

УДК 57.083.18:579.61:579.873.21:616.24-008.8.-078

ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ РАНЬОГО ВИЯВЛЕННЯ ШТАМІВ *Mycobacterium tuberculosis*, СТІЙКИХ ДО ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ

Ю.О. ЧЕРЕДНИК¹, О.В. АНОПРІЄНКО², Н.Г. ГОРОВЕНКО³, Ю.І. ФЕЩЕНКО¹

¹ ДУ «Національний інститут фізіотерапії і пульмонології імені Ф.Г. Яновського НАМН України»

Україна, 03680, Київ, вул. М. Амосова, 10

² Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного, 150

³ Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України

Україна, 03112, Київ, вул. Дорогожицька, 9

e-mail: yurach@ukr.net

Мета. Метою роботи було визначення найбільш ефективних та інформативних генетичних ПЛР-маркерів *Mycobacterium tuberculosis* для ідентифікації збудника у клінічних зразках для прискорення виявлення мультирезистентних штамів. **Методи.** 69 клінічних зразків від хворих на туберкульоз легень м. Києва проаналізовані за допомогою методу ПЛР з праймерами до 10 геномних маркерів і методами мікроскопії та посіву на культуральні середовища. ПЛР-позитивні зразки проаналізовані за допомогою ПЛР тест-системи «*Magicplex TB/MDR Real-time Test (ver.2.0)*» (Seegene Inc., Корея) на стійкість МБТ до протитуберкульозних препаратів (ПТП). **Результати.** 45 зразків мокротиння хворих на легеневий туберкульоз були ПЛР-позитивними, що складає 63,8 % від загальної кількості зразків і є ефективнішим показником, ніж виявлення збудника методом мікроскопії (39,1%) та культурального посіву (53,6%). ПЛР-маркери *Is-2* і *hsp65-3* показали високу ефективність виявлення МБТ (відповідно, 59,4% і 53,6%). З 45 ПЛР-позитивних зразків 12 (26,7%) виявили стійкість як до рифампіцину, так і до ізоніазиду, що є ознакою мультирезистентних штамів. **Висновки.** Комбінація декількох найбільш чутливих та інформативних маркерів у ПЛР-експрес-діагностиці для виявлення й ідентифікації МБТ підвищує ефективність визначення штамів, стійких до ПТП.

Ключові слова: *Mycobacterium tuberculosis*, ПЛР-діагностика, туберкульоз, мультирезистентність.

Вступ. Незважаючи на велику кількість нових тестів, розроблених у світі для діагностики туберкульозу та ідентифікації штамів *M.tuberculosis* (МБТ), продовжується робота з пошуку нових підходів та оптимізації вже існуючих стратегій виявлення і характеристики цього одного з найнебезпечніших патогенів людини [1, 2]. Ефективність ПЛР для виявлення МБТ у різному діагностичному матеріалі та за допомогою різних маркерів досліджувалася та була доведена у численних дослідженнях [2–4]. Зростання в усьому світі кількості мультирезистентних (МР) штамів, а також поява екстремально-резистентних до протитуберкульозних препаратів (ПТП) штамів робить найактуальнішим завданням на сучасному етапі прискорення виявлення таких стійких штамів МБТ

[5]. Низка комерційних тест-систем, що дозволяють виявляти моно- та мультирезистентні штами, з'явилася на ринку [1, 6]. Проте доцільність широкого використання у скринінгових дослідженнях та в регіонах із різною епідеміологічною ситуацією таких тест-систем ще потребує ретельного аналізу [6]. Економному й ефективному використанню цих систем сприяв би попередній ПЛР-аналіз на наявність ДНК МБТ у клінічних зразках за допомогою певних ПЛР-маркерів. Чутливість та специфічність ПЛР-систем на ці маркери є визначальними для ефективного визначення стійкості до ПТП.

Метою роботи було виявлення найефективніших і інформативних генетичних ПЛР-маркерів *M. tuberculosis* для ідентифікації збудника у клінічних зразках і прискорення виявлення штамів, резистентних до протитуберкульозних препаратів. Були обрані 10 маркерів з різною специфічністю щодо *M. tuberculosis*, і ефективність ПЛР на ці мішені була порівняна з ефективністю класичних культурального і мікроскопічного методів виявлення МБТ. На основі цього аналізу здійснено визначення стійкості збудника до ПТП.

Матеріали і методи

Клінічний матеріал. Зразки мокротиння були отримані від 69 хворих на легеневий туберкульоз (ЛТ) пацієнтів (42 чоловіки і 27 жінок), що проживають у м. Києві. Діагноз було встановлено згідно з наказом Міністерства охорони здоров'я України від 09.06.06 № 384 за даними рентгенологічного та клінічних обстежень, під час перебування пацієнтів у ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф.Г. Яновського НАМН України» в 2011 році. Середній вік пацієнтів складав $37,4 \pm 1,8$ року; мінімальний вік – 14 років, максимальний – 70 років. Серед обстежених хворих переважали особи до 35 років – 35 пацієнтів ($50,7 \pm 7,1\%$), 23 пацієнти

($33,3 \pm 5,7\%$) були віком від 35 до 50 років і 11 пацієнтів ($15,9 \pm 3,8\%$) – старше 50 років.

При надходженні хворого в стаціонар зразки мокротиння аналізували мікроскопічним (забарвлення за Цілем-Нільсенем) і мікробіологічними (посів на середовище Левенштейна-Йенсена) методами за стандартними методиками [7], а також молекулярно-генетичними методами. Усі хворі були розподілені на 4 групи залежно від результатів мікроскопічного (М) і культурального (К) досліджень. 26 зразків були негативними за результатами обох методів (група М–К–) і 21 зразок – позитивним (група М+К+). 16 зразків були негативними за результатами бактеріоскопії і позитивними за даними посіву (група М–К+). В 6 випадках зафіксовано позитивні дані бактеріоскопії і негативний результат культурального посіву (група М+К–).

Виділення ДНК. Попередню обробку мокротиння проводили розчином N-ацетил-L-цистеїну/NaOH. Виділення ДНК проводилось відповідно до інструкції виробника тест-системи «DNA extraction kit» (Seegene, Inc. Korea). Зразки ДНК накопичували і зберігали при -70 °С. Для ампліфікації використовували 5 мкл з 200 мкл супернатанту, що містив досліджувану ДНК.

ПЛР. Полімеразну ланцюгову реакцію виконували за допомогою Taq-полімерази (Fermentas) у 20 мкл реакційної суміші, що містила $10 \times$ буфер для полімерази, 300 мкМ dNTP, по 10 pmol прямого й зворотного праймерів (табл. 1.), 1 од. Taq-полімерази і досліджувану ДНК.

Праймери конструювали за допомогою програми Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, США). Для маркерів Is-1, Is-2 виконували одностадійну ПЛР. Для маркерів hsp65, hupB, mtp40, mpb64, groB і katG застосовували двостадійну ПЛР – дві послідовні реакції з використанням різних (heminested-ПЛР) або однакових пар

праймерів (табл. 1). Для мішеней IS6110 і *hsp65* аналізували кілька варіантів ПЛР – відповідно маркери Is-1, Is-2 та *hsp65-1*, *hsp65-2*, *hsp65-3*.

Реакцію виконували на ампліфікаторі 2720Tc (Applied Biosystems, США) з наступними параметрами циклу 95 °С – 5 хв (94 °С – 30 сек, 55 °С – 30 сек, 72 °С – 30 сек) × 35 циклів. Для nested-ПЛР з першої суміші відбирали 1 мкл і вносили у якости ДНК у другу реакційну суміш. Параметри циклу були 95 °С – 3 хв (94 °С – 30 сек, 60 °С – 30 сек, 72 °С – 30 сек) × 35 циклів. Температурні умови другої реакції для маркера *katG* були такими: 1 етап – 95 °С – 5 хв, 70 °С – 30 сек, 2 етап – 95 °С – 30 сек, 69 °С – 30 сек; 72 °С – 30 сек, зі зниженням на один градус в стадії аннелінгу у кожному циклі протягом 10 циклів, і 3 етап – (94 °С – 20 сек, 60 °С – 30 сек, 72 °С – 30 сек) × 35 циклів. Продукти ПЛР розділяли в агароз-

ному (1,5–2,5%) гелі з забарвленням бромистим етидієм, візуалізацією на УФ-трансліюмінаторі і подальшою архівацією за допомогою системи аналізу результатів BG62-A2010 Gel Doc system Felix 1010 (BioStep, Німеччина).

Визначення лікарської стійкості до рифампіцину та ізоніазиду проводили за допомогою двостадійної ПЛР згідно з протоколом до інструкції виробника «Magicplex TB/MDR Real-time Test (ver.2.0)» (Seegene Inc., Корея). Першу реакцію виконували на ампліфікаторі 2720Tc (Applied Biosystems, США), другу ПЛР проводили на 7500 Real-time PCR System, Version. 1.4 (Applied Biosystems, США).

Статистична обробка даних. Для визначення ступеня конкордантності між двома діагностичними методами (бактеріальний посів/ПЛР) та між різними ПЛР-маркерами, результати аналізували за до-

Таблиця 1. Послідовності праймерів, що застосовані для ідентифікації МБТ

Ген / мішень	Назви праймерів	Послідовності праймерів (5'-3')	Довж. прод. МБТ (п.н.) – маркер	Джер.
IS6110	Ins1	cgtgagggcatcgaggtggc	244 – Is-1	[8]
	Ins2 IS-ff	cgctagggctcggtgacaaa tcgaacggctgatgacaaaactc	213 – Is-2	[8]
<i>hsp65</i>	Зовн. 65F 65R	gatcgagctggaggatccgtac agctgcagcccaagggtgtt	380	
	Внутр. 65F-ех1 65F-in2 65R-in2	cgccgagctggtcaagaggtta aggtcaccgagaccctgctcaagg gggttggaactcctcgacgggtgatg	366 – <i>hsp65-1</i> 333 – <i>hsp65-2</i> 166 – <i>hsp65-3</i>	
	<i>katG</i>	Зовн. F463 R463 Внутр. k463-1 k463-2	ccgacgatgctggcactgacct cgctgtcgctaccacggaacg gggcatcagagacactcaatcccgatgcc tgccatgagacactcaa cccgatgcca	344 314 – <i>katG</i>
<i>mtp40</i>	F40 R40	tcgaccacgtcacgcccc cccgatagggaaatgctcggca	426 – <i>mtp40</i>	
<i>mpb64</i>	F64 R64	agcggccacatcgctcactc cggcgctatcgatacctgtgtc	174 – <i>mpb64</i>	
<i>hupB</i>	Зовн. <i>hupB-F</i> <i>hupB-R</i>	ggaggggtgggatgaacaaagcag gtatccgtgtgtcttgacctattg	645	[3]
	Внутр. <i>hupB-ff</i>	gcagccaagaaggttagcgaa	318 – <i>hupB</i>	
<i>rpoB</i>	Rpb-R Rpb-F	ggtagcggcttcgatgaac cgatcacaccgcagacgttg	317 – <i>rpoB</i>	

помогою Каппа-індексу. Показники ко-позитивності і ко-негативності аналізували за матрицею спряженості 2X2 (<http://www.biometrika.tomsk.ru/freq2.htm>; <http://www.vassarstats.net/kappa.html>).

Результати та обговорення

Обрані для аналізу маркери *Is-1*, *Is-2*, *65kDa-1*, *65kDa-2*, *65kDa-3*, *hupB*, *katG*, *groB*, *mpb64* і *mtp40* характеризуються дещо різною специфічністю щодо видів *M.tuberculosis* complex (МТК) (МТБ і 6 споріднених видів – патогенів людини і тварин), а отже, й інформативністю щодо можливої стратегії відбору штамів-кандидатів для виявлення наявності стійкості до ПТП [8–14]. Ефективність виявлення МБТ підвищується при застосуванні гніздової ПЛР (nested PCR). Ми застосовували напівгніздовий варіант ПЛР з одним внутрішнім праймером для геноспецифічних маркерів, що присутні у поодинокій копії у геномі *M.tuberculosis*: *65kDa-1*, *65kDa-2*, *65kDa-3*, *hupB*, *katG* та двостадійну ПЛР з однаковими праймерами для *groB*, *mpb64*, *mtp40*. Для маркерів на інерційну послідовність *Is-1* і *Is-2* застосовували одностадійну ПЛР.

У табл. 2 наведено результати визначення МБТ за допомогою обраних марке-

рів у клінічних зразках мокротиння хворих на легеневий туберкульоз, що були розподілені на 4 групи за даними аналізів мікроскопії (М) і культурального посіву (К). Метод мікроскопії, на відміну від культурального, належить до експрес-методу виявлення збудника захворювання, проте його чутливість значно нижча від посіву. Порівняно з бактеріоскопічним методом, який виявив 39,1% позитивних зразків (М+) з усіх 69 клінічних зразків, ПЛР-маркери продемонстрували більшу ефективність: від 59,4% для *Is-2* до 39,1% виявлення МБТ для *mpb64* (табл. 2). Порівняно з ефективністю методу посіву на культуральне середовище (53,6% виявлення МБТ) ПЛР-маркери *Is-2* і *hsp65-3* показали більшу або рівну ефективність виявлення МБТ (відповідно 59,4% і 53,6% позитивних зразків). Невиявлення МБТ методом ПЛР з високочутливими маркерами у порівнянні з культуральним посівом може пояснюватися олігобацилярністю клінічних зразків і ймовірнішим розподілом МБТ між аліквотами зразків, що йдуть на різні дослідження.

Ступінь конкордантності методів культурального посіву і ПЛР на різні генетичні маркери визначали з урахуванням Каппа-індексу (табл. 3). Для ПЛР з усіма маркера-

Таблиця 2. Виявлення МБТ у клінічних зразках за допомогою ПЛР до різних геномних маркерів (%)

Маркер	<i>hsp</i> 65-1	<i>hsp</i> 65-2	<i>hsp</i> 65-3	<i>katG</i>	<i>Is-1</i>	<i>Is-2</i>	<i>groB</i>	<i>hupB</i>	<i>mpb</i> 64	<i>mtp</i> 40
М+К+ n=21	95,2	100,0	100,0	95,2	95,2	100,0	95,2	95,2	85,7	95,2
М+К– n=6	16,7	83,3	83,3	66,7	66,7	83,3	16,7	33,3	16,7	66,7
М–К+ n=16	43,8	50,0	68,8	56,3	56,3	81,3	43,8	37,5	50,0	56,3
М–К– n=26	–	–	–	–	3,8	7,7	–	–	–	3,8
N=69	40,6	49,3	53,6	47,8	49,3	59,4	40,6	40,6	39,1	49,3

Примітки: М+ і М– позитивні і негативні результати аналізу методом мікроскопії; К+ і К– позитивні і негативні результати аналізу методом культурального посіву.

Таблиця 3. Порівняння ефективності ПЛР на різні маркери щодо виявлення МБТ посівом на культуральне середовище

Культ. посів	Is-1		Is-2		hsp65-1		hsp65-2		hsp65-3		katG		groV		hupB		mpb64		mpr40	
	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.
Поз.	29	8	34	3	27	10	29	8	32	5	29	8	27	10	26	11	26	11	29	8
Нег.	5	27	7	25	1	31	5	27	5	27	4	28	1	31	2	30	1	31	5	27
Спост.конк.	81,2%		85,5%		84,1%		81,2%		85,5%		82,6%		84,1%		81,2%		82,6%		81,1%	
Очік.конк.	49,9%		50,7%		49,3%		49,9%		50,3%		49,9%		49,3%		49,3%		49,2%		49,9%	
Каппа-інд. (К)	0,625		0,706		0,685		0,624		0,709		0,653		0,685		0,628		0,658		0,624	
Ко-позит.зр.	73,0%		91,9%		73,0%		78,4%		86,5%		78,4%		73,0%		70,3%		70,3%		78,4%	
Ко-негат.зр.	96,9%		78,1%		96,9%		84,4%		84,4%		87,5%		96,9%		93,7%		96,9%		84,4%	

Примітки: Поз. – позитивні; Нег. – негативні; Спост. конк. – спостережена конкордантність; Очік.конк. – очікувана конкордантність; Ко-позит. зр. – ко-позитивні зразки; Ко-негат. зр. – ко-негативні зразки; Культ. посів – культуральний посів.

Таблиця 4. Порівняння ПЛР-маркерів щодо IS-2

ПЛР-маркери	Is-1		hsp65-1		hsp65-2		hsp65-3		katG		groV		hupB		mpb64		mpr40	
	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.	Поз.	Нег.
Is-2	34	7	27	14	32	9	35	6	31	10	28	13	28	13	25	16	32	9
Поз.	0	28	1	27	2	26	2	26	2	26	0	28	0	28	2	26	2	26
Нег.	89,9%		78,3%		84,1%		88,4%		82,6%		81,2%		81,2%		73,9%		84,1%	
Спост.конкорд.	49,9%		48,2%		49,9%		50,7%		49,6%		48,2%		48,2%		47,9%		49,9%	
Очікув.конкорд.	0,7977		0,5801		0,682		0,7649		0,655		0,6361		0,6361		0,4988		0,682%	
Каппа-індекс (К)	82,9%		65,8%		78,1%		85,4%		75,2%		68,3%		68,3%		61,0%		78,1	
Ко-позит. зразки	100%		96,5%		92,9%		92,9%		92,9%		100%		100%		92,9%		92,9%	
Ко-негат. зразки																		

Примітки: Поз. – позитивні; Нег. – негативні; Спост. конкорд. – спостережена конкордантність; Очік. конкорд. – очікувана конкордантність; Ко-позит. зр. – ко-позитивні зразки; Ко-негат. зр. – ко-негативні зразки.

ми якісна інтерпретація цього показника відповідає «хорошому» рівню співпадіння ($0,61 < K \leq 0,80$). Найбільший відсоток ко-позитивних результатів показала ПЛР на один з маркерів інсерційного елементу IS6110 – Is-2. Проте hsp65-3 демонструє найвищий Каппа-індекс (0,709).

Порівняння ПЛР-маркерів щодо найефективнішого Is-2 наведено у табл. 4. Кількість ко-позитивних зразків була більшою для пари Is-2/hsp65-3, а ступінь конкордантності – для Is-2/Is-1 ($K = 0,7977$, найбільш близький до якісного критерію «відмінно» $0,81 < K \leq 0,99$). Тим не менше, ще ряд маркерів додавали від 1-го до 2-х додаткових позитивних зразків до виявлених за допомогою Is-2 (табл. 4). Цікаво, що один з цих додаткових ПЛР-позитивних зразків був позитивним за кількома маркерами, але не Is-1. Це може означати присутність штаму без інсерційного елементу IS6110. Таким чином, для 45 ПЛР-позитивних зразків мокротиння, що складало 63,8% від загальної кількості зразків, стало можливим прискорення як підтвердження діагнозу ТБ, так і встановлення стійкості до ПТП. Для 10,2% з цих ПЛР-позитивних зразків встановлення стійкості до ПТП за допомогою класичного культурального методу було би неможливим навіть протягом тривалого часу (1,5–2 місяці), якого потребує стандартна методика [7].

Усі ПЛР-позитивні зразки були проаналізовані за допомогою тест-системи «Magicplex TB/MDR Real-time Test (ver.2.0)» (Seegene Inc., Корея) на стійкість МБТ до протитуберкульозних препаратів рифампіцину (R) та ізоніазиду (H). Не мали стійкості, тобто були чутливими до обох препаратів, 23 зразки ($51,1 \pm 7,1\%$ ПЛР-позитивних зразків). Два зразки були монорезистентними до рифампіцину і 8 – до ізоніазиду. 12 зразків ($26,7 \pm 5,0\%$) мали стійкість як до рифампіцину, так і до ізоніазиду, що є ознакою МР-штамів. Загалом,

частка штамів з виявленою стійкістю до одного або двох препаратів складала 48,9%.

Ефективність ПЛР у аналізі клінічних зразків може коливатися в досить широких межах і залежати від таких факторів, як тип зразків (кров, сеча, інші), методу їх обробки, групи хворих, які підлягали аналізу, групи зразків (за результатами мікроскопічного і культурального аналізів), ефективності конкретних праймерів, специфічних компонентів ПЛР сумішей і інших факторів. Подальша оптимізація аналізу може вагомим підвищувати показники виявлення патогену. Проте у деяких випадках (наприклад, негативні на мікроскопію клінічні зразки) аналіз кількох зразків (мінімум три) одного пацієнта може бути рекомендовано [3]. ПЛР-тести з інсерційною послідовністю IS6110 як мішені характеризуються максимальною чутливістю у порівнянні з іншими маркерами завдяки великій кількості копій повтору в геномі більшості штамів МБТ. У деяких інших дослідженнях для маркера IS6110 було отримано схожі дані – 57,0% і 53,0% позитивних зразків [15, 16]. У дослідженнях із більшими показниками виявлення застосовували напівгніздову ПЛР або аналізували дещо відмінні вибірки [3, 17, 18]. Проте необхідно враховувати, що деякі популяції МБТ характеризуються наявністю певної частки штамів без цього елементу [19]. Ряд інших діагностичних маркерів МБТ можуть бути відсутні у певній частині штамів (hsp65 і mtp40), що призводить до фальш-негативних результатів при діагностиці [20]. Таким чином, якомога детальніша характеристика генотипової структури популяції МБТ необхідна для прогнозування результатів і вибору інформативних маркерів діагностики.

Вибір діагностичного маркера може бути зумовлений категорією хворих. Так, маркерам, що ефективно дискримінують види МТК *M. tuberculosis* і *M. bovis* (hsp65, mtp40), може бути надана перевага при діагностиці дитячого ТБ. Hsp65 можливо ви-

користати для групи хворих з підозрою на мікобактеріози, що викликаються нетуберкульозними мікобактеріями, які часто зустрічаються у пацієнтів з ВІЛ/СНІД. Для нетуберкульозних мікобактерій спектр стійкості до ПТП може відрізнятись, тому може бути необхідне застосування інших тест-систем виявлення стійкості до цих препаратів. Маркер *katG*, який може дозволити розділяти штами першої та другої/третьої принципівих генетичних груп МБТ, може бути корисний при прогнозуванні МР-штамів, оскільки відомо, що до першої групи належить сімейство W-Beijing найбільш еволюційно-успішних і вірулентних штамів МБТ, для яких у деяких регіонах світу було показано кореляцію з мультирезистентністю. Маркери на ген *groV* можуть бути корисними для паралельного виявлення МБТ і встановлення мутацій, що відповідають за стійкість до рифампіцину, методом секвенування.

Висновки

Комбінація кількох найчутливіших (наприклад IS6110, *hsp65*) і найінформативніших (наприклад *hsp65*, *mtp40*, *katG*) маркерів у ПЛР-експрес-діагностиці ТБ для виявлення й ідентифікації МБТ прискорює та підвищує ефективність визначення стійких до протитуберкульозних препаратів штамів. Перспективною є розробка комплексної стратегії ідентифікації МБТ методом ПЛР, яка б враховувала категорії хворих та форми захворювання і доповнювала стратегію генотипування штамів МБТ для ефективнішого моніторингу ситуації з захворюванням на туберкульоз в Україні.

Перелік літератури

1. Lawn S.D., Mwaba P., Bates M. et al. Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test // *Lancet Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 13. – P. 349–361.
2. Haldar S., Chakravorty S., Bhalla M. et al. Simplified detection of *Mycobacterium tuber-*

culosis in sputum using smear microscopy and PCR with molecular beacons // *J. Med. Microbiol.* – 2007. – Vol. 56. – P. 1356–1362.

3. Eing B.R., Becker A., Sohns A., Ringelmann R. Comparison of Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay with in-house PCR and culture for detection of *M. tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – Vol. 36. – P. 2023–2029.
4. Noordhoek G.T., Kolk A.H.J., Bjune G. et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories // *J. Clin. Microbiol.* – 1994. – P. 277–284.
5. ВОЗ. Доклад о глобальной борьбе с туберкулезом. 2012 г. http://www.who.int/tb/publications/global_report/ru/index.html
6. Pang Y., Xia H., Zhang Z. et al. Multicenter evaluation of Genechip for detection of Multidrug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* – 2013 – Vol.20. – P.11–21.
7. Наказ МОЗ України від 06.02.2002 №45 «Про затвердження інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції» / Складено під керівництвом Фещенко Ю.І., Журило О.А., Клименко М.Т. та ін. // Зб. норм.-директ. документів з охорони здоров'я. – 2002. – № 2. – С. 63–111.
8. McNabb A., Eisler D., Adie K. et al. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *mycobacterium* species isolated from clinical sources // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42. – P. 3000–3011.
9. Thierry D., Cave M.D., Eisenach K.D. et al. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – Vol. 18. – P. 188.
10. Ikononopoulos J.A., Gorgoulis V.G., Kastrinakis N.G. et al. Sensitive differential detection of genetically related mycobacterial pathogens in archival material // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2000. – Vol. 114. – P. 940–950.
11. Herrera E.A. and Segovia M. Evaluation of *mtp40* genomic fragment amplification for specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. – P. 1108–1113.
12. Prabhakar S., Mishra A., Singhal A. et al. Use of the *hupB* gene encoding a histone-like protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a target for detection and differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis* // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42. – P. 2724–2732.
13. Sreevatsan S., Sreevatsan S., Pan X. et al. Analysis of the *oxyR-ahpC* region in isoniazid-resistant and -susceptible *Mycobacterium*

- tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities // Antimicrob. Agents Chemother. – 1997. – Vol. 41. – P. 600–606.
14. Lee H., Bang H-E., Bai G-H. et al. Novel polymorphic region of the *rpoB* gene containing *Mycobacterium* species-specific sequences and its use in identification of mycobacteria // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – P. 2213–2218.
 15. Nolte F.S., Metchock B., McGowan J.E. et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31. – P. 1777–1782.
 16. Shawar R.M., el-Zaatari F.A., Nataraj A., Clarridge J.E. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two-step polymerase chain reaction and nonisotopic hybridization methods // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31, № 1. – P. 61–65.
 17. Montenegro S.H., Gilman R.H., Sheen P. et al. Improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Peruvian children by use of a heminested IS6110 polymerase chain reaction assay // Clin. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 36. – P. 16–23.
 18. Ogusku M.M., Salem J.I. Analysis of different primers used in the PCR method: diagnosis of tuberculosis in the State of Amazonas, Brazil // J. Bras. Pneumol. – 2004. – Vol. 30, № 4. – P. 343–349.
 19. Yuen L.K., Ross B.C., Jackson K.M., Dwyer B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31. – P. 1615–1618.
 20. Vera-Cabrera L., Hernandez-Vera M.A., Welsh O. et al. Phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis* is a preferential locus for IS6110 transposition // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 39. – P. 3499–3504.

Представлено Л.А. Лівшиць і Ю.В. Вагіним
Надійшла 24.05.2013

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ
ДЛЯ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ ШТАММОВ
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
УСТОЙЧИВЫХ К ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ
ПРЕПАРАТАМ

Ю.О. Чередник¹, О.В. Аноприенко²,
Н.Г. Горovenko³, Ю.И. Фещенко¹

¹ ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии имени Ф.Г. Яновского АМН Украины»
Украина, 03680, Киев, ул. Н. Амосова, 10

² Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины

Украина, 03680, Киев, ул. Заболотного, 150

³ Национальная медицинская академия после-
дипломного образования имени П.Л. Шупика
МОЗ Украины

Украина, 03112, Киев, ул. Дорогожицкая, 9
e-mail: yurach@ukr.net

Цель. Целью работы было определение наиболее эффективных и информативных генетических ПЦР-маркеров *Mycobacterium tuberculosis* для идентификации возбудителя ТБ в клинических образцах, для сокращения сроков выявления мультирезистентных штаммов МБТ. **Методы.** 69 клинических образцов от больных туберкулезом легких г. Киева были проанализированы с помощью метода ПЦР с праймерами к 10 геномным маркерам, а также методами микроскопии и посева на культуральные среды. ПЦР-положительные образцы были проанализированы с помощью ПЦР тест-системы «Magixplex TB / MDR Real-time Test (ver.2.0)» (Seegene Inc., Корея) на устойчивость МБТ к противотуберкулезным препаратам. **Результаты.** 45 образцов мокроты больных легочным туберкулезом (63,8% от общего количества образцов) были ПЦР-позитивными, что является более эффективным показателем, чем выявление возбудителя методом микроскопии (39,1%) и культурального посева (53,6%). ПЦР-маркеры *Is-2* и *hsp65-3* показали высокую эффективность детекции МБТ (соответственно, 59,4% и 53,6%). Из 45 ПЦР-положительных образцов 12 (26,7%) выявили стойкость как к рифампицину, так и к изониазиду, что является признаком мультирезистентных штаммов. **Выводы.** Применение в ПЦР экспресс-диагностике нескольких наиболее чувствительных и информативных маркеров

для обнаружения и идентификации МБТ повышает эффективность определения штаммов, устойчивых к ПТП.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, ПЦР-диагностика, туберкулез, мультирезистентность.

ASSESSMENT OF GENETIC MARKERS
FOR EARLY DETECTION
OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
STRAINS RESISTANT TO ANTI-TB DRUGS

Yu.O. Cherednyk¹, O.V. Anopriyenko²,
N.G. Gorovenko³, Yu.I. Feschenko¹

¹ SO «F.G. Yanovskyi National institute
of phthiology and pulmonology of NAMS
of Ukraine»

Ukraine, 03680, Kyiv, N. Amosova str., 10

² Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS
of Ukraine

Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 150

³ P.L. Shupyk National Medical Academy
of Postgraduate Education of NAMS of Ukraine

Ukraine, 03112, Kyiv, Dorogozhytska str., 9
e-mail: yurach@ukr.net

Aim. The aim was to determine the most effective and informative PCR-markers of *Mycobacterium tuberculosis* for identification of pathogen in clinical samples to accelerate

detection of multidrug-resistant strains.

Methods. The 69 clinical samples from patients with pulmonary tuberculosis living in Kyiv (Ukraine) were analyzed by PCR with primers to 10 genomic markers and methods of microscopy and seeding on culture medium. PCR-positive samples were analyzed by PCR test system «Magicplex TB/MDR Real-time Test (ver.2.0)» (Seegene Inc., Korea) for resistance to antituberculous drugs. **Results.** 45 sputum samples from patients with pulmonary tuberculosis were PCR-positive, accounting for 63.8% of all samples that is more efficient rate than pathogen detection by microscopy (39.1%) and cultural seeding (53.6%). PCR markers *Is-2* and *hsp65-3* showed high efficiency of *M. tuberculosis* detection (59.4% and 53.6%, respectively). Of the 45 PCR-positive specimens 12 (26.7%) showed resistance to both rifampicin and isoniazid, indicating the multidrug-resistant strains. **Conclusions.** Combination of several most sensitive and informative markers in PCR express-diagnostics for detection and identification of *M. tuberculosis* increases the efficiency of sequential determining of the strains resistant to anti-TB drugs.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, diagnostics, tuberculosis, PCR, multidrug resistance.