

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТУБЕРКУЛЬОЗНИХ МІКОБАКТЕРІЙ

Шаповалова О.В., Філімонова Н.І.

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

Актуальність. На сьогодні молекулярно-генетичні методи ідентифікації та типування мікобактерій широко застосовуються в наукових та практичних лабораторіях. Вони ефективно доповнюють традиційні бактеріологічні фенотипові та хемотаксономічні методи при вирішенні питань діагностики, епідеміології, систематики та філогенії мікобактерій та пов'язаних з ними інфекційних захворювань.

Мета. Визначити спектр сучасних молекулярних методів, що застосовуються при ідентифікації патогенних видів мікобактерій комплексу *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC).

Матеріали і методи. Проводили пошук наукової літератури та рекомендацій для практичних діагностичних лабораторій з використанням баз даних наукової інформації та сайтів організацій та відомств, які працюють у галузі охорони здоров'я.

Результати і висновки. Існуючі молекулярні методи, що застосовуються при дослідженні мікобактерій, в основному базуються на ампліфікації, молекулярній гібридизації та секвенуванні.

До методів ампліфікації ДНК або РНК належать класична полімеразна ланцюгова реакція (PCR), її реал-тайм та мультиплексні протоколи, лігазна ланцюгова реакція (LCR), ізотермічна ампліфікація - опосередкована транскрипцією (TMA), зі зміщенням ланцюга (SDA), петлева (LAMP), яка може поєднуватись із зворотною транскрипцією (RT-LAMP), аналіз кількості тандемних повторів (MIRU-VNTR), споліготипування та інші. Також відпрацьовані методи ампліфікації у комплексі з ферментною рестрикцією (PRA), ДНК-гібридизацією, мікрочипуванням, MALDI-TOF мас-спектрометрією, ВЕРХ. Матеріалом для дослідження слугують культури мікобактерій або безпосередньо клінічні зразки. Набори для виконання деяких з цих методів комерційно доступні: Xpert MTB/RIF, AMPLICOR®M. tuberculosis, AMTD Test, DTB, Light cycler®Mycobacterium detection тощо. Чутливість і специфічність даних тестів досягає майже 100 % лише при діагностиці легеневих форм туберкульозу, підтверджених мікроскопічно, тому вони є найбільш корисними в разі діагностики позалегевих уражень, а також захворювань, спричинених нетуберкульозними мікобактеріями.

Для підтвердження *M. tuberculosis* в культурі можуть використовуватися тести, що базуються на технології прямої та зворотної гібридизації – AccuProbe®MT Complex Culture Identification Test, INNO-LiPA RIF.TB Assay, GenoType Mycobacterium CM/AS.

Секвенування для визначення послідовностей 16S рДНК вважається референтним молекулярним методом для ідентифікації мікобактерій.

Мішенями для дослідження мікобактерій зазвичай слугують фрагменти окремих генів та варіабельних спейсерів – родоспецифічного гену *hsp65*, 16S рРНК, *rpoB*, *recA*, *dnaJ*, *sod*, ITS. Ізоляти MTBC диференціюють за поліморфізмом IS 6110, локусів прямих повторів (DR), делецій (RD), послідовностей *mtp40*, *gyrB*. З метою генотипування видів MTBC застосовуються методи споліготипування, MIRU-VNTR, аналіз поліморфізму одиничних маркерних нуклеотидів (SNP) та більш довгих фрагментів геному (LSP), довжини фрагментів рестрикції (RFLP). Для філогенетичного аналізу, визначення контамінації, мікст-інфекції, реактивації або суперінфекції при туберкульозі найбільш прийнятними вважаються методи виявлення локусів ДНК, що повторюються або є варіабельними – споліготипування, MIRU-VNTR з одночасним використанням різноманітних маркерів.

Молекулярні методи дослідження мікобактерій розрізняються за чутливістю, трудомісткістю, вартістю, мають великі переваги в часі виконання, дозволяють виявляти маркери лікарської стійкості. Однак, вони не замінюють традиційні методи діагностики легеневого туберкульозу, але можуть бути корисними у випадках негативних результатів мікроскопії, позалегевих форм туберкульозу та захворюваннях, спричинених нетуберкульозними мікобактеріями.