

## МОЛЕКУЛЯРНІ ТЕХНОЛОГІЇ ДОСЛІДЖЕННЯ МІКОБАКТЕРІЙ

Шаповалова О.В.<sup>1</sup>,  
Позмогова С.А.<sup>2</sup>, Завгородній А.І.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Національний фармацевтичний університет  
України

<sup>2</sup> Національний науковий центр "ІЕКВМ", м.  
Харків, Україна

**Вступ.** Незважаючи на значні успіхи у боротьбі з туберкульозом людини та тварин, на сьогодні багато аспектів лабораторної діагностики, профілактики та лікування захворювання вимагають подальшого вдосконалення. Останнім часом успішно впроваджуються комплексні технології, що ефективно застосовують переваги рутинних та інноваційних підходів при виявленні та ідентифікації мікобактерій. З метою реалізації довгострокових міжнародних стратегій та національних програм викорінення туберкульозу багато зусиль спрямовується на вдосконалення як традиційних методів мікроскопічної, культуральної та імунологічної діагностики, так і новітніх молекулярно-генетичних технологій. У цьому процесі передові позиції займають методи молекулярної діагностики, що дозволяють вирішувати актуальні проблеми діагностики позалегенових форм захворювання, епідеміології та епізоотології туберкульозу, ідентифікації ізолятів нетуберкульозних мікобактерій та виявлення форм збудників, стійких до протитуберкульозних препаратів.

Метою роботи є проведення порівняльного аналізу технологій та методологічних підходів, які застосовуються в сучасних лабораторіях, що спеціалізуються на молекулярній ідентифікації та диференціації мікобактерій та викладені в джерелах літератури, які висвітлюють проблеми діагностики, лікування та профілактики туберкульозу та мікобактеріозів у гуманній та ветеринарній медицині.

Проводили автоматизований пошук джерел літератури в базах PubMed, Medline, Web of Science, Google Scholar за допомогою ключових термінів: Drug Resistance, Molecular Epidemiology, Molecular Diagnosis, MTBC, Mutations, Mycobacterioses, Mycobacterium, NTM, Resistance, Tuberculosis. Пошук проводили без мовних обмежень, для відбору публікацій було обрано період з січня 2001 року по грудень 2022 року. Для аналізу було відібрано повнотекстові статті, що включали біологічну характеристику мікобактерій, технології молекулярної діагностики туберкульозу та мікобактеріозів людини та тварин, питання молекулярної епідеміології мікобактеріальних інфекцій, сучасні методи

виявлення стійкості збудників до протитуберкульозних препаратів. Критерії включення: публікації, що висвітлюють результати оригінальних досліджень, а також оглядові статті, що включали лабораторні дослідження з використанням молекулярно-генетичних методів діагностики. Критерії виключення: публікації, відмінні від оригінальних досліджень (наприклад, листи чи коментарі тощо); звіти про клінічні випадки захворювань; рекламні матеріали. В ході аналізу та узагальнення знайденої наукової інформації застосовували термінологію Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) щодо стійкості мікобактерій до протитуберкульозних препаратів. За результатами пошуку для проведення аналізу було обрано 51 джерело літератури.

Аналіз даних літератури свідчить, що незважаючи на те, що перші види патогенних мікобактерій, *M. leprae* та *M. tuberculosis*, були описані понад 140 років тому, питання ефективної ідентифікації збудників не втратили актуальності до наших днів. Фенотипові методи та підходи в лабораторній діагностиці туберкульозу, як і раніше, вважаються "золотим стандартом", проте їх активно доповнюють сучасні молекулярно-генетичні технології.

Згідно з сучасною таксономією до роду *Mycobacterium* відносяться мікроорганізми 206 видів, понад 100 з яких були описані в останні двадцять років завдяки сучасним молекулярним технологіям. При цьому доведено, що епідемічну та епізоотичну небезпеку становлять не тільки безумовні патогени, що належать до комплексу *M. tuberculosis* (MTBC), але й опортуністичні види групи нетуберкульозних мікобактерій (NTM). Пильна увага мікробіологів і клініцистів акцентується на нових підтверджених видах мікобактерій, патогенний потенціал яких залишається остаточно не вивченим. До них відносяться описані за останні п'ять років 11 нових визнаних видів, більшість з яких пов'язані з розвитком респіраторних уражень та імуносупресії в організмі господаря.

Підвищення ефективності діагностики туберкульозу та мікобактеріозів, що викликаються NTM, потребує подолання низки обмежень традиційних лабораторних діагностичних технологій, серед яких наступні.

1. Залежність результату від виконання вимог до якості відбору, транспортування та стану об'єкта діагностичного дослідження.
2. Низька чутливість або специфічність деяких рутинних тестів.
3. Ненадійність тестів першого рівня під час роботи з особливими групами пацієнтів, серед яких діти, ВІЛ-інфіковані тощо.

4. Відсутність point-of-care діагностичних тестів для застосування у медичних закладах первинної ланки та більшості ветеринарних клінік.
5. Відсутність абсолютно надійних біомаркерів розвитку захворювання та стійкості збудників до антибактеріальних препаратів.
6. Відсутність експрес-тестів для виявлення стійкості до більшості протитуберкульозних препаратів.
7. Висока вартість, матеріаломісткість, трудомісткість та тривалість проведення діагностичних процедур [4, 10, 12].

Сучасні технології молекулярного типування та ідентифікації мікобактерій ґрунтуються на відмінностях генетичної структури мікроорганізмів. Їхнє впровадження в лабораторну практику почалося з середини 90-х років ХХ століття. Традиційно сьогодні в центрі уваги клініцистів залишаються obligatно патогенні види комплексу *Mycobacterium tuberculosis*, у дослідженні яких досягнуто великих успіхів. Однак численні сапрофітні та умовно-патогенні види мікобактерій, відомі як нетуберкульозні мікобактерії, є не менш значущою групою мікроорганізмів, вивченню ролі яких у розвитку захворювань людини та тварин приділяється не менш пильна увага. Для вирішення питань, що стосуються епідеміології/епізоотології, діагностики, контролю та профілактики захворювань, які викликаються мікобактеріями різних видів, в останні десятиліття успішно застосовується комплекс традиційних фенотипічних та сучасних молекулярно-генетичних методів, причому останні мають широкі перспективи удосконалення та розвитку [3, 24, 38, 39].

Молекулярно-генетичні технології дозволяють виявляти в культурі бактерій або безпосередньо в біоматеріалі специфічні генетичні маркери, якими є ділянки нуклеотидних послідовностей ДНК або РНК. До молекулярних маркерів відносяться повторювані послідовності нуклеотидів, сайти впізнання ендонуклеазами рестрикції, мобільні генетичні елементи, точкові мутації в окремих конститутивних генах, генах вірулентності та послідовностях, що не кодують, поліморфні послідовності різної довжини і делеції в хромосомній або плазмідній ДНК. Аналіз цих молекулярних патернів використовується для отримання філогенетичної та філогеографічної інформації, проведення видової диференціації штамів та скринінгу окремих клінічних ізолятів, представників як МТВС, так і NTM.

Загальновідомо, що найпоширенішими маркерами для ідентифікації більшості бактерій є присутні у всіх клітинах родо- і видоспецифічні для більшості мікроорганізмів гени, що кодують 16S і 23S рРНК та спейсерні послідовності 16S-23S рибосомної

ДНК (рДНК). Визначення особливостей розташування консервативних та варіабельних послідовностей нуклеотидів у цих ділянках дозволяє ідентифікувати ізоляти бактерій, у тому числі й такі, що важко культивуються, а також розрізняти близькоспоріднені види та підвиди мікроорганізмів [26].

Ген *M. tuberculosis* (МТВ), що кодує 16S рРНК, вважається ідеальним маркером для ідентифікації бактерій, їхньої геносистематики та філогенетики. Його консервативні родоспецифічні послідовності можуть використовуватися як універсальні праймери на початкових етапах реакції ампліфікації і як молекулярні зонди при дослідженні різних видів бактерій, варіабельні ділянки дозволяють проводити міжвидову і внутрішньовидову ідентифікацію. Молекулярно-генетичний аналіз послідовностей висококонсервативних послідовностей гена 16S рРНК дозволяє диференціювати різні види мікобактерій на основі відхилень від 1% і більше. Внутрішні транскрибовані спейсерні області (internal transcribed spacer, ITS) 16S-23S рРНК є мішенями для дослідження як МТВС, так і видів NTM. У той же час наявність мутацій є маркером лікарської стійкості (ЛС) до протитуберкульозних препаратів. В даний час послідовності 16S рРНК кожного виду, що публікуються в загальнодоступних базах даних, можуть бути використані з метою вивчення різних груп мікобактерій [9].

Крім зазначених вище, для диференціації мікобактерій в якості молекулярних мішеней також можуть бути використані поліморфні послідовності генів, що кодують антигени *M. tuberculosis* масою 32 кДа і 38 кДа, імунодомінантний антиген HSP65 (білок теплового шоку сімейства Hsp60), регуляторний білок DnaJ (представник сімейства Hsp40), специфічні секреторні протеїни MPT64 *M. tuberculosis* та MPB64 *M. bovis*, гени *sod*, *recA*, *secA1*, родоспецифічний ген *ku*, який є інформативним для первинного скринінгу та ідентифікації мікобактерій у біоматеріалі, численні вставні (або інсерційні) послідовності – мобільні генетичні елементи IS (IS6110, IS901, IS900, IS1245 та інші), які забезпечують генетичну мінливість мікобактерій [8, 22, 46, 49].

Довгий список маркерів, які застосовуються для генотипування *M. tuberculosis* і NMT, також включає міжгенні послідовності, що повторюються, які не мають видової або родової специфічності (паліндроми ERIC і короткі послідовності GTG). Як нова мішень для діагностики та терапії туберкульозу запропонована кільцева РНК (circ RNA) – некодуюча молекула РНК, яка диференційно експресується в мононуклеарних лейкоцитах при легеневій формі інфекції *M. tuberculosis* [47, 50].

Таким чином, перелік найбільш широко застосовуваних на сьогодні молекулярних мішеней для дослідження мікобактерій містить понад 10 різних геномних маркерів. Перелік таргетних генів та їх продуктів наданий у таблиці 1. Для швидкої та надійної ідентифікації багатьох видів мікобактерій,

що важко ідентифікуються традиційними фенотиповими та хемотаксономічними методами, необхідне проведення комплексного аналізу кількох таргетних послідовностей із застосуванням молекулярних технологій [20, 22, 40, 41, 45].

**Таблиця 1 Найбільш поширені молекулярні маркери, що застосовуються для дослідження мікобактерій**

№ з/п	Геномний маркер	Продукт гена
1.	<i>rrs</i>	16S рРНК
2.	<i>hsp65</i>	Білок теплового шоку 65 кДа
3.	<i>groES</i>	Шаперон 10 кДа
4.	<i>dnaj</i>	Шаперон 40 кДа
5.	<i>recA</i>	Фермент реплікації RecA
6.	<i>oxyR</i>	Індуктор антиоксидантних генів OxyR
7.	<i>rnpB</i>	Каталітична субодиниця рибонуклеази Р
8.	<i>sodA</i>	Супероксиддисмутаза
9.	<i>secA1</i>	Препротеїн-транслоказа
10.	<i>argG</i>	Аргініносукцинат-синтетаза
11.	<i>argH</i>	Аргініносукцинат-ліаза
12.	<i>pgmA</i>	Фосфоглюкомутаза
13.	<i>glpK</i>	Гліцеролкіназа
14.	<i>esx</i>	Імунодомінантні білкові антигени <i>M. tuberculosis</i> сімейства Esx

Важливим аспектом молекулярного типування є аналіз генів, які визначають лікарську стійкість мікобактерій. Історично найбільша увага в цьому аспекті приділяється вивченню *M. tuberculosis*, оскільки сьогодні лікарсько-стійкий туберкульоз, що загрожує успішному лікуванню та профілактиці, залишається головною проблемою громадської охорони здоров'я в багатьох країнах, у тому числі в Європейському регіоні та в Україні.

Згідно з ініціативами Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), при реалізації глобальної стратегії з ліквідації туберкульозу використовується наступна класифікація ЛС збудника туберкульозу: монорезистентність (стійкість тільки до одного протитуберкульозного препарату першого ряду – ізоніазиду або рифампіцину); полірезистентність (ПР, стійкість до більш ніж одного протитуберкульозного препарату першого ряду, крім ізоніазиду та рифампіцину); множинна лікарська стійкість (МЛС (MDR/RR), стійкість щонайменше до ізоніазиду та рифампіцину одночасно); широка лікарська стійкість (ШЛС, (XDR), крім МЛС, стійкість до будь-якого фторхінолону і щонайменше до одного з трьох ін'єкційних препаратів другого ряду (капреоміцину, канаміцину, амікацину); стійкість до рифампіцину (стійкість до рифампіцину, що супроводжується або не супроводжується стійкістю до інших протитуберкульозних препаратів, у тому числі стійкість до рифампіцину у формі монорезистентності, полірезистентності, МЛС або

ШЛС). Згідно нової ініціативи експертів ВООЗ до визначення ЛС *M. tuberculosis* була додана пре-широка ЛС (пре-ШЛС, pre-XDR-TB: штами, які відповідають визначенню MDR/RR, що також є стійкими до будь-якого фторхінолону). Також було змінено визначення ШЛС: натепер це пре-ШЛС та стійкість як мінімум до одного з додаткових препаратів групи А (бедаквіліну та/або лінезоліду) [28]. Поряд із здійсненням програм ліквідації туберкульозу, останніми роками не залишаються поза увагою фахівців клінічно значущі нетуберкульозні мікобактерії, при цьому також надається велике значення розшифровці профілю резистентності цих бактерій до антибактеріальних препаратів [17, 36, 51].

Як відомо, формування ЛС мікобактерій почалося одночасно з початком ери хіміотерапії. ЛС розвивається внаслідок однієї або кількох спонтанних мутацій у відповідних генах, що зачіпають обмежену кількість нуклеотидів і виникають із непостійною частотою. У *M. tuberculosis* цей процес переважно індукується неадекватними схемами хіміотерапії, зупиненим або незакінченим лікуванням, хоча в деяких штамів мікобактерій зустрічаються і спонтанні мутації, що визначають первинну резистентність до антибактеріальних препаратів широкого спектра дії. Однак у різних видів спектр та ступінь цієї чутливості різняться. Описано також явище перехресної резистентності, при якій спостерігається генетично детермінована ЛС до кількох протитуберкульозних препаратів одночасно

(частіше всередині однієї групи препаратів, наприклад, до ізоніазиду, етіонаміду, рифампіцину та його похідних, до аміноглікозидів) [19, 35, 37]. Розвиток перехресної резистентності пояснюється схожістю хімічної структури деяких протитуберкульозних препаратів. Також розрізняють мутації, що визначають різний ступінь розвитку ЛС до певного препарату – високий або середній. В цьому разі пацієнту можуть бути рекомендовані альтернативні варіанти лікування [20].

Молекулярно-генетичні технології виявлення мутацій є найнадійнішими та найшвидшими при виявленні ЛС мікобактерій, проте в деяких випадках їх негативний результат потребує підтвердження чутливості ізоляту за допомогою класичного культурального методу дослідження. Своєчасне виявлення відповідних молекулярних маркерів ЛС, як і найкраще розуміння механізмів її формування, необхідні не тільки для розробки передових технологій діагностики ЛС туберкульозу та мікобактеріозів, але й для створення нових препаратів для лікування та профілактики цих захворювань [19].

В даний час для кожного протитуберкульозного препарату першого і другого ряду, як і для більшості резервних препаратів, визначені гени, специфічні мутації в яких призводять до розвитку ЛС мікобактерій. Для найбільш вивченого виду *M. tuberculosis* список молекулярних маркерів для виявлення ЛС містить низку конститутивних генів, що кодує клітинні мішені дії протитуберкульозних препаратів [2, 33].

У таблиці 2 наведено узагальнений перелік відомих молекулярних мішеней, відповідні мутації у яких визначають різний ступінь ЛС збудника туберкульозу. Насамперед до них відносяться наступні маркери ЛС: резистентність до рифампіцину у понад 95% випадків викликається мутаціями у специфічній 81 п.н. області гена *rpoB*; стійкість до ізоніазиду головним чином пов'язана з модифікаціями гена *katG* (високий рівень стійкості) або гена *inhA* (низький рівень стійкості), при цьому також можливий розвиток перехресної резистентності до етіонаміду. Стійкість до піразинаміду зазвичай визначається численними мутаціями гена *pncA*, хоча також відомі такі мутації, що не призводять до резистентності. В той же час, деякі стійкі до піразинаміду ізоляти мають незмінні нуклеотидні послідовності гена *pncA*. Найчастіше стійкість до етамбутолу кодує мутація в гені *embB*, але не всі мутації цього гена пов'язані з резистентністю до даного препарату. Більшість ЛС до фторхінолонів обумовлена мутаціями в генах *gyrA* і *gyrB*. Стійкість до ін'єкційних препаратів другого ряду (амікацину, капреоміцину та канаміцину) зазвичай опосередковується геном *rrs*. Виявлення маркерів резистентності до антимікробних препаратів широкого спектру дії має важливе значення для успішної хіміотерапії мікобактеріозів, що викликаються NTM [5, 7, 11, 15, 16, 18, 21, 25, 27, 32, 41, 43, 48].

**Таблиця 2 Основні гени *M. tuberculosis* та NTM, що визначають розвиток стійкості до лікарських препаратів**

Препарат	Ген	Продукт	Механізм резистентності/ клінічне значення
Ізоніазид	<i>katG</i>	Каталаза-пероксидаза (KatG)	Інгібування синтезу міколових кислот та інші ефекти. Високий ступінь стійкості до ізоніазиду
	<i>inhA</i>	NADH-залежна еноіл-АСР редуктаза (InhA)	Низький ступінь стійкості до ізоніазиду та етіонаміду
	<i>fabG1</i>	3-оксіацил-АСР редуктаза	Регуляція експресії <i>inhA</i>
	<i>ahpC</i>	Алкілгідропероксид редуктаза С AhpC	Високий ступінь стійкості до ізоніазиду
	<i>ndh</i>	NADH дегідрогеназа	Стійкість до Ізоніазиду
	<i>iniA</i>	Фермент ефлюксного насоса	
	<i>fadE24</i>	Фермент б-окислення жирних кислот	
<i>kasA</i>	Кетоацил-АСР-синтегаза (KasA)		
Рифампіцин	<i>rpoB</i>	β-субодиниця РНК-полімерази	Інгібування синтезу РНК
	<i>rpoA</i>	α-субодиниця РНК-полімерази	
	<i>rpoC</i>	β-субодиниця РНК-полімерази	
Піразинамід	<i>pncA</i>	Піразинамідаза (PncA)	Активация піразинаміда
	<i>rpsA</i>	Рибосомальний протеїн S1 RpsA	Зміни транс-трансляції
	<i>panD</i>	Аспартат-декарбоксилаза	Зміни синтезу пантотената і КоА

Препарат	Ген	Продукт	Механізм резистентності/ клінічне значення
Стрептоміцин	<i>rpsL</i>	Рибосомальний протеїн S12	Інгібування синтезу білка
	<i>rrs</i>	16S рРНК	
	<i>gidB</i>	7-метилгуанозин-метилтрансфераза	
Етамбутол	<i>embA</i>	Арабінозил-трансфераза (EmbCAB)	Інгібування синтезу арабіногалактана клітинної стінки
	<i>embB</i>		
	<i>embC</i>		
	<i>embR</i>	Регулятор експресії <i>embCAB</i> оперона	
	<i>rmlD</i>	dTDP-4-дегідрорамнозоредуктаза	
	<i>ubiA</i>	DPPR-синтаза	
Амікацин Канаміцин	<i>rrs</i>	16S рРНК	Інгібування синтезу білка
	<i>eis</i>	Аміноглікозид-ацетилтрансфераза	
	<i>whiB7</i>	Регулятор транскрипції	
Фторхінолони	<i>gyrA</i>	А-субодиниця ДНК-гірази	Інгібування синтезу ДНК
	<i>gyrB</i>	В-субодиниця ДНК-гірази	
Макроліди	<i>rrl</i>	Пептидилтрансфераза 23S рРНК	Модифікація хімічної структури лікарських препаратів
	<i>erm(41)</i>	Аденін-(2058)-N(6)-метилтрансфераза 23S рРНК	
Капреоміцин, Біоміцин	<i>tlyA</i>	Метилтрансфераза рРНК	Інгібування синтезу білка
	<i>rrs</i>	16S рРНК	
Етіонамід	<i>inhA</i>	NADH-залежна еноіл-АСР-редуктаза	Порушення синтезу клітинної стінки
	<i>ethA</i>	Флавін-монооксигеназа	
	<i>ethR</i>	Репресор транскрипції сімейства TetR	
Пара-аміносаліцилова кислота	<i>thyA</i>	Тимидилатсинтаза А	Інгібування обміну фолієвої кислоти та тимідину
	<i>folC</i>	Дигідрофолат-синтаза	
	<i>dfrA</i>	Дигідрофолат-редуктаза	
	<i>ribD</i>	5-аміно-6-(5-фосфорибозиламіно)урацил-редуктаза	
D-циклосерин	<i>alr</i>	D-аланін-рацемаза	Інгібування синтезу пептидоглікана клітинної стінки
	<i>ddl</i>	D-аланін- D-аланін-лігаза	
	<i>ald</i>	L-аланін-дегідрогеназа	
	<i>CysA</i>	D-серин протонний симпортер	
Діарилхіноліни Бедаквілін (TMC207)	<i>atpE</i>	Субодиниця С АТФ-синтети	Інгібування синтезу АТФ
	<i>mmpR</i>	Ферменти ефлюксного насоса	Стійкість до Бедаквіліну
	<i>pepQ</i>		
Нітроімідазол Претоманід (PA-824)	<i>ddn</i>	Деазафлавін-залежна нітроредуктаза Ddn	Інгібування синтезу міколових кислот, продукція реактивних форм нітрогену
	<i>fgd1</i>	F <sub>420</sub> -залежна глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа (G6PD)	
	<i>fbiA</i>	Фермент біосинтезу ко-фактора F <sub>420</sub> FbiA	
	<i>fbiB</i>	Фермент біосинтезу ко-фактора F <sub>420</sub> FbiB	
	<i>fbiC</i>	Фермент біосинтезу ко-фактора F <sub>420</sub> FbiC	
Нітроімідазол Деламанід (OPC-67683)	<i>ddn</i>	Деазафлавін-залежна нітроредуктаза Ddn	Інгібування синтезу міколових кислот, продукція реактивних форм нітрогену
	<i>fgd1</i>	F <sub>420</sub> -залежна глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа	
	<i>fbiA</i>	Фермент біосинтезу ко-фактора F <sub>420</sub> FbiA	

Препарат	Ген	Продукт	Механізм резистентності/ клінічне значення
	<i>fbiC</i>	Фермент біосинтезу ко-фактора F <sub>420</sub> FbiC	
1,2-етилендіамін SQ109	<i>mmpL3</i>	Мембранний переносник	Інгібування синтезу міколових кислот
Оксазолідинони Лінезолід	<i>rrl</i>	23S рРНК	Інгібування синтезу білка
	<i>rplC</i>	Рибосомальний протеїн L3	

Основними молекулярними технологіями, що застосовуються для вивчення ЛС мікобактерій, є повногеномне секвенування ізолятів та аналіз окремих генів, виділених із клінічних зразків [11, 35]. Однак, незважаючи на очевидні переваги молекулярних методів тестування, генетичні основи ЛС досі не повністю розшифровані для всіх протитуберкульозних препаратів та для всіх ізолятів мікобактерій. Це означає, що хоча виявлення мутації, що визначає ЛС, і має безперечне клінічне значення, слід пам'ятати, що відсутність мутацій у цільовому гені не обов'язково свідчить про сприйнятливість організму до цього препарату. Таким чином, хоча всі доступні в даний час молекулярні технології мають переваги в швидкості та чутливості, за рахунок чого можуть допомогти у швидкому виявленні маркерів ЛС, проте вони не можуть повністю замінити рутинні фенотипові методи дослідження, тому їх результати потребують підтвердження традиційними лабораторними методами.

З метою виявлення специфічних геномних послідовностей, що використовуються як молекулярні мішені при дослідженні мікобактерій, застосовуються різні лабораторні технології, серед яких найбільш поширеними є методи ампліфікації, гібридизації нуклеїнових кислот, рестрикційного аналізу та секвенування [5, 11, 39]. При цьому найбільша ефективність досягається при використанні комплексу цих допоміжних методів досліджень. В останні роки численний арсенал сучасних молекулярних методів динамічно розширюється, і однозначно виділити провідний технологічний прийом у протоколах їх застосування важко.

Найчастіше застосовуваною технологією молекулярної діагностики туберкульозу та ідентифікації видів NTM на сьогодні є ампліфікація нуклеїнових кислот. Її переваги полягають у швидкості отримання результату та можливості одночасного тестування великої кількості проб. В даний час застосовуються різні протоколи ампліфікації, засновані на класичній та мультиплексній ПЛР; ПЛР в режимі реального часу (Real-time PCR); ізотермічній ампліфікації, опосередкованій транскрипцією (ТМА, transcription-mediated amplification); петльовій ізотермічній ампліфікації (LAMP, loop mediated isothermal

amplification), яка може включати зворотну транскрипцію (RT-LAMP); ПЛР, опосередкованій лігуванням (LM-PCR, ligation-mediated PCR); ПЛР на основі послідовностей, що повторюються (rep-ПЛР) і багатьох інших варіантах методу [20, 27].

Останнім часом для оцінки генетичної мінливості різних таксонів бактеріальних патогенів, у тому числі мікобактерій, запропоновано використовувати технології типування, засновані на випадковій ампліфікації поліморфної послідовності ДНК (RAPD, randomly amplified polymorphic DNA) або ПЛР з довільними праймерами (AP-PCR, arbitrarily PCR), для проведення яких не потрібно попередньо знати послідовність ДНК-матриці [4]. Хоча дана технологія має високу роздільну здатність, вона не позбавлена низки обмежень, найважливішим з яких є погана відтворюваність. Проте аналіз RAPD може бути використаний для генотипування як MTBC, так і NTM. Для підвищення роздільної здатності методу при типуванні штамів *M. tuberculosis* як матрицю ПЛР було запропоновано використовувати ITS генів, що кодують 16S-23S рРНК мікобактерій різних видів. Застосування комбінації кількох наборів праймерів при аналізі RAPD також підвищує ефективність швидкої диференціації епідеміологічно непов'язаних штамів безпігментних мікобактерій, що швидко ростуть. Так, аналіз RAPD може бути застосований для генотипування *M. phocaicum*, *M. goodnae*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. abscessus* та *M. chelonae*. Також була розроблена імуно-полімеразна ланцюгова реакція (I-PCR), яка поєднує в собі високу продуктивність та чутливість ПЛР із простотою та універсальністю імуноферментного аналізу, що призводить до збільшення ефективності серологічної діагностики туберкульозу [29].

В даний час для диференціації видів мікобактерій як альтернатива культуральним дослідженням широко використовуються методи гібридизації з ДНК-зондами (DNA probe), які являють собою мічені унікальні специфічні одноланцюгові олігонуклеотидні фрагменти ДНК, комплементарні таргетній послідовності нуклеїнової кислоти певного збудника. В результаті реакції молекулярної гібридизації зонд з'єднується з таргетною послідовністю, що дозволяє ідентифікувати різні

цільові фрагменти нуклеїнових кислот, в яких відбулося зв'язування ДНК-зонда і мішені без застосування методу ампліфікації. Працюючи з чистими культурами мікобактерій результат можна отримати протягом 2-3 годин. У сучасних тест-системах використовуються обидві технології (ампліфікація та гібридація), що дозволяє проводити дослідження безпосередньо проб біоматеріалу без їх попереднього культивування [20, 31].

Як відомо, перші спроби молекулярного аналізу геномної ДНК збудника туберкульозу людини ґрунтувалися на використанні методу з використанням ферментів рестрикції (REA, restriction endonuclease assay). Він полягав у тому, що ДНК бактеріальної хромосоми досліджуваного штаму розрізалася певними рестриктазами, фрагменти, що утворилися, розділялися і візуалізувалися методом електрофорезу, а за отриманими патернами фрагментів ДНК (ДНК - фінгерпринтів) характеризували кожен штам. З метою спрощення аналізу та забезпечення більш точного електрофоретичного поділу в широкому діапазоні розмірів фрагментів рестрикції пізніше було запропоновано застосовувати метод гелелектрофорезу в пульсуючому полі (REA-PFGE, pulsed field gel electrophoresis) [4].

Принцип PFGE полягає в тому, що при періодичній зміні (пульсації) електричного поля фрагменти ДНК змінюють напрямок переміщення, чим досягається розділення великих молекул. Основна перевага PFGE – це можливість розділяти більш великі фрагменти ДНК, що перевищують межу односпрямованого електрофорезу, яка становить 50 т.п.н. Останнє забезпечується застосуванням рестриктаз, що розщеплюють, і щадного способу підготовки геномної ДНК.

PFGE-типуювання може бути ефективним для вирішення задач диференціації штамів *M. tuberculosis*, *M. bovis* та *M. bovis* BCG. Метод має високу відтворюваність і роздільну здатність, проте його широке використання при молекулярно-епідеміологічних дослідженнях інфекцій МТВС обмежено через дорожнечу, тривалість (зазвичай близько 5 днів), потребу у великій кількості ДНК для аналізу та необхідність складного технічного забезпечення. Незважаючи на це, метод залишається найефективнішим для типуювання багатьох видів NTM, як повільно зростаючих, включаючи *M. kansasii*, MAC, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. goodii* та *M. haemophilum*, так і швидко зростаючих видів *M. fortuitum*, *M. chelonae* та *M. abscessus*. Він також використовується як підтверджуючий після генотипування видів *M. abscessus*, *M. massiliense* та *M. bollettii* методом

ПЛР на основі послідовностей, що повторюються (rep-PCR, repetitive sequence-based PCR) [23].

Як свідчать дані літератури, диференціацію як штамів, так і видів мікобактерій, можливо проводити за допомогою ПЛР-аналізу поліморфізму довжини фрагментів рестрикції (RFLP, restriction fragment length polymorphism), що поєднує технології ампліфікації та рестрикційного аналізу [24]. У цьому методі спочатку для візуалізації результатів тестування використовувався класичний метод гібридації за Саузерном (Саузерн-Блоттінг, Southern blot), який в подальшому був замінений на автоматизовані версії.

Надалі було показано, що надійними генетичними маркерами поліморфізму мікобактерій на рівні видів і штамів можуть служити інші молекулярні мішені – вставні послідовності (IS, insertion sequences) *M. tuberculosis* і NTM. Вони являють собою мобільні генетичні елементи, які відносяться до ділянок геному, що повторюються. До найбільш досліджених IS відносяться IS6110, які були знайдені у більшості видів МТВС.

У представників групи МТВС було виявлено загалом 29 різних послідовностей, що належать до 4 сімейств IS [31, 43]. Вісім з них присутні в геномі *M. tuberculosis* H37Rv у більш ніж одному екземплярі, три – у трьох (IS1557) або більше екземплярах (IS1081 та IS6110). Найбільш добре вивченими IS є IS6110 із сімейства IS3, яке було спочатку описано у бактерій родини *Enterobacteriaceae*. IS6110 є унікальними для МТВС і у більшості його представників присутні у кількох копіях. Як правило, кількість копій IS6110 варіює від 0 до 25. Виняток становить вид *M. bovis*, який містить лише від 1 до 3 послідовностей IS6110. Довжина IS6110 становить 1355 п.н., на її кінцях розташовані термінальні інвертовані повтори (TIR, terminal inverted repeats) довжиною 28 п.н., також є дві відкриті рамки читування, що частково перекриваються (orfA і orfB), які кодують транспозазу. IS6110 розкидані по всьому геному, хоча були описані певні "гарячі точки" для їх інтеграції в бактеріальну хромосому. Саме через велику кількість копій та різноманітності в розташуванні, IS6110 стали корисним генетичним маркером для диференціювання штамів *M. tuberculosis*. Наявність IS6110 також може бути використана як маркер для виявлення *M. tuberculosis* у стародавніх муміфікованих зразках. Інші послідовності, IS1547 та IS1081, на відміну від IS6110, присутні в кількості 5-7 копій на геном і досить однорідно розподілені серед штамів *M. tuberculosis*, що виключає їх використання у якості діагностичного маркеру.

У геномі різних видів NTM також було виявлено IS [23]. Серед них для молекулярного

типування штамів MAC найбільш актуальними є IS1245 та IS1311, хоча геном представників MAC містить й інші вставні послідовності. Так, IS900 були виявлені у *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; IS901 – у *M. avium* subsp. *avium*; IS902 – у *M. avium* subsp. *silvaticum*. Такі послідовності, як IS666, IS1110 та IS1626 в ізолятів *M. avium*, ще недостатньо вивчені. В даний час IS900, IS901 та IS902 слугують для діагностичних цілей, як під час ідентифікації, так і для диференціації різних штамів *M. avium*.

Відомі також ряд IS, що використовуються для епідеміологічних досліджень NTM, відмінних від MAC. Ці IS включають IS1395 *M. xenopi*, IS1511/IS1512 *M. goodii*, IS1407 *M. celatum*, IS6120 *M. smegmatis*, IS2404 *M. ulcerans*, IS2606 *M. ulcerans* та *M. lentiflavii* [40].

Діагностичний досвід показує, що для міжвидової та внутрішньовидової диференціації бактерій найкращі результати досягаються шляхом аналізу нуклеотидних послідовностей кількох генів. Цю функцію виконує технологія типування на основі мультилокусних послідовностей (MLST, multilocus sequence typing), призначена для аналізу невеликої кількості (до 10) конститутивних генів, що кодують життєво важливі ферменти та структурні білки. Цей метод визнано корисним для диференціації різних представників NTM: ізолятів комплексу *M. avium-M. intracellulare*, підвидів та штамів *M. avium*, штамів *M. mucogenicum* та *M. phocaicum*, виділених як з об'єктів зовнішнього середовища, так і від пацієнтів при спалахах внутрішньолікарняних інфекцій [45].

Як виявилось, для диференціації видів MTBC стандартний метод MLST несе мало інформації та є неефективним через низький рівень поліморфізму послідовностей конститутивних генів цих бактерій. Натомість було запропоновано іншу стратегію типування, яка дозволяє проводити диференціацію послідовностей генів, що відрізняються навіть однією нуклеотидною заміною, у тому числі виявляти мутації, що призводять до розвитку ЛС. Метод виявлення таких фрагментів геному, що повторюються, званих однонуклеотидні поліморфізми (SNPs, single nucleotide polymorphisms), носить назву SNP-типування. Він здійснюється за допомогою комбінації різних варіантів ПЛР-аналізу фрагментів ензимної рестрикції ДНК. Для одночасного виявлення кількох мутацій у різних генах також може бути використана технологія мікрочіпів [30].

Як показали результати порівняльних досліджень мінливості геномів різних штамів *M. tuberculosis*, еволюційна історія цього виду супроводжувалася втратою генетичного матеріалу. У геномі збудника були виявлені різні делеції, також відомі як поліморфізми довгих послідовностей (LSP,

large sequence polymorphisms) або ділянки відмінності (RD, regions of difference). При цьому було встановлено, що делеції не розподіляються випадковим чином, а виявляються у вигляді агрегатів, які зустрічаються як у внутрішньогенних, так і у міжгенних ділянках. Оскільки LSP є значним джерелом генетичної мінливості між штамами, було запропоновано їх використання у якості маркерів для генотипування. При цьому аналіз хромосомних делецій (делітогування) виявився надзвичайно корисним при вивченні філогенії та еволюції видів MTBC, а також для швидкого скринінгу клінічних ізолятів *M. tuberculosis*. Технологія делітогування може бути здійснена як методом ампліфікації на основі класичної чи мультиплексної ПЛР так і за допомогою автоматизованого методу із застосуванням набору мікрочіпів [13].

З 2002 року відома технологія мультиплексної ампліфікації зондів за допомогою лігування (MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification), яка об'єднує дослідження SNP і LSP. Метод дозволяє аналізувати до 50 маркерів, що дає можливість одночасно ідентифікувати кілька видів мікобактерій, у тому числі в межах MTBC, а також ряд маркерів лікарської стійкості. Для аналізу *M. tuberculosis* ця технологія перша була відпрацьована в 2008 р. із застосуванням 18 маркерів, що визначають ЛС (*rpoB*, *katG*, *inhA*, *embB*), видоспецифічні мішені для виявлення генотипу MTBC (16S rRNA, IS6110, TbD1), а також штами генетичних сімейств Haarlem та Beijing (*ogt*, *mutT2*, *mutT4*) [6].

Аналогічний принцип має MLPA з флуоресцентною детекцією сигналу, а саме мультиплексна ПЛР з олігонуклеотидним лігуванням (MOL-PCR, multiplexed oligonucleotide ligation PCR) або зонди, що замикають кільце (padlock probes) [20].

В даний час методи, в яких використовуються технології ампліфікації та гібридизації нуклеїнових кислот, рекомендуються ВОЗ для широкого застосування. Серед них: картриджна технологія (CB-NAAT), гібридизація ДНК з використанням лінійних зондів (LPA) та LAMP. Щодо виявлення та ідентифікації MTBC до найбільш застосовуваних комерційно доступних тест-систем відносяться Amplicor PCR assay (Roche Molecular Systems, США), Amplified MTD assay (Gen-Probe Inc., США), GenoType Mycobacteria Direct assay (Hain Lifescience, Німеччина) [4, 26, 44].

Відомо, що максимальний рівень деталізації при аналізі послідовності нуклеотидів конкретного гена забезпечує метод секвенування, який застосовується як для ідентифікації різних видів мікобактерій, так і для типування з виявленням SNP, включаючи SNP, пов'язані з лікарською стійкістю. Аналіз послідовності генів, обмежених невеликими ділянками геному, може бути ефективно виконаний з



використанням методу секвенування по Сенгеру або піросеквенування. Крім того, з цією метою можна додатково застосувати метод MALDI-TOF мас-спектрометрії або ПЦР-електророзпилювальної іонізаційної мас-спектрометрії (PCR-ESI/MS). Сучасні високопродуктивні технології секвенування нового покоління (NGS, next-generation sequencing), призначені для дослідження безлічі коротких фрагментів генома на базі одностричкових бібліотек, повністю автоматизовані та дозволяють аналізувати великий об'єм інформації. Сферою їх застосування є розшифровка геномів нових видів бактерій, повногеномне та метагеномне секвенування, направлене секвенування окремих генів та їх фрагментів [1, 4, 8, 13, 14, 30, 34, 42].

### Висновки

На сьогодні молекулярні технології є невід'ємним елементом практично всіх діагностичних та епідеміологічних/епізотологічних досліджень при мікобактеріальних інфекціях. Вони розширюють наше розуміння біології мікобактерій і слугують потужними інструментами для вдосконалення стратегії і тактики лікування і профілактики захворювань, що викликаються цими патогенами. Еволюція молекулярних технологій йде в напрямку підвищення їх чутливості, специфічності, швидкості, простоти та зниження вартості аналізу. Однак із великого переліку відомих і доступних на сьогодні молекулярних методів дослідження різних видів мікобактерій жоден неможливо вважати досконалим. Вони відрізняються не тільки відтворюваністю, надійністю, але й ефективністю витрат на постановку, можливістю стандартизувати способи інтерпретації результатів і створювати зручні у використанні бази даних для проведення міжлабораторних порівняльних досліджень. У кожному конкретному випадку в залежності від мети та об'єкта дослідження з урахуванням можливостей лабораторії вибирається оптимальна технологія ідентифікації та диференціації мікобактерій, що були ізольовані з біоматеріалу.

### Molecular technologies of mycobacterial research Shapovalova O.V., Pozmogova S.A., Zavgorodniy A.I.

**Introduction.** Despite significant successes in the fight against human and animal tuberculosis, many aspects of laboratory diagnostics, prevention and treatment of the disease require further improvement. Recently, complex technologies have been successfully implemented that effectively support the advantages of routine and innovative methods of molecular diagnostics and allow solving the urgent problems of detecting extrapulmonary forms of the disease, epidemiology and epizootology of tuberculosis, identifying isolates of non-tuberculous mycobacteria and forms of pathogens resistant to anti-

tuberculosis drugs. The purpose of the work is to conduct a comparative analysis of technologies and methodological approaches used in modern laboratories specializing in molecular identification and differentiation of mycobacteria in human and veterinary medicine. We conducted a search for sources of literature covering the problems of diagnostics, treatment and prevention of tuberculosis in the PubMed, Medline, Web of Science, Google Scholar databases from 2001 to 2022. Full-text articles were selected for analysis, including the biological characteristics of mycobacteria, technologies of molecular diagnostic of human and animals tuberculosis and mycobacteriosis, issues of molecular epidemiology of mycobacterial infections, modern methods of detecting resistance of pathogens to antituberculosis drugs. The results of the literature data analysis show that common molecular genetic technologies allow detection MTBC and NTM in culture or specific genetic markers directly in the biomaterial: ITS 16S-23S pPHK, immunodominant antigen HSP65, specific proteins DnaJ, MPT64, MPB64, IS (IS6110, IS901, IS900, IS1245 and other), genes of resistance to antituberculosis drugs, mutation or deletion of the corresponding genes, etc. Most often, for this purpose, NAAT technologies are used in various modifications, MLPA, MOL-PCR, SNP- typing, DNA probe, PFGE- typing and other. WHO has introduced CB-NAAT, LPA and LAMP cartridge technology for widespread use, on which commercially available test systems from various manufacturers are based. The main molecular technologies used to determine the drug resistance of mycobacteria and the mechanisms of its occurrence are whole-genome sequencing of isolates and analysis of individual genes isolated from clinical samples. Currently, for each antituberculosis drug of the first and second line, as well as for most reserve drugs, genes, specific mutations in which lead to the development of drug resistance, have been identified. For the most studied *M. tuberculosis*, the list of molecular markers for detection of drug resistance includes a number of constitutive genes encoding the cellular targets of antituberculosis drugs. For this purpose, MLPA technologies with many drug resistance markers (*rpoB*, *katG*, *inhA*, *embB*) are widely used along with MTBC and NTM genotype detection. **Conclusion.** Today, molecular technologies are an integral element of almost all diagnostic and epidemiological/epizootological studies of mycobacterial infections. They expand our understanding of the biology of mycobacteria and serve as powerful tools for improving strategies and tactics for the treatment and prevention of diseases caused by these pathogens. The evolution of molecular technologies is in the direction of increasing their sensitivity, specificity, speed, simplicity and reducing the cost of analysis. Molecular technologies known and available today differ

in reproducibility, reliability, production cost, degree of standardization, methods of interpreting results, availability of databases for interlaboratory comparative studies conducting. In each specific case, depending on the purpose and object of the study, taking into account the capabilities of the laboratory, the optimal technology for the identification and differentiation of mycobacteria isolated from biomaterial should be selected.

**Key words:** Drug Resistance, Molecular Diagnosis, Molecular Epidemiology, MTBC, Mutations, Mycobacterioses, Mycobacterium, NTM, Resistance, Tuberculosis.

### References

1. Adikaram Ch. P. Overview of Non Tuberculosis Mycobacterial Lung Diseases. *Mycobacterium – Research and Development*. 2018. Ch. 13. P. 257-286. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.73542>.
2. Afanasiev M. V. Molecular typing of clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*: abstract dis. ... cand. biol. sciences: 03.00.04. M., SRI Research Institute of Physical and Chemical Medicine, 2008. 24 p.
3. Algorithm for laboratory diagnosis and treatment-monitoring of pulmonary tuberculosis and drug-resistant tuberculosis using state-of-the-art rapid molecular diagnostic technologies: expert opinion of the European Tuberculosis Laboratory Initiative core group members for the WHO European Region. World Health Organization. Regional Office for Europe. 2017. 29 p. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/344108>.
4. Bagre A., Kumar Lariya N., Lal Kori M. Diagnosis of Tuberculosis: A core curriculum review *IJRAR*. 2019, V. 6. 1. P.1193-1217.
5. Barbova A. I., Zhurylo O. A., Trofimova P. S., Myronchenko S. V. Comparative results of drug resistance determining by molecular-genetic and phenotypic research methods. *Ukrainian Pulmonology Journal*. 2018, № 1 (S). P. 6-8.
6. Bergval I. L., Vijzelaar R. N. C. P., Dalla Costa E. R., Schuitema A. R. J., Oskam L., Kritski A. L., Klatser P. R., Anthony R. M. Development of Multiplex Assay for Rapid Characterization of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2008. 46. 2. P. 689–699.
7. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>.
8. Cherednyk Yu. A., Anoprienko O. V., Feshchenko Yu. I. Molecular and genetic typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Ukraine. *Ukrainian Pulmonology Journal*. 2005. 4. P. 66 - 68.
9. Clarridge J. E., III. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical*

*microbiology reviews*. 2004. Vol. 17, No. 4. P. 840–862. doi: 10.1128/CMR.17.4.840–862.2004.

10. Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know. Sixth Edition 2013. Chapter 4. Diagnosis of Tuberculosis Disease. URL: <https://www.medbox.org/document/introduction-to-the-core-curriculum-on-tuberculosis-what-the-clinician-should-know#GO>.
11. Dicks K.V., Stout J.E. Molecular Diagnostics for *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Annu. Rev. Med.* 2019. 70. P. 77-90.
12. Ergeshov A.E., Chernousova L.N., Andreevskaya S.N. New Technologies for the Diagnosis of Drug-Resistant Tuberculosis. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2019. 74 (6). P. 413–422. doi: 10.15690/vramn1163.
13. Faksri K., Xia E., Tan J.H., Teo Y.Y., Ong R.T. In silico region of difference (RD) analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex from sequence reads using RD-Analyzer. *BMC Genomics*. 2016. 17 (1). P. Article number: 847. doi: 10.1186/s12864-016-3213-1.
14. Feshchenko Y. I. Up-to-date tendencies in tuberculosis research. *Ukrainian Pulmonology Journal*. 2019. № 1. P. 8–24.
15. Fujiwara M., Kawasaki M., Hariguchi N., Liu Y., Matsumoto M. Mechanisms of resistance to delamanid, a drug for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2018. V. 108. P. 186-194. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.12.006>.
16. Gils T., Lynen L., de Jong B.C., Van Deun A., Decroo T. Pretomanid for tuberculosis: a systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 2022. 28 (1). P. 31-42. doi: 10.1016/j.cmi.2021.08.007. Epub 2021 Aug 14.
17. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization. 2019. 297 p. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565714>.
18. Islam M.M., Hameed H.M.A., Mugweru J., Chhotaray C., Wang C., Tan Y., Liu J., Li X., Tan S., Ojima I., Yew W.W., Nuermberger E., Lamichhane G., Zhang T. Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy. *J Genet Genomics*. 2017. 44 (1). P. 21-37. doi: 10.1016/j.jgg.2016.10.002.
19. Islam M.M., Tan Y., Hameed H.M.A., Liu Z., Chhotaray C., Liu Y., Lu Z., Cai X., Tang Y., Gao Y., Surineni G., Li X., Tan S., Guo L., Cai X., Yew W.W., Liu J., Zhong N., Zhang T. Detection of novel mutations associated with independent resistance and cross-resistance to isoniazid and prothionamide in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection* 2019. 25. P. 1041.e1-1041.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.12.008>
20. Jagielski T., Minias A., van Ingen J., Rastogi N., Brzostek A., Z'aczek A., Dziadek J. Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria.

- Clin Microbiol Rev. 2016. 29. P. 239-290. doi:10.1128/CMR.00055-15.
21. Kadura S., King N., Nakhoul M., Zhu H., Theron G., Köser C.U., Farhat M.J. Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed Mycobacterium tuberculosis drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid. *Antimicrob Chemother*. 2020. 75 (8). P. 2031-2043. doi: 10.1093/jac/dkaa136.
22. Kim H., Kim S.-H., Shim T.-S., Kim Mi-na, Bai G.-H. Differentiation of Mycobacterium species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (hsp65). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005. 55. P. 1649-1656. doi 10.1099/ijs.0.63553-0.
23. Leao S.C., Martin A., Mejia G.I., Palomino J.C., Robledo, J., da Silva Telles, M.A., Portaels F. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. 2004. 164 pp.
24. Liashenko O.O. Genotyping methods in phthysiology. *Tuberculosis Lung Diseases HIV Infection*. 2015. № 1 (20). P. 98 - 103.
25. Liu W., Li B., Chu H., Zhang Z., L. Luo, W. Ma, S. Yang, Q. Guo. Rapid Detection of Mutations in erm(41) and RRL Associated With Clarithromycin Resistance in Mycobacterium Abscessus Complex by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis *J Microbiol. Methods* 2017. Vol. 143. P. 87-93. doi: 10.1016/j.mimet.2017.10.010.
26. *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*. Allan L. Truant, editor-in-chief. 2nd edition. Hoboken, New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2016. Ch. 14 Mycobacteria. P. 273 - 283.
27. Mase A., Yamaguchi F., Funaki T., Yamazaki Y., Shikama Y., Fukuchi K. PCR amplification of the erm(41) gene can be used to predict the sensitivity of Mycobacterium abscessus complex strains to clarithromycin. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2020. 19. P. 945-955. DOI: 10.3892/etm.2019.8289.
28. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, 27-29 October 2020. Geneva: World Health Organization; 2021. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/meeting-report-of-the-who-expert-consultation-on-the-definition-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>.
29. Mehta P., Dahiya B., Sharma S., Singh N., Dharra R., Thakur Z., Mehta N., Gupta K.B., Gupta M.C., Chaudhary D. Immuno-PCR, a new technique for the serodiagnosis of tuberculosis. *J Microbiol Methods*. 2017. 139. P. 218-229.
30. Mokrousov I.V. Some features of genome structure and evolution of Mycobacterium tuberculosis *Infekc. immun.* 2011. Vol. 1. 3. P. 211–220.
31. Neonakis I. K., Gitti Z., Krambovitis E., Spandidos D. A. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *Journal of Microbiological Methods* 2008. 75. P. 1–11.
32. Nguyen T.V.A., Anthony R.M., Cao T.T.H., Bañuls A.L., Nguyen V.A.T., Vu D.H., Nguyen N.V., Alffenaar J.C. Delamanid Resistance: Update and Clinical Management. *Clin Infect Dis*. 2020. 71 (12). P. 3252-3259. doi: 10.1093/cid/ciaa755.
33. On the approval of the Instructions for Microbiological Diagnosis of Tuberculosis Order of the Ministry of Health from 27.06.2019 № 1462. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0886-19#Text>.
34. Parveen S., Arya D. Recent Advances in Diagnosis of Tuberculosis: A Review. *Int. J. Life. Sci. Scienti. Res*. 2018. 4 (1). P 1557-1562. doi:10.21276/ijlssr.2018.4.1.8.
35. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. World Health Organization. Geneva. 2008. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTML-TB-2008.392>.
36. *Practical Manual on Tuberculosis laboratory strengthening, 2022 update*. Geneva: World Health Organization; 2022. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061507>.
37. Rueda J., Realpe T., Mejia G.I., Zapata E., Roza J.C., Ferro B.E., Robledo J. Genotypic Analysis of Genes Associated with Independent Resistance and Cross-Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2015. 59(12). P. 7805-7810. doi: 10.1128/AAC.01028-15.
38. Sevastyanova E. V., Chernousova L. N. Modern algorithms of microbiological diagnostics of tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2018. Vol. 96. 7. P. 11-17. doi: 10.21292/2075-1230-2018-96-7-11-17.
39. Sharma N., Sharma V., Singh P.R., Jawed B., Babu V., Kandpal J., Nautiyal S.C., Singh R.K. Tuberculosis and Molecular Diagnosis. *WebmedCentral Biotechnology* 2013. 4 (2): WMC003992.
40. Skrypnyk A.V., Stegnyy B.T., Skrypnyk V.G., Zavgorodny A.I. Molecular genetic in-house methods for detection and species differentiation of mycobacteria used in veterinary phthysiology. *Works of the Federal Center for Animal Health*. 2008. 6. P. 171-185
41. Soini H., Musser J. M. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. *Clinical Chemistry* 2001. 47. 5. P. 809-814.
42. Somily A.M., Habib H.A., Sarwar M.S., Al-Beeshi N.Z., Alohalo R.M., Shakoor Z.A. Performance of the BD ProbeTec ET direct detection assay for the analysis of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and non-respiratory clinical specimens. *J Taibah Univ Med Sci*. 2016. 12(4). P. 364-368. doi: 10.1016/j.jtumed.2016.09.005.
43. Surkova L. K., Slizen V. V., Zalutskaya O. M. Correlation between molecular-genetic characteristics of Mycobacterium tuberculosis and prevalence,

manifestation and outcome of disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series. 2016. 4. P. 114–125.

44. The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. Expert group meeting report Geneva. 2013 World Health Organization 2013 WHO/HTM/TB/2013.01. 52 p.

45. Williams K. J., Ling C. L., Jenkins C., Gillespie S. H., McHugh T. D. A paradigm for the molecular identification of Mycobacterium species in a routine diagnostic laboratory. *Journal of Medical Microbiology* 2007, 56. P. 598-602. doi 10.1099/jmm.0.46855-0.

46. Yamada-Noda M., Ohkusua K., Hatac H., Monir Shaha M., Nhunga P.H., Suna X.S., Hayashia M., Ezakia T. Mycobacterium species identification – A new approach via dnaJ gene sequencing. *Systematic and Applied Microbiology* 2007. 30. P. 453-462. doi:10.1016/j.syapm.2007.06.003.

47. Yong Y.K., Tan H.Y., Saeidi A., Wong W.F., Vignesh R., Velu V., Eri R., Larsson M., Shankar E.M. Immune Biomarkers for Diagnosis and Treatment Monitoring of Tuberculosis: Current Developments and Future Prospects. 2019. *Front. Microbiol.* 10. Article 2789. doi: 10.3389/fmicb.2019.02789.

48. Zhao L, Sun Q, Liu H, Wu X, Xiao T, Zhao X, Li G, Jiang Y, Zeng C, Wan K. 2015. Analysis of *embCAB* mutations associated with ethambutol resistance in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015. 59 (4). P. 2045–2050. doi:10.1128/AAC.04933-14.

49. Zhou L., Ma C., Xiao T., Li M., Liu H., Zhao X., Wan K., Wang R. A New Single Gene Differential Biomarker for Mycobacterium tuberculosis Complex and Non-tuberculosis Mycobacteria. *Front. Microbiol.* 2019. 10. Article 1887. doi: 10.3389/fmicb.2019.01887.

50. Zhuang Z.G., Zhang J.A, Luo H.L., Liu G.B., Lu Y.B., Ge N.H., Zheng B.Y., Li R.X., Chen C., Wang X, Liu Y.Q., Liu F.H., Zhou Y., Cai X.Z., Chen Z.W., Xu J.F. The circular RNA of peripheral blood mononuclear cells: Hsa\_circ\_0005836 as a new diagnostic biomarker and therapeutic target of active pulmonary tuberculosis. *Mol Immunol.* 2017. 90. P. 264-272. doi: 10.1016/j.molimm.2017.08.008.

51. Zimina V.N., Degtyaryova S.Yu., Beloborodova E.N., Kulabukhova E.I., Rusakova L.I., Fesenko O.V. A current state of mycobacterioses. *CMAC.* 2017. 19.4. P. 276-282.