

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ СВОЙСТВО СКОРОСТИ РОСТА КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *Mycobacterium tuberculosis*: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ, ЛОКАЛИЗАЦИИ ТУБЕРКУЛЕЗА, ЛЕЧЕНИЯ

О.А. Маничева¹, М.З. Догонадзе¹, Н.Н. Мельникова¹, Б.И. Вишневский¹, С.А. Маничев²

¹ ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Фенотипические свойства штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных легочным или внелегочным туберкулезом, определяются комплексом факторов: генетическими особенностями патогена, его способностью к адаптации *in vivo* и *in vitro*, воздействием иммунной системы хозяина, влиянием химиотерапии. Наиболее доступным для исследования взаимоотношений хозяин-патоген на уровне «макроорганизм/штаммовая популяция» является фенотипическое свойство — скорость роста. Темп репликации, как правило, исследуют в сопоставлении с лекарственной чувствительностью микобактерий или с их генотипическими особенностями. Целью работы была оценка *in vitro* скорости роста штаммов *M. tuberculosis*, выделенных из диагностического материала больных туберкулезом при легочной и внелегочной локализации, нелеченых и леченых (оперированных и неоперированных), а также чувствительных и устойчивых изолятов в сравнении с референтным штаммом H37Rv. Для оценки скорости роста 116 клинических изолятов использовали модификацию метода, предложенного A. von Groll et al.: для построения кривой роста измеряли интенсивность флуоресценции в 96-луночном планшете (с помощью индикатора резазурина) ежедневно в течение 8 дней. Скорость роста определяли как наклон полученной кривой. Вычисляли средние значения в группах: 1 — нелеченые больные туберкулезом органов дыхания (ТОД), респираторный материал; 2 — леченые неоперированные больные ТОД, респираторный материал; 3 группа — леченые оперированные больные ТОД (преимущественно с хроническим и гиперхроническим течением процесса), респираторный материал; 4 — аналогичные пациенты, операционный материал; 5 — больные костно-суставным туберкулезом (КСТ), операционный материал. Кроме того, исследовали группы чувствительных и резистентных штаммов, между которыми значимых различий в скорости роста не обнаружили. Параметры роста штаммов, выделенных из материала больных ТОД, превышали таковые при КСТ. Это объясняется менее благоприятными условиями вегетации возбудителя при КСТ. Поскольку при локализации туберкулезного поражения, отграниченного

Адрес для переписки:

Маничева Ольга Алексеевна
194064, Россия, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 32,
ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ.
Тел.: 8 (812) 297-86-31 (служебн.).
Факс: 8 (812) 297-16-26.
E-mail: olgamanicheva@rambler.ru

Contacts:

Olga A. Manicheva
194064, Russian Federation, St. Petersburg, Polytechnicheskaya str., 32,
St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology.
Phone: +7 (812) 297-86-31 (office).
Fax: +7 (812) 297-16-26.
E-mail: olgamanicheva@rambler.ru

Библиографическое описание:

Маничева О.А., Догонадзе М.З., Мельникова Н.Н., Вишневский Б.И., Маничев С.А. Фенотипическое свойство скорости роста клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis*: зависимость от локализации процесса, лечения, лекарственной чувствительности // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 175–186. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-175-186

Citation:

Manicheva O.A., Dogonadze M.Z., Melnikova N.N., Vishnevskiy B.I., Manichev S.A. The growth rate phenotypic property of *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains: dependence on tuberculosis localization, treatment, drug susceptibility // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 175–186. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-175-186

от внешней среды, невозможна передача возбудителя к другому хозяину, то невозможна и селекция штаммов по способности выживать в тканях костно-суставной системы, следовательно, в этом случае следует говорить об адаптации штаммовой популяции патогена к индивидуальному хозяину. Скорость роста изолятов от не-леченых пациентов с ТОД была выше, чем у леченых. Сравнение параметров роста только МЛУ штаммов 1–5 групп для устранения влияния фактора чувствительности/устойчивости в целом выявило ту же картину. Снижение скорости роста штаммов, выделенных от леченых пациентов с ТОД, мы считаем результатом не только лечения, но и адаптации патогена к его окружающей среде — внутренней среде макроорганизма. Для подтверждения этого предположения оценили бактериальную нагрузку 1083 образцов диагностического материала, сгруппированных аналогичным образом, при этом отбирали только МЛУ/ШЛУ штаммы. В группах леченых больных частота высокой обсемененности ($KOE \geq 100$) достигала 52,5–63,8%, что свидетельствует о сохранении жизнеспособности возбудителя у таких пациентов. Скорость роста не адаптированного (вследствие длительных пассажей на искусственных средах) к макроорганизму штамма H37Rv по средним значениям была значимо выше, чем во всех группах клинических штаммов. Таким образом, выявлена гетерогенность фенотипических свойств клинических штаммов *M. tuberculosis* по признаку скорости роста. Скорость роста клинических штаммов *M. tuberculosis* зависит от локализации процесса (ТОД, КСТ) и совместного воздействия факторов лечения пациентов и адаптации патогена к хозяину.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, клинические штаммы, скорость роста, лекарственная чувствительность, туберкулез легких, внелегочный туберкулез.

THE GROWTH RATE PHENOTYPIC PROPERTY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* CLINICAL STRAINS: DEPENDENCE ON TUBERCULOSIS LOCALIZATION, TREATMENT, DRUG SUSCEPTIBILITY

Manicheva O.A.^a, Dogonadze M.Z.^a, Melnikova N.N.^a, Vishnevskiy B.I.^a, Manichev S.A.^b

^a St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The phenotypic properties of the *M. tuberculosis* strains obtained from patients with pulmonary or extra-pulmonary tuberculosis are determined by a complex set of factors: the genetic characteristics of the pathogen, its ability to adapt in vivo and in vitro, the influence of the host's immune system and chemotherapy. The growth rate as the phenotypic property is the most accessible for the study of the host-pathogen relationships at the level of host/strain population interactions. The aim of the study is to assess in vitro of the growth rate of *M. tuberculosis* strains isolated from patients with pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis: untreated and treated (with surgical and non-surgical treatment) and also sensitive and resistant isolates in comparison with the reference strain H37Rv. To estimate the growth rate of 116 clinical isolates we have used the modified method originally developed by von Groll and co-authors: to get the bacteria growth curve the fluorescence intensity of growing strains (with indicator resazurin) has been measured daily for 8 days in 96-well plate. The growth rate is determined as the slope of the growth curve. The mean values of the growth rate have been calculated in the following groups of patients: 1 — untreated patients with pulmonary tuberculosis (PT), respiratory material; 2 — non-surgical treated PT patients, respiratory material; 3 — surgical treated PT patients (mainly with chronic and hyperchronic process), respiratory material; 4 — patients like in 3rd group, surgical material; 5 — bone and joint tuberculosis (BJT), surgical material. In addition, groups of sensitive and resistant strains have been examined, but there are no significant differences in growth rates. It has been obtained that the growth rate of strains isolated from the PT patients is higher than in BJT patients: it can be explained less favorable conditions for the pathogen vegetation in the BJT. In the case of a closed tuberculous lesion where the pathogen transmission to another host is impossible, then the selection of strains with the property to survive in the tissues of the osteoarticular system is impossible too, therefore it should be observed only an adaptation of the pathogen strain population to the individual host. The growth rate of isolates from untreated PT patients is higher than that of the treated ones. Comparison of the growth parameters of only MDR strains 1–5 groups to eliminate the influence of the sensitivity/resistance has resulted in the same conclusions. We suggest that the decrease in the growth rate of strains from the treated PT patients is in not only result of the treatment, but also is conditioned by adaptation of the pathogen to its external environment, which is the internal environment of the macroorganism. To confirm this assumption, the bacterial load of 1,083 diagnostic specimens grouped in a similar manner has been estimated, taking into account only MDR/XDR strains. In the group of treated patients the frequency of high bacterial load ($CFU \geq 100$) reached 52.5–63.8% that shows the conserved fitness of bacteria in such patients. The mean values of the growth rate of the strain H37Rv non-adapted to the macroorganism (due to numerous passages on artificial media) are higher than in all groups of clinical strains. Thus, heterogeneity of phenotypic properties of *M. tuberculosis* clinical strains on the basis of growth rate has been obtained. The growth rate of *M. tuberculosis* clinical strains is depended on the tuberculosis localization (PT, BJT) and on the joint effect of patient treatment and pathogen adaptation to the host.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, clinical strains, drug resistance, pulmonary tuberculosis, extrapulmonary tuberculosis.

Введение

Туберкулез — динамический многофакторный процесс взаимодействия хозяин—патоген. Фенотипические свойства возбудителя «на выходе» из макроорганизма, то есть свойства конкретного штамма, полученного при посеве патологического материала на искусственные питательные среды, определяются как генетическими особенностями патогена, его способностью к адаптации *in vivo* и *in vitro*, так и воздействием на него комплекса факторов организма хозяина, который служит для *Mycobacterium tuberculosis* внешней средой.

Спектр изученных фенотипических свойств *M. tuberculosis* весьма широк. Лекарственная резистентность — наиболее изученное свойство вследствие постоянной востребованности в практической фтизиатрии. Однако устойчивость к противотуберкулезным препаратам формируется в первую очередь в результате селекции микобактерий с мутациями, обеспечивающими выживание возбудителя в организме больного при воздействии химиотерапии. Во вторую очередь на возникновение резистентности влияют особенности внутренней среды макроорганизма, отвечающего комплексом разнообразных реакций (от молекулярного до организменного уровня) на туберкулезную инфекцию, но это вопрос, заслуживающий отдельного рассмотрения [3].

Применение методов биоинформатики, достижения в области молекулярной генетики, транскриптомики, метаболомики, протеомики позволили получить громадный объем информации о возбудителе туберкулеза, его способности адаптироваться к различным условиям *in vivo* и *in vitro* (лишь некоторые работы и обзоры последних лет [2, 7, 14, 16, 17, 36]). Один из основных аспектов исследований — выявление генов и биомолекул, сопряженных с патогенностью/вирулентностью микобактерий, преимущественно в качестве мишеней для создания новых антимикобактериальных/антиинфекционных препаратов. Кроме того, исследуют фенотипические свойства в сопоставлении с фенотипическим же свойством лекарственной устойчивости и ассоциированными с ней генетическими мутациями [33, 34], принадлежностью штаммов к той или иной филогенетической линии [10, 19, 31, 39]. Немногие публикации касаются влияния макроорганизма на формирование фенотипических свойств микобактерий [1, 25]. Исследования системы хозяин-патоген в основном проводят в аспекте взаимодействия субъектов на молекулярном и клеточном (макрофаги *ex vivo*, кле-

точные линии) уровнях, либо при использовании экспериментальных моделей туберкулеза на животных [9, 13, 30]. Клинические аспекты этих отношений в основном ориентированы на фенотипическое свойство лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*, либо генетические особенности возбудителя, изученные с помощью методов молекулярной эпидемиологии или генетики [11, 21, 35].

Наиболее доступным для исследования большого числа штаммов возбудителя с целью анализа взаимоотношений хозяин—патоген на уровне макроорганизм/штаммовая популяция *M. tuberculosis* является фенотипическое свойство — скорость роста.

В геноме *M. tuberculosis* обнаружены гены, экспрессия или ингибция которых определяет скорость размножения микобактерий *in vitro* и/или *in vivo*, переход в дормантное состояние [4, 20, 22, 23, 24, 26]. Скорость роста микобактерий в основном сопоставляют с их резистентностью к противотуберкулезным препаратам или принадлежностью к той или иной филогенетической линии [5, 6, 15]. Однако это свойство формируется не только под влиянием генетических особенностей штамма, но и в ходе адаптации микобактерий к особенностям внутренней среды организма хозяина. В нашем исследовании мы сосредоточили внимание на сопоставлении скорости роста не только с резистентностью к противотуберкулезным препаратам, но и с локализацией инфекции, а также влиянием химиотерапии (нелеченые пациенты, леченые, оперированные вследствие неэффективности терапии).

Цель работы — оценить *in vitro* скорость роста штаммов *M. tuberculosis*, выделенных из диагностического материала больных туберкулезом при легочной и внелегочной локализации, нелеченых и леченых, оперированных и неоперированных, а также чувствительных и устойчивых изолятов в сравнении с референтным штаммом H37Rv.

Материалы и методы

Исследовали 116 клинических штаммов *M. tuberculosis* из коллекции СПб НИИ фтизиопульмонологии, выделенных из материала 77 больных туберкулезом органов дыхания (ТОД) и 39 пациентов с костно-суставным туберкулезом (КСТ). В случае ТОД отбирали штаммы, выделенные преимущественно из первых трех образцов респираторного материала до начала лечения, в том числе повторного. Бактериальную массу первой или второй (в случае выделения только на жид-

кой среде) генерации изолята суспендировали в физиологическом растворе с 15% глицерина и замораживали при -80°C . Идентификация принадлежности к виду *M. tuberculosis* была проведена стандартными методами (Приказы № 109 от 21.03.2003 (ред. от 29.10.2009) № 951 от 29.12.2014). Лекарственная чувствительность к противотуберкулезным препаратам была определена непрямым методом абсолютных концентраций и/или с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960.

Кроме того, для оценки бактериальной нагрузки диагностического материала больных туберкулезом органов дыхания (ТОД) и пациентов с костно-суставным туберкулезом (КСТ) использовали данные о числе КОЕ (колониеобразующих единиц) в 1083 образцах (2009–2015 гг.) с выявленной при дальнейшем тестировании множественной (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ).

Скорость роста исследуемых штаммов измеряли с помощью метода A. von Groll et al. [38] в нашей модификации. За 3 недели до опыта суспензию *M. tuberculosis* размораживали и высевали на среду Левенштейна–Йенсена. Суспензию бактериальной массы готовили следующим образом. Полную петлю культуры, осторожно снятую с косяка среды так, чтобы не задеть среду, вносили в сухую стерильную пробирку с 8–10 стеклянными шариками диаметром 3–5 мм. Бактериальную массу растирали с помощью шейкера «Вортекс» на максимальном числе оборотов, вносили 3–4 капли

бульона Миддлбука 7Н9 (Becton Dickinson, США) и вновь растирали. Затем добавляли 5 мл бульона Миддлбука и оставляли на 1 ч для осаждения конгломератов. Отбирали верхнюю часть супернатанта (объем 2 мл) и доводили его до плотности 1 ед. McFarland. Затем суспензию разводили в 40 раз бульоном Миддлбука с ростовой добавкой OADC (10%, Becton Dickinson, США), инокулировали в 96-луночный планшет (объем 200 мкл, по 8 лунок на штамм) и добавляли 30 мкл 0,01% водного раствора резазурина (Sigma-Aldrich). Флуоресценцию измеряли на планшетном ридере FLUOstar Optima (длина волны возбуждения — 530 нм, излучения — 590 нм) ежедневно в течение 8 дней. Для каждого штамма в формате программы Microsoft Excel строили кривую роста по средним значениям интенсивности флуоресценции каждого дня измерения и вычисляли ее наклон в условных единицах, характеризующих скорость роста. Опыты повторяли 2–6 раз, скорость роста каждого штамма оценивали в условных единицах, соответствующих средним значениям интенсивности флуоресценции, полученным во всех опытах.

В большинстве опытов с целью сравнения параллельно определяли скорость роста стандартного штамма H37Rv (TBC#1/47), полученного из ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». Лиофилизированную культуру высевали на среду Левенштейна–Йенсена и через 3 недели инкубации собирали бактериальную массу, сус-

Таблица. Структура лекарственной чувствительности штаммов *M. tuberculosis*

Table. Structure of drug sensitivity of *M. tuberculosis* strains

Группы Groups	Число штаммов (абс./%) Number of strains (abs./%)				
	чувствительных sensitive	полирезистентных drug-resistant	МЛУ MDR	ШЛУ XDR	Всего Total
ТОД, нелеченые, респираторный материал PT, untreated, respiratory specimens	2/6,5	5/16,1	21/67,7	3/9,7	31/100
ТОД, леченые неоперированные, респираторный материал PT, treated non-surgery, respiratory specimens	0	2/16,7	7/58,3	3/25,0	12/100
ТОД, леченые оперированные, респираторный материал PT, treated, surgery, respiratory specimens	0	0	9/32,1	19/67,9	28/100
ТОД, леченые оперированные, операционный материал PT, treated, surgery, surgical specimens	0	0	0	6/100	6/100
КСТ, операционный материал BJT, surgical specimens	10/25,6	6/15,4	22/56,4	1/2,6	39/100
Всего Total	12/10,3	13/11,2	59/50,9	32/27,6	116/100

Примечание. ТОД — туберкулез органов дыхания, КСТ — костно-суставной туберкулез, МЛУ — множественная лекарственная устойчивость, ШЛУ — широкая лекарственная устойчивость.

Note. PT — pulmonary tuberculosis, BJT — bone and joint tuberculosis, MDR — multidrug-resistance, XDR — extensively drug-resistant.

пендировали в физиологическом растворе с 15% глицерина и замораживали при -80°C . Во всех опытах использовали только вторую генерацию штамма, которую получали после трехнедельной инкубации размороженной суспензии, инокулированной на среду Левенштейна–Йенсена. Вычисляли среднее значение скорости роста H37Rv для всех серий опытов ($n = 10$).

Клинические штаммы *M. tuberculosis* объединяли в различные группы в зависимости от лечения, диагностического материала и локализации процесса: 1 группа — нелеченные (впервые выявленные) больные ТОД, респираторный материал ($n = 31$); 2 группа — леченные неоперированные больные ТОД, респираторный материал ($n = 12$); 3 группа — леченные оперированные больные ТОД (с хроническим и гиперхроническим течением процесса), респираторный материал ($n = 28$); 4 группа — аналогичные пациенты, операционный материал ($n = 6$); 5 группа — больные КСТ, операционный материал ($n = 39$). В каждой группе вычисляли среднее значение и доверительный интервал ($M \pm I$; при $p = 0,05$); значимость различий между группами определяли с помощью t -теста, критерия Манна–Уитни, критерия χ^2 Пирсона, используя программу SPSS.

Результаты

Структура лекарственной чувствительности исследованных штаммов *M. tuberculosis* приведена в таблице. Для всех групп характерно ее смещение в сторону множественной (МЛУ) и широкой (ШЛУ) лекарственной устойчивости. В общей сложности доля штаммов с МЛУ и ШЛУ достигала 78,5% числа исследованных изолятов. При ТОД процент изолятов *M. tuberculosis* с ШЛУ был больше в 2,6 и 7,0 раз во 2 и 3 группах в сравнении с первой. Все 6 исследованных штаммов, выделенных из операционного материала пациентов с ТОД, были с ШЛУ.

Скорость роста штаммов *M. tuberculosis* с различными характеристиками лекарственной чувствительности приведена на рисунке 1. Скорость роста чувствительных штаммов значительно не отличалась от лекарственно-устойчивых штаммов (полирезистентных, МЛУ и ШЛУ), при этом отмечали значительную вариабельность параметров роста изолятов — размах выборки составлял 56,7–321,3 (чувствительные), 30,2–424,6 (МЛУ) и 10,2–423,1 (ШЛУ) усл.ед. Различия обнаружены между группами штаммов с полирезистентностью и ШЛУ ($p < 0,05$).

Мы сочли более корректным сравнение скорости роста чувствительных и устойчивых штаммов *M. tuberculosis* для изолятов только при КСТ, так как при ТОД даже у впервые выявленных (нелеченных) больных структура лекарственной чувствительности смещена в сторону МЛУ (табл.) и всего 2 штамма из 31 были чувствительными. Скорость роста чувствительных, полирезистентных и МЛУ изолятов (ШЛУ во внимание не принимали, так как был только один такой штамм) при КСТ была сходной (рис. 2).

В целом изоляты от больных ТОД (респираторный материал, $n = 71$) по средним значениям характеризовались большей скоростью роста, чем таковые при КСТ ($n = 39$): $215,6 \pm 25,2$ против $174,6 \pm 18,6$ усл. ед. ($p = 0,011$).

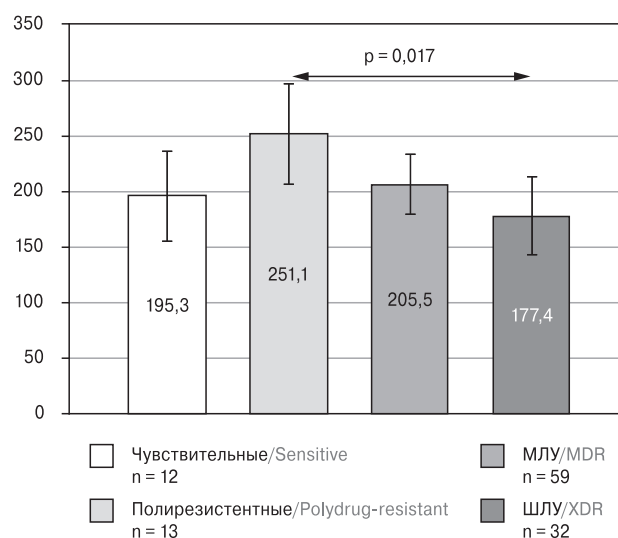


Рисунок 1. Скорость роста клинических штаммов *M. tuberculosis* с различными характеристиками лекарственной чувствительности

Figure 1. The growth rate of *M. tuberculosis* clinical strains with different drug susceptibility characteristics

Примечание. Средние значения скорости роста (в усл. ед.) с 95% доверительным интервалом. В каждом опыте величину скорости роста представляли в условных единицах, считая ее равной наклону кривой, полученной при ежедневной флуоресцентной спектрометрии штамма и вычисленной с помощью программы MS Excel. Значение скорости роста для каждого штамма рассчитывали по данным 2–6 опытов, для группы — по данным параметров роста, входящих в нее штаммов. Стрелка указывает на значимые различия между группами.

Note. The growth rate mean values (conventional units) with the 95% confidence interval. In each experiment, the growth rate it was presented in conventional units, which we equated to the slope of the curve obtained with the daily fluorescence spectrometry of the strain and calculated in MS Excel. The growth rate for each strain were calculated with date of the 2–6 experiments, mean value for the group were calculated according to the data of strains included in it. The arrow showing significant differences between the groups.

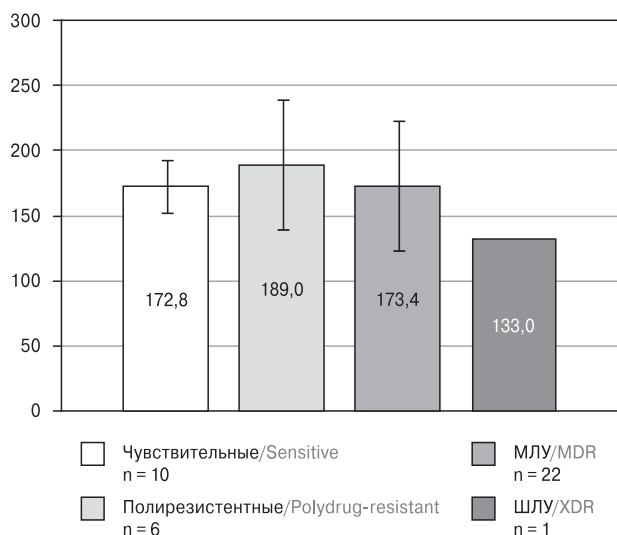


Рисунок 2. Скорость роста клинических штаммов *M. tuberculosis* с различными характеристиками лекарственной чувствительности при костно-суставном туберкулезе

Figure 2. The growth rate of *M. tuberculosis* clinical strains with different drug susceptibility characteristics in bone and joint tuberculosis.

Примечание. Средние значения скорости роста (в усл. ед.) с 95% доверительным интервалом.

Note. The growth rate mean values (conventional units) with the 95% confidence interval.

Штаммы от больных ТОД различались по средним значениям скорости роста (рис. 3): изоляты из респираторного материала впервые выявленных (группа 1, $n = 31$) превосходили по параметрам роста штаммы от пациентов леченых неоперированных (группа 2, $n = 12$) в 1,40 раза ($U_{\text{эмп.}} = 119$, $U_{\text{крит.}} = 124$, $p < 0,05$), леченых оперированных (группа 3, $n = 28$) — в 1,32 раза ($p = 0,036$). При тенденции превышения скорости роста штаммов, выделенных из операционного материала, в сравнении с изолятами из респираторного материала оперированных пациентов (3 и 4 группы) значимой разницы не обнаружено ($p = 0,066$) вследствие разброса данных и небольшой выборки в четвертой группе ($n = 6$).

Скорость роста штаммов, выделенных из операционного материала больных КСТ, была значимо меньше таковой изолятов 1 (в 1,43 раза) и 4 групп (в 1,29 раза), не отличаясь при этом от 2-й и 3-й.

Все группы по средним значениям параметров роста были значимо меньше стандартного музейного штамма H37Rv (средние значения скорости роста при измерении в 10 сериях опытов). При этом скорость штаммов 1–5 групп составляла соответственно 70,9; 50,6; 52,3; 63,4

и 49,3% от скорости роста музейного штамма. Следует отметить, что доля изолятов, выделенных из респираторного материала леченых пациентов с ТОД, у которых скорость роста была не меньше таковой стандартного штамма H37Rv составляла 30,0% (12 из 40) против 58,1% (18 из 31) у нелеченых ($\chi^2 = 5,638$, $p = 0,018$).

Для того, чтобы исключить влияние фактора чувствительности, сравнили показатели роста только МЛУ штаммов (такие штаммы составляли большую долю всех исследованных изолятов) (рис. 4). При этом было выявлено ее превышение в 1,48 раза в 1 группе в сравнении со 2-й ($U_{\text{эмп.}} = 39$, $U_{\text{крит.}} = 41$, $p < 0,05$) и в 1,46 раза ($p = 0,008$) в сравнении с 5-й. Также следует отметить тенденцию к снижению скорости роста в 1,27 раза в 3 группе в сравнении с 1-й, однако малая выборка ($n = 9$, вследствие того, что штаммы с МЛУ составили всего 32,1% от числа всех штаммов в этой группе — 19 из 28) и разброс данных не позволили сделать заключение о значимости этих различий. Все 6 штаммов 4 группы (операционный материал леченых оперированных больных) были с ШЛУ, что не дало возможности включить эту группу в сравнительный анализ.

Бактериальная нагрузка диагностического материала, определяемая при его посеве на плотные питательные среды, в некоторой степени характеризует жизнеспособность штаммовой популяции *M. tuberculosis*. Для оценки возможного влияния лечения на данный показатель провели сравнение массивности роста 1083 МЛУ/ШЛУ штаммов возбудителя туберкулеза, выделенных от пациентов, находившихся в клиниках СПб НИИ фтизиопульмонологии в 2009–2015 гг. (рис. 5). В респираторном материале леченых оперированных больных с ТОД доля штаммов с высокой массивностью роста ($\text{КОЕ} \geq 100$) была наиболее высокой, превосходя группу нелеченых в 1,9 раза, леченых неоперированных — в 1,2 раза, КСТ — в 2,6 раза. Наименьшей доля таких штаммов была в группе 5 (КСТ), значимо отличаясь при этом от групп второй и четвертой в 2,2 раза, а третьей — в 2,6 раза.

Корреляции между скоростью роста исследованных субкультур и бактериальной нагрузкой диагностического материала, из которого были выделены исследованные штаммы, не обнаружено ($r = 0,01$).

Обсуждение

Высокий процент МЛУ/ШЛУ штаммов *M. tuberculosis* среди исследованных изолятов обусловлен тем, что в клиниках СПб НИИФ на-

ходятся на лечении преимущественно пациенты с лекарственно-устойчивым туберкулезом. В связи с этим выборка лекарственно-чувствительных изолятов была небольшой.

Доводы в пользу применения метода REMA (Resazurin Microdilution Assay), модифицированного для определения скорости роста штаммов *M. tuberculosis*, в сравнении с измерением плотности суспензий, определением КОЕ, использованием системы BACTEC MGIT, приведены в работе A. von Groll et al. [38]: простота, быстрота, экономичность. В нашей работе для регистрации результата в отличие от указанно-

го выше исследования мы использовали более чувствительную в сравнении с адсорбционной флуоресцентную спектрофотометрию, так как при длине возбуждающей волны 530 нм интенсивность свечения восстановленной формы (резорурфина, образующегося при воздействии окислительно-восстановительных ферментов живых клеток на резазурин) многократно превосходит таковую окисленной (резазурин) формы индикатора, в отличие от адсорбционной спектрофотометрии, при которой площадь перекрытия спектров значительна (Parrot, 2003). Кроме того, мы выстраивали кривую роста

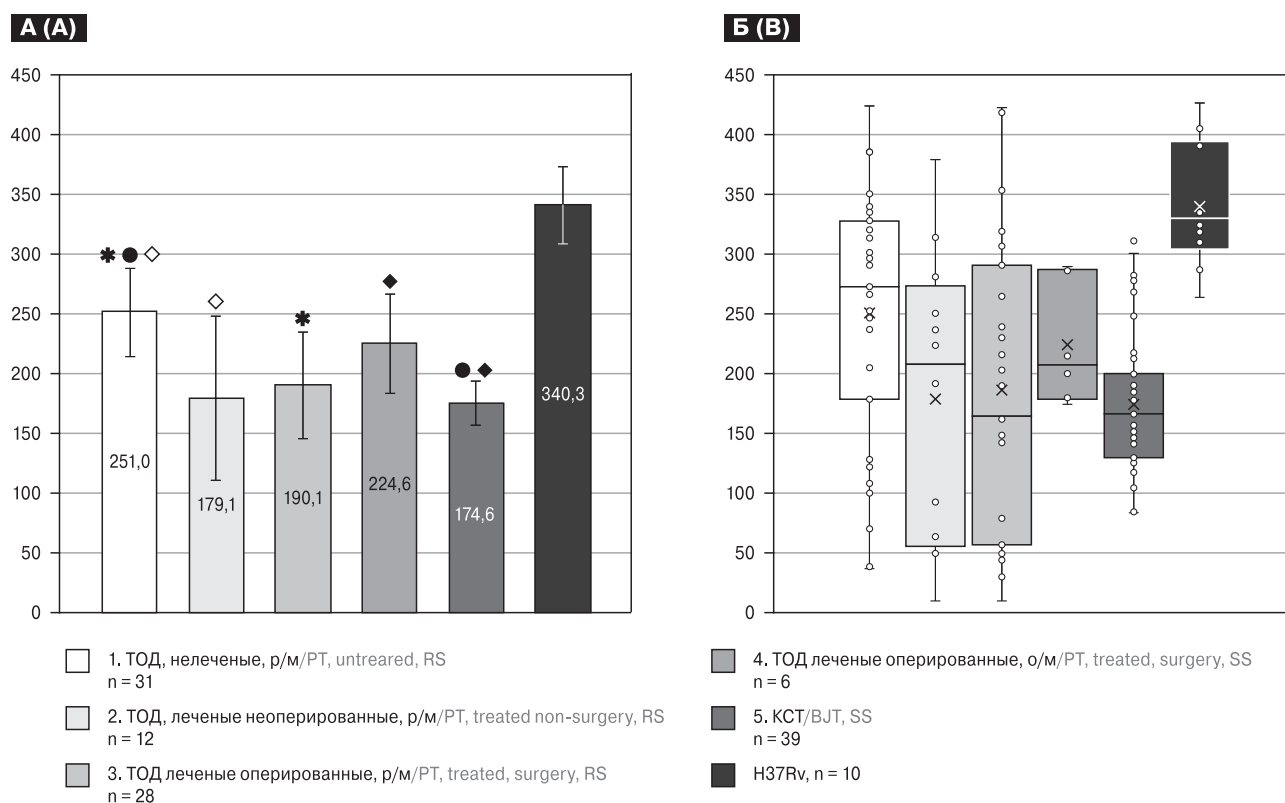


Рисунок 3. Скорость роста штамма H37Rv и изолятов *M. tuberculosis* в зависимости от лечения и локализации процесса

Figure 3. The growth rate of the *M. tuberculosis* H37Rv and clinical strains depending on the treatment and localization of the process.

А) Средние значения скорости роста (в усл. ед.) с 95% доверительным интервалом. ТОД — туберкулез органов дыхания, КСТ — костно-суставной туберкулез, р/м — респираторный материал, о/м — операционный материал; значимые различия между группами по критерию t: * — $p = 0,036$, ● — $p = 0,026$; по критерию Манна-Уитни: ◇ — $U_{\text{эмп.}} = 119$, $U_{\text{крит.}} = 124$, $p < 0,05$, ◆ — $U_{\text{эмп.}} = 55$, $U_{\text{крит.}} = 69$, $p < 0,05$. Б) Бокс-плоты показывают распределение значений скорости роста в группах. Легенда та же. Кружки — значения скорости роста; верхняя и нижняя грани прямоугольников — значения верхних и нижних квартилей, пересекающая прямоугольники прямая — медиана, верхние и нижние отрезки — максимальные и минимальные значения, x — средние значения.

А) The growth rate mean values (conventional units) with a confidence interval (95% CI); PT — pulmonary tuberculosis, BJT — bone and joint tuberculosis, RS — respiratory specimens; SS — surgical specimens; significant differences between groups by the t criterion: * — $p = 0.036$, ● — $p = 0.026$; by the Mann-Whitney criterion: ◇ — $U_{\text{emp.}} = 119$, $U_{\text{crit.}} = 124$, $p < 0.05$, ◆ — $U_{\text{emp.}} = 55$, $U_{\text{crit.}} = 69$, $p < 0.05$. Б) Box plots showing the distribution of growth rates in groups. The legend is the same. Circles — the values of the growth rate; the upper and lower rectangle faces are the values of the upper and lower quartiles, the line intersecting the rectangle is the median, the upper and lower line segments are the maximum and minimum values, x — the mean values.

и вычисляли ее наклон, который по сути и отражает скорость роста — изменение параметра интенсивности флуоресценции в единицу времени, а не фиксированную точку во времени, к которой штамм достигает определенного числа ростовых единиц [37] или оптической плотности [8].

Средние значения скорости роста чувствительных и МЛУ/ШЛУ штаммов значимо не отличались как в целом, так и внутри группы КСТ. Сходные результаты получены F.S. Spies с соавт. [34]. Это согласуется с данными литературы о сохранении жизнеспособности у резистентных к рифампицину изолятов за счет компенсаторных мутаций [12]. С другой стороны, наши результаты отличаются от данных N.S. Morcillo et al. [27], которые при определе-

нии параметров относительного (по отношению к стандартному штамму H37Rv) фитнеса исследуемых штаммов (выделенных от эпидемиологически связанных пациентов), обнаружили его уменьшение у МЛУ штаммов в сравнении с чувствительными и лекарственно-устойчивыми, при этом степень резистентности штамма к противотуберкулезным препаратам (значения минимальной ингибирующей концентрации) не коррелировала с параметрами фитнеса.

Поскольку большую часть чувствительных штаммов (10 из 12) составляли изоляты, выделенные при КСТ, провели сравнение скорости роста чувствительных и устойчивых *M. tuberculosis* внутри этой группы. Отсутствие значимых различий подтвердило наше предположение о большем влиянии на параметры роста локализации туберкулеза, нежели фактора лекарственной чувствительности/устойчивости.

Возможное объяснение значимо большей скорости роста полирезистентных штаммов в сравнении с МЛУ изолятами — из 13 полирезистентных штаммов только 1 штамм был устойчив к рифампицину. Известно, что мутации в гене *rpoB* уменьшают фитнес микобактерий, а компенсаторные мутации могут его восстанавливать [12]. Вероятно, чувствительность к рифампицину приближает штамм по параметрам фитнеса к «дикому» типу.

Параметры роста штаммов, выделенных из материала больных ТОД, значимо превышали таковые при КСТ. Это закономерно, учитывая менее благоприятные условия вегетации возбудителя при КСТ. Поскольку при локализации туберкулезного поражения, отграниченного от внешней среды, невозможна передача возбудителя к другому хозяину, то невозможна и селекция штаммов по способности выживать в тканях костно-суставной системы, следовательно, в этом случае следует говорить об адаптации штаммовой популяции патогена к индивидуальному хозяину.

Скорость роста изолятов от нелеченых пациентов по средним значениям была значимо выше, чем у леченых. Сравнение параметров роста только МЛУ штаммов 1–4 групп для устранения влияния фактора чувствительности/устойчивости в целом выявило ту же картину. Для ответа на вопрос является ли уменьшение скорости роста изолятов от леченых больных только следствием лечения, угнетающего жизнеспособность микобактерий, или он действует вкуче с фактором их адаптации к макроорганизму, оценили, во-первых, массивность роста МЛУ/ШЛУ штаммов при

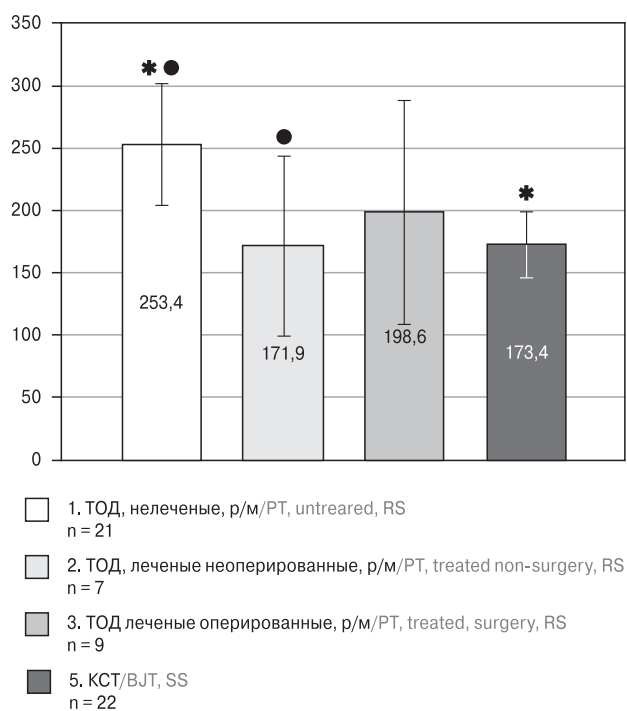


Рисунок 4. Скорость роста клинических МЛУ штаммов *M. tuberculosis*

Figure 4. The growth rate of the *M. tuberculosis* MDR clinical strains

Примечание. Средние значения скорости роста (в усл. ед.) с 95% доверительным интервалом. ТОД — туберкулез органов дыхания, КСТ — костно-суставной туберкулез, р/м — респираторный материал, о/м — операционный материал. Различия между группами значимы:

* — по критерию t , $p = 0,008$; ● — по критерию Манна-Уитни, $U_{эмп.} = 37$, $U_{крит.} = 41$, $p < 0,05$.

Note. The growth rate mean values (conventional units) with the 95% confidence interval. PT — pulmonary tuberculosis, BJT — bone and joint tuberculosis, RS — respiratory specimens; SS — surgical specimens. Significant differences between groups: * — by the criterion t , $p = 0,008$; ● — by the Mann-Whitney criterion, $U_{эмп.} = 37$, $U_{крит.} = 41$, $p < 0,05$.

посеве диагностического материала пациентов схожих групп ($n = 1083$). Было выявлено, что у леченых больных доля штаммов с КОЕ ≥ 100 значимо выше, чем у нелеченых пациентов и при КСТ. Это свидетельствует о том, что лечение и само по себе наличие МЛУ/ШЛУ не сказывается на жизнеспособности *M. tuberculosis*. Во-вторых, мы сравнили параметры роста клинических штаммов и музейного штамма H37Rv. Этот штамм в течение многих лет культивировался на искусственных питательных средах, сохраняется он в коллекциях (например, АТТС — в США, коллекции микроорганизмов в НЦЭСМП, РФ) в лиофилизированном или замороженном виде. Несмотря на длительные пассажи штамм не потерял способности вызывать туберкулезные изменения на моделях разных видов животных и потому используется как эталонный в самых разнообразных исследованиях. История используемого нами штамма H37Rv восходит к 1948 г., когда штаммы поддерживались путем многократных пересевов, поэтому мы рассматривали этот штамм как референтный не адаптированный к макроорганизму, но адаптированный к росту на искусственных питательных средах, как образец для сравнения с ним адаптированных к хозяину клинических изолятов. По средним значениям скорости роста H37Rv значимо превышал таковые исследованных изолятов во всех группах. При этом относительно H37Rv скорость роста была наибольшей в группе нелеченых больных — 70,9%. В остальных группах (леченые, КСТ), за исключением операционного материала леченых пациентов с ТОД (небольшое число таких изолятов не позволяет сделать корректный вывод), параметры роста клинических штаммов составляли около половины значений скорости роста референтного не адаптированного штамма H37Rv — 50,6; 52,3; 49,3%. И, в-третьих, параметры роста мы регистрировали у субкультур (2–4 генерации), в искусственной питательной среде, при отсутствии в ней противотуберкулезных препаратов.

Снижение скорости роста *M. tuberculosis*, выделенных от леченых пациентов, мы считаем результатом не только лечения, но и адаптации патогена к его окружающей среде — внутренней среде макроорганизма. Способность лекарственно-устойчивых микобактерий к адаптации к хозяину подтверждена в работе S.H. Gillespie et al. [18]. Возможно, снижение темпа репликации — это один из путей к переходу в дормантное состояние, которому способствует воздействие на патоген факторов иммунной защиты хозяина. Так, на модели экспериментального туберкулеза у мышей

в тканях легких были выявлены микобактерии не способные к росту, но сохраняющие метаболическую активность, при этом такие формы отсутствовали у мышей с генетически обусловленным недостатком синтеза IFN γ , то есть при иммунокомпрометированности [23].

Таким образом, штаммы *M. tuberculosis* различаются по фенотипическому свойству ско-

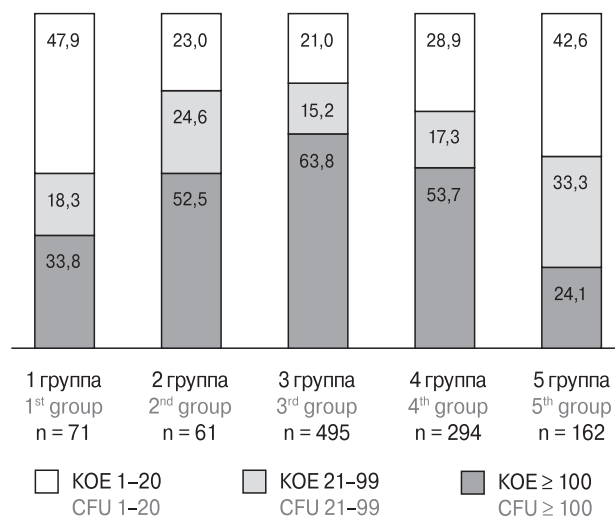


Рисунок 5. Бактериальная нагрузка диагностического материала (данные 2009–2015 гг.) при МЛУ/ШЛУ туберкулезе

Figure 5. The bacterial loads of the diagnostic material (data 2009–2015) in MDR/XDR tuberculosis

Примечание. В каждой группе указана доля образцов (в %) с низкой (1–20 КОЕ), средней (21–99 КОЕ) и высокой (≥ 100 КОЕ) бактериальной нагрузкой. 1 группа — нелеченые пациенты с ТОД, респираторный материал; 2 группа — леченые не оперированные пациенты с ТОД, респираторный материал; 3 группа — леченые оперированные пациенты с ТОД, респираторный материал; 4 группа — леченые оперированные пациенты с ТОД, операционный материал; 5 группа — пациенты с туберкулезом костно-суставной системы, операционный материал. Различия для КОЕ ≥ 100 между группами: 1 и 2 — $\chi^2 = 4,675$, $p = 0,031$; 1 и 3 — $\chi^2 = 23,354$, $p < 0,001$; 1 и 4 — $\chi^2 = 9,094$, $p = 0,003$; 2 и 5 — $\chi^2 = 16,452$, $p < 0,001$; 3 и 4 — $\chi^2 = 7,840$, $p = 0,005$; 3 и 5 — $\chi^2 = 77,703$, $p < 0,001$; 4 и 5 — $\chi^2 = 37,465$, $p < 0,001$.

Note. Each group showing the percentage of samples with low (1–20 CFU), medium (21–99 CFU) and high (≥ 100 CFU) bacterial load. 1 group — untreated pulmonary tuberculosis patients, respiratory specimens; 2 group — treated non-surgery pulmonary tuberculosis patients, respiratory specimens; 3 group — treated surgery pulmonary tuberculosis patients, respiratory specimens; 4 group — treated surgery pulmonary tuberculosis patients, surgical specimens; 5 group — bone and joint tuberculosis patients, surgical specimens. Significant differences for CFU ≥ 100 between the groups: 1 and 2 — $\chi^2 = 4.675$, $p = 0.031$; 1 and 3 — $\chi^2 = 23.354$, $p < 0.001$; 1 and 4 — $\chi^2 = 9.094$, $p = 0.003$; 2 and 5 — $\chi^2 = 16.452$, $p < 0.001$; 3 and 4 — $\chi^2 = 7.840$, $p = 0.005$; 3 and 5 — $\chi^2 = 77.703$, $p < 0.001$; 4 and 5 — $\chi^2 = 37.465$, $p < 0.001$.

рости роста. Поскольку скорости роста чувствительных и МЛУ/ШЛУ изолятов сходны, а показатели роста штаммов, выделенных от пациентов с ТОД и КСТ, различаются, то можно сделать вывод, что на формирование данного фенотипического свойства *M. tuberculosis* в значительной мере влияет локализация туберкулезного процесса. Снижение репликации микобактерий можно трактовать как ответ патогена на неблагоприятные условия вегетации в костно-суставной ткани. Известные данные о трудностях бактериологической диагностики КСТ, связанные с частой олигобациллярностью и сниженной ферментативной активностью, косвенно можно объяснить и выявленной пониженной скоростью роста *M. tuberculosis* при этой локализации.

Уменьшение скорости роста изолятов, выделенных от леченых пациентов ТОД в сравнении с нелечеными мы объясняем не столько наличием собственно лекарственной устойчивости у *M. tuberculosis*, сколько совместным влиянием двух факторов: лечения и адаптации патогена к макроорганизму при длительной его вегетации. В пользу значимости фактора адаптации свидетельствует, во-первых, факт сохранения

жизнеспособности патогена у леченых пациентов с ТОД, вызванным штаммами микобактерий с МЛУ/ШЛУ, что проявляется в большой частоте (52,5–63,8%) высокой бактериальной нагрузки (КОЕ \geq 100) диагностического материала. Во-вторых, у большинства (70,0%) изолятов от леченых пациентов с ТОД скорость роста меньше, чем темп репликации референтного не адаптированного к макроорганизму (вследствие длительных пассажей на питательных средах) штамма H37Rv. В-третьих, скорость роста определяли у субкультур (2–4 генерации) в жидкой питательной среде, то есть без непосредственного влияния противотуберкулезных препаратов на штамм в момент исследования. Необходимы дальнейшие исследования фенотипического свойства скорости роста в зависимости от генетических особенностей возбудителя и лечения.

Благодарность

Благодарим Н.С. Соловьеву, заведующую бактериологической лабораторией СПбНИИФ, за предоставленную информацию о КСТ штаммах *M. tuberculosis*.

Список литературы/References

1. Arcos J., Sasindran S.J., Fujiwara N., Turner J., Schlesinger L.S., Torrelles J.B. Human lung hydrolases delineate mycobacterium tuberculosis-macrophage interactions and the capacity to control infection. *J. Immunol.*, 2011, vol. 187, no. 1, pp. 372–381. doi: 10.4049/jimmunol.1100823
2. Balázs G., Heath A.P., Shi L., Gennaro M.L. The temporal response of the Mycobacterium tuberculosis gene regulatory network during growth arrest. *Mol. Syst. Biol.*, 2008, vol. 4, no. 225, pp. 1–8. doi: 10.1038/msb.2008.63
3. Ben-Kahlia I., Al-Hajjaj S. Drug-resistant tuberculosis viewed from bacterial and host genomes. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2016, vol. 48, iss. 4, pp. 353–360. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.07.010
4. Beste D.J.V., Espasa M., Bonde B., Kierzek A.M., Stewart G.R., McFadden J. The genetic requirements for fast and slow growth in mycobacteria. *PLoS One*, 2009, vol. 4, iss. 4: e5349. doi: 10.1371/journal.pone.0005349
5. Bhattar P., Chatterjee A., D'souza D., Tolani M., Mistry N. Estimating fitness by competition assays between drug susceptible and resistant mycobacterium tuberculosis of predominant lineages in Mumbai, India. *PLoS One*, 2012, vol. 7, iss. 3:e33507. doi: 10.1371/journal.pone.0033507
6. Bhattar P., Mistry N. Fitness of acquired drug resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from DOTS compliant patients. *Tuberculosis*, 2013, vol. 93, iss. 4, pp. 418–424. doi: 10.1016/j.tube.2013.03.006
7. Bretl D.J., Demetriadou C., Zahrt T.C. Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of mycobacterium tuberculosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2011, vol. 75, no. 4, pp. 566–582. doi: 10.1128/MMBR.05004-11
8. Casart Y., Turcios L., Florez I., Jaspe R., Guerrero E., de Waard J., Aguilar, D., Hernández-Pando R., Salazar L. IS6110 in oriC affects the morphology and growth of Mycobacterium tuberculosis and attenuates virulence in mice. *Tuberculosis*, 2008, vol. 88, iss. 6, pp. 545–552. doi: 10.1016/j.tube.2008.03.006
9. Chandra N., Kumar D., Rao K. Systems biology of tuberculosis. *Tuberculosis*, 2011, vol. 91, iss. 5, pp. 487–496. doi: 10.1016/j.tube.2011.02.008
10. Chen Y.-Y., Chang J.-R., Huang W.-F., Hsu S.-C., Kuo S.-C., Sun J.-R., Dou H.Y. The pattern of cytokine production in vitro induced by ancient and modern Beijing mycobacterium tuberculosis strains. *PLoS One*, 2014, vol. 9, iss. 4: e94296. doi: 10.1371/journal.pone.0094296
11. Click E.S., Winston C.A., Oeltmann J.E., Moonan P.K., Mac Kenzie W.R. Association between Mycobacterium tuberculosis lineage and time to sputum culture conversion. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2013, vol. 17, no. 7, pp. 878–884. doi: 10.5588/ijtld.12.0732
12. Comas I., Borrell S., Roetzer A., Rose G., Malla B., Kato-Maeda M., Galagan J., Niemann S., Gagneux S. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat. Genet.*, 2011, vol. 44, no. 1, pp. 106–110. doi: 10.1038/ng.1038
13. Dey B., Bishai W.R. Crosstalk between Mycobacterium tuberculosis and the host cell. *Semin. Immunol.*, 2014, vol. 26, iss. 6, pp. 486–496. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.002

14. Eoh H. Metabolomics: a window into the adaptive physiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2014, vol. 94, iss. 6, pp. 538–543. doi: 10.1016/j.tube.2014.08.002
15. Faksri K., Chaiprasert A., Pardieu C., Casali N., Palaga T., Palittapongarnpim P., Prayoonwiwat N., Drobniewski F. Heterogeneity of phenotypic characteristics of the modern and ancestral Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Asian. Pac. J. Allergy Immunol.*, 2014, vol. 32, no. 2, pp. 124–132. doi: 10.12932/AP0361.32.2.2013
16. Flores-Villalva S., Rogriguez-Hernandez E., Rubio-Venegas Y., Canto-Alarcon J.G., Milian-Suazo F. What can proteomics tell us about tuberculosis? *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, vol. 25, no. 8, pp. 1181–1194. doi: 10.4014/jmb.1502.02008
17. Forrellad M.A., Klepp L.I., Gioffré A., Sabio y García J., Morbidoni H.R., de la Paz Santangelo M., Cataldi A.A., Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 2013, vol. 4, iss. 1, pp. 3–66. doi: 10.4161/viru.22329
18. Gillespie S.H., Billington O.J., Breathnach A., McHugh T.D. Multiple drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: evidence for changing fitness following passage through human hosts. *Microb. Drug Resist.*, 2002, vol. 8, iss. 4, pp. 273–279. doi: 10.1089/10766290260469534
19. Gomes L.L., Vasconcellos S.E.G., Gomes H.M., Elias A.R., Da Silva Rocha A., Ribeiro S.C.M., Panunto A.C., Ferrazoli L., Da Silva Telles M.A., De Ivens A.M.E., Kritski A.L., Mokrousov I., Manicheva O.A., Lasunskaja E., Suffys P.N. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in Brazil and Mozambique and relation with infectivity and induction of necrosis in THP-1 cells. *Tuberculosis*, 2015, vol. 95, suppl. 1, pp. 190–196. doi: 10.1016/j.tube.2015.02.025
20. Griffin J.E., Gawronski J.D., DeJesus M.A., Ioerger T.R., Akerley B.J., Sasseti C.M. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, no. 9: e1002251. doi: 10.1371/journal.ppat.1002251
21. Hang N.T.L., Maeda S., Keicho N., Thuong P.H., Endo H. Sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains and unfavorable outcomes of anti-tuberculosis treatment. *Tuberculosis*, 2015, vol. 95, iss. 3, pp. 336–342. doi: 10.1016/j.tube.2015.02.040
22. Hu Y., Movahedzadeh F., Stoker N.G., Coates A.R.M. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* α -crystallin-like hspX gene causes increased bacterial growth in vivo. *Infect. Immun.*, 2006, vol. 74, no. 2, pp. 861–868. doi: 10.1128/iai.74.2.861
23. Kurtz S., McKinnon K.P., Runge M.S., Ting J.P.-Y., Braunstein M. The SecA2 secretion factor of *Mycobacterium tuberculosis* promotes growth in macrophages and inhibits the host immune response. *Infect. Immun.*, 2006, vol. 74, no. 12, pp. 6855–6864. doi: 10.1128/IAI.01022-06
24. Lamichhane G., Raghunand T.R., Morrison N.E., Woolwine S.C., Tyagi S., Kandavelou K., Bishai W.R. Deletion of a *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal atpase homologue gene produces a slow-growing strain that persists in host tissues. *J. Infect. Dis.*, 2006, vol. 194, iss. 9, pp. 1233–1240. doi: 10.1086/508288
25. Manina G., Dhar N., McKinney J.D. Stress and host immunity amplify *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. *Cell Host Microbe*, 2015, vol. 17, iss. 1, pp. 32–46. doi: 10.1016/j.chom.2014.11.016
26. Martinot A.J., Farrow M., Bai L., Layre E., Cheng T.-Y., Tsai J.H., Iqbal J., Annand J.W., Sullivan Z.A., Hussain M.M., Sacchetti J., Moody D.B., Seeliger J.C., Rubin E.J. *Mycobacterial* metabolic syndrome: LprG and Rv1410 regulate triacylglyceride levels, growth rate and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.*, 2016, vol. 12, no. 1: e1005351. doi: 10.1371/journal.ppat.1005351
27. Morcillo N.S., Imperiale B.R., Di Giulio Á., Zumárraga M.J., Takiff H., Cataldi Á.A. Fitness of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* and the impact on the transmission among household contacts. *Tuberculosis*, 2014, vol. 94, iss. 6, pp. 672–677. doi: 10.1016/j.tube.2014.08.003
28. Naidoo C.C., Pillay M. Increased in vitro fitness of multi- and extensively drug-resistant F15/LAM4/KZN strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2014, vol. 20, iss. 6, pp. O361–O369. doi: 10.1111/1469-0691.12415
29. Perrot S., Dutertre-Catella H., Martin C., Warnet J.-M., Rat P. A new nondestructive cytometric assay based on resazurin metabolism and an organ culture model for the assessment of corneal viability. *Cytometry*, 2003, Part A, vol. 55A, iss. 1, pp. 7–14. doi: 10.1002/cyto.a.10067
30. Reiling N., Homolka S., Walter K., Brandenburg J., Niwinski L., Ernst M., Herzmann C., Lange C., Diel R., Ehlers S., Niemann S. Clade-specific virulence patterns of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains in human primary macrophages and aerogenically infected mice. *MBio*, 2013, vol. 4, no. 4: e00250-13. doi: 10.1128/mBio.00250-13
31. Romero M.M., Balboa L., Basile J.I., López B., Ritacco V., de la Barrera S.S., Sasiain M.C., Barrera L., Alemán M. Clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* differ in their ability to induce respiratory burst and apoptosis in neutrophils as a possible mechanism of immune escape. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, vol. 2012, 11 p. doi: 10.1155/2012/152546
32. Schierloh P., Klepp L., Vazquez C., Rocha R.V., Blanco F.C., Balboa L., Schierloh P., Klepp L., Vazquez C., Rocha R.V., Blanco F.C., Balboa L., López B., Ritacco V., Bigi F., Sasiain M.C. Differential expression of immunogenic proteins on virulent *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Biomed. Res. Int.*, 2014, vol. 2014, 13 p. doi: 10.1155/2014/741309
33. Smith K.L.J., Saini D., Bardarov S., Larsen M., Frothingham R., Gandhi N.R., Jacobs Jr.W.R., Sturm A.W., Lee S. Reduced virulence of an extensively drug-resistant outbreak strain of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *PLoS One*, 2014, vol. 9, iss. 4: e94953. doi: 10.1371/journal.pone.0094953
34. Spies F.S., von Groll A., Ribeiro A.W., Ramos D.F., Ribeiro M.O., Regina E., Costa D., Martin A., Carlos J., Lucia M., Zaha A., Eduardo P., Silva A. Biological cost in *Mycobacterium tuberculosis* with mutations in the rpsL, rrs, rpoB, and katG genes. *Tuberculosis*, 2013, vol. 93, iss. 2, pp. 150–154. doi: 10.1016/j.tube.2012.11.004
35. Stavrum R., PrayGod G., Range N., Faurholt-Jepsen D., Jeremiah K., Faurholt-Jepsen M., Jeremiah K., Faurholt-Jepsen M., Krarup H., Aabye M.G., Chagalucha J., Friis H., Andersen A.B., Grewal H.Ms. Increased level of acute phase reactants in patients infected with modern *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Mwanza, Tanzania. *BMC Infect. Dis.*, 2014, vol. 14, pp. 309–321. doi: 10.1186/1471-2334-14-309
36. Swanepoel C.C., Loots D.T. The use of functional genomics in conjunction with metabolomics for *Mycobacterium tuberculosis* research. *Dis. Markers*, 2014, vol. 2014, 12 p. doi: 10.1155/2014/124218

37. Toungousova O.S., Caugant D.A., Sandven P., Mariandyshev A.O., Bjune G. Impact of drug resistance on fitness of Mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing genotype. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2004, vol. 42, iss. 3, pp. 281–290. doi: 10.1016/j.femsim.2004.05.012
38. Von Groll A., Martin A., Portaels F., da Silva P.E.A., Palomino J.C. Growth kinetics of Mycobacterium tuberculosis measured by quantitative resazurin reduction assay: a tool for fitness studies. *Brazilian J. Microbiol.*, 2010, vol. 41, no. 2, pp. 300–303. doi: 10.1590/S1517-83822010000200006
39. Von Groll A., Martin A., Stehr M., Singh M., Portaels F., da Silva P.E.A., Palomino J.C. Fitness of mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing and Non-W-Beijing genotype. *PLoS One*, 2010, vol. 5, iss. 4: e10191. doi: 10.1371/journal.pone.0010191

Авторы:

Маничева О.А., д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Догонадзе М.З., к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Мельникова Н.Н., к.м.н., старший научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Вишнеvский Б.И., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Маничев С.А., к.псх.н., доцент, зав. кафедрой эргономики и инженерной психологии ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Manicheva O.A., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, St. Petersburg Research Institute of Phthiopolmonology, St. Petersburg, Russian Federation;
Dogonadze M.Z., PhD (Biology), Senior Researcher, St. Petersburg Research Institute of Phthiopolmonology, St. Petersburg, Russian Federation;
Melnikova N.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, St. Petersburg Research Institute of Phthiopolmonology, St. Petersburg, Russian Federation;
Vishnevskiy B.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Researcher, St. Petersburg Research Institute of Phthiopolmonology, St. Petersburg, Russian Federation;
Manichev S.A., PhD (Psychology), Associate Professor, Head of the Department of Ergonomics and Engineering Psychology, St. Petersburg Research Institute of Phthiopolmonology, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.07.2017
Принята к печати 27.02.2018

Received 11.07.2017
Accepted 27.02.2018