УДК: 616-002.5:576.852.211-07 DOI: 10.32902/2663-0338-2022-4.1-17

Порівняння систем GeneXpert MTB/RIF і GenoType зі стрипами MTBDRplus для виявлення мутацій, пов'язаних із резистентністю *M. tuberculosis* до рифампіцину при туберкульозі

Журило О.А.[1], Барбова А.І.[1], Трофімова П.С.[1], Чередник Ю.О.[1], Павлова О.В.[2], Чернов О.В.[2]

1. ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України», м. Київ, Україна
2. Міжнародна організація PATH в Україні, м. Київ, Україна

Мета. Проаналізувати рівень відповідності двох молекулярно-генетичних методів – GeneXpert MTB/RIF і GenoTypeDRplus – щодо визначення медикаментозної чутливості *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) до рифампіцину (R) при виявленні мутацій у ділянці RRDR, пов'язаних зі стійкістю до препарату.

Матеріали та методи. Досліджувалися штами МБТ зі стійкістю до R, що була виявлена будь-яким із молекулярно-генетичних методів, які вивчаються. Відібрано 96 зразків мокротиння. Мазки мокротиння було досліджено на наявність кислотостійких бактерій шляхом мікроскопії після забарвлення за методом Циля – Нільсена. Посів матеріалу здійснювали в бульйон Middlebrook 7H9 і щільне середовище Левенштейна – Єнсена. Інкубація рідкого середовища проводилася в системі BACTEC MGIT. Для ідентифікації штамів використовували імунохроматографічний тест. Тест медикаментозної чутливості МБТ до R виконувався в системі BACTEC MGIT. Тест GeneXpert MTB/RIF виконувався відповідно до інструкції виробника. Аналіз GenoTypeDRplus проводили на дезактивованих і концентрованих зразках мокротиння. Процес здійснювався в три етапи: екстракція ДНК з обробленого зразка мокротиння; ампліфікація ділянки RRDR за допомогою ПЛР; гібридизація продукту ПЛР на специфічних олігонуклеотидних зондах, іммобілізованих на тест-смужці. Для секвенування виділення ДНК МБТ здійснювали набором QIAamp® DNA Mini Kit. Концентрацію ДНК вимірювали на спектрофотометрі Denovix Quantus. Ампліфікація таргетної панелі проводилася за допомогою набору Deeplex Myc-TB. Очищення ампліконів виконували за допомогою магнітних кульок Agencourt AMPure XP. Кількісний аналіз очищених продуктів ампліфікації виконували флуориметром Qubit. Підготовка бібліотеки ДНК *M. tuberculosis* для секвенування зразків проводилася за допомогою набору Nextera XT DNA library preparation kit. Для бібліотеки використовували 5,0 мкл вихідної ДНК із концентрацією 0,2 нг/мкл. Секвенування виконувалося на обладнанні MiSeq із виконанням протоколу нормалізації та денатурації бібліотеки.

Результати та їх обговорення. Системи GeneXpert MTB/RIF і MTBDRplus націлені на одну й ту саму ділянку визначення резистентності R – 81 п. о. (RRDR) субодиниці бактеріальної РНК-полімерази (rpoB) для виявлення мутацій із використанням ДНК-зондів, тобто є відповідність зондів один одному й очікувана схожість зв'язування зондів. Нами проведено аналіз усіх зразків мокротиння з використанням методів GeneXpert MTB/RIF і GenoType MTBDRplus і фенотипового BACTEC MGIT. Встановлено рівень відповідності двох молекулярно-генетичних методів виявлення пов'язаних із R мутацій у ділянці RRDR. Зону RRDR 81bp гена rpoB неузгоджених випадків було вивчено за допомогою секвенування.

GeneXpert MTB/RIF і GenoType DRplus збігалися з фенотиповим методом, відповідно, в 92,7 та 89,6 % випадків резистентності МБТ. Повний збіг результатів GeneXpert MTB/RIF і GenoTypeMTBDRplus відзначався в 92,7 % випадків. GeneXpert MTB/RIF і GenoType DRplus показали схожу схему збою зв'язування зондів дикого типу (WT-зондів) при скануванні ділянки 81 п. о. (RRDR), що призводить до діагностики стійкості через програмне забезпечення відмови зонда. Секвенування RRDR-ділянки «невідповідних» штамів показало, що зонди GeneXpert виявили сім таких випадків правильно, а GenoTypeDRplus був помилковим у всіх випадках. GeneXpert продемонстрував велику точність у виявленні R-стійкості для неузгоджених ізолятів порівняно з GenoTypeDRplus. GeneXpert MTB/RIF має низку інших переваг порівняно з GenoTypeDRplus. GeneXpert MTB/RIF відносно легше виконувати, вимоги до біологічної безпеки мінімальні, передбачаються менший час для дослідження й більша автоматизація процесу, що забезпечує нижчу ймовірність людських помилок і вищий рівень відтворюваності результатів. З огляду на ці факти та результати GeneXpert MTB/RIF, отримані в дослідженні, рекомендовано використовувати цей метод для виявлення мультирезистентного туберкульозу.

Висновки. Секвенування 81bp ділянки RRDR неузгоджених штамів *M. tuberculosis* показало, що GeneXpert MTB/RIF виконував аналіз точніше, ніж GenoTypeDRplus, у разі виявлення мутацій, пов'язаних зі стійкістю до R.

GeneXpert MTB/RIF відносно легше виконувати, вимоги до біологічної безпеки мінімальні, передбачаються менший час для дослідження й більша автоматизація процесу, що забезпечує нижчу ймовірність людських помилок і вищий рівень відтворюваності результатів, тому доцільно використовувати його для виявлення мультирезистентного туберкульозу.

Аналітичне рішення Deeplex Myc-TB дає можливість отримати великий обсяг вагомої інформації з маркерів медикаментозної стійкості до антимікобактеріальних препаратів і прискорити процес аналізу даних завдяки зручному використанню програмного забезпечення.