

## Методики лабораторных исследований

### ТЕСТЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ

#### Часть 1. Метод абсолютных концентраций на плотной среде Левенштейна–Йенсена

© 2021 г. Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., Андреевская С.Н.,  
Смирнова Т.Г., Черноусова Л.Н.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва, Россия

Поступила 29.03.2021

Проведен краткий обзор основных понятий, связанных с лекарственной чувствительностью микобактерий и фенотипических методов ее тестирования. Изложена методика определения чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам методом абсолютных концентраций на плотной яичной питательной среде Левенштейна–Йенсена.

*Ключевые слова:* тестирование лекарственной чувствительности микобактерий, клинический изолят, метод абсолютных концентраций на среде Левенштейна–Йенсена.

Работа выполнена в рамках темы НИР № 0515-2019-0015 «Формирование лекарственной устойчивости микобактерий и соматических клеток к противотуберкулезным препаратам».

DOI: 10.7868/52587667821020084

---

## Laboratory Techniques

### DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING OF MYCOBACTERIA

#### Part I. The absolute concentration method on Lowenstein–Jensen solid medium

Sevastyanova E.V., Larionova E.E., Andreevskaya S.N.,  
Smirnova T.G., Chernousova L.N.

Central TB Research Institute, Moscow, Russia

Submitted as of 29.03.2021

This article provides a brief review of key concepts associated with drug susceptibility of mycobacteria and phenotypic methods of its testing. The absolute concentration method of drug susceptibility testing on solid egg Lowenstein-Jensen medium is described.

*Keywords:* drug susceptibility testing of mycobacteria, clinical isolate, absolute concentration method on Lowenstein-Jensen medium.

The article was prepared under research topic No. 0515-2019-0015: “The development of drug resistance of mycobacteria and somatic cells to TB drugs”.

---

**Л**екарственная устойчивость (ЛУ) микобактерий туберкулеза (МБТ) является одной из самых серьезных проблем современной фтизиатрии. Определение лекарственной чувствительности (ЛЧ) микобактерий (МБ) является решающим фактором для выбора оптимальной химиотерапии туберкулеза (ТБ), прогноза и своевременной коррекции лечения, а также служит важным показателем эпидемиологической напряженности по туберкулезу в отдельных регионах или даже в масштабах страны.

В основе ЛУ МБТ лежат изменения в геноме штаммов МБТ, меняющие чувствительность бактериальной клетки к противотуберкулезным препаратам (ПТП).

Чувствительность МБТ к ПТП – это неспособность бактерии расти на питательной среде с минимальной ингибирующей концентрацией препарата, задерживающей рост МБТ при стандартных условиях постановки теста. Чувствительными к данному препарату считаются те штаммы МБТ, на которые этот препарат в критической концентрации оказывает бактерицидное или бактериостатическое действие.

Устойчивость (резистентность) определяется как снижение чувствительности до такой степени, что данный штамм МБТ способен размножаться при воздействии на него препарата в критической или более высокой концентрации. Уровень (или степень) устойчивости данного штамма в целом выражается той максимальной концентрацией препарата (мкг/мл), при которой еще наблюдается размножение МБТ.

Критическая концентрация (КК) препарата – это величина, с помощью которой возможно разделение микобактерий культуральными методами на чувствительные и устойчивые. Критическая концентрация препарата подавляет рост более 95% от всех чувствительных штаммов *M. tuberculosis*, и не влияет на рост более 95% от всех устойчивых штаммов *M. tuberculosis*, которые выделяются от пациентов, не реагирующих на терапию.

Для различных ПТП установлена определенная критическая концентрация. Она отличается от минимальной ингибирующей концентрации и имеет клиническое значение, так как отражает воздействие препарата на МБТ в условиях макроорганизма и выбрана с учетом фармакокинетических и фармакодинамических свойств ПТП.

Для разных по составу питательных сред критическая концентрация одного и того же препарата различна. Значения критических концентраций ПТП существенно отличаются при использовании разных методов определения ЛЧ МБТ.

В настоящее время ВОЗ рекомендованы критические концентрации почти для всех ПТП при определении ЛЧ на плотных и жидких питательных средах [14].

Большое значение для принятия конкретных решений о проведении терапии больног туберкулезом имеет структура лекарственной резистентности МБТ. До недавнего времени в соответствии с международными стандартами, принятыми в 2006 г., различали следующие категории ЛУ МБТ:

- **Монорезистентность** – устойчивость только к одному (любому) ПТП.

- **Полирезистентность** – устойчивость к двум и более ПТП, исключая резистентность одновременно к изониазиду и рифампицину.

- **Множественная лекарственная устойчивость** (МЛУ, MDR) – это особая категория ЛУ полирезистентных штаммов, у которых имеется устойчивость одновременно к изониазиду и рифампицину, независимо от резистентности к другим ПТП.

- **Широкая лекарственная устойчивость** (ШЛУ, XDR) определяется как устойчивость, по крайней мере, к изониазиду, рифампицину, фторхинолонам и к одному из трех инъекционных препаратов (капреомицину, канамицину или амикацину).

В октябре 2020 г. состоялось консультативное совещание экспертов ВОЗ, на котором были предложены изменения в категориях ЛУ МБТ [13].

На совещании были озвучены следующие изменения:

1. Вместо категории **ТБ с ШЛУ** введена новая категория **«пред-широкая лекарственная устойчивость»** (ТБ с **пре-ШЛУ**): ТБ, вызванный штаммами *M. tuberculosis*, резистентными к рифампицину и изониазиду (или только к одному рифампицину (ТБ с РР)) и устойчивостью к фторхинолонам – левофлоксацину или моксифлоксацину.

Следует учесть, что офлоксацин и инъекционные препараты (канамицин, капреомицин) более не рекомендованы для лечения больных ТБ вследствие низкой эффективности лечения, соответственно, устойчивость к этим антибиотикам не используется для определения категорий ТБ.

2. **«ТБ с широкой лекарственной устойчивостью»** (ШЛУ ТБ) получил другое определение: ТБ, вызванный штаммами *M. tuberculosis*, устойчивыми к рифампицину, изониазиду (или только к рифампицину), левофлоксацину/моксифлоксацину и к одному либо нескольким препаратам из группы А.

В группу А входят левофлоксацин, моксифлоксацин, линезолид и бедаквиллин. Таким образом, в настоящее время под ШЛУ ТБ следует

понимать наличие устойчивости микобактерий к рифампицину и изониазиду (МЛУ ТБ) или наличие резистентности к одному рифампицину (ТБ с РР) в сочетании с устойчивостью к левофлоксацину или моксифлоксацину и устойчивостью к линезолиду или бедаквилину. Группа А впоследствии будет расширяться за счет новых противотуберкулезных препаратов (претоманид, деламанид), в соответствии с этим ТБ с устойчивостью к новым препаратам также будет подпадать под определение **ТБ с ШЛУ**.

При внедрении в практику новых терминов следует ожидать, что число случаев ТБ с пре-ШЛУ будет больше, чем ТБ с ШЛУ в старом определении этого термина, т.к. из критериев причисления к категории пре-ШЛУ исключена устойчивость к инъекционным препаратам, в настоящее время не рекомендованным для лечения ТБ [13].

Группа больных ТБ с ШЛУ в новом понимании этого термина будет сравнительно небольшая, т.к. ЛУ к новым ПТП встречается пока довольно редко [13].

Для оценки эпидемиологической ситуации в международной практике принято различать ЛУ МБТ у ранее не леченных больных (*первичную*) и ранее леченных больных (*приобретенную*).

ЛУ МБТ ранее не леченных больных определяется как устойчивость, обнаруженная у МБТ, выделенных от пациента, никогда не лечившегося от ТБ или получавшего лечение менее одного месяца. ЛУ МБТ у ранее леченных больных определяется как устойчивость, выявленная у больного ТБ, получавшего лечение в течение одного месяца и более.

ЛУ МБТ у ранее не леченных больных имеет большое клиническое и эпидемиологическое значение, поэтому для правильной ее оценки чрезвычайно важно исследовать культуру, выделенную из диагностического материала, собранного до начала лечения.

Методы тестирования ЛЧ (ТЛЧ) можно разделить на 2 группы: **генотипические методы** или молекулярные – по маркерам устойчивости МБТ (выявление специфических генных мутаций, связанных с резистентностью к определенному ПТП) и **фенотипические методы**, среди которых выделяют культуральные (по задержке роста на питательных средах в присутствии ПТП) [5, 6, 7].

#### **Принципы организации тестирования лекарственной чувствительности МБТ культуральными методами**

При проведении культуральных исследований по определению ЛЧ МБТ требуется соблюдать следующие стандарты исследований:

- ТЛЧ МБТ необходимо производить в боксах биологической безопасности 2-го класса, которые обеспечивают не только защиту оператора, но и сохранность от контаминации биологического объекта.

- При получении от больного культур МБТ из различного диагностического материала (мокрота, лаважная жидкость, моча, гной, биопсийный и послеоперационный материал) необходимо исследование каждого выделенного изолята.

ТЛЧ необходимо проводить исключительно после видовой идентификации МБ методом иммунохроматографии или ПЦР и проверки культуры на отсутствие бактерий-контаминантов на кровяном агаре [2].

- При одновременном получении от больного двух и более культур МБТ из однородного диагностического материала достаточно исследовать один клинический изолят из пробирки с наиболее массивным ростом.

- При выделении культуры МБТ в количестве, недостаточном для получения микобактериальной суспензии необходимой концентрации (менее 3 колоний), исследование ЛЧ необходимо производить только после пересева культуры.

- ТЛЧ МБТ необходимо производить только с использованием чистых субстанций ПТП.

На результаты ТЛЧ МБТ существенную роль оказывают такие факторы, как используемая для тестирования питательная среда и стабильность вносимых в нее чистых субстанций лекарственных препаратов.

В различных партиях сред минимальная ингибирующая концентрация лекарственного препарата может существенно различаться. Под воздействием ряда компонентов сред может происходить инактивация некоторых лекарственных препаратов. Например, фосфолипиды в яичных средах инактивируют стрептомицин, D-аланин нейтрализует циклосерин, полиамины подавляют активность этамбутола и т.д. Существенное влияние на стабильность лекарственных препаратов оказывают также условия их стерилизации и хранения.

Многие лекарственные препараты представляют собой соли, таким образом, биологически активные субстанции являются только частью общей массы молекулы, в то время как другие радикалы (например, сульфаты, гидрохлориды и т.д.) могут составлять значительную долю общего веса. В связи с этим, при приготовлении питательных сред с препаратами необходимо учитывать количество активного вещества и молекулярную формулу препарата [4].

Во всем мире в качестве одной из стандартных сред для ТЛЧ МБТ применяется среда

Левенштейна–Йенсена (Л–Й). Соблюдение стандартной технологии приготовления питательной среды с препаратами имеет важнейшее значение для получения достоверных результатов тестирования [1].

Как уже указывалось выше, для приготовления питательных сред с целью определения ЛЧ МБТ должны использоваться только химически чистые субстанции препаратов. При приготовлении рабочих растворов с необходимыми концентрациями активной субстанции, расчеты количества взвешиваемых навесок следует производить с учетом процента активности препарата, которая может варьировать от серии к серии.

**Внимание!** Следует отметить, что ТЛЧ к пиразинамиду на плотных средах не проводят, поскольку высокая противотуберкулезная активность пиразинамида проявляется при сниженных значениях кислотности среды (рН – 6,0). В то же время для культивирования МБТ на плотных яичных средах оптимальным является значение рН, близкое к нейтральному. Эти обстоятельства не позволяют использовать стандартные методики для определения ЛЧ МБТ к пиразинамиду на плотных яичных питательных средах [5].

Большое значение при постановке тестов на ЛЧ МБТ имеет правильная подготовка бактериальной суспензии для посева на питательную среду. На контрольную и содержащую препарат среду должны вноситься надлежащие количества микроорганизмов. Если число бактериальных единиц слишком мало, стандартного количества объема бактериальной суспензии будет недостаточно для определения критической доли устойчивых штаммов. Если число МБТ слишком велико, рост естественным образом образующихся резистентных штаммов может симулировать ЛУ.

Важное значение имеет также возраст культуры, использованной для приготовления посевной суспензии. Тестирование на определение ЛЧ должны проводиться только с молодыми, активно растущими культурами. Использование старой культуры для приготовления посевной суспензии может привести к искажению результата исследования.

Поскольку в случае использования непрямых методов ТЛЧ МБТ подготовка бактериальной суспензии проводится в лаборатории, при приготовлении микобактериальной суспензии для посева может быть выбрано такое соотношение чувствительных и резистентных микроорганизмов, которое не соответствует действительной ситуации в пораженном органе пациента. В связи с этим необходимо правильно производить

отбор для приготовления бактериальной массы для исследования (обязательно выбирать несколько колоний с различных участков пробирки с ростом культуры либо делать смыв со всей поверхности культуральной среды).

Важную роль при ТЛЧ МБТ играет также длительность инкубации.

### Методы определения ЛЧ МБТ

Для определения ЛЧ МБТ должны использоваться только стандартизованные методы исследования, что позволяет:

- правильно вести лечение пациентов;
- интерпретировать и сравнивать данные, полученные из различных источников;
- проводить оценку уровней ЛУ и тенденций, наблюдаемых в разных регионах.

Выбор того или иного метода ТЛЧ МБТ определяется традиционно сложившимися методическими подходами, используемыми в лаборатории.

Все имеющиеся методы определения ЛЧ МБТ можно условно разделить на 2 категории:

- методы прямого определения ЛЧ МБТ;
- методы непрямого определения ЛЧ МБТ.

При использовании культуральных методов прямого определения ЛЧ МБТ мокрота или другие диагностические материалы, предварительно деконтаминированные и прошедшие гомогенизацию, высеваются непосредственно на среды, содержащие и не содержащие соответствующий ПТП. Объем инокулята определяется в зависимости от количества МБТ, определенно при микроскопии мазка.

Методы прямого определения ЛЧ имеют ряд недостатков, поэтому в настоящее время не рекомендованы к использованию:

- для исследования нельзя использовать образцы диагностического материала, имеющие отрицательный результат микроскопии,
- при проведении данного исследования повышается риск контаминации,
- может наблюдаться недостаточный рост культуры, не позволяющий сделать достоверные выводы.

При использовании методов непрямого определения ЛЧ МБТ проводится выделение микроорганизмов из клинических образцов при культивировании, идентификация микобактерий до вида, а затем на контрольную и содержащую препарат яичную/плотную агаровую или жидкую среду высевается гомогенная суспензия или культура, выросшая на бульоне.

В литературе описаны три основных классических микробиологических метода непрямого определения ЛЧ МБТ [8, 9, 12]:

- метод пропорций, применяемый как на плотных, так и на жидких средах;
- метод коэффициента устойчивости;
- метод абсолютных концентраций.

В России достаточно распространенными и традиционно используемыми фенотипическими методами ТЛЧ МБТ являются непрямой метод абсолютных концентраций на плотной яичной питательной среде Л-Й и непрямой модифицированный метод пропорций на жидкой питательной среде Миддлбрук 7Н9 в автоматизированной системе учета роста микобактериальных культур ВАСТЕС MGIT 960. Остальные фенотипические методы ТЛЧ МБТ являются альтернативными. К ним, например, относится метод пропорций и метод с реактивом Грисса.

Метод с реактивом Грисса – это нитратредуктазный метод. Метод основан на детекции роста МБТ по окислению нитрата ферментом, продуцируемым МБТ (но не *M. bovis*), с последующей цветной реакцией с образовавшимся нитритом [10, 11]. Метод используется в нескольких странах. Критические концентрации для этого метода в многоцентровых международных исследованиях не разрабатывались. Достоинствами метода являются сокращение времени получения результата до 12–14 дней и простота интерпретации результата (по цветному окрашиванию среды с растущими на ней МБТ)

#### **Методика выполнения тестирования ЛЧ МБТ непрямой метод абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна–Йенсена**

Суть метода заключается в том, что осуществляют дозированный посев тщательно подготовленной микобактериальной суспензии из выросшей культуры МБТ на пробирки с питательной средой Л-Й, содержащие определенные концентрации ПТП и контрольные пробирки без препаратов. Обычно используется несколько концентраций препаратов, ЛУ определяется с помощью минимальной ингибирующей концентрации препарата, которая ингибирует рост всех или почти всех МБТ, что обычно определяется как наличие 20 или менее колоний возбудителя.

При использовании данного метода удовлетворительные результаты получаются только тогда, когда:

- тестируемая культура МБТ не контаминирована посторонней микрофлорой;
- стандартизовано количество бактериальной суспензии для посева;
- приготовление плотной питательной среды Л-Й и разведение ПТП выполнено с соблюдением всех норм и правил.

Непрямой метод абсолютных концентраций характеризуется тем, что:

- позволяет выявить устойчивость возбудителя туберкулеза к ПТП как первого, так и второго ряда;
- период определения ЛЧ МБТ составляет 3 (4) недели;
- заключение о результатах ТЛЧ МБТ поступает к лечащему врачу не ранее, чем через 2–2,5 месяца после посева диагностического материала.

#### **Приготовление питательных сред с ПТП**

Питательные среды для ТЛЧ МБТ должны содержать точные концентрации антибактериальных препаратов, соответствующие их активности. Поэтому, при приготовлении растворов препаратов необходимо учитывать их антибактериальную активность. Показатели антибактериальной активности должны быть указаны в паспорте к препарату.

**Важно!** Для приготовления растворов используйте только химически чистые субстанции, в паспорте к которым указана их антибактериальная активность и сроки годности. Храните субстанции препаратов строго в соответствии с рекомендациями производителя. Не используйте субстанции с истекшими сроками годности!

Для определения чувствительности к лекарственным препаратам в лаборатории должны иметься ежегодно поверяемые весы, позволяющие производить взвешивание с точностью до 0,2 мг, что обеспечит точность навески препаратов с погрешностью не более  $\pm 1,5\%$ .

При хранении разведенных препаратов при температуре +5 °С и выше более 6 часов может произойти снижение их активности. Поэтому растворы ПТП необходимо готовить непосредственно перед приготовлением сред.

Аликвоты разведенных препаратов в объеме, необходимом для добавления в одну порцию среды, можно хранить в морозильных камерах, поддерживающих температуру ниже –20 °С, хранение возможно в течение 6 месяцев, при условии недопущения их оттаивания и повторного замораживания. Такая технология дает определенные преимущества: приготовление большего объема раствора позволяет взвешивать большую навеску препарата, что уменьшает ошибку взвешивания и потери вещества при взвешивании.

Для ТЛЧ МБТ применяется плотная яичная среда Л-Й [3]. После добавления препарата в среду необходимо тщательно ее перемешать, не допуская образования пузырьков и пены

и обеспечивая равномерное распределение препарата в среде. Свертывание среды с препаратом должно осуществляться в тех же условиях, что и свертывание среды без препарата – коагуляция проводится при 82–83 °С в течение 40 минут.

В набор сред для ТЛЧ входят: контрольная среда (без препаратов), среды, содержащие ПТП, а также среды с веществами, применяемыми для видовой идентификации МБ. В случае проведения идентификации выросшей культуры методом ПЦР или иммунохроматографическим способом и проверки контаминации культуры посевом на кровяной агар, необходимость в селективных средах для определения вида МБ отпадает [2].

С целью снижения экономических затрат на одно исследование, ТЛЧ МБТ непрямым методом абсолютных концентраций рекомендуется проводить к одной, критической концентрации для каждого из исследуемых ПТП, определяемой как предельная. Штаммы, которые культивируются при более высоких, чем критическая, концентрациях препарата, относят к лекарственно-устойчивым.

В таблице указаны критические концентрации ПТП, к которым должно проводиться ТЛЧ МБТ методом абсолютных концентраций.

**Таблица.** Критические концентрации ПТП для определения ЛУ МБ методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна–Йенсена

**Table.** Critical concentrations of TB drugs for drug susceptibility testing of mycobacteria by the absolute concentration method on Lowenstein–Jensen medium

Название препарата	Концентрация в мкг/мл
<b>Препараты I ряда</b>	
Изониазид	1
Рифампицин	40
Этамбутол	2
Стрептомицин	10
<b>Препараты II ряда*</b>	
Канамицин	30
Капреомицин	30
Протионамид (этионамид)	30
Циклосерин	30
Офлоксацин	2
ПАСК	1

\* Критические концентрации препаратов II ряда носят ориентировочный характер. В настоящее время критерии определения ЛЧ МБТ к ПТП II ряда остаются нечеткими и спорными.

\* Critical concentrations of second-line drugs are approximate. Currently the criteria for testing susceptibility to second-line drugs are vague and disputable.

Таким образом, комплект для ТЛЧ МБТ должен включать контрольную пробирку, не содержащую препаратов, и пробирки с препаратами в критических концентрациях, указанных выше (см. табл.). В случае, когда идентификация выделенной культуры не была проведена методом ПЦР или иммунохроматографическим методом, в комплект для ТЛЧ МБТ должны быть включены:

- пробирка с добавлением салициловокислого натрия в концентрации 1000 мкг/мл;
- пробирка с ТСН (thiophene-2-carboxylis acid hydrazide) в концентрации 2 мкг/мл.

Наличие двух последних пробирок необходимо для проведения обязательной идентификации МБ, выполняемой в ходе ТЛЧ.

**Важно!** Все среды, входящие в набор для тестирования одного штамма, должны готовиться из одной партии среды Л–Й в один день!

#### Примеры приготовления питательных сред с ПТП

Примеры по приготовлению навесок чистых субстанций препаратов подробно изложены в Приказе МЗ РФ № 109 от 21 марта 2003 г., приложение 11, а именно:

**Стрептомицин.** Для определения ЛЧ МБТ к стрептомицину используют стрептомицина сульфат. По данным производителя, активность стрептомицина сульфата составляет 750 мг в 1 г чистой субстанции.

Чтобы получить исходный рабочий раствор (**A**), содержащий в 1 мл раствора 1 мг активной субстанции, следует приготовить навеску 20 мг стрептомицина сульфата с точностью до 0,2 мг, что будет соответствовать 15 мг активной субстанции, и растворить эту навеску в 15 мл стерильной дистиллированной воды – 1 мг/мл = 1000 мкг/мл.

**Приготовление питательной среды:**

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (40 пробирок по 5 мл) необходимо в стерильную промаркированную колбу стерильной пипеткой налить последовательно 2 мл раствора (**A**) + 198 мл среды = 10 мкг/мл.

Желательно вначале налить в колбу расчетное количество раствора (**A**), а затем расчетное количество питательной среды, после чего тщательно перемешать содержимое круговыми движениями колбы. Разлить содержимое колбы в 40 пробирок по 5 мл в каждую. Пробирки поместить в наклонном положении в аппарат для свертывания, добиваясь равномерной величины скошенной поверхности среды (примерно 8–10 см), и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

**Изониазид.** Активность препарата: в 1 г чистой субстанции содержится 990 мг активной субстанции = 99%.

Приготовить навеску 20 мг изониазида. Далее приготовить растворы:

- (А): в 20 мл стерильной дистиллированной воды растворить 20 мг изониазида – 1 мг/мл = 1000 мкг/мл;

- (Б): к 9 мл стерильной дистиллированной воды добавить 1 мл раствора (А) – 100 мкг/мл.

*Приготовление питательной среды:*

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (40 пробирок по 5 мл) для каждого из двух разведений препарата необходимо в две стерильные промаркированные колбы (колба № 1 – 1 мкг/мл, колба № 2 – 10 мкг/мл) стерильной пипеткой налить последовательно:

- в № 1 – 2 мл раствора (Б) + 198 мл среды = 1 мкг/мл;

- в № 2 – 2 мл раствора (А) + 198 мл среды = 10 мкг/мл.

Желательно вначале налить в колбы расчетное количество раствора (Б) или (А), а затем расчетное количество питательной среды. Содержимое каждой колбы необходимо тщательно перемешать круговыми движениями и разлить в 40 пробирок по 5 мл в каждую, начиная с колбы № 1. Пробирки поместить в наклонном положении в аппарат для свертывания, добиваясь равномерной величины скошенной поверхности среды (примерно 8–10 см), и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

**Рифампицин.** Активность препарата: в 1 г чистой субстанции – 970 мг активной субстанции = 97%.

*Рифампицин нерастворим в дистиллированной воде.* Для приготовления раствора препарата рекомендуется использовать следующую последовательность приготовления растворов.

Взвесить 30 мг порошковидной формы чистой субстанции рифампицина. Приготовленную навеску перенести в стерильную пробирку (1): 30 мг RIF + 2,0 мл этанола или диметилформамида – 14 550 мкг/мл;

**При использовании этанола: подогреть до температуры 35–40 °С на водяной бане.**

Затем, используя стерильные пробирки, приготовить растворы:

- (А): 2,0 мл раствора (1) + 5,2 мл H<sub>2</sub>O – 4000 мкг/мл;

- (Б): 2,5 мл раствора (А) + 2,5 мл H<sub>2</sub>O – 2000 мкг/мл.

Для ускорения полного растворения препарата допустимо легкое подогревание на водяной бане до 35–40 °С.

*Приготовление питательной среды:*

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (40 пробирок по 5 мл) необходимо в стерильную промаркированную колбу стерильной пипеткой налить последовательно 4 мл раствора (Б) + 196 мл среды = 40 мкг/мл.

Желательно вначале налить в колбу расчетное количество раствора (Б), а затем добавить в нее расчетное количество питательной среды. Содержимое колбы тщательно перемешать круговыми движениями, а затем разлить в 40 пробирок по 5 мл в каждую. Пробирки поместить в наклонном положении в аппарат для свертывания, добиваясь равномерной величины скошенной поверхности среды (примерно 8–10 см), и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

**Этамбутол.** Для определения ЛЧ МБТ используется этамбутол дигидрохлорид. Активность препарата: в 1 г чистой субстанции – 740 мг активной субстанции.

Приготовить навеску препарата весом 20 мг вещества. Затем приготовить растворы:

- (А): растворить 20 мг этамбутола в 14,8 мл стерильной дистиллированной воды – 1 мг/мл = 1000 мкг/мл;

- (Б): к 8 мл стерильной дистиллированной воды добавить 2 мл раствора (А) – 200 мкг/мл.

*Приготовление питательной среды:*

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (40 пробирок по 5 мл) на каждое разведение препарата необходимо в две стерильные промаркированные колбы (колба № 1 – 2 мкг/мл, колба № 2 – 5 мкг/мл) стерильной пипеткой налить последовательно:

- в № 1 – 2 мл раствора (Б) + 198 мл среды = 2 мкг/мл;

- в № 2 – 5 мл раствора (Б) + 195 мл среды = 5 мкг/мл.

Желательно вначале налить в обе колбы расчетное количество раствора (Б), а затем последовательно добавить в каждую из них расчетное количество питательной среды. Тщательно перемешать содержимое круговыми движениями колбы. Затем содержимое каждой колбы разлить в 40 пробирок по 5 мл в каждую, начиная с колбы № 1. Пробирки поместить аппарат для свертывания и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

**Канамицин.** Активность препарата: в 1 г чистой субстанции канамицина моносульфата колеблется от 750 до 823 мг активной субстанции. Для расчета возьмем величину активности, равную 750 мкг в 1 мг.

Чтобы получить исходный рабочий раствор (А), содержащий в 1 мл раствора 2000 мкг

активной субстанции, следует приготовить навеску 30 мг порошковидной формы канамицина моносульфата = 22,5 мг активного начала и растворить ее в 11,3 мл стерильной дистиллированной воды – 2 мг/мл = 2000 мкг/мл.

*Приготовление питательной среды:*

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (40 пробирок по 5 мл) необходимо в стерильную промаркированную колбу стерильной пипеткой налить последовательно 3 мл раствора (А) + 197 мл среды = 30 мкг/мл.

Желательно вначале налить в колбу расчетное количество раствора (А), а затем добавить в нее расчетное количество питательной среды. Тщательно перемешать содержимое круговыми движениями колбы, а затем разлить его в 40 пробирок по 5 мл в каждую. Пробирки поместить в наклонном положении в аппарат для свертывания, добываясь равномерной величины скошенной поверхности среды (примерно 8–10 см), и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

**Протионамид (этионамид).** Оба препарата плохо растворяются в воде. Активность препарата: в 1 г чистой субстанции – 990 мг активной субстанции.

Препарат нерастворим в дистиллированной воде, поэтому для приготовления раствора (А) следует приготовить навеску препарата весом 20 мг вещества и растворить ее в 3 мл ректифицированного этилового спирта 96° или диметил-сульфоксида, а затем добавить к раствору 6,9 мл стерильной дистиллированной воды – 2000 мкг/мл.

*Приготовление питательной среды:*

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (5 мл – 40) необходимо в стерильную промаркированную колбу стерильной пипеткой налить последовательно 3 мл раствора (А) + 197 мл среды = 30 мкг/мл.

Желательно вначале налить в колбу расчетное количество раствора (А), а затем добавить в нее расчетное количество питательной среды. Перемешивание, разливание и коагулирование производят так же, как и в предыдущем случае.

**Капреомицин.** Содержание активной субстанции в препарате – 840 мг в 1 г.

*Растворы капреомицина отличаются нестабильностью, поэтому их готовят непосредственно перед приготовлением сред.*

Приготовить навеску 20 мг вещества. Затем приготовить раствор (А):

20 мг капреомицина + 8,4 мл H<sub>2</sub>O – 2000 мкг/мл.

*Приготовление питательной среды:*

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (5 мл – 40) необходимо в стерильную промаркированную колбу стерильной

пипеткой налить последовательно 3 мл раствора (А) + 197 мл среды = 30 мкг/мл.

Желательно вначале налить в колбу расчетное количество раствора (А), а затем расчетное количество питательной среды. Перемешивание, разливание и коагулирование производят так же, как и в предыдущем случае.

**Циклосерин (D-cycloserin).** В 1 г препарата содержится 980 мг активной субстанции.

*Растворы циклосерина отличаются нестабильностью, поэтому их готовят непосредственно перед приготовлением сред.*

Для приготовления раствора (А) следует приготовить навеску препарата весом 20 мг вещества и растворить в 9,9 мл стерильной дистиллированной воды – 2 мг/мл = 2000 мкг/мл.

*Приготовление питательной среды:*

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (5 мл – 40) необходимо в стерильную промаркированную колбу стерильной пипеткой налить последовательно 3 мл раствора (А) + 197 мл среды = 30 мкг/мл.

Желательно вначале налить в колбу расчетное количество раствора (А), а затем расчетное количество питательной среды. Перемешивание, разливание и коагулирование производят так же, как и в предыдущем случае.

**ПАСК.** Активность препарата: в 1 г чистой субстанции – 877,2 мг активной субстанции. Для примера расчета возьмем среднюю величину активности, равную 880 мг в 1 мг.

Чтобы получить исходный рабочий раствор (А), содержащий в 1 мл раствора 1,0 мг активной субстанции, следует взвесить 20 мг порошковидной формы ПАСК = 17,6 мг активного начала и растворить навеску в 17,6 мл стерильной дистиллированной воды – 1 мг/мл = 1000 мкг/мл.

Затем готовят раствор (Б): к 18 мл стерильной дистиллированной воды добавить 2 мл раствора (А) – 100 мкг/мл.

*Приготовление питательной среды:*

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (5 мл – 40) необходимо в стерильную промаркированную колбу стерильной пипеткой налить последовательно 2 мл раствора (Б) + 198 мл среды = 1 мкг/мл.

Желательно вначале налить в колбу расчетное количество раствора (Б), а затем расчетное количество питательной среды. Перемешивание, разливание и коагулирование производят так же, как и в предыдущем случае.

**Офлоксацин.** Активность препарата: в 1 г чистой субстанции – 1000 мг активной субстанции.

Офлоксацин нерастворим в дистиллированной воде, для его растворения применяется 0,1 N раствор NaOH. Для приготовления указан-



ного раствора к навеске 0,4 г NaOH добавляют 100 мл стерильной дистиллированной воды = 0,1 N раствор NaOH. Далее готовят растворы:

- **(А)**: приготовить навеску препарата весом 20 мг вещества и растворить ее в 20 мл 0,1 N раствора NaOH – 1 мг/мл = 1000 мкг/мл;

- **(Б)**: к 12 мл стерильной дистиллированной воды добавить 3 мл раствора **(А)** – 200 мкг/мл.

*Приготовление питательной среды:*

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (40 пробирок по 5 мл) необходимо в стерильную промаркированную колбу стерильной пипеткой налить последовательно 2 мл раствора **(Б)** + 198 мл среды = 2 мкг/мл.

Желательно вначале налить в колбу расчетное количество раствора **(Б)**, а затем расчетное количество питательной среды. Перемешивание, разливание и коагулирование производят так же, как и в предыдущем случае.

### **Приготовление и посев микобактериальной суспензии**

Подготовка к выполнению процедуры посева микобактериальной суспензии включает в себя следующие операции:

- проверенные и отобранные для ТЛЧ культуры МБТ расставляют в штативе в порядке номеров (номера отобранных культур заносят в лабораторный журнал регистрации ЛЧ выделенных культур),

- необходимо также заранее расставить в штативах наборы питательных сред для каждой из исследуемых культур,

- на каждой пробирке со средой надписывают номер культуры и название препарата,

- для удобства последующего считывания результатов ТЛЧ рекомендуется выполнять надписи на верхней части пробирки, с той ее стороны, где находится скос питательной среды,

- кроме того, пробирки из каждого набора сред следует размещать в штативах в одинаковой определенной последовательности (в соответствии с графами лабораторного журнала).

### **Приготовление микобактериальной суспензии**

Приготовление микобактериальной суспензии является чрезвычайно важным компонентом ТЛЧ МБТ. Для приготовления посевной суспензии микобактериальную массу (10–20 мг) отбирают одноразовой микробиологической петлей. Для правильного выполнения ТЛЧ необходимо собрать бактериальную массу со всей поверхности среды для того, чтобы соотношение чувствительных и приобретших устойчивость микобактериальных клеток в собранной для проведения

тестирования бактериальной массе соответствовало таковому в выросшей культуре.

Существуют несколько способов приготовления суспензии.

1. Собранную биомассу помещают в стерильную сухую толстостенную пробирку с завинчивающейся крышкой (можно использовать одноразовые пластиковые пробирки 15 мл). Микробиологической петлей тщательно растирают культуру МБТ и по каплям добавляют 2–3 мл физиологического раствора. Полученную суспензию используют для дальнейшей стандартизации.

2. Микобактериальную массу помещают в стерильную сухую толстостенную пробирку с завинчивающейся крышкой (можно использовать одноразовые пластиковые пробирки 15 мл) со стерильными стеклянными бусами и стерильным физиологическим раствором. Уровень жидкости в пробирке не должен превышать уровня бус (приблизительно 1 мл). Суспензию перемешивают на вортексе в течение 120–150 секунд. После окончания встряхивания в пробирку доливают еще 1–2 мл стерильного физиологического раствора. Полученную суспензию используют для дальнейшей стандартизации.

3. Микобактериальную массу помещают в стерильную сухую толстостенную пробирку с завинчивающейся крышкой (можно использовать одноразовые пластиковые пробирки 15 мл) со стерильными стеклянными бусами и стерильным физиологическим раствором с добавлением 0,05% ТВИН-80 и встряхивают на вортексе в течение 20–25 секунд. Полученную суспензию используют для дальнейшей стандартизации.

**Внимание!** Процедура приготовления суспензии приводит к образованию инфекционного аэрозоля! При встряхивании суспензии на вортексе должны использоваться герметично закрывающиеся пробирки с завинчивающимися крышками! Процедура должна проводиться в боксе биобезопасности!

Приготовленной суспензии дают отстояться в течение 15–30 минут и полученный супернатант отбирают одноразовой стерильной пастеровской пипеткой, стараясь забирать только верхний слой жидкости и оставлять в пробирке крупные частицы негомогенизированной культуры.

Суспензию переносят в стерильную пробирку, диаметр которой соответствует диаметру пробирки с оптическим стандартом мутности 5 ЕД. Затем микобактериальную суспензию титруют по стандарту мутности № 5 ГНИИСК (500 млн микробных клеток/мл). Использованную пипетку сбрасывают в емкость с дезинфицирующим раствором.

По окончании процедуры стандартизации по оптическому стандарту мутности № 5 всех взятых для тестирования культур переходят к дальнейшему разведению этих суспензий.

Каждую стандартизованную по оптическому стандарту мутности № 5 суспензию разводят в 10 раз стерильным физиологическим раствором. Для этого следует заранее приготовить ряд пробирок по числу исследуемых культур МБТ, подписать на них номера культур и расставить их в штативе в порядке номеров регистрации. В каждую пробирку налить по 9 мл стерильного физиологического раствора.

При разведении приготовленных суспензий в каждую из подготовленных пробирок с физраствором следует внести стерильной одноразовой пипеткой по 1 мл приготовленной по стандарту № 5 суспензии МБТ соответствующего номера. Посев на среды с лекарственными препаратами производят из разведенной в 10 раз культуры.

#### **Посев микобактериальной суспензии**

Из пробирки с разведенной 1:10 микобактериальной суспензией стерильной мерной серологической пипеткой произвести посев по 0,2 мл (около 10 млн микробных клеток) в пробирки с контрольной средой Л-И и пробирки, содержащие ПТП в определенных концентрациях. Суспензию вносят на верхнюю треть косяка во все пробирки с питательной средой, приготовленной для определения ЛЧ культуры данного номера, *тщательно сверяя номер культуры и суспензии с номерами, написанными на пробирках*. Во избежание ошибок все пробирки, подготовленные для посева одной культуры, следует расставлять в одном ряду штатива.

Каждую засеянную суспензией пробирку закрывают недренированной силиконовой пробкой и ставят в вертикальный штатив с тем, чтобы за время постановки теста суспензия равномерно стекала по поверхности скошенной среды к дну пробирки.

По завершении посева всех суспензий засеянные пробирки перемещают в горизонтальные штативы и инкубируют в термостате при температуре 37 °С. При этом поверхность скошенной питательной среды должна находиться в горизонтальной плоскости, а наклон штатива должен исключить смачивание пробки культуральной суспензией. Засеянная суспензия должна равномерно покрывать всю поверхность скошенной среды.

Через 2–3 суток можно перевести пробирки в вертикальные штативы, однако эта процедура не носит обязательного характера.

**Внимание!** При исследовании ЛЧ нескольких штаммов МБТ на всех пробирках для приготовления микобактериальной суспензии и пробирках с плотной питательной средой должны быть заранее надписаны номера культур МБТ, соответствующие лабораторному регистрационному журналу.

Во избежание контаминации для каждой культуры должна быть заготовлена своя стерильная пробирка с физраствором. Не используйте физраствор из одного флакона для разведения суспензий различных культур!

#### **Оценка результатов определения ЛУ МБТ**

Оценку результатов определения ЛУ МБТ производят через 3 недели инкубации в термостате. При скудном росте МБТ на контрольной питательной среде следует выждать еще 1 неделю до получения выраженного роста в контроле, после чего выдают окончательный ответ.

**Внимание!** При использовании метода абсолютных концентраций культура МБТ считается устойчивой, если на питательной среде с определенным препаратом вырастает 20 и более колоний микроорганизмов при обильном росте на контрольной пробирке (без препарата).

#### **Использование дополнительных концентраций ПТП**

Кроме критических концентраций при использовании метода абсолютных концентраций в ряде случаев целесообразно использовать и дополнительные концентрации ПТП для определения порога устойчивости. Это дает возможность клиницисту варьировать дозировки и лекарственные режимы за счет повышения дозы, методов введения и использования аддитивных и синергидных свойств различных комбинаций ПТП. Например, устойчивость МБТ к изониазиду в ряде случаев может быть преодолена путем применения повышенных доз и внутривенного введения препарата.

Таким образом, при диагностической необходимости, по запросу клинициста, возможно проводить исследование ЛЧ МБТ к следующим дополнительным концентрациям противотуберкулезных препаратов:

- изониазид – 10 мкг/мл,
- этамбутол – 5 мкг/мл.

#### **Контроль качества тестов лекарственной чувствительности МБТ**

Для обеспечения достоверности получаемых результатов необходимо проводить контроль качества выполняемых лабораторией тестов по исследованию ЛЧ МБТ.

### **Внутрилабораторный контроль качества сред для тестирования ЛЧ методом абсолютных концентраций**

Необходимо проверять качество каждой партии сред для ТЛЧ МБТ. С этой целью каждая партия вновь приготовленной питательной среды должна быть проверена на стерильность (инкубация в термостате).

Также для каждой партии среды при ТЛЧ клинических образцов необходимо одновременно провести тест на чувствительность стандартного штамма *M. tuberculosis* H37Rv ко всем исследуемым ПТП. Если среда с препаратами приготовлена правильно, то контрольная культура не должна расти при тех концентрациях препаратов, при которых не растут чувствительные к данному препарату штаммы. Появление роста контрольного штамма в пробирке с препаратом указывает на то, что при приготовлении среды с препаратом была допущена ошибка или на то, что неправильно приготовлена бактериальная суспензия.

Для более полной оценки качества сред рекомендуется при постановке тестов на ЛЧ для клинических изолятов наряду с тестированием стандартного чувствительного штамма провести тест на чувствительность со стандартными штаммами, устойчивыми к тем препаратам, к которым должна быть установлена чувствительность клинических образцов.

При отсутствии в лаборатории стандартных (коллекционных) штаммов лаборатория может использовать выделенные от пациентов штаммы, которые в многократных исследованиях подтверждают свою чувствительность и/или устойчивость.

*Регистрация результатов внутрилабораторного контроля качества каждой партии сред должна производиться в журнале приготовления сред.*

Внутрилабораторный контроль качества включает также регулярную проверку используемого лабораторного оборудования – свертывателя сред, термостатов, рН-метра, автоматических дозаторов, стандартов мутности и др.

### **Внешняя оценка качества теста ЛЧ МБТ**

Внешняя оценка качества исследований ЛЧ обеспечивается внешней лабораторией, которая, например, является членом супранациональной лабораторной сети.

В Российской Федерации начиная с 2005 г. в рамках Федеральной системы внешней оценки качества МСИ ФСВОК клинических лабораторных исследований, совместно с супранациональными лабораториями ВОЗ, проводится независимая оценка качества исследований ЛЧ МБТ

с использованием наборов контрольных образцов (международные панели из 20 тест-штаммов для профессионального тестирования).

В заключение следует отметить, что проведение тестов лекарственной чувствительности для микобактерий туберкулеза – сложный, многокомпонентный процесс. От того, как соблюдаются все процедуры контроля качества исследований, и с какой тщательностью в лаборатории выполняются все стандартные процедуры тестирования, зависит получаемый результат и в конечном итоге эффективность лечения туберкулеза у конкретного пациента.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Культуральные методы диагностики туберкулеза: Учебное пособие для проведения базового курса обучения специалистов бактериологических лабораторий учреждений противотуберкулезной службы / под ред. проф. Ерохина В.В. М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада». – 2008. – 208 с.
2. Ларионова Е.Е., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Севастьянова Э.В., Черноусова Л.Н. Методы идентификации микобактерий // *Вестник ЦНИИТ*. 2021. – № 1. – С. 87–98. DOI: 10.7868/52587667821010106
3. Ларионова Е.Е., Андреевская И.Ю., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Севастьянова Э.В. Культуральный метод исследования микобактерий. Плотные питательные среды // *Вестник ЦНИИТ*. 2020. – № 3. – 2020. – С. 75–86. DOI: 10.7868/52587667820030103
4. Приказ МЗ РФ № 749 от 31.10.2018 г. «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей и признании утратившими силу некоторых приказов Минздрава России, Минздравсоцразвития России и Минздрава России» (с изменениями на 28 июля 2020 г.).
5. Приказ МЗ РФ № 951 от 29.12.2014 г. «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».
6. Черноусова Л.Н., Пузанов В.А., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Попов С.А. Лабораторная диагностика туберкулеза. Методические материалы к проведению цикла тематического усовершенствования / Под ред. проф. Ерохина В.В. 2012. – М. – 707 с.
7. Черноусова Л.Н., Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Попов С.А., Журавлев В.Ю., Пузанов В.А., Марьяндышев А.О., Вахрушева Д.В., Кравченко М.А., Сафонова С.Г., Васильева И.А., Эргешов А.Э. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. 2015. – РФО. – М. – 35 с.
8. Canetti G., Froman S., Grosset J., Hauduroy P., Langerova M., Mahler H.T., Meissner G., Mitchison D.A., Sula L. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull. World Health Organ.*, 1963, vol. 29, no. 5, pp. 565–578.

9. *Canetti G., Rist N., Grosset J.* Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. *Rev. Tuberc. Pneumol. Paris*, 1963, vol. 27, pp. 217–72.
  10. *Escoto M.L., de Kantor I.N.* Nitrate reductase activity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in the presence of electron donors. *J. Clin. Microbiol.*, 1978, vol. 7, no. 6, pp. 601–602.
  11. *Khye Seng Goh, Nalin Rastogi.* Simple and rapid method for detection of nitrate reductase activity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium canettii* grown in the Bactec MGIT 960 system. *Microbiol. Methods*, 2010, vol. 81, no. 2, pp. 208–210. Epub 2010, Mar. 15. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.03.005
  12. *Snider D.E. Jr., Good R.C., Kilburn J.O., Laskowski L.F. Jr., Lusk R.H., Marr J.J., Reggiardo Z., Middlebrook G.* Rapid drug-susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 198, vol. 123, no. 4, pt. 1, pp. 402–406. DOI: 10.1164/arrd.1981.123.4.402
  13. World Health Organization: Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis. Geneva, October 2020, 33 p. <https://www.who.int/publications/i/item/meeting-report-of-the-who-expert-consultation-on-the-definition-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>
  14. World Health Organization: Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. Geneva, 2018, 132 p.
- 
1. Culture methods for TB diagnosis: Manual for the basic training course for TB bacteriological laboratory specialists. Ed. by V.V. Erokhin. Moscow-Tver, Triada, 2008, 208 p. (In Russ.)
  2. *Larionova E.E., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Sevastyanova E.V., Chernousova L.N.* Methods for the identification of mycobacterium species. *CTRI Bulletin*, 2021, no. 1, pp. 87–98. (In Russ.) DOI: 10.7868/S2587667821010106
  3. *Larionova E.E., Andreevskaya I.Yu., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Sevastyanova E.V.* The culture method for mycobacteria studies. Solid growth media. *CTRI Bulletin*, 2020, no. 3, pp. 75–86. (In Russ.) DOI: 10.7868/S2587667820030103
  4. On endorsement of general pharmacopeial monographs or pharmacopeial monographs and on recognition of some orders by Ministry of Health and Medical Industry, Ministry of Health and Social Development, and Ministry of Health of the Russian Federation invalid (as of 28.07.2020). Order no. 749 by RF MoH as of 31.10.2018. (In Russ.)
  5. On endorsement of methodical recommendations on improvement of pulmonary TB diagnosis and treatment. Order no. 951 by RF MoH as of 29.12.2014. (In Russ.)
  6. *Chernousova L.N., Puzanov V.A., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Larionova E.E., Popov S.A.* Laboratory diagnosis of TB. In: Methodical materials for the thematic improvement cycle. Ed. by V.V. Erokhin. Moscow, 2012, 707 p. (In Russ.)
  7. *Chernousova L.N., Sevastyanova E.V., Larionova E.E., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Popov S.A., Zhuravlev V.Yu., Puzanov V.A., Maryandyshev A.O., Vakhrushcheva D.V., Kravchenko M.A., Safonova S.G., Vasilyeva I.A., Ergeshov A.E.* Federal clinical recommendations for management and implementation of microbiological and molecular genetic diagnosis of TB. Moscow, RSPH, 2015, 35 p. (In Russ.)
  8. *Canetti G., Froman S., Grosset J., Hauduroy P., Langeroova M., Mahler H.T., Meissner G., Mitchison D.A., Sula L.* Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull. World Health Organ.*, 1963, vol. 29, no. 5, pp. 565–578.
  9. *Canetti G., Rist N., Grosset J.* Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. *Rev. Tuberc. Pneumol. Paris*, 1963, vol. 27, pp. 217–72.
  10. *Escoto M.L., de Kantor I.N.* Nitrate reductase activity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in the presence of electron donors. *J. Clin. Microbiol.*, 1978, vol. 7, no. 6, pp. 601–602.
  11. *Khye Seng Goh, Nalin Rastogi.* Simple and rapid method for detection of nitrate reductase activity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium canettii* grown in the Bactec MGIT 960 system. *Microbiol. Methods*, 2010, vol. 81, no. 2, pp. 208–210. Epub 2010, Mar. 15. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.03.005
  12. *Snider D.E. Jr., Good R.C., Kilburn J.O., Laskowski L.F. Jr., Lusk R.H., Marr J.J., Reggiardo Z., Middlebrook G.* Rapid drug-susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 198, vol. 123, no. 4, pt. 1, pp. 402–406. DOI: 10.1164/arrd.1981.123.4.402
  13. World Health Organization: Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis. Geneva, October 2020, 33 p. <https://www.who.int/publications/i/item/meeting-report-of-the-who-expert-consultation-on-the-definition-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>
  14. World Health Organization: Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. Geneva, 2018, 132 p.

## REFERENCES

### ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»  
107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

*Севастьянова Элина Викторовна* – д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела микробиологии  
Тел.: +7 (499) 785-90-91  
E-mail: elinasev@yandex.ru

*Ларионова Елена Евгеньевна* – к.б.н., старший научный сотрудник отдела микробиологии  
Тел.: +7 (499) 785-90-91  
E-mail: larionova\_lena@mail.ru

*Андреевская Софья Николаевна* – к.м.н., старший научный сотрудник отдела микробиологии  
Тел.: +7 (499) 785-90-91  
E-mail: andsofia@mail.ru

*Черноусова Лариса Николаевна* – д.б.н., профессор, главный научный сотрудник отдела микробиологии  
Тел.: +7 (499) 785-90-91  
E-mail: lchernousova@mail.ru

*Смирнова Татьяна Геннадьевна* – к.м.н., зав. отделом микробиологии  
Тел.: +7 (499) 785-90-91  
E-mail: s\_tatka@mail.ru

### FOR CORRESPONDENCE:

Central TB Research Institute  
2, Yauzskaya alley, 107564, Moscow, Russia

*Elina V. Sevastyanova*, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, Microbiology Department  
Tel.: +7 (499) 785-90-91  
E-mail: elinasev@yandex.ru

*Elena E. Larionova*, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Microbiology Department  
Tel.: +7 (499) 785-90-91  
E-mail: larionova\_lena@mail.ru

*Sofya N. Andreevskaya*, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Microbiology Department  
Tel.: +7 (499) 785-90-91  
E-mail: andsofia@mail.ru

*Larisa N. Chernousova*, Doctor of Biological Sciences, Principal Researcher, Microbiology Department  
Tel.: +7 (499) 785-90-91  
E-mail: lchernousova@mail.ru

*Tatiana G. Smirnova*, Candidate of Medical Sciences, Head, Microbiology Department  
Tel.: +7 (499) 785-90-91  
E-mail: s\_tatka@mail.ru