

Методики лабораторных исследований

ТЕСТЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ

Часть 2. Метод пропорций на плотных питательных средах

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

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

Поступила 23.07.2021

Проведен краткий обзор основных понятий, связанных с лекарственной чувствительностью микобактерий и фенотипических методов ее тестирования. Изложена методика определения чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам (ПТП) методом пропорций на плотных питательных средах.

Ключевые слова: тестирование лекарственной чувствительности микобактерий, клинический изолят, метод пропорций, плотные питательные среды.

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

DOI: 10.7868/S2587667821030092

Laboratory Techniques

DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING OF MYCOBACTERIA

Part 2. The proportion method on solid growth media

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

Central TB Research Institute, Moscow, Russia

Submitted as of 23.07.2021

This article provides a brief review of key concepts associated with drug susceptibility of mycobacteria and phenotypic methods of its testing. The proportion method of drug susceptibility testing on solid growth media is described.

Keywords: drug susceptibility testing of mycobacteria, clinical isolate, proportion method, solid growth media.

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

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы разрабатываются новые тактики лечения туберкулеза (ТБ), особое значение приобретает персонализированный подход к химиотерапии для пациентов, инфицирован-

ных микобактериями туберкулеза (МБТ) с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ/ШЛУ). По результатам теста лекарственной чувствительности (ТЛЧ) возможна своевременная коррекция лечения. Кроме того, потребность в тестировании лекарственной

чувствительности (ЛЧ) МБТ повышается с ростом значимости эпидемиологического надзора за устойчивостью к ПТП в конкретном регионе и в масштабах страны, что служит важным показателем эпидемиологической напряженности по ТБ.

Особенности новых подходов, введенных ВОЗ по определению терминов, характеризующих ЛЧ МБТ, описаны в предыдущей статье, посвященной определению ЛЧ методом абсолютных концентраций [1]. Кроме того, можно получить более подробную информацию в рекомендательных документах ВОЗ [11, 14].

Методы определения ЛЧ МБТ были стандартизованы в середине XX века. В согласительных документах ВОЗ, подготовленных по итогам международных консультативных встреч специалистов по бактериологии ТБ в 1961, 1963, 1967 и 1969 гг., были сформулированы критерии и стандарты технических процедур для выполнения тестов на определение чувствительности МБТ для трех основных методов – абсолютных концентраций, пропорций и коэффициента резистентности [6, 7, 8, 12].

МЕТОД ПРОПОРЦИЙ

Первоначально классический метод пропорций был предложен G. Canetti et al. [7]. В настоящее время оригинальный метод модифицирован и адаптирован для лабораторий с высокой точностью.

Метод пропорций является основным рекомендованным ВОЗ методом для определения ЛЧ *M. tuberculosis*. Принцип метода состоит в определении процента клеток МБТ в культуре, устойчивых к тому или иному ПТП. Метод обладает рядом преимуществ:

- высокая чувствительность и специфичность;
- для метода разработаны критические концентрации (КК) для многих ПТП 1-го и 2-го ряда, а также для новейших ПТП;
- КК регулярно пересматриваются;
- метод может выполняться как на плотных (яичных и агаризованных), так и на жидких средах в автоматизированных системах;
- в случае использования жидких сред сокращается время получения результата (в среднем до 5–9 дней).

При сравнении метода абсолютных концентраций и метода пропорций ряд исследователей отмечают более высокую чувствительность и специфичность последнего, особенно в отношении этамбутола, стрептомицина и препаратов 2-го ряда [9, 10].

Несмотря на приведенные достоинства, метод пропорций обладает и серьезными недостатками, среди которых:

- время получения результатов на плотных питательных средах составляет от 21 до 40 дней;
- метод более сложен в исполнении и интерпретации результата;
- метод требует высоких трудозатрат;
- метод является дорогим (при использовании системы ВАСТЕС MGIT 960/320).

Для ТЛЧ МБТ методом пропорций можно использовать различные плотные питательные среды – яичные и агаризованные [14]. ВОЗ стандартизовала и рекомендовала выполнение теста на трех видах сред: яичной среде Левенштейна–Йенсена и двух агаризованных средах – агар Middlebrook 7H10 и агар Middlebrook 7H11. Критические концентрации для ПТП различаются для каждого вида сред, так же, как и число ПТП, для которых эти критические концентрации были разработаны. В табл. 1 указаны критические концентрации ПТП, к которым должно проводиться ТЛЧ МБТ методом пропорций на трех средах [14].

Удовлетворительные результаты ТЛЧ методом пропорций получаются только тогда, когда:

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

Приготовление питательных сред с противотуберкулезными препаратами

Общие правила

Общие правила приготовления любых типов плотных сред для постановки ТЛЧ методом пропорций одинаковы и не отличаются от таковых для постановки ТЛЧ методом абсолютных концентраций. Среда 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!

Таблица 1. Критические концентрации ПТП для определения ЛЧ МБТ методом пропорций на плотных питательных средах**Table 1.** Critical concentrations of TB drugs for drug susceptibility testing of mycobacteria by the proportion method on solid growth media

Группа препаратов ¹	Препарат	Критические концентрации, мкг/мл		
		Среда Левенштейна-Йенсена	Agar Middlebrook 7H10	Agar Middlebrook 7H11
1-й ряд	Стрептомицин ²	4,0	2,0	2,0
	Рифампицин ³	40,0	0,5	1,0
	Изониазид	0,2	0,2	0,2
	Этамбутол ²	2,0	5,0	7,5
Группа А	Левофлоксацин	2,0	1,0	–
	Моксифлоксацин (КК)	1,0	0,5	0,5
	Моксифлоксацин (пограничная концентрация) ⁴	–	2,0	–
	Бедаквилин	–	–	0,25
	Линезолид	–	1,0	1,0
Группа С	Деламанид	–	–	0,016
	Амикацин	30,0	2,0	–
	Этионамид	40,0	5,0	10,0
	Протионамид	40,0	–	–

¹ В таблице указаны только те препараты, для которых разработаны критические концентрации.

² Согласно [5], стрептомицин и этамбутол относятся к группе С.

³ Для рифампицина приведены критические концентрации, пересмотренные экспертной группой ВОЗ в 2020 г. [13]. Для всех остальных противотуберкулезных препаратов критические концентрации последний раз пересматривались в 2018 г. [14].

⁴ Если препарат устойчив к КК, но чувствителен к пограничной концентрации, возможно принятие решения лечащим врачом об увеличении принимаемой пациентом дозы препарата для преодоления лекарственной устойчивости МБТ.

¹ Only drugs with specified critical concentrations are included in the table.

² According to [5], streptomycin and ethambutol are referred to group C.

³ For rifampicin, critical concentrations revised by the WHO expert group in 2020 [13] are indicated. For other drugs, critical concentrations were last revised in 2018 [14].

⁴ If a drug is resistant to the critical concentration but susceptible to the borderline concentration, the attending physician may decide on increasing the drug dose to overcome *M. tuberculosis* resistance.

Для определения чувствительности к лекарственным препаратам в лаборатории должны быть 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 усло-

вии 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 субстанции при взвешивании.

После добавления препарата в среду необходимо тщательно ее перемешать, обеспечивая равномерное распределение препарата в среде, следует не допускать образования пузырей и пены. Свертывание (или застывание) среды с препаратом должно осуществляться в тех же условиях, что и свертывание (застывание) среды без препарата.

Для проведения ТЛЧ методом пропорций используется только чистая культура МБТ, предва-

рительно прошедшая процедуру проверки на контаминацию посторонней микрофлорой на кровяном агаре, процедуру проверки на принадлежность к МБТ окраской мазка культуры по Цилю–Нильсену, методом ПЦР или иммунохроматографическим методом [2].

Внимание! Проверка культуры на контаминацию параллельно с проведением самого теста на лекарственную чувствительность не допускается.

Состав комплекта сред для ТЛЧ методом пропорций:

- Если тест выполняется на среде Левенштейна–Йенсена: две пробирки с контрольной средой (без препаратов), по одной пробирке со средой, содержащей ПТП.
- Если тест выполняется на агаризованных средах (Middlebrook 7H10 или 7H11): две пробирки с контрольной средой без препаратов, по две пробирки со средой, содержащими ПТП.

Методика выполнения ТЛЧ МБТ методом пропорций на плотной питательной среде Левенштейна–Йенсена

Суть метода заключается в том, что осуществляют дозированный посев тщательно подготовленной и раститрованной микобактериальной суспензии из выросшей культуры МБТ на пробирки с питательной средой Левенштейна–Йенсена, содержащие ПТП в КК и контрольные пробирки без препаратов. После определенного срока инкубации (21 и 28 дней для промежуточной оценки, 40 дней для окончательной оценки результатов ЛЧ) сравнивают рост колоний МБТ на среде без препарата и на среде, содержащей препарат. Результат получают, высчитывая процент выросших колоний на среде с препаратом (т.е. устойчивых к этому препарату) по отношению к числу выросших колоний на контрольной среде без препарата (т.е. к общему числу инокулированных клеток МБТ). Если процент выросших колоний ≥ 1 , то культура МБТ считается устойчивой к данному препарату, если < 1 , то культура МБТ считается чувствительной к данному препарату. Интерпретация результатов одинакова для всех ПТП.

Процедура приготовления плотной питательной яичной среды Л-Й подробно изложена в Приказе МЗ РФ № 109 [4], а также в других источниках [3]. Ниже будет дана подробная инструкция для разведения ПТП в расчете на приготовление 100 комплектов для ТЛЧ методом пропорций.

Разлить готовую среду Л-Й по 500 мл в стерильные флаконы – два флакона по 500 мл для контрольной среды без препаратов, по одному флакону 500 мл для каждого из ПТП. Флаконы со средой промаркировать (контроль без препаратов, наименование ПТП). ПТП разводят в соответствии с табл. 2.

После добавления ПТП в соответственно промаркированные флаконы со средой необходимо тщательно перемешать среду с тем, чтобы препарат равномерно распределился по всему объему.

Разлить приготовленные среды в стерильные промаркированные пробирки, закрыть пробирки крышкой и свертывать среду в свертывателе или в специальных наклонных штативах в термостате с принудительной вентиляцией.

Подготовка микобактериальной суспензии

Для ТЛЧ используется только чистая, свежая культура МБТ, прошедшая идентификацию. Бактериальную массу следует снимать петлей со всей поверхности среды.

1. Бактериальную массу гомогенизировать в стерильной пробирке с бусами d 2–3 мм и стерильным физиологическим раствором на вортексе. Более подробно о способах гомогенизации бактериальной массы изложено в [1].

2. Из гомогенизированной бактериальной массы приготовить суспензию микобактериальных клеток в физиологическом растворе по стандарту мутности МакФарланда № 1 (3×10^8 клеток МБТ/мл).

3. Последовательно приготовить четыре 10-кратных разведения суспензии 10^{-1} (3×10^7 клеток МБТ/мл), 10^{-2} (3×10^6 клеток МБТ/мл), 10^{-3} (3×10^5 клеток МБТ/мл), 10^{-4} (3×10^4 клеток МБТ/мл). Для ТЛЧ будут использоваться разведения 10^{-2} (3×10^6) – для контрольной пробирки 1 и пробирок с ПТП и 10^{-4} (3×10^4) – для контрольной пробирки 2. Для приготовления разведений суспензии МБТ необходимо заранее подготовить по 4 пробирки с 9 мл стерильного физиологического раствора на каждую тестируемую культуру. Пробирки промаркировать номером культуры и разведением. Из пробирки с подготовленной по стандарту мутности МакФарланда № 1 культуры перенести стерильной пастеровской пипеткой 1 мл суспензии МБТ в пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора (разведение 10^{-1}). Аккуратно и тщательно перемешать разведение суспензии пастеровской пипеткой. Перенести 1 мл суспензии из разведения 10^{-1} в пробирку со следующим разведением (10^{-2}). Тщательно перемешать пастеровской пипеткой

Таблица 2. Процедура разведения ПТП для среды Левенштейна–Йенсена**Table 2.** The procedure of drug dilution for Lowenstein–Jensen growth medium

Препарат/критическая концентрация (мкг/мл)	Процедура разведения препарата	Объем препарата, который надо добавить в среду ¹
Изониазид/0,2	1. Взвесить 10 мг изониазида 2. Растворить навеску в 20,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 1) 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 24,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2).	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Рифампицин/40,0	1. Взвесить 80 мг рифампицина 2. Растворить навеску в 20,0 мл 95%-ного этанола или ДМСО (Раствор 1).	Добавить 5 мл Раствора 1 к 500 мл среды
Этамбутол/2,0	1. Взвесить 10 мг этамбутола 2. Растворить навеску в 50,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 1)	Добавить 5 мл Раствора 1 к 500 мл среды
Левифлоксацин/2,0	1. Взвесить 10 мг левофлоксацина 2. Растворить навеску в 5,0 мл 0,1М NaOH ² (Раствор 1). 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 9,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Моксифлоксацин/1,0	1. Взвесить 11 мг моксифлоксацина гидрохлорида (соответствует 10 мг активного вещества). 2. Растворить навеску в 5,0 мл 0,1М NaOH ² (Раствор 1) 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 19,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Амикацин/30,0	1. Взвесить 42 мг амикацина сульфата (соответствует 30 мг активного вещества) 2. Растворить навеску в 10,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 1)	Добавить 5 мл Раствора 1 к 500 мл среды
Стрептомицин/4,0	1. Взвесить 13 мг стрептомицина сульфата (соответствует 10 мг активного вещества) 2. Растворить навеску в 25 мл стер. дистил. воды (Раствор 1)	Добавить 5 мл Раствора 1 к 500 мл среды
Этионамид/40,0	1. Взвесить 80 мг этионамида 2. Растворить навеску в 20,0 мл 95%-ного этанола (Раствор 1)	Добавить 5 мл Раствора 1 к 500 мл среды

¹ Остатки разведенного препарата можно в аликвотах по 5,5–6 мл хранить в плотно закрывающихся пробирках при температуре ниже –20 °С для приготовления следующей партии комплектов для ТЛЧ. Хранению подлежат все препараты, кроме этионамида. Этионамид при заморозке выпадает в нерастворимый осадок. Разводить этионамид необходимо непосредственно перед приготовлением среды для ТЛЧ.

² Для приготовления 0,1М раствора NaOH взвесьте 0,4 г NaOH и растворите в 100 мл дистиллированной воды. Хранить при +2 ÷ +8 °С.

¹ Excessive drug dilution may be stored in 5.5–6 ml aliquots in tightly covered tubes at temperatures lower than –20 °C for preparation of other series for DST. All drugs except ethionamide are eligible for storage. Ethionamide produces insoluble deposition at freezing. It is important to dilute ethionamide immediately before medium preparation of DST.

² For preparation of 0.1M of NaOH, take 0.4 g of NaOH and dilute in 100 ml of distilled water. Store at +2 ÷ +8 °C.

и перенести 1 мл суспензии в следующее разведение, таким образом приготовив 4 разведения МБТ. Для постановки ТЛЧ методом пропорций будет использовано два разведения: 10⁻² и 10⁻⁴.

Посев разведенной суспензии МБТ на контрольные среды и среды с ПТП

1. Засеять по 0,1 мл суспензии МБТ (три капли из одноразовой пастеровской пипетки) из разведения 10⁻² (посевная доза будет составлять 3 × 10⁵ клеток МБТ) в контрольную пробирку 1 и в пробирки с препаратами.

2. Засеять 0,1 мл суспензии МБТ (три капли из одноразовой пастеровской пипетки) из разведения 10⁻⁴ (посевная доза 3 × 10³ клеток МБТ) в контрольную пробирку 2.

Распределить суспензию МБТ по всей площади скошенной среды, чтобы клетки МБТ как можно равномернее осели на поверхность среды. Пробирки инкубировать при 37 °С, уложив горизонтально. Через несколько часов пробирки можно поднять и инкубировать вертикально. Получение результатов осуществляется в три этапа – на 21-й, 28-й и 40-й день инкубации.

Первый просмотр проводить на 21-й день инкубации

1. Проверить пробирки на наличие контаминации, удалить контаминированные пробирки, после выяснения причин контаминации повторить тест со свежей культурой МБТ.

2. Оценить рост колоний МБТ на среде без препаратов в контрольных пробирках:

а) При правильной подготовке микобактериальной суспензии в **контрольной пробирке 1** должно быть приблизительно в 100 раз больше колоний МБТ, чем в **контрольной пробирке 2**.

б) Если в **контрольной пробирке 1** наблюдается менее 20 колоний МБТ (скудный рост) или нет роста МБТ вообще, необходимо продолжить инкубацию до 28-го дня.

в) Если в **контрольной пробирке 1** визуализируется сплошной рост, а на среде с ПТП за 21 день не выросло ни одной колонии МБТ, то культура МБТ будет считаться **чувствительной** и тест можно считать выполненным.

г) Если в **обеих** контрольных пробирках регистрируется сплошной рост МБТ, это означает, что разведение культуры МБТ было произведено неправильно (**гиперзасев**). В этом случае ТЛЧ необходимо повторить, используя свежую культуру МБТ.

3. В остальных случаях необходимо подсчитать процент устойчивых клеток МБТ, выросших на средах с ПТП по отношению к общему числу засеянных клеток МБТ (выросших на среде без препарата в контрольной пробирке):

а) Подсчитать число колоний на среде без препарата в **контрольной пробирке 1** (разведение 10^{-2}).

б) Посчитать число колоний МБТ, засеянных из разведения 10^{-2} , выросших на пробирке с ПТП.

в) Посчитать процент числа колоний, выросших на пробирке с ПТП (то есть процент устойчивых клеток МБТ) от числа колоний на **контрольной пробирке 1** (то есть от общего числа посеянных клеток МБТ) по формуле:

$$\frac{\text{Число колоний, выросших в пробирке, содержащей ПТП}}{\text{Число колоний, выросших в контрольной пробирке 1}} \times 100\%$$

В случае сплошного роста МБТ или слишком большого числа колоний МБТ в **контрольной пробирке 1** процент устойчивых клеток можно подсчитать, используя **контрольную пробирку 2**, учитывая коэффициент разведения ($\times 100$). В этом случае формула будет выглядеть следующим образом:

$$\frac{\text{Число колоний, выросших в пробирке, содержащей ПТП}}{\text{Число колоний, выросших в контрольной пробирке 2}} \times 100\%$$

4. Интерпретировать результат. Если процент выросших на среде с ПТП колоний ≥ 1 , то куль-

тура МБТ будет считаться **устойчивой** к данному препарату и тест можно считать выполненным.

Во всех остальных случаях пробирки продолжают инкубировать до 28-го дня.

Следующий просмотр осуществить на 28-й день

1. Оценить рост колоний МБТ на среде без препаратов в контрольных пробирках.

Если в **контрольной пробирке 1** наблюдается менее 20 колоний МБТ (скудный рост) или нет роста МБТ вообще, это означает, что разведение культуры МБТ для засева было произведено неправильно (**гипозасев**). Необходимо переставить тест со свежей культурой МБТ.

2. В остальных случаях необходимо подсчитать процент устойчивых клеток МБТ, выросших на средах с ПТП, по отношению к общему числу засеянных клеток МБТ (выросших на среде без препарата в контрольной пробирке) по формуле, как это описано выше.

3. Интерпретировать результат. Если процент выросших на среде с ПТП колоний ≥ 1 , то культура МБТ будет считаться **устойчивой** к данному препарату и тест можно считать выполненным.

Во всех остальных случаях пробирки продолжают инкубировать до 40-го дня.

Следующий просмотр осуществить на 40-й день

1. Подсчитать процент устойчивых клеток МБТ, выросших на средах с ПТП, по отношению к общему числу засеянных клеток МБТ (выросших на среде без препарата в контрольной пробирке) по формуле, как это описано выше.

2. Интерпретировать результат. Если процент выросших на среде с ПТП колоний < 1 , то культура МБТ будет считаться **чувствительной** к данному препарату и тест можно считать выполненным. Если процент выросших на среде с ПТП колоний ≥ 1 , то культура МБТ будет считаться **устойчивой** к данному препарату и тест можно считать выполненным.

Проведение ТЛЧ методом пропорций на агаризованных питательных средах

В настоящей статье мы приводим протокол постановки ТЛЧ методом пропорций на агаризованных средах Middlebrook 7H10 и Middlebrook 7H11.

Обе среды готовятся по одинаковой методике. Представлены расчеты для приготовления 100 комплектов тестов на ЛЧ.

1. Подготовить стерильные стеклянные флаконы на 1000 мл. Число флаконов равняется числу ПТП плюс два флакона для среды без препаратов. Подписать флаконы для среды без препаратов и оставшиеся флаконы в соответствии с наименованием препаратов.

2. Налить во флаконы по 450 мл дистиллированной воды.

3. Взвесить на весах 9,5 г основы агара Middlebrook 7H10 или 10,5 г основы Middlebrook 7H11.

4. Добавить основу агара во флаконы с дистиллированной водой.

5. Добавить во флаконы по 2,5 мл глицерина, тщательно перемешать, разбив комки агаровой основы.

6. Закрывать флаконы и автоклавировать при 121 °С 15 минут.

7. После автоклавирования агар должен остыть до 50–56 °С.

Внимание! Добавление обогащающей добавки и антибиотиков в слишком горячий агар приведет к разрушению компонентов добавки и препаратов и получению невалидных результатов ТЛЧ. Если температура колбы опустится ниже 50 °С, агар может застыть.

8. Во все флаконы добавить по 50 мл обогащающей добавки OADC.

9. Во флаконы, подписанные названиями ПТП, добавить по 5 мл соответствующих препаратов, разведенных предварительно по схеме, указанной в табл. 3 и 4.

Таблица 3. Процедура разведения ПТП для агаризованной среды Middlebrook 7H10

Table 3. The procedure of drug dilution for Middlebrook 7H10 agar

Препарат/критическая концентрация (мкг/мл)	Процедура разведения препарата	Объем препарата, который надо добавить в среду ¹
Изониазид/0,2	1. Взвесить 10 мг изониазида 2. Растворить навеску в 20,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 1) 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 24,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Рифампицин/0,5	1. Взвесить 10 мг рифампицина. 2. Растворить навеску в 10,0 мл 95% -ного этанола или ДМСО (Раствор 1) 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 19,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Этамбутол/5,0	1. Взвесить 10 мг этамбутола 2. Растворить навеску в 20,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 1)	Добавить 5 мл Раствора 1 к 500 мл среды
Левифлоксацин/1,0	1. Взвесить 10 мг левофлоксацина 2. Растворить навеску в 10,0 мл 0,1М NaOH ² (Раствор 1) 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 9,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Моксифлоксацин/0,5	1. Взвесить 11 мг моксифлоксацина гидрохлорида (соответствует 10 мг активного вещества) 2. Растворить навеску в 20,0 мл 0,1М NaOH ² (Раствор 1) 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 9,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Моксифлоксацин/2,0	1. Взвесить 11 мг моксифлоксацина гидрохлорида (соответствует 10 мг активного вещества) 2. Растворить навеску в 5,0 мл 0,1М NaOH ² (Раствор 1) 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 9,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Линезолид/1,0	1. Взвесить 10 мг линезолида 2. Растворить навеску в 10,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 1) 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 9,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Амикацин/2,0	Взвесить 14 мг амикацина сульфата (соответствует 10 мг активного вещества) Растворить навеску в 5,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 1) Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 9,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Этионамид/5,0	1. Взвесить 10 мг этионамида 2. Растворить навеску в 20,0 мл 95% -ного этанола (Раствор 1)	Добавить 5 мл Раствора 1 к 500 мл среды

¹ Остатки разведенного препарата можно в аликвотах по 5,5–6 мл хранить в плотно закрывающихся пробирках при температуре ниже –20 °С для приготовления следующей партии комплектов для ТЛЧ. Хранению подлежат все препараты, кроме этионамида. Этионамид при заморозке выпадает в нерастворимый осадок. Разводить этионамид необходимо непосредственно перед приготовлением среды для ТЛЧ.

² Для приготовления 0,1М раствора NaOH взвесьте 0,4 г NaOH и растворите в 100 мл дистиллированной воды. Хранить при +2 ÷ +8 °С.

¹ Excessive drug dilution may be stored in 5.5–6 ml aliquots in tightly covered tubes at temperatures lower than –20 °C for preparation of other series for DST. All drugs except ethionamide are eligible for storage. Ethionamide produces insoluble deposition at freezing. It is important to dilute ethionamide immediately before medium preparation of DST.

² For preparation of 0.1M of NaOH, take 0.4 g of NaOH and dilute in 100 ml of distilled water. Store at +2 ÷ +8 °C.

Таблица 4. Процедура разведения ПТП для агаризованной среды Middlebrook 7H11**Table 4.** The procedure of drug dilution for Middlebrook 7H11 agar

Препарат/критическая концентрация (мкг/мл)	Процедура разведения препарата	Объем препарата, который надо добавить в среду ¹
Изониазид/0,2	1. Взвесить 10 мг изониазида 2. Растворить навеску в 20 мл стер. дистил. воды (Раствор 1) 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 24,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Рифампицин/1,0	1. Взвесить 10 мг рифампицина 2. Растворить навеску в 5,0 мл 95%-ного этанола или ДМСО (Раствор 1) 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 19,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды.
Этамбутол/7,5	1. Взвесить 15 мг этамбутола 2. Растворить навеску в 20,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 1)	Добавить 5 мл Раствора 1 к 500 мл среды
Левифлоксацин/1,0	1. Взвесить 10 мг левофлоксацина 2. Растворить навеску в 10 мл 0,1М NaOH ² (Раствор 1) 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 9,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Моксифлоксацин/0,5	1. Взвесить 11 мг моксифлоксацина гидрохлорида (соответствует 10 мг активного вещества) 2. Растворить навеску в 20,0 мл 0,1М NaOH ² (Раствор 1) 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 9,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Бедаквилин/0,25	1. Взвесить 12 мг бедаквилина фумарата (соответствует 10 мг активной субстанции бедаквилина) 2. Растворить навеску в 20,0 мл ДМСО (Раствор 1) 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 19,0 мл ДМСО (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Линезолид/1,0	1. Взвесить 10 мг линезолида 2. Растворить навеску в 10 мл стер. дистил. воды (Раствор 1) 3. Добавить 1,0 мл Раствора 1 к 9,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2)	Добавить 5 мл Раствора 2 к 500 мл среды
Деламанид/0,016	1. Взвесить 10 мг деламанида 2. Растворить навеску в 2,5 мл стер. дистил. воды (Раствор 1) 3. Добавить 0,5 мл Раствора 1 к 12,0 мл стер. дистил. воды (Раствор 2) 4. Добавить 1,0 мл Раствора 2 к 9 мл стер. дистил. воды (Раствор 3) 5. Добавить 1,0 мл Раствора 3 к 9 мл стер. дистил. воды (Раствор 4)	Добавить 5 мл Раствора 4 к 500 мл среды
Этионамид/10,0	1. Взвесить 10 мг этионамида 2. Растворить навеску в 10,0 мл 95% -ного этанола (Раствор 1)	Добавить 5 мл Раствора 1 к 500 мл среды

¹ Остатки разведенного препарата можно в аликвотах по 5,5–6 мл хранить в плотно закрывающихся пробирках при температуре ниже –20 °С для приготовления следующей партии комплектов для ТЛЧ. Хранению подлежат все препараты, кроме этионамида. Этионамид при заморозке выпадает в нерастворимый осадок. Разводить этионамид необходимо непосредственно перед приготовлением среды для ТЛЧ.

² Для приготовления 0,1М раствора NaOH взвесьте 0,4 г NaOH и растворите в 100 мл дистиллированной воды. Хранить при +2 ÷ +8 °С.

¹ Excessive drug dilution may be stored in 5.5–6 ml aliquots in tightly covered tubes at temperatures lower than –20 °C for preparation of other series for DST. All drugs except ethionamide are eligible for storage. Ethionamide produces insoluble deposition at freezing. It is important to dilute ethionamide immediately before medium preparation of DST.

² For preparation of 0.1M of NaOH, take 0.4 g of NaOH and dilute in 100 ml of distilled water. Store at +2 ÷ +8 °C.

Приготовленную среду без препаратов и содержащую ПТП можно разливать по 5 мл в промаркированные чашки Петри/24-луночные планшеты или пробирки с завинчивающимися крышками (скошенная среда). Для приготовления «косяков» после розлива среды пробирки немедленно установить в штативы под наклоном с тем, чтобы среда застыла, образовав поверхность скошенной среды.

Подготовка микобактериальной суспензии

Для ТЛЧ используется только чистая, свежая культура МБТ, прошедшая идентификацию. Бактериальную массу следует снимать петлей со всей поверхности среды.

1. Бактериальную массу гомогенизировать стерильной в пробирке с бусами d 2–3 мм и стерильным физиологическим раствором на вортек-

се. Подробно о способах гомогенизации бактериальной массы изложено в [1].

2. Из гомогенизированной бактериальной массы приготовить суспензию микобактериальных клеток в физиологическом растворе по стандарту мутности МакФарланда № 1 (3×10^8 клеток МБТ/мл).

3. Последовательно приготовить четыре 10-кратных разведения суспензии 10^{-1} (3×10^7 клеток МБТ/мл), 10^{-2} (3×10^6 клеток МБТ/мл), 10^{-3} (3×10^5 клеток МБТ/мл), 10^{-4} (3×10^4 клеток МБТ/мл). Для ТЛЧ будут использоваться разведения 10^{-2} (3×10^6) – для **контрольной пробирки 1** и пробирок с ПТП и 10^{-4} (3×10^4) – для **контрольной пробирки 2** и пробирок с ПТП. Процедура разведения суспензии в деталях изложена выше.

Для постановки ТЛЧ методом пропорций будет использовано два разведения: 10^{-2} и 10^{-4} .

Посев разведенной суспензии МБТ на контрольные среды и среды с ПТП

Методика посева раститорованной суспензии МБТ на пробирки со скошенной агаризованной средой не отличается от таковой в случае использования чашек Петри или 24-луночных планшетов. Далее будет описана процедура проведения ТЛЧ методом пропорций на скошенной агаризованной среде в пробирках.

1. Засеять по 0,1 мл суспензии МБТ (три капли из одноразовой пастеровской пипетки) из разведения 10^{-2} (3×10^6) в **контрольную пробирку 1** и в пробирки с препаратами.

2. Засеять 0,1 мл суспензии МБТ (три капли из одноразовой пастеровской пипетки) из разведения 10^{-4} (3×10^4) в **контрольную пробирку 2** и в пробирки с препаратами.

Распределить суспензию МБТ по всей площади агара, чтобы клетки МБТ как можно равномернее осели на поверхность среды. Пробирки инкубировать при 37 °С, уложив горизонтально. Через несколько часов пробирки можно поднять и инкубировать вертикально. Время до получения предварительного результата – 21–28 дней.

Если агаризованная среда была разлита в чашки Петри или 24-луночные планшеты, необходимо распределить засеянную суспензию МБТ по всей поверхности агара, добиваясь равномерного распределения клеток МБТ, затащить крышки чашек или планшетов парафильмом. Инкубацию чашек/планшетов проводить в пакетах, пропускающих CO_2 , во избежание высыхания среды в термостате или использовать CO_2 -инкубатор с поддержанием влажности.

Интерпретация результатов

Первый просмотр сделать через 2 дня для контроля контаминации среды посторонней микрофлорой. Удалить контаминированные пробирки. В случае контаминации всех контрольных пробирок постановка ТЛЧ для данной культуры МБТ считается невалидной и подлежит удалению. После выяснения причин, приведших к контаминации, ТЛЧ выполняют заново. В случае пророста только одной из контрольных пробирок (**контрольная пробирка 1** или **контрольная пробирка 2**), контаминированная пробирка удаляется, интерпретация результатов проводится по единственной контрольной пробирке. В случае контаминации пробирки, содержащей препарат, пробирка удаляется, после выяснения причин контаминации ТЛЧ для этого препарата переделывается.

Внимание! Нельзя «подставлять» вновь засеянную свежую пробирку с препаратом к поставленному ранее комплекту ТЛЧ, даже если контаминацию пробирки с препаратом выявили на следующий день.

Предварительный результат ТЛЧ получают на 21-й день. Если на обеих контрольных пробирках выросло менее 50 колоний, пробирки оставляют в термостате до 28-го дня. На 28-й день получают окончательный результат. В случае слабого роста (менее 50 колоний) или отсутствия роста колоний МБТ на обеих контрольных пробирках (**гипозасев**), ТЛЧ следует переделать со свежей культурой МБТ, более тщательно приготовив разведения микобактериальной суспензии. В случае получения от 50 до 200 колоний в контрольных пробирках ТЛЧ считается валидным и результаты подлежат интерпретации. В случае сплошного роста МБТ в **контрольной пробирке 1** (**гиперзасев**) и от 50 до 200 колоний в **контрольной пробирке 2** результат считывается с **контрольной пробирки 2** (разведение 10^{-4}) и сред с ПТП, на которые был произведен посев суспензии МБТ того же разведения (10^{-4}), что и в **контрольную пробирку 2**. В случае сплошного роста МБТ на обеих контрольных пробирках (**гиперзасев**) тест необходимо полностью переделать со свежей культурой МБТ, обращая внимание на тщательность подготовки разведений суспензии МБТ.

Внимание! В случае гиперзасева на обеих контрольных пробирках и полного отсутствия роста колоний МБТ на пробирках с ПТП разрешается выдать заключение о наличии чувствительности культуры МБТ к этим ПТП.

Внимание! Подсчет процента выросших колоний МБТ на среде с ПТП необходимо производить относительно числа колоний МБТ, выросших на среде без ПТП (контрольных пробирках), засеянных тем же разведением суспензии МБТ.

1. Подсчитать число колоний на среде без препарата в **контрольной пробирке 1** (разведение 10^{-2}).

2. Посчитать число колоний МБТ, засеянных из разведения 10^{-2} , выросших на пробирке с ПТП.

3. Посчитать процент числа колоний, выросших на пробирке с ПТП (то есть процент устойчивых клеток МБТ) от числа колоний на **контрольной пробирке 1** (то есть от общего числа посеянных клеток МБТ) по формуле:

$$\frac{\text{Число колоний, выросших в пробирке, содержащей ПТП}}{\text{Число колоний, выросших в контрольной пробирке 1}} \times 100\%$$

4. Интерпретировать результат:

а) Если процент выросших на среде с ПТП колоний < 1 , то культура МБТ будет считаться **чувствительной** к данному препарату и тест можно считать выполненным.

б) Если процент выросших на среде с ПТП колоний ≥ 1 , то культура МБТ будет считаться **устойчивой** к данному препарату и тест можно считать выполненным.

В случае, если интерпретировать результаты, полученные при засеве разведения МБТ 10^{-2} на **контрольную пробирку 1** и пробирки с ПТП невозможно (гиперзасев или контаминация), можно получить результат с пробирок, засеянных из разведения суспензии МБТ 10^{-4} , подсчитав процент устойчивых колоний, выросших на среде с ПТП относительно колоний, выросших в **контрольной пробирке 2**, используя тот же алгоритм подсчета процента устойчивых клеток МБТ.

Контроль качества ТЛЧ МБТ

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

Внутрилабораторный контроль качества сред для тестирования лекарственной чувствительности методом пропорций

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 ЛЧ стандартного штамма *M. tuberculosis* H37Rv ко всем исследуемым ПТП. Если среда с ПТП 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 ЛЧ 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 лекарственной чувствительности 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 (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 ТЛЧ для МБТ – 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 ПТП конкретного пациента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ларионова Е.Е., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Севастьянова Э.В., Черноусова Л.Н. Тесты лекарственной чувствительности микобактерий. Часть 1. Метод абсолютных концентраций на плотной среде Левенштейна-Йенсена // *Вестник ЦНИИТ*. 2021. – № 1. – С. 81–93. DOI: 10.7868/S2587667821020084
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/S2587667821010106
3. Ларионова Е.Е., Андриевская И.Ю., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Севастьянова Э.В. Культуральный метод исследования микобактерий. Плотные питательные среды // *Вестник ЦНИИТ*. 2020. – № 3. – С. 75–86. DOI: 10.7868/S2587667820030103
4. Приказ МЗ РФ № 109 от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».
5. Сводное руководство ВОЗ по лечению лекарственно-устойчивого туберкулеза. Копенгаген: Европейское региональное бюро ВОЗ, 2019. Лицензия CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
6. Canetti G., Fox W., Khomenko A., Mahler H.T., Menon N.K., Mitchison D.A., Rist N., Šmelev N.A. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ.*, 1969, no. 41(1), pp. 21–43.
7. 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.
8. 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. 217–272.
9. Hirano K., Wada M., Abe C., Aoyagi T. A study on resistance of Mycobacterium tuberculosis to four first-line anti-tuberculosis drugs in Japan: comparison of results in the local facilities and in the reference laboratory, in 1997. *Kekkaku*, 2001, vol. 76, no. 6, pp. 461–471.
10. Liu Y., Wang S., Na X. Drug susceptibility testing for M. tuberculosis with proportion method. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.*, 2000, vol. 23, no. 2, pp. 89–92.
11. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, 27–29 October 2020. Geneva: World Health Organization; 2021. CC BY-NC-SA 3.0 IGO, <https://www.who.int/publications/i/item/meeting-report-of-the-who-expert-consultation-on-the-definition-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>

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.*, 1981, vol. 123, no. 4 pt. 1, pp. 402–406. DOI: 10.1164/arrd.1981.123.4.402
13. Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). Geneva, World Health Organization, 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
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

1. Larionova E.E., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Sevastyanova E.V., Chernousova L.N. Drug susceptibility testing of mycobacteria. Part 1. The absolute concentration method on Lowenstein-Jensen solid medium. *CTRI Bulletin*, 2021, no. 1, pp. 81–93. (In Russ.) DOI: 10.7868/S2587667821020084
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., Andrievskaya 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 improvement of TB control in the Russian Federation. Order no. 109 by RF MoH as of 21.03.2003. (In Russ.)
5. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. (In Russ.)
6. Canetti G., Fox W., Khomenko A., Mahler H.T., Menon N.K., Mitchison D.A., Rist N., Šmelev N.A. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ.*, 1969, no. 41(1), pp. 21–43.
7. 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.
8. 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. 217–272.
9. Hirano K., Wada M., Abe C., Aoyagi T. A study on resistance of Mycobacterium tuberculosis to four first-line anti-tuberculosis drugs in Japan: comparison of results in the local facilities and in the reference laboratory, in 1997. *Kekkaku*, 2001, vol. 76, no. 6, pp. 461–471.

10. Liu Y., Wang S., Na X. Drug susceptibility testing for *M. tuberculosis* with proportion method. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.*, 2000, vol. 23, no. 2, pp. 89–92.
11. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, 27–29 October 2020. Geneva: World Health Organization; 2021. CC BY-NC-SA 3.0 IGO, <https://www.who.int/publications/i/item/meeting-report-of-the-who-expert-consultation-on-the-definition-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>
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.*, 1981, vol. 123, no. 4 pt. 1, pp. 402–406. DOI: 10.1164/arrd.1981.123.4.402
13. Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). Geneva, World Health Organization, 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
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.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

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

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

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

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

FOR CORRESPONDENCE:

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

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

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

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