S (N=0)									
D94G	R (N=19)				1	3	3	7	5	
	S (N=0)									
D94Y	R (N=1)							1		
	S (N=0)									
D94V	R (N=2)			1		1				
	S (N=0)									
D500H	R (N=1)				1					
	S (N=0)									
N538K	R (N=2)					2				
	S (N=0)									
A90V D500N	R (N=1)								1	
	S (N=0)									
D94A E540D	R (N=1)							1		
	S (N=0)									

	S (N=0)								
D94G G509A	R (N=1)								1
	S (N=0)								
D94G T539P	R (N=1)								1
	S (N=0)								
D94N A90V	R (N=1)								1
	S (N=0)								
H70A G88A G509A	R (N=1)							1	
	S (N=0)								
S91P D94A	R (N=1)				1				
	S (N=0)								
Всего с мутациями	R (N=55)	2	5		12	11	14	11	
	S (N=0)								
Дикий тип	R (N=0)								
	S (N=89)	29	18	37	5				

Распределение МИК среди устойчивых к моксифлоксацину изолятов согласно MGIT находилось в диапазоне 0,25 – 8 мг/л, таким образом, 7 из них были чувствительны согласно МусоТВ (МИК от 0,25 до 0,5 мг/л, Рис. 42MFX). В данных изолятах были идентифицированы следующие замены: D94A (N=3), D94G, D94V, S91P/D94A (все – в гене *gyrA*) и D500H в *gyrB* (Таблица 21d). С другой стороны, штаммы с мутацией D94G в основном характеризовались высокими значениями МИК от 4 до 8 мг/л; два изолята с заменой D94A и один с D94V также были устойчивы с МИК от 1 до 2 мг/л. Все остальные 35 изолятов с МИК = 0,25 мг/л и 5 штаммов с МИК = 0,5 мг/л были чувствительны в системе MGIT и относились к дикому типу по данным анализа на биочипе.

В исследуемой коллекции изоляты с заменами D500H и N538K в гене *gyrB* характеризовались умеренным уровнем устойчивости к офлоксацину и моксифлоксацину, подтверждая результаты более ранних работ (Malik et al., 2012) и позволяя использовать более высокие дозы фторхинолонов в отношении штаммов ТБ с такими мутациями. Клиническая значимость резистентности низкого уровня была также показана в мышинной модели для фторхинолонов: активность моксифлоксацина в отношении штамма с низким уровнем устойчивости с заменой D500N GyrB была близка к таковой в штамме дикого типа, однако рецидивы ТБ после терапии FQ наблюдались в 30% случаев (Fillion et al., 2013). Семь изолятов с мутацией A90V в гене *gyrA*

обладали более высокими МИК по OFX и MFX, чем было описано ранее (Niward et al., 2016; Rigouts et al., 2016), тем самым характеризуя нерациональное применение фторхинолонов в отношении штаммов с такой мутацией.

Мутации в гене *rrs* или промоторе *eis* были идентифицированы в 93% KAN-устойчивых (согласно MGIT) и 98% KAN-устойчивых (согласно МусоТВ) изолятах с МИК в диапазоне от 10 до 40 мг/л (критическая концентрация – 5 мг/л). 20 штаммов с МИК = 5 мг/л, соответствующей чувствительному варианту, были устойчивы согласно результатам в MGIT и 18 из них обладали мутациями в гене *eis* (Таблица 21е). 18 других штаммов с МИК = 2,5 мг/л были преимущественно чувствительны согласно MGIT (N=13), из них 4 несли мутации в *eis*: c-12t (N=3) и g-10a.

Замена a1401g в гене *rrs* была идентифицирована в 28 изолятах, которые были устойчивы к KAN и АМК обоими фенотипическими методами. Большинство данных штаммов обладали максимальными МИК, используемыми в МусоТВ для тестирования - 40 мг/л для KAN (N=22) и 16 мг/л для АМК. Диапазон МИК по KAN для изолятов с мутациями в *eis* частично перекрывался с диапазоном МИК от 2,5 до 40 мг/л у штаммов с мутацией a1401g в *rrs*, однако, 31 из 40 изолятов имели МИК 5-10 мг/л. Один изолят с заменой g1484t в *rrs* был устойчив к KAN и АМК согласно MGIT, но обладал МИК = 2мг/л по АМК, что соответствует чувствительному варианту. Пять из 33 АМК-устойчивых по MGIT штаммов обладали МИК от 0,5 до 2 мг/л, характеризуя их как чувствительные в системе МусоТВ. Четыре таких штамма обладали мутациями c-14t в *eis*, один изолят имел замену g1484t в гене *rrs*. Два других изолята с мутацией c-14t являлись чувствительными по данным MGIT.

**Таблица 21е.** Распределение мутаций в генах *rrs*, *eis* в чувствительных и устойчивых изолятах с установленными значениями МИК по канамицину и амикацину.

<b>Канамицин</b>		<b>Число изолятов</b>							
		MGIT 960	МИК в МУСОТВ, мг/л						
Мутации в <i>rrs</i> , <i>eis</i>			0,63	1,25	2,5	5	10	20	40
a1401g	R (N=28)						4	2	22
	S (N=0)								
g1484t	R (N=1)						1		
	S (N=0)								
c(-12)t	R (N=8)				2	5			1
	S (N=1)				1				
c(-14)t	R (N=6)					1	1	4	
	S (N=0)								
g(-10)a	R (N=13)				1	9	3		
	S (N=0)								
g(-37)t	R (N=12)					3	9		
	S (N=0)								
Всего с мутациями	R (N=68)				3	18	18	6	23
	S (N=1)				1				
Дикий тип	R (N=5)				2	2	1		
	S (N=70)	24	34	12					

<b>Амикацин</b>		<b>Число изолятов</b>									
		MGIT 960 CC = 1,0	МИК в МУСОТВ, мг/л								
Мутации в <i>rrs</i> , <i>eis</i>			0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	
g1484t	R (N=1)						1				
	S (N=0)										
c(-12)t	R (N=0)										
	S (N=9)			6	1	2					
c(-14)t	R (N=4)					1	3				
	S (N=2)			1			1				
g(-10)a	R (N=0)										
	S (N=13)			3	7	3					
g(-37)t	R (N=0)										
	S (N=12)				6	6					
wt	R (N=2)				1	1					
	S (N=73)	16	34	19	4						
a1401g	R (N=28)								6	22	
	S (N=0)										
Без мутации a1401g в <i>rrs</i>	R (N=7)				1	2	4				
	S (N=109)	16	44	33	15	1					

При анализе резистентности к канамицину, немалая доля (20 из 73) изолятов, устойчивых по данным MGIT, обладали МИК = 5 мг/л, в то время как все чувствительные изоляты имели меньшие значения МИК. В этой связи,

снижение критической концентрации по KAN в системе MucTB ниже значения в 5 мг/л позволит получить существенно лучшую корреляцию как между микробиологическими методами, так и при установлении генетических детерминант резистентности по KAN. По данным гибридизационного анализа, 18 из описанных изолятов обладали мутациями в промоторном регионе гена *eis*, ассоциированного с умеренным уровнем устойчивости к канамицину.

Анализ семейств ТБ с использованием набора «ТБ-ТЕСТ» в указанной выборке показал доминирование генотипа Beijing (111/144 изолятов, 77%) (Таблица 22), при этом треть изолятов данного генотипа относилась к кластеру Beijing ВО/W148. Доли МЛУ- и ШЛУ-форм ТБ среди всех штаммов Beijing-составили 59/111 (53%) и 31/111 (28%), соответственно. В когорте впервые выявленных больных МЛУ и ШЛУ изоляты были обнаружены в 54% случаев, из которых 4 обладали фенотипом ШЛУ. Среди штаммов, полученных от хронических пациентов и больных с рецидивами ТБ, доля МЛУ+ШЛУ составила 90%, а ШЛУ фенотип был обнаружен в 47% случаев.

**Таблица 22.** Ассоциация паттернов лекарственной чувствительности с генотипами возбудителя и историей лечения пациентов, от которых были получены изоляты.

Паттерн чувств (MGIT)	Beijing (N=111, 77%)		Евро-американская линия (N=33, 23%)				Впервые выявлен. (N=67)	Хрон. больные (N=58)	Случаи рецидивов (N=19)			
	ВО/W148	Другие Beijing	Haarlem	LAM	Ural	Другие EA						
ШЛУ	10	21	0	5	2	2	4	6%	27	47%	9	47%
МЛУ	18	41	2	2	2	0	32	48%	26	45%	7	37%
Моно/поли	2	12	0	0	2	4	12	18%	5	9%	3	16%
Чувств	0	7	1	4	0	7	19	28%	0	0%	0	0%

Установление семейства ТБ в настоящее время имеет высокую клиническую значимость, особенно в отношении современного варианта Beijing (Ribeiro et al., 2014, Yin et al., 2016) в силу его вирулентности (Ribeiro et al., 2014), трансмиссивности (Gagneux et al., 2006), лекарственной толерантности (de Keijzer et al., 2014) и способности к адаптации под давлением лекарственных препаратов (McGrath et al., 2014). Полученные результаты показывают доминирование МЛУ-штаммов семейства Beijing в сравнении с

Евро-американской линией (53% против 18%). Вместе с тем, доля ШЛУ-изолятов была практически одинакова в обеих линиях (27-28%). В данной выборке не было обнаружено чувствительных изолятов генотипов Beijing B0/W148 и Ural.

В целом, совпадение результатов, полученных тремя методами, составило ~94%. В сравнении с Bactec MGIT система Sensititre MycoTB обладает возможностью сравнения установленных значений МИК с данными фармакокинетики, что позволяет дифференцированно назначать высокие дозы химиопрепаратов или наоборот, удалять конкретные лекарства из схем терапии. Спектр анализируемых с использованием набора ТБ-ТЕСТ геномных мишеней по препаратам первого и второго ряда охватывает, как минимум, I-IV режимы химиотерапии больных туберкулезом в соответствии с Приказом Минздрава РФ № 951 от 29.12.2014 г. При этом скорость и возможность анализа клинических образцов позволяет использовать набор ТБ-ТЕСТ как метод быстрого скрининга изолятов от пациентов с последующей коррекцией режимов терапии и переводом на лечение новейшими противотуберкулезными препаратами (Zimenkov et al., 2017).

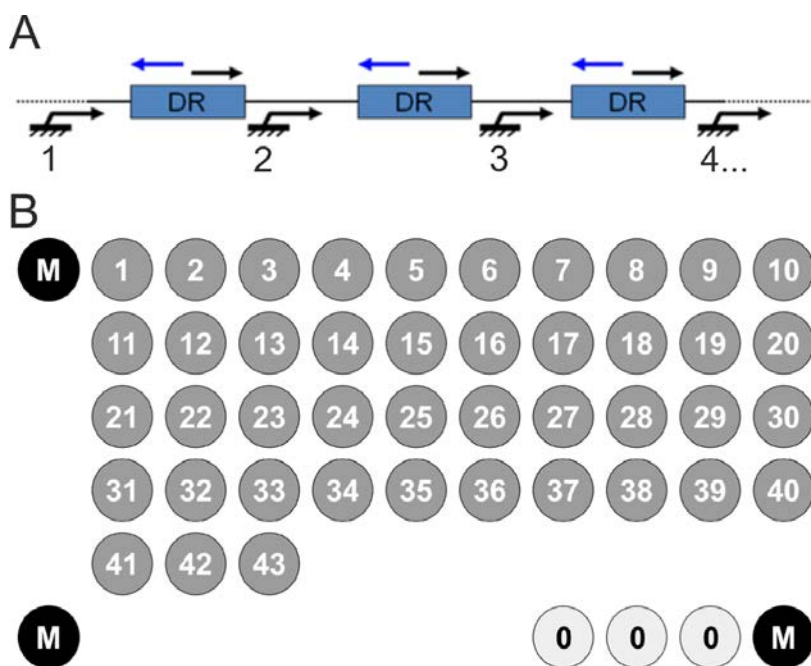
### **3.2.7 Генотипирование микобактерий туберкулезного комплекса на основе анализа региона прямых повторов**

Нарастающее количество секвенированных геномов *M. tuberculosis* и последующее сравнение их *in silico* выявило достаточный уровень генетического разнообразия для филогенетически надежных построений, по крайней мере, на уровне генетических семейств (Roetzer et al., 2013). Однако для рутинного внутривидового генетического типирования штаммов МТВС, оценки гетерогенности популяции изолята, дифференциации *M. tuberculosis* от *M. bovis* и *M. bovis BCG*, вызывающих поствакцинальные осложнения у детей, установления принадлежности изолята к генотипу Beijing используют более простые молекулярно-генетические методы, одним из которых является сполиготипирование. В основе данного метода лежит анализ локуса прямых



повторов (direct repeat – DR) микобактериального генома, характеризующегося наличием многократно повторяющихся участков длиной 36 н.п. идентичной последовательности, между которыми расположены уникальные спейсерные последовательности длиной от 24 до 41 н.п. Идентификация спейсеров в DR-локусе позволяет составить генетический профиль каждого изолята МТВС, относя его к определенному генотипу.

В настоящей работе предложена адаптация метода анализа DR-локуса на гидрогелевом биочипе, содержащем олигонуклеотиды, специфичные к последовательностям 43 спейсеров региона прямых повторов генома МТВС (Таблица 23). Процедура включала амплификацию и флуоресцентное маркирование DR-локуса с последующей гибридизацией полученных ПЦР-продуктов на биочипе (Рис. 43) (Bespyatykh et al., 2014).



**Рис. 43.** (А) Схема анализа региона прямых повторов (DR). В ходе ПЦР происходит наработка продуктов, содержащих спейсерные регионы, фланкированные прямыми повторами DR, с использованием праймеров, последовательности которых комплементарны последовательности прямого повтора. Полученные продукты гибридизуются со специфичными к последовательностям спейсерного региона олигонуклеотидами (обозначены '1', '2', '3', '4...'), иммобилизованными на биочипе. (В) Схема биочипа для анализа региона прямых повторов. Цифрами '1' – '43' обозначены элементы, содержащие зонды, специфичные к каждому из 43 спейсеров (Таблица 23). Ячейки с индексом 'M' являются маркерами флуоресценции и необходимы для автоматической обработки результатов гибридизации, элементы '0' используются для вычисления фонового сигнала.

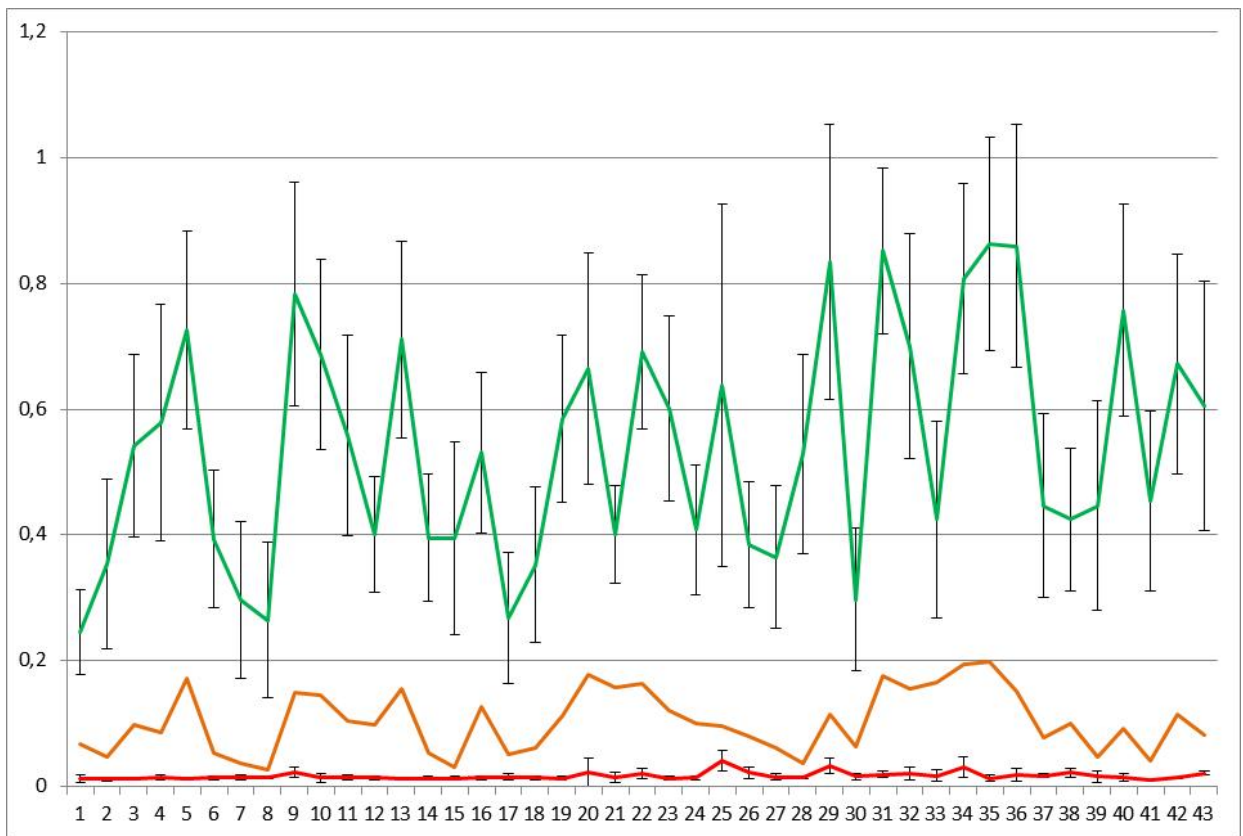
**Таблица 23.** Перечень последовательностей иммобилизованных олигонуклеотидов.

№ спейсера	Последовательность 5'-3'	Длина, нк
1	agggtcgccggttctggatc	20
2	ctcatgcttgggcgacag	18
3	ccgtgcttccagtgatcgc	19
4	catacggccgaccaatcatca	20
5	ccacttgtgcgggattagc	19
6	ttccggcttcaatttcagc	23
7	tactcggggctgccgtctg	22
8	cagcctcgccggggcc	16
9	catgtgctgacagcggattc	20
10	ccgggcagcgttcgaca	17
11	caacggcggcggcaac	16
12	gggagatgctgtccgagg	18
13	tcgaccatcattgccattccc	21
14	ccttcgggtgatgcggatg	21
15	cttgaataacgcgactgaatt	22
16	cgagttcccgtcagcgt	17
17	gcccgcgcggatgact	16
18	cgggcgagctgcagatg	17
19	actggcttggcgtgatcct	20
20	gacctcgccaggagagaaga	21
21	cgcgtcgatgctgatgtccc	20
22	tgtcaccgcagacggcacgattg	23
23	cagcatcgctgatgcggtccag	22
24	ctgggtgagacgtgctcg	18
25	cagcgaccaccgcacct	18
26	ccaccatcatccggcgc	17
27	ggattcgtgatctcttcccgc	21
28	cggcgtttagcgatcacaaca	21
29	tacaggctccacgacacgacc	21
30	cgcgccctttccagccg	18
31	cagacaggttcgctgatca	21
32	gaccaaataggatcggcgtg	21
33	catgacggcgggtgcac	19
34	cacctgcccacaccgtc	18
35	acgctcgaaacgcttccaacg	21
36	cgaaatccagcaccacatcc	20
37	cgcgaactcgtccacagtcc	20
38	cgtggatggcggatgcgttg	20
39	tcggcgtgggtaaccgatc	19
40	gtgcctcatacaggtccagtgc	22
41	ggcacggagctttccggct	19
42	gggacatggacgagcgcgac	20
43	gggtgcgggaggtgcagca	17

Интерпретацию результатов гибридизации на биочипе проводили согласно следующему алгоритму. Для каждого элемента с иммобилизованным спейсер-специфичным зондом подбирали граничное значение, позволяющее

дифференцировать положительные и отрицательные сигналы каждой ячейки, и, таким образом, определять наличие или отсутствие соответствующего спейсера в анализируемом образце ДНК. Алгоритм включал две последовательных нормировки. На первом этапе все сигналы элементов нормировали на фоновое значение (среднее по ячейкам с индексом '0'). Далее максимальный сигнал, полученный от элемента биочипа с иммобилизованным зондом, приравнивали к 1, минимальный сигнал от элемента '0' к 0,01; значения остальных сигналов нормировали на значение от максимального сигнала. Данная нормировка была необходима для снижения флуктуации сигналов в ячейках, обусловленной использованием разных анализаторов флуоресценции, концентрациями гибридизуемой ДНК, небольшими отклонениями в диаметрах гелевых элементов.

Подбор граничных значений проводили с использованием 67 гибридизационных профилей, полученных при анализе 67 образцов ДНК МТВС, для которых наличие/отсутствие спейсера было установлено классическим сполиготипированием (Kamerbeek et al., 1997), полностью совпадающим с результатами анализа на чипах. Были рассчитаны средние значения положительного и отрицательного сигнала и их стандартные отклонения. Для всех 43 спейсеров разница между средними сигналами превосходила сумму стандартных отклонений по меньшей мере, в 2 раза. Индивидуальные граничные значения для каждого элемента с иммобилизованным зондом определяли как среднее между максимальным отрицательным и минимальным положительным сигналами (Рис. 44).



**Рис. 44.** Дважды нормированные значения интенсивности сигналов 43 элементов биочипа по результатам анализа 67 образцов ДНК МТВС. Средний положительный сигнал показан зеленой линией, средний отрицательный – красной, граничные значения для каждого элемента показаны оранжевой кривой.

Для оценки интенсивности сигналов на биочипе в целом с целью дифференциации позитивных и негативных результатов сполиготипирования были проанализированы гибридизационные профили, полученные при анализе ДНК 30 нетуберкулезных микобактерий. Сравнение 67 МТВС-позитивных и 30 МТВС-негативных гибридизационных профилей позволило выявить пороговое значение, равное 4,5, полученное как отношение максимального сигнала в элементах с иммобилизованными зондами, к среднему сигналу от трех пустых ячеек. Если данное отношение не превосходило граничное значение, считали, что в анализируемом образце отсутствовала ДНК МТВС.

Описанный алгоритм использовали для обработки результатов гибридизации исследуемых образцов ДНК. Дважды нормализованные значения сигналов 43 элементов, содержащих иммобилизованные зонды, специфичные к последовательностям 43 спейсеров, сравнивали с индивидуальными граничными значениями и транслировали в двоичный код, где 'n' означает



(Mokrousov, 2012; Mokrousov, 2013). Показано, что профиль SIT1, соответствующий генотипу Beijing, был обнаружен в ~70% (238/346 изолятов). Остальные 108 анализируемых образцов соответствовали 34 различным профилям сполиготипов, демонстрируя гетерогенность популяции МТВС, не относящейся к семейству Beijing.

Совпадение сполиготипов, полученных с использованием гидрогелевого биочипа, и классического метода обратной блот-гибридизации (Kamerbeek et al., 1997) составило 99,7% (345 из 346 образцов,  $\kappa=0,995$ ,  $P<0,00001$ ). Диагностические чувствительность и специфичность метода составили 99,1% и 100%, соответственно, при одном расхождении (генотип одного изолята был определен как Beijing SIT 1 вместо Beijing SIT 190).

Разработанный метод предназначен для «глубокого» типирования МТВС и может быть применен для целей эпидемиологического генотипирования в тех случаях, когда установление семейства возбудителя ТБ с использованием набора «ТБ-ТЕСТ» недостаточно. Несмотря на то, что по разрешающей способности сполиготипирование уступает методу анализа варибельности количества копий тандемных нуклеотидных повторов MIRU-VNTR (Sola et al., 2003), скорость и простота разработанного подхода и набора реагентов «СПОЛИГО-БИОЧИП» (РУ ФСР 2010/09159) на его основе позволяет эффективно его использовать в качестве базового метода эпидемиологического генотипирования.



### 3.2.8 Видовая идентификация и дифференциация микроорганизмов рода *Mycobacterium* – возбудителей туберкулеза и микобактериозов

Помимо безусловных патогенов человека, таких как *M. tuberculosis complex* и *M. leprae*, существует целый ряд условно-патогенных микобактерий, которые могут вызвать микобактериозы. Особенностью заболеваний, вызываемых разными видами как туберкулезных, так и нетуберкулезных микобактерий, особенно на ранних стадиях, является сходная клинико-рентгенологическая картина, при этом точная идентификация инфекционного агента необходима для верификации диагноза «туберкулез/микобактериоз» и назначения адекватной химиотерапии.

Предложен метод идентификации микроорганизмов рода *Mycobacterium* с использованием гибридизации на биочипе с олигонуклеотидами, специфичными к фрагменту гена *gyrB*. Последовательность этого локуса является более вариабельной, нежели последовательность гена 16S рРНК, что дает возможность проводить детальный анализ микроорганизмов и идентифицировать большее количество видов. Так, анализ последовательности гена 16S рРНК не позволяет дифференцировать *M. gastri* и *M. kansasii* (Harmsen et al., 2003), вызывающих при определенных обстоятельствах различную клиническую картину (van Ingen, 2013).

Множественное выравнивание последовательностей гена *gyrB* (всего – 21 последовательность) было сконструировано с использованием последовательностей наиболее распространенных видов микобактерий: *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank Acc. #NC\_000962), *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 (#AM408590), *M. canettii* CIPT 140010059 (#HE572590), *M. marinum* MB2 (#ANPM0100000), *M. intracellulare* KPM 3101 (#AB014188), *M. avium* KPM 3012 (#AB014189), *M. avium* 104 (#NC\_008595), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K10 (#NC\_002944), *M. avium* 10-5581 (#NZ\_AYNT01000000), *M. kansasii* ATCC 12478 (#NC\_022663), *M. gastri* KPM 3503 (#AB014295), *M. scrofulaceum* KPM 2027(#AB014207), *M. szulgai* KPM 2403 (#AB014185), *M. malmoense* KPM 3401 (#AB014187), *M. asiaticum* ATCC 25274 (#AB014206), *M. gordonae* KPM 2202



(#AB014298), *M. xenopi* 3993 (#JAOC01000008), *M. simiae* KPM 1403 (#AB014182), *M. fortuitum* KPM 4003 (#AB014199), *M. smegmatis* MC2 155 (#CP000480), and *M. chelonae* ATCC 35752 (#GU143883). Для 19 видов микобактерий были разработаны по три уникальных олигонуклеотидных зонда, комплементарных видоспецифичным последовательностям фрагмента гена *gyrB* длиной 352 п.н (Рис. 46), 4 зонда соответствовали *M. tuberculosis* и 2 олигонуклеотида были предназначены для идентификации *M. bovis* и *M. canettii*. Биочип содержал 60 уникальных зондов, разработанных изначально для идентификации 21 вида микобактерий (Рис. 47). Процедура анализа включала асимметричную ПЦР с флуоресцентным маркированием с целью амплификации сегмента гена *gyrB* длиной 352 п.н. с последующей гибридизацией на гидрогелевом биочипе (Zimenkov et al., 2015).

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

F..R  
 tub GAACCGCAGTTCGAGGGCCAGACCAAGTGGGCAACACCGAGGTCAAATCGTTTGTGCAGAAGGTCTGTAACGAACAGCTGACCCACTGGTTTG  
 bov .....  
 mar ..G.....T.....A.....C.....G.....C.....T.....C.....G.....C.....C.....  
 int .....T.....C.....A.....G.....G.....C.....C.....C.....C.....C.....  
 avi.A .....AC.....G.....G.....C.....G.....C.....C.....C.....C.....  
 avi.B .....AC.....G.....G.....C.....G.....C.....C.....C.....C.....  
 avi.C .....AC.....G.....G.....C.....G.....C.....C.....C.....C.....  
 kan ..G.....G.....AC.....G.....G.....C.....G.....C.....C.....T.....C.....  
 gas .....G.....AC.A.....G.....G.....C.....G.....C.....T.....C.....C.....  
 scr ..G.A.....A.....A.....C.....G.....G.....C.....G.....C.....G.....C.....C.....  
 szu .....AC.....T.....G.....C.....A.....C.....C.....C.....C.....  
 mal .....A.....A.....C.....G.....C.....C.....C.....C.....G.....C.....  
 asi .....C.....A.....C.....G.....C.....C.....G.....C.....C.....C.....  
 gor .....T.....C.....G.....C.....G.....C.....C.....C.....C.....  
 xen .....G.....C.C.G.....A.....G.....C.....A.....C.....C.....T.....C.....  
 sim ..G.....T.....G.....AC.C.....G.....C.....A.....A.....C.....T.....C.....  
 for C.....T.....G.....G.....AC.C.....G.....C.....A.....C.....G.....A.C.G.....T.....C.C.....  
 sme .....C.....C.....C.....G.....C.....C.....A.....C.....G.....CAG.....C.....  
 che .....T.....T.....A.....C.....G.....G.....C.....G.....C.....G.....CAG.....C.....

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

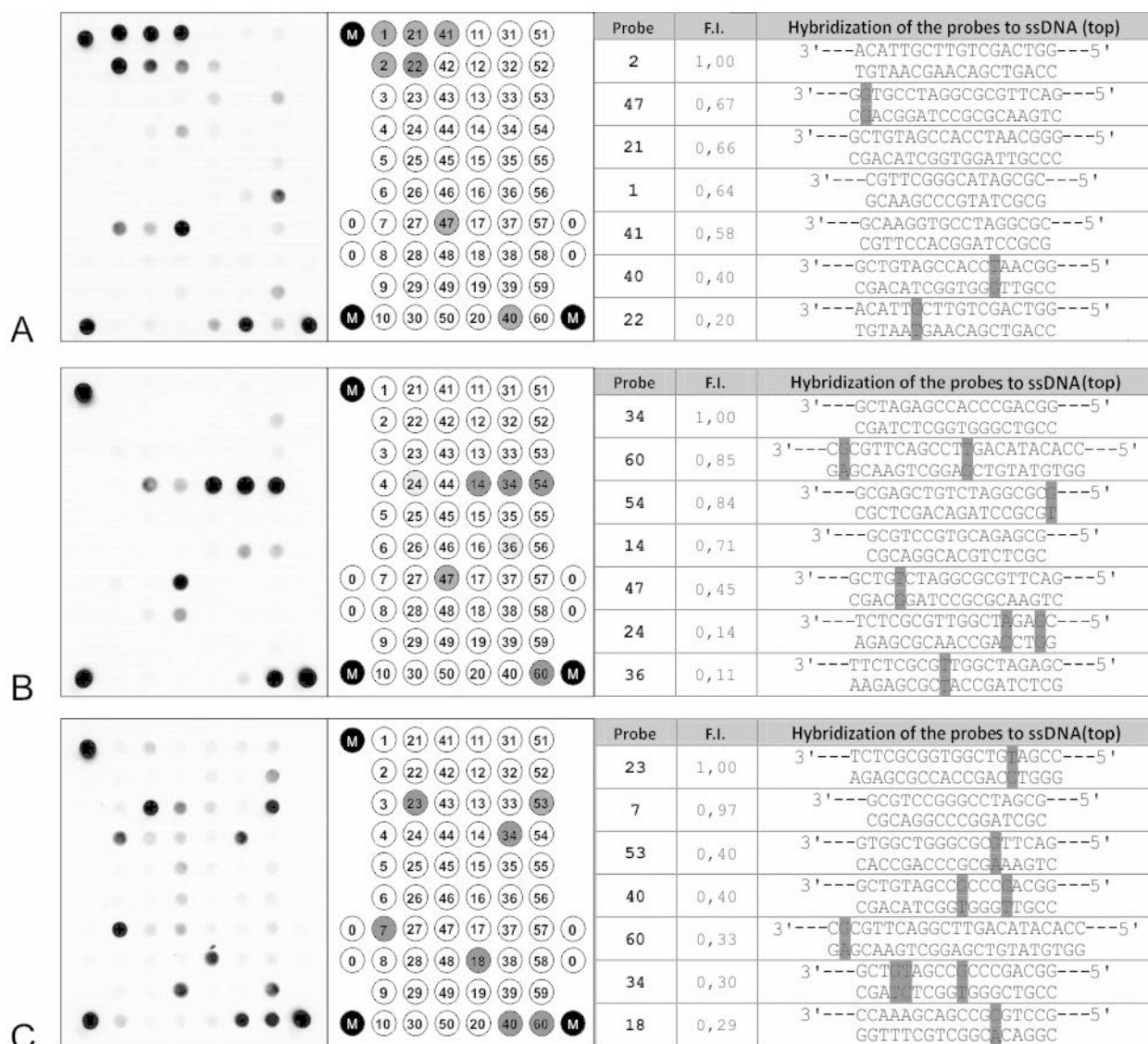
tub AAGCCAAACCCACCCGACGCGAAAGTCGTTGTGAACAAGGCTGTGTCCTCGCCGCAAGCCCGTATCGCCGCACGTAAGGCACGAGAGTTGGTGCAGCGTAA  
 bov .....T.....  
 (can) .....42.....T.....  
 mar ..G.....T.TT.G.A.C.....AC.A.....G.....C.....14.....G.....A.....C.....C.....G.....C.....G.....C.....  
 int ..G.....G.G.....C.....G.....G.....C.....3.....G.....G.....7.....G.....G.....C.....G.....C.....G.....T.....C.....  
 avi.A .....G.A.....C.....A.....C.....3.....G.....T.....A.....A.....G.....G.....C.....C.....G.....C.....C.....  
 avi.B .....G.A.....C.....A.....C.....4.....G.....T.....G.....A.....G.....G.....C.....T.....C.....C.....5.....G.....C.....C.....  
 avi.C .....G.A.....C.....A.....C.....4.....G.....T.....G.....A.....G.....G.....C.....T.....C.....G.....C.....C.....  
 kan ..G.....G.T.....T.....AC.....C.....G.....T.....A.....A.....C.....T.....12.....C.....C.....G.....C.....C.....C.....  
 gas .....G.T.....T.....T.....AC.....C.....A.....T.....A.....10.....G.....A.....G.....T.....C.....C.....G.....C.....C.....  
 scr ..G.....AT.....G.....ACG.....G.....A.....G.....8.....T.....G.....G.....C.....T.....C.....C.....G.....T.....AC.....C.....  
 szu .....GT.G.A.C.....AC.....C.....G.....C.....G.....16.....A.....G.....G.....C.....C.....C.....36.....T.....C.....  
 mal .....GG.G.T.....C.....ACT.....A.....G.....T.....G.....13.....C.....G.....A.....A.....G.....C.....G.....AC.....C.....  
 asi .....G.....T.GT.G.A.C.....AC.....C.....G.....T.....G.....C.....A.....G.....G.....11.....G.....G.....C.....C.....  
 gor .....G.....T.GT.G.A.T.....AC.....A.....G.....G.....C.....C.....G.....G.....G.....C.....G.....C.....C.....  
 xen ..T.....AT.T.....C.....GAC.....C.....C.....G.....T.....A.....G.....G.....C.....G.....A.....A.....C.....17.....C.....C.....37.....  
 sim ..G.....GT.G.A.T.....AC.....A.....G.....T.....G.....15.....C.....G.....C.....T.....G.....G.....G.....G.....  
 for ..G.....GG.....A.C.....ACT.....A.....G.....C.....G.....A.....A.....9.....G.....G.....CGCG.....C.....C.....39.....G.....T.....TC.....C.....C.....  
 sme .....G.....TG.T.....A.....AC.....C.....A.....G.....C.....G.....G.....G.....G.....20.....G.....T.....38.....C.....C.....  
 che ..CT.G.....G.....A.....ACT.....18.....G.....T.....G.....A.....G.....G.....G.....G.....G.....T.....C.....C.....C.....C.....  
 6 .....G.....A.....A.....G.....C.....

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

.....21.....41.....



(avi.B), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (avi.C), *M. kansasii* (kan), *M. gastri* (gas), *M. scrofulaceum* (scr), *M. szulgae* (szu), *M. malmoense* (mal), *M. asiaticum* (asi), *M. gordonae* (gor), *M. xenopi* (xen), *M. simiae* (sim), *M. fortuitum* (for), *M. smegmatis* (sme), *M. chelonae* (che). Последовательности олигонуклеотидов с нумерацией от 1 до 60 (соответствует номерам элементов биочипа на Рис. 47) выделены серым цветом.



**Рис. 47.** Идентификация ДНК *M. tuberculosis* (А), *M. marinum* (В) и *M. flavescens* (С) на биочипе. Для каждого образца слева направо показана гибридизационная картина, затем схема биочипа, на которой ячейки с максимальными сигналами отмечены серым цветом. Для данных ячеек далее представлены интенсивности сигналов, нормированные на максимальное значение, и гибридизационные дуплексы, образованные иммобилизованными зондами и последовательностью гибридизуемого фрагмента гена *gyrB*, выделены неспаренные основания. Обозначения: 'М' – маркерные ячейки, '0' – ячейки, не содержащие олигонуклеотидов, 1-60 – ячейки с иммобилизованными зондами.

Интерпретацию результатов анализа проводили согласно следующему алгоритму. На первом этапе идентифицировали ячейки с положительными сигналами, превосходящими средний сигнал в элементах с индексом '0' более, чем в 4,0 раза. Если число элементов биочипа с положительными сигналами составляло менее 3, такой профиль гибридизации считали «слабым» и далее не рассматривали.

Для каждого анализируемого образца получали гибридизационный

профиль из 60 значений сигналов элементов, содержащих иммобилизованные зонды. Первичные 20 эталонных профилей были получены по результатам анализа видоспецифичных синтетических фрагментов ДНК (Zimenkov et al., 2015) с 20 последовательностями, соответствующими указанным на Рис. 46 видам (*M. canetti* не тестировали). Данные профили были добавлены в базу данных, интегрированную в ПО. В дальнейшем для анализа гибридизационного профиля использовали подход математического сравнения интенсивностей флуоресценции с эталонными профилями, получаемыми в результате гибридизационного анализа фрагментов с известной последовательностью. В качестве критерия сравнения использовали коэффициент линейной корреляции Пирсона, который может принимать значения от -1 до +1:

$$r = \frac{60 \sum (x_i y_i) - \sum x_i y_i}{\sqrt{(60 \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2)(60 \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2)}} \quad (8),$$

где  $x_i$  и  $y_i$  – сигналы  $i$  элемента ( $1 \leq i \leq 60$ ) для двух разных профилей, 60 – число ячеек чипа с иммобилизованными зондами. В случае если коэффициент  $r$  превосходил пороговое значение 0,9, то считали, что анализируемый образец ДНК принадлежит к тому же виду, что и профиль из базы данных. Пороговые значения были определены на основе матрицы корреляций эталонных профилей (Таблица 25). Средний коэффициент корреляции  $r$  для профилей разных видов составил  $0,04 \pm 0,15$ , в то время как корреляция профилей при анализе одного и того же образца в трех повторностях составила  $r = 0,995 \pm 0,004$ .

Наивысшее значение межвидовой корреляции  $r = 0,80$  было получено между профилями *M. bovis* и МТС (*M. tuberculosis, non-bovis*), поскольку последовательности анализируемого фрагмента гена *gyrB* для данных видов различаются всего одним нуклеотидом, соответственно, гибридизационные профили дифференцировались по сигналам элементов с зондами 2 и 22 (Рис. 47).

**Таблица 25.** Матрица коэффициентов взаимных корреляций Пирсона для 20 гибридизационных профилей, полученных при анализе последовательностей синтетических фрагментов гена *gyrB*, соответствующих 20 видам и подвидам микобактерий.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	<i>tub</i>	<i>bov</i>	<i>mar</i>	<i>int.A</i>	<i>avi.A</i>	<i>avi.B</i>	<i>avi.C</i>	<i>avi.D</i>	<i>kan</i>	<i>gas</i>	<i>scr</i>	<i>szu</i>	<i>mal</i>	<i>asi</i>	<i>gor</i>	<i>xen</i>	<i>sim</i>	<i>for</i>	<i>sme</i>	<i>che</i>
1 <i>M. tuberculosis</i>	1,00	0,80	-0,02	0,16	-0,13	-0,18	0,10	-0,15	-0,12	-0,12	-0,14	0,01	-0,12	-0,10	-0,10	-0,11	0,11	-0,11	0,21	0,00
2 <i>M. bovis</i>	0,80	1,00	-0,01	0,23	-0,09	-0,16	0,09	-0,06	-0,12	-0,10	-0,05	0,04	-0,06	-0,05	-0,07	-0,08	0,16	-0,08	0,14	0,02
3 <i>M. marinum</i>	-0,02	-0,01	1,00	0,20	0,00	0,00	-0,08	-0,03	-0,02	-0,08	-0,05	0,30	0,10	-0,04	-0,06	-0,11	0,09	0,00	0,16	0,00
4 <i>M. intracellulare</i>	0,16	0,23	0,20	1,00	0,05	0,04	-0,05	0,25	-0,05	-0,11	0,18	0,01	0,10	0,09	-0,09	-0,11	0,20	-0,03	0,12	0,01
5 <i>M. avium</i> group A	-0,13	-0,09	0,00	0,05	1,00	0,53	0,03	0,55	0,37	0,06	0,03	-0,08	-0,01	0,00	0,10	0,11	-0,10	0,02	-0,03	-0,05
6 <i>M. avium</i> group B	-0,18	-0,16	0,00	0,04	0,53	1,00	0,35	0,40	0,29	0,05	-0,07	-0,09	-0,07	-0,03	-0,02	-0,03	-0,08	0,20	0,06	-0,07
7 <i>M. avium</i> group C	0,10	0,09	-0,08	-0,05	0,03	0,35	1,00	0,23	0,07	0,05	-0,06	0,14	0,08	0,04	-0,01	-0,02	0,20	0,26	0,31	0,33
8 <i>M. avium</i> group D	-0,15	-0,06	-0,03	0,25	0,55	0,40	0,23	1,00	0,19	-0,06	0,23	0,04	0,25	0,13	-0,07	-0,08	0,08	0,23	0,02	0,19
9 <i>M. kansasii</i>	-0,12	-0,12	-0,02	-0,05	0,37	0,29	0,07	0,19	1,00	0,23	-0,09	-0,11	-0,09	-0,09	0,04	-0,13	-0,08	-0,11	-0,07	-0,12
10 <i>M. gastri</i>	-0,12	-0,10	-0,08	-0,11	0,06	0,05	0,05	-0,06	0,23	1,00	-0,14	-0,12	-0,11	-0,15	0,04	-0,11	-0,04	-0,12	-0,10	-0,11
11 <i>M. scrofulaceum</i>	-0,14	-0,05	-0,05	0,18	0,03	-0,07	-0,06	0,23	-0,09	-0,14	1,00	-0,06	0,22	-0,09	-0,06	-0,04	-0,06	-0,06	-0,09	0,05
12 <i>M. szulgai</i>	0,01	0,04	0,30	0,01	-0,08	-0,09	0,14	0,04	-0,11	-0,12	-0,06	1,00	0,25	0,19	-0,07	-0,08	0,26	0,37	0,08	0,32
13 <i>M. malmoense</i>	-0,12	-0,06	0,10	0,10	-0,01	-0,07	0,08	0,25	-0,09	-0,11	0,22	0,25	1,00	0,24	-0,11	-0,09	0,05	0,05	0,02	0,22
14 <i>M. asiaticum</i>	-0,10	-0,05	-0,04	0,09	0,00	-0,03	0,04	0,13	-0,09	-0,15	-0,09	0,19	0,24	1,00	-0,09	-0,12	0,02	0,13	0,18	0,09
15 <i>M. goodii</i>	-0,10	-0,07	-0,06	-0,09	0,10	-0,02	-0,01	-0,07	0,04	0,04	-0,06	-0,07	-0,11	-0,09	1,00	-0,07	-0,06	-0,10	0,06	-0,07
16 <i>M. xenopi</i>	-0,11	-0,08	-0,11	-0,11	0,11	-0,03	-0,02	-0,08	-0,13	-0,11	-0,04	-0,08	-0,09	-0,12	-0,07	1,00	-0,10	-0,02	-0,12	-0,04
17 <i>M. simiae</i>	0,11	0,16	0,09	0,20	-0,10	-0,08	0,20	0,08	-0,08	-0,04	-0,06	0,26	0,05	0,02	-0,06	-0,10	1,00	0,14	0,06	0,32
18 <i>M. fortuitum</i>	-0,11	-0,08	0,00	-0,03	0,02	0,20	0,26	0,23	-0,11	-0,12	-0,06	0,37	0,05	0,13	-0,10	-0,02	0,14	1,00	0,13	0,22
19 <i>M. smegmatis</i>	0,21	0,14	0,16	0,12	-0,03	0,06	0,31	0,02	-0,07	-0,10	-0,09	0,08	0,02	0,18	0,06	-0,12	0,06	0,13	1,00	0,28
20 <i>M. chelonae</i>	0,00	0,02	0,00	0,01	-0,05	-0,07	0,33	0,19	-0,12	-0,11	0,05	0,32	0,22	0,09	-0,07	-0,04	0,32	0,22	0,28	1,00

При анализе образцов профили с коэффициентом корреляции  $r < 0,9$  группировали с эталонными профилями, после чего создавали матрицу кросс-корреляций с последующим кластерным анализом в программе Statistica, при использовании порогового значения 0,9. Полагали, что образцы с профилями, принадлежащими одному кластеру, соответствовали виду или подвиду с последовательностью гена *gyrB*, отличающейся от последовательностей исходных 20 видов микобактерий. Для таких образцов проводили секвенирование локусов *gyrB*, *16S pPHK* и межгенного транскрибируемого спейсера 16S – 23S рPHK (ITS), с последующей идентификацией вида. Новый профиль, соответствующий обнаруженному виду микобактерий, добавляли в базу данных, таким образом расширяя спектр идентифицируемых видов. Суммарно, при анализе различных коллекций микобактериальной ДНК, число уникальных профилей, соответствующих 35 различным видам, выросло с 20 до 35.

Отдельный алгоритм был разработан для анализа гибридизационных профилей, полученных от смесей геномной ДНК двух различных видов микобактерий. Если коэффициент корреляции такого профиля с наиболее подходящим эталонным профилем составлял 0,5-0,9, проводили дополнительный анализ сигналов в исследуемом профиле. Максимальный сигнал в профиле принимали за 1, другие сигналы нормировали на максимальный и все полученные значения сигналов более 0,1 считали значимыми. Если число таких значимых сигналов в профиле было больше, чем в эталонном на 3-7 единиц, из исследуемого профиля конструировали сокращенный, отбрасывая значимые сигналы, общие для эталонного и анализируемого профилей. Далее рассчитывали коэффициенты корреляции сокращенного профиля с базой эталонных профилей и подбирали второй наиболее подходящий эталонный профиль.

Разработанным методом проведено исследование ДНК 543 изолятов микобактерий из трех коллекций. Коллекция I включала 44 штамма *M. tuberculosis*, 2 *M. bovis* and 291 изолята NTM от пациентов МНПЦБТ. Вторая



(II) выборка была получена из СПб НИИФ и включала 108 изолятов, в т.ч. 8 *M. tuberculosis* и 100 штаммов нетуберкулезных микобактерий. Коллекция III НИИ ФП состояла из 98 клинических изолятов (4 *M. tuberculosis* and 94 NTM). Все образцы были охарактеризованы до вида референсными микробиологическими, биохимическими и молекулярно-генетическими тестами.

Коэффициенты корреляции с одним из эталонных профилей составили более 0,9 для 403 из 543 (74%) анализируемых образцов. Разработанным методом было корректно идентифицировано 11 из 19 эталонных профилей: MTC (*non-bovis*) (N = 56), *M. bovis* (N = 2), *M. intracellulare* (N = 28), *M. avium.A* (N = 83), *M. avium.B* (N = 46), *M. avium.D* (N = 9), *M. kansasii* (N = 41), *M. gordonae* (N = 25), *M. xenopi* (N = 61), *M. fortuitum* (N = 37), *M. smegmatis* (N = 1), *M. chelonae* (N = 14). Восемь профилей, соответствующих *M. marinum*, *M. avium.C*, *M. gastri*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. asiaticum*, and *M. simiae*, в исследуемых коллекциях найдены не были.

Коэффициенты корреляция профилей, полученных при анализе синтетических фрагментов ДНК и геномной ДНК одного вида, были значительно выше порогового значения 0,9. Например, для 56 профилей MTC (*non-bovis*), средняя интеркорреляция составила  $0,97 \pm 0,03$ , средняя корреляция между профилем синтетического фрагмента и геномной ДНК данного вида -  $0,95 \pm 0,02$ . В каждом случае результаты анализа на биочипе подтверждали секвенированием генов *gyrB*, 16S рРНК и локуса ITS (Таблица 26).

Для 117 из 543 (22%) гибридизационных профилей были получены корреляционные коэффициенты менее 0,75 при сравнении с эталонными профилями, тем самым принадлежность к определенному виду сразу установить не удалось. Проведенный кластерный анализ позволил выявить 30 кластеров с средней внутрикластерной корреляцией  $0,94 \pm 0,02$  и средней межкластерной корреляцией  $0,19 \pm 0,18$ . Средняя корреляция новых кластеров с 20 эталонными профилями составила  $0,11 \pm 0,18$ . Новым кластерам были

присвоены номера #21 - #50 в Таблице 26.

Мы предположили, что данные гибридизационные профили были получены при амплификации и гибридизации фрагмента *gyrB* с последовательностью, отличающейся от последовательностей исходных 20 видов. Полученные коэффициенты корреляции свидетельствуют, что каждый кластер принадлежал отдельному виду или подвиду с идентичной или высокомонологичной последовательностью *gyrB*. Эта гипотеза была подтверждена секвенированием локусов *gyrB*, 16S рРНК и ITS (Таблица 26).

На Рис. 47С представлен пример гибридизационного профиля ДНК изолята из коллекции I, соответствующего *M. flavescens* (#44 в Таблице 26). Среднее значение  $r$  с эталонными профилями составило  $0,13 \pm 0,16$ . Полученные нами последовательности генов *gyrB* и 16S были на 100% гомологичны опубликованным ранее последовательностями *M. flavescens* (Genbank Accession No. AB014310 и No. AF547922). Выравнивание фрагмента гена *gyrB* и последовательности иммобилизованного олигонуклеотида, показанное на Рис. 47С, показало не совсем «классическую картину» зависимости интенсивности сигнала от количества неспаренных оснований в дуплексе. Однако такая зависимость не является строгой в силу разницы в термодинамических свойствах неканонического взаимодействия оснований и вклада положения неспаренного основания в дуплексе: мисматчи в положении, близком к середине олигонуклеотида оказывают больший дестабилизирующий эффект на гибридизационный дуплекс (Naiser et al., 2008).

Таким образом, кластерный анализ гибридизационных профилей и секвенирование трех локусов с последующей реаннотацией профилей позволили идентифицировать еще 17 видов микобактерий: *M. abscessus* (N = 18), *M. lentiflavum* (N = 7), *M. septicum*/*M. peregrinum* (N = 4), *M. mageritense* (N = 2), *M. neoaurum* (N = 2), *M. iranicum* (N = 2), *M. flavescens* (N = 2), *M. mantenii* (N = 1), *M. intracellulare*/*M. colombiense* (N = 1), *M. kumamotonense* (N = 1), *M. senuense* (N = 1), *M. interjectum* (N = 1), *M. intermedium* (N = 1), *M. houstonense* (N = 1), *M. mucogenicum* (N = 1), *M. duvalii* (N = 1) и *M. phlei* (N = 1).

**Таблица 26.** Сравнение результатов идентификации видов микобактерий в трех коллекциях клинических изолятов разработанным методом гибридизации на биочипе с данными микробиологических методов, результатами, полученными системой GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain LifeScience, Германия) и секвенированием локусов *gyrB*, 16S рРНК и ITS.

Таксон	Колл. <sup>a</sup>	N	Данные микробиологии <sup>b</sup>	GenoType Mycobacterium CM/AS <sup>c</sup>	Биочип-1 <sup>d</sup>	Секвенирование <sup>e</sup>			Биочип-2 <sup>f</sup>
						<i>gyrB</i>	16S	ITS	
MTBC	I	41	tub	-	tub				
	I	1	kan	-	tub	tub			
	II	4	-	MTC	tub				tub
	III	8	-	MTC	tub				
	I	2	bov	-	bov				bov
	I	6	MAC	-	int				
	I	1	xen	-	int				
	II	14	-	int	int	int			int.A
	II	1	-	Myc	int				
	III	6	-	int	int				
MAC	I	8	MAC	-	#20				
	I	1	gor	-	#20				int.B
	II	1	-	int	#20				
	III	4	-	int	#20	int	int		
	I	71	MAC	-	avi.A				
	II	8	-	avi	avi.A				avi.A
	III	4	-	avi	avi.A				
	I	4	MAC	-	avi.B	avi			
	I	1	kan	-	avi.B	avi			
	II	28	-	avi	avi.B				avi.B
	II	2	-	weak	avi.B				
	III	11	-	avi	avi.B				
	I	6	MAC	-	#21	99% avi	avi	avi	
	II	2	-	avi	#21	avi			avi.D
	III	1	-	avi	#21				
II	1	-	avi	#22	avi			avi.E	
I	1	MAC	-	#23	93% int	man	sp.	man	
II	1	-	int	#24	92% int	int/col		int/col	
<i>M. kansasii</i>	I	31	kan	-	kan	kan	gas/kan	kan	
	I	1	mar	-	kan	kan			
	I	1	fla	-	kan	kan	gas/kan	kan	kan
	II	1	-	kan	kan				
	II	1	-	Myc	kan				
	III	6	-	kan	kan				
<i>M. goodii</i>	I	9	gor	-	gor				
	I	1	fla	-	gor	99% gor			
	I	1	che	-	gor	99% gor	gor		gor.A
	I	1	MAC	-	gor	99% gor	gor		
	I	1	MAC	-	gor	gor	gor	gor	
	III	12	-	gor	gor				
	I	1	scr	-	#25	92% gor	gor		
	I	1	scr	-	#25	92% gor	gor		gor.B
	I	1	gor	-	#25	91% gor	gor		
	III	2	-	gor	#25	90% gor	99% gor	gor	
I	1	gor	-	#26	92% gor	gor		gor.C	

	I	1	gor	-	#26	92% gor	gor		
	III	3	-	gor	#26				
	I	1	gor	-	#27	gor	gor	gor	
	III	1	-	gor	#27	gor		gor	gor.D
	III	1	-	gor	#27				
	III	1	-	gor	#27	gor	gor	gor	
	I	1	gor	-	#28	90% asi	gor		
	I	1	gor	-	#28	90% asi	gor		gor.E
	I	1	gor	-	#28	90% asi	gor		
	III	3	-	gor	#28	90% asi	gor		
<i>M. xenopi</i>	I	48	xen	-	xen	xen			
	I	1	MAC	-	xen				
	I	1	MAC	-	xen	xen	xen		
	I	1	MAC	-	xen	xen			xen
	I	1	MAC	-	xen				
	I	1	MAC	-	xen				
	II	1	-	xen	xen				
	III	7	-	xen	xen				
<i>M. terrae</i> complex	I	1	ter	-	#29	avi	kum/avi	kum/avi	kum
	II	1	-	Myc	#30	97% Ter	sen		sen
<i>M. lentiflavum</i>	II	4	-	Myc	#31	88% Myc	len		
	II	1	-	weak	#31				len.A
	III	1	-	Myc	#31	88% Myc			
	II	1	-	Myc	#32	88% int	len		len.B
<i>M. interjectum</i>	I	1	MAC	-	#33	90% mal	ijc		ijc
<i>M. intermedium</i>	I	1	gor	-	#34	90%	imd		imd
<i>M. mageritense</i>	I	1	for	-	#35	mag	mag		
	III	1	-	Myc	#35	mag			mag
<i>M. neoaurum</i>	II	1	-	Myc	#36				
	II	1	-	int	#36	neo	neo		neo
<i>M. fortuitum</i>	I	25	for	-	for	for	for		
	I	1	MAC	-	for	99% for			
	I	1	MAC	-	for				for.A
	II	3	-	for	for	99% for	for		
	III	7	-	for	for	99% for	for		
	I	25	for	-	#37	for	for		
	I	1	che	-	#37	98% for	for		for.B
	II	4	-	for	#37	98% for	for		
	III	2	-	for	#37	98% for			
<i>M. houstonense</i>	I	1	for/che	-	#38	99% Myc	mag/for	99% hst	hst
<i>M. septicum</i> / <i>M. peregrinum</i>	I	1	for	-	#39	87% sep	sep/per		sep/per.A
	II	1	-	per	#40	86% tok/sep	sep/per	per	sep/per.B
	III	2	-	per	#41	96% sep/per	sep/per	99% per	sep/per.C
<i>M. mucogenicum</i>	III	1	-	Myc	#42	86% chu	muc	95% Myc	muc
<i>M. duvalii</i>	I	1	MAC	-	#43	92% Myc	duv		duv
<i>M. flavescens</i>	I	1	fla	-	#44	fla	fla		fla.A
	II	1	-	Myc	#45	94% fla	fla		fla.B
<i>M. phlei</i>	I	1	gor	-	#46	phl	phl	phl	phl
<i>M. smegmatis</i>	II	1	-	for	sme	sme	sme	sme	sme
	I	3	che	-	che				
	II	4	-	che	che				che
	III	7	-	che	che				
<i>M. abscessus</i>	I	5	for	-	#47	abs	abs	abs	abs.A

	I	3	che	-	#47		abs	abs	
	III	7	-	abs	#47				
	II	2	-	abs	#48	99% abs	abs	abs	abs.B
	III	1	-	abs	#49	bol	abs		bol
<i>M. iranicum</i>	I	1	gor	-	#50	91% sme	ira	99% ira	
	I	1	for	-	#50	91% sme	ira	99% ira	ira

**Примечание:**

<sup>a</sup> – I – коллекция МНПЦБТ, II – коллекция СПб НИИФ, III – коллекция НИИ ФП;

<sup>b</sup> – Используемые сокращения: abs – *M. abscessus*, avi – *M. avium*, asi – *M. asiaticum*, bol – *M. abscessus subsp. bolletii*, bov – *M. bovis*, che – *M. chelonae*, chu – *M. chunense*, col – *M. colombiense*, duv – *M. duvalii*, fla – *M. flavescens*, for – *M. fortuitum*, gor – *M. gordonae*, hst – *M. houstonense*, ijc – *M. interjectum*, imd – *M. intermedium*, int – *M. intracellulare*, ira – *M. iranicum*, kan – *M. kansasii*, kum – *M. kumamotoense*, len – *M. lentiflavum*, MAC – *M. avium complex*, mag – *M. mageritense*, mal – *M. malmoense*, man – *M. mantonii*, muc – *M. mucogenicum*, Muc – *Mycobacterium specie*, nea – *M. neoaurum*, per – *M. peregrinum*, phl – *M. phlei*, sim – *M. simiae*, sen – *M. sensuense*, sep – *M. septicum*, sme – *M. smegmatis*, ter – *M. terrae*, tok – *M. tokaiense*, tub – *M. tuberculosis*, xen – *M. xenopi*;

<sup>c</sup> – Данные, полученные с использованием системы GenoType *Mycobacterium CM/AS*;

<sup>d</sup> – первичные данные при анализе на биочипе, новые профили без достаточной гомологии обозначены '#' и номером;

<sup>e</sup> – приведены виды с наиболее гомологичными последовательностями, указан % гомологии;

<sup>f</sup> – реаннотированный профиль гибридизации по результатам анализа полученных последовательностей локусов *gyrB*, 16S рРНК и ITS.

18 из 543 гибридизационных профилей были признаны «слабыми», т.к. не содержали положительных сигналов. Амплификация фрагмента гена 16S рРНК была успешной только для 6 изолятов, последующее секвенирование установило, что три изолята содержали ДНК *Gordonia sputi*, один изолят - ДНК *Staphylococcus hominis*, один изолят – ДНК *Staphylococcus epidermidis*, еще один изолят - ДНК *Mycobacterium celatum*.

В шести профилях были идентифицированы смеси ДНК двух различных видов: *M. avium* и *M. intracellulare*, *M. avium* и *M. lentiflavum* (в двух образцах); МТС (non *bovis*) и *M. avium* (в трех образцах). Смешанные профили обладали промежуточным значением коэффициента корреляции с одним из эталонных профилей и, одновременно, содержали значительное количество положительных сигналов в силу присутствия дополнительного образца ДНК. Наличие второго профиля, соответствующего иной микобактериальной ДНК в смеси, определяли согласно представленному выше алгоритму.

Результирующий перечень определенных видов в трех коллекциях

приведен в Таблице 27. В целом, разработанным методом удалось установить вид у 525 из 543 (96,7%) изолятов. Принимая во внимание, что 17 из 18 неидентифицированных образцов не содержали микобактериальной ДНК, согласно данным секвенирования гена 16S рРНК, чувствительность метода составила 99,8%, специфичность – 100% при использовании секвенирования локусов *gyrB*, *16S pРНК* и ITS в качестве референсного.

Средняя кросс-корреляция для всех независимых профилей составила  $0,13 \pm 0,19$ , позволяя получить 50 различных профилей, соответствующих видам и подвидам микроорганизмов рода *Mycobacterium*. Наивысшая корреляция ( $r = 0,80 \pm 0,02$ ) между профилями была зарегистрирована для *M. avium*(A) и *M. avium*(E), однако, эта величина ниже порогового значения  $r = 0,9$ , тем самым ошибка в идентификации данных профилей не приведет к неправильному установлению вида. Итоговый список видов, определяемых разработанным методом, включал в себя 35 видов микобактерий, в том числе *M.tuberculosis*, *M. bovis*, *M. intracellulare*, *M. avium ssp.*, *M. mantenii*, *M. intracellulare/M. colombiense*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. xenopii*, *M. kumamotoense*, *M. sensuense*, *M. lentiflavum*, *M. interjectum*, *M. intermedium*, *M. mageritense*, *M. neoaurum*, *M. fortuitum*, *M. septicum/ M. peregrinum*, *M. houstonense*, *M. iranicum*, *M. mucogenicum*, *M. duvalii*, *M. flavescence*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. marinum*, *M. avium subsp. paratuberculosis*, *M. gastri*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgae*, *M. malmoense*, *M. asiaticum*, *M. simiae*. При этом разработанный алгоритм анализа гибридизационных профилей позволяет идентифицировать как внутривидовые различия, например, у *M. avium*, так и смеси микроорганизмов, включая *M. tuberculosis* и *M. avium*.

Специфичность метода была протестирована использованием геномной ДНК *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis* и *Streptococcus sanguinis*. Во всех случаях были получены отрицательные результаты («слабые» гибридизационные профили).

Аналитическую чувствительность оценивали также посредством определения вида в 61 образце мокроты, полученном от пациентов НИИ ФП, охарактеризованном методом люминесцентной микроскопии. Чувствительность метода составила 95% (18 из 19 образцов для AFB+++, 93% (14 из 15) AFB++, 85% (11 из 13) for AFB+, 89% (8 из 9) для единичных полей зрения и 36% (4 из 11) – для бактериоскопически отрицательных образцов.

**Таблица 27.** Спектр идентифицированных видов микобактерий в трех коллекциях образцов.

Группа	Вид	Коллекция			Всего
		I	II	III	
MTBC	MTBC (not <i>M. bovis</i> )	44	4	8	56
	<i>M. bovis</i>	2	0	0	2
MAC	<i>M. intracellulare</i>	16	16	10	42
	<i>M. avium</i> ssp.	82	41	16	139
	<i>M. mantonii</i>	1	0	0	1
	<i>M. intracellulare</i> / <i>M. colombiense</i>	0	1	0	1
	<i>M. kansasii</i>	33	2	6	41
	<i>M. goodii</i>	22	0	23	45
	<i>M. xenopi</i>	53	1	7	61
Terraе group	<i>M. kumamotoense</i>	1	0	0	1
	<i>M. senense</i>	0	1	0	1
	<i>M. lentiflavum</i>	0	6	1	7
	<i>M. interjectum</i>	1	0	0	1
	<i>M. intermedium</i>	1	0	0	1
Neoaurum group	<i>M. mageritense</i>	1	0	1	2
	<i>M. neoaurum</i>	0	2	0	2
	<i>M. fortuitum</i>	56	7	9	72
Fortuitum group	<i>M. septicum</i> / <i>M. peregrinum</i>	1	1	2	4
	<i>M. houstonense</i>	1	0	0	1
	<i>M. iranicum</i>	2	0	0	2
	<i>M. mucogenicum</i>	0	0	1	1
Smegmatis group	<i>M. duvalii</i>	1	0	0	1
	<i>M. flavescence</i>	1	1	0	2
	<i>M. phlei</i>	1	0	0	1
	<i>M. smegmatis</i>	0	1	0	1
Chelonaе-abscessus group	<i>M. chelonaе</i>	3	4	7	14
	<i>M. abscessus</i> ssp.	8	2	8	18

Установлены доминирующие в Европейской части РФ виды NTM, такие как комплекс *Mycobacterium avium* (39%), *M. fortuitum* (17%) и *M. xenopi* (13%),

способные вызывать инфекционные процессы у иммуносупрессивных больных. Клиническая значимость идентификации атипичных микобактерий варьирует в зависимости от вида, и, если *M. kansasii*, обнаруженный нами в 9% случаев (41 изолят), ассоциирован с патологическим процессом (van Ingen, 2013), то 10% (45 изолятов) NTM составляли изоляты *M. goodii* – малоинфекционного вида, редко вызывающего патологии (Mazumder et al., 2010) и являющегося основным лабораторным контаминантом (Arnouk et al., 2000).

Помимо существенно большего количества определяемых видов в сравнении с ранее описанными методиками, преимуществом разработанного подхода является возможность «самообучения» при идентификации неизвестного микроорганизма, посредством установления его вида методом секвенирования и добавления соответствующего профиля в базу данных, интегрированную в ПО для анализа результатов гибридизации на биочипе.

### **3.3 Анализ генетических детерминант резистентности к антимикробным препаратам возбудителей инфекций репродуктивного тракта**

#### **3.3.1 Фенотипическая чувствительность и генетические детерминанты резистентности изолятов *Neisseria gonorrhoeae***

Одной из задач мониторинга лекарственно-устойчивых форм возбудителя гонококковой инфекции является анализ распространения хромосомных генетических детерминант антибиотикорезистентности (мутационного профиля) в современной популяции *N. gonorrhoeae*. С этой целью был создан пилотный вариант гидрогелевого биочипа для идентификации мутационного профиля в генах *penA*, *ponA*, *rpsJ*, *gyrA* и *parC* у изолятов *N. gonorrhoeae*, выделенных на территории Российской Федерации в 2015 году, с определением соответствий полученных данных паттернам фенотипической чувствительности возбудителя к пенициллину, тетрациклину и фторхинолонам.

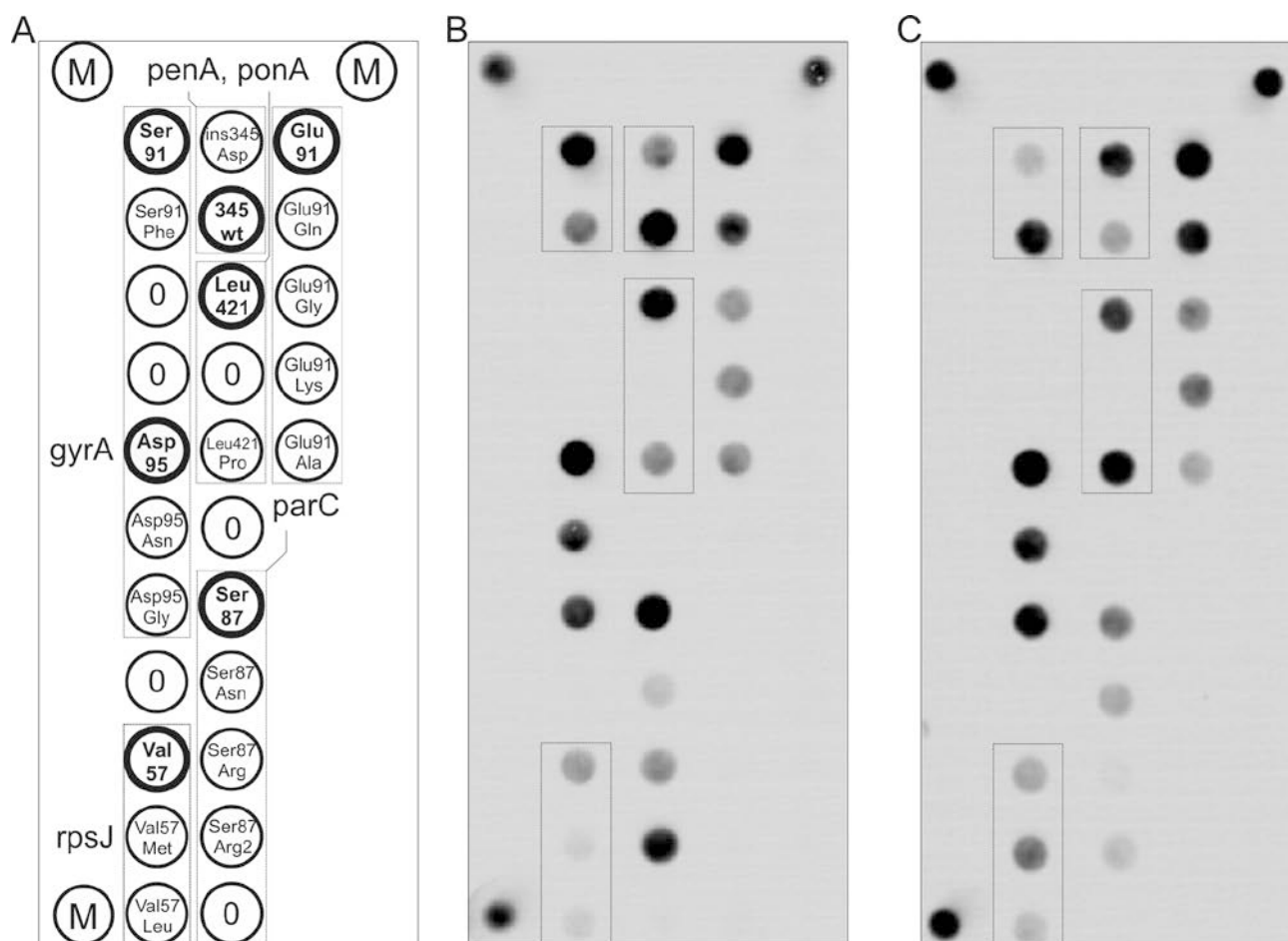
Биочип содержал 21 гелевый элемент с иммобилизованными олигонуклеотидами, шесть ячеек с индексом «0» без зондов и три ячейки с



индексом «М» (Рис. 48А). Обозначение ячеек, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды, и назначение зондов приведено в Таблице 28.

**Таблица 28.** Олигонуклеотиды, иммобилизованные на биочипе для идентификации мутаций, ассоциированных с резистентностью к пенициллину, тетрациклину и фторхинолонам.

Обозначение	Ген	Последовательность 5'-3'	Назначение олигонуклеотида (идентификация признака)
<b>Пенициллин</b>			
345 wt	<i>penA</i>	CCGTGCGCGATACCCATGT	Дикий тип в 345 кодоне
ins345Asp	<i>penA</i>	GTGCGCGACGATACCCATG	Инсерция аспартата в 345 кодоне
Leu421	<i>ponA</i>	CCGTTGCTGCAGGGGGC	Дикий тип в 421 кодоне
Leu421Pro	<i>ponA</i>	CCGTTGCCGACAGGGGG	замена лейцина на пролин в кодоне 421
<b>Тетрациклин</b>			
Val57	<i>rpsJ</i>	TTCTCCGCACGTGAACAAAAC	Дикий тип в 57 кодоне
Val57Met	<i>rpsJ</i>	TTCTCCGCACATGAACAAAAC	замена валина на метионин в кодоне 57
Val57Leu	<i>rpsJ</i>	TTCTCCGCACTTGAACAAAAC	замена валина на лейцин в кодоне 57
<b>Фторхинолоны</b>			
Ser91	<i>gyrA</i>	GCGATTCCGCAGTTTACGA	Дикий тип в 91 кодоне
Ser91Phe	<i>gyrA</i>	GCGATTTTCGCAGTTTACGA	замена серина на фенилаланин в 91 кодоне
Asp95	<i>gyrA</i>	CGCAGTTTACGACACCATCGTC C	Дикий тип в кодоне 95
Asp95Asn	<i>gyrA</i>	CGCAGTTTACAACACCATCGTC C	замена аспартата на аспарагин в 91 кодоне
Asp95Gly	<i>gyrA</i>	GCAGTTTACGGCACCATCGTC	замена аспартата на глицин в 91 кодоне
Ser87	<i>parC</i>	GCGACAGTTCGCTATGA	Дикий тип в 87 кодоне
Ser87Asn	<i>parC</i>	GCGACAATTCCGCTATGA	замена серина на аспарагин в кодоне 87
Ser87Arg <sub>1</sub>	<i>parC</i>	GCGACCGTTCGCTATGA	замена серина на аргинин в кодоне 87 (вариант 1)
Ser87Arg <sub>2</sub>	<i>parC</i>	GCGACAGGTCGCTATGA	замена серина на аргинин в кодоне 87 (вариант 2)
Glu91	<i>parC</i>	CSTATGAGGCGATGGTGCG	Дикий тип в 91 кодоне
Glu91Gln	<i>parC</i>	CSTATCAGGCGATGGTGCG	замена глутамата на глутамин в кодоне 91
Glu91Gly	<i>parC</i>	CSTATGGGGCGATGGTGCG	замена глутамата на глицин в кодоне 91
Glu91Lys	<i>parC</i>	CSTATAAGGCGATGGTGCG	замена глутамата на лизин в кодоне 91
Glu91Ala	<i>parC</i>	CSTATGCGGCGATGGTGCG	замена глутамата на аланин в кодоне 91



**Рис. 48.** Идентификация мутаций в хромосомных генах *N.gonorrhoeae*, кодирующих мишени для АМП, с использованием биочипа. (А) Схема микрочипа. Кластеры элементов, соответствующие различным анализируемым генам, обведены тонким контуром. Обозначения ячеек даны в соответствии с названиями олигонуклеотидов в Таблице 19. Элементы с олигонуклеотидами, специфичными к последовательности дикого типа, обведены толстым контуром (В) Гибридационная картина ДНК штамма дикого типа. (С) Гибридационная картина образца ДНК *N.gonorrhoeae* с мутациями: инсерция Asp345 в гене *penA*, Leu421Pro в гене *ponA*, Val57Met в гене *rpsJ*, Ser91Phe в гене *gyrA*.

Процедуры амплификации, включая последовательности праймеров, и гибридизации на биочипе проводили в соответствии с описанными режимами (Kubanov et al., 2016; Кубанов и др., 2017). Интерпретацию результатов проводили согласно описанному ранее алгоритму, сравнивая интенсивность сигналов флуоресценции элементов, содержащих олигонуклеотиды, соответствующие дикому типу и мутантным вариантам (Рис. 48В и 48С). Если совершенный гибридационный дуплекс регистрировали в элементе, соответствующем ДНК дикого типа, то это означало, что в данной аминокислотной позиции изучаемый образец ДНК мутаций не имел. Регистрация совершенного дуплекса в ячейке, соответствующей ДНК с

мутацией, означала наличие мутации по данной аминокислотной позиции в исследуемом образце ДНК.

Разработанным методом исследовано 128 изолятов *N. gonorrhoeae*, полученных в 2015 году из специализированных учреждений дерматовенерологического профиля 9 субъектов РФ. Фенотипическая чувствительность гонококков к 6 антибиотикам (пенициллин, цефтриаксон, тетрациклин, азитромицин, спектиномицин, ципрофлоксацин) была установлена в соответствии с критериями CLSI и EUCAST. NG-MAST генотипирование (*Neisseria gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing) (ECDC, 2012) анализируемых изолятов проводили путем секвенирования нуклеотидных последовательностей фрагментов двух вариабельных генов: *porB* (кодирует белок поринового канала) и *tbpB* (кодирует бета-субъединицу трансферрин-связывающего белка). По результатам секвенирования каждой из данных аллелей и их последующего сравнения с международной базой данных [www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net) делали заключение о принадлежности изолята к определенному молекулярному типу («сиквенс-типу») *N.gonorrhoeae*, имеющему оригинальное цифровое обозначение, например NG-MAST 807.

Результаты анализа 128 изолятов *N.gonorrhoeae*, включая установление сиквенс-типа, паттернов фенотипической чувствительности к АМП и идентификацию генетических детерминант резистентности к АМП, приведены в Таблице 29.

**Таблица 29.** Перечень изолятов с установленными сиквенс-типами, паттернами фенотипической чувствительности по пенициллину (Пен), тетрациклину (Тет) и ципрофлоксацину (Цип), мутационными профилями по результатам анализа на биочипе.

# обр.	Сиквенс-тип NG-MAST	МИК, мг/л			Результаты анализа на биочипе				
		Пен	Тет	Цип	penA	ponA	rpsJ	gyrA	parC
07/15/001	1544	0,5	0,5	0,004	D345a	L421P	wt	D95G	S87R
07/15/002	12531	0,12	0,12	0,015	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/003	807	0,12	0,5	0,002	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/004	12529	0,25	0,06	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/005	1580	0,015	0,5	0,004	wt	wt	wt	wt	wt
07/15/006	12444	0,015	0,25	0,002	wt	wt	wt	wt	wt
07/15/007	12447	0,25	0,5	16	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/008	5042	0,03	0,5	0,008	wt	wt	wt	wt	wt
07/15/009	12539	0,06	0,5	0,004	D345a	L421P	V57M	wt	wt
07/15/010	12531	0,015	0,25	0,03	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/011	12524	0,25	4	16	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/012	9476	0,25	0,5	4	D345a	L421P	V57L	S91F+D95G	S87R+E91G
07/15/013	9476	0,25	0,5	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/014	9476	0,25	0,5	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/015	9476	0,25	0,25	8	D345a	L421P	wt	S91F+D95G	S87R
07/15/016	9476	1	0,5	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/017	1544	0,06	0,25	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/018	12529	0,06	0,25	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/019	9476	0,25	0,5	8	D345a	L421P	V57L	S91F+D95G	S87R
07/15/020	3329	0,25	0,5	16	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/021	12557	0,03	0,25	0,008	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/022	9660	0,015	0,5	0,004	wt	wt	wt	wt	wt
07/15/023	12530	0,12	0,06	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/024	1544	0,12	0,25	0,002	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/025	5042	0,015	0,25	0,008	wt	wt	wt	wt	wt
07/15/026	807	0,06	0,06	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/027	12447	0,25	0,5	16	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/028	12531	0,06	0,25	0,008	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/029	9476	0,25	0,5	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/030	9476	0,25	1	16	D345a	wt	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/031	12558	0,25	0,25	4	D345a	L421P	V57M	S91F+D95N	wt
07/15/032	12531	0,12	0,06	0,03	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/033	1043	0,5	2	0,06	D345a	wt	V57M	wt	wt
07/15/034	9499	0,25	0,5	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/035	9476	0,25	0,5	4	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/036	807	0,06	0,25	0,008	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/037	12531	0,06	0,5	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/038	1580	0,015	0,12	0,004	wt	wt	wt	wt	wt
07/15/039	12524	1	1	16	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/040	387	0,25	0,25	16	D345a	wt	wt	wt	wt

07/15/041	12444	0,06	0,5	0,004	wt	wt	wt	wt	wt
07/15/043	12529	0,12	0,25	0,008	D345a	wt	wt	D95G	wt
07/15/044	1544	0,12	0,5	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/046	12555	0,5	0,5	4	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/047	9476	0,25	1	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/048	9476	0,5	0,5	4	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/049	9480	0,25	0,06	0,5	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/050	12555	0,25	0,5	8	D345a	L421P	V57L	S91F+D95G	S87R
07/15/051	12560	0,12	0,25	0,004	wt	wt	wt	wt	wt
07/15/052	12603	0,03	0,25	0,002	wt	wt	wt	wt	wt
07/15/053	1544	0,25	0,12	0,002	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/054	9476	0,5	2	4	D345a	L421P	wt	S91F+D95G	S87R
07/15/055	807	0,12	0,12	0,002	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/056	12531	0,5	0,12	0,002	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/057	1544	0,25	0,5	0,008	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/058	12602	0,015	0,06	0,004	wt	wt	wt	wt	wt
07/15/059	1531	0,12	0,25	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/060	807	0,03	0,12	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/061	12557	0,015	0,5	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
07/15/062	9476	0,25	0,5	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
07/15/063	387	0,015	0,06	0,004	wt	wt	wt	wt	wt
07/15/064	9476	0,5	0,5	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
09/15/001	12448	0,015	16	0,008	wt	wt	wt	wt	wt
09/15/002	12448	0,5	8	4	wt	wt	wt	wt	wt
09/15/003	12445	1	1	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
09/15/004	12445	0,25	2	16	D345a	L421P	V57L	S91F+D95G	S87R
09/15/005	12540	1	2	0,015	D345a	L421P	wt	wt	S87R
09/15/006	1993	0,015	0,5	0,002	wt	wt	wt	wt	wt
12/15/001	5941	0,12	0,25	0,008	D345a	wt	wt	wt	wt
12/15/002	807	0,12	0,12	0,008	D345a	wt	wt	wt	wt
12/15/003	5714	0,015	0,12	0,008	D345a	wt	wt	wt	wt
12/15/004	807	0,06	0,06	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
12/15/005	13060	0,25	0,5	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
12/15/006	807	0,12	0,5	0,008	D345a	wt	wt	wt	wt
12/15/008	1993	0,015	0,05	0,004	wt	wt	wt	wt	wt
12/15/010	1993	0,015	0,06	0,002	wt	wt	wt	wt	wt
19/15/001	12449	0,5	2	16	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
19/15/002	12446	1	2	32	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
19/15/003	12445	0,12	0,5	0,015	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
19/15/004	5714	0,015	0,5	0,015	wt	wt	wt	wt	S87R
19/15/005	12450	1	2	16	D345a	L421P	V57L	S91F+D95G	wt
19/15/006	12451	1	2	16	wt	L421P	V57L	S91F	wt
19/15/007	1993	0,015	1	0,004	wt	wt	wt	wt	wt
19/15/008	12559	1	2	0,008	D345a	wt	V57M	wt	wt
19/15/009	2875	1	2	64	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
19/15/010	13058	0,5	2	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R

19/15/011	12446	0,5	2	64	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
19/15/012	13055	0,5	0,03	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
19/15/013	13055	0,5	2	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
19/15/014	12446	0,5	4	32	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
19/15/015	13061	0,015	0,25	0,008	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
19/15/016	9834	0,5	1	16	wt	wt	wt	wt	wt
20/15/001	9576	0,12	0,12	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
20/15/002	12601	0,5	2	4	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
20/15/003	12600	0,015	0,03	0,002	wt	wt	wt	wt	wt
20/15/004	1407	0,5	2	16	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
20/15/005	11335	0,06	0,12	0,002	D345a	wt	wt	wt	wt
20/15/006	12559	0,015	0,06	0,002	wt	wt	wt	wt	wt
21/15/001	12528	0,25	1	16	D345a	L421P	V57M	S91F+D95N	E91G
21/15/002	12532	0,25	0,5	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
21/15/003	2694	0,5	2	0,5	D345a	L421P	wt	wt	wt
21/15/004	1993	0,015	0,06	0,004	D345a	wt	V57M	wt	wt
21/15/005	13056	0,5	1	8	D345a	L421P	wt	wt	wt
21/15/006	13057	0,5	1	8	D345a	L421P	V57M	S91F	wt
21/15/007	13056	0,5	1	8	D345a	L421P	V57M	S91F	wt
28/15/001	9570	0,015	0,06	0,5	D345a	wt	wt	wt	wt
28/15/002	9570	0,06	0,12	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
28/15/003	9570	0,015	0,5	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
28/15/004	9570	0,015	0,06	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
28/15/005	9570	0,015	0,12	0,002	D345a	wt	wt	wt	wt
36/15/001	807	0,06	0,06	0,008	D345a	wt	wt	wt	wt
36/15/002	807	0,03	0,06	0,008	D345a	wt	wt	wt	wt
36/15/003	5792	0,25	0,5	0,002	D345a	wt	V57M	wt	wt
36/15/004	5792	0,25	0,5	0,002	D345a	wt	V57M	wt	wt
36/15/005	5792	0,25	0,5	0,002	D345a	wt	V57M	wt	wt
36/15/006	13059	0,06	0,06	0,002	D345a	L421P	wt	wt	wt
36/15/007	13054	0,06	0,25	0,008	D345a	wt	wt	wt	wt
36/15/008	13054	0,06	0,12	0,004	D345a	wt	wt	wt	wt
36/15/009	13054	0,06	0,5	0,002	D345a	wt	wt	wt	wt
41/15/001	5714	0,015	0,25	0,008	wt	wt	wt	wt	wt
41/15/002	5714	0,015	0,5	0,002	D345a	wt	wt	wt	wt
41/15/003	12556	2	4	8	D345a	L421P	V57M	S91F+D95G	S87R
41/15/004	5714	0,015	0,25	0,002	wt	wt	wt	wt	wt
41/15/005	5714	0,015	0,12	0,002	wt	wt	wt	wt	wt

Наиболее часто представленной мутацией в анализируемой выборке *N.gonorrhoeae* (у 98 из 128 исследованных штаммов; 76,6%) являлась инсерция аспарагиновой кислоты в кодоне 345 гена *penA*. Другая мутация, также детерминирующая формирование устойчивости к  $\beta$ -лактамам антибиотикам

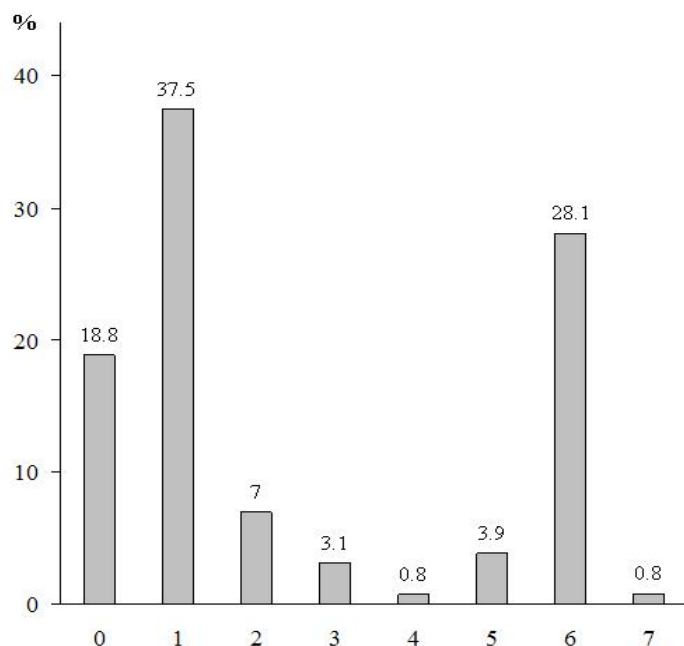
(замена Leu421Pro в гене *ponA*), встречалась в два раза реже: у 47 из 128 исследованных штаммов; 36,7%.

Мутации, затрагивающие ген *rpsJ*, преимущественно были связаны с аминокислотной заменой Val57Met (46 штаммов; 35,9%), в то время как замена Val57Leu выявлялась только у 6 штаммов (4,7%). Сходная частота мутаций была характерна и для гена *gyrA*. Так, аминокислотная замена Ser91Phe была зафиксирована у 47 штаммов (36,7%), а Asp95Gly у 42 штаммов (32,8%), при этом в большинстве случаев эти мутации встречались совместно (у 40 штаммов; 31,3%). На этом фоне мутация, приводящая к аминокислотной замене Asp95Asn, обнаруживалась значительно реже (только у 2 штаммов; 1,6%), в обоих случаях будучи ассоциированной с аминокислотной заменой Ser91Phe. Наконец, в гене *parC* типично регистрировалась замена Ser87Arg (вариант 1): у 42 штаммов (32,8%). В свою очередь аминокислотная замена Glu91Gly присутствовала только у 2 штаммов (1,6%), а замены Ser87Arg (вариант 2), Glu91Gln, Glu91Lys и Glu91Ala не были обнаружены.

Таким образом, в анализируемой выборке *N.gonorrhoeae* наибольшее распространение получила мутация в гене *penA* (у 3 из каждых 4 изолятов), в то время как мутации в генах *ponA*, *rpsJ*, *gyrA* и *parC* имели сходную частоту распространения, обнаруживаясь примерно у трети (32,8 – 40,6%) исследованных штаммов. У 24 из 128 изолятов (18,8%) мутаций обнаружено не было, на основании чего они были отнесены к группе штаммов «дикого типа».

Анализ частоты присутствия одной или нескольких мутаций у отдельных штаммов *N.gonorrhoeae* показал, что зафиксированное распределение является не нормальным, а бимодальным (Рис. 49), обусловленным высокими частотами присутствия в анализируемой выборке изолятов с одиночными и множественными мутациями. Максимальную частоту распространения имели штаммы *N. gonorrhoeae* с одной точечной мутацией (типично - ins345Asp в гене *penA*): 48 изолятов, 37,5%. В свою очередь второй максимум распределения был связан со штаммами, несущими одновременно шесть мутаций (36 изолятов; 28,1%), наиболее типично ins345Asp

(*penA*) + Leu421Pro (*ponA*) + Val57Met (*rpsJ*) + Ser91Phe и Asp95Gly (*gyrA*) + Ser87Arg (*parC*).



**Рис. 49.** Частоты встречаемости изолятов *N.gonorrhoeae* с одиночными и множественными мутациями в генах, детерминирующих устойчивость к АМП (%). По оси абсцисс: 0 – 7 соответствует количеству мутаций, обнаруживаемых у отдельных штаммов *N.gonorrhoeae*.

Сопоставление результатов генетического анализа и исследования фенотипической чувствительности *N.gonorrhoeae* к АМП выявило четыре варианта, формирующие, суммарно, 89,1% от всей анализируемой выборки (Таблица 30). Наиболее многочисленным являлся вариант, ассоциированный с чувствительностью ко всем использованным антибиотикам (47 штаммов) и характеризуемый мутационным профилем дикого типа (18 штаммов) либо наличием одиночной мутации ins345Asp в гене *penA*. Среди монорезистентных паттернов доминировали штаммы со сниженной чувствительностью к пенициллину (МИК  $\geq 0,12$  мг/л; 22 штамма), типично имеющие единственную мутацию в гене *penA*. В свою очередь, наиболее многочисленные группы *N.gonorrhoeae* с отсутствием чувствительности к 2 или 3 антибиотикам были представлены паттернами «пенициллин + ципрофлоксацин» (22 штамма) и «пенициллин + тетрациклин + ципрофлоксацин» (23 штамма), характеризуемыми наличием множественных мутаций в генах, кодирующих «мишени» для данных антибиотиков.



**Таблица 30.** Фенотипическая чувствительность к АМП и ее соответствие мутационным профилям *N.gonorrhoeae*

Паттерны чувствительности*	Кол-во штаммов, ед.(%)	Мутационный профиль					
		Наличие мутаций в генах					Нет мутаций (дикий тип)
		<i>penA</i>	<i>ponA</i>	<i>rpsJ</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	
Чувствительны к 6 антибиотикам	47 (36,7)	25	2	2	1	1	18
Нечувствительны к 1 антибиотику:							
Пен	23 (18,0)	22	1	4	3	2	1
Тет	2 (1,6)	-	-	-	-	-	2
Спек	1 (0,8)	-	-	-	-	-	1
Ази	1 (0,8)	1	-	-	-	-	-
Цип	1 (0,8)	1	-	-	-	-	-
Нечувствительны к 2 антибиотикам:							
Пен+Тет	2 (1,6)	2	1	1	-	1	-
Пен+Цип	22 (17,2)	22	20	20	21	20	-
Спек+Ази	1 (0,8)	1	-	1	-	-	-
Нечувствительны к 3 антибиотикам:							
Пен+Тет+Цип	23 (18,0)	21	18	19	20	17	1
Пен+Цеф+Цип	1 (0,8)	1	-	-	-	-	-
Нечувствительны к 4 антибиотикам:							
Пен+Тет+Ази+Цип	4 (3,1)	3	3	2	2	2	1

\* чувствительными считались штаммы, оцененные как S (susceptible) по критериям CLSI и EUCAST; нечувствительными считались штаммы, оцененные как I (intermediate) и R (resistant).

Следует отметить наличие единичных изолятов, отличающихся высоким уровнем фенотипической чувствительности при наличии множественных мутаций (1 штамм), либо устойчивостью к 3-4 препаратам при мутационном профиле, соответствующем дикому типу (2 штамма). Подобный результат свидетельствует о существовании иных, неучтенных при выполнении настоящего исследования механизмах устойчивости *N.gonorrhoeae* к антибиотикам, одновременно позволяя объяснить большинство выявленных паттернов их фенотипической чувствительности именно мутационными профилями в генах, кодирующих мишени для АМП.

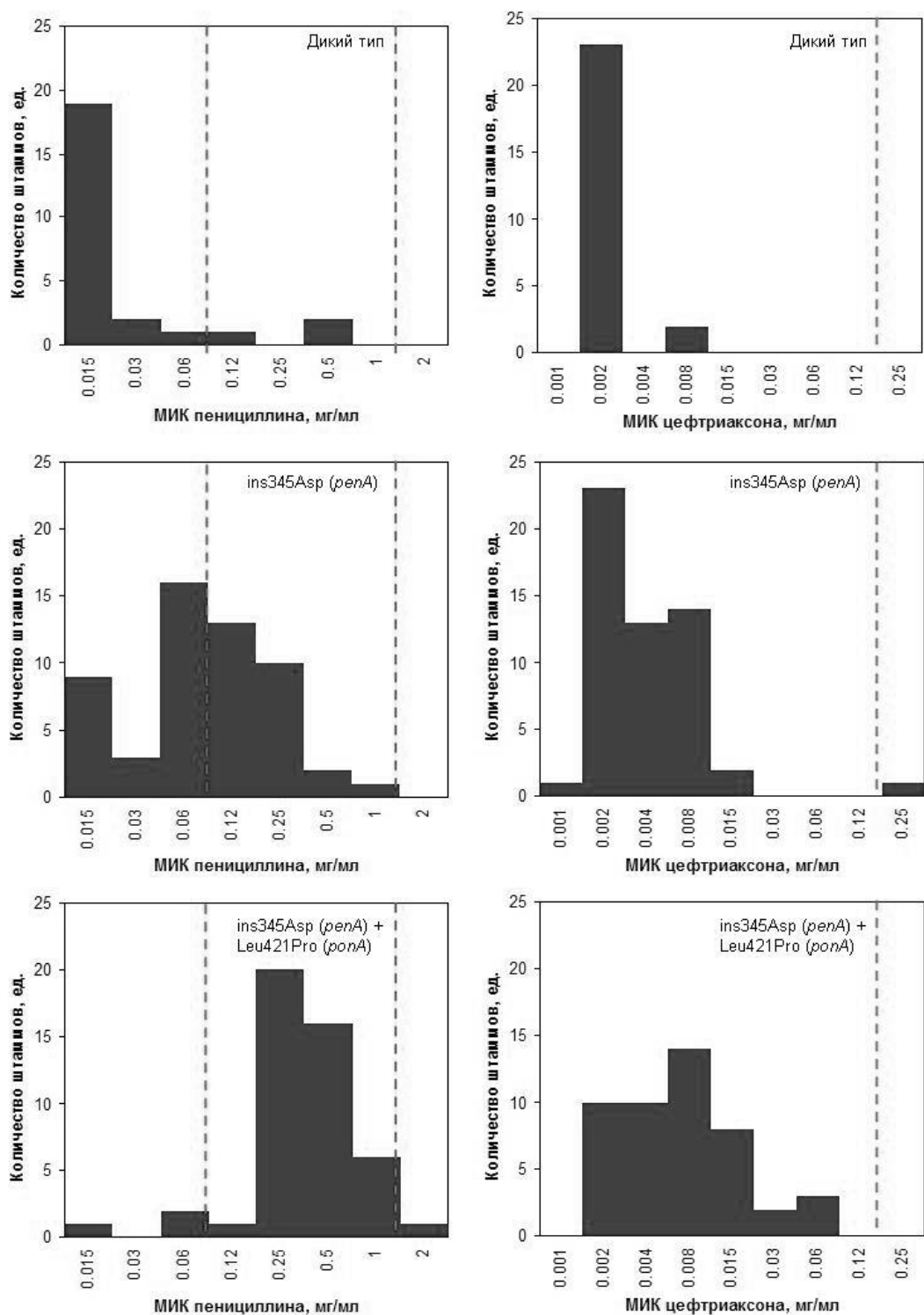
Множественный корреляционный анализ взаимосвязей между генетическими и фенотипическими характеристиками *N.gonorrhoeae* показал, что резистентность к пенициллину менее выражено коррелировала с наличием мутации в гене *penA* ( $r = 0,26$ ) и значительно - с мутацией в гене *ponA* ( $r = 0,56$ ), что хорошо согласуется с

представлениями о важности изменения кодируемых ими пенициллин-связывающих белков в развитии устойчивости к данному антибиотику (Brannigan et al., 1990, Ropp et al., 2002). При этом анализ распределений МИК пенициллина свидетельствовал о статистически значимых ( $P < 0,01$ ) различиях между штаммами дикого типа и *N.gonorrhoeae*, несущими мутацию ins345Asp(*penA*), а одновременное присутствие двух мутаций ins345Asp(*penA*) + Leu421Pro (*ponA*) еще более смещало значения МИК в зону высоких значений (Рис. 50).

Одновременно следует отметить, что воздействие данных мутаций на распределение МИК цефтриаксона также было сонаправленным (Рис. 50), что свидетельствует в пользу значимости ряда ранее накопленных мутаций, кодирующих мишени для пенициллина, в современной эволюции *N.gonorrhoeae*, заключающейся в прогрессирующем снижении чувствительности к цефалоспорином III поколения (Wi et al., 2017).

Другая значимая группа коэффициентов корреляции была установлена между устойчивостью к ципрофлоксацину и детерминантами Ser91Phe(*gyrA*) ( $r = 0,59$ ), Asp95Gly(*gyrA*) ( $r = 0,55$ ) и Ser87Arg (*parC*) ( $r = 0,51$ ), что соответствует данным о множественных мутациях в системе репликации ДНК как важном механизме устойчивости *N.gonorrhoeae* к фторхинолонам (Vernel-Pauillac et al., 2009, Shaskolskiy et al., 2016).

С другой стороны, связь устойчивости к тетрациклину с наличием точечных мутаций Val57Met и Val57Leu в гене *rpsJ* характеризовалась статистически незначимыми коэффициентами корреляции, предположительно объясняемыми их относительной недостаточностью в отсутствие аддитивных мутаций в генах *mtrR* и *penB* (Shaskolskiy et al., 2016). В свою очередь, отсутствие статистически значимых коэффициентов корреляции между исследованными генетическими детерминантами и устойчивостью к спектиномицину и азитромицину может объясняться отсутствием в перечне исследуемых детерминант мутаций в генах 16S РНК (Pina et al., 2013; Nabu et al., 2014) и 23S РНК (Jacobsson et al., 2016), определяющих формирование резистентности к данным антибиотикам через изменение тонкой структуры бактериальной рибосомы.



**Рис. 50.** Распределение значений МИК пенициллина (слева) и цефтриаксона (справа) в отношении изолятов *N.gonorrhoeae* дикого типа (верхний ряд), несущих мутацию *ins345Asp(penA)* (средний ряд) или совокупность мутаций *ins345Asp(penA) + Leu421Pro(ponA)* (нижний ряд).

Следует также отметить немалые значения коэффициентов корреляции (0,70 – 0,91), связывающие между собой мутации *Leu421Pro(ponA)*, *Val57Met/Leu(rpsJ)*, *Ser91Phe(gyrA)*, *Asp95Gly(gyrA)* и *Ser87Arg(parC)*, что свидетельствует о высокой

вероятности их совместного присутствия в бактериальной хромосоме ряда проанализированных штаммов.

Проведенный статистический анализ подтверждает характерность одновременного присутствия в хромосоме ряда штаммов *N.gonorrhoeae* множественных мутаций в генах, кодирующих «мишени» для антибиотиков, следствием которого является бимодальное, отличное от нормального, распределение антибиотикорезистентности в популяции, проявляющееся в существовании нескольких типичных паттернов резистентности возбудителя гонококковой инфекции к антимикробным препаратам. Подобное распределение соответствует представлениям о возможности существования в бактериальных популяциях т.н. «штаммов-гипермутаторов» (Macia et al., 2005), недостаточность систем репарации которых способствует накоплению в бактериальной хромосоме множественных мутаций, что при их локализации в генах, кодирующих «мишени» для антибиотиков, ведет к формированию мультирезистентного фенотипа.

Условием для распространения данного механизма мультирезистентности в популяции *N.gonorrhoeae* представляется клональный характер ее организации, обеспечивающий вертикальную передачу соответствующих хромосомных детерминант при переносе возбудителя гонококковой инфекции по «сексуальным цепям». Иллюстрацией сказанного являются результаты анализа генов *porB* и *tbpB* в системе NG-MAST, позволившего выявить в анализируемой выборке два наиболее многочисленных кластера (группы штаммов с идентичным сиквенс-типом), характеризующиеся альтернативными профилями антибиотикорезистентности (Таблица 31).

**Таблица 31.** Частота обнаружения генетических детерминант антибиотикорезистентности и признаков устойчивости к антимикробным препаратам у *N.gonorrhoeae*, относящихся к NG-MAST типам 807 и 9476.

Анализируемые признаки	Сиквенс-типы <i>N.gonorrhoeae</i>	
	№ (n – количество изолятов в выборке)	
	807 (n=10)	9476 (n=14)
Наличие мутаций		
ins345Asp ( <i>penA</i> )	10 (100%)	14 (100%)
Leu421Pro ( <i>ponA</i> )	-	13 (92,9%)
Val57Met/Leu ( <i>rpsJ</i> )	-	12 (85,7%)
Ser91Phe ( <i>gyrA</i> )	-	14 (100%)
Asp95Gly( <i>gyrA</i> )	-	14 (100%)
Ser87Arg ( <i>parC</i> )	-	14 (100%)
Отсутствие чувствительности к антибиотикам		
Пенициллин	4 (40%)	14 (100%)
Цефтриаксон	-	-
Тетрациклин	-	3 (21,4%)
Спектиномицин	-	-
Азитромицин	-	-
Ципрофлоксацин	-	14 (100%)

Штаммы, относящиеся к распространенному в России (Kubanova et al., 2014), Белоруссии (Lebedzeu et al., 2015) и Казахстане (Kushnir et al., 2012) сиквенс-типу 807, типично несли одиночную мутацию в гене *penA*, следствием которой являлась сниженная чувствительность к пенициллину, у 4 из 10 исследованных штаммов соответствующая критерию «промежуточная чувствительность» (МИК = 0,12 мг/л). С другой стороны, представители сиквенс-типа 9476, получившего распространение в Архангельской области РФ как следствие миграции по региональным «сексуальным цепям» (Kubanov et al., 2016), характеризовались одновременным присутствием в хромосомах шести точечных мутаций. В итоге представители данного клона были устойчивы к ципрофлоксацину (МИК от 4 до 16 мг/л), обладали промежуточной резистентностью к пенициллину (0,25 – 1,0 мг/л), а также проявляли сниженную чувствительность к тетрациклину (0,25 – 2,0 мг/л). При этом устойчивость к последнему у двух из 14 изолятов соответствовала критерию «промежуточная», в то время как один штамм обладал высоким уровнем резистентности.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что современная эмпирическая терапия гонококковой инфекции, основанная на преимущественном использовании цефалоспоринов III поколения и формально не ведущая к «селекционному давлению» по генетическим детерминантам,

контролирующим устойчивость к ранее использованным препаратам, не сопровождается их элиминацией из популяции *N.gonorrhoeae*. Одной из возможных причин этого является исторически сформировавшийся мутационный профиль генов, кодирующих мишени для антибиотиков, что соответствует представлениям о существовании в бактериальных популяциях своеобразных «штаммов-гипермутаторов». Их предшествующая молекулярная эволюция привела к накоплению в бактериальной хромосоме множественных детерминант резистентности к антибактериальным препаратам, в результате чего мутационные профили и определяемые ими паттерны антибиотикорезистентности в современной популяции *N.gonorrhoeae* приобрели отличное от нормального статистическое распределение.

Другой важной причиной представляется многофакторный характер феномена антибиотикорезистентности, в котором ряд ранее мутировавших генов является основой для следующего витка молекулярной эволюции, следствием которого может стать полная утрата эффективности антимикробных препаратов в отношении *N.gonorrhoeae*. В частности, это относится к генам *penA* и *ponA*, ранее возникшие мутации в которых оказываются значимыми и в развивающейся устойчивости к цефалоспорином. Дополнительным свидетельством в пользу значимости названных генетических детерминант является чрезвычайно широкое распространение точечной мутации ins345Asp (*penA*) в современной российской популяции *N.gonorrhoeae*, а также типичное присутствие мутации Leu421Pro (*ponA*) в геноме мультирезистентных штаммов. Кроме того, ряд не учтенных в настоящем исследовании хромосомных генов (*penB*, *mtrR*, *porB*), мутации в которых накопились на предыдущих этапах использования антибиотиков, также могут принимать участие в формировании резистентности к цефалоспорином (Shaskolskiy et al., 2016).

Таким образом, мы вправе ожидать возникновения устойчивости к современным антимикробным препаратам в первую очередь среди мультирезистентных штаммов *N.gonorrhoeae*, как это имеет место в странах дальнего

зарубежья на примере сиквенс-типа 1407 (Ohnishi et al., 2011; Unemo et al., 2012; Gianecini et al., 2016). Указанное обстоятельство свидетельствует в пользу актуальности непрерывной системы мониторинга антибиотикорезистентности возбудителя гонококковой инфекции, одним из инструментов которого может стать разработанный метод идентификации генетических маркеров устойчивости на основе гидрогелевого биочипа.

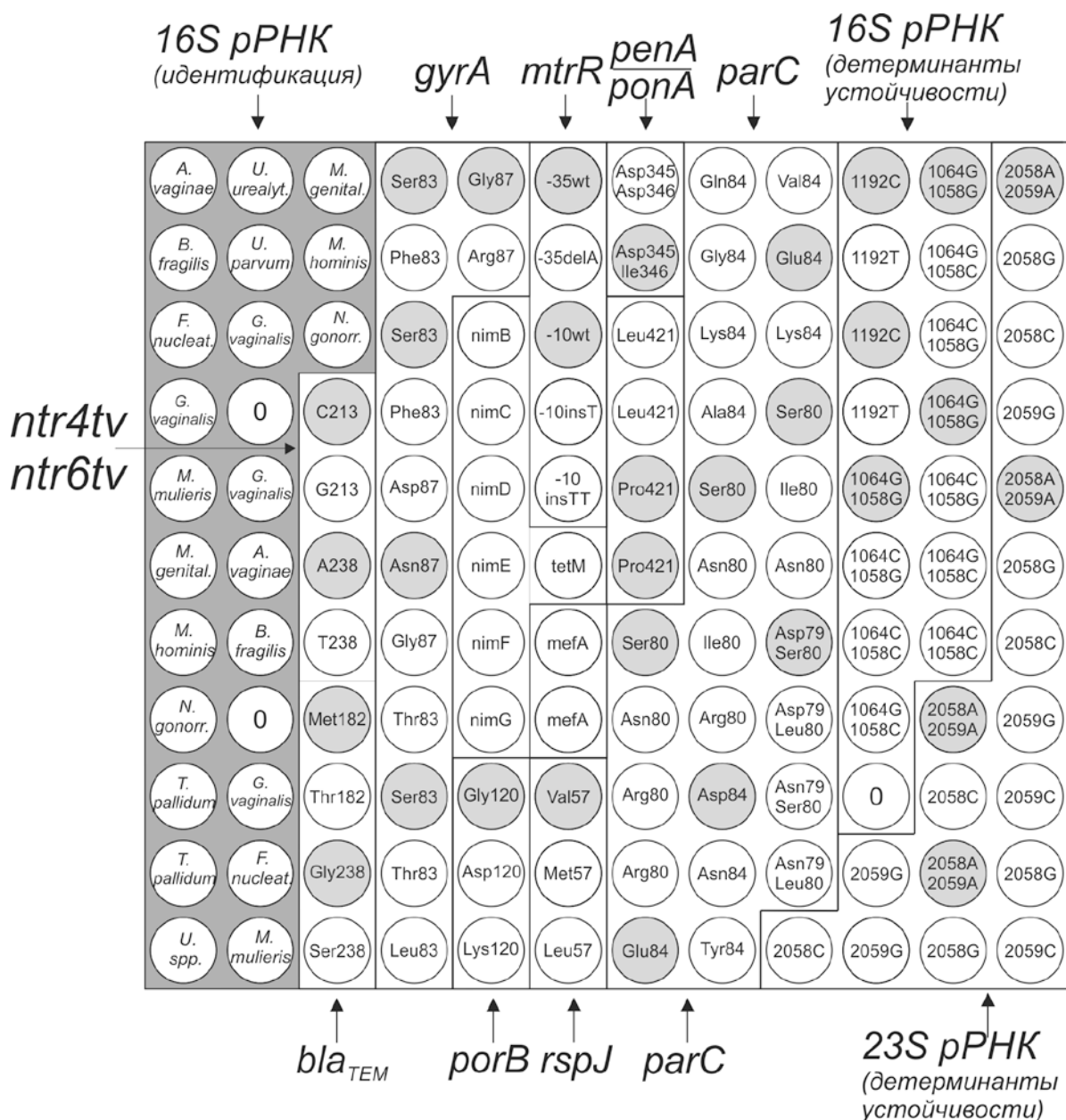
### **3.3.2 Биочип для идентификации генетических детерминант резистентности к антимикробным препаратам возбудителей инфекций репродуктивного тракта**

Разработан метод мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на гидрогелевом биочипе (Рис. 51) для идентификации ДНК 12 различных облигатных и условно-патогенных микроорганизмов – возбудителей ИРТ, в том числе, *N. gonorrhoeae*, *T. pallidum*, *M. genitalium*, *A. vaginae*, *B. fragilis*, *F. nucleatum*, *G. vaginalis*, *M. mulieris*, *M. hominis*, *T. vaginalis*, *U. parvum* и *U. urealyticum*, с одновременным дифференцированным анализом 39 генетических детерминант устойчивости к  $\beta$ -лактамным антибиотикам, макролидам, аминогликозидам, тетрациклинам, спектиномицину, фторхинолонам и нитроимидазолам.

Проведенное нами исследование коллекции изолятов *N. gonorrhoeae* показало необходимость конструирования дополнительного набора зондов для выявления мультирезистентных вариантов возбудителя. С целью идентификации резистентности к расширенному спектру  $\beta$ -лактамных антибиотиков разработаны олигонуклеотиды для идентификации плазмидного гена *bla<sub>TEM</sub>* и замен M182T, G238S в нем, вызывающих появление резистентности к цефалоспорином. В дополнение к анализу замен в кодоне 57 гена *rpsJ*, кодирующего белок S10, разработаны зонды для идентификации плазмидного гена *tetM*, продукт которого связывается с 30S субъединицей рибосомы и вытесняет тетрациклин с его сайта связывания. Для детекции резистентности *N. gonorrhoeae* к макролидам (азитромицину) сконструированы зонды для идентификации замен в гене 23S рРНК - A2059G, ассоциированную с высоким уровнем резистентности, и C2611T, встречающихся в геноме умеренно-резистентных изолятов (Ng et al., 2002). Анализ устойчивости к

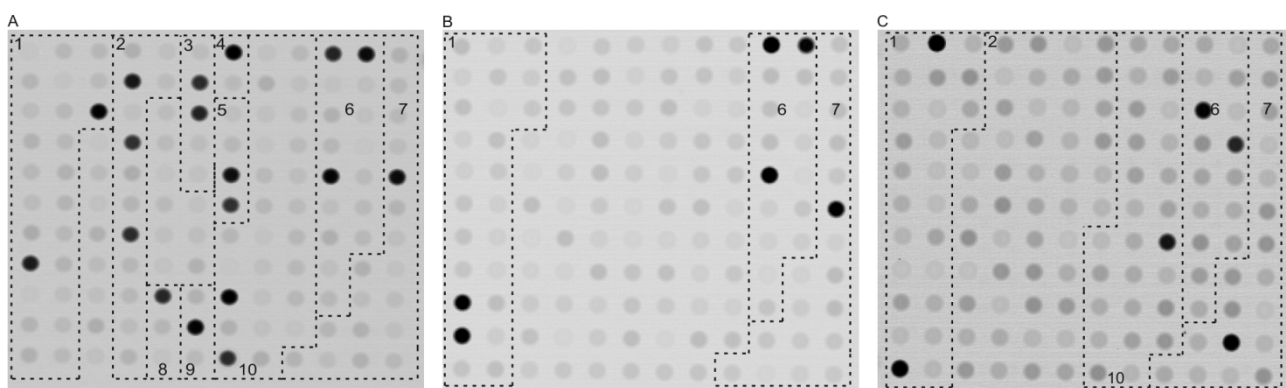
спектиномицину планировали проводить посредством идентификации нуклеотидных замен на участке его связывания с рРНК (ген *rrs*) G1064C, C1192, G1058C. Разработаны зонды для выявления инсерций Т и ТТ в положении -10 и делеции А в положении -35 в промоторной области гена *mtrR*, являющегося репрессором транскрипции *mtrCDE* оперона, ответственного за регуляцию экспрессии помпы эффлюкса MtrC – MtrD – MtrE, выводящей антибиотики из периплазматического пространства клетки. Данные мутации приводят к сверхэкспрессии помпы MtrCDE и повышению резистентности к антибиотикам пенициллинового ряда, тетрациклинам, макролидам, цефалоспорином. Наконец, были сконструированы олигонуклеотиды для выявления замен G120K, G120D/A121D в гене *porB*, продукт которого участвует в транспорте антибиотиков через внешнюю мембрану клетки. Эти детерминанты ассоциированы с устойчивостью *N. gonorrhoeae* к тетрациклинам, а повышение резистентности к β-лактамным антибиотикам (пенициллинам, цефалоспорином) наблюдается при сочетании этих мутаций с мутациями в гене *mtrR* помпы эффлюкса MtrCDE (Olesky et al., 2006).





**Рис. 51.** Схема биочипа для анализа возбудителей ИРТ. Микрочип содержал 129 элементов, содержащих иммобилизованные олигонуклеотидные зонды. Группа из 23 элементов «16S pPHK идентификация» содержала олигонуклеотиды, соответствующие видоспецифичному полиморфизму гена 16S pPHK и предназначенные для идентификации 12 возбудителей ИРТ: *N. gonorrhoeae*, *T. pallidum*, *T. vaginalis*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *A. vaginae*, *G. vaginalis*, *M. mulieris*, *B. fragilis* и *F. nucleatum*. Кластер из 98 элементов включал зонды, специфичные к диким и мутантным вариантам последовательностей генов, являющихся детерминантами резистентности возбудителей ИРТ к АМП и разбитых на ячейки: *penA*, *ponA*, *bla*<sub>TEM</sub> (устойчивость к β-лактамам); *16S pPHK*, *rpsJ*, *tetM* (устойчивость к тетрацикламам); *23S pPHK*, *mefA* (устойчивость к макролидам); *gyrA*, *parC* (устойчивость к фторхинолонам); *nimB-G* и *ntr4tv/ntr6tv* (устойчивость к метронидазолу у про- и эукариот, соответственно). Еще 8 элементов биочипа содержали зонды, предназначенные для идентификации генетических детерминант *porB* и *mtrR*, участвующих в эффлюксе антибиотиков и ассоциированных с резистентностью микроорганизмов к нескольким классам АМП. В группах ячеек, выявляющих мутации, элементы, содержащие олигонуклеотиды дикого типа, выделены серым цветом. Нумерация полиморфизмов для генов *penA*, *ponA*, *rpsJ*, *porB* приведена для *N. gonorrhoeae*; *ntr4tv* и *ntr6tv* – *T. vaginalis*; всех остальных – *E. coli*.

Выделение ДНК из клинических изолятов, амплификацию в мультиплексной ПЦР с праймерами к последовательностям целевых генов, флуоресцентное маркирование продуктов амплификации и их гибридизацию на ДНК-чипах проводили в соответствии с описанными схемами и режимами (Leinsoo et al., 2016; Лейнсоо и др., 2017). Видовую принадлежность анализируемой ДНК устанавливали по флуоресценции ячеек с олигонуклеотидами, соответствующими видоспецифичному полиморфизму гена 16S рРНК, согласно описанному выше алгоритму. Детерминанты резистентности к АМП идентифицировали по наибольшему сигналу флуоресценции элементов, содержащих олигонуклеотиды дикого и мутантного вариантов каждого гена. Обнаружение генов - маркеров резистентности (*tetM*, *mefA*, *nimB-G* и т.д.) проводили на основе превышения порогового значения флуоресценции в значимой ячейке в сравнении со средним значением сигнала в ячейках пустого геля. Примеры гибридизационных картин представлены на Рис. 52.



**Рис. 52.** Гибридизационные картины, полученные при анализе ДНК изолятов *N. gonorrhoeae* (А), *T pallidum* (В), *U. urealyticum* (С). Цифрами обозначены группы элементов биочипа, содержащие зонды к полиморфизмам: 1 – 16S рРНК (для идентификации), 2 – *gyrA*, 3 – *mtrR*, 4 – *penA*, 5 – *ronA*, 6 – 16S рРНК (детерминанты резистентности), 7 – 23S рРНК, 8 – *porB*, 9 – *gpsJ*, 10 – *parC*.

А) В образце ДНК *N. gonorrhoeae* найдены мутации: S91F+D95G в гене *gyrA* (S83F и D87G в нумерации *E. coli*), -35delA в промоторе гена *mtrR*, insD345 в гене *penA*, S87R в гене *parC* (S80R в нумерации *E. coli*).

В) В образце ДНК *T pallidum* обнаружена мутация A2058G в гене 23S рРНК.

С) Последовательность генов 23S рРНК, *parC* и 16S рРНК образца ДНК *U. urealyticum* относится к дикому типу.

С использованием разработанного биочипа проведено исследование 180 образцов ДНК, в том числе, 25 образцов ДНК из мазков урогенитального

тракта. В девяти образцах была обнаружена ДНК *A. vaginae*, в одном образце – *F. nucleatum*, в семнадцати – *G. vaginalis*, в трёх – *M. mulieris*, в одном – *M. genitalium*, в восьми – *M. hominis*, в одном – *T. vaginalis*, в десяти – *U. parvum*, в семи – *U. urealyticum*. Девятнадцать образцов содержали смеси, из них четыре – *G. vaginalis* и *U. parvum*, два – *G. vaginalis* и *M. hominis*, два – *A. vaginae*, *G. Vaginalis*, *U. parvum*. Остальные образцы содержали следующие смеси: *G. vaginalis* и *U. urealyticum*; *U. parvum* и *U. urealyticum*; *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum*; *A. vaginae*, *F. nucleatum*, *M. mulieris*, *M. hominis*; *A. vaginae*, *G. vaginalis*, *U. parvum*; *A. vaginae*, *G. vaginalis*, *U. urealyticum*; *A. vaginae*, *G. vaginalis*, *M. mulieris*, *U. parvum*; *A. vaginae*, *M. mulieris*, *M. hominis*, *U. parvum*; *A. vaginae*, *G. vaginalis*, *M. hominis*, *U. urealyticum*; *A. vaginae*, *G. vaginalis*, *M. hominis*, *U. urealyticum*; *G. vaginalis*, *M. hominis*. В образце ДНК *T. vaginalis* были обнаружены полиморфизмы C213G и A238T в генах *ntr4tv* и *ntr6tv*, ассоциированные с устойчивостью к метронидазолу (Paulish-Miller et al., 2014). ДНК других обнаруженных микроорганизмов относили к дикому типу согласно исследованию последовательностей целевых локусов на биочипе.

При анализе ДНК 93 штаммов *N. gonorrhoeae*, 32 клинических изолятов *T. pallidum* и 29 монокультур или ассоциаций *Ureaplasma spp.* / *Mycoplasma spp.*, образца *T. vaginalis* результаты их видовой идентификации на микрочипе полностью совпали с результатами, предварительно полученными с использованием референс-методов. Чувствительность метода в отношении идентификации микроорганизмов составила 87%, специфичность - 96%.

Большая часть (31 из 32) клинических изолятов *T. pallidum* была отнесена к категории дикого типа, что согласуется с ранее полученными данными о низкой частоте распространения генетических детерминант резистентности к антибиотикам в российской популяции возбудителя сифилиса (Khairullin et al., 2016). На этом фоне у одного изолята была идентифицирована одиночная мутация A2058G в гене 23S рРНК (Рис. 52В), определяющая резистентность к макролидам и подтвержденная результатами секвенирования целевого гена. В

случае штаммов дикого типа расхождений между результатами гибридизации и секвенирования генов 16S рРНК и 23S рРНК найдено не было.

Разработанным методом было проанализировано 29 образцов ДНК, выделенной из клинических изолятов *U. spp.* и *M. hominis*. Было обнаружено 5 изолятов с сочетанной инфекцией (*U. spp.* + *M. Hominis*) и 24 изолята с моноинфекцией, 12 из которых содержали *U. urealyticum* (Рис. 52С) и 12 – *U. parvum*. Большинство изолятов были чувствительны к АМП согласно микробиологическим тестам, однако для 5 изолятов с сочетанной инфекцией, 1 изолята *U. urealyticum* и 2 изолятов *U. parvum* МИК азитромицина составляла 4 мг/л. Два образца с сочетанной инфекцией, 3 штамма *U. urealyticum* и 2 штамма *U. parvum* имели МИК ципрофлоксацина 2 мг/л. Наконец, у двух образцов с сочетанной инфекцией МИК доксициклина составила 8 мг/л; при этом все изоляты были чувствительны к тетрациклину. В то же время, анализ на биочипах показал отсутствие мутаций в генах 23S рРНК, 16S рРНК, *parC* у всех изолятов, т.е. все они были отнесены к дикому типу. Возможными объяснениями полученных расхождений могут быть (а) неизвестные механизмы формирования резистентности и соответствующие генетические детерминанты (Munoz and Goje, 2016, Beeton and Spiller, 2017); б) ассоциация исследуемых нуклеотидных/аминокислотных замен в обозначенных локусах с более высокими значениями МИК. Например, показано, что для *M. genitalium* мутация A2059G в 23S рРНК приводит к повышению МИК по азитромицину от 8 мг/л и более (Jensen et al., 2014).

При тестировании образцов ДНК *N. gonorrhoeae* (Рис. 52А) различные генетические детерминанты и их сочетания, определяющие устойчивость к АМП, были детектированы у 76 штаммов (82%), в то время как принадлежность к дикому типу зарегистрирована у 17 (18%) клинических изолятов. В целом, для трети исследованных штаммов *N. gonorrhoeae* было характерным одновременное присутствие в хромосоме множественных детерминант резистентности.

Наиболее высокой частотой распространения в исследуемой выборке *N. gonorrhoeae* характеризовалась инсерция в гене *penA*, приводящая к появлению аспартата в положении 345 и снижающая аффинность взаимодействия кодируемого пенициллин-связывающего белка РВР2 с бета-лактамными антибиотиками (мутация обнаружена у 75 из 93 тестированных штаммов, 81%). Сопоставление результатов гибридизации с результатами фенотипического анализа свидетельствовало об относительно низкой предсказательной ценности обнаружения одиночной мутации *insD345*, прогнозирующей развитие устойчивости *N. gonorrhoeae* к пенициллину с уровнем значимости не более 0,380 ( $\chi^2=0,769$ ) (Таблица 32). При этом одновременное обнаружение данной мутации вместе с заменой Leu421Pro в гене *ponA* и, особенно, при их сочетании с делецией аденина в позиции -35 промоторной области гена *mtrR* существенно повышало предсказательную ценность разработанного метода, позволяя дифференцировать чувствительные и устойчивые к пенициллину штаммы с уровнем значимости 0,054 и  $<0,001$  ( $\chi^2=3,701$  и 16,749, соответственно). Следует отметить также, что ни в одном образце анализируемой выборки не был найден ген *bla<sub>TEM</sub>* плазмидной локализации, также наделяющий возбудителя гонореи устойчивостью к  $\beta$ -лактамным антибиотикам.

При анализе детерминант устойчивости *N. gonorrhoeae* к тетрациклинам принадлежность к дикому типу констатирована у 57 из 93 исследованных штаммов (61%), в то время как остальные несли мутацию V57M в гене *rpsJ*. Идентификация только указанной мутации не позволяла достоверно прогнозировать устойчивость *N. gonorrhoeae* к тетрациклинам (уровень значимости 0,187;  $\chi^2=1,737$ ), что становилось возможным (уровень значимости  $<0,001$ ;  $\chi^2=31,601$ ) при обнаружении ее сочетания с мутацией в гене *mtrR*. Ни в одном из изолятов не было найдено гена *tetM*, являющегося генетическим маркером устойчивости высокого уровня (МИК  $> 1$  мг/л).

**Таблица 32.** Соответствие между генетическими детерминантами резистентности к АМП для *N. gonorrhoeae* и фенотипической чувствительностью (МИК); предсказательная ценность анализа на биочипе.

Детерминанты резистентности к АМП	Количество изолятов, характеризуемых значениями МИК (мг/л)																Предсказательная ценность генетических детерминант резистентности	
	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	P	$\chi^2$
<b>Пенициллин</b>																		
Дикий тип					14	1		1		2								
<i>penA</i> <sub>insD345</sub>					8	3	13	7	8	1	1						<b>0,380</b>	<b>0,769</b>
<i>penA</i> <sub>insD345</sub> <i>ponA</i> <sub>L421P</sub>							2		11	6	2						<b>0,054</b>	<b>3,701</b>
<i>penA</i> <sub>insD345</sub> <i>ponA</i> <sub>L421P</sub> <i>mtrR</i> <sub>-35delA</sub>									2	7	3	1					<b>&lt;0,001</b>	<b>16,749</b>
Всего					22	4	15	8	21	16	6	1						
<b>Тетрациклин</b>																		
Дикий тип							13	13	15	10	2	2		1	1			
<i>rpsJ</i> <sub>V57M</sub>							1		1	16	4	1					<b>0,187</b>	<b>1,737</b>
<i>rpsJ</i> <sub>V57M</sub> <i>mtrR</i> <sub>-35delA</sub>										2	2	7	2				<b>&lt;0,001</b>	<b>31,601</b>
Всего							14	13	16	28	8	10	2	1	1			
<b>Ципрофлоксацин</b>																		
Дикий тип	14	25	13	1	1	1			3			1		1				
<i>gyrA</i> <sub>D87G</sub> или <i>gyrA</i> <sub>D87G</sub> <i>parC</i> <sub>S80R</sub> или <i>parC</i> <sub>S80R</sub>		1	1	1	1												<b>0,746</b>	<b>0,105</b>
<i>gyrA</i> <sub>S83F+D87N</sub> или <i>gyrA</i> <sub>S83F</sub> ;												1	1				<b>&lt;0,001</b>	<b>29,466</b>
<i>gyrA</i> <sub>S83F+D87G</sub> <i>parC</i> <sub>S80R</sub> или <i>gyrA</i> <sub>S83F+D87N</sub> <i>parC</i> <sub>E84G</sub>												5	14	6		2	<b>&lt;0,001</b>	<b>77,355</b>
Всего	14	26	2	2	1	1			3			7	15	7	2	2		

Примечание: вертикальной чертой разделены зоны МИК, характеризующие чувствительные (слева) и устойчивые (справа) фенотипы

p-вероятность обнаружения чувствительных штаммов с указанными детерминантами резистентности

Принадлежность к штаммам дикого типа достаточно строго коррелировала с чувствительностью *N. gonorrhoeae* к фторхинолонам, в то время как наличие единичных и множественных мутаций в генах *gyrA* и *parC* с различной степенью эффективности позволяло предсказывать устойчивость к данной группе АМП. Замены D87G в *gyrA*, S80R в *parC* и их сочетание не имели прогностической ценности, обнаруживаясь только среди чувствительных фенотипов. С другой стороны, мутации S83F и S83F+D87G в гене *gyrA*, а также их сочетания с мутациями в гене *parC* строго соотносили указанные генотипы с резистентными фенотипами (уровень значимости  $<0,001$ ;  $\chi^2=29,466$  и  $77,355$  соответственно).

Молекулярно-генетический анализ детерминант резистентности к цефтриаксону по генам *penA*, *ponA* и *mtrR* показал, что фенотипическая чувствительность изолятов с заменами в данных локусах в целом ниже, чем у образцов дикого типа. Тем не менее, чтобы сделать заключение об идентификации истинных маркеров резистентности к цефалоспорином, необходимо анализировать больше геномных мишеней, в первую очередь, мозаичный аллель гена *penA* (Kubanov et al., 2014).

В рассматриваемой выборке не было обнаружено образцов с мутациями в положении 2058 и 2059 гена 23S рРНК, ассоциированных с устойчивостью к азитромицину, в том числе в двух устойчивых (МИК = 1 мг/л) к этому препарату изолятах. В одном из них была выявлена делеция -35delA в гене *mtrR*, однако данный полиморфизм наблюдался и среди 20 чувствительных к азитромицину образцов. Ни в одном образце не была обнаружена замена в положении -10 промотора гена *mtrR*.

Все изоляты *N. gonorrhoeae* были охарактеризованы как фенотипически чувствительные к спектиномицину и, в то же время, определялись на биочипах как дикий тип в положении 1192 гена 16S рРНК. Анализ гена *porB* также не выявил мутаций G120K/L.

В целом, полученные результаты хорошо согласовывались с представлениями о широком распространении генетических детерминант

резистентности в российской популяции *N. gonorrhoeae* (Iina et al., 2008; Kubanov et al., 2016), а также подтверждали аддитивный эффект анализируемых мутаций в определении устойчивости к АМП (Iina et al., 2008; Shaskolskiy et al., 2016). В свою очередь, практически-ориентированный аспект полученного результата определялся возможностью высокоточного прогнозирования резистентных фенотипов *N. gonorrhoeae* на основе генетического тестирования на олигонуклеотидном биочипе в дополнение к фенотипическим методам определения чувствительности к пенициллинам, тетрациклинам и фторхинолонам, а в перспективе (при дальнейшем расширении и уточнении перечня анализируемых детерминант резистентности) – и к современным АМП: цефалоспорином III поколения и аминоциклитолам.

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало перспективы использования технологии гидрогелевых олигонуклеотидных биочипов, успешно применяющейся в настоящее время для анализа возбудителя туберкулеза (Gryadunov et al., 2011; Nosova et al., 2016; Zimenkov et al., 2016), и для решения аналогичных задач в лабораторной диагностике ИРТ. При этом достигнутые результаты включают высокую чувствительность и специфичность идентификации наиболее распространенных возбудителей ИРТ, а также предсказательную эффективность обнаружения генетических детерминант их резистентности к АМП, в рамках настоящего исследования наиболее комплексно продемонстрированную на примере *N. gonorrhoeae*. Дальнейшее развитие предложенного подхода, связанное с расширением спектра детектируемых возбудителей ИРТ и анализируемых маркеров их резистентности, а также проведением развернутых клинико-лабораторных испытаний биочипа, в перспективе должно позволить на единой технологической платформе решать весь спектр задач лабораторной диагностики данной этиологически разнообразной и часто резистентной к терапии группы заболеваний.

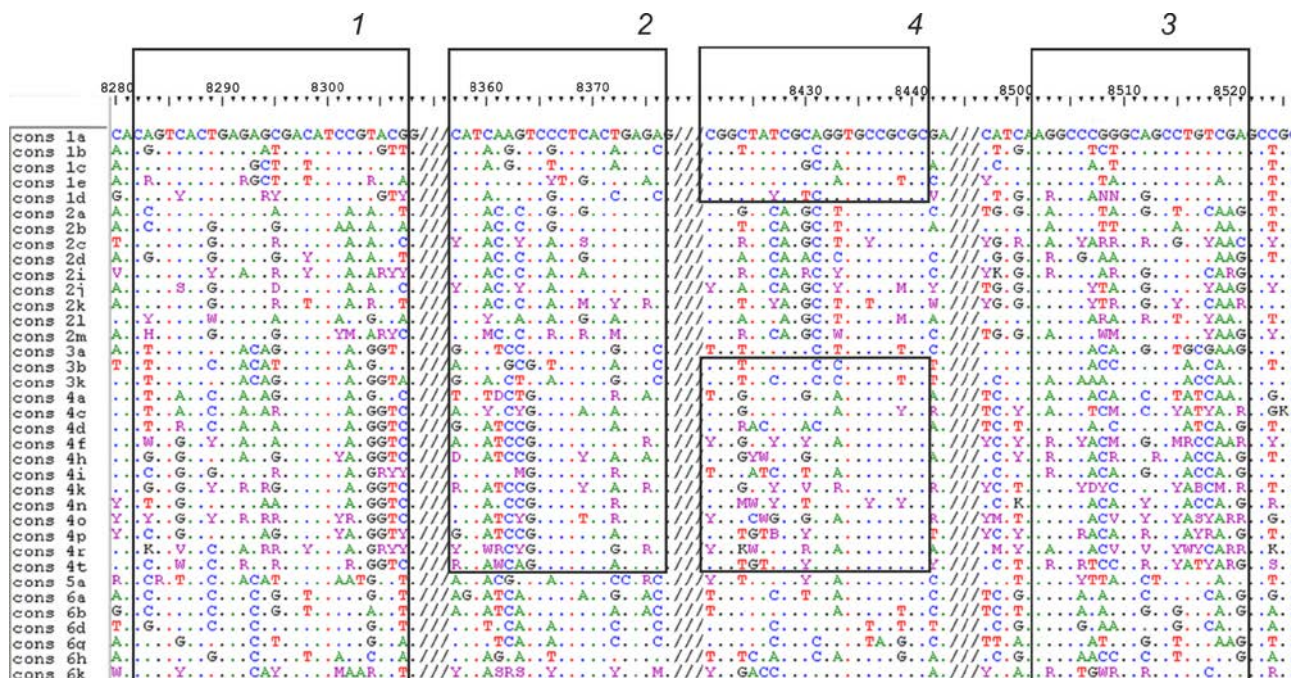


### **3.4 Определение генотипа и подтипа вируса гепатита С на основе анализа области NS5B вирусного генома**

Предложен метод идентификации 6 (1-6) генотипов и 36 (1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 2a, 2b, 2c, 2d, 2i, 2j, 2k, 2l, 2m, 3a, 3b, 3k, 4a, 4c, 4d, 4f, 4h, 4i, 4k, 4n, 4o, 4p, 4r, 4t, 5a, 6a, 6b, 6d, 6g, 6h, 6k) подтипов ВГС посредством анализа генотип- и подтип-специфичных последовательностей области NS5B генома ВГС на гидрогелевом биочипе (Gryadunov et al., 2012; Грядунув и др., 2013). Процедура анализа включала обратную транскрипцию РНК ВГС, совмещенную с ПЦР, с целью амплификации и флуоресцентного маркирования области NS5B с последующей гибридизацией полученного фрагмента на биочипе, регистрацию и интерпретацию полученных результатов.

В силу высокой вариабельности последовательности региона NS5B с целью повышения надежности метода для каждого генотипа и подтипа выбирали по возможности несколько дискриминирующих олигонуклеотидов, комплементарных различным участкам исследуемого сегмента генома ВГС. Для каждого генотипа и подтипа создавали консенсусную последовательность региона NS5B на основе базы данных геномов ВГС, секвенированных в Лаборатории вирусологии Госпиталя Университета г. Тулузы (Франция, <http://www.chu-toulouse.fr/-laboratoire-de-virologie>), доступных в GenBank последовательностей геномов ВГС и базы последовательностей ВГС в Лос Аламосской лаборатории (Kuiken et al., 2008). При этом если последовательность генотип-специфичного олигонуклеотида являлась уникальной и позволяла однозначно идентифицировать генотип, то в случае подтипов последовательность одного зонда могла соответствовать сразу двум и более подтипам в отдельном дифференцирующем участке исследуемого фрагмента области NS5B благодаря высокой гомологии (85% и более) между подтипами одного генотипа. Подтип-специфичные олигонуклеотиды были объединены в группы, соответствующие выбранным участкам исследуемого фрагмента NS5B (Рис. 53), позволяющим дифференцировать максимальное число подтипов. Количество групп варьировало от 1 до 4 в зависимости от

степени гомологии последовательностей фрагмента NS5B различных подтипов. Таким образом, число олигонуклеотидов на биочипе (Рис. 54А) было оптимизировано для надежной идентификации каждого генотипа и подтипа ВГС.



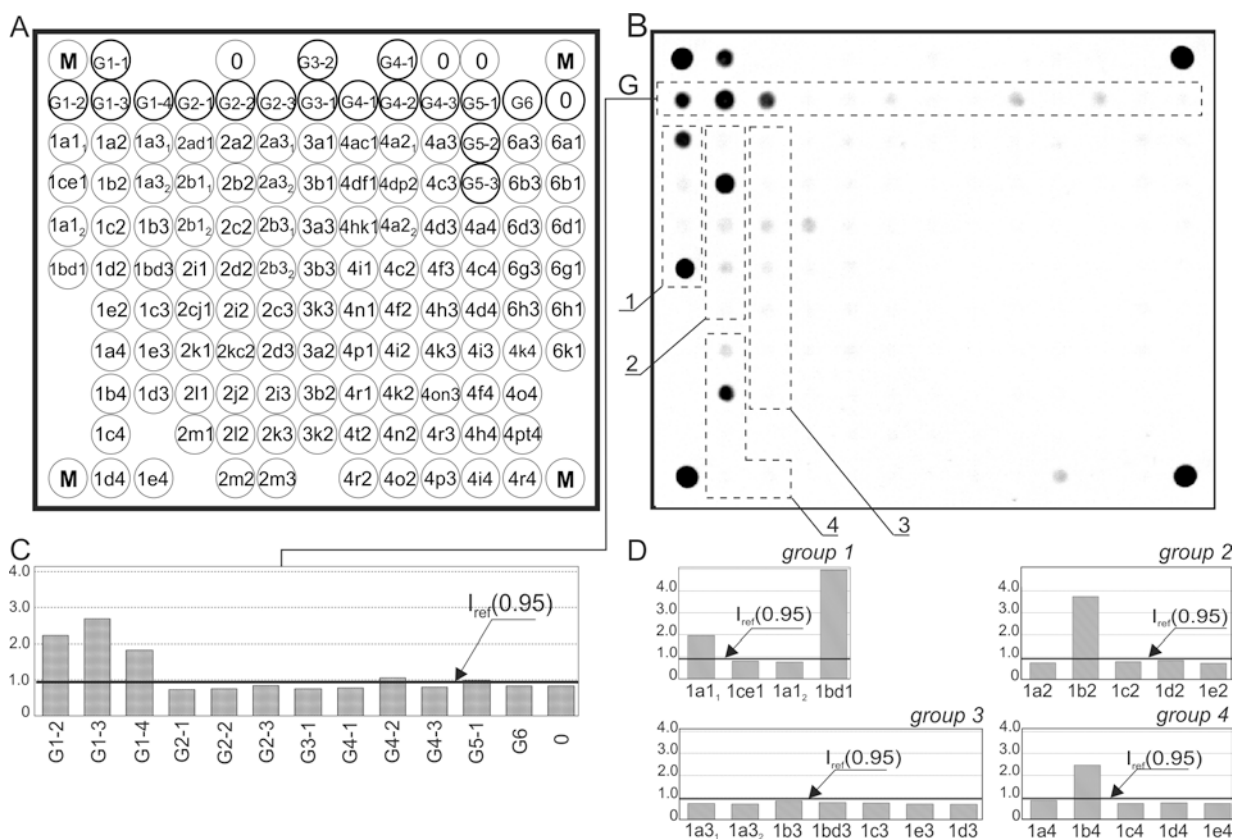
**Рис. 53.** Множественное выравнивание подтип-специфичных консенсусных последовательностей области NS5B. Подтипы приведены в левой колонке. Нуклеотиды, совпадающие с консенсусной последовательностью подтипа 1a приведены точками. Нумерация приведена относительно референсной последовательности H77 подтипа 1a (GenBank Acc No NC\_004102). Положения сегментов области NS5B, использованных для конструирования подтип-специфичных зондов, выделены контуром. Номер сегмента соответствует номеру группы и назначению подтип-специфичного зонда. Для надежной идентификации каждого из подтипов внутри генотипа 1 (1a, 1b, 1c, 1d, 1e) сконструировано 4 группы олигонуклеотидов. Для надежной идентификации каждого из подтипов 2a, 2b, 2c, 2d, 2i, 2j, 2k, 2l, 2m внутри генотипа 2 сконструировано 3 группы олигонуклеотидов. Для надежной идентификации каждого из подтипов 3a, 3b, 3k генотипа 3 сконструировано 3 группы зондов. Для идентификации подтипов 4a, 4c, 4d, 4f, 4h, 4i, 4k, 4n, 4o, 4p, 4r, 4t внутри генотипа 4 сконструировано 4 группы олигонуклеотидов. Генотип 5 представляет собой единственный подтип 5a, тем самым зонды, идентифицирующие генотип, выявляют и подтип 5a.. Для надежной идентификации каждого из подтипов 6a, 6b, 6d, 6g, 6h, 6k генотипа 6 сконструировано 2 группы зондов.

Разработан алгоритм интерпретации результатов гибридизации на биочипах, включающий следующие стадии. На первом этапе проводили выделение достоверных сигналов, т.е. сигналов в ячейках, где возможно образование совершенных дуплексов. Для этого нормированные сигналы интенсивности флуоресценции всех ячеек биочипа сортировали по возрастанию и сравнивали с усредненным сигналом ( $I_{ref}$ ) в ячейках, не содержащих

олигонуклеотидов. Достоверными сигналами считали такие, которые превосходили  $I_{ref}$ , по меньшей мере, в 2,0 раза. Второй этап начинали с анализа отфильтрованных достоверных сигналов  $G_i$  в группах ячеек, содержащих олигонуклеотиды, специфичные к различным генотипам ( $i$ -номер генотипа). Выделяли максимальный сигнал внутри каждой группы ячеек  $G_{imax}$  и сравнивали между собой. Если сигнал  $G_{imax}$  в одной группе превосходил максимальные сигналы в остальных группах более, чем в 1,5 раза (пороговое значение), то делали заключение о принадлежности исследуемого образца к данному генотипу. В случае, если отношение сигналов среди  $G_{imax}$  не превышало порогового значения, то считали, что однозначная идентификация генотипа невозможна и в анализируемом образце предположительно присутствовала смесь двух и более вариантов ВГС с различными генотипами. Если сигналы в группах, содержащих генотип-специфичные олигонуклеотиды, не проходили первичную фильтрацию относительно  $I_{ref}$ , то делали заключение о низкой интенсивности сигналов и возможном отсутствии РНК ВГС в исследуемом образце. При этом идентификацию подтипа не проводили.

Таким образом, если был определен генотип на основании значения сигнала  $G_{imax}$ , то далее рассматривали только группы ячеек, содержащих олигонуклеотиды, специфичные к подтипам, относящимся к идентифицированному генотипу. В соответствии с предложенной стратегией выбора зондов для идентификации подтипа, олигонуклеотиды объединены в группы числом от 1 до 4, соответствующие выбранным участкам исследуемого фрагмента NS5B, позволяющим дифференцировать максимальное число подтипов. При идентификации подтипа сначала выбирали сигналы внутри каждой группы ячеек, превосходящие остальные сигналы в этой группе, по меньшей мере, в 1,5 раза, такой сигнал обозначали как  $S_{ixj}$  (при этом  $i$ - номер генотипа, 'x' - символьное обозначение подтипа, в соответствии с принятой классификации подтипов ВГС,  $j$  – номер группы). В случае, если в группе две и более ячейки обладали сигналами, различающимися между собой менее, чем в 1,5 раза, то выбирали все такие сигналы  $S_{ixj}$ ,  $S_{iyj}$ , и т.д. В результате получали

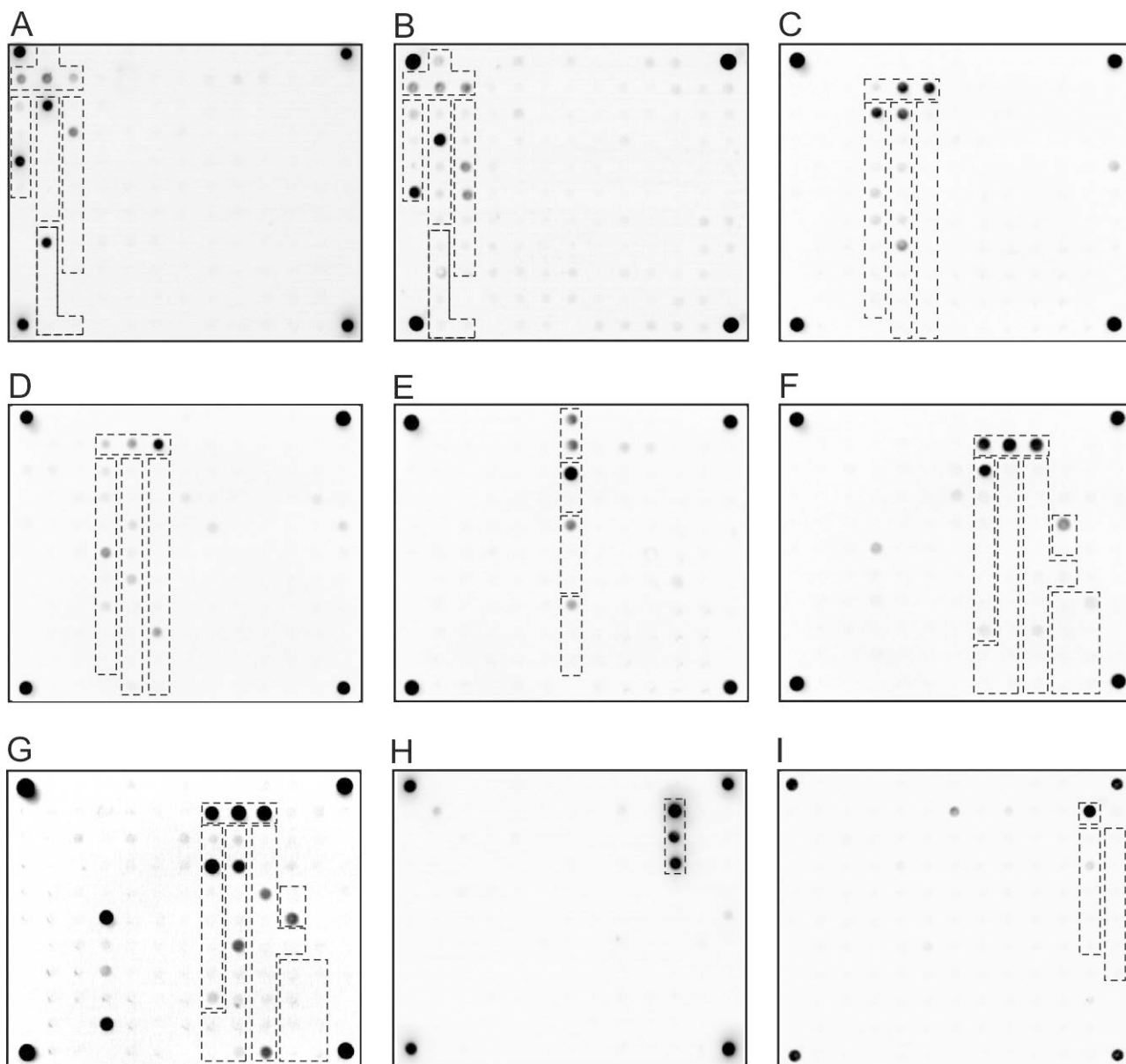
набор ячеек из разных групп  $ix_1, iy_1, ix_2, iz_2, ix_3$  и т.д., сигналы в которых превосходили остальные в своих группах не менее чем в 1,5 раза. При этом, если в полученном наборе присутствовали по меньшей мере 2 ячейки из разных групп, соответствующие одному подтипу, например  $ix_1$  и  $ix_3$  или  $ix_1$  и  $ix_2$ , то выдавали заключение о принадлежности исследуемого образца к подтипу 'x' генотипа 'i'. В случае, если в полученном наборе ячейки из разных групп соответствовали разным подтипам, например  $ix_1, iy_2, iz_3$  или  $ix_1, iy_3$ , тогда интенсивности сигналов данных ячеек сравнивали между собой. Если сигнал ячейки, соответствующей подтипу 'x' одной группы, превосходил сигналы ячеек других групп в 3,0 и более раза, то делали заключение о принадлежности исследуемого образца к подтипу 'x'. В случае, если отношение сигналов  $S_{ix_1}/S_{iy_2}$  не превышало 3,0, считали, что подтип не установлен и возможна принадлежность к подтипу 'x' или подтипу 'y'. Такое же заключение выдавали в случае, если максимальный сигнал в группе имела ячейка, содержащая олигонуклеотид, специфичный к двум подтипам, например  $ix_1$ , при отсутствии достоверных сигналов в других группах ячеек. В случае, если сигналы в группах, содержащих подтип-специфичные олигонуклеотиды, не проходили первичную фильтрацию относительно  $I_{ref}$ , считали, что подтип исследуемого образца не определен. Пример гибридизационной картины образца ВГС подтипа 1b с иллюстрацией анализа сигналов в различных группах биочипа приведен на Рис. 54 (B-D).



**Рис. 54.** (А) Схема биочипа для идентификации генотипа и подтипа ВГС. Биочип содержит 110 иммобилизованных олигонуклеотидов, четыре маркерные точки (М) для захвата изображения, выполняемого ПО, и 4 ячейки пустого геля (О) для вычисления референсного (фоновое) значения интенсивности флуоресценции  $I_{ref}$ . В двух верхних строках иммобилизованы олигонуклеотиды с индексом 'G', позволяющие идентифицировать генотипы (1-6) ВГС. Ниже иммобилизованы олигонуклеотиды, позволяющие идентифицировать подтипы с обозначением 'ixj', где i- номер генотипа, 'x' - символьное обозначение подтипа, в соответствии с принятой классификацией, j – номер группы. (В) Гибридационная картина РНК ВГС подтипа 1b. Выделены зоны с ячейками, содержащими генотип-специфичные олигонуклеотиды (G), группы ячеек 1-4 с подтип-специфичными зондами. (С) Нормированные интенсивности элементов с генотип-специфичными зондами. Указано пороговое значение  $I_{ref}$ . Достоверное превышение  $I_{ref}$  зарегистрировано только в группе генотипа 1. (D) Нормированные интенсивности групп элементов 1-4 с подтип-специфичными зондами. В группе 1 максимальный сигнал зарегистрирован в ячейке, содержащей зонд, специфичный к подтипам 1b и 1d. В группе 2 – в ячейке с зондом на 1b. В группе 3 элементов с достоверными сигналами не выявлено. В группе 4 достоверный сигнал выявлен в ячейке с зондом на 1b. Таким образом, подтип анализируемого образца РНК ВГС определен как 1b.

Примеры гибридационных картин анализа других вариантов ВГС приведены на Рис. 55 (А-І). Совершенные гибридационные дуплексы были получены от генотип-специфичных зондов и фрагментов области NS5В соответствующего генотипа при отсутствии кросс-гибридации в элементах, содержащих зонды, специфичные к другим генотипам. При анализе некоторых образцов, например, подтипа 4d (Рис. 55G), достоверные сигналы были

получены в элементах с зондами, специфичными к подтипам генотипа 2. Вместе с тем, описанный выше алгоритм интерпретации рассматривает только элементы с подтип-специфичными зондами, соответствующими установленному генотипу независимо от сигналов в других ячейках биочипа. Таким образом, подтип ВГС большинства образцов был определен однозначно.



**Рис. 55.** Гибридационные картины, полученные при анализе образцов РНК ВГС, принадлежащих подтипам 1a (А), 1b (В), 2a (С), 2i (D), 3a (Е), 4a (F), 4d (G), 5a (H), 6х (х - подтип не установлен) (I). Группы элементов, содержащих генотип- и подтип-специфичные зонды, соответствующие анализируемым образцам, выделены контуром.

Возможности метода в отношении идентификации смешанных инфекций ВГС были оценены на образцах плазмы крови, содержащих вирусы подтипов 1a+4a и 1b+3a в различных соотношениях. После выделения РНК, проведения

амплификации и гибридизации было получено, что смешанные варианты ВГС были успешно идентифицированы при концентрации минорного подтипа до 20%. Меньшая концентрация в смеси приводила к падению сигнала в соответствующих элементах с генотип-специфичными олигонуклеотидами и такие образцы определяли только по доминирующему подтипу.

С использованием разработанного метода проведено исследование 345 серопозитивных образцов ВГС в сравнении с «золотым стандартом» генотипирования – секвенированием области NS5B с последующим филогенетическим анализом. Для всех образцов РНК был успешно определен генотип (Таблица 33) обоими методами при 100% корреляции. Совпадение результатов идентификации подтипов было получено для 329 из 330 образцов (99,7%,  $\kappa = 0,996$ ,  $p < 0,00001$ ). Для одного образца методом секвенирования был установлен подтип 2с, при идентификации подтипа 2к на биочипе. Методом секвенирования не удалось установить подтип 8 образцов (2,3%), при анализе на биочипе - у 12 образцов (3,5%) ( $p = 0,36$ ).

Образцы с неустановленным по результатам секвенирования подтипом были идентифицированы на биочипах как 1а, 1b, 2к, 4h и 4г. Образцы с неопределенным по результатам гибридизации на биочипах подтипом были идентифицированы секвенированием как 1d, 2а, 2j и 2l. У пяти образцов подтипы не были установлены обоими методами.

Разработанным методом были корректно идентифицированы подтипы 1а, 1b, 1е, 2а, 2b, 2с, 2i, 2к, 3а, 4а, 4с, 4d, 4f, 4к, 4р, 4г и 5а. Ошибки при определении подтипов 1d, 2j, 2l и 4h связаны с небольшим количеством последовательностей NS5B этих подтипов в базах данных и, как следствие, недостаточно точным конструированием подтип-специфичных олигонуклеотидов. Вместе с тем, частоты встречаемости в Европе данных разновидностей ВГС достаточно невелики и составляют 2,9% для 2l, 0,9% - 2j, 1% - 4h (Thomas et al., 2007; Nicot et al., 2005), при этом не имея специальных режимов терапии.

**Таблица 33.** Сравнение результатов, полученных при генотипировании 345 образцов ВГС методом гибридизации на биочипе и секвенированием области NS5B с последующим филогенетическим анализом.

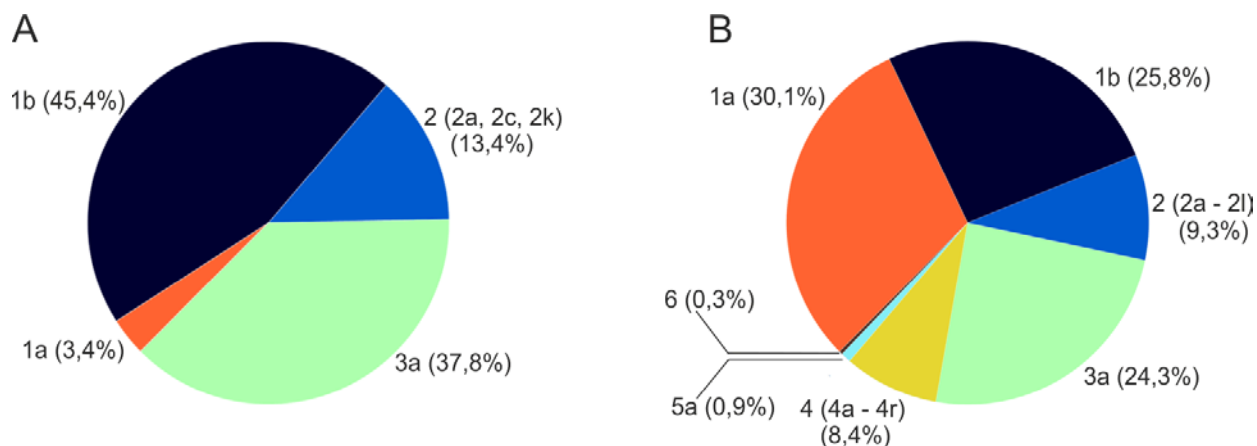
Секвенирование NS5B	Количество образцов ВГС с генотипом и подтипом, установленными по результатам гибридизации на биочипе																									
	1	1a	1b	1d	1e	2	2a	2b	2c	2i	2j	2k	2l	3a	4	4a	4c	4d	4f	4h	4k	4p	4r	5a	6	Всего
1	1	1	1																							3
1a		103																								103
1b			88																							88
1d	1																									1
1e					1																					1
2						3						1														4
2a						1	4																			5
2b								5																		5
2c									3			1														4
2i										7																7
2j						1																				1
2k												5														5
2l						1																				1
3a														84												84
4																										0
4a																12										12
4c																	1									1
4d																		8								8
4f																			1							1
4h															1											1
4k																					1					1
4p																						1				1
4r															2								2			4
5a																								3		3
6																									1	1
<b>Всего</b>	<b>2</b>	<b>104</b>	<b>89</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>84</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>345</b>



В то же время, разработанный метод гибридизации на биочипе продемонстрировал 100% корреляцию с «золотым стандартом» при идентификации распространенных в ЕС и клинически значимых подтипов, таких как 1a, 1b, 4a, 4d и 3a (Gryadunov et al., 2010).

Исследование коллекции образцов ВГС Лаборатории вирусологии Госпиталя Университета г. Тулузы показало примерный паритет подтипов 1a и 1b, преобладание 2i и 2k среди подтипов генотипа 2 (Таблица 33), заметную часть подтипа 3a и значительную долю подтипов 4a и 4d (~8%), обусловленную миграцией из стран Северной Африки, что, в целом, хорошо согласуется с эпидемиологическими данными по странам ЕС (Welzel et al., 2017).

В Российской Федерации по результатам клинических испытаний набора «HCV-Биочип», разработанного на основе предложенного метода, установлено тотальное доминирование подтипов 1b (45,4%) и 3a (37,8%), при незначительном присутствии подтипа 1a (3,4%), схожей с французской долей подтипов генотипа 2 (2a, 2b, 2k) (13,4%) и полном отсутствии образцов с генотипами 4-6 (Рис. 56).



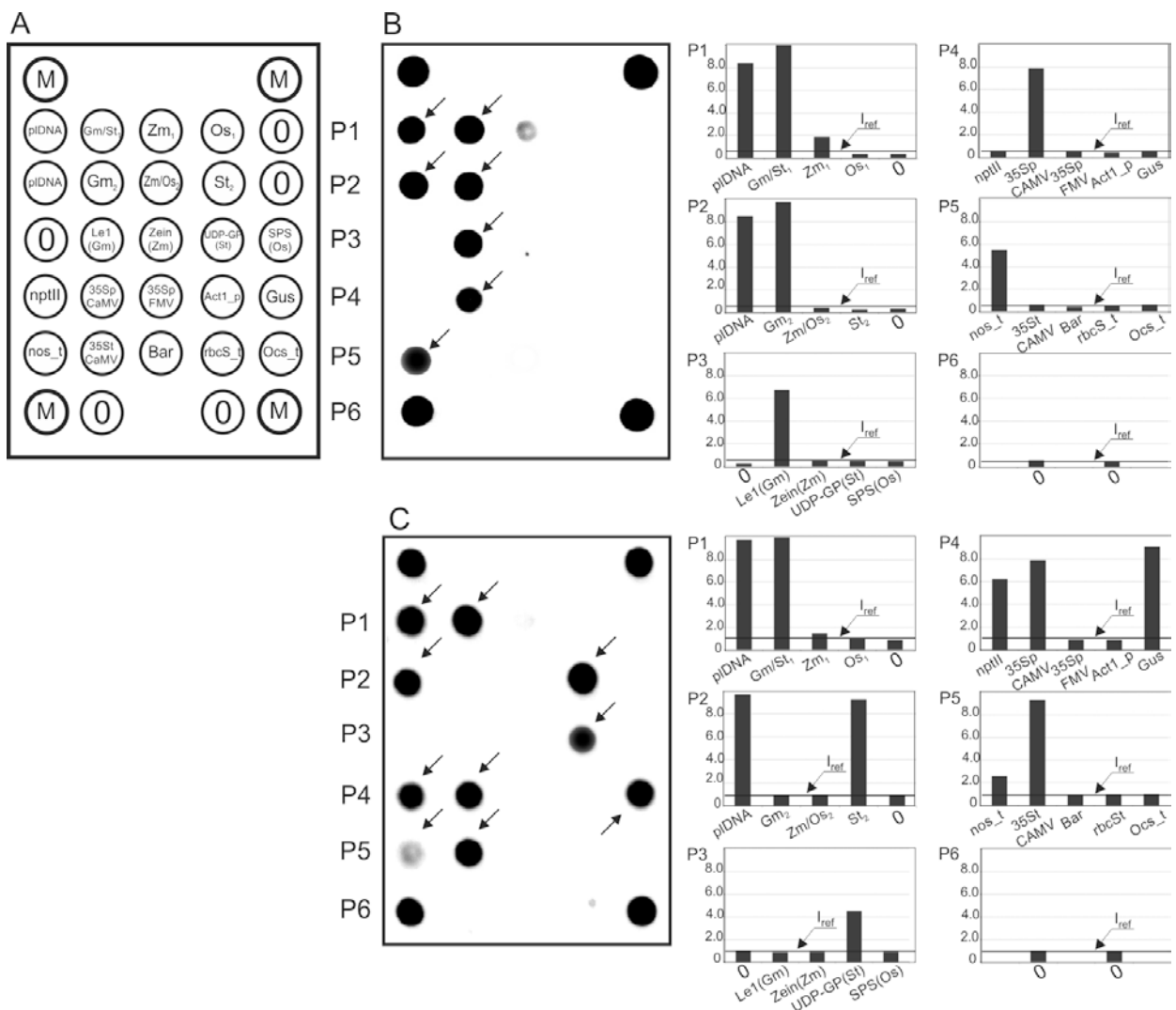
**Рис. 56.** Распределение (%) генотипов и подтипов ВГС в исследованных выборках образцов в России (N = 119) (А) и Франции (N = 345) (В).

Таким образом, разработанный метод идентификации генотипа и подтипа ВГС и набор «HCV-Биочип» (РУ ФСР 2011/10135) на его основе по своим диагностическим характеристикам практически не уступает технологиям секвенирования, являясь эффективным инструментом рутинного генотипирования, и актуален для оценки ответа на

противовирусную терапию препаратами прямого действия в зависимости от подтипа ВГС, что в настоящее время становится предметом многих исследований (Hezode, 2017; Rodriguez-Frias et al., 2017; Wilson et al., 2017).

### **3.5 Идентификация генетических детерминант трансгенности растительного происхождения на гидрогелевых биочипах**

Совместно с Институтом физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (ИФР РАН) разработана методика выявления ГМИ на основе специализированного гидрогелевого биочипа, позволяющая идентифицировать последовательности промоторов *35S CaMV*, *35S FMV*, гена актина риса, терминаторов *nos*, *35S CaMV*, *ocs*, гена *RBSC* гороха, маркерных генов *BAR*, *gus*, *nptII* в геномах сои, кукурузы, картофеля и риса (Грядунов и др., 2011). Биочип состоял из 31 элемента, 22 из которых содержали индивидуальный ковалентно иммобилизованный олигонуклеотид (Рис. 57А). Для подтверждения ДНК растительного происхождения сконструированы олигонуклеотидные зонды ('plDNA' на Рис. 57А) и праймеры, специфичные к фрагменту гена *rbcL*, кодирующего большую субъединицу рибулоза-1,5-бифосфат карбоксилазы/оксигеназы. Видоспецифичный полиморфизм в этом же гене был использован для идентификации и дифференциации культур сои ('Gm'), кукурузы ('Zm'), картофеля ('St'), риса ('Os'). Для подтверждения наличия ДНК сои в образце также были сконструированы праймеры и зонды, специфичные к фрагменту гена лектина (*LE1*), для выявления ДНК кукурузы использовали зонды и праймеры, специфичные к гену зеина (*IVR1*). Последовательности праймеров и зондов для идентификации ДНК картофеля и риса были комплементарны последовательностям участков гена фосфорилазы УДФ-глюкозы картофеля (*UDP-GP*) и фосфатсинтазы риса (*SPS*), соответственно. Разработаны олигонуклеотиды и праймеры для идентификации 10 различных детерминант трансгенности (ряды P4 и P5 на Рис. 57А).



**Рис. 57.** (А). Схема биочипа для идентификации ГМИ. Ячейки с индексом '0' не содержат олигонуклеотидов и служат для вычисления порогового значения сигнала  $I_{ref}$ . Ячейки с индексом 'M' предназначены для правильного позиционирования (захвата изображения) и содержат ковалентно связанный флуоресцентный краситель. Ряды ячеек, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды, и элементов отрицательного контроля обозначены индексами P1-P6. Флуоресцентное изображение биочипа и гистограммы нормированных сигналов рядов ячеек P1-P6 при анализе ДНК трансгенной сои (В) и ДНК картофеля линии 1/2 (С). Ячейки, в которых образовались совершенные гибридные дуплексы, на флуоресцентной картине указаны стрелками. Значение  $I_{ref}$  на каждой гистограмме указано сплошной толстой линией.

Процедура анализа включала мультиплексную амплификацию с одновременным флуоресцентным маркированием фрагментов растительной ДНК с последующей гибридизацией на биочипе и поэтапной интерпретацией результатов. На первом этапе определяли достоверные сигналы в ячейках, при которых возможно образование совершенных гибридных дуплексов. Для этого нормированные сигналы каждого элемента биочипа сравнивали с усредненным сигналом ( $I_{ref}$ ) в ячейках индексом '0', не

содержащих олигонуклеотидов. Достоверными сигналами считали такие, которые превосходят  $I_{ref}$ , по меньшей мере, в 2,0 раза. При наличии достоверных сигналов в группе ячеек 'pDNA' выдавали заключение о присутствии растительной ДНК в исследуемом образце. За неимением достоверных сигналов в данной группе выдавали заключение об отсутствии ДНК растительного происхождения и анализ остальных ячеек биочипа не проводили.

На следующем этапе рассматривали достоверные сигналы в двух группах ячеек, содержащих зонды, последовательности которых были комплементарны видоспецифичным последовательностям фрагмента гена *RBCL* (группы выделены индексами '1' и '2' на Рис. 57А). Выделяли максимальные сигналы внутри каждой группы ячеек, превосходящие другие достоверные сигналы в данной группе не менее, чем в 1,5 раза, и устанавливали принадлежность анализируемой ДНК к одной (или нескольким) из культур (соя, кукуруза, картофель или рис).

С целью подтверждения присутствия ДНК, выделенной из определенной культуры, анализировали сигналы в ячейках «Le1», «Zein», «UDP-GP», «SPS», содержащие олигонуклеотиды, специфичные к последовательностям генов, уникальных для генома каждой из культур (соя, кукуруза, картофель или рис). В случае обнаружения достоверного сигнала в данной группе ячеек, выдавали окончательное заключение о наличии ДНК определенной культуры в исследуемом материале.

Наконец, проводили анализ сигналов в ячейках «nptII», «35Sp CaMV», «35Sp FMV», «Act1\_p», «Gus», «nos\_t», «35St CaMV», «rbcSt», «Ocs\_t», «Bar», содержащих зонды, специфичные к элементам векторных конструкций и маркерным генам, являющимися генетическими детерминантами трансгенности. При наличии достоверного сигнала хотя бы в одном из рассматриваемых элементов делали заключение о трансгенности исследуемой ДНК с указанием обнаруженной детерминанты трансгенности. При отсутствии

достоверных сигналов указанных ячеек биочипа отмечали, что в анализируемом продукте ГМИ отсутствуют.

На Рис. 57В представлены гибридизационная картина и гистограмма нормированных сигналов ячеек биочипа (ряды P1-P6), полученные в результате анализа ДНК сои, содержащей трансгенные элементы. В соответствии с предложенным алгоритмом интерпретации результатов было вычислено значение  $I_{ref}$ , как средний сигнал в ячейках, не содержащих олигонуклеотидов. В данном случае это значение составило 0,59. Далее был проведен поиск достоверных сигналов в ячейках. Сигналы в ячейках «p1DNA» (8,43; 8,50) превышали пороговое значение  $I_{ref}$  более чем в 1,5 раза. Следовательно, исследуемый образец содержал ДНК растительного происхождения.

Анализ двух рядов ячеек, содержащих зонды, комплементарные видоспецифичным последовательностям фрагмента гена *RBCL*, выявил следующее. В верхнем ряду достоверный сигнал отмечен в ячейках «*Gm/St<sub>1</sub>*» (9,91) и «*Zm<sub>1</sub>*» (1,87), при этом сигнал в первой ячейке превосходил сигнал во второй более чем в 1,5 раза. Во втором ряду достоверный сигнал принадлежал только ячейке «*Gm<sub>2</sub>*» (9,37). В обеих группах совершенные гибридизационные дуплексы с исследуемым фрагментом гена *RBCL* были образованы зондами, специфичными к ДНК сои. Данное обстоятельство подтверждало и наличие достоверного сигнала (6,72) в элементе биочипа, содержащем зонд, специфичный к фрагменту гена лектина *LE1*, уникального для генома сои. Таким образом, в исследуемом образце присутствовала ДНК сои.

Анализ элементов, содержащих зонды, специфичные к фрагментам векторных конструкций и маркерных генов, выявил следующие достоверные сигналы: «35Sp CaMV» (7,88), «nos\_t» (5,50). Следовательно, в данных ячейках образовались совершенные гибридизационные дуплексы с соответствующими ПЦР-продуктами, а исследуемая ДНК сои являлась трансгенной.

Анализ ДНК картофеля линии 1/2 (Рис. 57С) проводили аналогичным образом. В данном случае значение  $I_{ref}$  составило 0,88. Достоверные сигналы в ячейках «p1DNA» (9,76; 9,68) свидетельствовали о наличии в образце

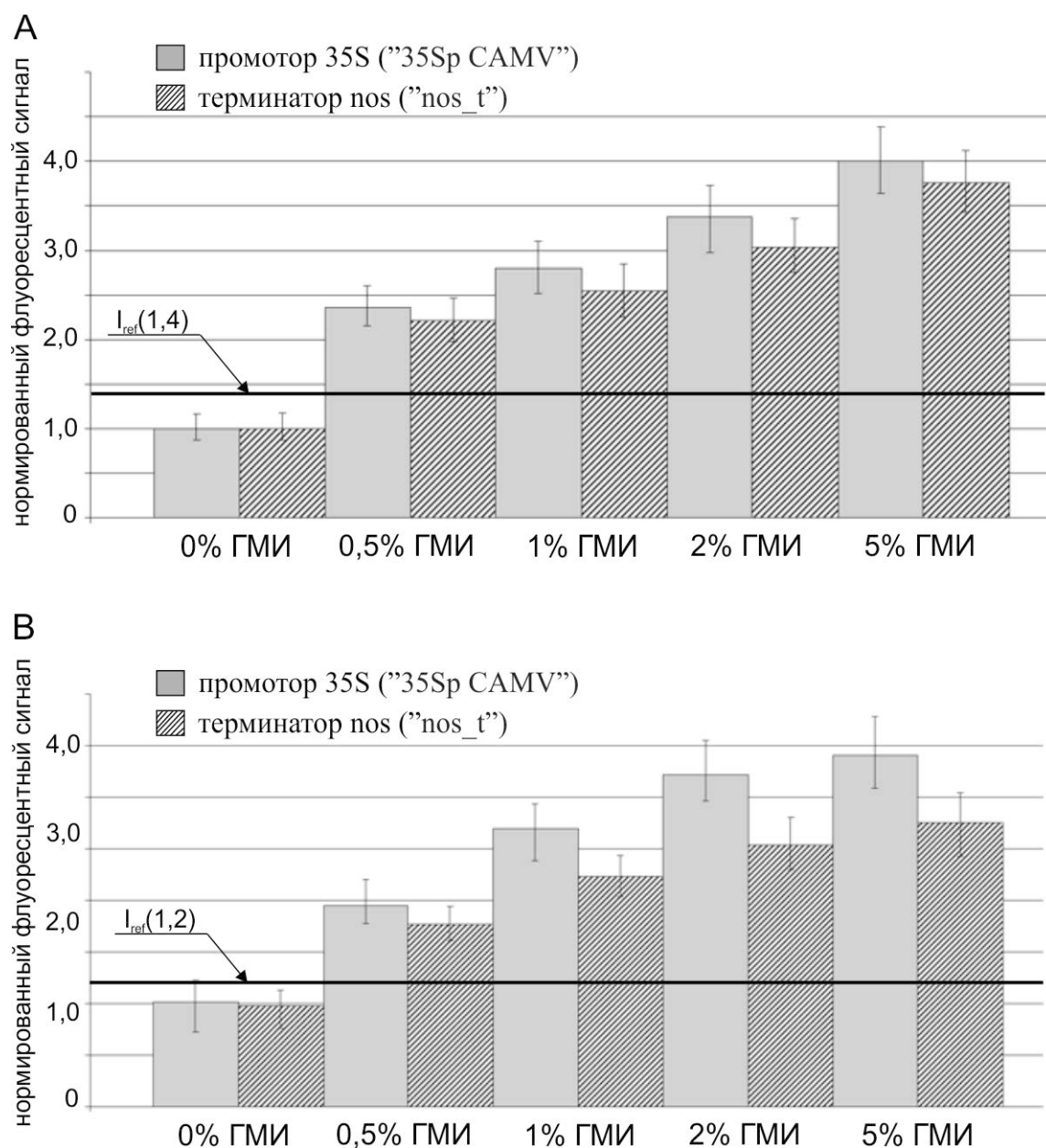
растительной ДНК. Идентификация ДНК картофеля была проведена на основании сигналов в ячейках, содержащих видоспецифичные зонды «Gm/St<sub>1</sub>» (9,92) и «St<sub>2</sub>» (8,86), а также сигнала в ячейке «UDP-GP (St)» (4,49), превосходящих  $I_{ref}$  более чем в 1,5 раза. Поиск достоверных сигналов в ячейках, содержащих зонды, специфичные к последовательностям векторных конструкций и маркерных генов, показал наличие таковых в элементах «nptII» (6,24), «35Sp CaMV» (7,87), «Gus» (9,06), «nos\_t» (2,58), «35St CaMV» (9,31). Таким образом, данный образец ДНК картофеля линии 1/2 является трансгенным, а тестирование на биочипе позволило идентифицировать множественные элементы векторной конструкции в геноме.

Методом мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на микрочипе были протестированы образцы ДНК, выделенные из нетрансгенных культур сои, кукурузы, картофеля, риса, пшеницы, табака. Видовая принадлежность ДНК к той или иной культуре или их отсутствие в образце были установлены на биочипе однозначно, при этом ложноположительные результаты при анализе на трансгенность зарегистрированы не были. Во всех экспериментах сигналы ячеек, содержащих олигонуклеотиды, специфичные к детерминантам трансгенности, превышали значение  $I_{ref}$  не более чем на 20%.

Аналитическую чувствительность разработанной методики оценивали путем последовательных десятикратных разведений ДНК картофеля трансгенной линии 1/2 и проведением анализа согласно вышеописанной методике. Предложенная методика позволяет воспроизводимо выявлять маркерные гены при концентрации растительной ДНК от  $10^4$  геном-эквивалентов в 1 мкл образца.

Оценку эффективности выявления трансгенной ДНК в смесях проводили с использованием калибровочных образцов, содержащих 0,5%, 1%, 2%, 5% ДНК ГМ-соя GTS 40-3-2 и 0,5%, 1%, 2%, 5% ДНК ГМ-кукурузы MON 810 из наборов для количественного определения ГМ-соя и ГМ-кукурузы компании «Синтол». Эксперимент с каждой из ДНК-матриц повторяли не менее пяти раз.

Выявление ДНК ГМ-сои или кукурузы при различном процентном содержании ДНК ГМ-культур проводили, оценивая сигналы в ячейках «35Sp CaMV» и «nos\_t», содержащих зонды, специфичные к целевым мишеням в геноме ГМ-культур. Результаты представлены на Рис. 58. Как свидетельствуют полученные результаты, предел чувствительности разработанного метода составляет 0,5% ГМО (Вершинкин и др., 2012). При содержании ГМИ менее 0,1% тестирование на биочипах приводило, в основном, к отрицательным результатам. Это позволило исключить из дальнейшего рассмотрения пищевые объекты с низким и сверхнизким содержанием ГМИ, которые согласно действующему законодательству не подлежат этикетированию.



**Рис. 58.** Гистограммы нормированных флуоресцентных сигналов ячеек «35Sp CaMV» и «pos\_t» при анализе калибровочных стандартов компании «Синтол», содержащих различное количество (0-5%) ДНК ГМ-кукурузы линии MON 810 (А) и сои Roundup Ready™ линии GTS 40-3-2 (В). Пороговое значение флуоресценции  $I_{ref}$  на каждой гистограмме указано сплошной толстой линией.

Препараты ДНК, выделенные из 20 пищевых продуктов, кормов и культур были проанализированы с использованием разработанной методики. Полученный на биочипах результат проверяли методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) при использовании наборов компании «Синтол» "Соя / GTS 40-3-2 количество", «Соя / 35S количество» и "Кукуруза / 35S количество", проводя количественную оценку трансгенной ДНК в образце (Таблица 34).

**Таблица 34.** Результаты анализа образцов ДНК из продуктов питания и кормов на биочипах и с использованием метода ПЦР с детекцией в режиме реального времени

#	Название / источник образца	Результат анализа на биочипах		Количественная идентификация трансгенной ДНК по результатам ПЦР-РВ	
		ДНК культуры	Трансгенность (+/-), выявленные детерминанты	Трансгенная культура, мишени	Наличие (+/-) и количество трансгена (%)
1	Кусочки грудинки цыпленка с сыром панировке (Бразилия)	Соя	+ <i>35Sp, nos_t</i>	Лектин сои, <i>35Sp</i>	+ 0,93%
2	Крабовые палочки. Имитация (ООО «Вичунай-Русь»)	Соя	+ <i>nptII, nos_t</i>	Лектин сои, спец. вставка для линии сои GTS-40-3-2	+ 1,17%
3	Сосиски «Компуша и Дюймовочка» для детей (ООО «МПЗ «КампоМос», Россия)	Соя	+ <i>35Sp, 35St, nos_t</i>	Лектин сои, спец. вставка для линии сои GTS-40-3-2	+ 2,9%
4	Ветчина «Экстра» (ООО «ОМПК»)	Соя	+ <i>35Sp, 35St, Gus, ocs</i>	Лектин сои, спец. вставка для линии сои GTS-40-3-2	+ 1,5%
5	Котлеты «Капустные» постные (ООО «МЛМ-РА», Россия)	Соя	+ <i>35Sp, nos_t</i>	Лектин сои, спец. вставка для линии сои GTS-40-3-2	+ 36%
6	Котлеты «Московские» (ООО «Вымпел»)	Соя/ Кукуруза	+ <i>35Sp, nos_t, gus, nptII, ocs</i>	Лектин сои, спец. вставка для линии сои GTS-40-3-2 Кукуруза	+ 12% > 10%
7	Котлеты из свежемороженого рубленого мяса	Соя	+ <i>35St, Act1_p, Bar</i>	Лектин сои	+ 36,63%



	(Бусиновский МПЗ)				
8	Наггетсы куриные, хрустящие (Бразилия)	Соя / Кукуруза	+ <i>35Sp, nos_t</i>	Лектин сои, спец. вставка для линии сои GTS-40-3-2 Кукуруза	+ 18%  0%
9	Лазанья «Болоньезе бешамель» (Бразилия)	Соя / Кукуруза	+ <i>35Sp, nos_t, gus, nptII, ocs</i>	Лектин сои  Кукуруза	+ 24%  12%
10	Пельмени «Дарья» (ООО «Дарья», Россия)	Соя	+ <i>35Sp, nos_t.</i>	Лектин сои, <i>35Sp</i>	+ 1,2%
11	Печеночный паштет (ООО «Дека»)	Соя	+ <i>Act1_p, rbsC_t</i>	Лектин сои	+ 4,9%
12	Сухой корм для кошек «Васька» (компания «Клинвет», Россия)	Соя	+ <i>35Sp, nos_t, 35St.</i>	Лектин сои, <i>35Sp</i>	+ ~100%
13	Сухой корм для собак («Pronature», Канада)	Соя / Кукуруза	+ <i>35Sp, nos_t, 35St.</i>	Кукуруза / <i>35Sp</i> Лектин сои	+ ~100% 0%
14	Сухой корм для кошек («Dr. Clauder's», Голландия)	Соя	+ <i>nos_t, 35St.</i>	Кукуруза / <i>35Sp</i>	+ 0,22%
15	Корм «Pedigree® Для щенков мелких пород»	Кукуруза	-	Кукуруза	0%
16	Детское питание пюре Hipp «Bio», цветная капуста (ООО "ХиПП Русь")	Соя	+ <i>35Sp, 35St.</i>	Лектин сои, <i>35Sp</i>	+ >10%
17	Детское пюре Nestle Абрикос («Nestle» Nutrition), Россия)	Соя	+ <i>35St, 35Sp</i>	Лектин сои, <i>35Sp</i>	+ >10%
18	Пюре «Nutricia Baby» брокколи (ООО «Нутриция», Россия)	Соя	+ <i>35Sp, 35St</i>	Лектин сои, <i>35Sp</i>	+ >10%
19	Картофель, сорт «Дезире» (Россия)	Картофель	-	-	-
20	Кукуруза, сорт «КР-415» (Россия)	Кукуруза	-	Кукуруза	-

Как свидетельствуют данные, приведенные в Таблице 34, наличие/отсутствие трансгенной ДНК по результатам анализа на биочипах в 100% случаев совпало с результатами метода ПЦР-РВ. При этом количество трансгенной ДНК сои или кукурузы в образцах варьировало от 0.22% до 100%, согласно данным ПЦР-РВ (Грядун и др., 2011).

Анализ образца пищевого продукта «Наггетсы куриные» (Бразилия) (#8 в Табл. 34) и корма для собак («Pronature», Канада, #13) показал наличие достоверных сигналов в ячейках «Gm/St<sub>1</sub>» и «Zm<sub>1</sub>», «Gm<sub>2</sub>» и «Zm/OS<sub>2</sub>»,

различающихся менее, чем в 1,5 раза. При этом достоверные сигналы также были зарегистрированы в элементах биочипа «Le1(Gm)» и «Zein(Zm)», содержащих олигонуклеотиды, специфичные к генам лектина и зеина, уникальным для геномов сои и кукурузы, соответственно. Такой результат гибридизации на биочипе был интерпретирован, как присутствие смеси ДНК сои и кукурузы. Методом ПЦР-РВ при использовании соответствующих тест-систем в образце #8 было показано наличие гена лектина сои, а также вставки для линии сои GTS 40-3-2, содержащей промотор 35S CaMV и терминатор *nos*. Было подтверждено также наличие ДНК кукурузы при отсутствии в ней трансгенных элементов. Результат анализа образца #13 методом ПЦР-РВ выявил аналогичную ситуацию с той разницей, что идентифицированная ДНК кукурузы содержала, по меньшей мере, один трансгенный элемент (в данном случае – промотор 35S CaMV), в то время как также присутствующая в образце ДНК сои являлась нетрансгенной. Таким образом, результаты, полученные при анализе данных образцов, методами ПЦР-РВ и гибридизацией на биочипе, следует считать совпадающими.

При тестировании ДНК, выделенной из образца #14 (корм для кошек «Dr.Clauder's», Голландия), было получено расхождение при идентификации культуры – методом гибридизации на биочипе была выявлена ДНК сои, в то время как метод ПЦР-РВ показал наличие ДНК кукурузы при отсутствии ДНК сои. Наличие трансгенных элементов в исследуемом образце было подтверждено обоими методами, при этом, согласно данным ПЦР-РВ, количество трансгенной ДНК составило 0,22%. Данное обстоятельство, т.е. присутствие генно-модифицированных источников в количестве, находящемся ниже предела чувствительности разработанного метода (0,5%), может служить объяснением ложно-положительного результата при идентификации культуры.

С использованием разработанного метода сотрудниками ИФР РАН был проведен скрининг более 400 разнообразных образцов продуктов, в том числе тех, в состав которых, согласно информации на этикетке, входил соевый белок. Примерно в 20% всех исследованных мясных продуктов достоверно были

обнаружены детерминанты трансгенности сои (Колотовкина и др., 2008). Однако последующее количественное определение показало, что в большинстве случаев массовая доля трансгенных компонентов в исследованных пищевых продуктах была незначительной и составляла лишь доли процента (от 0,04 до 0,87%) по отношению к нетрансгенной сое. Из 420 проанализированных образцов мясных продуктов, приобретенных в Московском регионе, в 312 (74,3%) ГМИ полностью отсутствовали, в 95 пробах (22,6%) обнаружено менее одного процента трансгенной сои, в 9 образцах (2,14%) содержание ГМИ составляло 1-5% и лишь в двух пробах содержание ГМИ превысило 5%. Исключение этих продуктов из числа трансгенных позволяет сделать вывод, что в период мониторинга в Москве более 97% мясных продуктов были практически свободны от трансгенной сои.

Разработанный метод достаточно технологичен и не требует значительных трудовых затрат. Компоненты для ПЦР могут быть приготовлены заранее, а сама амплификация занимает не более 2.5 часов. Гибридизация на биочипе проходит без участия персонала и может проводиться и в нерабочее время, т.е. в течение ночи. Отмывка биочипа после гибридизации и анализ флуоресценции ячеек с применением аппаратно-программного комплекса на анализа биочипов требуют минимума трудовых затрат и могут быть проведены в течение нескольких минут. Анализ результатов гибридизации производится в автоматическом режиме с использованием специализированного программного обеспечения, использующего алгоритм интерпретации гибридизационных картин, описанный выше. Срок хранения биочипов с прогибридизованным флуоресцентно-меченым материалом составляет несколько лет, при этом повторная регистрация флуоресценции может быть проведена в любой момент. Преимущества метода не ограничены приведенными примерами, так как обусловлены возможностью постоянно дополнять набор ячеек биочипа по мере освоения генной инженерией новых регуляторных участков ДНК и маркерных генов для создания трансгенных растений.

Метод отличается воспроизводимостью, простотой выполнения анализа и может быть использован для быстрого массового скрининга на наличие ГМИ продуктов питания и кормов, реализуемых в торговых сетях. Он прекрасно подходит как первый этап тестирования для идентификации заведомо трансгенных образцов из большой их выборки для последующего анализа количественного содержания трансгена (Колотовкина и др., 2008). Помимо этого, разработанный метод нашел успешное применение и в фундаментальных исследованиях, в частности, для подтверждения встраивания того или иного комплекса целевых и маркерных генов в геном лабораторных растений, трансформированных для исследовательских целей (Баврина и др., 2007; Наумкина и др., 2007).

На основании полученных данных совместно с ИФР РАН разработано и утверждено Изменение №2 к ГОСТ Р 52174-2003 «Биологическая безопасность. Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа». ГОСТ Р 52174-2003 в последней редакции от 01.07.2014 г. существенно расширяет спектр идентифицируемых генетически модифицированных источников растительного происхождения, что позволяет контролировать более 80% генно-модифицированных культур, разрешенных в настоящее время для применения в пищевой промышленности на территории РФ.

## Заключение

В настоящей работе представлены исследования, реализующие возможности технологии гидрогелевых олигонуклеотидных биочипов, на основе которых созданы и валидированы методы, составляющие основу наборов реагентов для диагностики *in vitro*. Мультиплексная амплификация с «пульсирующей» элонгацией и флуоресцентным маркированием существенно расширила спектр одновременно анализируемых геномных локусов. Выбор последовательностей дискриминирующих зондов, условия их иммобилизации и гибридизации на гидрогелевом биочипе обеспечили разрешение в один нуклеотид при идентификации значимых точечных мутаций. Реализованные в ПО алгоритмы обработки гибридизационных картин позволили автоматизировать конечный этап анализа, выдавая отчет в удобном для пользователей формате.

С помощью разработанных методов проведены исследования лекарственной чувствительности микроорганизмов, полученные результаты могут служить основой совершенствования схем терапии заболеваний, вызываемых лекарственно-устойчивыми инфекционными агентами.

Созданные, испытанные и зарегистрированные наборы реагентов на основе гидрогелевых биочипов в виде изделий для диагностики *in vitro* или национального стандарта нашли свое применение в различных областях биомедицинских исследований. Так, совокупность разработанных тест-систем для анализа возбудителей туберкулеза и микобактериозов позволяет проводить комплексное исследование материала от больных в рамках единой диагностической платформы биочипов в условиях клинической лаборатории.

Дальнейшим развитием технологии многопараметрического анализа геномов может стать интеграция гидрогелевых биочипов с описанными в настоящей работе микрофлюидными модулями для автоматизированного выделения нуклеиновых кислот. Ядро системы – гидрогелевый биочип, будет модифицироваться в зависимости от назначения диагностического теста, в то время как остальные параметры и компоненты являются унифицированными.

Такие «Лаборатории на чипе» позволят значительно улучшить качество лабораторной диагностики, снизить вероятность заражения медперсонала потенциальным инфекционным материалом, уменьшить количество ложноположительных и ложно-отрицательных результатов, сократить бюджетные ассигнования на лечение и повысить качество жизни населения в целом.

### **Выводы**

1. Разработана методология, обеспечивающая полный цикл многопараметрического анализа биологического образца, включающая:

- выделение и очистку НК одновременно из двух и более (до 24) биологических образцов в одноразовых сменных микрофлюидных модулях, изолированных от внешней среды и содержащих все реагенты и компоненты для выделения НК;

- процедуру мультиплексной ПЦР, обеспечивающей одновременную амплификацию и флуоресцентное маркирование десятков фрагментов геномов, в том числе, с высоким (более 70%) содержанием GC, при использовании циклического изменения температуры элонгации в течение короткого (до 2 с) времени – так называемых множественных «пульсов»;

- процедуру гибридизации продуктов амплификации на биочипе с иммобилизованными зондами в условиях, обеспечивающих разрешение в один нуклеотид между совершенными и несовершенными дуплексами;

- интерпретацию результатов анализа на биочипе при использовании различных специализированных алгоритмов, зависящих от конфигурации биочипа и реализованных в программном обеспечении.

2. Разработан метод мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на гидрогелевом биочипе, обеспечивающий обнаружение ДНК возбудителя туберкулеза с одновременным установлением его принадлежности к семействам Beijing (включая кластер Beijing B0/W148), LAM, Haarlem, Ural и идентификацией 116 генетических детерминант резистентности к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, инъекционным препаратам

(амикацин, канамицин), капреомицину, этамбутолу. Выявлены корреляции между генетическими детерминантами и уровнями устойчивости к препаратам первого и второго ряда, что используется для персонализированного применения химиопрепаратов при терапии лекарственно-устойчивых форм. Установлен мутационный профиль изолятов, показана ассоциация отдельных семейств ТБ с устойчивыми и чувствительными формами. Подтверждена значимость идентификации штаммов генотипа Beijing B0/W148.

3. Анализ локуса прямых повторов генома микобактерий туберкулезного комплекса с использованием гидрогелевого биочипа позволяет дифференцировать микобактерии туберкулеза человеческого или бычьего типов, различать виды, входящие в состав МТВС (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti* и др.), а также устанавливать генотипы *Mycobacterium tuberculosis* с диагностической чувствительностью и специфичностью, превосходящими 99%.

4. Разработанный метод определения видоспецифичного полиморфизма гена *gyrB* на основе гидрогелевого биочипа обеспечивает идентификацию 35 микроорганизмов рода *Mycobacterium*, при этом совпадение результатов идентификации с секвенированием составило 96,7%. Выявлены доминирующие на европейской части территории РФ виды NTM, такие как комплекс *M. avium* (39%), *M. fortuitum* (17%) и *M. xenopi* (13%).

5. Анализ последовательности высокополиморфной области NS5B генома вируса гепатита С с использованием специализированного биочипа позволяет определять 6 генотипов и 36 различных подтипов ВГС. Совпадение с «золотым стандартом» генотипирования ВГС - секвенированием области NS5B с последующим филогенетическим анализом составило 100% при идентификации генотипа и 99,7% в отношении идентификации подтипа ВГС.

6. Разработан метод идентификации 12 возбудителей ИРТ с одновременным установлением 39 генетических маркеров устойчивости к АМП, включая β-лактамы препараты, макролиды, тетрациклины,

фторхинолоны, нитроимидазол, спектиномицин. Показано, что идентификация сочетаний генетических детерминант устойчивости существенно повышает предсказательную ценность определения резистентного фенотипа, на примере анализа выборки изолятов *N. gonorrhoeae*.

7. Разработан метод мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на гидрогелевом биочипе, обеспечивающий обнаружение десять различных трансгенных элементов в ДНК сельскохозяйственных культур (соя, кукуруза, картофель, рис) с пределом чувствительности 0,5% генно-модифицированной ДНК. Разработанный подход может быть использован для массового скрининга продуктов питания и кормов на наличие ГМИ растительного происхождения.



## Благодарности

Выражаю свою искреннюю признательность всем, кто на протяжении многих лет помогал и поддерживал меня в данной работе. Я бесконечно признателен своей семье - жене Елизавете, дочери Нелли, отцу Александру Ивановичу и сестре Ольге за любовь, терпение, понимание и поддержку. Львиная доля результатов по исследованию возбудителя туберкулеза и микобактериозов на биочипах получена моим другом и коллегой Дániлой Зименковым, за что я ему неизмеримо благодарен.

Сердечно благодарю Владимира Михайловича Михайловича, Александра Сергеевича Заседателя и Александра Александровича Макарова за ценные консультации, помощь и повседневную поддержку.

Искренне благодарю сотрудников Лаборатории технологий молекулярной диагностики и Лаборатории биологических микрочипов ИМБ, РАН, в непосредственном сотрудничестве с которыми были получены основные результаты: Екатерину Дементьеву, Бориса Шаскольского, Арво Лейнсоо - за ежедневную поддержку в Лаборатории и работу по анализу возбудителей инфекций органов репродукции; Ольгу Антонову и Елену Кулагину – за работу по исследованиям возбудителя туберкулеза и созданию метода анализа трансгенных растений; Виктора Евгеньевича Барского, Дмитрия Дмитриевича Мамаева и Дмитрия Юрасова – за инженерное обеспечение в разработке аппаратно-программных комплексов для анализа биочипов и выделения нуклеиновых кислот; Романа Юрасова – за разработку и реализацию программного обеспечения для анализа биочипов; Сергея Суржикова – за синтез олигонуклеотидов и праймеров; Марину Филиппову и Сергея Полякова – за изготовление гидрогелевых биочипов; Александра Васильевича Чудинова – за безотказное предоставление на протяжении многих лет конъюгатов для флуоресцентного маркирования анализируемых фрагментов ДНК; Елену Ивановну Новикову – за помощь в решении многих личных и рабочих вопросов; а также Андрея Борисовича Полтарауса – за оперативное и высококачественное секвенирование фрагментов ДНК.

Выражаю искреннюю благодарность коллегам других Институтов, в сотрудничестве с которыми была выполнена данная работа. Сотрудникам МНПЦБТ – Елене Носовой, Ксении Галкиной, Марии Красновой, Юлии Исаевой, Марине Витальевне Макаровой, Светлане Григорьевне Сафоновой и Виталию Ильичу Литвинову – за помощь, понимание и предоставление образцов ДНК возбудителей туберкулеза и микобактериозов; Вячеславу Юрьевичу Журавлеву (СПб НИИФ) и Сергею Александровичу Попову (НИИ ФП) – также за всестороннюю помощь в исследованиях возбудителей туберкулеза и микобактериозов; Дмитрию Геннадьевичу Дерябину и Алексею Алексеевичу Кубанову (ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России) – за совместную работу по изучению механизмов резистентности возбудителей органов репродукции; Георгию Александровичу Романову и Ирине Гетман (ИФР РАН) – за многолетнее сотрудничество в разработке методов анализа генно-модифицированных источников растительного происхождения; профессору Жаку Изопе и Флоренс Нико (Лаборатория вирусологии госпиталя Университета г. Тулузы, Франция) – за успешное сотрудничество по разработке биочипа для генотипирования вируса гепатита С.

Огромное спасибо всем сотрудникам административно-управленческого персонала ИМБ РАН за помощь в решении многих общеинститутских проблем и вопросов, что позволило высвободить время для написания данной работы.

Я искренне признателен Александру Шантырю, Ивану Паначеву, Андрею Дмитриеву, Кириллу Алферову, Александре Скороходовой, Андрею Гулевичу и Алексею Кузьмину за дружбу, мудрость и поддержку.

На разных этапах работа финансировалась госконтрактами и субсидиями Министерства образования и науки РФ, программами Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Биоразнообразие и динамика генофондов», грантами РФФИ и РФФИ (№ 14-50-00060), за что выражаю им благодарность.

## Список сокращений и условных обозначений

НК	нуклеиновые кислоты
ПЦР	полимеразная цепная реакция
NGS	технологии секвенирования следующего поколения
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	рибонуклеиновая кислота
ГМИ	генно-модифицированные источники
ТВ	<i>M. tuberculosis</i> , возбудитель туберкулеза
MTBC	микобактерии туберкулезного комплекса
НСV / ВГС	вирус гепатита С
ИРТ	инфекции репродуктивного тракта
АМП	антимикробные препараты
NTM	нетуберкулезные (атипичные) микобактерии
МЛУ ТБ/ ШЛУ ТБ	возбудитель туберкулеза с множественной/ широкой лекарственной устойчивостью
РУ	регистрационное удостоверение Росздравнадзора
LOC-системы	«лаборатории на чипе»
МИК	минимальная ингибирующая концентрация
INH	изониазид
RMP	рифампицин
RFB	рифабутин
EMB	этамбутол
FQ	фторхинолоны
OFX	офлоксацин
LVX	левофлоксацин
MFX	моксифлоксацин
SLID/ID2	инъекционные препараты второго ряда
KAN	канамицин
AMK	амикацин
CAP	капреомицин
STR	стрептомицин
PZA	пиразинамид
AFB+/AFB-	микроскопически положительный/отрицательный результат при выявлении кислотоустойчивых бацилл
ПППД	препараты прямого противовирусного действия
IFN	интерферон-альфа

dUTP-ImD	конъюгат дезоксиуридинтрифосфата и красителя индодикабоцианинового ряда
GuSCN	гуанидинтиоцианат
WT	последовательность ДНК дикого типа микроорганизма, чувствительного к АМП
ЛЮМ	метод люминесцентной микроскопии
ПТД	противотуберкулезный диспансер
DR-локус	регион прямых повторов в геномах микобактерий туберкулезного комплекса
MIRU-VNTR	анализ вариабельности количества копий tandemных нуклеотидных повторов
ITS	межгенный транскрибируемый спейсер генов 16S – 23S рРНК
NG-MAST	мультиантиген-сиквенс-типирование <i>N. gonorrhoeae</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institution, США
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
WHO/ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
pHEMA	поли-2-гидроксиэтилметакрилат
FDA	Food and drug administration (США)
MIAME	минимальная информация о эксперименте с микрочипами
БВ	бактериальный вагиноз
PBP	penicillin-binding proteins
ИФА	иммуноферментный анализ
SVR	устойчивый вирусологический ответ
ISAAA	Международная служба мониторинга использования сельскохозяйственных биотехнологий
АК ВНК	Аппаратный комплекс для одновременного автоматизированного выделения и очистки нуклеиновых кислот из нескольких биологических образцов
ОТ-ПЦР	ПЦР, совмещенная с обратной транскрипцией
HBV	вирус гепатита В

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агаев Ф.Ф., Алиев К.А., Салимова Н.А., Абузаров Р.М., Гасымов И.А., Грядунов Д.А. Молекулярно-генетические и бактериологические методы диагностики *M.tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью. // Туберкулез и болезни легких. 2009. 86(9): 32-35.
2. Аляпкина Ю.С., Алексеев Я.И., Варламов Д.А., Домотенко Л.В., Шипина Л.К., Владимирский М.А. Разработка технологии ПЦР в реальном времени для экспресс-определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам резервного ряда: фторхинолонам, амикацину и капреомицину. // Туберкулез и болезни легких. 2014. 12: 69-75.
3. Баврина Т.В., Миляева Э.Л., Гетман И.А., Романов Г.А. Особенности проявления и наследования TRP1-фенотипа у инсерционного мутанта табака с длительным периодом цветения. // Физиология растений. 2007. 54(5): 730-737.
4. Барило В.Н., Кузьмин А.В., Черноусова Л.Н., Гольшевская В.И. Ускоренное определение чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам в системе "Bactec MGIT 960 " и на биочипах "ТБ-Биочип". // Туберкулез и болезни легких. 2009. 86(11): 56-60.
5. Бобровская К.В., Кравченко М.А., Бердников Р.Б. Лекарственная чувствительность микобактерий туберкулеза, полученных из мокроты и операционного материала больных с туберкулемами легких. // Уральский медицинский журнал. 2013. 2(107): 50-53.
6. Васильева И.А., Белиловский Е.М., Борисов С.Е., Стерликов С.А. Заболеваемость, смертность и распространенность как показатели бремени туберкулеза в регионах ВОЗ, странах мира и в Российской Федерации. Часть 1. Заболеваемость и распространенность туберкулеза. // Туберкулез и болезни легких. 2017. 95(6): 9-21.
7. Васильева И.А., Самойлова А.Г., Эргешов А.Э., Багдасарян Т.Р., Черноусова Л.Н. Химиотерапия туберкулеза: проблемы и перспективы. // Вестник РАМН. 2012. 11: 9-14.
8. Вершинкин Д.А., Гетман И.А., Чижова С.И., Грядунов Д.А., Михайлович В.М., Заседателев А.С., Романов Г.А. Идентификация генно-модифицированных организмов с помощью гидрогелевых биологических микрочипов. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им ЮА Овчинникова. 2012. 8(4): 52-53.
9. Гаева Н.Д., Жилин О.В., Ивлева С.Р., Овчинникова О.А. Опыт применения тест-систем "ТБ-БИОЧИП (МЛУ)" в Липецкой области. // Туберкулез и болезни легких. 2010. 87(2): 57-59.

10. Грядунов Д.А., Гетман И.А., Романов Г.А. Применение гидрогелевых биочипов для идентификации генно-модифицированных источников. // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. 2011. Под редакцией Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний: 120-136.
11. Грядунов Д.А., Гетман И.А., Чижова С.Н., Михайлович В.М., Заседателев А.С., Романов Г.А. Идентификация генно-модифицированных источников растительного происхождения в пищевых продуктах и сырье с использованием гидрогелевого олигонуклеотидного микрочипа. // Молекулярная биология. 2011. 45(6): 973-983.
12. Грядунов Д.А., Зименков Д.В. Способ обнаружения ДНК возбудителя туберкулеза с одновременным установлением его генотипа и определением генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости, олигонуклеотидный микрочип, набор праймеров и набор олигонуклеотидных зондов, используемые в способе. // 2015. Патент РФ 2562866. – Бюл. № 25; опубликовано 10.09.2015; приоритет от 11.11.2014.
13. Грядунов Д.А., Зименков Д.В., Михайлович В.М., Наседкина Т.В., Дементьева Е.И., Рубина А.Ю., Паньков С.В., Барский В.Е., Заседателев А.С. Технология гидрогелевых биочипов и ее применение в медицинской лабораторной диагностике. // Медицинский алфавит. 2009. 3: 10-14.
14. Грядунов Д.А., Михайлович В.М., Лапа С.А., Рудинский Н.И., Барский В.Е., Чудинов А.В., Заседателев А.С., Мирзабеков А.Д. Идентификация штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с одновременным определением их лекарственной устойчивости методом гибридизации на олигонуклеотидных микрочипах. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2003. 4: 24-27.
15. Грядунов Д.А., Михайлович В.М., Нико Ф., Дюбуа М., Заседателев А.С., Изопет Ж. Способ идентификации генотипа и подтипа вируса гепатита С на биологическом микрочипе. // 2013. Патент ЕАПО 018102. - Бюл. № 5; опубликовано 30.05.2013; приоритет от 09.08.2007.
16. Дауров Р.Б., Васильева И.А., Перфильев А.В., Черноусова Л.Н., Кузьмин А.В., Глазкова Н.А. Клинико-рентгенологическая динамика у впервые выявленных больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью микобактерий при раннем назначении резервной схемы химиотерапии по данным тест-системы "ТБ-Биочип". // Туберкулез и болезни легких. 2010. 87(4): 10-13.
17. Журавлев В.Ю., Васильева Г.Ю., Васильева И.Н., Советова Н.А., Олейник В.В., Вишневский А.А. Технологии "ТБ-биочип" в верификации диагноза туберкулезного спондилита. // Туберкулез и болезни легких. 2011. 88(4): 144-145.

18. Исакова Ж.Т., Гончарова З.К., Юсупова Э.У., Тумашова А.Ф., Кожомкулов М.Д., Кожомкулов Д.К., Чубаков Т.Ч., Алишеров А.Ш., Алдашев А.А. Анализ мутаций мультирезистентных штаммов *M.tuberculosis* у больных туберкулезом в Кыргызской республике. // Туберкулез и болезни легких. 2007. 84(4): 17-21.
19. Исакова Ж.Т., Совхозова Н.А., Гончарова З.К., Алдашев А.А. Сравнительный анализ определения лекарственно-устойчивых штаммов *M.tuberculosis* бактериологическим методом абсолютных концентраций и методом биологических микрочипов. // Туберкулез и болезни легких. 2011. 88(3): 57-59.
20. Кашкин К.Н., Стрижков Б.Н., Грядунов Д.А., Суржиков С.А., Гречишникова И.В., Крейндин Э.Я., Чупеева В.В., Евсеев К.В., Турыгин А.Ю., Мирзабеков А.Д. Определение точечного нуклеотидного полиморфизма в гене *r53* с помощью селективного лигирования и амплификации по принципу катящегося кольца на микрочипах. // Молекулярная биология. 2005. 39(1): 26-35.
21. Колотовкина Я.Б., Наумкина Е.М., Чижова С.И., Гетман И.А., Кузнецов В.В., Цыдендамбаев В.Д., Кузнецов Вл.В., Романов Г.А. Методы идентификации и мониторинг трансгенных компонентов в продуктах питания. // Российская сельскохозяйственная наука. 2008. 5: 44-47.
22. Колчинский А.М., Грядунов Д.А., Лысов Ю.П., Михайлович В.М., Наседкина Т.В., Турыгин А.Ю., Рубина А.Ю., Барский В.Е., Заседателев А.С. Микрочипы на основе трехмерных ячеек геля: история и перспективы. // Молекулярная биология. 2004. 38(1): 5-16.
23. Кричевская Н.А. Роль молекулярно-генетических методов исследования лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза в лечении больных деструктивным специфическим процессом легких. // Современные проблемы науки и образования. 2014. 2: 290.
24. Кубанов А.А., Лейнсоо А.Т., Честков А.В., Дементьева Е.И., Шаскольский Б.Л., Соломка В.С., Грядунов Д.А., Дерябин Д.Г. Хромосомные детерминанты антибиотикорезистентности и фенотипическая чувствительность к антимикробным препаратам в российской популяции *Neisseria gonorrhoeae*. // Молекулярная биология. 2017. 51(3): 431-441.
25. Кубанова А.А., Кубанов А.А., Фриго Н.В., Волков И.А., Ротанов С.В., Суворова А.А. Первый опыт молекулярного типирования и определения антибиотикорезистентности штаммов возбудителя сифилиса *Treponema pallidum* в Российской Федерации. // Вестник дерматологии и венерологии. 2013. 3: 34-46.
26. Кузьмин А.В., Васильева И.А., Черноусова Л.Н. Эффективность химиотерапии деструктивного туберкулеза легких, основанной на результатах экспресс-детекции

лекарственной чувствительности к изониазиду и рифампицину тест-системой-"ТБ-БИОЧИП". // Туберкулез и болезни легких. 2006. 83(8): 17-23.

27. Лейнсоо А.Т., Шаскольский Б.Л., Дементьева Е.И., Грядунов Д.А., Кубанов А.А., Честков А.В., Образцова О.А., Шпилевая М.В., Дерябин Д.Г. Олигонуклеотидный микрочип для идентификации возбудителей инфекций репродуктивного тракта с одновременным анализом детерминант резистентности к антимикробным препаратам. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. 7: 66-72.

28. Ломова Л.А., Иванова О.В. Практическое значение тест-системы «ТБ-Биочип» в диагностике туберкулеза легких при отрицательных результатах микроскопии мазка мокроты в регионе с высоким уровнем лекарственной устойчивости возбудителя. // Туберкулез и болезни легких. 2011. 88(5): 31.

29. Манаенкова Е.В., Савин А.А. Опыт применения тест-системы «ТБ-БИОЧИП» в Тамбовской области. // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. 60(2): 59-62.

30. Микулович Ю.Л., Савочкина Ю.А., Альварес Фигероа М.В., Луданный Р.И., Тимошина О.Ю., Кравцова Т.А., Попов С.А., Лобашова Г.П., Шипулин Г.А. Разработка набора реагентов для выявления мутаций, ассоциированных с множественной лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза. // Молекулярная диагностика 2017. Москва: ООО фирма "Юлис". 1: 502-504.

31. Михеева О.П., Иванова О.В. Результаты определения лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* с помощью биологических микрочипов в Кемеровской области. // Туберкулез и болезни легких. 2011. 88(5): 48-49.

32. Наумкина Е.М., Болякина Ю.П., Романов Г.А. Органоспецифичность и индуцибельность функционирования промотора гена пататина класса I картофеля в трансгенном арабидопсисе. // Физиология растений. 2007. 54(3): 397-408.

33. Носова Е.Ю., Галкина К.Ю., Антонова О.В., Гармаш Ю.Ю., Скотникова О.И., Мороз А.М. Молекулярно-биологический микрочип "ТБ-БИОЧИП-2" для определения чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью к фторхинолонам у больных с впервые выявленным и хроническим течением туберкулеза. // Вестник РАМН. 2008. 3: 16-19.

34. Носова Е.Ю., Галкина К.Ю., Маркова О.В., Грядунов Д.А., Скотникова О.И. Изучение лекарственной чувствительности к фторхинолонам путем выявления мутаций в гене *gyrA*. // Туберкулез и болезни легких. 2007. 10: 57-60.



35. Носова Е.Ю., Краснова М.А., Галкина К.Ю., Букатина А.А., Исаева Ю.Д. Молекулярно-генетические исследования во фтизиатрии. // Туберкулез и болезни легких. 2011. 88(6): 28-32.
36. Павлова М.В., Сапожникова Н.В., Журавлев В.Ю., Кондакова М.Н., Арчакова Л.И. Ускоренная диагностика множественной лекарственной устойчивости МБТ на основе тест-системы «ТБ-биочип». // Туберкулез и болезни легких. 2011. 88(5): 93.
37. Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Молекулярно-генетический анализ изониазид-резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Саратовской области. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2013. 3: 26-28.
38. Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Молекулярно-генетические особенности лекарственной устойчивости к рифампицину и распространенность мутаций в гене *groV* на территории саратовской области. // Туберкулез и болезни легких. 2014. 91(4): 22-25.
39. Скотникова О.И., Галкина К.Ю., Носова Е.Ю., Краснова М.А., и др. Характеристика чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину и изониазиду посредством определения мутаций в генах *groV*, *katG*, *inhA*, *oxyA*, *kasA* различными молекулярно-биологическими методами. // Туберкулез и болезни легких. 2005. 82(8): 42-45.
40. Смазнова И.А., Терешин В.С., Полозов А.И., Гаврилюк С.В., Заякин В.В., Мороз А.М., Нам И.Я. Внедрение в Брянской области метода биочипов для ранней диагностики туберкулеза и определения форм микобактерий, резистентных к лекарственным средствам. // Вестник Брянского государственного университета. 2010. 4: 232-237.
41. Татьков С.И., Сивков А.Ю., Болдырев А.Н., Смирнова О.Ю., Туманов Ю.В., Медведева Е.В., Ивлев-Дунтау А.П., Стрелис А.К., Новицкий В.В., Уразова О.И., Воронкова О.В. Результаты применения биочипов для определения лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* в Новосибирской и Томской областях. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2007. 3: 9-14.
42. Чечеткин В.Р., Прокопенко Д.В., Макаров А.А., Заседателев А.С. Биочипы для медицинской диагностики. // Российские нанотехнологии. 2006. 1(1-2): 13-27.
43. Li P., Sedighi A., Wang L. Microarray Technology. Methods and Applications. // 2016. Humana Press.
44. Abergel A., Loustaud-Ratti V., Metivier S., Jiang D., Kersey K., Knox S. et al.. A SPECIAL MEETING REVIEW EDITION: Advances in the Treatment of Hepatitis C Virus Infection from The Liver Meeting 2013: The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. // Gastroenterology & hepatology. 2014. 10(Suppl 1): 1-19.

45. Ackart D.F., Hascall-Dove L., Caceres S.M., Kirk N.M., Podell B.K., Melander C., Orme I.M., Leid J.G., Nick J.A. and Basaraba R.J. Expression of antimicrobial drug tolerance by attached communities of *Mycobacterium tuberculosis*. // *Pathogens and disease*. 2014. 70(3): 359-369.
46. Adams K.N., Takaki K., Connolly L.E., Wiedenhoft H., Winglee K., Humbert O., Edelstein P. H., Cosma C.L. and Ramakrishnan L. Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. // *Cell*. 2011. 145(1): 39-53.
47. Africa C.W., Nel J. and Stemmet M. Anaerobes and bacterial vaginosis in pregnancy: virulence factors contributing to vaginal colonisation. // *International journal of environmental research and public health*. 2014. 11(7): 6979-7000.
48. Alexandrova L., Zicari S., Matyugina E., Khandazhinskaya A., Smirnova T., Andreevskaya S., Chernousova L., Vanpouille C., Kochetkov S. and Margolis L. Dual-targeted anti-TB/anti-HIV heterodimers. // *Antiviral research*. 2017. 145: 175-183.
49. Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E., Ma C., Lossos I.S., Rosenwald A., Boldrick J.C., Sabet H., Tran T., Yu X., Powell J.I., Yang L., Marti G.E., Moore T., Hudson J., Jr., Lu L., Lewis D.B., Tibshirani R., Sherlock G., Chan W.C., Greiner T.C., Weisenburger D.D., Armitage J.O., Warnke R., Levy R., Wilson W., Grever M.R., Byrd J.C., Botstein D., Brown P.O. and Staudt L.M. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. // *Nature*. 2000. 403(6769): 503-511.
50. Allan-Blitz L.T., Humphries R.M., Hemarajata P., Bhatti A., Pandori M.W., Siedner M.J. and Klausner J.D. Implementation of a Rapid Genotypic Assay to Promote Targeted Ciprofloxacin Therapy of *Neisseria gonorrhoeae* in a Large Health System. // *Clinical infectious diseases*. 2017. 64(9): 1268-1270.
51. Anderson R.C., Su X., Bogdan G.J. and Fenton J. A miniature integrated device for automated multistep genetic assays. // *Nucleic acids research*. 2000. 28(12): E60.
52. Andersson D.I. and Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? // *Nature reviews Microbiology*. 2010. 8(4): 260-271.
53. Antonova O.V., Gryadunov D.A., Lapa S.A., Kuz'min A.V., Larionova E.E., Smirnova T.G., Nosova E.Y., Skotnikova O.I., Chernousova L.N., Moroz A.M., Zasedatelev A.S. and Mikhailovich V.M. Detection of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genome determining resistance to fluoroquinolones by hybridization on biological microchips. // *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2008. 145(1): 108-113.
54. Arnow P.M., Bakir M., Thompson K. and Bova J.L. Endemic contamination of clinical specimens by *Mycobacterium gordonae*. // *Clinical infectious diseases*. 2000. 31(2): 472-476.

55. Baez-Saldana R., Delgado-Sanchez G., Garcia-Garcia L., Cruz-Hervert L.P., Montesinos-Castillo M., Ferreyra-Reyes L., Bobadilla-Del-Valle M., Canizales-Quintero S., Ferreira-Guerrero E., Tellez-Vazquez N., Montero-Campos R., Yanes-Lane M., Mongua-Rodriguez N., Martinez-Gamboa R. A., Sifuentes-Osornio J. and Ponce-de-Leon A. Isoniazid Mono-Resistant Tuberculosis: Impact on Treatment Outcome and Survival of Pulmonary Tuberculosis Patients in Southern Mexico 1995-2010. // *PloS one*. 2016. 11(12): e0168955.
56. Bahar H., Torun M. M., Öçer F. and Kocazeybek B. *Mobiluncus* species in gynaecological and obstetric infections: antimicrobial resistance and prevalence in a Turkish population. // *International journal of antimicrobial agents*. 2005. 25(3): 268-271.
57. Bai Z.-G., Yang K.-H., Liu Y.-L., Tian J.-H., Ma B., Mi D.-H., Jiang L., Tan J.-Y. and Gai Q.-Y. Azithromycin vs benzathine penicillin G for early syphilis: a meta-analysis of randomized clinical trials. // *International journal of STD & AIDS*. 2008. 19(4): 217-221.
58. Banuls M.J., Garcia-Pinon F., Puchades R. and Maquieira A. Chemical derivatization of compact disc polycarbonate surfaces for SNPs detection. // *Bioconjugate chemistry*. 2008. 19(3): 665-672.
59. Barbulovic-Nad I., Lucente M., Sun Y., Zhang M., Wheeler A.R. and Bussmann M. Bio-microarray fabrication techniques--a review. // *Critical reviews in biotechnology*. 2006. 26(4): 237-259.
60. Beeton M.L. and Spiller O.B. Antibiotic resistance among *Ureaplasma* spp. isolates: cause for concern? // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017. 72(2): 330-337.
61. Belisle J.T., Vissa V.D., Sievert T., Takayama K., Brennan P.J. and Besra G.S. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. // *Science*. 1997. 276(5317): 1420-1422.
62. Bengtson H.N., Homolka S., Niemann S., Reis A. J., da Silva P.E., Gerasimova Y.V., Kolpashchikov D.M. and Rohde K.H. Multiplex detection of extensively drug resistant tuberculosis using binary deoxyribozyme sensors. // *Biosensors & bioelectronics*. 2017. 94: 176-183.
63. Bespyatykh J.A., Zimenkov D.V., Shitikov E.A., Kulagina E.V., Lapa S.A., Gryadunov D.A., Ilina E.N. and Govorun V.M. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates using hydrogel oligonucleotide microarrays. // *Infection, genetics and evolution*. 2014. 26: 41-46.
64. Beyer A., Pollok S., Berg A., Weber K. and Popp J. Easy daylight fabricated hydrogel array for colorimetric DNA analysis. // *Macromolecular bioscience*. 2014. 14(6): 889-898.
65. Borden J.R., Paredes C.J. and Papoutsakis E.T. Diffusion, mixing, and associated dye effects in DNA-microarray hybridizations. // *Biophysical journal*. 2005. 89(5): 3277-3284.

66. Bottger E.C. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing. // *Clinical microbiology and infection*. 2011. 17(8): 1128-1134.
67. Brandis G. and Hughes D. Genetic characterization of compensatory evolution in strains carrying rpoB Ser531Leu, the rifampicin resistance mutation most frequently found in clinical isolates. // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013. 68(11): 2493-2497.
68. Brannigan J.A., Tirodimos I.A., Zhang Q.Y., Dowson C.G. and Spratt B.G. Insertion of an extra amino acid is the main cause of the low affinity of penicillin-binding protein 2 in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. // *Molecular microbiology*. 1990. 4(6): 913-919.
69. Brook I. Antibiotic Resistance of Anaerobic Bacteria. // *Antimicrobial Drug Resistance*. 2009. Mayers D., Humana Press: 873-899.
70. Bruderer S. and Leitner K. Genetically Modified (GM) Crops: molecular and regulatory details. // 2003. Basel, Switzerland BATS Centre: Biosafety and Sustainability: 199.
71. Brudey K., Driscoll J. R., Rigouts L., Prodinger W.M., Gori A., Al-Hajj S. A., et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. // *BMC microbiology*. 2006. 6: 23.
72. Buckley C., Trembizki E., Donovan B., Chen M., Freeman K., Guy R., Kundu R., Lahra M.M., Regan D. G., Smith H., Whiley D. M. and Investigators G. S. A real-time PCR assay for direct characterization of the *Neisseria gonorrhoeae* GyrA 91 locus associated with ciprofloxacin susceptibility. // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016. 71(2): 353-356.
73. Burian J., Ramon-Garcia S., Sweet G., Gomez-Velasco A., Av-Gay Y. and Thompson C. J. The mycobacterial transcriptional regulator whiB7 gene links redox homeostasis and intrinsic antibiotic resistance. // *The Journal of biological chemistry*. 2012. 287(1): 299-310.
74. Buriankova K., Doucet-Populaire F., Dorson O., Gondran A., Ghnassia J.C., Weiser J. and Pernodet J.L. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004. 48(1): 143-150.
75. Cabibbe A.M., Miotto P., Moure R., Alcaide F., Feuerriegel S., Pozzi G., Nikolayevskyy V., Drobniowski F., Niemann S., Reither K., Cirillo D. M. Lab-on-Chip-Based Platform for Fast Molecular Diagnosis of Multidrug-Resistant Tuberculosis. // *Journal of clinical microbiology*. 2015. 53(12): 3876-3880.
76. Call D.R. Challenges and opportunities for pathogen detection using DNA microarrays. // *Critical reviews in microbiology*. 2005. 31(2): 91-99.

77. Campbell P.J., Morlock G.P., Sikes R.D., Dalton T.L., Metchock B., Starks A.M., Hooks D.P., Cowan L.S., Plikaytis B.B. and Posey J.E. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011. 55(5): 2032-2041.
78. Castan P., de Pablo A., Fernandez-Romero N., Rubio J. M., Cobb B. D., Mingorance J. and Toro C. Point-of-care system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance in sputum samples. // *Journal of clinical microbiology*. 2014. 52(2): 502-507.
79. CDC. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2014. // 2015. Atlanta, U.S. Department of Health and Human Services.
80. Chambers H.F., Moreau D., Yajko D., Miick C., Wagner C., Hackbarth C., Kocagoz S., Rosenberg E., Hadley W. K. and Nikaïdo H. Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995. 39(12): 2620-2624.
81. Chen J.J., Hsueh H.M., DeLongchamp R.R., Lin C.J. and Tsai C.A. Reproducibility of microarray data: a further analysis of microarray quality control (MAQC) data. // *BMC bioinformatics*. 2007. 8: 412.
82. Chen W., Biswas T., Porter V. R., Tsodikov O. V. and Garneau-Tsodikova S. Unusual regioversatility of acetyltransferase Eis, a cause of drug resistance in XDR-TB. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011. 108(24): 9804-9808.
83. Chevaliez S., Rodriguez C. and Pawlotsky J.M. New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C. // *Gastroenterology*. 2012. 142(6): 1303-1313 e1301.
84. Chueca N., Rivadulla I., Lovatti R., Reina G., Blanco A., Fernandez-Caballero J. A., Cardenoso L., Rodriguez-Granjer J., Fernandez-Alonso M., Aguilera A., Alvarez M., Galan J. C. and Garcia F. Using NS5B Sequencing for Hepatitis C Virus Genotyping Reveals Discordances with Commercial Platforms. // *PloS one*. 2016. 11(4): e0153754.
85. Colangeli R., Helb D., Sridharan S., Sun J., Varma-Basil M., Hazbon M. H., Harbacheuski R., Megjugorac N.J., Jacobs W.R., Jr., Holzenburg A., Sacchettini J.C. and Alland D. The *Mycobacterium tuberculosis* *iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. // *Molecular microbiology*. 2005. 55(6): 1829-1840.
86. Colman R. E., Anderson J., Lemmer D., Lehmkühl E., Georghiou S. B., Heaton H., Wiggins K., Gillece J. D., Schupp J. M., Catanzaro D. G., Crudu V., Cohen T., Rodwell T. C. and Engelthaler D. M. Rapid Drug Susceptibility Testing of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Directly from Clinical Samples by Use of Amplicon Sequencing: a Proof-of-Concept Study. // *Journal of clinical microbiology*. 2016. 54(8): 2058-2067.

87. Comas I., Borrell S., Roetzer A., Rose G., Malla B., Kato-Maeda M., Galagan J., Niemann S. and Gagneux S. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. // *Nature genetics*. 2011. 44(1): 106-110.
88. Couldwell D.L. and Lewis D.A. *Mycoplasma genitalium* infection: current treatment options, therapeutic failure, and resistance-associated mutations. // *Infection and drug resistance*. 2015. 8: 147-161.
89. Cruz A. R., Pillay A., Ramirez L.G., Chi H., Valencia C., Alexander N., Radolf J. and Salazar J.C. Molecular typing and detection of macrolide resistance mutations in *T. pallidum* strains from Cali, Colombia. // *Sexually transmitted infections*. 2013. 89(Suppl 1): A234.
90. Dalton T., Cegielski P., Akksilp S., Asencios L., Campos Caoili J., Cho S. N., et al. Prevalence of and risk factors for resistance to second-line drugs in people with multidrug-resistant tuberculosis in eight countries: a prospective cohort study. // *Lancet*. 2012. 380(9851): 1406-1417.
91. Damin F., Galbiati S., Ferrari M. and Chiari M. DNA microarray-based solid-phase PCR on copoly (DMA-NAS-MAPS) silicon coated slides: An example of relevant clinical application. // *Biosensors & bioelectronics*. 2016. 78: 367-373.
92. Danilchanka O., Pavlenok M. and Niederweis M. Role of porins for uptake of antibiotics by *Mycobacterium smegmatis*. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008. 52(9): 3127-3134.
93. De Backer E., Verhelst R., Verstraelen H., Claeys G., Verschraegen G., Temmerman M. and Vanechoutte M. Antibiotic susceptibility of *Atopobium vaginae*. // *BMC infectious diseases*. 2006. 6(1): 51.
94. de Keijzer J., de Haas P.E., de Ru A.H., van Veelen P.A. and van Soolingen D. Disclosure of selective advantages in the "modern" sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype family by quantitative proteomics. // *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2014. 13(10): 2632-2645.
95. de Vos M., Muller B., Borrell S., Black P. A., van Helden P.D., Warren R.M., Gagneux S. and Victor T.C. Putative compensatory mutations in the *rpoC* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* are associated with ongoing transmission. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013. 57(2): 827-832.
96. Dégrange S., Renaudin H., Charron A., Bébéar C. and Bébéar C. M. Tetracycline resistance in *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma hominis*: prevalence in Bordeaux, France, from 1999 to 2002 and description of two tet(M)-positive isolates of *M. hominis* susceptible to tetracyclines. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008. 52(2): 742-744.

97. Demay C., Liens B., Burguiere T., Hill V., Couvin D., Millet J., Mokrousov I., Sola C., Zozio T. and Rastogi N. SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. // *Infection, genetics and evolution*. 2012. 12(4): 755-766.
98. Dhand A. and Snyderman D. Mechanism of resistance in metronidazole. // *Antimicrobial Drug Resistance*. 2009. Mayers D., Humana Press: 223-227.
99. Didelot A., Kotsopoulos S.K., Lupo A., Pekin D., Li X., Atochin I., Srinivasan P., Zhong Q., Olson J., Link D. R., Laurent-Puig P., Blons H., Hutchison J. B. and Taly V. Multiplex picoliter-droplet digital PCR for quantitative assessment of DNA integrity in clinical samples. // *Clinical chemistry*. 2013. 59(5): 815-823.
100. Dominguez J., Boettger E. C., Cirillo D., Cobelens F., Eisenach K. D., Gagneux S., Hillemann D., Horsburgh R., Molina-Moya B., Niemann S., Tortoli E., Whitelaw A., Lange C. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. // *The international journal of tuberculosis and lung disease*. 2016. 20(1): 24-42.
101. Dona V., Low N., Golparian D. and Unemo M. Recent advances in the development and use of molecular tests to predict antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. // *Expert review of molecular diagnostics*. 2017. 17(9): 845-859.
102. Dupuy A. and Simon R.M. Critical review of published microarray studies for cancer outcome and guidelines on statistical analysis and reporting. // *Journal of the National Cancer Institute*. 2007. 99(2): 147-157.
103. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. // *Journal of hepatology*. 2017. 66(1): 153-194.
104. European Centre for Disease Prevention and Control. Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* – results from a pilot study 2010-2011. // 2012. Stockholm, Sweden.
105. Edwards R. Resistance to beta-lactam antibiotics in *Bacteroides spp.* // *J Med Microbiol*. 1997. 46: 979-986.
106. Eitel Z., Sóki J., Urbán E. and Nagy E. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. // *Anaerobe*. 2013. 21(0): 43-49.
107. Eklund A. C. and Szallasi Z. Correction of technical bias in clinical microarray data improves concordance with known biological information. // *Genome biology*. 2008. 9(2): R26.

108. Eldholm V., Monteserin J., Rieux A., Lopez B., Sobkowiak B., Ritacco V. and Balloux F. Four decades of transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain. // *Nature communications*. 2015. 6: 7119.
109. Endimiani A., Guilarte Y., Tinguely R., Hirzberger L., Selvini S., Lupo A., Hauser C. and Furrer H. Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Switzerland (1998-2012): emergence of multidrug-resistant clones less susceptible to cephalosporins. // *BMC Infect Dis*. 2014. 14(1): 106.
110. Engstrom A., Perskvist N., Werngren J., Hoffner S. E. and Jureen P. Comparison of clinical isolates and in vitro selected mutants reveals that tlyA is not a sensitive genetic marker for capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011. 66(6): 1247-1254.
111. Epstein J. R., Ferguson J. A., Lee K. H. and Walt D. R. Combinatorial decoding: an approach for universal DNA array fabrication. // *Journal of the American Chemical Society*. 2003. 125(45): 13753-13759.
112. Epstein J. R., Lee M. and Walt D. R. High-density fiber-optic genosensor microsphere array capable of zeptomole detection limits. // *Analytical chemistry*. 2002. 74(8): 1836-1840.
113. Ferber D. Biochemistry. Protein that mimics DNA helps tuberculosis bacteria resist antibiotics. // *Science*. 2005. 308(5727): 1393.
114. Fillion A., Aubry A., Brossier F., Chauffour A., Jarlier V. and Veziris N. Impact of fluoroquinolone resistance on bactericidal and sterilizing activity of a moxifloxacin-containing regimen in murine tuberculosis. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013. 57(9): 4496-4500.
115. Fodor S.P., Read J.L., Pirrung M.C., Stryer L., Lu A.T. and Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. // *Science*. 1991. 251(4995): 767-773.
116. Fonseca J.D., Knight G.M. and McHugh T.D. The complex evolution of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *International journal of infectious diseases*. 2015. 32: 94-100.
117. Foongladda S., Banu S., Pholwat S., Gratz J., S O. T., Nakkerd N., Chinli R., Ferdous S. S., Rahman S. M., Rahman A., Ahmed S., Heysell S., Sariko M., Kibiki G. and Houpt E. Comparison of TaqMan((R)) Array Card and MYCOTB(TM) with conventional phenotypic susceptibility testing in MDR-TB. // *The international journal of tuberculosis and lung disease*. 2016. 20(8): 1105-1112.
118. Fraiture M. A., Herman P., Taverniers I., De Loose M., Deforce D. and Roosens N. H. Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions. // *BioMed research international*. 2015. 2015: 392872.



119. Gagneux S., Burgos M.V., DeRiemer K., Encisco A., Munoz S., Hopewell P. C., Small P.M. and Pym A.S. Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. // *PLoS pathogens*. 2006. 2(6): e61.
120. Garton N.J., Waddell S.J., Sherratt A.L., Lee S.M., Smith R.J., Senner C., Hinds J., Rajakumar K., Adegbola R.A., Besra G.S., Butcher P.D. and Barer M.R. Cytological and transcript analyses reveal fat and lazy persister-like bacilli in tuberculous sputum. // *PLoS medicine*. 2008. 5(4): e75.
121. Geißdörfer W., Böhmer C., Pelz K., Schoerner C., Frobenius W. and Bogdan C. Tuboovarian abscess caused by *Atopobium vaginae* following transvaginal oocyte recovery. // *Journal of clinical microbiology*. 2003. 41(6): 2788-2790.
122. Gengenbacher M. and Kaufmann S. H. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. // *FEMS microbiology reviews*. 2012. 36(3): 514-532.
123. Gianecini R., Oviedo C., Stafforini G. and Galarza P. *Neisseria gonorrhoeae* Resistant to Ceftriaxone and Cefixime, Argentina. // *Emerging infectious diseases*. 2016. 22(6): 1139-1141.
124. Gikalo M.B., Nosova E.Y., Krylova L.Y. and Moroz A.M. The role of *eis* mutations in the development of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region. // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012. 67(9): 2107-2109.
125. Golparian D., Shafer W.M., Ohnishi M. and Unemo M. Importance of multidrug efflux pumps in the antimicrobial resistance property of clinical multidrug-resistant isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. // *Antimicrob Agents Chemother*. 2014. 58(6): 3556-3559.
126. Gomgnimbou M.K., Hernandez-Neuta I., Panaiotov S., Bachiyska E., Palomino J. C., Martin A., del Portillo P., Refregier G. and Sola C. Tuberculosis-spoligo-rifampin-isoniazid typing: an all-in-one assay technique for surveillance and control of multidrug-resistant tuberculosis on Luminex devices. // *Journal of clinical microbiology*. 2013. 51(11): 3527-3534.
127. Goodwin S., McPherson J.D. and McCombie W.R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. // *Nature reviews Genetics*. 2016. 17(6): 333-351.
128. Gryadunov D., Dementieva E., Mikhailovich V., Nasedkina T., Rubina A., Savvateeva E., Fesenko E., Chudinov A., Zimenkov D., Kolchinsky A. and Zasedatelev A. Gel-based microarrays in clinical diagnostics in Russia. // *Expert review of molecular diagnostics*. 2011. 11(8): 839-853.
129. Gryadunov D., Mikhailovich V., Lapa S., Roudinskii N., Donnikov M., Pan'kov S., Markova O., Kuz'min A., Chernousova L., Skotnikova O., Moroz A., Zasedatelev A. and Mirzabekov A. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. // *Clinical microbiology and infection*. 2005. 11(7): 531-539.

130. Gryadunov D., Nicot F., Dubois M., Mikhailovich V., Zasedatelev A. and Izopet J. Hepatitis C virus genotyping using an oligonucleotide microarray based on the NS5B sequence. // Journal of clinical microbiology. 2010. 48(11): 3910-3917.
131. Gryadunov D.A., Mikhailovich V.M., Nicot F., Dubois M., Zasedatelev A.S. and Izopet J. Method for identifying the genotype and subtype of Hepatitis C virus on a biological microchip. // 2012. EP Patent. 2236624 B1: 1-76.
132. Gryadunov D.A., Mikhailovich V.M., Noskov A.N., Lapa S.A., Sobolev A.S, Pan'kov S.V., Rubina A.Yu, Zasedatelev A.S. and Mirzabekov A.D. Detection of Bacillus anthracis using multiplex PCR on the oligonucleotide biochip. // Doklady Biochemistry and biophysics. 2001. 381: 384-386.
133. Guttikonda S. K., Marri P., Mammadov J., Ye L., Soe K., Richey K., Cruse J., Zhuang M., Gao Z., Evans C., Rounsley S. and Kumpatla S. P. Molecular Characterization of Transgenic Events Using Next Generation Sequencing Approach. // PloS one. 2016. 11(2): e0149515.
134. Hall L., Jude K. P., Clark S. L., Dionne K., Merson R., Boyer A., Parrish N. M. and Wengenack N.L. Evaluation of the Sensititre MycoTB plate for susceptibility testing of the Mycobacterium tuberculosis complex against first- and second-line agents. // Journal of clinical microbiology. 2012. 50(11): 3732-3734.
135. Han J.S., Lee J.J., Anandan T., Zeng M., Sripathi S., Jahng W.J., Lee S.H., Suh J.W. and Kang C.M. Characterization of a chromosomal toxin-antitoxin, Rv1102c-Rv1103c system in Mycobacterium tuberculosis. // Biochemical and biophysical research communications. 2010. 400(3): 293-298.
136. Harmsen D., Dostal S., Roth A., Niemann S., Rothganger J., Sammeth M., Albert J., Frosch M. and Richter E. RIDOM: comprehensive and public sequence database for identification of Mycobacterium species. // BMC infectious diseases. 2003. 3: 26.
137. Harwich M., Alves J., Buck G., Strauss J., Patterson J., Oki A., Girerd P. and Jefferson K. Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies. // BMC Genomics. 2010. 11(1): 375.
138. Hayden M.J., Nguyen T.M., Waterman A. and Chalmers K.J. Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. // BMC genomics. 2008. 9: 80.
139. He Z., Wu L., Li X., Fields M. W. and Zhou J. Empirical establishment of oligonucleotide probe design criteria. // Applied and environmental microbiology. 2005. 71(7): 3753-3760.

140. Hegde S.S., Vetting M.W., Roderick S.L., Mitchenall L.A., Maxwell A., Takiff H.E. and Blanchard J.S. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. // *Science*. 2005. 308(5727): 1480-1483.
141. Helb D., Jones M., Story E., Boehme C., Wallace E., Ho K., Kop J., Owens M. R., Rodgers R., Banada P., Safi H., Blakemore R., Lan N. T., Jones-Lopez E. C., Levi M., Burday M., Ayakaka I., Mugerwa R. D., McMillan B., Winn-Deen E., Christel L., Dailey P., Perkins M. D., Persing D. H. and Alland D. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. // *Journal of clinical microbiology*. 2010. 48(1): 229-237.
142. Hezode C. Pan-genotypic treatment regimens for hepatitis C virus: Advantages and disadvantages in high- and low-income regions. // *Journal of viral hepatitis*. 2017. 24(2): 92-101.
143. Hezode C., Asselah T., Reddy K.R., Hassanein T., Berenguer M., Fleischer-Stepniewska K., Marcellin P., Hall C., Schnell G., Pilot-Matias T., Mobashery N., Redman R., Vilchez R. A. and Pol S. Ombitasvir plus paritaprevir plus ritonavir with or without ribavirin in treatment-naive and treatment-experienced patients with genotype 4 chronic hepatitis C virus infection (PEARL-I): a randomised, open-label trial. // *Lancet*. 2015. 385(9986): 2502-2509.
144. Hoek K.G., Schaaf H.S., Gey van Pittius N.C., van Helden P.D. and Warren R.M. Resistance to pyrazinamide and ethambutol compromises MDR/XDR-TB treatment. // *South African medical journal*. 2009. 99(11): 785-787.
145. Hoffmann J., Mark D., Lutz S., Zengerle R. and von Stetten F. Pre-storage of liquid reagents in glass ampoules for DNA extraction on a fully integrated lab-on-a-chip cartridge. // *Lab on a chip*. 2010. 10(11): 1480-1484.
146. Holst-Jensen A., Spilsberg B., Arulandhu A. J., Kok E., Shi J. and Zel J. Application of whole genome shotgun sequencing for detection and characterization of genetically modified organisms and derived products. // *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2016. 408(17): 4595-4614.
147. Homolka S., Projahn M., Feuerriegel S., Ubben T., Diel R., Nubel U. and Niemann S. High resolution discrimination of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex strains based on single nucleotide polymorphisms. // *PloS one*. 2012. 7(7): e39855.
148. Hook A. L., Anderson D. G., Langer R., Williams P., Davies M. C. and Alexander M. R. High throughput methods applied in biomaterial development and discovery. // *Biomaterials*. 2010. 31(2): 187-198.
149. Huang W. L., Hsu Z. J., Chang T. C. and Jou R. Rapid and accurate detection of rifampin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using an oligonucleotide array. // *Clinical microbiology and infection*. 2014. 20(9): O542-549.

150. Ilina E.N., Malakhova M.V., Bodoev I.N., Oparina N.Y., Filimonova A.V. and Govorun V.M. Mutation in ribosomal protein S5 leads to spectinomycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. // *Frontiers in microbiology*. 2013. 4: 186.
151. Ilina E.N., Vereshchagin V.A., Borovskaya A.D., Malakhova M.V., Sidorenko S.V., Al-Khafaji N.C., Kubanova A.A. and Govorun V.M. Relation between genetic markers of drug resistance and susceptibility profile of clinical *Neisseria gonorrhoeae* strains. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008. 52(6): 2175-2182.
152. Islam M.S., Richards J.P. and Ojha A.K. Targeting drug tolerance in mycobacteria: a perspective from mycobacterial biofilms. // *Expert review of anti-infective therapy*. 2012. 10(9): 1055-1066.
153. Jacobsson S., Golparian D., Cole M., Spiteri G., Martin I., Bergheim T., Borrego M. J., Crowley B., Crucitti T., Van Dam A. P., Hoffmann S., Jeverica S., Kohl P., Mlynarczyk-Bonikowska B., Pakarna G., Stary A., Stefanelli P., Pavlik P., Tzelepi E., Abad R., Harris S. R. and Unemo M. WGS analysis and molecular resistance mechanisms of azithromycin-resistant (MIC >2 mg/L) *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Europe from 2009 to 2014. // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016. 71(11): 3109-3116.
154. Jayaraman A., Hall C.K. and Genzer J. Computer simulation study of probe-target hybridization in model DNA microarrays: effect of probe surface density and target concentration. // *The Journal of chemical physics*. 2007. 127(14): 144912.
155. Jensen J.S., Fernandes P. and Unemo M. In vitro activity of the new fluoroketolide solithromycin (CEM-101) against macrolide-resistant and -susceptible *Mycoplasma genitalium* strains. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014. 58(6): 3151-3156.
156. Johansen S.K., Maus C.E., Plikaytis B.B. and Douthwaite S. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. // *Molecular cell*. 2006. 23(2): 173-182.
157. Joob B. and Wiwanitkit V. Diagnostic performance of GenoType(R) MTBDRplus line probe assay. // *International journal of mycobacteriology*. 2017. 6(3): 322.
158. Josey W.E. and Schwebke J.R. The polymicrobial hypothesis of bacterial vaginosis causation: a reassessment. // *International journal of STD & AIDS*. 2008. 19(3): 152-154.
159. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M. and van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. // *Journal of clinical microbiology*. 1997. 35(4): 907-914.

160. Kamle M., Kumar P., Patra J.K. and Bajpai V.K. Current perspectives on genetically modified crops and detection methods. // *3 Biotech*. 2017. 7(3): 219.
161. Kamle S., Ojha A. and Kumar A. Development of an enzyme linked immunosorbant assay for the detection of Cry2Ab Protein in transgenic plants. // *GM crops*. 2011. 2(2): 118-125.
162. Kaur S., Rana V., Singh P., Trivedi G., Anand S., Kaur A., Gupta P., Jain A. and Sharma C. Novel mutations conferring resistance to kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Northern India. // *Tuberculosis*. 2016. 96: 96-101.
163. Ke R., Mignardi M., Hauling T. and Nilsson M. Fourth Generation of Next-Generation Sequencing Technologies: Promise and Consequences. // *Human mutation*. 2016. 37(12): 1363-1367.
164. Kent P. and Kubica G. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. // 1985. Atlanta, GA, USA, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention.
165. Khairullin R., Vorobyev D., Obukhov A., Kuular U. H., Kubanova A., Kubanov A. and Unemo M. Syphilis epidemiology in 1994-2013, molecular epidemiological strain typing and determination of macrolide resistance in *Treponema pallidum* in 2013-2014 in Tuva Republic, Russia. // *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2016. 124(7): 595-602.
166. Khodakov D., Wang C. and Zhang D. Y. Diagnostics based on nucleic acid sequence variant profiling: PCR, hybridization, and NGS approaches. // *Advanced drug delivery reviews*. 2016. 105(Pt A): 3-19.
167. Khodakov D.A. and Ellis A.V. Recent developments in nucleic acid identification using solid-phase enzymatic assays. // *Microchimica Acta*. 2014. 181(13): 1633-1646.
168. Khodakov D.A., Mamaev D.D., Dementieva E.I., Filatov I.V., Yurasov D.A., Cherepanov A.I., Vasiliskov V.A., Smoldovskaya O.V., Gryadunov D.A., Mikhailovich V.M., Zasedatelev A.S. and Makarov A.A. Microfluidic module for automated isolation and purification of nucleic acids from biological samples. // *Doklady Biochemistry and biophysics*. 2010. 435: 291-294.
169. Khodakov D.A., Zakharova N.V., Gryadunov D.A., Filatov F.P., Zasedatelev A.S. and Mikhailovich V.M. An oligonucleotide microarray for multiplex real-time PCR identification of HIV-1, HBV, and HCV. // *BioTechniques*. 2008. 44(2): 241-246, 248.
170. Khrapko K.R., Lysov Yu.P., Khorlin A.A., Ivanov I.B., Yershov G.M., Vasilenko S.K., Florentiev V.L. and Mirzabekov A.D. A method for DNA sequencing by hybridization with

- oligonucleotide matrix. // DNA sequence : the journal of DNA sequencing and mapping. 1991. 1(6): 375-388.
171. Kikuchi M., Ito S., Yasuda M., Tsuchiya T., Hatazaki K., Takanashi M., Ezaki T. and Deguchi T. Remarkable increase in fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium* in Japan. // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2014. 69(9): 2376-2382.
172. Kim Y., Sohn D. and Tan W. Molecular beacons in biomedical detection and clinical diagnosis. // International journal of clinical and experimental pathology. 2008. 1(2): 105-116.
173. Kissinger P. Epidemiology and treatment of trichomoniasis. // Current infectious diseases report. 2015. 17(6): 484.
174. Koehne J., Chen H., Li J., Cassell A. M., Ye Q., Ng H. T., Han J. and Meyyappan M. Ultrasensitive label-free DNA analysis using an electronic chip based on carbon nanotube nanoelectrode arrays. // Nanotechnology. 2003. 14(12): 1239-1245.
175. Kohanski M.A., DePristo M.A. and Collins J.J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. // Molecular cell. 2010. 37(3): 311-320.
176. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A. and Collins J.J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. // Cell. 2007. 130(5): 797-810.
177. Kohlhoff S.A. and Hammerschlag M.R. Treatment of chlamydial infections: 2014 update. // Expert opinion on pharmacotherapy. 2015. 16(2): 205-212.
178. Kong L.X., Perebikovskiy A., Moebius J., Kulinsky L. and Madou M. Lab-on-a-CD: A Fully Integrated Molecular Diagnostic System. // Journal of laboratory automation. 2016. 21(3): 323-355.
179. Kubanov A., Vorobyev D., Chestkov A., Leinsoo A., Shaskolskiy B., Dementieva E., Solomka V., Plakhova X., Gryadunov D. and Deryabin D. Molecular epidemiology of drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Russia (Current Status, 2015). // BMC infectious diseases. 2016. 16: 389.
180. Kubanova A., Frigo N., Kubanov A., Sidorenko S., Lesnaya I., Polevshikova S., Solomka V., Bukanov N., Domeika M. and Unemo M. The Russian gonococcal antimicrobial susceptibility programme (RU-GASP)--national resistance prevalence in 2007 and 2008, and trends during 2005-2008. // Euro surveillance. 2010. 15(14).
181. Kubanova A., Kubanov A., Frigo N., Solomka V., Semina V., Vorobyev D., Khairullin R. and Unemo M. Russian gonococcal antimicrobial susceptibility programme (RU-GASP)--resistance in *Neisseria gonorrhoeae* during 2009-2012 and NG-MAST genotypes in 2011 and 2012. // BMC infectious diseases. 2014. 14: 342.

182. Kubanova A.A., Kubanov A.A., Kozhushnaia O.S., Vorob'ev D.V., Solomka V.S. and Frigo N.V. The role of some individual amino acid substitutions in penicillin-binding protein (PBP2) of *Neisseria gonorrhoeae* in the emergence of resistance to ceftriaxone. // *Molekuliarnaia biologii*. 2014. 48(6): 977-982.
183. Kuiken C., Hraber P., Thurmond J. and Yusim K. The hepatitis C sequence database in Los Alamos. // *Nucleic acids research*. 2008. 36: D512-516.
184. Kurbatova E.V., Cavanaugh J.S., Shah N. S., Wright A., Kim H., Metchock B., Van Deun A., Barrera L., Boulahbal F., Richter E., Martin-Casabona N., Arias F., Zemanova I., Drobniewski F., Santos Silva A., Coulter C., Lumb R. and Cegielski J.P. Rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: susceptibility to isoniazid and other anti-tuberculosis drugs. // *The international journal of tuberculosis and lung disease*. 2012. 16(3): 355-357.
185. Kurbatova E.V., Kaminski D.A., Erokhin V.V., Volchenkov G.V., Andreevskaya S.N., Chernousova L.N., Demikhova O.V., Ershova J.V., Kaunetis N.V., Kuznetsova T.A., Larionova E.E., Smirnova T.G., Somova T.R., Vasilieva I.A., Vorobieva A.V., Zolkina S.S. and Cegielski J.P. Performance of Cepheid (R) Xpert MTB/RIF (R) and TB-Biochip (R) MDR in two regions of Russia with a high prevalence of drug-resistant tuberculosis. // *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2013. 32(6): 735-743.
186. Kushnir A.V., Muminov T.A., Bayev A.I., Khrapov E.A. and Filipenko M.L. Molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Almaty, Kazakhstan, by VNTR analysis, Opa-typing and NG-MAST. // *Infection, genetics and evolution*. 2012. 12(3): 570-576.
187. Kuznetsova V.E., Spitsyn M.A., Shershov V.E., Guseinov T.O., Fesenko E.E., Lapa S.A., Ikonnikova A.Y., Avdonina M.A., Nasedkina T.V., Zasedatelev A.S. and Chudinov A.V. Novel fluorescently labeled nucleotides: synthesis, spectral properties and application in polymerase chain reaction. // *Mendeleev Communications*. 2016. 26(2): 95-98.
188. Le Goff G.C., Srinivas R.L., Hill W.A. and Doyle P.S. Hydrogel microparticles for biosensing. // *European polymer journal*. 2015. 72: 386-412.
189. Lebedzeu F., Golparian D., Titov L., Pankratava N., Glazkova S., Shimanskaya I., Charniakova N., Lukyanau A., Domeika M. and Unemo M. Antimicrobial susceptibility/resistance and NG-MAST characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* in Belarus, Eastern Europe, 2010-2013. // *BMC infectious diseases*. 2015. 15: 29.
190. Lee K., Babajanyan A., Melikyan H., Kim C., Kim S., Kim J., Lee J. H., Friedman B., Levicky R. and Kalachikov S. Label-free DNA microarray bioassays using a near-field scanning microwave microscope. // *Biosensors & bioelectronics*. 2013. 42: 326-331.

191. Leinsoo A., Shaskolskiy B., Dementieva E., Runina A., Vorobyev D., Plakhova X., Kubanov A. and Gryadunov D. Microarray-based assay for simultaneous identification and drug resistance detection of microorganisms causing sexually transmitted diseases. // *International Journal of Infectious Diseases*. 2016. 45(S1): 75-76.
192. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. // *Current topics in microbiology and immunology*. 2008. 322: 107-131.
193. Li J., Gao X., Luo T., Wu J., Sun G., Liu Q., Jiang Y., Zhang Y., Mei J. and Gao Q. Association of gyrA/B mutations and resistance levels to fluoroquinolones in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. // *Emerging microbes & infections*. 2014. 3(3): e19.
194. Li Q. J., Jiao W. W., Yin Q. Q., Xu F., Li J. Q., Sun L., Xiao J., Li Y. J., Mokrousov I., Huang H. R. and Shen A. D. Compensatory Mutations of Rifampin Resistance Are Associated with Transmission of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype Strains in China. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016. 60(5): 2807-2812.
195. Linger Y., Kukhtin A., Golova J., Perov A., Lambarqui A., Bryant L., Rudy G. B., Dionne K., Fisher S. L., Parrish N. and Chandler D. P. Simplified microarray system for simultaneously detecting rifampin, isoniazid, ethambutol, and streptomycin resistance markers in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Journal of clinical microbiology*. 2014. 52(6): 2100-2107.
196. Liu J. and Nikaido H. A mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids accumulates meromycolates. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999. 96(7): 4011-4016.
197. Liu J., Rosenberg E. Y. and Nikaido H. Fluidity of the lipid domain of cell wall from *Mycobacterium chelonae*. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995. 92(24): 11254-11258.
198. Liu J., Williams B. A., Gwartz R. M., Wold B. J. and Quake S. Enhanced signals and fast nucleic acid hybridization by microfluidic chaotic mixing. // *Angewandte Chemie*. 2006. 45(22): 3618-3623.
199. Löfmark S., Edlund C. and Nord C. E. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. // *Clinical infectious diseases*. 2010. 50(S1): S16-S23.
200. Low N. and Unemo M. Molecular tests for the detection of antimicrobial resistant *Neisseria gonorrhoeae*: when, where, and how to use? // *Current opinion in infectious diseases*. 2016. 29(1): 45-51.



201. Lu C., Ye T., Zhu G., Feng P., Ma H., Lu R. and Lai W. Phenotypic and genetic characteristics of macrolide and lincosamide resistant *Ureaplasma urealyticum* isolated in Guangzhou, China. // *Current microbiology*. 2010. 61(1): 44-49.
202. Luetkemeyer A.F., Kendall M. A., Wu X., Lourenco M. C., Jentsch U., Swindells S., Qasba S.S., Sanchez J., Havlir D.V., Grinsztejn B., Sanne I.M., Firnhaber C. Evaluation of two line probe assays for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis (TB) drug resistance, and non-TB Mycobacteria in HIV-infected individuals with suspected TB. // *Journal of clinical microbiology*. 2014. 52(4): 1052-1059.
203. Luna V.A., Cousin S., Whittington W.L.H. and Roberts M.C. Identification of the conjugative *mef* gene in clinical *Acinetobacter junii* and *Neisseria gonorrhoeae* isolates. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000. 44(9): 2503-2506.
204. MacBeath G. and Schreiber S.L. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. // *Science*. 2000. 289(5485): 1760-1763.
205. Macia M.D., Blanquer D., Togores B., Sauleda J., Perez J.L. and Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005. 49(8): 3382-3386.
206. Made D., Degner C. and Grohmann L. Detection of genetically modified rice: A construct-specific real-time PCR method based on DNA sequences from transgenic Bt rice. // *European Food Research and Technology*. 2006. 224: 271-278.
207. Madison B., Robinson-Dunn B., George I., Gross W., Lipman H., Metchock B., Sloutsky A., Washabaugh G., Mazurek G. and Ridderhof J. Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis by agar proportion and radiometric methods. // *Journal of clinical microbiology*. 2002. 40(11): 3976-3979.
208. Madsen C.T., Jakobsen L., Buriankova K., Doucet-Populaire F., Pernodet J.L. and Douthwaite S. Methyltransferase Erm(37) slips on rRNA to confer atypical resistance in Mycobacterium tuberculosis. // *The Journal of biological chemistry*. 2005. 280(47): 38942-38947.
209. Malik S., Willby M., Sikes D., Tsodikov O.V. and Posey J.E. New insights into fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis: functional genetic analysis of *gyrA* and *gyrB* mutations. // *PloS one*. 2012. 7(6): e39754.
210. Mamaev D., Shaskolskiy B., Dementieva E., Khodakov D., Yurasov D., Yurasov R., Zimenkov D., Mikhailovich V., Zasedatelev A. and Gryadunov D. Rotary-based platform with disposable fluidic modules for automated isolation of nucleic acids. // *Biomedical microdevices*. 2015. 17(1): 18.

211. Mamaev D.D., Khodakov D.A., Dement'eva E.I., Filatov I.V., Iurasov D.A., Cherepanov A.I., Vasiliskov V.A., Smoldovskaia O.V., Zimenkov D.V., Griadunov D.A., Mikhailovich V.M. and Zasedatelev A.S. Method for automated extraction and purification of nucleic acids and its implementation in microfluidic system. // *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*. 2011. 47(2): 231-240.
212. Manns M. P., Buti M., Gane E., Pawlotsky J. M., Razavi H., Terrault N. and Younossi Z. Hepatitis C virus infection. // *Nature reviews Disease primers*. 2017. 3: 17006.
213. Margolis E. and Fredricks D. N. Bacterial vaginosis-associated bacteria. // *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*. 2015. Schwartzman Y.-W. Boston, Academic Press: 1487-1496.
214. Martin D. H. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. // *The American journal of the medical sciences*. 2012. 343(1): 2-9.
215. Marzancola M. G., Sedighi A. and Li P. C. DNA Microarray-Based Diagnostics. // *Methods in molecular biology*. 2016. 1368: 161-178.
216. Matějková P., Flasarová M., Zákoucká H., Bořek M., Křemenová S., Arenberger P., Woznicová V., Weinstock G. M. and Šmajš D. Macrolide treatment failure in a case of secondary syphilis: a novel A2059G mutation in the 23S rRNA gene of *Treponema pallidum subsp. pallidum*. // *Journal of medical microbiology*. 2009. 58(6): 832-836.
217. Maus C.E., Plikaytis B.B. and Shinnick T.M. Mutation of tlyA confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005. 49(2): 571-577.
218. Mayer C. and Takiff H. The Molecular Genetics of Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Microbiology spectrum*. 2014. 2(4): MGM2-0009-2013.
219. Mazumder S. A., Hicks A. and Norwood J. *Mycobacterium gordonae* pulmonary infection in an immunocompetent adult. // *North American journal of medical sciences*. 2010. 2(4): 205-207.
220. McGrath M., Gey van Pittius N.C., van Helden P.D., Warren R.M. and Warner D.F. Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014. 69(2): 292-302.
221. McIlleron H., Wash P., Burger A., Norman J., Folb P.I. and Smith P. Determinants of rifampin, isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol pharmacokinetics in a cohort of tuberculosis patients. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006. 50(4): 1170-1177.
222. McQuain M.K., Seale K., Peek J., Fisher T.S., Levy S., Stremmler M.A. and Haselton F.R. Chaotic mixer improves microarray hybridization. // *Analytical biochemistry*. 2004. 325(2): 215-226.

223. Menard J.P. Antibacterial treatment of bacterial vaginosis: current and emerging therapies. // *International journal of women's health*. 2011. 3: 295-305.
224. World Health Organization and Fondation Merieux. TB diagnostics and laboratory services: actions for care delivery and sustainability. // 2012.
225. Michiels S., Koscielny S. and Hill C. Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. // *Lancet*. 2005. 365(9458): 488-492.
226. Mikhailovich V., Lapa S., Gryadunov D., Sobolev A., Strizhkov B., Chernyh N., Skotnikova O., Irtuganova O., Moroz A., Litvinov V., Vladimirskii M., Perelman M., Chernousova L., Erokhin V., Zasedatelev A. and Mirzabekov A. Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. // *Journal of clinical microbiology*. 2001. 39(7): 2531-2540.
227. Mirzabekov A.D. DNA sequencing by hybridization--a megasequencing method and a diagnostic tool? // *Trends in biotechnology*. 1994. 12(1): 27-32.
228. Mohamed N.A., Rashid Z.Z. and Wong K.K. Hepatitis C virus genotyping methods: evaluation of AmpliSens((R)) HCV-1/2/3-FRT compared to sequencing method. // *Journal of clinical laboratory analysis*. 2014. 28(3): 224-228.
229. Mokrousov I. The quiet and controversial: Ural family of *Mycobacterium tuberculosis*. // *Infection, genetics and evolution*. 2012. 12(4): 619-629.
230. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis*. // *Clinical microbiology reviews*. 2013. 26(2): 342-360.
231. Mokrousov I. Emerging clones of *Mycobacterium tuberculosis* in Russia and former Soviet Union countries: Beijing genotype and beyond. // *International journal of mycobacteriology*. 2016. 5 Suppl 1: S69-S70.
232. Molina-Moya B., Gomgnimbou M. K., Lafoz C., Lacoma A., Prat C., Refregier G., Samper S., Dominguez J. and Sola C. Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Strains with TB-SPRINT. // *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2017.
233. Molina-Moya B., Lacoma A., Prat C., Diaz J., Dudnyk A., Haba L., Maldonado J., Samper S., Ruiz-Manzano J., Ausina V. and Dominguez J. AID TB resistance line probe assay for rapid detection of resistant *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. // *The Journal of infection*. 2015. 70(4): 400-408.
234. Montero C., Mateu G., Rodriguez R. and Takiff H. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001. 45(12): 3387-3392.

235. Morris R.P., Nguyen L., Gatfield J., Visconti K., Nguyen K., Schnappinger D., Ehrt S., Liu Y., Heifets L., Pieters J., Schoolnik G. and Thompson C. J. Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. 102(34): 12200-12205.
236. Muller B., Streicher E. M., Hoek K. G., Tait M., Trollip A., Bosman M.E., Coetzee G.J., Chabula-Nxiweni E.M., Hoosain E., Gey van Pittius N. C., Victor T. C., van Helden P.D. and Warren R.M. *inhA* promoter mutations: a gateway to extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa? // *The international journal of tuberculosis and lung disease*. 2011. 15(3): 344-351.
237. Munoz J.L. and Goje O.J. *Mycoplasma genitalium*: An Emerging Sexually Transmitted Infection. // *Scientifica*. 2016. 2016: 7537318.
238. Murphy D.G., Sablon E., Chamberland J., Fournier E., Dandavino R. and Tremblay C.L. Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa. // *Journal of clinical microbiology*. 2015. 53(3): 967-972.
239. Murphy D.G., Willems B., Deschenes M., Hilzenrat N., Mousseau R. and Sabbah S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. // *Journal of clinical microbiology*. 2007. 45(4): 1102-1112.
240. Nabu S., Lawung R., Isarankura-Na-Ayudhya P., Isarankura-Na-Ayudhya C., Roytrakul S. and Prachayasittikul V. Reference map and comparative proteomic analysis of *Neisseria gonorrhoeae* displaying high resistance against spectinomycin. // *Journal of medical microbiology*. 2014. 63(Pt 3): 371-385.
241. Naiser T., Kayser J., Mai T., Michel W. and Ott A. Position dependent mismatch discrimination on DNA microarrays - experiments and model. // *BMC bioinformatics*. 2008. 9: 509.
242. Nampoothiri K.M., Rubex R., Patel A.K., Narayanan S.S., Krishna S., Das S.M. and Pandey A. Molecular cloning, overexpression and biochemical characterization of hypothetical beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. // *Journal of applied microbiology*. 2008. 105(1): 59-67.
243. Nash K.A., Zhang Y., Brown-Elliott B.A. and Wallace R.J., Jr. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005. 55(2): 170-177.
244. Nelson B.P., Grimsrud T.E., Liles M.R., Goodman R.M. and Corn R.M. Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays. // *Analytical chemistry*. 2001. 73(1): 1-7.

245. Ng L. K., Martin I., Liu G. and Bryden L. Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002. 46(9): 3020-3025.
246. Nguyen L., Chinnapapagari S. and Thompson C.J. FbpA-Dependent biosynthesis of trehalose dimycolate is required for the intrinsic multidrug resistance, cell wall structure, and colonial morphology of *Mycobacterium smegmatis*. // *Journal of bacteriology*. 2005. 187(19): 6603-6611.
247. Nicot F., Legrand-Abravanel F., Sandres-Saune K., Boulestin A., Dubois M., Alric L., Vinel J. P., Pasquier C. and Izopet J. Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4 strains circulating in south-western France. // *The Journal of general virology*. 2005. 86(Pt 1): 107-114.
248. Niederweis M. Mycobacterial porins--new channel proteins in unique outer membranes. // *Molecular microbiology*. 2003. 49(5): 1167-1177.
249. Nielsen H.B., Wernersson R. and Knudsen S. Design of oligonucleotides for microarrays and perspectives for design of multi-transcriptome arrays. // *Nucleic acids research*. 2003. 31(13): 3491-3496.
250. Nishino K. and Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. // *Journal of bacteriology*. 2001. 183(20): 5803-5812.
251. Niward K., Angeby K., Chryssanthou E., Paues J., Bruchfeld J., Jureen P., Giske C.G., Kahlmeter G. and Schon T. Susceptibility testing breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis* categorize isolates with resistance mutations in *gyrA* as susceptible to fluoroquinolones: implications for MDR-TB treatment and the definition of XDR-TB. // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016. 71(2): 333-338.
252. Nolan J.P. and Sklar L. A. Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm. // *Trends in biotechnology*. 2002. 20(1): 9-12.
253. Nosova E.Yu, Krasnova M.A., Galkina K., Makarova M.V., Litvinov V.I. and Moroz A.M. Comparing performance of "TB-BIOCHIP", "Xpert MTB/RIF" and "genotype MTBDRplus" assays for fast identification of mutations in the *Mycobacterium tuberculosis* complex in sputum from TB patients. // *Molekuliarnaia biologiya*. 2013. 47(2): 267-274.
254. Nosova E.Y., Zimenkov D.V., Khakhalina A.A., Isakova A.I., Krylova L.Y., Makarova M.V., Galkina K.Y., Krasnova M.A., Safonova S.G., Litvinov V.I., Gryadunov D.A. and Bogorodskaya E.M. A Comparison of the Sensititre MycoTB Plate, the Bactec MGIT 960, and a Microarray-Based Molecular Assay for the Detection of Drug Resistance in Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Moscow, Russia. // *PloS one*. 2016. 11(11): e0167093.

255. Nsofor C.A. DNA microarrays and their applications in medical microbiology. // *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 2014. 9(1): 1-11.
256. Oddy M. H., Santiago J. G. and Mikkelsen J. C. Electrokinetic instability micromixing. // *Analytical chemistry*. 2001. 73(24): 5822-5832.
257. Ohnishi M., Golparian D., Shimuta K., Saika T., Hoshina S., Iwasaku K., Nakayama S., Kitawaki J. and Unemo M. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011. 55(7): 3538-3545.
258. Olesky M., Zhao S., Rosenberg R. L. and Nicholas R. A. Porin-mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with penB mutations. // *Journal of bacteriology*. 2006. 188(7): 2300-2308.
259. Olesky M., Zhao S., Rosenberg R.L. and Nicholas R.A. Porin-mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with penB mutations. // *Journal of bacteriology*. 2006. 188(7): 2300-2308.
260. Orpana A.K., Ho T.H. and Stenman J. Multiple heat pulses during PCR extension enabling amplification of GC-rich sequences and reducing amplification bias. // *Analytical chemistry*. 2012. 84(4): 2081-2087.
261. Ozkumur E., Ahn S., Yalcin A., Lopez C. A., Cevik E., Irani R. J., DeLisi C., Chiari M. and Unlu M. S. Label-free microarray imaging for direct detection of DNA hybridization and single-nucleotide mismatches. // *Biosensors & bioelectronics*. 2010. 25(7): 1789-1795.
262. Pan'kov S.V., Chechetkin V.R., Somova O.G., Antonova O.V., Moiseeva O.V., Prokopenko D.V., Yurasov R.A., Gryadunov D.A. and Chudinov A.V. Kinetic effects on signal normalization in oligonucleotide microchips with labeled immobilized probes. // *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 2009. 27(2): 235-244.
263. AASLD-IDS A HCV Guidance Panel. Hepatitis C guidance: AASLD-IDS A recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. // *Hepatology*. 2015. 62(3): 932-954.
264. Pantel A., Petrella S., Veziris N., Brossier F., Bastian S., Jarlier V., Mayer C. and Aubry A. Extending the definition of the GyrB quinolone resistance-determining region in *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase for assessing fluoroquinolone resistance in *M. tuberculosis*. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012. 56(4): 1990-1996.
265. Parkash V., Domfeh A.B., Cohen P. J., Dumur C.I. and Fuller C.E. The pathwork tissue of origin test. // *American journal of clinical pathology*. 2012. 138(1): 165-166.

266. Patel N., Davies M., Hartshorne M., Heaton R., Roberts C., Tendler S. and Williams P. Immobilization of Protein Molecules onto Homogeneous and Mixed Carboxylate-Terminated Self-Assembled Monolayers. // *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 1997. 13(24): 6485–6490.
267. Paulish-Miller T.E., Augostini P., Schuyler J.A., Smith W.L., Mordechai E., Adelson M.E., Gygax S.E., Secor W.E. and Hilbert D.W. *Trichomonas vaginalis* metronidazole resistance is associated with single nucleotide polymorphisms in the nitroreductase genes *ntr4Tv* and *ntr6Tv*. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014. 58(5): 2938-2943.
268. Pemov A. and Bavykin S. Dual phase multiplex polymerase chain reaction // 2008. US patent 7432055.
269. Pemov A., Modi H., Chandler D. P. and Bavykin S. DNA analysis with multiplex microarray-enhanced PCR. // *Nucleic acids research*. 2005. 33(2): e11.
270. Peterson A.W., Heaton R.J. and Georgiadis R.M. The effect of surface probe density on DNA hybridization. // *Nucleic acids research*. 2001. 29(24): 5163-5168.
271. Philalay J.S., Palermo C.O., Hauge K.A., Rustad T.R. and Cangelosi G.A. Genes required for intrinsic multidrug resistance in *Mycobacterium avium*. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004. 48(9): 3412-3418.
272. Pholwat S., Liu J., Stroup S., Gratz J., Banu S., Rahman S. M., Ferdous S. S., Foongladda S., Boonlert D., Ogarkov O., Zhdanova S., Kibiki G., Heysell S. and Houpt E. Integrated microfluidic card with TaqMan probes and high-resolution melt analysis to detect tuberculosis drug resistance mutations across 10 genes. // *mBio*. 2015. 6(2): e02273.
273. Pholwat S., Stroup S., Heysell S., Ogarkov O., Zhdanova S., Ramakrishnan G. and Houpt E. *eis* Promoter C14G and C15G Mutations Do Not Confer Kanamycin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016. 60(12): 7522-7523.
274. Piletsky S., Piletska E., Bossi A., Turner N. and Turner A. Surface functionalization of porous polypropylene membranes with polyaniline for protein immobilization. // *Biotechnology and bioengineering*. 2003. 82(1): 86-92.
275. Pluen A., Netti P.A., Jain R.K. and Berk D.A. Diffusion of macromolecules in agarose gels: comparison of linear and globular configurations. // *Biophysical journal*. 1999. 77(1): 542-552.
276. Polaris Observatory HCV Collaboration. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. // *The lancet Gastroenterology & hepatology*. 2017. 2(3): 161-176.

277. Pond M.J., Hall C.L., Miari V.F., Cole M., Laing K.G., Jagatia H., Harding-Esch E., Monahan I.M., Planche T., Hinds J., Ison C. A., Chisholm S., Butcher P.D. and Sadiq S.T. Accurate detection of *Neisseria gonorrhoeae* ciprofloxacin susceptibility directly from genital and extragenital clinical samples: towards genotype-guided antimicrobial therapy. // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016. 71(4): 897-902.
278. Qin D., Xia Y. and Whitesides G. M. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. // *Nature protocols*. 2010. 5(3): 491-502.
279. Quer J., Gregori J., Rodriguez-Frias F., Buti M., Madejon A., Perez-del-Pulgar S., et al. High-resolution hepatitis C virus subtyping using NS5B deep sequencing and phylogeny, an alternative to current methods. // *Journal of clinical microbiology*. 2015. 53(1): 219-226.
280. Quer J., Rodriguez-Frias F., Gregori J., Tabernero D., Soria M. E., Garcia-Cehic D., Homs M., Bosch A., Pinto R. M., Esteban J. I., Domingo E. and Perales C. Deep sequencing in the management of hepatitis virus infections. // *Virus research*. 2016.
281. Quinting B., Reyrat J.M., Monnaie D., Amicosante G., Pelicic V., Gicquel B., Frere J.M. and Galleni M. Contribution of beta-lactamase production to the resistance of mycobacteria to beta-lactam antibiotics. // *FEBS letters*. 1997. 406(3): 275-278.
282. Ramakrishnan R., Dorris D., Lublinsky A., Nguyen A., Domanus M., Prokhorova A., Gieser L., Touma E., Lockner R., Tata M., Zhu X., Patterson M., Shippy R., Sendera T. J. and Mazumder A. An assessment of Motorola CodeLink microarray performance for gene expression profiling applications. // *Nucleic acids research*. 2002. 30(7): e30.
283. Randhawa G., Singh M. and Sood P. DNA-based methods for detection of genetically modified events in food and supply chain. // *Current Science*. 2016. 110(6): 1000-1009.
284. Rayner T. F., Rocca-Serra P., Spellman P. T., Causton H. C., Farne A., Holloway E., Irizarry R. A., Liu J., Maier D. S., Miller M., Petersen K., Quackenbush J., Sherlock G., Stoeckert C. J., Jr., White J., Whetzel P. L., Wymore F., Parkinson H., Sarkans U., Ball C. A. and Brazma A. A simple spreadsheet-based, MIAME-supportive format for microarray data: MAGE-TAB. // *BMC bioinformatics*. 2006. 7: 489.
285. Redelinghuys M.J., Ehlers M.M., Dreyer A.W., Lombaard H.A. and Kock M.M. Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. // *BMC Infect Dis*. 2014. 14: 171.
286. Reeves A.Z., Campbell P.J., Sultana R., Malik S., Murray M., Plikaytis B.B., Shinnick T.M. and Posey J.E. Aminoglycoside cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* due to mutations in



- the 5' untranslated region of *whiB7*. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013. 57(4): 1857-1865.
287. Ribeiro S.C., Gomes L.L., Amaral E.P., Andrade M.R., Almeida F.M., Rezende A.L., Lanes V.R., Carvalho E.C., Suffys P.N., Mokrousov I. and Lasunskaja E.B. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. // *Journal of clinical microbiology*. 2014. 52(7): 2615-2624.
288. Rigouts L., Coeck N., Gumusboga M., de Rijk W. B., Aung K. J., Hossain M. A., Fissette K., Rieder H. L., Meehan C. J., de Jong B. C. and Van Deun A. Specific *gyrA* gene mutations predict poor treatment outcome in MDR-TB. // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016. 71(2): 314-323.
289. Rigouts L., Gumusboga M., de Rijk W.B., Nduwamahoro E., Uwizeye C., de Jong B. and Van Deun A. Rifampin resistance missed in automated liquid culture system for *Mycobacterium tuberculosis* isolates with specific *rpoB* mutations. // *Journal of clinical microbiology*. 2013. 51(8): 2641-2645.
290. Rodriguez-Frias F., Nieto-Aponte L., Gregori J., Garcia-Cehic D., Casillas R., Tabernero D., Homs M., Blasi M., Vila M., Chen Q., Vargas V., Castells L., Viladomiu L., Genesca J., Minguez B., Augustin S., Riveiro-Barciela M., Carbonell J., Perales C., Soria M. E., Asensio M., Llorens M., Ordeig L., Godoy C., Buti M., Esteban R., Pumarola T., Esteban J. I. and Quer J. High HCV subtype heterogeneity in a chronically infected general population revealed by high-resolution hepatitis C virus subtyping. // *Clinical microbiology and infection*. 2017. pii: S1198-743X(17)30095-2.
291. Roetzer A., Diel R., Kohl T. A., Ruckert C., Nubel U., Blom J., Wirth T., Jaenicke S., Schuback S., Rusch-Gerdes S., Supply P., Kalinowski J. and Niemann S. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. // *PLoS medicine*. 2013. 10(2): e1001387.
292. Ropp P.A., Hu M., Olesky M. and Nicholas R. A. Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002. 46(3): 769-777.
293. Rouquette-Loughlin C., Dunham S. A., Kuhn M., Balthazar J. T. and Shafer W. M. The NorM efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* recognizes antimicrobial cationic compounds. // *Journal of bacteriology*. 2003. 185(3): 1101-1106.

294. Rouquette-Loughlin C.E., Balthazar J.T. and Shafer W.M. Characterization of the MacA–MacB efflux system in *Neisseria gonorrhoeae*. // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005. 56(5): 856-860.
295. Rubina A.Y., Kolchinsky A.M., Makarov A.A. and Zasedatelev A.S. Why 3-D? Gel-based microarrays in proteomics. // *Proteomics*. 2008. 8(4): 817-831.
296. Rubina A.Y., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M. and Mirzabekov A.D. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. // *Analytical biochemistry*. 2004. 325(1): 92-106.
297. Rudi K., Rud I. and Holck A. A novel multiplex quantitative DNA array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed. // *Nucleic acids research*. 2003. 31(11): e62.
298. Sala C., Haouz A., Saul F.A., Miras I., Rosenkrands I., Alzari P.M. and Cole S.T. Genome-wide regulon and crystal structure of BlaI (Rv1846c) from *Mycobacterium tuberculosis*. // *Molecular microbiology*. 2009. 71(5): 1102-1116.
299. Salazar R., Roepman P., Capella G., Moreno V., Simon I., Dreezen C., Lopez-Doriga A., Santos C., Marijnen C., Westerga J., Bruin S., Kerr D., Kuppen P., van de Velde C., Morreau H., Van Velthuysen L., Glas A. M., Van't Veer L. J. and Tollenaar R. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. // *Journal of clinical oncology*. 2011. 29(1): 17-24.
300. Sali M., De Maio F., Caccuri F., Campilongo F., Sanguinetti M., Fiorentini S., Delogu G. and Giagulli C. Multicenter Evaluation of Anyplex Plus MTB/NTM MDR-TB Assay for Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Multidrug-Resistant Isolates in Pulmonary and Extrapulmonary Specimens. // *Journal of clinical microbiology*. 2016. 54(1): 59-63.
301. Sandoz K.M. and Rockey D.D. Antibiotic resistance in *Chlamydiae*. // *Future microbiology*. 2010. 5(9): 1427-1442.
302. Sandres-Saune K., Deny P., Pasquier C., Thibaut V., Duverlie G. and Izopet J. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. // *Journal of virological methods*. 2003. 109(2): 187-193.
303. Sassolas A., Leca-Bouvier B. D. and Blum L. J. DNA biosensors and microarrays. // *Chemical reviews*. 2008. 108(1): 109-139.
304. Schena M., Shalon D., Davis R.W. and Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. // *Science*. 1995. 270(5235): 467-470.

305. Schulze H., Rubtsova M. and Bachmann T.T. DNA Microarrays for Pathogen Detection. // Modern Techniques for Pathogen Detection. 2015. Popp J. and Bauer M. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: 113-210.
306. Sha M.Y., Walton I.D., Norton S.M., Taylor M., Yamanaka M., Natan M. J., Xu C., Drmanac S., Huang S., Borchering A., Drmanac R. and Penn S.G. Multiplexed SNP genotyping using nanobarcode particle technology. // Analytical and bioanalytical chemistry. 2006. 384(3): 658-666.
307. Shafer W. and Folster J. Towards an understanding of chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: evidence for a porin-efflux pump collaboration. // Journal of bacteriology. 2006. 188: 2297-2299.
308. Shafer W.M., Yu E.W., Rouquette-Loughlin C., Golparian D., Jerse A.E. and Unemo M. Efflux Pumps in *Neisseria gonorrhoeae*: Contributions to Antimicrobial Resistance and Virulence. // Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Regulation and Clinical Implications. 2016. Li X.-Z., Elkins C. A. and Zgurskaya H. I. Springer International Publishing: 439-469.
309. Shaskolskiy B., Dementieva E., Leinsoo A., Runina A., Vorobyev D., Plakhova X., Kubanov A., Deryabin D. and Gryadunov D. Drug Resistance Mechanisms in Bacteria Causing Sexually Transmitted Diseases and Associated with Vaginosis. // Frontiers in microbiology. 2016. 7: 747.
310. Shaw-Smith C., Redon R., Rickman L., Rio M., Willatt L., Fiegler H., Firth H., Sanlaville D., Winter R., Colleaux L., Bobrow M. and Carter N. P. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. // Journal of medical genetics. 2004. 41(4): 241-248.
311. Shershov V., Lapa S., Kuznetsova V., Spitsyn M., Guseinov T., Polyakov S., Stomakhin A., Zasedatelev A. and Chudinov A. Comparative Study of Novel Fluorescent Cyanine Nucleotides: Hybridization Analysis of Labeled PCR Products Using a Biochip. // Journal of Fluorescence. 2017.
312. Shilnikova I.I., Dmitrieva, N.V. Evaluation of antibiotic susceptibility of *Bacteroides*, *Prevotella* and *Fusobacterium* species isolated from patients of the N. N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia. // Anaerobe. 2015. 31: 15-18.
313. Shitikov E.A., Bespyatykh J.A., Ischenko D.S., Alexeev D.G., Karpova I.Y., Kostryukova E.S., Isaeva Y.D., Nosova E.Y., Mokrousov I.V., Vyazovaya A.A., Narvskaya O.V., Vishnevsky B.I., Otten T.F., Zhuravlev V.Yu, Yablonsky P.K., Ilina E.N. and Govorun V.M. Unusual large-scale chromosomal rearrangements in *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 cluster isolates. // PloS one. 2014. 9(1): e84971.

314. Shkarupeta M.M., Lazarev V.N., Akopian T.A., Afrikanova T.S. and Govorun V.M. Analysis of antibiotic resistance markers in *Chlamydia trachomatis* clinical isolates obtained after ineffective antibiotic therapy. // Bulletin of experimental biology and medicine. 2007. 143(6): 713-717.
315. Simon R., Radmacher M. D., Dobbin K. and McShane L. M. Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. // Journal of the National Cancer Institute. 2003. 95(1): 14-18.
316. Singh A., Gupta R., Vishwakarma R.A., Narayanan P.R., Paramasivan C.N., Ramanathan V.D. and Tyagi A.K. Requirement of the mymA operon for appropriate cell wall ultrastructure and persistence of Mycobacterium tuberculosis in the spleens of guinea pigs. // Journal of bacteriology. 2005. 187(12): 4173-4186.
317. Smith D. B., Bukh J., Kuiken C., Muerhoff A.S., Rice C.M., Stapleton J.T. and Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. // Hepatology. 2014. 59(1): 318-327.
318. Smith T., Wolff K.A. and Nguyen L. Molecular biology of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. // Current topics in microbiology and immunology. 2013. 374: 53-80.
319. Sola C., Filliol I., Legrand E., Lesjean S., Locht C., Supply P. and Rastogi N. Genotyping of the Mycobacterium tuberculosis complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. // Infection, genetics and evolution. 2003. 3(2): 125-133.
320. Somoskovi A. and Salfinger M. The Race Is On To Shorten the Turnaround Time for Diagnosis of Multidrug-Resistant Tuberculosis. // Journal of clinical microbiology. 2015. 53(12): 3715-3718.
321. Somoskovi A. and Salfinger M. Mycobacteria: Tuberculosis. // Antimicrobial Drug Resistance. 2017. Mayers D., Sobel J., Ouellette M., Kaye K. and Marchaim D. New York, USA, Springer International Publishing. 2: 1041-1059.
322. Sorokin N.V., Chechetkin V.R., Livshits M.A., Pan'kov S.V., Donnikov M.Y., Gryadunov D.A., Lapa S.A. and Zasedatelev A.S. Discrimination between perfect and mismatched duplexes with oligonucleotide gel microchips: role of thermodynamic and kinetic effects during hybridization. // Journal of biomolecular structure & dynamics. 2005. 22(6): 725-734.
323. Sorokin N.V., Chechetkin V.R., Pan'kov S.V., Somova O.G., Livshits M.A., Donnikov M.Y., Turygin A.Y., Barsky V.E. and Zasedatelev A.S. Kinetics of hybridization on surface oligonucleotide microchips: theory, experiment, and comparison with hybridization on gel-based microchips. // Journal of biomolecular structure & dynamics. 2006. 24(1): 57-66.

324. Sorokin N.V., Yurasov D.Y., Cherepanov A.I., Kozhekbaeva J.M., Chechetkin V.R., Gra O.A., Livshits M.A., Nasedkina T.V. and Zasedatelev A.S. Effects of external transport on discrimination between perfect and mismatch duplexes on gel-based oligonucleotide microchips. // *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 2007. 24(6): 571-578.
325. Spiegel C.A. Susceptibility of *Mobiluncus* species to 23 antimicrobial agents and 15 other compounds. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1987. 31(2): 249-252.
326. Spitsyn M., Kuznetsova V., Shershov V., Lapa S., Guseinov T., Zasedatelev A. and Chudinov A. Cyanine-dye-modified 2'-deoxyuridine-5'-triphosphates: Synthesis, applications, and linker effect on substrate properties for Taq DNA polymerase. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2017. 43(4): 471-475.
327. FAS/Moscow Staff. Russian Federation. Agricultural Biotechnology Annual report 2016. // 2016. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA): 26.
328. Stamm L. Antibiotic resistance in *Treponema pallidum subsp. pallidum*, the syphilis agent. // *The Pathogenic Spirochetes: strategies for evasion of host immunity and persistence*. 2012. Embers M. E., Springer US: 213-228.
329. Stamm L.V. Global challenge of antibiotic-resistant *Treponema pallidum*. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010. 54(2): 583-589.
330. Stamm L.V. Syphilis: antibiotic treatment and resistance. // *Epidemiology and infection*. 2015. 143(8): 1567-1574.
331. Stephan J., Mailaender C., Etienne G., Daffe M. and Niederweis M. Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004. 48(11): 4163-4170.
332. Su C., Sun Y., Xie J. and Peng Y. A construct-specific qualitative and quantitative PCR detection method of transgenic maize BVLA430101. // *European Food Research and Technology*. 2011. 233(1): 117-122.
333. Tamarit-Lopez J., Morais S., Banuls M. J., Puchades R. and Maquieira A. Development of hapten-linked microimmunoassays on polycarbonate discs. // *Analytical chemistry*. 2010. 82(5): 1954-1963.
334. Thakur S.D., Starnino S., Horsman G.B., Levett P.N. and Dillon J.R. Unique combined penA/mtrR/porB mutations and NG-MAST strain types associated with ceftriaxone and cefixime MIC increases in a 'susceptible' *Neisseria gonorrhoeae* population. // *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014. 69(6): 1510-1516.

335. Thayil S.M., Morrison N., Schechter N., Rubin H. and Karakousis P.C. The role of the novel exopolyphosphatase MT0516 in *Mycobacterium tuberculosis* drug tolerance and persistence. // *PloS one*. 2011. 6(11): e28076.
336. Theron G., Peter J., Richardson M., Barnard M., Donegan S., Warren R., Steingart K.R. and Dheda K. The diagnostic accuracy of the GenoType((R)) MTBDRsl assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. // *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014. (10): CD010705.
337. Thomas F., Nicot F., Sandres-Saune K., Dubois M., Legrand-Abrevanel F., Alric L., Peron J. M., Pasquier C. and Izopet J. Genetic diversity of HCV genotype 2 strains in south western France. // *Journal of medical virology*. 2007. 79(1): 26-34.
338. Tijero M., Diez-Ahedo R., Benito-Lopez F., Basabe-Desmots L., Castro-Lopez V. and Valero A. Biomolecule storage on non-modified thermoplastic microfluidic chip by ink-jet printing of ionogels. // *Biomicrofluidics*. 2015. 9(4): 044124.
339. Tomusiak A., Strus M. Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* isolated from cases of bacterial vaginosis. // *Ginekologia Polska*. 2011. 82(12): 900-904.
340. Tong Y. Q., Liu B., Liu H., Zheng H. Y., Gu J., Liu H., Song E. J., Song C. and Li Y. Accurate genotyping of hepatitis C virus through nucleotide sequencing and identification of new HCV subtypes in China population. // *Clinical microbiology and infection*. 2015. 21(9): 874 e879-874 e821.
341. Trembizki E., Buckley C., Donovan B., Chen M., Guy R., Kaldor J., Lahra M.M., Regan D. G., Smith H., Ward J. and Whiley D.M. Direct real-time PCR-based detection of *Neisseria gonorrhoeae* 23S rRNA mutations associated with azithromycin resistance. // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015. 70(12): 3244-3249.
342. Trembizki E., Guy R., Donovan B., Kaldor J. M., Lahra M. M., Whiley D.M.. Further evidence to support the individualised treatment of gonorrhoea with ciprofloxacin. // *The Lancet Infectious diseases*. 2016. 16(9): 1005-1006.
343. Tremblay L.W., Fan F. and Blanchard J.S. Biochemical and structural characterization of *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase with the carbapenems ertapenem and doripenem. // *Biochemistry*. 2010. 49(17): 3766-3773.
344. Tucker J.D. and Cohen M.S. China's syphilis epidemic: epidemiology, proximate determinants of spread, and control responses. // *Current opinion in infectious diseases*. 2011. 24(1): 50-55.
345. Udawadia Z.F., Amale R.A., Ajbani K.K. and Rodrigues C. Totally drug-resistant tuberculosis in India. // *Clinical infectious disease*. 2012. 54(4): 579-581.

346. Unemo M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea - the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge. // BMC Infectious diseases. 2015. 15: 364.
347. Unemo M., Del Rio C. and Shafer W.M. Antimicrobial Resistance Expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: A Major Global Public Health Problem in the 21st Century. // Microbiology spectrum. 2016. 4(3).
348. Unemo M., Golparian D., Nicholas R., Ohnishi M., Gallay A. and Sednaoui P. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel penA mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. // Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012. 56(3): 1273-1280.
349. Unemo M. and Jensen J.S. Antimicrobial-resistant sexually transmitted infections: gonorrhoea and *Mycoplasma genitalium*. // Nature reviews Urology. 2017. 14(3): 139-152.
350. Unemo M. and Shafer W.M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. // Clinical microbiology reviews. 2014. 27(3): 587-613.
351. van de Vijver M.J., He Y.D., van't Veer L.J., Dai H., Hart A.A., Voskuil D.W., Schreiber G.J., Peterse J.L., Roberts C., Marton M.J., Parrish M., Atsma D., Witteveen A., Glas A., Delahaye L., van der Velde T., Bartelink H., Rodenhuis S., Rutgers E.T., Friend S.H. and Bernards R.A. gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. // The New England journal of medicine. 2002. 347(25): 1999-2009.
352. van der Heijden Y.F., Karim F., Mufamadi G., Zako L., Chinappa T., Shepherd B.E., Maruri F., Moosa M.S., Sterling T.R. and Pym A.S. Isoniazid-monoresistant tuberculosis is associated with poor treatment outcomes in Durban, South Africa. // The international journal of tuberculosis and lung disease. 2017. 21(6): 670-676.
353. Van Deun A., Aung K. J., Bola V., Lebeke R., Hossain M. A., de Rijk W.B., Rigouts L., Gumusboga A., Torrea G. and de Jong B.C. Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: challenging the gold standard. // Journal of clinical microbiology. 2013. 51(8): 2633-2640.
354. Van Deun A., Barrera L., Bastian I., Fattorini L., Hoffmann H., Kam K. M., Rigouts L., Rusch-Gerdes S. and Wright A. Mycobacterium tuberculosis strains with highly discordant rifampin susceptibility test results. // Journal of clinical microbiology. 2009. 47(11): 3501-3506.
355. van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. // Seminars in respiratory and critical care medicine. 2013. 34(1): 103-109.
356. Vasilevsky S., Greub G., Nardelli-Haeffliger D. and Baud D. Genital *Chlamydia trachomatis*: understanding the roles of innate and adaptive immunity in vaccine research. // Clinical microbiology reviews. 2014. 27(2): 346-370.

357. Veal W.L., Nicholas R.A. and Shafer W.M. Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump due to an *mtrR* mutation is required for chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. // *Journal of bacteriology*. 2002. 184(20): 5619-5624.
358. Verhelst R., Verstraelen H., Claeys G., Verschraegen G., Delanghe J., Van Simaey L., De Ganck C., Temmerman M. and Vanechoutte M. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. // *BMC Microbiology*. 2004. 4(1): 16.
359. Vernel-Pauillac F., Hogan T. R., Tapsall J. W. and Goarant C. Quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: rapid genotyping of quinolone resistance-determining regions in *gyrA* and *parC* genes by melting curve analysis predicts susceptibility. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009. 53(3): 1264-1267.
360. Verriere P. Preventing GMO contamination. An overview of national 'coexistence' measures in EU. // 2015. Brussels, Belgium, IFOAM EU Group.
361. Verstraelen H. and Verhelst R. Bacterial vaginosis: an update on diagnosis and treatment. // *Expert review of anti-infective therapy*. 2009. 7(9): 1109-1124.
362. Vetting M., Roderick S.L., Hegde S., Magnet S. and Blanchard J.S. What can structure tell us about *in vivo* function? The case of aminoglycoside-resistance genes. // *Biochemical Society transactions*. 2003. 31(Pt 3): 520-522.
363. Virtanen C. and Woodgett J. Clinical uses of microarrays in cancer research. // *Methods in molecular medicine*. 2008. 141: 87-113.
364. Viveiros M., Martins M., Rodrigues L., Machado D., Couto I., Ainsa J. and Amaral L. Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs. // *Expert review of anti-infective therapy*. 2012. 10(9): 983-998.
365. Votintseva A.A., Bradley P., Pankhurst L., Del Ojo Elias C., Loose M., Nilgiriwala K., Chatterjee A., Smith E. G., Sanderson N., Walker T. M., Morgan M. R., Wyllie D. H., Walker A. S., Peto T., Crook D.W. and Iqbal Z. Same-Day Diagnostic and Surveillance Data for Tuberculosis via Whole-Genome Sequencing of Direct Respiratory Samples. // *Journal of clinical microbiology*. 2017. 55(5): 1285-1298.
366. Wacker R. and Niemeyer C.M. DDI-microFIA--A readily configurable microarray-fluorescence immunoassay based on DNA-directed immobilization of proteins. // *Chembiochem*. 2004. 5(4): 453-459.
367. Wadlow R. and Ramaswamy S. DNA microarrays in clinical cancer research. // *Current molecular medicine*. 2005. 5(1): 111-120.



368. Waites K.B. and Xiao L. Chapter 89 - Mycoplasmas and ureaplasmas of humans. // *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition). 2015. Schwartzman Y.-W. Boston, Academic Press: 1587-1609.
369. Walter N.D., Dolganov G.M., Garcia B.J., Worodria W., Andama A., Musisi E., Ayakaka I., Van T.T., Voskuil M.I., de Jong B.C., Davidson R.M., Fingerlin T.E., Kechris K., Palmer C., Nahid P., Daley C. L., Geraci M., Huang L., Cattamanchi A., Strong M., Schoolnik G. K. and Davis J.L. Transcriptional Adaptation of Drug-tolerant *Mycobacterium tuberculosis* During Treatment of Human Tuberculosis. // *The Journal of infectious diseases*. 2015. 212(6): 990-998.
370. Wang F., Cassidy C. and Sacchetti J. C. Crystal structure and activity studies of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase reveal its critical role in resistance to beta-lactam antibiotics. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006. 50(8): 2762-2771.
371. Wang L. and Li P.C. Microfluidic DNA microarray analysis: a review. // *Analytica chimica acta*. 2011. 687(1): 12-27.
372. Welzel T M., Bhardwaj N., Hedskog C., Chodavarapu K., Camus G., McNally J., Brainard D., Miller M.D., Mo H., Svarovskaia E., Jacobson I., Zeuzem S. and Agarwal K. Global epidemiology of HCV subtypes and resistance-associated substitutions evaluated by sequencing-based subtype analyses. // *Journal of hepatology*. 2017. 67(2): 224-236.
373. Whiley D.M., Linnios E.A., Ray S., Sloots T.P. and Tapsall J.W. Further questions regarding the role of mosaic penA sequences in conferring reduced susceptibility to ceftriaxone in *Neisseria gonorrhoeae*. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007. 51(2): 802-803.
374. WHO. Baseline report on global sexually transmitted infection surveillance 2012. // 2013. Geneva, Switzerland, WHO Press.
375. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. // 2014. Geneva, Switzerland, WHO Press.
376. WHO. Report on global sexually transmitted infection surveillance 2013. // 2014. Geneva, Switzerland, WHO Press.
377. WHO. Global tuberculosis report. // 2016. Geneva, Switzerland, WHO Press.
378. WHO. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of TB // 2016. Geneva, Switzerland, WHO Press..
379. Wi T., Lahra M. M., Ndowa F., Bala M., Dillon J. R., Ramon-Pardo P., Eremin S. R., Bolan G. and Unemo M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Global surveillance and a call for international collaborative action. // *PLoS medicine*. 2017. 14(7): e1002344.

380. Wiegand J., Buggisch P., Boecher W., Zeuzem S., Gelbmann C. M., Berg T., Kauffmann W., Kallinowski B., Cornberg M., Jaeckel E., Wedemeyer H. and Manns M.P. Early monotherapy with pegylated interferon alpha-2b for acute hepatitis C infection: the HEP-NET acute-HCV-II study. // *Hepatology*. 2006. 43(2): 250-256.
381. Williamson D.A., Roberts S. A., Bower J. E., Vaughan R., Newton S., Lowe O., Lewis C. A. and Freeman J.T. Clinical failures associated with rpoB mutations in phenotypically occult multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. // *The international journal of tuberculosis and lung disease*. 2012. 16(2): 216-220.
382. Wilson E.M., Rosenthal E.S., Kattakuzhy S., Tang L. and Kottilil S. Clinical Laboratory Testing in the Era of Directly Acting Antiviral Therapies for Hepatitis C. // *Clinical microbiology reviews*. 2017. 30(1): 23-42.
383. Workowski K.A. and Bolan G.A. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. // *MMWR Recommendations and reports*. 2015. 64(RR-03): 1-137.
384. Yershov G., Barsky V., Belgovskiy A., Kirillov E., Kreindlin E., Ivanov I., Parinov S., Guschin D., Drobishev A., Dubiley S. and Mirzabekov A. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996. 93(10): 4913-4918.
385. Yin Q.Q., Liu H.C., Jiao W.W., Li Q.J., Han R., Tian J.L., Liu Z.G., Zhao X.Q., Li Y.J., Wan K.L., Shen A.D. and Mokrousov I. Evolutionary History and Ongoing Transmission of Phylogenetic Sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype in China. // *Scientific reports*. 2016. 6: 34353.
386. Yu X., Xia H.S., Sun Z.D., Lin Y., Wang K., Yu J., Tang H., Pang D.W. and Zhang Z.L. On-chip dual detection of cancer biomarkers directly in serum based on self-assembled magnetic bead patterns and quantum dots. // *Biosensors & bioelectronics*. 2013. 41: 129-136.
387. Yuen C.M., Kurbatova E.V., Click E.S., Cavanaugh J.S. and Cegielski J.P. Association between *Mycobacterium tuberculosis* complex phylogenetic lineage and acquired drug resistance. // *PloS one*. 2013. 8(12): e83006.
388. Zarantonelli L., Borthagaray G., Lee E.-H. and Shafer W. M. Decreased azithromycin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* due to mtrR mutations. // *Antimicrobial agents chemotherapy*. 1999. 43(10): 2468-2472.
389. Zaunbrecher M.A., Sikes R.D., Jr., Metchock B., Shinnick T.M. and Posey J.E. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers

- kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009. 106(47): 20004-20009.
390. Zhang L., Miles M.F. and Aldape K.D. A model of molecular interactions on short oligonucleotide microarrays. // Nature biotechnology. 2003. 21(7): 818-821.
391. Zhu X., Chen L., Shen P., Jia J., Zhang D. and Yang L. High sensitive detection of Cry1Ab protein using a quantum dot-based fluorescence-linked immunosorbent assay. // Journal of agricultural and food chemistry. 2011. 59(6): 2184-2189.
392. Zimenkov D.V., Antonova O.V., Kuz'min A.V., Isaeva Y.D., Krylova L.Y., Popov S.A., Zasedatelev A.S., Mikhailovich V.M. and Gryadunov D.A. Detection of second-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using oligonucleotide microarrays. // BMC infectious diseases. 2013. 13: 240.
393. Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Antonova O.V., Krasnova M.A., Chernyaeva E.N., Zhuravlev V.Y., Kuz'min A.V., Popov S.A., Zasedatelev A.S. and Gryadunov D.A. Evaluation of a low-density hydrogel microarray technique for mycobacterial species identification. // Journal of clinical microbiology. 2015. 53(4): 1103-1114.
394. Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Antonova O.V., Zhuravlev V.Y. and Gryadunov D.A. Simultaneous drug resistance detection and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using a low-density hydrogel microarray. // The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2016. 71(6): 1520-1531.
395. Zimenkov D.V., Nosova E.Y., Kulagina E.V., Antonova O.V., Arslanbaeva L.R., Isakova A.I., Krylova L.Y., Peretokina I.V., Makarova M.V., Safonova S.G., Borisov S.E. and Gryadunov D.A. Examination of bedaquiline- and linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region. // The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2017. 72(7): 1901-1906.