

Е. Н. Разнатовская¹, Г. В. Худяков¹, Н. А. Грицова²

¹ Запорожский государственный медицинский университет

² Национальная медицинская академия последипломного образования им. П. Л. Шупика

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВО ФТИЗИАТРИИ

Цель исследования – провести обзор литературы на предмет изучения возможностей и достижения молекулярно-генетической диагностики туберкулеза в мире и Украине.

Материалы и методы. Обзор литературных источников.

Результаты и обсуждение. В основе молекулярно-генетических методов диагностики лежит метод полимеразной цепной реакции, разновидностей которых очень много. Эти методы диагностики позволяют изучить виды и генотипы микобактерий туберкулеза, медикаментозную устойчивость микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам. Изучение генотипов микобактерий туберкулеза позволяют исследовать путь передачи туберкулеза, определить повторное инфицирование микобактериями и выявить факторы риска специфического заболевания, что позволяет своевременно исследовать контакты и провести химиопрофилактику.

Выводы. На сегодня в мире, в том числе и Украине, есть значительные достижения в молекулярно-генетической диагностике туберкулеза. Учитывая эпидемию туберкулеза и темпы роста химиорезистентного туберкулеза в Украине, внедрение новейших молекулярно-генетических методов диагностики туберкулеза является важным и необходимым заданием для фтизиатрии.

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы диагностики, туберкулез.

Туберкулез на сегодня во всем мире является одной из главных угроз для здоровья человечества среди инфекционных болезней, и является второй по значимости причиной смерти от них [7, 23, 25, 48]. Со времени провозглашения в Украине эпидемии туберкулеза в 1995 г., которая является одним из разрушительных для человека естественных явлений, вопреки всем стараниям ее преодолеть, количество больных продолжает увеличиваться [15, 22]. Украина отнесена в группу стран с высоким уровнем заболеваемости туберкулезом и занимает второе место после Российской Федерации среди стран Центральной и Восточной Европы по темпам роста химиорезистентного туберкулеза (ХРТБ) и четвертое место в мире по его распространенности среди больных с новыми случаями заболевания [21, 29].

Одними из причин высокого уровня заболеваемости туберкулеза, как чувствительными формами, так и химиорезистентными [7, 14, 23], является несвоевременное и позднее выявления больных активным специфическим процессом, что приводит к позднему началу лечения. Своевременная идентификация штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ), их резистентности к противотуберкулезным препаратам и немедленное начало лечения данной категории больных предупреждают распространение резистентных МБТ, дальнейшее нарастания степени резистентности и прогрессирования процесса. Отсутствие

такой информации или ее позднее получение значительно снижают эффективность лечения больных ХРТБ.

Основным методом диагностики туберкулеза является исследование мокроты на выявление МБТ [9]. Самым простым и не затратным методом является бактериоскопия мокроты. Но недостатками этого метода являются: невозможно дифференцировать МТБ *M. tuberculosis complex* от нетуберкулезных микобактерий; при незначительном количестве МТБ в мокроте метод не эффективен (необходимо содержание в 1 мл мокроты, как минимум, 5000-10000 МБТ) [10]. Культивирование МБТ проводится на твердой (яичная среда Левенштейн-Йенсен) и жидкой (метод ВАСТЕС) средах, агаре (Middlebrook 7Н10 и 7Н10). Для определения теста медикаментозной чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам используются твердые и жидкие среды, при которых скорость роста культуры и выявления медикаментозной чувствительности разная (1–3 месяца и 14–21 суток, соответственно). При этом метод ВАСТЕС позволяет идентифицировать *M. tuberculosis complex*. Чувствительность культуральных методов (число МБТ) – как минимум 100 в 1 мл.

Поэтому, на сегодня актуальными являются молекулярно-генетические методы диагностики туберкулеза, что позволяет не только рано и своевременно диагностировать активный специфический

ческий процесс, но и назначить необходимое своевременное и адекватное лечение.

Цель исследования – провести обзор литературы на предмет изучения возможностей и достижения молекулярно-генетической диагностики туберкулеза в мире и Украине.

Результаты и обсуждения

Молекулярно-генетические (МГ) методы диагностики основаны на манипулировании с геномными материалами возбудителя с целью выявления специфического генетического материала [25]:

- участков дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) с нуклеотидной последовательностью, специфической в отношении данного вида или штаммов возбудителя;

- для анализа специфических последовательностей ДНК в генах, определяющих чувствительность возбудителя к определённым лекарственным веществам;

- для анализа функциональной активности определённых генов возбудителя.

В основе МГ методов диагностики лежит метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который основан на выявлении в геноме возбудителя видоспецифических последовательностей. Метод ПЦР обладает высокой специфичностью и чувствительностью с разрешающей способностью менее 10 МБТ в 1 мл диагностического материала. А положительный результат однозначно указывает на принадлежность МБТ к *M. tuberculosis complex*.

Разновидности ПЦР [6, 12, 33, 40, 42, 43, 47]:

1. Вложенная ПЦР (Nested PCR) применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Для этого метода используют две пары праймеров с проведением двух последовательных реакций. При этом вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

2. Инвертированная ПЦР или обратная ПЦР (Inverse PCR) используется при условии, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Для осуществления этого метода проводят ряд разрезов ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов (лигирование), и в результате известные фрагменты оказываются на обоих концах неизвестного участка.

3. ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из библиотеки рибонуклеиновой кислоты (РНК). Перед обычной ПЦР проводят на матрице мРНК синтез одноцепочечной молекулы ДНК с помощью ревертазы и получают одноцепочечную кДНК, которая используется в качестве матрицы для ПЦР. С по-

мощью этого метода определяют де и когда экспрессируются данные гены.

4. Асимметричная ПЦР (Asymmetric PCR) проводится для амплификации преимущественно одной из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа. Особенностью метода является то, что один из праймеров берётся в большом избытке. Модификаций этого метода является Linear-After-The-Exponential-PCR (LATE-PCR), в котором используются праймеры с разной концентрацией. ПЦР проводят при высокой температуре отжига, тем самым удаётся поддержать эффективности реакции на протяжении всех циклов. Используется в некоторых методиках секвенирования ДНК и гибридизационного анализа.

5. Количественная ПЦР или ПЦР в реальном времени (Quantitative PCR, Q-PCR). Используется для непосредственного наблюдения за измерением количества конкретного ПЦР продукта в каждом цикле реакции. В этом методе используют флуоресцентно-меченые праймеры или ДНК-зонды. Используется флуоресцентный интеркалирующий краситель Sybr Green I, который обеспечивает простой и экономичный вариант для детекции и количественного определения ПЦР-продуктов [42]. Во фтизиатрии этот метод используется для выявления *M. tuberculosis complex* в клиническом материале. По данным производителя, специфичность 100% [1, 12].

6. Ступенчатая ПЦР (Touchdown PCR). С помощью этого метода уменьшается влияние неспецифического связывания праймеров. При этом праймер частично гибридизуется с комплементарной цепью. Частичная гибридизация праймера на геномной ДНК приводит к неспецифической амплификации [40, 43].

7. Метод молекулярных колоний или ПЦР в геле (PCR Colony). Акриламидный гель полимеризуют со всеми компонентами ПЦР на поверхности и проводят ПЦР. В точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.

8. ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (Rapid amplification of cDNA ends, RACE-PCR).

9. ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR). Модификация ПЦР для амплификации протяжённых участков ДНК.

10. ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК (Random Amplification of Polymorphic DNA (ДНК отпечатков) [RAPD]). Используется для различия близких по генетической последовательности организмы. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера, который будет частично комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых организмов. Учитывая технологию DNA, важность ее проявляется в определении причин

реактивации специфического процесса и создания баз данных генотипом МБТ.

11. Групп-специфическая ПЦР (group-specific PCR). Это ПЦР для родственных последовательностях внутри одного или между разными видами, используя консервативные праймеры к этим последовательностям.

12. Уникальная ПЦР (unique PCR) – то противоположный методу групп-специфической ПЦР. Суть метода состоит в подборе праймеров для амплификации только конкретной последовательности среди родственных последовательностей.

13. ПЦР с использованием горячего старта (Hot-start PCR) – это модификация ПЦР с использованием ДНК-полимеразы. При этом, полимеразная активность блокируется в момент постановки реакции до первой денатурации в ПЦР.

14. Виртуальная ПЦР (in silico PCR, цифровая ПЦР, электронная ПЦР, e-ПЦР). Это математический метод компьютерного анализа теоретической ПЦР с использованием списка последовательностей праймеров (или ДНК-зондов) для предсказания потенциальной амплификации ДНК исследуемого генома, хромосомы и др.

Метод ПЦР предполагает использование специфических зондов (праймеров) и получение дискретных ДНК-продуктов амплификации отдельных участков геномной ДНК [36, 38, 39, 44].

– SSR (https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BD%D0%B3%D0%BB%D0%B8%D0%B9%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D1%8F%D0%B7%D1%8B%D0%BA Simple Sequence Repeats) – фланкирующие праймеры. ПЦР с флангирующими праймерами позволяет рассматривать полиморфизм только одного локуса.

– RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). В RAPD можно использовать как одиночный праймер, так и несколько RAPD праймеров. Метод универсален для исследований разных видов, при использовании одних и те же праймеров.

– ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) – это специализированный вариант RAPD метода, в котором праймер состоит из микросателлитной последовательности. В методе используется один или несколько праймеров. Продукты ISSR амплификации содержат на флангах инвертированную микросателлитную последовательность праймера.

– RFLP (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) или полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Это метод с использованием блот-гибридизации и включает в себя: выделение ДНК, получение фрагментов рестрикции, их электрофоретическое разделение, перенос на фильтры с последующей гибридизацией специфических ДНК-зондов с полученными фрагментами ДНК. ПДРФ эффективен при картировании генома, маркировании генов многих биологических и экономически важных при-

знаков. ПДРФ-анализ с зондами, в результате высокой вариабельности участков ДНК, позволяет получать мультилокусные спектры с высоким разрешением на популяционном уровне. Благодаря очень высокому уровню полиморфизма этот метод в настоящее время является приоритетным для анализа внутри- и межпопуляционной изменчивости и определения генетических расстояний между группами организмов.

– AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) представляет собой комбинацию между ПДРФ и ПЦР методов. Метод AFLP состоит из нескольких этапов: геномная ДНК одновременно рестрицируется двумя рестриктазами (EcoRI и MseI), затем рестрицированная геномная ДНК лигируется с адаптором. После этого проводится две последовательные ПЦР.

– SSAP (Sequence Specific Amplification Polymorphism) – это модификация метода AFLP, для выявления полиморфизма.

– IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) – ПЦР между праймерами, комплементарными последовательностям двух рядом расположенных LTR ретротранспозона. Можно комбинировать праймеры из LTR с другими праймерами из повторяющейся ДНК.

– REMAP (Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism) – ПЦР между праймером к фрагменту LTR ретротранспозона и праймером из рядом расположенного, простого микросателлитного повтора (ISSR праймер).

– RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms). Метод, основан на использовании праймеров к последовательностям ретротранспозонов и выявляющий кодоминантные аллельные варианты. Принцип метода основан на мультилокусной ПЦР, в которой используются пара праймеров, фланкирующих участок ДНК до ретротранспозиции и праймер к LTR ретротранспозона, который встроен в данный участок между первыми двумя праймерами. Этот метод выявляет полиморфизм только для данного полиморфного локуса.

– iPBS (inter PBS amplification). Метод основан на использовании праймеров к PBS (Primer Binding Site https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BD%D0%B3%D0%BB%D0%B8%D0%B9%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D1%8F%D0%B7%D1%8B%D0%BA, участок связывания тРНК). Метод используется для выявления полиморфизма между образцами.

– VNTR (https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BD%D0%B3%D0%BB%D0%B8%D0%B9%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D1%8F%D0%B7%D1%8B%D0%BA Variable Number Tandem Repeat). Метод определения вариабельного числа точных tandemных повторов в ДНК МБТ. Tandemные повторы широко распространены в разных геномах и высокополиморфны. Метод основан только на использовании

ПЦР и не требует дополнительных манипуляций. С помощью VNTR достигается большая степень дискриминации штаммов, чем с помощью метода ПДРФ [2, 18, 20]. В настоящее время наиболее быстрым и простым методом генотипирования МБТ является MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – микобактериальные рассеянные повторяющиеся элементы).

– SNP (single nucleotide polymorphisms) или однонуклеотидный полиморфизм. Метод используется для отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме (или в другой сравниваемой последовательности) у представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом индивида [36, 44]. SNP-типирование позволяет более точно определять семейство штаммов и оценить количественный состав популяции штаммов МТБ [5].

МГ методы диагностики позволяют изучить виды и генотипы МБТ, медикаментозную устойчивость МБТ к противотуберкулезным препаратам. Изучение генотипов МБТ позволяют исследовать путь передачи туберкулеза, определить повторное инфицирование микобактериями и выявить факторы риска специфического заболевания, что позволяет своевременно исследовать контакты и провести химиопрофилактику.

Особенность генома *M. tuberculosis complex* является большое число повторяющихся последовательностей ДНК [34]. В хромосоме *M. tuberculosis H37Rv* насчитывают до 56 копий IS-элементов (insertion sequences – вставочная последовательность), которые обеспечивают ДНК-полиморфизм МБТ. В составе хромосомы различных штаммов МБТ присутствует от 5 до 20 копий IS6110. Наряду с IS-элементами геном содержит несколько типов коротких повторов нуклеотидов и прямые повторы DR (Direct Repeat), находящиеся в DR-области и разделённые переменными последовательностями (спейсерами). Различия в количестве копий и локализации на хромосоме этих генетических элементов используют для дифференциации штаммов МБТ. В геноме H37Rv найдены два профага – phiRv1 и phiRv2. Определены участки генома (*mutT*, *ogt-genes*), отвечающие за увеличение частоты мутаций и адаптацию МБТ.

Наиболее распространенными семействами штаммов МТБ в мире являются Beijing и LAM (Latin American Mediterranean) [2, 45, 49]. Но, соотношение отдельных генотипов в популяциях МБТ может существенно различаться в разных регионах мира, что следует учитывать при разработке стратегий генотипирования микроорганизма [41].

Воронкова О. В. с соавт. (2011) [5] установили, что среди генетически неоднородных штаммов МБТ, циркулирующих на территории Томской области Российской Федерации (РФ), вызываю-

щих остро прогрессирующий распространенный деструктивный туберкулез легких, 19% проявляют множественную лекарственную устойчивость. Штаммы семейства Beijing (пекинская группа) составляют 27% от общей популяции возбудителя, имеют высокий показатель кластеризации (74%), уровень их множественной лекарственной устойчивости в 3 раза превышает таковой у «непекинских» штаммов, для которых доля кластеризующихся штаммов составляет 11%.

По данным проведенных молекулярно-эпидемиологических исследований Ерохина В. В. и Черноусовой Л. Н. (2011) [8] с использованием МГ методов диагностики (ПЦР, биочиповая и стриповая технологии) установлено, что в Российской Федерации преобладают штаммы W-Beijing кластера. Установлено, что особенностью штаммов этого кластера являлась повышенная способность выживать вне зависимости от инфицирующей дозы. Изучение транскрипции генов *icl* и *hspX*, активирующихся при внутриклеточном существовании патогена, показало повышенную конститутивную экспрессию гена *hspX* у МБТ W-Beijing кластера. Изучение мутаций в геноме МБТ показало расширение спектра мутаций в генах-мишенях МБТ у больных с неэффективным лечением. Использование МГ методов диагностики позволили в течение 2–3 дней определять устойчивость МБТ к противотуберкулезным препаратам и своевременно откорректировать режим химиотерапии, что позволило достижению прекращения бактериовыделения у 98,6% больных ХРТБ легких через 6 месяцев лечения.

Для генотипирования изолятов *M. tuberculosis complex* в настоящее время используются методы, основанные на разных по природе повторяемых элементах [27]:

- анализ полиморфизма спейсерных последовательностей ДНК (локус DR) – метод сполитипирования (spoligotyping). Это более простой метод для скрининга штаммов и предварительного эпиданализа, исследования непосредственно клинического материала;
- рассеиваемых повторах (Mycobacterial interspersed repeat units, MIRU);
- ETR (Exact tandem repeats) – мишени метода VNTR-типирования переменных по количеству тандемных повторов);
- мобильных элементах ПДРФ с использованием праймера IS6110 (IS6110-ПДРФ).

Общим свойством этих методов является их меньшая стабильность, что делает более достоверными конвергентные события, которые могут приводить к детекции фальш-идентичных генотипов [37].

Длительное время стандартом типирования *M. tuberculosis complex* являлся метод IS6110-ПДРФ [46], который заключается в обнаружении в геноме МБТ ряда повторяющихся ну-

клеотидных последовательностей и анализа полиморфизма длин фрагментов рестрикции. IS6110 отличаются высокой стабильностью своего расположения, что позволяет точно идентифицировать различные штаммы.

Чередник Ю. О. с соавт. (2013) [27] указывают на недостатки метода IS6110-ПДРФ в том, что при повышении дискриминантной способности ПЦР-типирования возникает необходимость в увеличении количества анализируемых локусов, что повышает стоимость анализа и усложняет процедуру ПЦР.

Исследователями К. В. Белоусова с соавт. (2014) [4] проведено сравнительный массивности и скорости роста, лекарственной чувствительности и генотипических особенностей МБТ, выделенных из резецированных участков легких и респираторного материал, с использованием молекулярно-генетических методов (ПЦР в режиме реального времени, Биочип, MIRU-VNTR-генотипирование). Изоляты были генотипированы с использованием 7 локусов (MIRU10, MIRU26, MIRU31, Mtub21, ETRA, UB26, QUB11b). Установлено, что МБТ, полученные из респираторного материала на этапе хирургического лечения и из операционного материала больных туберкулезом легких, по изученным клинически значимым биологическим свойствам (массивность и скорость роста, лекарственная чувствительность и генотипические особенности) одинаковы. При этом резецированные участки легких являются наиболее информативным материалом, позволяющим получить достоверные сведения о возбудителе туберкулеза непосредственно из очага туберкулезного поражения.

Изучение штаммов киевской популяции МБТ [26, 28] было проведено методом ETR-VNTR (по локусам ETR A, B, C, D, E), SNP-типирования группоспецифических SNP katG463 та gyrA95 с помощью ПДРФ-анализа и делеционного ПЦР-анализа (делеция TbD1). Установлено, что в группе носителей Beijing-штаммов 12,3% были представители младшей возрастной группы. Выявлена достоверная ассоциация между принадлежностью к семейству LAM и хроническим течением туберкулез с фиброзно-кавернозной формой. На основе полиморфизмов katG463, gyrA95 и TbD1, штаммы МБТ разделили на 4 группы: группа предшественников штаммов (TbD1+, katG463 CTG, gyrA95 ACC); современные штаммы МБТ: ПГГ-1 (TbD1-, katG463 CTG, gyrA95 ACC) ПГГ-2 (TbD1-, katG463 CGG, gyrA95 ACC) и ПГГ-3 (TbD1-, katG463 CGG, gyrA95 AGC). С учетом этой классификации, установили, что наиболее распространенными были штаммы ПГГ-1 (56,7%), из которых 92,6% составляли штаммы семействам Beijing. При этом исследователи доказали целесообразность применения более одного метода генотипирования с использованием более стабильных SNP и LSP маркеров.

Проведенные исследования в Харьковской области свидетельствуют о том, что среди изолятов штаммы Beijing определялись в 34% случаев, а LAM – в 23% [35].

В одесской популяции МБТ штаммы Beijing определялись в 40% [16].

В полтавской популяции штаммов МБТ 70% принадлежали к генетическому семейству Beijing [24]. Анализ изолятов ДНК RIF-устойчивых штаммов был проведен методом MAC-ПЦР. Мутации в одном из трех изученных кодонов groB 526 или 531 были выявлены в 80%. Установлено, что анализ методом MAC-ПЦР гена groB обеспечивает расширенный мутационный анализ кодонов 516 и 526. Вариант katG 315 – является наиболее частым в Полтаве и Полтавской области.

На основе использования ПЦР в режиме реального времени, Скорняков С.Н. с соавт. (2014) [18] предложили схему генотипирования МБТ на территории Уральского региона РФ: MIRU-VNTR-типирование изолятов генотипа Beijing проводится с использованием 9 локусов (MIRU26, QUB26, Mtub21, Qub11b, MIRU31, MIRU40 VNTR4120, VNTR3820, VNTR3232), изолятов других генотипов (non-Beijing) – 15 локусов (Mtub04, ETRC, MIRU04, MIRU40, MIRU10, MIRU16, Mtub21, QUB11b, ETRA, Mtub30, MIRU26, MIRU31, Mtub39, QUB26, QUB4156) и/или сполитипирования. Авторы указывают на то, что предложенная схема позволяет эффективно и с наименьшими затратами определять принадлежность МБТ к наиболее эпидемиологически значимым генетическим группам в целях мониторинга их распространения.

Задачи МГ методов определения медикаментозной чувствительности или устойчивости МБТ, что позволяет назначить своевременно необходимый адекватный режим противотуберкулезной химиотерапии и применить меры предупреждения распространения лекарственно-устойчивого туберкулеза. Принципы этих методов сводятся к выявлению мутаций в определенных нуклеотидных последовательностях известных генов [19]. На сегодня известны гены МБТ, ответственные за формирование лекарственной устойчивости к изониазиду (katG, inhA, ahpC), рифампицину (groB), стрептомицину (rrs и rpsL), этамбутолу (embB), пиразинамиду (pncA), фторхинолону (gyrA) [11].

В настоящее время для быстрого детектирования изолятов, устойчивых к противотуберкулезным препаратам, внедряются молекулярно-генетические методы: ПЦР в реальном времени, гибридизация ДНК в формате чипов, секвенирование. Основные методы основаны на прямом прочтывании (секвенировании) этих последовательностей после амплификации и гибридизации биотин-меченых фрагментов ДНК, амплифицированных в ходе ПЦР с ДНК-зондами. Оба метода проводят с помощью ферментного конъю-

гата (стрептавидин-щелочная фосфатаза) – метод LIPA-Rif-TB.

К МГ методам определения лекарственной устойчивости МБТ относятся:

– тест-система Gene Xpert MTB/RIF – метод полуколичественной гнездовой ПЦР в реальном времени, проводимой *in vitro* (с определением устойчивости МБТ к рифампицину) [10, 30, 48];

– мультиплексная ПЦР и ТБ – Биочип (с определением устойчивости МБТ к изониазиду и рифампицину);

– тест-система Genotype® – стриповый метод (с определением устойчивости МБТ к изониазиду, рифампицину, этамбутолу, фторхинолонам, аминогликозидам/ циклических пептидов).

Тест-системы Genexpert MTB/RIF и Genotype® Всемирной организацией здравоохранения рассматриваются как приоритетные.

В Украине с 2012 года, в комплексе с бактериоскопией мазка мокроты и бактериологическими методами применяются молекулярно-генетические тест-системы Genexpert MTB/RIF и Genotype® [3, 10, 31, 32]. Тест-система Genexpert MTB/RIF используется в лабораториях микробиологической диагностики туберкулеза II и III уровней для быстрого выявления МБТ (без идентификации) и определения устойчивости к рифампицину. Тест-система Genotype® используется только в лабораториях микробиологической диагностики туберкулеза III уровня для диагностики туберкулеза с идентификацией МБТ и определением устойчивости к изониазиду, рифампицину, этамбутолу, фторхинолонам, аминогликозидам/ циклических пептидов [10]. МГ исследования проводятся всем больным туберкулезом легких (1, 2 и 3 категорий), независимо от результатов бактериоскопии, до начала лечения [32].

Салина Т. Ю. и Морозова Т. И. (2011) [17] проводили изучение лекарственной чувствительности МБТ к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам с помощью биологических микрочипов. Установлено, что мутации ДНК МБТ в гене *katG* встречались у 74,4%, в гене *inhA* – у 39,5%, в гене *ahpC* – у 4,7%. Отмечено расширение спектра мутаций в гене *groB*, кодирующих лекарственную устойчивость к рифампицину. Не получено достоверных различий в спектре генетических мутаций МБТ у пациентов с тяжелыми, прогрессирующими формами туберкулеза по сравнению с пациентами с ограниченным и благоприятно протекающим туберкулезом.

Исакова Ж. Т. (2009) [11] изучала эффективность тест-системы «ТБ-Биочип MDR» в экспресс-идентификации штаммов МБТ с лекарственной устойчивостью к рифампицину и изониазиду. Исследование на биочипах заключалось в выделении ДНК МБТ, проведении двух последовательных мультиплексных ПЦР со специфическими для IS6110, *groB*, *katG*, *inhA* и *ahpC*

праймерами, гибридизации продуктов амплификации второй стадии ПЦР с олигонуклеотидными зондами, установленными в ячейках биочипа. Основным преимуществом тест-системы «ТБ-Биочип MDR» была возможность выявить штаммы МБТ с множественной лекарственной устойчивостью в течение двух дней, что позволило быстро подобрать эффективный режим химиотерапии.

Лаврова О. И. с соавт. (2014) [13] проводили изучение МГ метода определения резистентности МБТ HRM (high resolution melting curve analysis), который основан на проведении амплификации фрагментов ДНК с последующим анализом их кривых плавления с высоким разрешением. Установлено, что метод HRM-анализ позволяет выявлять все мутации в интересующих фрагментах генов, различать ДНК мутантного и дикого типов в их смеси, не имеет контаминационной опасности.

В настоящее время создаются библиотеки генов МБТ, накопление информации по нуклеиновым кислотам, видовой специфичности белков МБТ, открытие вставочных элементов в геномном материале МБТ, что дает возможность проведения внутривидовой дифференциации штаммов МБТ, их полиморфизма [28].

Выводы

На сегодня в мире, в том числе и Украине, есть значительные достижения в молекулярно-генетической диагностике туберкулеза.

Преимуществами МГ методов диагностики туберкулеза являются:

- скорость диагностики (до 2-х дней);
- высокая специфичность;
- высокая чувствительность (от 10 клеток в 1 мл диагностического материала);
- положительный результат однозначно указывает на принадлежность МБТ к *M. tuberculosis complex* (что не требует дополнительной дифференцировки от нетуберкулезных микобактерий);
- экспресс-выявление генетических маркеров устойчивости *M. tuberculosis complex* к противотуберкулезным препаратам.

Учитывая эпидемию туберкулеза и темпы роста химиорезистентного туберкулеза в Украине, внедрение новейших молекулярно-генетических методов диагностики туберкулеза будет способствовать, как повышению эффективности лечения больных, так и улучшению эпидемиологической ситуации касательно этого заболевания в стране.

Необходимо учитывать полученные результаты отечественных исследователей, особенно по поводу высокой эффективности метода генотипирования с использованием более стабильных SNP и LSP маркеров.

Список літератури

1. Аляпкина Ю. С., Алексеев Я. И., Варламов Д. А. и др. Разработка технологии ПЦР в реальном времени для экспресс-определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам резервного ряда: фторхинолонам, амикацину и капреомицину // Туберкулез и болезни лёгких. – 2014. – № 12. – С. 69–75.
2. Баранов А. А., Марьяндышев А. О. Применение методов молекулярной биологии для исследования микобактерий туберкулеза // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 4. – С. 3–7.
3. Барбова А. И., Журило О. А., Жеребко Н. М., Чайка А. О. Порядок використання молекулярно-генетичних методів у лабораторіях з діагностики туберкульозу в Україні : методичні рекомендації. – Київ, 2014. – 17 с.
4. Белоусова К. В., Кравченко М. А., Бердников Р. Б. и др. Сравнительный анализ клинически значимых биологических свойств *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных из резецированных участков легких и респираторного материала // Биологические науки. – 2014. – № 9. – С. 2452–2455.
5. Воронкова О. В., Уразова О. И., Хасанова Р. Р. и др. Генотипическая характеристика *M. tuberculosis* – возбудителей остро прогрессирующего деструктивного туберкулеза легких // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 1. – С. 11–18.
6. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – Москва: Мир, 2002. – 589 с.
7. Дмитриев В. А. Глобальная проблема туберкулеза и современная стратегия ВОЗ борьбы с ним // Антибиотики и химиотерапия. – 2008. – № 5–6. – С. 3–6.
8. Ерохин В. В., Черноусова Л. Н. Значение молекулярно-генетических исследований в модернизации фтизиатрии // Фтизиатрия и пульмонология. – 2011. – № 2 (2). – С. 52–53.
9. Журило О. А., Барбова А. И., Глушкевич Т. Г., Третьякова Л. В. Стандарти бактеріологічної діагностики туберкульозу в лабораторіях протитуберкульозних закладів України: навчальний посібник для фахівців бактеріологічних лабораторій закладів протитуберкульозної служби України. – Київ, 2012. – 188 с.
10. Журило О. А., Барбова А. И., Черенько С. О. та ін. Алгоритм діагностики хіміорезистентного туберкульозу з комплексним використанням гено- та фенотипічних методів в бактеріологічних лабораторіях протитуберкульозних закладів України : методичні рекомендації. – Київ, 2013. – 21 с.
11. Исакова Ж. Т. Практическое значение тест-системы «ТБ-Биочип MDR» в экспресс-идентификации штаммов *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009. – № 2. – С. 50–51.
12. Концепции химиотерапии и этиологической (микробиологической и молекулярно-биологической) диагностики туберкулеза в Российской Федерации на современном этапе // Медицинский альянс. – 2013. – № 1. – С. 31–33.
13. Лаврова О. И., Фигероа Альварес М. В., Творогова М. Г. HRM – новый молекулярный метод определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – № 7. – С. 62–64.
14. Мельник В. М., Матусевич В. Г., Новожилова И. О. та ін. Організація виявлення та лікування хворих на хіміорезистентний туберкульоз: методичні рекомендації. – Київ, 2014. – 20 с.
15. Недоспасова О. В., Павлова О. В., Щербінська А. М. та ін. Туберкульоз в Україні: аналітично-статистичний довідник. – Кіровоград: «ПОЛУМ», 2014. – 106 с., 87 табл.
16. Ніколаєвський В. В. Оптимізація стратегії генотипування штамів *Mycobacterium tuberculosis* в Одеській області України: порівняння методів споліготипування та VNTR // Одеський медичний журнал – 2005. – Vol. 89, № 3. – С. 32–38.
17. Салина Т. Ю., Морозова Т. И. Клинические и эпидемиологические аспекты микробиологической диагностики туберкулеза с использованием биологических микрочипов // Медицинский альманах. – 2011. – № 4 (17). – С. 59–62.
18. Скорняков С. Н., Умпелева Т. В., Вязовая А. А. и др. Генотипирование уральских изолятов *Mycobacterium tuberculosis* // Биологические науки. – 2014. – № 9. – С. 2485–2488.
19. Скотникова О. И. Молекулярно-биологические методы во фтизиатрии // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2005. – № 8. – С. 5–10.
20. Сурикова О. В., Войтих Д. В., Курунов Ю. Н. Опыт использования VNTR-типирования: *Mycobacterium tuberculosis* для решения клинических задач: контроля за качеством лечения и работой лабораторной службы // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2005. – № 2. – С. 21–24.
21. Феценко Ю. И., Мельник В. М. Організація контролю за хіміорезистентним туберкульозом. Виробниче видання. – К.: Здоров'я, 2013. – 704 с.
22. Феценко Ю. И., Мельник В. М., Турченко Л. В. Концептуальні засади оптимізації протитуберкульозних заходів і реформування протитуберкульозної служби в Україні. – Режим доступа: <ftp://ftp1.ifp.kiev.ua/original/2015/feschenko2015.pdf>.
23. Феценко Ю. И., Мельник В. М., Турченко Л. В., Лірник С. В. Туберкульоз: організація діагностики, лікування, профілактики та контролю за смерністю. – К.: Здоров'я, 2010. – 448 с.
24. Філатова О. В., Бойко М. Г. Роль генетичних досліджень в лікуванні туберкульозу // Вісник проблем біології і медицини – 2013 – Вип. 1, том 2 (99). – С. 221–223.
25. Фтизиатрия. Национальное руководство / Под ред. М. И. Перельмана. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – С. 170.
26. Чередник Ю. О., Анопрієнко О. В., Горovenko Н. Г., Феценко Ю. И. Генотипові та клініко-епідеміологічні характеристики ізолятів *Mycobacterium tuberculosis*, що циркулюють в м. Києві // Вісник проблем біології і медицини – 2013. – Вип. 4, Том 1 (104). – С. 220–225.
27. Чередник Ю. О., Анопрієнко О. В., Горovenko Н. Г., Феценко Ю. И. ETR-VNTR та групспецифічне SNP-типуювання штамів *Mycobacterium tuberculosis*, що циркулюють у м. Києві // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2013. – том 11, № 2. – С. 283–291.
28. Чередник Ю. О., Анопрієнко О. В., Горovenko Н. Г., Феценко Ю. И. Проблеми комплексної лабораторної ПЛР-діагностики і генотипування штамів *Mycobacterium tuberculosis* в Україні // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. пр. – 2012. – Т. 3. – С. 398–403.
29. Черенько С. О. Проблема хіміорезистентного тубер-

- кульозу. – Режим доступу: <http://www.ifp.kiev.ua/doc/people/tubrezist.htm>.
30. Черенько С. О., Варицька А. О., Барбова А. І., Трофимова П. С. Контингенти хворих з груп високого ризику щодо мультирезистентного туберкульозу Rif⁺ за результатами обстеження хворих за допомогою Genexpert MTB/RIF // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2014. № 4 (19). – С. – 29–33.
 31. Україна. МОЗ. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги: наказ МОЗ України від 21.12.2012 р. № 1091. – 166 с.
 32. Україна. МОЗ. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги дорослим «Туберкульоз»: наказ МОЗ України від 04.09.2014 р. № 620. – 139 с.
 33. Bustin S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays // Journal of Molecular Endocrinology. – 2000. – Vol. 25. – P. 169–193.
 34. Cole S. T. Comparative and functional genomics of the Mycobacterium tuberculosis complex // J Microbiol. – 2002. – Vol. 148. – P. 2919–2928.
 35. Dumova M. A., Liashenko O. O., Poteiko P. I. et al. Genetic variation of Mycobacterium tuberculosis circulating in Kharkiv Oblast, Ukraine // BMC Infect. Dis. – 2011. – Vol. 11. – P. 77–87.
 36. Erali M., Palais R., Wittwer C.T. SNP genotyping by unlabeled probe melting analysis // Methods in Molecular Biology. – 2008. – Vol. 429. – P. 199–206.
 37. Fenner L., Malla B., Ninet B. et al. «PseudoBeijing»: evidence for convergent evolution in the direct repeat region of Mycobacterium tuberculosis // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, № 9. – P. 24737.
 38. Genotyping of triallelic SNPs using TaqMan PCR // Molecular and Cellular Probes. – 2007. – Vol. 21 (3). P. 171–176.
 39. Giegling I., Hartmann A. M., Möller H.J., Rujescu D. Anger- and aggression-related traits are associated with polymorphisms in the 5-HT-2A gene // Journal of Affective Disorders. – 2006. – Vol. 96 (1–2). – P. 75–81
 40. Hecker K., Roux K. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR // Biotechniques. – 1996. – Vol. 20 (3). – P. 478–485. PMID 8679209.
 41. Iwamoto T., Yoshida S., Suzuki K. et al. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on Mycobacterium tuberculosis strains predominated by the Beijing family // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – Vol. 272. – P. 282–283.
 42. Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR // Nat. Protoc. – 2006. – Vol. 1. – P. 1559–1582.
 43. Roux K. Using mismatched primer-template pairs in touchdown PCR // Biotechniques. – 1994. – Vol. 16 (5). – P. 812–814. PMID 8068332.
 44. Sharma N., Nautiyal S.C., Kumari S. et al. High Resolution Melt Curve Analysis- An Innovative Approach for Molecular Diagnosis // WebmedCentral Biotechnology. – 2013. – Vol. (3). WMC003998.
 45. Stepashina V. N., Ivanov I. Iu., Lipin M. Iu., Shemiakin I. G. Characteristics of Mycobacterium tuberculosis clinical strains genotype A1 // Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. – 2006. – Vol. 2. – P. 29–33.
 46. Supply P., Allix C., Lesjean S. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 12. – P. 4498–4510.
 47. VanGuilder H. D., Vrana K. E., Freeman W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis // Biotechniques. – 2008. – Vol. 44. – P. 619–626.
 48. WHO. Global Tuberculosis Control report. – Geneva, Switzerland: WHO, 2012. – 273 p.
 49. Zheltkova E., Raddy M. C., Malomanova N. et al. Typing of Mycobacterium tuberculosis cultures from Samara region by the variable number of tandem repeats // Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. – 2004. – Vol. 1. – P. 35–37.

Стаття надійшла до редакції 04.08.2016

О. М. Разнатовська¹, Г. В. Худяков¹, Н. А. Гріцова²

¹ Запорізький державний медичний університет

² Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ У ФТИЗИАТРІЇ

Мета дослідження – провести огляд літератури на предмет вивчення можливостей і досягнення молекулярно-генетичної діагностики туберкульозу в світі та Україні.

Матеріали та методи. Огляд літературних джерел.

Результати та обговорення. В основі молекулярно-генетичних методів діагностики лежить метод полімеразної ланцюгової реакції, різновидів якої дуже багато. Ці методи діагностики дозволяють вивчити види і генотипи мікобактерій туберкульозу, медикаментозну стійкість мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів. Вивчення генотипів мікобактерій туберкульозу дозволяють досліджувати шлях передачі туберкульозу, визначити повторне інфікування мікобактеріями і виявити фактори ризику специфічного захворювання, що дозволяє своєчасно досліджувати контакти і провести хіміопрофілактику.

Висновки. На сьогодні у світі, в тому числі й Україні, є значні досягнення в молекулярно-генетичній діагностиці туберкульозу. Враховуючи епідемію туберкульозу і темпи зростання хіміорезистентного туберкульозу в Україні, впровадження новітніх молекулярно-генетичних методів діагностики туберкульозу є важливим і необхідним завданням для фтизіатрії.

Ключові слова: молекулярно-генетичні методи діагностики, туберкульоз.

*E. N. Raznatovskaya*¹, *G. V. Chudyakov*¹, *N.A. Gricova*²

¹ *Zaporozhye State Medical University*

² *National Medical Academy of Postgraduate Education named after P.L. Shupyk*

MOLECULAR GENETIC METHODS OF DIAGNOSTICS AND THEIR USE IN PHTHISIOLOGY

Objective – a review of the literature on the subject of exploring the possibilities and achievements of molecular genetic diagnosis of tuberculosis in the world and Ukraine.

Materials and methods. The study of literature.

Results and discussion. The basis of molecular-genetic diagnostic methods is the polymerase chain reaction, which is a lot of varieties. These diagnostic methods allow to study species and genotypes of *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to anti-TB drugs. The study of genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* enable us to investigate transmission of tuberculosis, *Mycobacterium* determine the re-infection and to identify risk factors for specific diseases, that allows to investigate the contacts and conduct chemoprophylaxis.

Conclusions. In today's world, including Ukraine, there are significant advances in molecular genetic diagnosis of tuberculosis. Given the epidemic of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis rate of growth in Ukraine, the introduction of new molecular genetic methods for diagnosis of tuberculosis is an important and necessary task for phthisiology.

Key words: molecular genetic methods of diagnosis, tuberculosis.