

# ВИКОРИСТАННЯ НОВОЇ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ СИСТЕМИ GENOTYPE І РІДКОГО ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА MIDDLEBROOK 7H9 В СИСТЕМІ VASTES MGIT 960 ДЛЯ ШВИДКОЇ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ І ВИЗНАЧЕННЯ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ СТІЙКОСТІ МІКОБАКТЕРІЙ ДО ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ 1-ГО ТА 2-ГО РЯДУ

**А. І. Барбова<sup>1</sup>, О. А. Журило<sup>1</sup>, П. С. Трофімова<sup>1</sup>, Н. М. Алієва<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України», Київ

<sup>2</sup>Полтавський обласний клінічний протитуберкульозний диспансер, Полтава

**Резюме.** Мета досліджень — підвищення ефективності і стандартизація методів лабораторної діагностики туберкульозу шляхом використання нової молекулярно-генетичної системи GenoType і рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі VASTES MGIT 960.

**Матеріали і методи.** Досліджували клінічні зразки мокротиння від хворих на туберкульоз легень. Застосована система GenoType. Для культивування мокротиння використано рідке живильне середовище — бульйон Middlebrook 7H9 в системі VASTES MGIT.

**Результати та їх обговорення.** Дві системи дали позитивний результат при дослідженні 756 (95,5 %) штамів мікобактерій, що були виділені в системі VASTES MGIT 960, утворювали корд-фактор та були позитивними за результатами ідентифікаційного тесту ID MTB MGIT і вони віднесені до мікобактерій туберкульозного комплексу. 36 (4,5 %) проб з позитивних пробірок MGIT мали негативний результат. Було встановлено, що 18 (2,3 %) штамів мікобактерій належали до *M. avium-intracellulare*, 12 (1,5 %) культур мікобактерій були віднесені до *M. kansasii*, 6 (0,7 %) культур було ідентифіковано, як *M. fortuitum*. Результати молекулярного дослідження МС мікобактерій щодо профілю резистентності INH+RIF співпали в 95,5 % (894 штами) з результатами фенотипічного тестування методом пропорцій. При наявності мутацій, що асоційовані з резистентністю до INH, лише в 93,1 % випадках спостерігалась МС *M. tuberculosis* до INH при проведенні ТМЧ в рідкому середовищі Middlebrook 7H9. При наявності мутації в генах, що відповідають за наявність стійкості до Q, в рідкому середовищі лише 288 (90,6 %) штамів *M. tuberculosis* мали МС до Ofx. Штами мікобактерій, в ДНК яких були виявлені мутації в генах, асоційованих з МС до аміноглікозидів/циклічних пептидів, в 299 (94,0 %) випадках були стійкими до Am та в 302 (94,9 %) випадках були стійкими до Sm за результатами ТМЧ в системі VASTES MGIT 960. При визначенні стійкості для E були виявлені найбільші розбіжності між результативністю молекулярно-генетичного і фенотипічного методів дослідження — лише 206 (64, 2 %) штамів *M. tuberculosis* були стійкими за результатами аналізу в системі VASTES MGIT 960. **Висновки.** Система GenoType дозволяє швидко проводити ідентифікацію мікобактерій та диференціацію нетуберкульозних штамів мікобактерій. Результати молекулярно-генетичного дослідження мультирезистентності в системі GenoType MTBDRplus співпадають в 95,5 % з результатами фенотипічного тестування методом пропорцій. Використання ДНК-стрип технології GenoType для визначення мутацій в генах мікобактерій, що відповідають за МС до ПТП, обов'язково потребує паралельної постановки ТМЧ в рідкому середовищі.

**Ключові слова:** туберкульоз, етіологічна діагностика, антибіотикорезистентність.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ GENOTYPE И ЖИДКОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ MIDDLEBROOK 7H9 В СИСТЕМЕ VASTES MGIT 960 ДЛЯ БЫСТРОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ К ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ПРЕПАРАТАМ 1-ГО И 2-ГО РЯДА**

**А. И. Барбова, А. А. Журило,  
П. С. Трофимова, Н. Н. Алиева**

**Резюме.** Цель исследований — повышение эффективности и стандартизация методов лабораторной диагностики туберкулеза путем использования

**USE OF THE NEW MOLECULAR GENETIC SYSTEM " GENOTYPE" AND MIDDLEBROOK 7H9 LIQUID NUTRITION MEDIUM IN THE VASTES MGIT 960 SYSTEM FOR QUICK DIAGNOSTICS OF TUBERCULOSIS AND DETERMINATION OF MEDICINAL STABILITY OF MICROBACTERIA TO ANTITUBERCULOSIS PREPARATIONS 1ST AND 2ND ROW**

**AI Barbov, AA Zhurilo,  
P. S. Trofimov, N. N. Alieva**

**Summary.** The aim of the research is to increase the effectiveness and standardization of methods for laboratory diagnosis of tuberculosis by using the new

новой молекулярно-генетической системы GenoType и жидкой питательной среды Middlebrook 7H9 в системе VASTES MGIT 960.

Материалы и методы. Исследовали клинические образцы мокроты от больных туберкулезом легких. Для культивирования мокроты использована жидкая питательная среда – бульон Middlebrook 7H9 в системе VASTES MGIT.

Результаты и их обсуждение. Обе системы дали положительный результат при исследовании 756 (95,5 %) штаммов микобактерий, которые были выделены в системе VASTES MGIT 960, образовывали корд-фактор, были положительными по результатам идентификационного теста ID MTB MGIT и были отнесены к микобактериям туберкулезного комплекса. 36 (4,5 %) проб из положительных пробирок MGIT имели негативный результат. По результатам молекулярно-генетической идентификации микобактерий нетуберкулезного комплекса было установлено, что 18 (2,3 %) штаммов микобактерий принадлежали к *M. avium-intracellulare*, 12 (1,5 %) культур микобактерий были отнесены к *M. kansasii*, 6 (0,7 %) культур было идентифицировано, как *M. fortuitum*. Результаты молекулярного исследования ЛУ микобактерий относительно профиля резистентности INH+RIF совпали в 95,5 % (894 штамма) с результатами фенотипического тестирования методом пропорций. При наличии мутаций, которые ассоциированы с резистентностью к INH, лишь в 93,1 % случаях наблюдалась ЛУ *M. tuberculosis* к INH при постановке ТМЧ в жидкой среде Middlebrook 7H9. При наличии мутаций в генах, которые отвечают за устойчивость к Q, в жидкой среде лишь 288 (90,6 %) штаммов *M. tuberculosis* имели MC к Ofx. Штаммы микобактерий, в ДНК которых были выявлены мутации в генах, ассоциированных с MC к аміноглікозидам/циклических пептидам, в 299 (94,0 %) случаях были устойчивы к Am и в 302 (94,9 %) случаях были устойчивыми к Cm по результатам ТМЧ в системе VASTES MGIT 960. При определении устойчивости к E были выявлены самые большие расхождения между результативностью молекулярно-генетического и фенотипического методов исследования – лишь 206 (64,2 %) штаммов *M. tuberculosis* были устойчивыми по результатам анализа в системе VASTES MGIT 960.

Выводы. Система GenoType позволяет быстро проводить идентификацию микобактерий и дифференциацию нетуберкулезных штаммов микобактерий. Результаты молекулярно-генетического исследования мультирезистентности в системе GenoType MTBDRplus совпадают в 95,5 % с результатами фенотипического тестирования методом пропорций. Использование ДНК-стрип технологии GenoType для выявления мутаций в генах микобактерий, которые отвечают за ЛУ к ПТП, обязательно нуждается в параллельной постановке ТМЧ в жидкой среде.

**Ключовые слова:** туберкулез, этиологическая диагностика, антибиотикорезистентность.

molecular genetic system GenoType and the Middlebrook 7H9 liquid medium in the VASTES MGIT 960 system. Materials and methods. Clinical samples of sputum from patients with pulmonary tuberculosis were investigated. For cultivation of sputum, a liquid nutrient medium is used - Middlebrook 7H9 broth in the VASTES MGIT system.

Results and its discussion. Both systems gave a positive result in the study of 756 (95.5%) strains of mycobacteria that were isolated in the VASTES MGIT 960 system, formed a cord factor, were positive according to ID MTB MGIT and were attributed to mycobacteria of the tuberculosis complex. 36 (4.5%) samples from positive MGIT tubes had a negative result. According to the results of molecular genetic identification of mycobacteria of a nontuberculous complex, 18 (2.3%) strains of mycobacteria belonged to *M. avium-intracellulare*, 12 (1.5%) of mycobacterial cultures were attributed to *M. kansasii*, 6 (0,7%) of cultures was identified as *M. fortuitum*. The results of a molecular study of LU of mycobacteria relative to the resistance profile of INH + RIF coincided in 95.5% (894 strains) with the results of phenotypic testing by the proportional method. In the presence of mutations that are associated with resistance to INH, only *M. tuberculosis* to INH was observed in 93.1% of patients with TMH in a Middlebrook 7H9 liquid medium. In the presence of mutations in the genes that are responsible for resistance to Q, only 288 (90.6%) strains of *M. tuberculosis* in the liquid medium had MS to Ofx. Mycobacterial strains with mutations in the genes associated with MC to aminoglycosides/cyclic peptides in the DNA of 299 (94.0%) cases were resistant to Am and in 302 (94.9%) cases were resistant to Cm by results TMS in the VASTES MGIT 960 system. In determining resistance to E, the greatest discrepancies between the efficacy of the molecular genetic and phenotypic methods of investigation were revealed - only 206 (64,2%) strains of *M. tuberculosis* were stable from the analysis of the VASTES MGIT 960 system.

Conclusions. The GenoType system allows rapid identification of mycobacteria and differentiation of non-tubercular strains of mycobacteria. The results of the molecular genetic study of multiresistance in the system GenoType MTBDRplus coincide in 95.5% with the results of phenotypic testing by the method of proportions. The use of the GenoType DNA strip for the detection of mutations in the mycobacterial genes, which are responsible for LT to PTP, necessarily requires a parallel formulation of TMP in a liquid medium.

**Key words:** tuberculosis, etiologic diagnosis, antibiotic resistance.

Адреса для листування:

Барбова Ганна Іванівна

ДУ «Національний Інститут фізіатрії і пульмонології

ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»

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

**ВСТУП**

Використання сучасних генотипічних і фенотипічних методів діагностики туберкульозу в практиці роботи мережі бактеріологічних лабораторій протитуберкульозних закладів України є необхідним для максимального скорочення термінів індикації і ідентифікації мікобактерій та визначення їх медикаментозної стійкості (МС) до протитуберкульозних препаратів (ПТП). Дуже важливим є розробка алгоритмів їх комбінованого застосування та впровадження в рутинну діагностичну практику, що істотно підвищить раннє виявлення хворих, у тому числі з малими формами легеневого та позалегенового туберкульозу. Такі методи є перспективними при обстеженні дітей, контактних і олігобацилярних хворих [2, 4, 6, 7, 9].

Метою досліджень було підвищення ефективності і стандартизація методів лабораторної діагностики туберкульозу шляхом використання нової молекулярно-генетичної системи GenoType і рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960.

**ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

Досліджували клінічні зразки мокротиння від хворих на туберкульоз легень, що лікувались в стаціонарі Інституту. Робота виконана за кошти держбюджету.

Для деконтамінації, розрідження і концентрації мікобактерій у мокротинні використовували реагент BBL Мусоргер з NALC-NaOH і додавали рівний об'єм його до зразків мокротиння. Інкубували пробірки при кімнатній температурі протягом 15 хв. Центрифугували пробірки зі зразками при прискоренні 3000 g протягом 20 хв., зливали супернатант із пробірок, потім до осаду додавали 0,8 – 1,0 мл стерильного фосфатного буферу та по 0,5 мл засівали в пробірки MGIT. Для збагачення рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 використовували реагент PANTA, який після розведення по 0,8 мл додавали до кожної пробірки MGIT безпосередньо перед засівом матеріалу. Пробірки поміщали в систему ВАСТЕС MGIT 960 та інкубували. Для фенотипічної ідентифікації виділених штамів мікобактерій застосований імунохроматографічний тест (ID МТВ MGIT) [1, 3, 4, 10, 13].

В роботі використана молекулярно-генетична система GenoType з різними наборами реагентів:

- набори GenoType Mycobacteria Direct і GenoType Mycobacteria CM застосовували для визначення комплексу *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis subsp.*, *M. bovis BCG*, *M. capre*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. pinnipedii*) і чотирьох клінічно значимих нетуберкульозних видів мікобактерій: *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. avium*. Принцип роботи набору заснований на реакції NASBA і DNA • STRIP-технології;
- набір GenoType MTBRplus використовували для визначення стійкості до рифампіцину (RIF) і ізоніазиду (INH) в позитивних зразках мокротиння або в негативних клінічних і культуральних зразках. Виявлення стійкості до RIF можливо при детекції найбільш значимих асоційованих

мутацій гена *groB*, (кодує  $\beta$ -субодиницю РНК полімерази). Для виявлення стійкості до INH, досліджують ген *katG*, (кодує каталазу, пероксидазу) і ділянку перегляду в гені *inhA* (кодує NADH енoїл АСР редуктазу);

- набір GenoType MTBRsl був застосований для визначення стійкості до фторхінолонів (Q), аміноглікозидів/ циклічних пептидів, а також етамбутолу (E) в позитивних зразках мокротиння. Визначення МС до Q можливо при детекції найбільш значимих асоційованих мутацій гена *gugA* (кодує  $\alpha$ -субодиницю ДНК гірази). Для виявлення МС до аміноглікозидів/циклічних пептидів досліджується ген 16S rPHK 9 (*rrs*) і для виявлення МС до E – ген *embB* відповідно (ці гени разом з генами *embA* і *embC* кодують арабінозилтрансферазу) [5, 11, 12].

Процедура проведення тестування підрозділялася на три етапи: виділення ДНК із дослідного матеріалу, мультиплексна ампліфікація з біотинілікованими праймерами і реверс-гібридизація.

Після хімічної денатурації, одноланцюгові амплікони зв'язуються із зондами (гібридизація). Високо специфічне зв'язування комплементарних ланцюгів ДНК зумовлено жорсткими умовами, які створюються в результаті оптимальної комбінації складу буфера і температури. Таким чином, зонди можуть вірогідно розпізнавати кілька варіантів послідовностей в ділянці гена, що тестується. Кон'югована стрептавідином лужна фосфатаза зв'язується з біотином ампліконів за допомогою фрагментів стрептавідина. У підсумку, лужна фосфатаза перетворює доданий субстрат у пофарбовану форму, що стає видимою на мембрані стрипів, як кольоровий преципітат. Оцінка проводиться комп'ютерною програмою автоматично.

Зберігання даних досліджень та їх математична обробка виконувались за допомогою ліцензійних програмних продуктів, які входять до пакету Microsoft Office Professional 2000, ліцензія Russian Academic OPEN NoLevel № 17016297.

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

При роботі з системою гібридизації з типоспецифічними зондами GenoType використовували набори реагентів, які призначені для дослідження зразків мокротиння позитивних за мазком, оскільки, за технічними параметрами для ефективної роботи існуюча версія системи потребує лише такі зразки клінічного матеріалу. Дана тест-система дозволяє виділити ДНК мікобактерій та провести їх ідентифікацію. Для дослідження було відібрано 684 зразки мокротиння з позитивними результатами бактеріоскопії при забарвленні за методом Циля-Нільсена. В дослідженні використовували зразки концентрованого і неконцентрованого мокротиння.

Після проведення всіх етапів дослідження були отримані наступні результати молекулярної ідентифікації мікобактерій на рівні ДНК: в 642 (93,9 %) зразках було підтверджено наявність комплексу *M. tuberculosis*, в 42 (6,2 %) зразках було виявлено мікобактерії нетуберкульозного комплексу: в 24 (3,5 %) випадках – *M. avium-intracellulare*, в 12

(1,8 %) випадках – *M. fortuitum*, а в 6 випадках (0,9 %) спостерігалась *M. kansasii*. Результати досліджень за допомогою системи гібридизації з типоспецифічними зондами GenoType представлені в табл. 1.

лежать до комплексу *M. tuberculosis* і потребують подальшої ретельної ідентифікації.

Всі культури мікобактерій, що були отримані з позитивних пробірок MGIT досліджувалися

Таблиця 1

Результати досліджень зразків мокротиння за допомогою молекулярно-генетичної системи GenoType, n = 684, (M ± m) %

Клінічний матеріал	Кількість зразків, що містять ДНК мікобактерій							
	<i>M. tuberculosis-complex</i>		<i>M. avium-intracellulare</i>		<i>M. fortuitum</i>		<i>M. kansasii</i>	
	абс	M ± m	абс	M ± m	абс	M ± m	абс	M ± m
Мокротиння	642	93,9 ± 0,9*	24	3,5 ± 0,7*	12	1,8 ± 0,5*	6	0,9 ± 0,4*
Концентроване мокротиння	642	93,9 ± 0,9*	24	3,5 ± 0,7*	12	1,8 ± 0,5*	6	0,9 ± 0,4*

Примітка. \* – p > 0,05 при порівнянні результатів позитивності зразків неконцентрованого та концентрованого мокротиння в системі GenoType.

З даних табл. 1 видно, що результати молекулярно-генетичних досліджень зразків неконцентрованого і концентрованого мокротиння за допомогою системи GenoType не відрізнялись між собою (p > 0,05).

В подальшому нами були проведені порівняльні дослідження щодо діагностичної ефективності молекулярно-генетичного методу в системі гібридизації з типоспецифічними зондами GenoType і культурального методу діагностики за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960. Результати досліджень представлені в табл. 2.

за допомогою імунохроматографічного ідентифікаційного тесту ID МТВ MGIT. За результатами дослідження виявилось, що 756 (95,5 %) культур, які мали корд-фактор, були ідентифіковані, як *M. tuberculosis-complex*, 36 (4,5 %) культур, що не утворювали корд-фактор, віднесені до мікобактерій нетуберкульозного комплексу.

На наступному етапі всі культури мікобактерій були досліджені за допомогою молекулярно-генетичної системи GenoType. Результати досліджень представлені в табл. 3.

Таблиця 2

Результати порівняльного дослідження культурального і молекулярно-генетичного методу діагностики туберкульозу позитивних за результатами бактеріоскопії зразків мокротиння, (M ± m) %

Методи дослідження	Кількість зразків мокротиння	
	Абс	M ± m
ВАСТЕС MGIT(+)	846	100
GenoType(+)	846	100

Примітки: (+) – позитивний результат.

Нами досліджено 846 зразків мокротиння з позитивними результатами бактеріоскопії.

З табл. 2 видно, що всі зразки мокротиння, що давали ріст при дослідженні методом посіву в системі ВАСТЕС MGIT 960, мали позитивний результат в системі GenoType, щодо наявності ДНК *M. tuberculosis-complex*. Діагностична цінність двох методів діагностики була дуже високою та складала 100 %.

За допомогою молекулярно-генетичної системи GenoType нами були проведені дослідження з ідентифікації 792 клінічних ізолятів мікобактерій, які були отримані в рідкому середовищі Middlebrook 7Н9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 із мокротиння пацієнтів з новими випадками.

При посіві клінічних ізолятів мікобактерій на 5,0% кров'яний агар росту неспецифічної мікрофлори не спостерігалось, що свідчило про виділення чистої культури мікобактерій. При мікроскопії вмісту позитивних пробірок MGIT була підтверджена кислотостійкість виділених бактерій, корд-фактор був визначений в 756 (95,5 %) випадках, в 36 (4,5 %) позитивних пробірках MGIT при мікроскопії були виявлені окремі кислотостійкі бактерії (КСБ), які не утворювали корд-фактор. Це дало нам підставу припустити, що дані культури мікобактерій не на-

Таблиця 3  
Результати дослідження клінічних ізолятів мікобактерій, що були виділені в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960, (M ± m) %

Методи дослідження	Кількість штамів мікобактерій	
	абс	M ± m
Корд-фактор (+) ID МТВ MGIT (+) GenoType MTBDRplus (+)	756	95,5 ± 0,7*
Корд-фактор (-) ID МТВ MGIT (-) GenoType MTBDRplus (+)	36	4,5 ± 0,7*
Всього	792	100

Примітки:

1. (+) – позитивний результат.

2. (-) – негативний результат.

3. \* – p < 0,01 при порівнянні кількості зразків мокротиння з позитивними результатами фенотипічної ідентифікації і молекулярно-генетичних досліджень та кількості зразків мокротиння з негативними результатами фенотипічної ідентифікації і позитивними результатами аналізу в системі GenoType MTBDRplus.

З табл. 3, видно, що 756 (95,5 %) штамів мікобактерій, які були виділені в системі ВАСТЕС MGIT 960, утворювали корд-фактор та були позитивними за результатами ідентифікаційного тесту ID МТВ MGIT, при проведенні молекулярно-генетичних досліджень в системі GenoType були ідентифіковані як *M. tuberculosis-complex*.

За результатами досліджень з використанням ідентифікаційного тесту ID MTB MGIT 36 (4,5 %) проб з позитивних пробірок MGIT мали негативний результат. Ці мікобактерії не утворювали корд-фактор, тому їх можна було віднести до комплексу негуберкульозних мікобактерій. Тому було проведено їх дослідження в системі GenoType з наборами GenoType Mycobacteria Direct і GenoType Mycobacteria CM, які дають можливість ідентифікувати клінічно-значимі ізоляти мікобактерій за межами туберкульозного комплексу.

За результатами молекулярно-генетичної ідентифікації було встановлено, що з 36 культур мікобактерій 18 (2,3 %) належали до *M. avium-intracellulare*, 12 (1,5 %) культур мікобактерій були віднесені до *M. kansasii*, 6 (0,7 %) культур було ідентифіковано, як *M. fortuitum*.

Враховуючі те, що для призначення ефективної терапії хворим на туберкульоз, необхідним є не тільки результат про наявність *M. tuberculosis-complex* в організмі пацієнта, найбільш вагомим є отримання в короткий термін профілю медикаментозної резистентності виділених мікобактерій, нами були розпочаті дослідження щодо обґрунтування використання молекулярно-генетичної системи GenoType для швидкого визначення МС мікобактерій.

Ці дослідження були спрямовані на визначення МС *M. tuberculosis-complex* в системі GenoType та наборами реагентів GenoType MTBDRplus та GenoType MTBDRsl для визначення медикаментозної резистентності до INH і RIF, Q, аміноглікозидів/циклічних пептидів та Е відповідно.

За результатами фенотипічного тестування на МС *M. tuberculosis* в рідкому середовищі були відібрані 936 мультирезистентних штамів *M. tuberculosis*, що циркулювали серед хворих на туберкульоз з різними категоріями та випадками захворювання. Результати досліджень представлені в табл. 4.

Таблиця 4

**Результати порівняльного аналізу мультирезистентних штамів *M. tuberculosis* за допомогою молекулярно-генетичної системи GenoType MTBDRplus і системи BACTEC MGIT 960, (M ± m) %**

Методи дослідження	Кількість штамів	
	абс	M ± m
GenoType MTBDRplus RIF (+) INH (+) BACTEC MGIT RIF (+) INH (+)	894	95,5 ± 0,7*
GenoType MTBDRplus RIF (+) INH (+) BACTEC MGIT RIF (-) INH (-)	42	4,5 ± 0,6*
Всього	936	100

Примітки:

1. (+) – позитивний результат.

2. (-) – негативний результат.

3. \* –  $p < 0,01$  при порівнянні показників мультирезистентності, виявлених фенотипічним і генотипічним методами одночасно та результатів мультирезистентності, виявленими за результатами молекулярно-генетичного дослідження і негативних результатів мультирезистентності методом культуральної діагностики.

Результати молекулярного дослідження МС мікобактерій щодо профілю резистентності MDR-штамів, тобто до INH і RIF одночасно співпали в 95,5 % (894 штами) з результатами фенотипічного

тестування методом пропорцій в системі BACTEC MGIT 960.

Результати визначення монорезистентності до RIF, або в комбінації з іншими ПТП, крім INH за допомогою двох методів не відрізнялись між собою і повністю співпадали (табл. 5).

Таблиця 5

**Результати порівняльного аналізу медикаментозної стійкості до рифампіцину за допомогою молекулярно-генетичної системи GenoType і набору MTBDRplus і системи BACTEC MGIT 960, (M ± m) %**

Методи дослідження	Кількість штамів	
	абс	M ± m
GenoType MTBDRplus RIF (+) BACTEC MGIT RIF (+)	102	100
Всього	102	100

Примітки:

1. (+) – позитивний результат.

2. (-) – негативний результат.

За допомогою набору GenoType MTBDRplus нами було досліджено 348 штамів МБТ з резистентністю до INH і співставленні з результатами тесту медикаментозної чутливості (ТМЧ) в системі BACTEC MGIT 960. В табл. 6 представлені результати порівняння результатів фенотипічного та генотипічного методів щодо резистентності до INH.

Таблиця 6

**Результати порівняльного аналізу медикаментозної стійкості до ізоніазиду за допомогою системи GenoType і набору MTBDRplus та системи BACTEC MGIT 960, (M ± m) %**

Методи дослідження	Кількість штамів	
	абс	M ± m
GenoType MTBDRplus INH (+) BACTEC MGIT INH (+)	324	93,1 ± 1,4*
GenoType MTBDRplus INH (+) BACTEC MGIT INH (-)	24	6,9 ± 1,3*
Всього	348	100

Примітки:

1. (+) – позитивний результат.

2. (-) – негативний результат.

3. \* –  $p < 0,01$  при порівнянні показників резистентності до INH, виявлених за допомогою культурального методу і молекулярно-генетичної системи GenoType та показників резистентності до INH, виявлених лише за допомогою молекулярно-генетичного методу.

Виявлено, що при наявності мутацій, які асоційовані з резистентністю до INH, лише в 93,1 % випадках спостерігалась МС *M. tuberculosis* до INH при проведенні ТМЧ в рідкому середовищі Middlebrook 7H9.

Виконані дослідження щодо порівняльного вивчення показників резистентності до ПТП 2-го ряду, виявлених за допомогою молекулярно-генетичного і фенотипічного методів. Для цього відібрано 318 штамів *M. tuberculosis*, які за результатами вивчення МС в системі GenoType із застосуванням набору GenoType MTBDRsl, мали резистентність до групи Q, аміноглікозидів/циклічних пептидів та Е. Для визначення МС фенотипічним методом до офлоксацину (Ofx), амікацину (Am), капреоміцину (Cm) та Е було застосовано рідке середовище в системі BACTEC MGIT 960.

Результати порівняльних досліджень представлені в табл. 7.

З табл. 7 видно, що при наявності мутації в генах, що відповідають за наявність стійкості до Q, в рідкому середовищі лише 288 (90,6 %) штамів *M. tuberculosis* мали МС до Ofx. Штами мікобактерій, в ДНК яких були виявлені мутації в генах, асоційованих з МС до аміноглікозидів/циклічних пептидів, в 299 (94,0 %) випадках були стійкими до Am та в 302 (94,9 %) випадках були стійкими до Cm за результатами ТМЧ в системі ВАСТЕС MGIT 960. При визначенні стійкості для E були виявлені найбільші розбіжності між результативністю молекулярно-генетичного і фенотипічного методів дослідження – лише 206 (64, 2 %) штамів *M. tuberculosis* були стійкими за результатами аналізу в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Таким чином, використання ДНК-стрипової технології для визначення мутацій в генах мікобактерій, що відповідають за МС до ПТП, обов'язково потребує паралельної постановки ТМЧ в рідкому середовищі для повної характеристики МС мікобактеріальної популяції.

На підставі отриманих експериментальних даних та проведеного аналізу встановлено загальні підходи до діагностики туберкульозу та хіміорезистентного туберкульозу з використанням сучасних гено-фенотипових методів. Генотипові методи використовуються з метою виявлення, диференціальної діагностики і визначення чутливості мікобактерій до ПТП 1-го і 2-го ряду, обов'язково паралельно супроводжуються класичними культуральними дослідженнями на рідких та/або щільних живильних середовищах, не використовуються для бактеріологічного моніторингу лікування хворих на туберкульоз (для цього застосовуються бактеріоскопія мазків мокротиння і

культуральні дослідження на рідких та/або щільних живильних середовищах).

### ВИСНОВКИ

1. Впровадження в діагностичні дослідження на туберкульоз системи GenoType дозволило швидко проводити ідентифікацію виділених мікобактерій та диференціацію нетуберкульозних штамів мікобактерій (*M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii* та ін.).

2. Результати молекулярно-генетичного дослідження мультирезистентності в системі GenoType MTBDRplus співпадають в 95,5 % з результатами фенотипічного тестування методом пропорцій. Дані визначення монорезистентності до рифампіцину, або в комбінації з іншими протитуберкульозними препаратами, крім ізоніазиду за допомогою методу генетичного тестування в системі GenoType MTBDRplus та фенотипічного методу визначення медикаментозної чутливості не відрізняються між собою і повністю співпадають.

3. Виявлено, що при наявності мутацій, що асоційовані з резистентністю до ізоніазиду, лише в 93,1 % випадках спостерігається МС МБТ до ізоніазиду при проведенні тесту в рідкому середовищі. При наявності мутації в генах, що відповідають за МС до фторхінолонів, в рідкому середовищі лише 90,6 % мають МС до офлоксацину. Штами мікобактерій, в ДНК яких були виявлені мутації в генах, асоційованих з МС до аміноглікозидів/циклічних пептидів в 299 (94,0 %) випадках були стійкими до Am та в 302 (94,9 %) випадках були стійкими до Cm за результатами ТМЧ в системі ВАСТЕС 960. При визначенні стійкості до етамбутолу були виявлені найбільші розбіжності між результативністю молекулярно-генетичного і фенотипічного методів дослідження – лише

Таблиця 7

Результати порівняльного аналізу медикаментозної стійкості до фторхінолонів, аміноглікозидів/циклічних пептидів та етамбутолу штамів *M. tuberculosis* за допомогою молекулярно-генетичного та фенотипічного методів, N = 318, (M ± m) %

Методи дослідження	Кількість штамів	
	абс	M ± m
GenoType MTBDRsl Q (+) ВАСТЕС MGIT Ofx (+)	288	90,6 ± 1,6*
GenoType MTBDRsl Q (+) ВАСТЕС MGIT Ofx (-)	30	9,4 ± 1,6*
GenoType MTBDRsl аміноглікозиди/ циклічні пептиди (+) ВАСТЕС MGIT Am (+)	299	94,0 ± 1,3*
GenoType MTBDRsl аміноглікозиди/ циклічні пептиди (+) ВАСТЕС MGIT Am(-)	19	6,0 ± 1,3*
GenoType MTBDRsl аміноглікозиди/ циклічні пептиди (+) ВАСТЕС MGIT Cm (+)	302	94,9 ± 1,2*
GenoType MTBDRsl аміноглікозиди/ циклічні пептиди (+) ВАСТЕС MGIT Cm(-)	16	5,1 ± 1,2*
GenoType MTBDRsl E (+) ВАСТЕС MGIT E(+)	206	64,2 ± 2,7*
GenoType MTBDRsl E (+) ВАСТЕС MGIT E (-)	112	35,8 ± 2,7*

Примітки:

1. (+) – позитивний результат.

2. (-) – негативний результат.

3. \* – p < 0,01 при порівнянні показників резистентності до Ofx, Am, Cm та E, виявлених за допомогою культурального методу і системи GenoType та показників резистентності до Q, аміноглікозидів/циклічних пептидів та E, виявлених лише за допомогою молекулярно-генетичного методу.

206 (64, 2 %) штамів *M. tuberculosis* були стійкими за результатами аналізу в системі BACTEC MGIT 960.

4. Наявність мутацій в генах, що асоційовані з МС до ПТП, не завжди підтверджується фенотипічними методами досліджень. Тому використання ДНК-стрип технології GenoType для визначення мутацій в генах мікобактерій, що відповідають за МС до ПТП, обов'язково потребує паралельної постановки ТМЧ в рідкому середовищі для повної характеристики МС мікобактеріальної популяції.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Автоматизированные методы культурального определения *Mycobacterium tuberculosis* на жидких средах [Текст] / О. А. Иртуганова [и др.] // Проблемы туберкулеза. – 2001. – № 3. – С. 53–56.
2. Дорожкова, И. Р. Повышение эффективности выделения и идентификации микобактерий в условиях централизованной микобактериологической лаборатории [Текст] / И. Р. Дорожкова, М. В. Макарова, Г. Е. Фрейман // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 11. – С. 21–26.
3. Застосування автоматизованої системи MGIT для діагностики туберкульозу легень і визначення медикаментозної стійкості мікобактерій [Текст] : методичні рекомендації / А. І. Барбова [та ін.] ; Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України. – К. : ІФП, 2007. – 24 с.
4. Молекулярно-генетичні підходи до здійснення ідентифікації мікобактерій [Текст] / О. А. Журило [та ін.]. // V з'їзд фтизіатрів і пульмонологів України : тез. доп. – К., 2013. – С. 123–124.
5. Результаты применения методов GenoType MTBDRplus и BACTEC MGIT для определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза [Текст] / П. И. Елисеев [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 10. – С. 31–34.
6. Система забезпечення якості бактеріологічних досліджень в закладах, що здійснюють мікробіологічну діагностику туберкульозу на різних рівнях надання медичної допомоги України [Текст] / О. А. Журило [та ін.] – Кіровоград : Поліум, 2013. – 72 с.
7. Стандарти бактеріологічної діагностики туберкульозу в лабораторіях протитуберкульозних закладів України [Текст] / О. А. Журило [та ін.]. – Кіровоград : Поліум, 2012. – 190 с.
8. Сучасні підходи щодо проведення бактеріологічної ідентифікації мікобактерій [Текст] / А. І. Барбова [та ін.] // Укр. пульмонол. журн. – 2013. – № 3. – С.28–32.
9. Фещенко, Ю. І. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Туберкульоз» : особливості його підготовки та чим відрізняється від попередніх клінічних протоколів [Текст] / Ю. І. Фещенко, С. О. Черенько, А. І. Барбова // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2013. – № 2. – С. 8–18.
10. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 System in Combination with the MGIT TBc Identification Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens [Text] / P.-L. Lu [etal.] // J. Clin. Microbiol. – 2011. – V. 49, № 6. – P. 2290–2292.
11. Evaluation of the MTBDRsl Test for Detection of Second-Line-Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [Text] / V. S. Kiet [etal.] // J. Clin. Microbiol. – 2010. – V. 48, № 8. – P. 2934–2939.
12. GenoType MTBDRsl for Molecular Detection of Second-Line-Drug and Ethambutol Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Clinical Samples [Text] / A. Lacoma [etal.] // J. Clin. Microbiol. – 2013. – V. 50. – P. 30–36.
13. Rusch-Gerdes, S. Multi-center laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drug and newer antimicrobials [Text] / S. Rusch-Gerdes, G. E. Pfiffer, M. Casal // J. Clin. Microbiol. – 2006. – № 44. – P. 688–692.