

ПРОДУКЦИЯ БИОФИЛЬМОВ КЛИНИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА

О.Б. Огарков^{1,2}, А.Е. Суздальницкий³, П.А. Хромова¹, Т.А. Цыренова³,
Н.А. Сокольникова³, С.Н. Жданова¹, М.Е. Кошечев³

¹ ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия

² ГБОУ ДПО Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования, г. Иркутск, Россия

³ ОГБУЗ Иркутская областная клиническая туберкулезная больница, г. Иркутск, Россия

Резюме. Приведены доказательства малой вероятности обнаружения феномена образования биофильмов (БФ) при росте современных клинических штаммов *M. tuberculosis* на жидкой питательной среде. Высказана гипотеза о роли МЛУ/ШЛУ как препятствия для продукции БФ. Обнаружено, что штаммы, способные к продукции БФ, на среде Левенштейна–Йенсена растут специфическими колониями в R-форме в виде диска с выпуклым центром — «НЛО-колонии». Исследована способность к продукции БФ, устойчивость к антибиотикам и их принадлежность к основным эпидемическим кластерам генотипа Beijing (CC1 и CC2-W148) у 67 НЛО-штаммов. Показано что, МЛУ/ШЛУ штаммы так же способны к продукции БФ, однако значимо чаще это наблюдается у штаммов CC1 и CC2-W148 генотипов. Выдвигается гипотеза о потенциальной роли БФ в исходах хронических форм туберкулеза.

Ключевые слова: продукция биофильмов, *Mycobacterium tuberculosis*, генотипы, МЛУ/ШЛУ.

BIOFILM FORMATION INDUCED BY CLINICAL ISOLATES OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Ogarkov O.B.^{a,b}, Suzdalnitsky A.E.^c, Khromova P.A.^a, Tsyrenova T.A.^c, Sokolnikova N.A.^c, Zhdanova S.N.^a,
Koshcheev M.E.^c

^a Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation

^b Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk, Russian Federation

^c Irkutsk Regional Clinical Tuberculosis Hospital, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The data proving low probability of observing Biofilm Formation (BF) by contemporary clinical strains of *M. tuberculosis* growing on liquid medium in vitro are discussed. A hypothesis about the role of MDR/XDR development hindering BF production was proposed. It was found that strains capable of producing BF grow on Lewenstein–Jensen medium generated R-form specific colonies shaped as a disk with a convex center, “UFO-colonies”. Sixty seven “UFO”-strains were investigated to BF production, resistance to antibiotics and their belonging to the main epidemics clusters of the Beijing genotype (CC1 and CC2-W148). It was shown that MDR/XDR strains were also capable of BF production that, however, was remarkably more frequent in strains of CC1 and CC2-W148 genotypes. Thus, it was hypothesized that BF production might potentially influence an outcome of chronic forms of TB-infection.

Key words: biofilm production, *Mycobacterium tuberculosis*, genotypes, MDR/XDR.

Адрес для переписки:

Огарков Олег Борисович
664003, Россия, г. Иркутск ул. Тимирязева, 16,
ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи
и репродукции человека.
Тел.: 8 (3952) 20-73-67.
E-mail: obogarkov@yandex.ru

Contacts:

Oleg B. Ogarkov
664003, Russian Federation, Irkutsk, Timiryaseva str., 16,
Scientific Center for Family Health and Human
Reproduction Problems.
Phone: +7 (3952) 20-73-67.
E-mail: obogarkov@yandex.ru

Библиографическое описание:

Огарков О.Б., Суздальницкий А.Е., Хромова П.А., Цыренова Т.А.,
Сокольникова Н.А., Жданова С.Н., Кошечев М.Е. Продукция биофильмов
клиническими штаммами возбудителя туберкулеза // Инфекция
и иммунитет. 2018. Т. 8, № 4. С. 435–440. doi: 10.15789/2220-7619-2018-
4-435-440

Citation:

Ogarkov O.B., Suzdalnitsky A.E., Khromova P.A., Tsyrenova T.A.,
Sokolnikova N.A., Zhdanova S.N., Koshcheev M.E. Biofilm formation
induced by clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 4,
pp. 435–440. doi: 10.15789/2220-7619-2018-4-435-440

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-00160 А

Введение

Лечение туберкулеза легких предполагает терапию в течение 6–9 месяцев для исключения рецидива. Причина подобной продолжительности лечения не вполне ясна, поскольку эффективная гибель *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) должна произойти в течение первых 14 дней [9]. Предполагается, что существует субпопуляция возбудителя, которая или недоступна терапевтическому воздействию или не реагирует на него [14]. Современные модели устойчивости МБТ обычно объясняют этот феномен присутствием покоящихся (нерастающих) клеток-персистеров возбудителя, способных переживать в условиях гипоксии длительное время [15]. В то же время МБТ может в равной степени рассматриваться как внутриклеточный, так и внеклеточный патоген, который значительную часть своего жизненного цикла *in vivo* проводит внутри биофильмоподобной структуры [12]. Способность к продукции биофильмов (БФ) широко распространена у патогенных микроорганизмов, когда происходит формирование многоклеточной структуры возбудителя, окруженной внеклеточным матриксом, состоящим из различных полимеров [16]. Одним из наиболее значимых свойств возбудителя внутри БФ является резкое снижение его чувствительности к воздействию антибиотиков. МБТ не являются исключением: возбудитель внутри БФ в 20–1000 раз более устойчив к противотуберкулезным препаратам (ПТП) [6]. Однако продукция БФ клиническими штаммами туберкулеза, остается весьма загадочным феноменом. Анализ более трех сотен клинических штаммов из двух областных противотуберкулезных учреждений Иркутска и Улан-Уде [3] показал, что в подавляющем большинстве случаев клинические изоляты МБТ не имеют способности к продукции БФ. Анализ литературы свидетельствует, что ни в одном из исследований за последние десятилетия нет описания масштабной продукции БФ клиническим штаммами, и все описанные эксперименты проведены на лабораторных штаммах, зачастую подвергнутых генной модификации [6, 7, 11, 16]. В то же время в русскоязычной литературе 80-х гг. прошлого века [2] продукция БФ описывается как рутинное явление при росте на жидкой питательной среде. Нами было сделано предположение, что основной причиной изменения культуральных свойств клинических изолятов возбудителя (отсутствие роста в виде БФ на жидкой среде) за последние десятилетия могло стать массовое распространение множественной и широкой лекарственной устойчивости (МЛУ и ШЛУ). Мы предполагаем, что мутации, вызывающие МЛУ и ШЛУ, в первую очередь однонуклеотид-

ные замены (SNP), влияющие на процессы синтеза клеточной стенки возбудителя, являются причиной потери МБТ способности формировать БФ в модели *in vitro*. Эта гипотеза была принята как основная на первоначальных этапах настоящего исследования.

Материалы и методы

Соблюдение этических норм. Настоящее исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ.

Штаммы микобактерий. Штаммы были получены с твердой питательной среды Левенштейна–Йенсена. Среда Школьникова готовилась согласно действующим рекомендациям [1], для получения биопленок штаммы МБТ выращивали в 5 мл среды в стеклянных пробирках без добавления сыворотки крови человека [2]. Оценку устойчивости к ПТП проводили на базе бактериологической лаборатории Иркутской областной клинической больницы согласно утвержденным стандартным операционным процедурам (СОП) на твердых питательных средах. Для уточнения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в ряде случаев проведена оценка устойчивости штаммов к 12-ти ПТП 1-го и 2-го рядов в жидкой среде Middlebrook 7H9 с тест-системой Sensititre Myco TB (Thermo Scientific, США).

Модельный эксперимент по исследованию продукции БФ клиническими штаммами МБТ проводили в стеклянных пробирках с 5 мл среды Школьникова. Посевная доза составляла 100 мкл культуры, приготовленной по стандарту мутности 0,5 ед. и разведенному в 100 раз. В первые 10 дней рост происходил в аэробных условиях (пробирки закрывались ватно-марлевыми пробками), в последующие дни эксперимента во избежание высыхания среды пробки заменялись пластиковыми. Длительность экспериментов во всех случаях составляла 45 дней. Классификация интенсивности образования БФ проводилась по следующим критериям: 1) исключительным (++++) считался обильный рост БФ, заходящий на стенки пробирки; 2) хороший рост (+++) предполагал наличие толстой пленки, покрывающей всю поверхность среды, не заходящей вверх на стенки пробирки; 3) слабый рост (++) отмечался при наличии тонкой пленки и/или отдельных островков на поверхности жидкой среды; 4) отрицательный результат рассматривался при отсутствии поверхностного, но при наличии обильного придонного роста.

Выделение геномной ДНК из биофильмов и штаммов. Экстракцию ДНК штаммов МБТ проводили из образцов, убитых прогреванием при 100°C в течение 30 мин. Для удаления ингибиторов ПЦР проводили предваритель-

ную обработку биофильмов протеиназой К (AppliChem) и хлороформом. Фермент добавляли в количестве 2 ед. на образец в равном образцу объеме 0,5-кратного лизирующего буфера [8] от набора ДНК-сорб-В (Интерлабсервис, Россия), интенсивно встряхивали и прогревали при 55°C 30 мин. В дальнейшем к образцу добавляли равный объем хлороформа, перемешивали и центрифугировали на максимальных оборотах. Полученный супернатант отбирали в чистый виал и выделяли ДНК набором «ДНК-сорб-В» (Интерлабсервис), согласно протоколу производителя.

ПЦР проводили в варианте с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе LightCycler Nano (Roche). Олигонуклеотидные праймеры и зонды собственного дизайна синтезированы НПФ «Синтол», реагенты для ПЦР приобретались в компаниях «Интерлабсервис» и «Силекс».

Статистическую обработку результатов проводили в таблицах Excel и программой Statistica v6.0.

Результаты

Первоначально был проведен целенаправленный скрининг чувствительных штаммов на способность образовывать БФ при росте на синтетической среде Школьниковой. Результатом этого поиска стало обнаружение трех культур, способных с разной эффективностью образовывать БФ (рис., А, III обложка). Было так же обнаружено, что все 3 культуры имеют специфическую R-форму колоний при росте на среде Левенштейна–Йенсена. В отличие от стандартной R-формы МБТ эти штаммы на твердой питательной среде образовывали сухую колонию, окруженную кольцом вторичного роста.

Данная R-форма колоний была условно названа нами «НЛО-колонии» (рис. Б, III обложка). Для получения более представительной выборки в течение года был предпринят развернутый поиск штаммов, продуцирующих такого рода НЛО-колонии. Скрининг более полутора тысяч посевов на средах Левенштейна–Йенсена и Финн II позволил выявить 67 пробирок с искомыми колониями. В 12-ти случаях штаммы были парными, то есть принадлежали одному больному. НЛО-штаммы значимо чаще продуцировали БФ при росте на среде Школьниковой ($p < 0,01$). Однако около трети штаммов (25 из 67) с НЛО-колониями оказались неспособны продуцировать био пленку при росте на жидкой среде в течение 45 дней, или продуцировали ее слабо (++). Ретроспективный анализ профилей устойчивости к ПТП выбранных культур обнаружил, что вопреки исходному предположе-

Таблица 1. Список праймеров и зондов, использованных для идентификации штаммов, принадлежащих к эпидемическим кластерам
Table 1. List of primers and probes used for identify strains belonging to epidemics clusters

Название гена и (позиция SNP в геноме) The name of the gene and (SNP position in the genome)	Структура олигонуклеотида 5' → 3' The structure of the oligonucleotide 5' → 3'	Размер ампликона (п.н.) The size of the amplicon (b.p.)	Tm, °C	Ссылка на источник Source reference	Примечание Note
Pks17 (1887060)	CC1 FAM-ATGAGCTCAC(G-LNA)CGGC(A-LNA)CCTG-RTQ1	71	65	[13]	Зонды и праймеры для выявления ДНК CC1/ non-CC1 кластеров (дизайн выполнен в рамках данного исследования) Probes and primers for DNA detection of CC1/ non-CC1 clusters (designed as part of this study)
	nonCC1 R6G-ATGAGCTCAC(C-LNA)CGGC(A-LNA)CCTG-BHQ2				
	CC1F AGGTGATGGGGCCTGGAATT				
	CC1R GAAAACAACAACAACGCTGACAC				
Инсерция IS6110 Rv2664-Rv2665 Insertion IS6110 Rv2664-Rv2665	W148 (R6G)-AGACTTCTGATCT(G-LNA)AGAC(C-LNA)TCA-(BHQ2)	198	65	[5]	Зонды и праймеры для выявления ДНК W148/ nonW148 кластеров Probes and primers for DNA detection of W148/ nonW148 clusters
	nonW148 (FAM)-TT(C-LNA)CTCTGACAGCAACA(C-LNA)CAGTT-(RTQ1)				
	GCGACCCCGCCCTCCTGA				
	TCGGCCGTACGGACGACGAT				

нию подавляющее большинство несет ЛУ, в том числе МЛУ/ШЛУ. Все 67 исследуемых штаммов были разделены на 2 группы: 1) хорошие продуценты БФ (++++ и +++) и плохие продуценты БФ (++, отсутствие поверхностного роста).

В процессе анализа был отмечена особенность штаммов кластера W148 продуцировать БФ и в то же время нести МЛУ/ШЛУ. После исключения из выборки высокотрансмиссивных кластеров CC2-W148 и CC1 [10], среди оставшихся штаммов отмечено появление значимой разницы в способности к продукции БФ, относительно распределения МЛУ/ШЛУ. Выборка МЛУ/ШЛУ штаммов без CC1 и CC2-W148 значимо чаще теряла способность к продукции БФ (табл. 2). Проведен углубленный анализ 24 парных штаммов (по 2 изолята от больного), с целью оценки изменения способности к продукции БФ в процессе лечения ПТП. Для всех штаммов определены минимальные ингибирующие концентрации (МИК) с помощью теста Sensititre Мусо ТВ. В трех случаях пару составляли культуры, выделенные из мокроты и из операционного материала, а в 9 случаях, из мокрот, выделенных с интервалом не менее 1 месяца. Ни в одном из 12 парных случаев не обнаружено значимых изменений в МИК большинства антибиотиков. Был выявлен 1 случай значимых различий в способности к продукции БФ. Парадоксально, но штамм, способный продуцировать полноценный БФ (++++), был выделен от больной в более поздние сроки лечения, чем штамм сравнения БФ (++) из мокроты. Углубленное количественное исследование устойчивости к противотуберкулезным препаратам (ПТП) этих штаммов не выявило больших различий в профилях чувствительности к антибиотикам, за исключением уменьшения минимальной ингибирующей концентрации к этионамиду с 8 мг/мл у штамма БФ (++) до

2 мкг/мл у штамм БФ (++++). Интересно, что штамма БФ (++++) в отличие от остальных парных штаммов, был выделен из натечника (холодного абсцесса).

Обсуждение

Вопреки основной гипотезе настоящего исследования нам не удалось выявить единственный ПТП или комбинацию антибиотиков, которые однозначно нарушают процесс образования поверхностного БФ на голодной среде Школьниковой (без добавления сыворотки крови). Проведенные ранее эксперименты с имеющимися продуцентами БФ показали, что добавление 10% инактивированной сыворотки крови человека не оказывает значительного влияния на возможность продукции БФ штаммом (данные не приводятся). В то же время после исключения из анализа штаммов высокотрансмиссивных кластеров CC1 и CC2-W148 генотипа Beijing среди оставшихся МЛУ/ШЛУ штаммов наблюдались значимые различия в продукции БФ. Как и ожидалось, активных продуцентов БФ среди МЛУ/ШЛУ штаммов встречалось значимо реже. По всей видимости штаммы высокотрансмиссивных кластеров CC2-W148 и CC1 [10], называемых также «Europe-Russia B0/W148 outbreak и Central Asia outbreak» [13], обладают наибольшим фитнес-потенциалом по отношению SNP, вызывающих устойчивость к ПТП. Достаточно сказать, что более 99% штаммов генотипа CC2-W148 имеют первичную устойчивость к рифампицину [13] и к изониазиду [5]. С этой точки зрения, исключение генетически гомогенных эпидемических штаммов, распространившихся в последние десятилетия [4], позволило увидеть картину более близкую к описываемой в нормативных документах прошлого века [2].

Таблица 2. Свойства исследуемых штаммов

Table 2. Properties of the studied strains

Характеристика штамма Properties of the strain	БФ +++++/+++ BF +++++/+++	БФ ++/отр. BF ++/neg.	χ^2 ; p
МЛУ/ШЛУ MDR/XDR	17/34 (50%)	23/33 (69,7%)	NS
СС1 CC1	1/34 (2,9%)	2/33 (6,1%)	NS*
СС2-W148 CC1-W148	12/34 (35,3%)	7/33 (21,2%)	NS*
«Иные генотипы» «Other genotypes»	21/34 (61,8%)	24/33 (72,7%)	NS
МЛУ/ШЛУ среди «иных генотипов» MDR/XDR among «other genotypes»	4/21 (19,1%)	14/24 (58,4%)	5,7; < 0,5*

Примечания. NS — отсутствие значимых различий. * Значение χ^2 с коррекцией по Йетсу.

Notes. NS — no significant differences; * χ^2 with Yates correction.

Пожалуй, наибольшее клиническое значение имеет результат, показывающий возможность восстановления активной продукции БФ штаммами в процессе лечения. Ретроспективный анализ этого случая не выявил какого-либо изменения в процессе химиотерапии за анализируемый период, однако больная отличалась низкой приверженностью к лечению, результатом чего, по-видимому, стало развитие натечного абсцесса. Объективно у штаммов из мокроты (более раннее выделение) и из натечного абсцесса (выделен через месяц) профили ПТП практически одинаковы (МЛУ, пред-ШЛУ штаммы, сохранившие устойчивость к канамицину), разница наблюдалась только в МИК к этионамиду 8 и 2 мкг/мл. Следует отметить, что оба эти значения остаются в пограничных зонах чувствительности к препарату. По всей видимости, наиболее важным фактором, спровоцировавшим активную БФ-продукцию на жидкой среде Школьниковой, был объект выделения (натечный абсцесс).

Исходя из полученных результатов можно предположить, что лечение ПТП препаратами может оказывать косвенное влияние на способность МБТ штаммов образовывать БФ при росте на жидкой питательной среде. Однако в услови-

ях роста *in vivo*, гораздо более сильное влияние на способность к формированию БФ оказывает окружающая патоген среда макроорганизма и (возможно) микробиота легкого. Можно думать, что образование БФ — процесс требующий больших затрат энергии, и для такого медленно растущего микроорганизма как МБТ это далеко не всегда целесообразная стратегия размножения. В пользу этого говорят наши наблюдения (данные не приводятся), о том, что пассирование активных продуцентов БФ на голодной среде Школьниковой в подавляющем большинстве случаев приводит штаммы к утрате способности к поверхностному росту при сохранении обильного придонного осадка.

Без сомнения, феномен образования БФ *in vitro* и, особенно, *in vivo* возбудителем туберкулеза требует дальнейшего изучения, поскольку вполне очевидно, что данный процесс многократно осложняет процессы лечения хронических форм туберкулеза.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Егору Шитикову, критические замечания которого привели к созданию нового теста для индикации субтипа СС1, генотипа Beijing

Список литературы/References

1. О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации: приказ Министерство Здравоохранения Российской Федерации № 109 от 21 марта 2003 г. [On the improvement of tuberculosis measures in the Russian Federation: Order of the Russia Ministry of Health, March 21, 2003 No. 109]. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_100829 (10.09.2018)
2. Об унификации микробиологических методов исследования при туберкулезе: приказ Минздрава СССР № 558 от 8 июня 1978 г. [On the unification of microbiological research methods for tuberculosis: order of the USSR Ministry of Health No. 558, June 8, 1978]
3. Огарков О.Б., Бадлеева М.В., Белькова Н.Л., Адельшин Р.В., Цыренова Т.А., Хромова П.А., Синьков В.В., Костюнин К.Ю., Дашацыренова С.Б., Кошечев М.Е., Зарбуев А.Н., Жданова С.Н. Феномен образования биопленок штаммами *Brevibacillus* spp. и *Bacillus* spp. в присутствии клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017. Т. 35, № 3. С. 98–103. [Ogarkov O.B., Badleeva M.V., Belkova N.L., Adeshin R.V., Tsyrenova T.A., Khromova P.A., Sinkov V.V., Kostjunin K.Yu., Dashatsyrenova S.B., Koshcheyev M.E., Zarbuev A.N., Zhdanova S.N. The phenomenon of the formation of biofilms by *Brevibacillus* spp. and *Bacillus* spp. in the presence of clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya* = *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2017, vol. 35, no. 3, pp. 98–103. doi: 10.3103/S0891416817030065 (In Russ.)]
4. Синьков В.В., Савилов Е.Д., Огарков О.Б. Реконструкция эпидемической истории «пекинского» генотипа *Mycobacterium tuberculosis* в России и странах бывшего СССР по результатам сполиготипирования // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011. № 3. С. 25–29. [Sinkov V.V., Savilov E.D., Ogarkov O.B. Reconstruction of the epidemic history of the Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Russia and former soviet countries using spoligotyping. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya* = *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2011, no. 3, pp. 25–29. doi: 10.3103/S0891416811030050 (In Russ.)]
5. Хромова П.А., Огарков О.Б., Жданова С.Н., Синьков В.В., Моисеева Е.Я., Цыренова Т.А., Кошечев М.Е., Зоркальцева Е.Ю., Савилов Е.Д. Выявление высокотрансмиссивных генотипов возбудителя в клиническом материале для прогноза неблагоприятного течения туберкулеза // Клиническая лабораторная диагностика. 2017. Т. 62, № 10. С. 622–627. [Khromova P.A., Ogarkov O.B., Zhdanova S.N., Sinkov V.V., Moiseeva E.Ya., Tzyrenova T.A., Koscheyev M.E., Zorkaltseva E.Yu., Savilov E.D. The detection of highly-transmissible genotypes of agent in clinical samples for prognosis of unfavorable course of tuberculosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* = *Clinical Laboratory Diagnostics*, 2017, vol. 62, no. 10, pp. 622–627. doi: 10.18821/0869-2084-2017-62-10-622-627 (In Russ.)]
6. Dalton J.P., Uy B., Phummarnin N., Copp B.R., Denny W.A., Swift S., Wiles S. Effect of common and experimental anti-tuberculosis treatments on *Mycobacterium tuberculosis* growing as biofilms. *Peer J.*, 2016, vol. 22, no. 4: e2717. doi: 10.7717/peerj.2717

7. Esteban J., García-Coca M. Mycobacterium biofilms. *Front Microbiol.*, 2018, vol. 18, no. 8, p. 2651. doi: 10.3389/fmicb.2017.02651
8. Hilz H., Wieggers U., Adamietz P. Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of “masked” proteins. *Eur. J. Biochem.*, 1975, vol. 56, no. 1, pp. 103–108. doi: 10.1111/j.1432-1033.1975.tb02211.x
9. Jindani A., Dore C.J., Mitchison D.A. Bactericidal and sterilizing activities of antituberculosis drugs during the first 14 days. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2003, vol. 167, pp. 1348–1354. doi: 10.1164/rccm.200210-1125OC
10. Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg N., Lecher S., Willery E., Blum M.G., Rüscher-Gerdes S., Mokrousov I., Aleksic E., Allix-Béguec C., Antierens A., Augustynowicz-Kopec E., Ballif M., Barletta F., Beck H.P., Barry C.E. 3rd, Bonnet M., Borroni E., Campos-Herrero I., Cirillo D., Cox H., Crowe S., Crudu V., Diel R., Drobniewski F., Fauville-Dufaux M., Gagneux S., Ghebremichael S., Hanekom M., Hoffner S., Jiao W.W., Kalon S., Kohl T.A., Kontsevaya I., Lillebæk T., Maeda S., Nikolayevskyy V., Rasmussen M., Rastogi N., Samper S., Sanchez-Padilla E., Savic B., Shamputa I.C., Shen A., Sng L.H., Stakenas P., Toit K., Varaine F., Vukovic D., Wahl C., Warren R., Supply P., Niemann S., Wirth T. Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage. *Nat. Genet.*, 2015, vol. 47, no. 3, pp. 242–249. doi: 10.1038/ng.3195
11. Ojha A.K., Baughn A.D., Sambandan D., Hsu T., Trivelli X., Guerardel Y., Alahari A., Kremer L., Jacobs W.R. Jr, Hatfull G.F. Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol. Microbiol.*, 2008, vol. 69, pp. 164–174. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06274.x
12. Orme I.M. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 2014, vol. 94, no. 1, pp. 8–14. doi: 10.1016/j.tube.2013.07.004
13. Shitikov E., Kolchenko S., Mokrousov I., Bespyatykh J., Ischenko D., Ilina E., Govorun V. Evolutionary pathway analysis and unified classification of East Asian lineage of Mycobacterium tuberculosis. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, pp. 9227. doi: 10.1038/s41598-017-10018-5
14. Wallis R.S., Patil S., Cheon S.H., Edmonds K., Phillips M., Perkins M.D., Joloba M., Namale A., Johnson J.L., Teixeira L., Dietze R., Siddiqi S., Mugerwa R.D., Eisenach K., Ellner J.J. Drug tolerance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, no. 11, pp. 2600–2606.
15. Wayne L.G., Sohaskey C.D. Nonreplicating persistence of Mycobacterium tuberculosis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001, vol. 55, pp. 139–163.
16. Xiang X., Deng W., Liu M., Xie J. Mycobacterium biofilms: factors involved in development, dispersal, and therapeutic strategies against biofilm-relevant pathogens. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 2014, vol. 24, no. 3, pp. 269–279. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2014010545

Авторы:

Огарков О.Б., д.м.н., главный научный сотрудник, зав. отделом эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Суздальницкий А.Е., зав. хирургическим отделением ОБГУЗ Иркутская областная клиническая туберкулезная больница, г. Иркутск, Россия;

Хромова П.А. младший научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Цыренова Т.А. зав. бактериологической лабораторией ОБГУЗ Иркутская областная клиническая туберкулезная больница, г. Иркутск, Россия;

Сокольников Н.А., бактериолог ОБГУЗ Иркутская областная клиническая туберкулезная больница, г. Иркутск, Россия;

Жданова С.Н., к.м.н., старший научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Кощев М.Е., к.м.н., главный врач ОБГУЗ Иркутская областная клиническая туберкулезная больница, г. Иркутск, Россия.

Authors:

Ogarkov O.B., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Suzdalnitsky A.E., Head of the Surgical Department, Irkutsk Regional Clinical Tuberculosis Hospital, Irkutsk, Russian Federation;

Khromova P.A., Junior Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Tsyrenova T.A., Head of the Bacteriological Laboratory, Irkutsk Regional Clinical Tuberculosis Hospital, Irkutsk, Russian Federation;

Sokolnikova N.A., Bacteriologist, Irkutsk Regional Clinical Tuberculosis Hospital, Irkutsk, Russian Federation;

Zhdanova S.N., PhD (Medicine), Junior Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Koshchev M.E., PhD (Medicine), Chief Physician, Irkutsk Regional Clinical Tuberculosis Hospital, Irkutsk, Russian Federation.