

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ФТИЗІАТРІЇ І
ПУЛЬМОНОЛОГІЇ ІМ. Ф. Г. ЯНОВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ім. М.І. ПИРОГОВА

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

АЛІЄВА НАТАЛЯ МИКОЛАЇВНА

УДК: 616.24–002.5-07:615.015.8:575.191.001.5.

ДИСЕРТАЦІЯ
ВИЯВЛЕННЯ М. TUBERCULOSIS І ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ
МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ СТІЙКОСТІ В УМОВАХ ВИКОРИСТАННЯ
НОВИХ ФЕНО-ГЕНОТИПІЧНИХ МЕТОДІВ

03.00.07 – мікробіологія

22 – охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають
посилання на відповідне джерело



Н.М. Алієва

Науковий керівник
Журило Олександр Анатолійович
доктор медичних наук, доцент

Київ – 2017

АНОТАЦІЯ

Алієва Н. М. Виявлення *M. tuberculosis* і визначення їх медикаментозної стійкості в умовах використання нових фено-генотипічних методів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.07 «Мікробіологія». – Державна установа «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського Національної академії медичних наук України», Київ, 2017; Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова Міністерства охорони здоров'я України, Вінниця, 2017.

У роботі вирішено актуальне наукове завдання сучасної мікробіології – підвищено ефективність лабораторної діагностики туберкульозу, стандартизовано виділення мікобактерій з визначенням їх медикаментозної стійкості у хворих на туберкульоз легень в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960, обґрунтовано її використання в комбінації з новими молекулярно-генетичними системами для швидкої діагностики туберкульозної інфекції GeneXpert MTB/RIF і GenoType, розроблено алгоритм лабораторної діагностики і визначення чутливості *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів.

Використання модифікованого щільного середовища для субкультивування позитивних зразків після вирощування в системі ВАСТЕС MGIT 960 скорочує середню тривалість субкультивування позитивних культур у 1,8 рази, тобто на 7,4 доби; середню тривалість виділення мікобактерій в 1,3 рази. Діагностична ефективність виділення культур мікобактерій в системі ВАСТЕС MGIT 960 склала 92,1%, що достовірно перевищує діагностичну ефективність методу посіву на щільне середовище Левенштейна-Єнсена: середня тривалість росту культур в рідкому середовищі склала 11,5 діб, що в

3,1 рази менше за терміни культивування збудника туберкульозу на класичному щільному середовищі.

Установлено, що культивування зразків мокротиння від хворих з різними категоріями захворювання на туберкульоз за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960 виявило додатково в середньому 18,2 % хворих у порівнянні з класичним культуральним методом діагностики.

Рідке живильне середовище доцільно використовувати, в першу чергу, для пацієнтів I-ої клінічної категорії (додатково виявлено 22,5 % випадків), визначена доцільність використання рідкого середовища для виявлення бактеріовиділювачів з діагнозом ВДТБ (додатково виявлено 22,1 % випадків), а також для діагностики РТБ (додатково виявлено 19,4 % випадків) і при обстеженні пацієнтів, що знаходилися в контакті з хворими на МРТБ (додатково виявлено 28,8 % випадків).

Доведено, що доцільно використання рідкого середовища для діагностики туберкульозу у дітей. Культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960 виявило *M. tuberculosis* у 13,6 % дітей з клінічним діагнозом «туберкульоз», що майже у 2,7 разів більше, ніж діагностика бактеріовиділення у дітей на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена.

Визначено “критичні” концентрації препаратів 2-го ряду – етіонаміду, капреоміцину, офлоксацину, амікацину, моксифлоксацину, левофлоксацину, протіонаміду і резервного ряду – лінезоліду при використанні їх для тесту медикаментозної чутливості (ТМЧ) в рідкому живильному середовищі Middlebrook 7H9 із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960, що дозволило вперше в Україні розробити стандартну методику визначення медикаментозної стійкості *M. tuberculosis* в системі ВАСТЕС MGIT 960 до препаратів 2-го ряду і резервного препарату – лінезоліду.

Застосування систем GeneXpert MTB/RIF, GenoType і ВАСТЕС MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень за діагностичною цінністю переважає класичний бактеріологічний метод дослідження хворих на туберкульоз легень і пацієнтів з підозрою на

туберкульоз. Ефективність комбінованого застосування систем GeneXpert MTB/RIF і BACTEC MGIT 960 при діагностиці випадків МРТБ складає 93,7%, що дає підстави використовувати дані системи для швидкої діагностики, насамперед, випадків мультирезистентного туберкульозу. Обґрунтовано застосування молекулярно-генетичних систем GenoType і GeneXpert MTB/RIF для досліджень клінічного матеріалу пацієнтів з підозрою на туберкульоз та хворих з встановленим клінічним діагнозом залежно від клінічної категорії захворювання на підставі того, що вони дозволяють додатково виявити 11,2% та 11,6% бактеріовиділювачів серед хворих I-ої та II-ої категорій відповідно.

Обґрунтовано комбіноване застосування систем GeneXpert, GenoType і BACTEC MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень і запропонований діагностичний алгоритм їх комплексного використання при виявленні *M. tuberculosis*, суть якого полягає в тому, що в Україні в лабораторіях 3-го рівня, по-перше, в процесі індикації і ідентифікації *M. tuberculosis* комплекс досліджень з використанням гено-фенотипічних систем потрібно здійснювати з однієї проби отриманого мокротиння після передпосівної обробки з утвореного осаду; по-друге, обґрунтований і запропонований об'єм лабораторних досліджень необхідно проводити залежно від клінічної категорії процесу та випадку захворювання на туберкульоз легень.

Алгоритм гено-фенотипічної діагностики туберкульозу регламентований Наказом МОЗ України № 620 від 04.09.2014 р.

За результатами роботи встановлені основні підходи до створення і функціонування системи управління якістю досліджень в лабораторіях, що здійснюють мікробіологічну діагностику туберкульозу, яка спрямована на підвищення ефективності лікувально-діагностичного процесу, зменшення невиправданих витрат та ризиків для пацієнтів, зниження захворюваності та смертності, збільшення очікуваної тривалості життя населення України (Регламентовано Наказом МОЗ України № 786 від 28.07.2016 р. «Про затвердження Положення про систему управління якістю досліджень в лабораторіях, що здійснюють мікробіологічну діагностику туберкульозу»).

Ключові слова: туберкульоз, *M. tuberculosis*, мультирезистентність, гено- фенотипічна діагностика туберкульозу, прискорена діагностика туберкульозу.

SUMMARY

Aliieva N.M. Detection of *M. tuberculosis* and determination of their drug resistance in the terms of use of new phenomenon genotypic methods. – Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the scientific degree of the candidate of medical sciences in specialty 03.00.07 «Microbiology». The State Establishment «National Institute of Phthisiology and Pulmonology named after F. H. Yanovskyi, National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kiev, 2017; National Pirogov Memorial Medical University Ministry of Public health of Ukraine, Vinnitsa, 2017.

The topical scientific problem of modern Microbiology was determined in the dissertation – the efficiency of laboratory diagnosis of TB was improved, the discharge of mycobacteria with the determination of their drug resistance in patients with pulmonary tuberculosis in liquid medium in the BACTEC MGIT 960 system was standardized, its use in combination with a new molecular-genetic systems for rapid diagnosis of TB infection by GeneXpert MTB/RIF and GenoType was justified, the algorithm of laboratory diagnosis and determination of sensitivity to antituberculosis *M. tuberculosis* drugs was made.

The use of modified dense medium for subcultivation positive samples after cultivation in BACTEC MGIT 960 system allows to reduce the average duration of subcultivation positive cultures in 1.8 times, i.e. on 7.4 days; the average duration of discharge of mycobacteria in 1.3 times. The diagnostic efficiency of discharge of the cultures of mycobacteria in the BACTEC MGIT 960 system was 92.1%, which significantly exceeds diagnostic efficiency of the method of planting on a dense the Löwenstein–Jensen medium: the average length growth of cultures in liquid medium

was 11.5 days, which is 3.1 times less than the periods of cultivation of tuberculosis etiological agent on the classical dense medium.

It was approved that the cultivation of sputum specimens from patients with different categories of tuberculosis by the BACTEC MGIT 960 system allows us to identify additionally in average of 18.2 % of patients compared with the classical culture-based method of diagnosis.

Liquid nutrient medium is reasonable primarily for patients of first clinical category (additionally 22.5% of cases was found), reasonability of using liquid medium for detection of smear-positive patients with a diagnosis of new case of TB was determined (additionally 22.1% of cases was identified), for R-TB diagnosis (additionally 19.4% cases was revealed) and during the examination of patients who had contact with patients with MDR-TB were identified (also 28.8% of cases was found).

It is proved that it is reasonable to use liquid media for diagnosis of tuberculosis in children. Cultivation in BACTEC MGIT 960 system gave us the opportunity to identify *M. tuberculosis* in 13.6% of children with a clinical diagnosis of tuberculosis, which is almost in 2.7 times more than the diagnosis of bacterial discharge in children on a dense Lowenstein-Jensen medium.

The «critical» concentrations of drugs 2nd row are ethionamide, capreomicin, ofloxacin, amikacin, moxifloxacin, levofloxacin, protionamide and reserve row such as linezolid were determined when they were used to test of drug sensitivity (TDS) in a liquid nutrient medium Middlebrook 7H9 with the use of WASTES MGIT 960 system, which allowed first in Ukraine to develop a standard method of determining drug resistance of *M. tuberculosis* in the BACTEC MGIT 960 system, to the drugs of the 2nd row and the reserve drug is linezolid.

The application of GeneXpert MTB/RIF, GenoType and WASTES MGIT 960 systems for studies of clinical material of patients with pulmonary tuberculosis in the diagnostic value dominates classical bacteriological method for examination of patients with pulmonary tuberculosis and patients with suspected tuberculosis. The efficacy of the combined application of GeneXpert MTB/RIF and MGIT 960

WASTES systems in the diagnosis of cases MDR-TB is 93.7%, which gives the reason to use these systems for rapid diagnosis, particularly cases of multidrug-resistant tuberculosis. The use of molecular genetic system GenoType and GeneXpert MTB/RIF for studies of clinical samples of patients with suspected TB and patients with established clinical diagnosis depends on the clinical categories of the disease based on the fact that they make it possible to identify 11.2% and 11.6% of patients discharge bacteria among I-st and II-nd category, relatively was justified.

The combined use of GeneXpert GenoType and WASTES MGIT 960 systems for studies of clinical material of patients with pulmonary tuberculosis and proposed diagnostic algorithm for their integrated use in the identifying of *M. tuberculosis* were justified, the essence of which consists of the fact that in the laboratory of the 3rd level of Ukraine, first, in the process of indication and identification of *M. tuberculosis* complex studies with the using of Geno-phenotypic systems is necessary to carry out from one sample of sputum obtained after pre-treatment with sediment; second, the reasonable and the proposed volume of laboratory studies is necessary to carry out depending on the clinical category of the process and cases of tuberculosis of the lungs.

The algorithm Geno-phenotypic diagnosis of tuberculosis is regulated by Order of The Ministry of Healthcare of Ukraine № 620 from 04.09.2014 year.

The main approaches to the establishment and operation of the quality management system of research in laboratories engaged in microbiological diagnosis of tuberculosis, focused on improving the efficiency of medical-diagnostic process, reduce unreasonable expenses and risks for patients, reduce morbidity and mortality, increasing longevity of the Ukrainian population were defined by results of our work (Regulated by Order of The Ministry of Healthcare of Ukraine № 786 from 28.07.2016 year «On approval of Provisions on the system of quality management research in laboratories engaged in microbiological diagnosis of tuberculosis»).

Key words: tuberculosis, *M. tuberculosis*, multiresistant, Geno-phenotypic diagnosis of tuberculosis, rapid diagnostics of tuberculosis.

Список публікацій здобувача

1. Порівняльна характеристика якості життя та стану здоров'я хворих інфільтративним туберкульозом легень в динаміці на різних етапах медичної реабілітації / Ю.П. Цапенко, М.Г. Бойко, О.О. Краєвська, Н.М. Алієва, Ю.О. Красношарпа // Світ медицини та біології. – 2012. – № 3. – С. 112–115.
2. Барбова А. І. Використання нової молекулярно-генетичної системи GeneXpert і рідкого живильного середовища в системі ВАСТЕС MGIT для швидкої діагностики туберкульозу / А.І. Барбова, О.А. Журило, Н.М. Алієва // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика. – 2015. – С. 423–430.
3. Експериментальні дослідження по підвищенню ефективності виділення мікобактерій з клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень з використанням рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 / А.І. Барбова, О.А., Журило, Н.М. Алієва, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко // Український пульмонологічний журнал. – 2015. – № 3. – С. 56–60.
4. Використання нової молекулярно-генетичної системи GenoType і рідкого живильного середовища для швидкої діагностики туберкульозу / А.І. Барбова, Л.В. Гайова, О.А. Журило, П.С. Трофімова, Н.М. Алієва // Scientific J. «ScienceRise». – 2015. – № 10/3 (15). – С. 29–37.
5. Варіанти моно- і полірезистентності МБТ до протитуберкульозних препаратів 1 ряду у хворих з новими і повторними випадками туберкульозу / А.І. Барбова, С.О. Черенько, Г.В. Старичек, О.В. Аврамчук, М.В. Погребна, Н.М. Алієва // Туберкульоз. Легеневі хвороби. ВІЛ-інфекція. – 2016. – № 1. – С. 23–26.
6. Визначення критеріїв резистентності *M.tuberculosis* до препаратів 2-го і резервного ряду за допомогою рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 / А.І. Барбова, О.А. Журило, Н.М. Алієва, Л.М. Сладкова // Український пульмонологічний журнал – 2017. – № 1. – С. 47–52.

7. Пат. 99799 Україна, МПК⁹ С 12 N 1/02, С 12 Q 1/02. Спосіб визначення чутливості *M.tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів в дослідному матеріалі хворих на туберкульоз легень / Журило О.А., Барбова А.І., Алієва Н.М., Трофімова П.С., Миронченко С.В.; заявник і патентовласник ДУ «Націонал. ін.-т фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМНУ». – № u 201414019; заявл. 29.12.14; опубл. 25.06.15, Бюл. № 12. – 1 с.

8. Спосіб визначення чутливості *M.tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів в дослідному матеріалі хворих на туберкульоз легень: інформаційний лист / О.А. Журило, А.І. Барбова, Н.М. Алієва, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко; НІФП ДУ НАМН України. – К.: НІФП, 2015. – 4 с.

9. Алгоритм бактеріологічного обстеження на туберкульоз внутрішньо переміщених осіб з регіонів із високою захворюваністю туберкульозом та біженців з тимчасово окупованих територій України: інформаційний лист / А.І. Барбова, О.А. Журило, Н.М. Алієва, Н.А. Рохманова; НІФП НАМН України. – К.: НІФП, 2015. – 4 с.

10. Критерій резистентності мікобактерій туберкульозу до канаміцину в рідкому живильному середовищі Міддлбрук 7Н9 в системі ВАСТЕС 960: інформаційний лист / О.А. Журило, А.І. Барбова, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко, Н.М. Алієва; НІФП НАМН України. – К.: НІФП, 2015. – 4 с.

11. Стратегічні напрями розвитку лабораторної діагностики туберкульозу в Україні / Ю.І. Феценко, О.А. Журило, А.І. Барбова, О.Э. Хейло, О.Р. Сметаніна, М.М. Карнаухова, Н.А. Гріцова, Н.М. Алієва. – К.: ВСВ «Медицина», 2017. – 120 с.

12. Частота первинної медикаментозної резистентності мікобактерій туберкульозу у хворих на вперше діагностований деструктивний туберкульоз легень в Полтавській області / А.Г. Ярешко, А.К. Вородюхіна, Н.М. Алієва, Ю.В. Визір // XIII Конгрес Світової Федерації українських лікарських товариств: Тез. доп. – Львів, 2010. – С. 269.

13. Динаміка частоти та профілю медикаментозної резистентності

мікобактерій туберкульозу у хворих на вперше діагностований туберкульоз легень в Полтавській області / А.Г. Ярешко, М.Г. Бойко, М.В. Куліш, А.К. Вородюхіна, Н.М. Алієва // Матеріали V з'їзду фтизіатрів і пульмонологів України. – Київ, 2013. – С. 250.

14. Ефективність комплексного застосування гено- та фенотипових методів бактеріологічної діагностики туберкульозу / О.А. Журило, А.І. Барбова, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко, Н.М. Алієва, І.В. Дідик // V міжнародний медичний конгрес «Впровадження сучасних досягнень у практику охорони здоров'я України»: Тез. доп. – Київ, 2016. – С.19.

15. Епідеміологічний нагляд за медикаментозною стійкістю збудника туберкульозу в Україні / А.І. Барбова, О.А. Журило, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко, Н.М. Алієва // V міжнародний медичний конгрес «Впровадження сучасних досягнень у практику охорони здоров'я України»: Тез. доп. – Київ, 2016. – С.10–11.

ЗМІСТ

| | С. |
|--|----|
| АНОТАЦІЯ..... | 2 |
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ..... | 14 |
| ВСТУП..... | 17 |
| РОЗДІЛ 1 СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ТА МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ М. TUBERCULOSIS І ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ ЧУТЛИВОСТІ ДО ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)..... | 27 |
| 1.1. Стан проблеми туберкульозу в світі та ситуація з туберкульозу в Україні, роль мікробіологічних досліджень як складової діагностичного процесу та при контролі ефективності хіміотерапії..... | 27 |
| 1.2. Фенотипічні методи бактеріологічної діагностики туберкульозу і експрес-методи індикації та ідентифікації М. tuberculosis, визначення їх чутливості до протитуберкульозних препаратів..... | 31 |
| 1.3. Молекулярно-біологічні методи індикації та ідентифікації штамів М. tuberculosis, визначення їх чутливості до протитуберкульозних препаратів..... | 38 |
| РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ..... | 48 |
| 2.1. Об'єкти дослідження..... | 48 |
| 2.2. Методи дослідження..... | 49 |
| 2.2.1. Первинна обробка матеріалу, виділення штамів мікобактерій, їх ідентифікація..... | 49 |
| 2.2.2. Одержання первинної культури мікобактерій в системі ВАСТЕС MGIT 960..... | 50 |
| 2.2.3. Дослідження медикаментозної стійкості мікобактерій в системі ВАСТЕС MGIT 960..... | 52 |

| | | |
|----------|---|-----|
| | | 12 |
| 2.2.4. | Молекулярно-генетичні методи дослідження..... | 53 |
| 2.3. | Статистична обробка отриманих результатів..... | 55 |
| РОЗДІЛ 3 | ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ З ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ВИДІЛЕННЯ МІКОБАКТЕРІЙ З КЛІНІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ХВОРИХ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ В СИСТЕМІ ВАСТЕС MGIT 960..... | 57 |
| РОЗДІЛ 4 | ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЩОДО ВИДІЛЕННЯ МІКОБАКТЕРІЙ ТРАДИЦІЙНИМ СПОСОБОМ ТА З ВИКОРИСТАННЯМ РІДКОГО ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА І МОДИФІКОВАНОГО ЩІЛЬНОГО ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА В СИСТЕМІ ВАСТЕС MGIT 960..... | 70 |
| РОЗДІЛ 5 | ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ СИСТЕМИ ВАСТЕС MGIT 960 ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ КЛІНІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ХВОРИХ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ ЗАЛЕЖНО ВІД КЛІНІЧНОЇ КАТЕГОРІЇ..... | 77 |
| РОЗДІЛ 6 | ВИЗНАЧЕННЯ КРИТЕРІЇВ РЕЗИСТЕНТНОСТІ M. TUBERCULOSIS ДО ПРЕПАРАТІВ 2-ГО І РЕЗЕРВНОГО РЯДУ В РІДКОМУ ЖИВИЛЬНОМУ СЕРЕДОВИЩІ В СИСТЕМІ ВАСТЕС MGIT 960..... | 86 |
| РОЗДІЛ 7 | ВИЗНАЧЕННЯ СХЕМИ ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ШВИДКОЇ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ І ФЕНОТИПІЧНОЇ СИСТЕМИ ВАСТЕС MGIT 960. РОЗРОБКА ДІАГНОСТИЧНОГО АЛГОРИТМУ..... | 100 |
| 7.1. | Встановлення особливостей використання систем GeneXpert і ВАСТЕС MGIT 960 для швидкої діагностики туберкульозу та обґрунтування оптимальної схеми їх комплексного застосування..... | 100 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 7.2. | Встановлення особливостей використання систем GenoType і ВАСТЕС MGIT 960 для швидкої діагностики туберкульозу, визначення чутливості <i>M. tuberculosis</i> до протитуберкульозних препаратів 1-го і 2-го ряду та обґрунтування оптимальної схеми їх комплексного застосування..... | 107 |
| 7.3. | Розробка алгоритму гено-фенотипічної діагностики туберкульозу..... | 117 |
| 7.3.1. | Алгоритм лабораторної діагностики випадку туберкульозу... | 119 |
| 7.3.2. | Алгоритм дій після отримання результату дослідження з системи GeneXpert..... | 119 |
| 7.3.3. | Використання системи гібридизації із типоспецифічними зондами (GenoType)..... | 125 |
| 7.3.4. | Алгоритм дій після отримання результату дослідження з системи GenoType..... | 126 |
| РОЗДІЛ 8 | ОБґРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ СИСТЕМ GENEXPERT ТА GENOTYPE ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ КЛІНІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ПІДОЗРОЮ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ТА ХВОРИХ ІЗ ВСТАНОВЛЕНИМ ДІАГНОЗОМ ЗАЛЕЖНО ВІД КЛІНІЧНОЇ КАТЕГОРІЇ ЗАХВОРЮВАННЯ..... | 133 |
| | АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ..... | 140 |
| | ВИСНОВКИ..... | 167 |
| | ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ..... | 170 |
| | СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ..... | 171 |
| | ДОДАТКИ..... | 199 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

| | |
|-------------|---|
| абс | – абсолютна величина |
| ВДТБ | – вперше діагностований туберкульоз легень |
| Дестр. | – деструктивний туберкульоз |
| ДНК | – дезоксирибонуклеїнова кислота |
| ІР | – індекс росту |
| Кат. | – категорія |
| Ког. | – когорта |
| КСБ | – кислотостійкі бактерії |
| КС | – коефіцієнт стійкості |
| КУО | – колонієутворююча одиниця |
| М | – мазок |
| МІК | – мінімальна інгібуюча концентрація |
| МР | – медикаментозна резистентність |
| МРТБ | – мультирезистентний туберкульоз |
| МС | – медикаментозна стійкість |
| МБТ | – мікобактерії туберкульозу |
| НТМБ | – нетуберкульозні мікобактерії |
| ПДРФ (RFLP) | – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів |
| ПЛР | – полімеразна ланцюгова реакція |
| п.н. | – пара нуклеотидів |
| ПР | – первинна резистентність |
| ПТЗ | – протитуберкульозні заклади |
| ПТП | – протитуберкульозні препарати |
| Резист. | – резистентність |
| РМРТБ | – ризик розвитку мультирезистентного туберкульозу |
| РНК | – рибонуклеїнова кислота |
| РТБ | – рецидив туберкульозу |
| ТБ | – туберкульоз |

| | |
|-------------|---|
| ТМС | – тест медикаментозної стійкості |
| ТМЧ | – тест медикаментозної чутливості |
| об/хв. | – обертів у хвилину |
| у.о. | – умовні одиниці |
| ХР | – хіміорезистентність |
| ХП | – хіміопрепарати |
| ХРТБ | – хіміорезистентний туберкульоз |
| ХТБ | – хронічний туберкульоз |
| ЦЛКК | – Центральна лікарська консультативна комісія |
| CFU | – колонієформуюча одиниця бактерій |
| DMSO | – димексидсульфоксид |
| DPO | – dual-priming oligonucleotide |
| GU | – одиниця росту (growth unit) |
| ID TBc MGIT | – імунохроматографічний ідентифікаційний тест |
| IS | – інсерційна послідовність (Insertion sequence) |
| McF | – стандарт каламутності |
| MDR | – мультирезистентний туберкульоз (multidrug resistance) |
| MMC | – множинна медикаментозна стійкість |
| MGIT | – Mycobacteria Growth Indicator Tube |
| NALC-NaOH | – N-ацетил-L-цистеїн з гідроксидом натрію |
| RD | – регіони відмінностей (region of difference) |
| RRDR | – rifampin resistance determining region |
| SNP | – поліморфізм поодиноких нуклеотидів (Single nucleotide polymorphism) |
| Am | – амікацин |
| H | – ізоніазид |
| INH | – ізоніазид |
| E | – етамбутол |
| Et | – етіонамід |
| Km | – канаміцин |

| | |
|-----|-------------------------------|
| R | – рифампіцин |
| RIF | – рифампіцин |
| S | – стрептоміцин |
| Cfx | – ципрофлоксацин |
| Cm | – капреоміцин |
| Cs | – циклосерин |
| Ofx | – офлоксацин |
| Z | – піразінамід |
| Mfx | – моксифлоксацин |
| Lfx | – левофлоксацин |
| Pas | – парааміносаліцилова кислота |
| Pt | – протіонамід |
| Lzd | – лінезолід |
| Q | – фторхінолони |

ВСТУП

Актуальність теми

Туберкульоз (сухоти) є найдавнішим і найбільш поширеним інфекційним захворюванням, яке, на відміну від інших інфекцій, має хронічний перебіг, що призводить до можливості багаторазового зараження оточуючих осіб різними штамми збудника, в тому числі резистентними, досить незначною кількістю хворих. Захворювання розвивається, як правило, поступово: від зараження до появи симптомів може пройти кілька місяців, іноді років [4, 11, 12, 14, 18, 23, 24, 32, 36, 44, 67, 71, 99, 116, 206, 226]. Інфекцію викликають бактерії роду *Mycobacterium* родини *Mycobacteriaceae*, типовим видом якої і є *Mycobacterium tuberculosis* [14, 31, 37, 41, 66, 69, 82, 95, 102, 151, 175].

Наразі у всьому світі відбулося зростання частоти хіміорезистентності мікобактерій туберкульозу (МБТ) до основних протитуберкульозних препаратів (ПТП) (ізоніазиду (H) та рифампіцину (R)), що спричинило значне зниження ефективності антимікобактеріальної терапії при застосуванні існуючої ДОТС-стратегії контролю за туберкульозом [4, 11, 12, 16, 20, 44, 59, 108, 114, 117, 1232, 174, 200].

Сучасна бактеріологія вивчає питання біології резистентного туберкульозу, розробляє швидкі тести отримання результатів резистентності збудника, вивчає спектр медикаментозної стійкості (МС) МБТ за результатами тестування у спеціалізованих лабораторіях [8, 15, 17, 34, 35, 47, 52, 58, 75, 91, 109, 141, 225, 230, 244, 255].

Одним із чинників, що наразі вимагає значної корекції стратегії боротьби з туберкульозом у світовому масштабі, є МС збудника. Феномен МС МБТ і поширення її загрозливими темпами у багатьох країнах світу, в тому числі і в Україні, є результатом впливу біологічних, медичних, соціальних і економічних факторів. МС МБТ позбавляє охорону здоров'я найбільш

ефективного засобу боротьби з туберкульозом – хіміотерапії, яка базується на використанні низки ПТП [11, 14, 93, 97, 98, 103, 163, 174, 196].

Несприятлива епідемічна ситуація з туберкульозу в Україні потребує постійного удосконалення методів виявлення та діагностики захворювань на туберкульоз серед населення з метою зниження інфікованості, захворюваності та обмеження і зменшення резервуару туберкульозної інфекції [62, 88, 93, 96, 97, 99, 203].

Захворювання на туберкульоз у більшості хворих діагностується несвоєчасно, що знижує ефективність лікування навіть при застосуванні сучасних методів хіміотерапії. Такі хворі створюють велику епідемічну небезпеку для оточуючих, особливо дитячого віку. Етіологічне підтвердження діагнозу туберкульозу за допомогою бактеріологічних і молекулярно-генетичних досліджень гарантованої якості, сучасне облаштування бактеріологічних лабораторій протитуберкульозних закладів (ПТЗ) України, епіднагляд за МС є основою сучасної клінічної фтизіатрії [112, 117, 119, 201, 221].

На час епідемії туберкульозу в країні одним із пріоритетних напрямків у системі протитуберкульозних заходів є підвищення рівня своєчасної ефективної діагностики хвороби. На бактеріологічні лабораторії покладається особлива функція у питаннях діагностики заразних випадків захворювання на туберкульоз та моніторингу ефективності процесу лікування. Саме тому важливим напрямком удосконалення та оптимізації роботи лабораторій протитуберкульозної служби є обов'язкова стандартизація основних бактеріологічних і молекулярно-генетичних методів дослідження. Впровадження їх в роботу дозволяють отримувати результати, які можуть бути порівняні з результатами досліджень інших лабораторій, що дає можливість своєчасно виявляти та реагувати на помилки діагностики, проводити оптимальне специфічне лікування хворих, оптимізувати та полегшити навчання фахівців, оцінювати якість роботи лабораторій, окремих фахівців та проводити

уніфікований контроль ефективності лабораторних досліджень [18, 22, 33, 55, 57, 58, 82, 1888, 206, 245, 257].

Традиційні мікробіологічні методи виявлення збудника за своєю ефективністю вже давно не задовольняють клініцистів. Зараз впроваджується низка нових фенотипічних методів, які дозволяють отримати результати шляхом використання різних технологій щодо виявлення ранніх ознак росту мікобактерій [11, 14, 55, 64, 82, 92, 106, 194, 230, 244].

З'явилося кілька систем на рідких середовищах (ВАСТЕС®, ВАСТЕС MGIT, ESP) для дослідження МБТ. Впровадження радіометричної системи ВАСТЕС® ТВ-460 стало проривом в експрес-виявленні росту мікобактерій [1, 10, 27, 36, 64, 73, 82, 181, 207, 229, 230, 244, 256].

Нині пропонуються автоматичні аналізатори бактеріологічних культур “МВ/Vast”, “ВАСТЕС MGIT 960”, в яких використовуються рідкі живильні середовища [10, 11, 14, 645, 82, 114, 104, 262].

Останні досягнення в області молекулярної біології і доробки у вивченні молекулярних основ МС *M. tuberculosis* надали нові методи швидкого виявлення МБТ в дослідному матеріалі [124, 127, 131, 137, 141, 189, 204, 238].

Більшість методів на основі ДНК/РНК детекції, які наразі застосовуються для виявлення вже відомих і відкриття нових мікроорганізмів базуються на трьох технологіях. Це – ПЛР-технологія, олігонуклеотидні мікрочипи і секвенування ДНК [56, 197, 222]. Наявна велика кількість комерційних наборів для виділення ДНК з дослідного матеріалу (фірми Qiagen (США), Roche (Німеччина), Seegen Inc. (Корея), АмпліСенс (Росія) та ін.), в яких ДНК максимально очищується та позбавляється інгібіторів ПЛР [202].

ПЛР у сполученні з гібридизацією є одним із поширених методів виявлення поліморфних ділянок у геномі *M. tuberculosis-complex* і водночас засобом підвищення чутливості й специфічності методу ПЛР для видової чи штамової ідентифікації *M. tuberculosis-complex* та загалом мікобактерій. Цей метод є основою багатьох тест-систем з використанням мішеней гену 16S *rRNA* 16S-23S *rRNA* ITS (AccuProbe (Gen-Probe, США), Cobas Amplicor (Roche

Molecular System, Branchburg, N. J.), INNO-LiPA Mycobacteria (Innogenetics, Бельгія)) [11, 14, 30, 85, 111, 114, 133, 189, 205, 211, 224], а також технології мікрочипів.

Можливість моніторингу ПЛР в реальному часі стало своєрідною революцією, як у кількісній оцінці ДНК і РНК, так і загалом ПЛР-діагностиці. Переваги ПЛР у реальному часі для виявлення мікроорганізмів включають можливість кількісної оцінки, більшу чутливість, відтворюваність і точність, поліпшення контролю якості, швидкий аналіз і більш низький ризик контамінації через відсутність необхідності нанесення зразків на гель.

Зусиллями представників комерційних (Cepheid, Sunnyvale, USA) і некомерційних організацій було розроблено автоматизований картриджний діагностичний тест на основі проб Molecular Beacons – «Xpert MTB/RIF», який може одночасно визначати *M. tuberculosis* та стійкість до R [159]. Система використовує принцип напівгніздової ПЛР та складається із трьох пар праймерів та п'яти олігонуклеотидних проб.

З метою підвищення ефективності діагностики туберкульозу все частіше використовується наступний підхід: поєднання молекулярно-генетичної діагностики із наступним культуральним посівом на рідкі живильні середовища [6, 73, 82, 96, 97, 114, 189, 204, 209].

Впровадження в практику роботи лабораторій різноманітних схем генотипічної і фенотипічної діагностики туберкульозу сприяє максимальному скороченню термінів індикації та ідентифікації мікобактерій. Комбіноване використання цих методів дозволяє отримати більш повну інформацію щодо збудника туберкульозу та здійснити його виділення із організму людини у випадках захворювання на олігобацилярний туберкульоз [6, 11, 82, 92, 189, 256].

Отже, використання сучасних фенотипічних і генотипічних методів у вивченні біології мікобактерій, застосування в практиці охорони здоров'я молекулярних методів у сполученні з рутинними і найновішими експрес-фенотипічними методами, дозволяє покращити діагностику збудника в бактеріологічних лабораторіях ПТЗ України.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана в рамках НДР лабораторії мікробіології ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України» А.13.08 «Розробити алгоритм гено-фенотипічної діагностики туберкульозу з раннім визначенням резистентності мікобактерій до антимікобактеріальних препаратів», № д/р 0113U000267, 2015 – 2017 рр.

Мета і задачі дослідження

Мета дослідження: підвищення ефективності діагностики туберкульозу, стандартизація виділення мікобактерій та визначення їх медикаментозної стійкості у хворих на туберкульоз легень в рідкому живильному середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 з обґрунтуванням комбінованого використання її з новими молекулярно-генетичними системами для швидкої діагностики туберкульозної інфекції.

Задачі дослідження:

1. Провести порівняльні дослідження щодо виділення мікобактерій традиційним способом та з використанням рідкого живильного середовища і модифікованого щільного живильного середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960.
2. Обґрунтувати застосування системи ВАСТЕС MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень залежно від клінічної категорії туберкульозного процесу.
3. Дослідити критерії резистентності *M. tuberculosis* до препаратів 2-го і резервного ряду в рідкому живильному середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 та розробити стандартну технологію визначення медикаментозної стійкості до цих препаратів в системі ВАСТЕС MGIT 960.
4. Обґрунтувати оптимальну схему комплексного використання рідкого живильного середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960 і молекулярно-генетичних систем GeneXpert і GenoType для швидкої діагностики туберкульозної інфекції, розробити діагностичний алгоритм їх комплексного використання щодо виявлення мікобактерій туберкульозу.

Об'єкт дослідження – біологічні властивості штамів *M. tuberculosis*, виділених від хворих на туберкульоз легень.

Предмет дослідження – методи виділення штамів *M. tuberculosis*, визначення їх чутливості до протимікробних засобів, молекулярно-генетична ідентифікація.

Методи дослідження: мікробіологічні (мікроскопія, виділення чистих культур клінічних штамів мікобактерій, дослідження їх біологічних властивостей, визначення чутливості до антимікробних препаратів; застосування системи ВАСТЕС MGIT 960 – для одержання первинної культури *M. tuberculosis*, і визначення медикаментозної стійкості), імунохроматографічний метод (ідентифікація виділених штамів мікобактерій), молекулярно-генетичні (ідентифікація мікобактерій, визначали їх резистентності до лікарських засобів), статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів

Підвищена ефективність виділення *M. tuberculosis* з мокротиння хворих на туберкульоз легень в рідкому живильному середовищі за рахунок використання модифікованого щільного живильного середовища для субкультивування позитивних зразків після вирощування в системі ВАСТЕС MGIT 960, що дозволяє у 1,8 разів скоротити виділення чистої культури *M. tuberculosis* на щільному середовищі, тобто на 7,4 доби; середня тривалість виділення мікобактерій із застосуванням рідкого середовища та модифікованого щільного середовища для субкультивування склала 18,9 днів, що в 1,3 рази менше тривалості виділення мікобактерій із застосуванням рідкого середовища та класичного середовища Левенштейна-Єнсена.

Установлено, що культивування зразків мокротиння від хворих з різними категоріями захворювання на туберкульоз за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960 дозволяє виявити додатково в середньому 18,2 % бактеріовиділювачів у порівнянні з класичним культуральним методом діагностики.

Рідке живильне середовище *доцільно* використовувати, в першу чергу, для пацієнтів I-ої клінічної категорії (додатково виявлено 22,5 % випадків), визначена *доцільність* використання рідкого середовища для виявлення бактеріовиділювачів з діагнозом вперше діагностований туберкульоз легень (ВДТБ) (додатково виявлено 22,1 % випадків), а також для діагностики рецидивів туберкульозу (РТБ) (додатково виявлено 19,4 % бактеріовиділювачів) і при обстеженні пацієнтів, що знаходилися в контакті з хворими на мультирезистентний туберкульоз (МРТБ) (додатково виявлено 28,8 % бактеріовиділювачів).

Доведено, що доцільно використання рідкого середовища для діагностики туберкульозу у дітей. Культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960 дало можливість виявити *M. tuberculosis* у 13,6 % дітей з клінічним діагнозом «туберкульоз», що майже у 2,7 разів більше, ніж діагностика бактеріовиділення у дітей на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена.

Вперше *визначено* “критичні” концентрації препаратів 2-го ряду – етіонаміду (Et – 5,0 мкг/мл), капреоміцину (Cm – 2,5 мкг/мл), офлоксацину (Ofx – 2,0 мкг/мл), амікацину (Am – 1,0 мкг/мл), моксифлоксацину (Mfx – 0,25 мкг/мл), левофлоксацину (Lfx – 2,0 мкг/мл), протіонаміду (Pt – 2,5 мкг/мл) і резервного ряду – лінезоліду (Lzd – 1,0 мкг/мл) при використанні їх для тесту медикаментозної чутливості (ТМЧ) в рідкому живильному середовищі Middlebrook 7H9 (далі – рідке середовище) із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960. Розроблена стандартна методика визначення МС *M. tuberculosis* з використанням рідкого середовища до препаратів 2-го ряду і резервного препарату Lzd.

Доведено, що молекулярно-генетична система GeneXpert може використовуватися для швидкої діагностики, насамперед, випадків МРТБ (відсоток діагностованих випадків МРТБ за допомогою системи GeneXpert і фенотипічного методу діагностики в системі ВАСТЕС MGIT 960 складає 93,7). Діагностична цінність дослідження негативних за результатами бактеріоскопії зразків мокротиння в системі GeneXpert складає 59,4 %.

Обґрунтовано застосування систем GenoType і GeneXpert для досліджень мокротиння пацієнтів з підозрою на туберкульоз та хворих з встановленим клінічним діагнозом залежно від клінічної категорії захворювання. Використання цих систем дозволяє виявити додатково 11,2 % та 11,6 % бактеріовиділювачів серед хворих I-ої та II-ої категорії відповідно.

Обґрунтовано комбіноване застосування систем GeneXpert, GenoType і ВАСТЕС MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень і запропонований діагностичний алгоритм їх комплексного використання при виявленні *M. tuberculosis*, суть якого полягає в тому, що в лабораторіях 3-го рівня України, по-перше, в процесі індикації і ідентифікації *M. tuberculosis* комплекс досліджень з використанням гено-фенотипічних систем потрібно здійснювати з однієї проби отриманого мокротиння після передпосівної обробки з утвореного осаду; по-друге, обґрунтований і запропонований об'єм лабораторних досліджень необхідно проводити залежно від клінічної категорії процесу та випадку захворювання на туберкульоз легень.

Практичне значення одержаних результатів дослідження

Найбільш вагому практичну значущість мають результати із визначення чутливості та специфічності різних методів виділення, ідентифікації та визначення МС збудника туберкульозу.

Обґрунтовано застосування молекулярно-генетичних методів діагностики туберкульозу в мережі лабораторій ПТЗ України. Доцільним є комплексне використання фено-генотипічних методів дослідження в лабораторіях 3 рівня, тобто на рівні обласних ПТЗ України.

Розроблена стандартизована методика визначення МС до Et, Cm, Ofx, Am, Mfx, Lfx, Pt і Lzd в рідкому середовищі із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960.

Впровадження в діагностичні дослідження на туберкульоз системи гібридизації з типоспецифічними зондами GenoType дозволило швидко проводити ідентифікацію виділених мікобактерій та диференціацію НТМБ (*M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii* та ін.).

Розроблений алгоритм використання системи GeneXpert і системи гібридизації з типоспецифічними зондами (технологія ДНК-стріпів) з сучасними бактеріологічними методами, який впроваджено в практику роботи бактеріологічних лабораторій ПТЗ України. Алгоритм гено-фенотипічної діагностики туберкульозу регламентований Наказом МОЗ України № 620 від 04.09.2014 р.

Особистий внесок здобувача

Робота виконана автором особисто на базі лабораторії мікробіології туберкульозу НІФП НАМН України і клініко-діагностичної лабораторії Полтавського ОПТД. Автором проаналізовано наукову літературу з проблеми дисертаційного дослідження, виконувала бактеріологічні та генетичні дослідження. Особисто провела експериментальні дослідження з підвищення ефективності виділення мікобактерій з клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень в системі ВАСТЕС MGIT 960 і порівняльні дослідження щодо виділення мікобактерій традиційним способом з використанням рідкого середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960. Обґрунтувала застосування системи ВАСТЕС MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень в залежності від клінічної категорії туберкульозного процесу і комбіноване застосування систем GeneXpert, GenoType і ВАСТЕС MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень та запропонувала алгоритм досліджень щодо виділення *M. tuberculosis*. У плануванні основних напрямків досліджень брав участь науковий керівник д-р мед. наук Журило О. А.

Апробація результатів дисертації

Матеріали дисертації були представлені на XIII конгресі Світової Федерації українських лікарських товариств (Львів, 2010); V з'їзді фтизіатрів і пульмонологів України (Київ, 2013); на науково-практичному семінарі «Мікробіологічні методи дослідження на туберкульоз та організація системи контролю якості при їх виконанні» (Київ, 2013); на науково-практичному семінарі «Контроль якості культуральних методів діагностики туберкульозу»

(Київ, 2014); на Республіканському науково-практичному семінарі для лікарів-бактеріологів протитуберкульозних закладів України «Прискорена мікробіологічна діагностика туберкульозу» (Київ, 2014); V міжнародному медичному конгресі «Впровадження сучасних досягнень у практику охорони здоров'я України» (Київ, 2016); на науково-практичній конференції «Актуальні питання ведення хворих на хіміорезистентний туберкульоз на стаціонарному і амбулаторному етапах» (Київ, 2017).

Публікації

За темою дисертації опубліковано 11 наукових праць, із них 1 посібник, 1 стаття в закордонному науковому виданні, 5 статей у медичних фахових виданнях, рекомендованих МОН України (із них 5 – у журналах, зареєстрованих у міжнародних наукометричних системах Index Copernicus, Science Index, Google Scholar), 4 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференціях, з'їздах і конгресах. За результатами дисертаційного дослідження отримано 1 патент України на корисну модель та видано 3 інформаційні листи. Всі результати досліджень повністю наведені у надрукованих роботах.

Обсяг і структура дисертації

Дисертація складається із вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів дослідження, 8 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку літературних джерел, який складається з 263 найменувань (109 кирилицею і 154 латиною), додатків. Матеріали дисертації викладені на 210 сторінках. Основний текст дисертації викладено на 147 сторінках комп'ютерного друку і проілюстровано 32 таблицями і 3 рисунками.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ТА МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ M. TUBERCULOSIS І ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ ЧУТЛИВОСТІ ДО ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Стан проблеми туберкульозу в світі та ситуація з туберкульозу в Україні, роль мікробіологічних досліджень як складової діагностичного процесу та при контролі ефективності хіміотерапії

Причини негативних змін в епідеміології туберкульозу пов'язані зі зниженням соціального рівня життя громадян, матеріальною незабезпеченістю програм боротьби з туберкульозом, змінами біологічних властивостей збудника, а саме МС до ПТП. У зв'язку з цим ускладнилася бактеріологічна верифікація діагнозу «туберкульоз» [12, 13, 15, 16, 17, 30, 33, 37, 43, 49, 64, 66, 83, 96, 103, 118, 103, 118, 174].

Проблема туберкульозу зберігає свою актуальність і в Україні. Статистичні дані щодо захворюваності на туберкульоз серед населення ґрунтуються на реєстрації хворих при звертанні їх у лікувальні заклади, тому вони не віддзеркалюють реальної картини щодо кількості хворих на ВДТБ в Україні, але вважається, що чисельність хворих на туберкульоз становлять 1,2 % від усієї чисельності населення [4, 16, 18, 29, 32, 44, 48, 49, 53, 57, 61, 72, 92, 93, 97, 99, 103]. Проблема туберкульозу ускладнюється МС збудника. Рівень первинної МС відображає адекватність та ефективність проведення хіміотерапії у хворих на ВДТБ і в цілому є показником успішного виконання Національної програми боротьби з туберкульозом. У розвинутих країнах світу зі сприятливою епідеміологічною ситуацією стосовно туберкульозу питома вага випадків туберкульозу з первинною МС серед бактеріовиділювачів не перевищує 5,0 %, а питома вага МРТБ не перевищує 3,0 %. Країни, в яких

частота захворювання на туберкульоз з множинною стійкістю збудника перевищує 5,0 % від усіх нових випадків, відносять до країн з високою поширеністю хіміорезистентного туберкульозу [4, 11, 16, 17, 29, 44, 45, 50, 98, 103, 116, 118, 174, 253, 257]. Проблема туберкульозу набуває ще більшої гостроти у зв'язку із поширенням ВІЛ-інфекції та СНІДу серед населення, наркоманії. Серед зазначеної категорії населення туберкульоз зустрічається в 2 – 3 і більше разів частіше, аніж у всій популяції [4, 11, 17, 32, 48, 72, 86, 92, 97, 99].

В Україні впроваджено метод пропорцій для визначення МС збудника до ПТП. До моменту отримання результатів дослідження в цьому випадку проходить декілька тижнів. В мережі бактеріологічних лабораторій 3-го рівня ПТЗ України впроваджується система ВАСТЕС MGIT 960. На нашу думку, це революційний прорив в експрес-виявленні росту мікобактерій та у визначенні їх МС, стандартизації мікробіологічних досліджень в Україні [6, 10, 11, 14, 82, 92, 95, 117, 174, 178, 179, 181, 194, 207, 230, 244].

Оцінюючи нинішню ситуацію з туберкульозу в Україні як вкрай небезпечну, назріла нагальна потреба в розробці відповідних мікробіологічних стандартів, які б дозволили підвищити якість методів діагностики щодо туберкульозу [6, 57, 61, 82, 103].

Феномен МС мікобактерій має важливе клінічне значення. У великій бактеріальній популяції, що розмножується, завжди є невелике число МС мутантів, які не мають практичного значення, але по мірі зменшення бактеріальної популяції змінюється співвідношення між кількістю чутливих і стійких мікобактерій до ПТП. У цих умовах відбувається розмноження стійких мікобактерій, ця частина бактеріальної популяції збільшується, досягаючи критичної пропорції [57, 59, 82, 118, 137, 171, 172, 204].

МРТБ, як особливу форму захворювання, почали виділяти з кінця 90-х років ХХ сторіччя. За останні роки в усьому світі відбувається зростання частоти МС МБТ до основних ПТП – Н і R і пов'язане із цим значне зниження ефективності хіміотерапії. Н і R – ключові препарати хіміотерапії туберкульозу.

Поєднана стійкість до цих препаратів виявляє великий вплив на тривалість, ефективність і вартість протитуберкульозної терапії. Ці складові виправдовують визначення МРТБ як стійкість, принаймні, до цих двох препаратів [97, 98, 103, 118, 174, 187, 193, 206, 213, 239, 241, 249, 257].

Методи, які доступні на сьогоднішній день більшості лабораторій, базуються на фенотипічному підході і вимагають культивування МБТ на живильних середовищах. При оцінці результатів визначення МС МБТ до ПТП, необхідно враховувати два аспекти: розподільну здатність бактеріологічних методик, за допомогою яких було отримано результат та динамічний характер процесів співвідношення чутливих і резистентних штамів МБТ у вогнищі ураження [7, 10, 27, 73, 82, 174, 196].

Мікробіологічні дослідження з діагностики туберкульозу є найважливішою складовою діагностичного процесу як на етапі постановки діагнозу «туберкульоз», так і при контролі ефективності хіміотерапії. Відповідно до Наказу МОЗ України від 06.02.02 р. № 45 «Про затвердження інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції» в Україні визначена мережа лабораторій з діагностики туберкульозу і втілена система лабораторних досліджень діагностики туберкульозу, якою передбачено 3 етапи:

1. Первинне (мікроскопічне) дослідження діагностичного матеріалу на наявність КСБ в установах загально-лікарняної мережі.
2. Комплексне мікроскопічне і культуральне дослідження діагностичного матеріалу в бактеріологічних лабораторіях ПТЗ України.
3. Визначення чутливості до ПТП і остаточна ідентифікація виділеного збудника в бактеріологічних лабораторіях ПТЗ України [95].

Мікробіологічне дослідження, що виконується в бактеріологічних лабораторіях ПТЗ України, включає: мікроскопічне дослідження мазка з осаду обробленого діагностичного біоматеріалу; культуральне дослідження (посів); попередню ідентифікацію виділених штамів мікобактерій як таких, що належать до *M. tuberculosis-complex*; проведення остаточної видової ідентифікації виділених мікобактерій; визначення чутливості виділених

мікобактерій до ПТП. У лабораторії, в залежності від її рівня діагностики, можуть виконуватися всі або тільки деякі з перерахованих досліджень [82, 95].

Культуральний метод дослідження на сьогодні залишається «золотим стандартом» в діагностиці туберкульозу. Виявлення *M. tuberculosis* в діагностичному матеріалі бактеріологічними методами дозволяє підтвердити достовірність поставленого діагнозу «туберкульоз» [82].

У зв'язку з родовими особливостями, культивування МБТ потребує особливих умов, відмінних від умов культивування інших мікроорганізмів. Термін подвоєння числа МБТ на середовищах, які широко використовуються, становить 18 – 24 годин. *M. tuberculosis* потребують для росту особливого складу живильного середовища, найширше використовується середовище, до складу якого входять курячі яйця, L-аспарагін і гліцерин [66, 82].

Тривалий час росту культури обумовлює необхідність попередньої обробки матеріалу з метою знищення в пробі немікобактеріальної мікрофлори. Відносна стійкість мікобактерій до дії лугів і кислот визначає умови обробки, при яких зниження життєздатності мікобактерій порівняно невелике, а нетуберкульозні мікроорганізми гинуть. Проте підібрати ідеальні умови обробки не вдається і процедура деконтамінації істотно впливає на результативність культурального методу. Недостатня деконтамінація збільшує число посівів з проростом (понад 5,0 %). Дуже жорстка обробка може суттєво вплинути на життєздатність МБТ. Якщо відсоток проростів менше 2,0 %, метод деконтамінації може інгібувати ріст МБТ або знищити їх, приводячи до хибнонегативних результатів [11, 14, 82].

У порівнянні з методом мікроскопії, культуральний метод дослідження має низку переваг. За допомогою культурального методу вдається виявити на 40,0 % більше випадків туберкульозу з бактеріовиділенням. Метод посіву більш чутливий, ніж метод мікроскопії: він дозволяє виділити культуру з діагностичних матеріалів, отриманих від олігобацилярних хворих. При добре організованому дослідженні вдається одержати культуру з матеріалів, що містять декілька сотень клітин мікобактерій. У разі використання рідких

середовищ поріг чутливості знижується до декількох десятків клітин мікобактерій. Культуральний метод дозволяє виділити культуру збудника та детально дослідити її: визначити видову належність і спектр чутливості до ПТП [1, 7, 27, 36, 37, 55, 73, 82, 87, 100, 134, 165, 200].

Разом з тим культуральний метод дослідження має низку недоліків.

Термін отримання результату культурального дослідження МБТ значно довший, ніж у інших видів мікроорганізмів. При використанні щільних живильних середовищ на яечній основі термін отримання результату складає 3–5 тижнів, проте для окремих культур, особливо виділених від пацієнтів, які раніше отримували лікування, він перевищує 10 тижнів. Негативний результат видається після 10 тижнів (2,5 місяців) культивування. Використання рідких живильних середовищ значно скорочує терміни появи росту. За рекомендаціями виробників автоматичних систем реєстрації росту мікобактерій, які працюють на рідких середовищах Middlebrook, час видачі негативного результату, не перевищує 42 доби [82].

1.2. Фенотипічні методи бактеріологічної діагностики туберкульозу і експрес-методи індикації та ідентифікації *M. tuberculosis* і визначення їх чутливості до протитуберкульозних препаратів.

Стандартизація системи виділення МБТ із діагностичного матеріалу й визначення їх МС вимагає використання технологій з оптимальним співвідношенням вартості та часу дослідження. Ця система буде економічно доступною в Україні та забезпечить найкращі результати в тому випадку, якщо нативні зразки для дослідження будуть надходити безпосередньо у великі регіональні лабораторії з великим об'ємом роботи, оснащені відповідним обладнанням. Ці стратегічні принципи підтримує ВООЗ і рекомендує країнам з високим рівнем захворюваності на туберкульоз [27, 33, 57, 73, 171, 174, 179].

Успіхи в області молекулярної біології та просування у вивченні молекулярних основ МС МБТ забезпечили розробку нових методів швидкого

виявлення МБТ у дослідному матеріалі та визначення їх МС [2, 3, 8, 19, 43, 52, 60, 112, 119, 131, 151, 166]. Введення радіометричної системи ВАСТЕС® та її адаптація для проведення досліджень МС *M. tuberculosis* (ВАСТЕС® ТВ-460) стали проривом у експрес-виявленні росту мікобактерій та у визначенні їх МС. ВАСТЕС® зараз використовується в основному в розвинених країнах. В Україні радіометрична система ВАСТЕС® ніколи не використовувалась [229, 244].

Виявлення комплексу *M. tuberculosis* у клінічних зразках є одним із основних діагностичних підходів у фтизіатрії. Метод мікроскопічного дослідження кислотостійких бактерій із забарвленням за Цилем-Нільсеном дозволяє протягом доби отримати результати, але він має низьку чутливість – 33,0 %. Люмінесцентна мікроскопія збільшує чутливість бактеріоскопії. Бактеріологічні методи більш інформативні, діагностична специфічність – 100 %, аналітична чутливість методу 100 – 200 мікробних клітин в 1,0 мл матеріалу. Проте, для отримання відповіді при посіві матеріалу з використанням щільних яєчних середовищ необхідно мати час: 4 – 8 тижнів [19, 36, 55, 104, 182].

Труднощі у виявленні мікобактерій пов'язані з великим відсотком олігобацилярних хворих і з мінливістю збудника. Повільний ріст мікобактерій також вносить додаткові труднощі у діагностику туберкульозу [7, 15, 33, 46, 50]. Жодне з існуючих живильних середовищ не відповідає оптимальним вимогам. Традиційно використовується щільне живильне середовище Левенштейна-Єнсена. До недоліків цього середовища відносяться: низька частота індикації мікобактерій з досліджуваного матеріалу і довгі терміни появи колоній [50, 79, 82].

Проблема розробки швидких, високочутливих і специфічних методів діагностики туберкульозу є вкрай актуальною. Враховуючи відносно низьку чутливість бактеріоскопії та тривалість методів культуральних досліджень (до 8 тижнів), експрес-діагностику збудника дозволяють проводити молекулярні методи. Але в клінічній практиці першочергового значення набувають лабораторні методи, які з більшою вірогідністю дозволяють верифікувати туберкульоз легень, а найбільш надійною ознакою захворювання на

туберкульоз є виділення культури *M. tuberculosis* та визначення її МС [3, 8, 27, 33, 55, 64, 76, 95, 112, 173].

Відомо, що традиційні мікробіологічні методи не в змозі швидко впоратися із завданнями виявлення *M. tuberculosis* і, тим більше, визначення її МС. Ефективність визначення мікобактерій в одному і тому ж зразку трьома методами (щільне живильне середовище Левенштейна-Єнсена, рідке живильне середовище і полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) складає: за допомогою середовищ – 66,0 % і 78,0 % відповідно, за допомогою ПЛР найвища – 99,0 % [37, 78, 88, 144].

Слід зазначити, що для фтизіатра не настільки важливо бактеріологічне підтвердження діагнозу, як відомості щодо спектру МС виділеного від хворого штаму МБТ, особливо вперше виявленого клінічного ізоляту. Основна вимога до дослідження МС – здатність розрізнити чутливі і стійкі штами МБТ. Таку відмінність цілком можливо провести фенотипічними методами. Справа в тому, що ізоляти МБТ від раніше не лікованих хворих досить однорідні за своєю чутливістю, що підтверджується досить вузьким діапазоном їх мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) традиційних ПТП [82, 178, 180]. Згідно із класичним визначенням МС штаму МБТ, стійкий штам – це такий, який значуще відрізняється за ступенем чутливості від «дикого» штаму, який ніколи не стикався із ПТП [58, 82, 207]. Концентрації препаратів, за якими проводиться поділ штамів на чутливі та стійкі, так звані «критичні концентрації», повинні лежати десь між вищою МІК для «диких» штамів і нижчою – для тих ізолятів, що вважаються стійкими. Але завдяки успіхам, досягнутим молекулярною біологією, не виключена поява нових проблем, особливо якщо врахувати, що для низки препаратів існує кілька генетичних механізмів, відповідальних за низький і високий рівень стійкості [30, 52, 80, 189, 192, 194, 230].

Комісією ВООЗ було схвалено три методи дослідження МС МБТ із використанням яєчного середовища Левенштейна-Єнсена, що не містить крохмалю: метод пропорцій, метод коефіцієнта стійкості (КС) і метод

абсолютних концентрацій [121, 207]. Найпоширенішим, впровадженим лабораторією НІФП у роботу бактеріологічних лабораторій 3 рівня ПТЗ України, є метод пропорцій [58, 82, 95].

Розчини відповідних препаратів додаються в ячне середовище перед його згортанням. В контрольні пробірки препарат не вноситься. Остаточні концентрації препаратів у такому середовищі для спрощеного варіанту дослідження наведено в Наказі № 45 МОЗ України від 06.02.02 р. [82, 95]. В оригінальному стандартному варіанті потрібні додаткові концентрації [121, 207]. Інокуляти готуються з добре гомогенізованої бактеріальної суспензії, доведеної до оптичної щільності стандарту, що містить 1,0 мг/мл бактеріальної маси, після чого розведення 10^{-3} і 10^{-5} вносяться у два набори пробірок із препаратом і без нього, по 0,1 мл на кожен пробірку. Пробірки інкубуються при 37°C . Після 28 діб інкубації підраховуються колонії на скосах із препаратом і без нього для визначення пропорції стійких бактерій. Будь-яка частка понад 1,0 % для Н, R і ПАСК (PAS) або понад 10,0 % для інших препаратів означає «стійкість», і ці результати є остаточними [207].

Цікавим представляється традиційний для деяких країн метод КС, який не використовується в Україні. КС – це відношення МІК штаму пацієнта до МІК МС референтного штаму – H_{37}Rv , визначених в одному експерименті. Референтний штам включається в кожний експеримент не тільки для контролю якості, але й для того, щоб стандартизувати результати з поправкою на варіації в припустимих межах [121, 207]. При зчитуванні результатів після 4 тижнів інкубації «ріст» фіксується при наявності 20 або більше колоній, а МІК – за визначенням найменшої концентрації, у присутності якої число колоній менше 20. Діапазон, необхідний для досліджуваного штаму, визначається варіацією МІК штаму H_{37}Rv [207].

До 2002 р. в Україні використовувався метод абсолютних концентрацій, який і в цей час поширений у країнах СНД [95]. Критичні концентрації, що створюються в середовищі за цим методом, загалом збігаються з концентраціями для методу пропорцій, однак власне «критична» концентрація

повинна бути встановлена спеціально для кожної лабораторії. Ріст 20 або більше колоній у присутності цих концентрацій є показником стійкості [82].

У світі також застосовуються прямі і непрямі дослідження з використанням агару 7Н10/7Н11. Вирощування культури на агарі 7Н10/7Н11 вимагає інкубатора, що створює концентрацію CO_2 в 5,0 – 10,0 %, а самі культури після інокуляції повинні бути поміщені в CO_2 -проникні пакети. Перевага проведення досліджень у чашках Петрі з агаром полягає в тому, що остаточні результати можна одержати протягом 3 тижнів, а не за 4 – 6 або більше тижнів, як при використанні середовища Левенштейна-Єнсена [190].

Існує декілька систем з використанням рідких середовищ (ВАСТЕС[®], MGIT). Так, для системи ВАСТЕС[®] використовується бульйон 7Н12, який містить основу 7Н9, гідролізат казеїну, бичачий сироватковий альбумін, каталазу і мічену ^{14}C жирну кислоту. Споживання ^{14}C -субстрату бактеріями, що розмножуються, призводить до виділення ^{14}C , кількість якого реєструється апаратом як індекс росту (IP) за шкалою (0 – 999). У присутності антимікробного препарату стійкість проявляється уповільненням щоденного приросту IP [229].

Істотною перевагою цієї методики є її здатність виявляти ріст МБТ і його інгібування раніше, ніж за допомогою будь-якого іншого методу. Для непрямого дослідження МС із використанням цієї системи потрібно в середньому 9,3 діб [181]. Середній загальний час, витрачений на первинну ізоляцію, плюс непряме дослідження, становить 18 діб [229]. Істотним недоліком системи ВАСТЕС[®] є проблема утилізації великого об'єму радіоактивних матеріалів (флаконів 12В), хоча радіоактивність їх у край низька. Інший недолік – це висока вартість. ВАСТЕС[®] дорожче кожної системи для твердих середовищ, однак, дешевше, ніж нові системи на нерадіоактивних рідких середовищах [1, 114, 194, 230, 244, 262].

Зараз впроваджується група нових фенотипічних методів, які дозволяють одержати швидкий результат шляхом використання різних технологій для виявлення ранніх ознак росту мікобактерій: визначення

споживання кисню, вимір метаболізму за допомогою кольорових індикаторів або рання візуалізація мікроколоній [1, 7, 10, 27, 82, 100, 114, 134, 165, 194, 200, 216, 225, 256, 262].

Одна з нещодавно розроблених систем експрес-виявлення росту мікобактерій – MGIT (Бектон Дікінсон, US). Система MGIT складається із скляних пробірок, що містять модифіковане рідке середовище Міддлбука 7H9 із флуоресцентним датчиком кисню, вмонтованим у дно кожної пробірки. Після інокуляції мікобактеріями споживання розчиненого кисню викликає флуоресценцію після освітлення УФ-лампю. При дослідженні МС набір контрольних пробірок і пробірок, що містять препарати, інокулюється дослідним ізолятом і після періоду інкубації при 37 °С порівнюється ріст у пробірках із препаратом і в контролі, що дозволяє встановити наявність стійкості [1, 10, 82, 108, 114, 165, 194, 230, 244, 262].

В 1997 р. з'явився культуральний метод – дослідження біологічно ампліфікованого фагу (Phab). Це дослідження засноване на здатності живої *M. tuberculosis*, інфікованої мікобактеріофагом, підтримувати реплікацію; екзогенні фаги інактивуються хімічно. Потім, після певного числа циклів інфекції, реплікації і вивільнення, визначається число ендогенних фагів, яке віддзеркалює число живих *M. tuberculosis*. Слабким місцем дослідження є специфічність мікобактеріофага (D29), який використовується в даному методі. Цей фаг може інфікувати і інші мікобактерії [198].

E-test, ще одна комерційна система (АБ БІОДИСК, Швеція), заснований на визначенні МС за допомогою смужок, що містять антибіотики з певним градієнтом концентрації. Смужку, що містить потрібний препарат, накладають на поверхню агарового середовища, яке інокульоване дослідним штамом. Після інкубації можна зчитувати МІК у місці перетинання еліпсу (створеного пригніченням росту) зі смужкою [110, 157, 158, 195, 227].

Становить інтерес група фенотипічних методик, так званих метаболічних експрес-досліджень.

Солі тетразолія використовувалися для вивчення метаболізму і життєздатності ряду мікроорганізмів [144, 219], а також для визначення токсичності з'єднань для еукаріотичних і прокаріотичних клітин [113, 216]. Уайко D. M. et al. (1995) [128] вперше описали колориметричний метод кількісного визначення МС *M. tuberculosis*, заснований на окисно-відновному барвнику (блакитний Аламар⁶). Барвник має блакитний колір в окисленому стані і рожевий – у відновленому. Цю зміну легко визначити візуально або виміряти за допомогою спектрофотометрії або флуориметрії. Для дослідження МС набір пробірок, що містять розведення кожного з ПТП, і контроль інокуються дослідним ізолятом. Після початку періоду інкубації (7, 10 або 14 діб) додається блакитний Аламар⁶ і пробірки інкубуються до зміни кольору; у тих пробірках, де відбувається ріст бактерій, стійких до препарату, індикатор змінює колір із блакитного на рожевий. Уайко D. M. et al. дослідили 50 ізолятів *M. tuberculosis*, визначаючи МІК H, R, E і S, та порівнюючи результати з тими, що були отримані методом пропорцій на агарі; відсоток збігу між двома методами склав 98,0 % для H, R, E, а 94,0 % – для S.

Заслуговує на увагу метод виявлення мікроколоній на твердих середовищах. При інокуляції на тонкий шар агару, наприклад, на середовище Міддлбука 7Н11 у чашці Петрі, мікобактерії утворюють типові мікроколонії, які легко виявити за допомогою мікроскопу [200, 225, 243]. При його використанні як експрес-методу дослідження МС *M. tuberculosis* показали, що для виявлення мікроколоній потрібно в середньому менше часу, ніж для дослідження традиційними культуральними методами: для хворих з позитивним мазком – 11 діб проти 62, а для хворих з негативним мазком – 35 діб проти 72.

1.3. Молекулярно-біологічні методи індикації та ідентифікації штамів *M. tuberculosis* і визначення їх чутливості до протитуберкульозних препаратів.

Вивчення молекулярних основ генетичної будови *M. tuberculosis* водночас із появою нових молекулярно-біологічних методів сприяло розвитку численних молекулярно-генетичних методик виявлення і визначення МС мікобактерій. Вони засновані на виділенні ДНК, ампліфікації гена і виявленні мутацій [84, 85, 122]. Ці методики мають декілька переваг: час очікування відповіді скорочується з декількох тижнів до декількох діб; можливість прямого застосування на клінічних зразках; є можливість автоматизації дослідження [112, 119, 125, 131, 147, 166, 167, 173, 189, 211, 239, 247].

Більшість методів на основі ДНК/РНК детекції, що використовуються на даний час для виявлення вже відомих і відкриття нових мікроорганізмів, базуються на трьох технологіях. Це – ПЛР-технологія, олігонуклеотидні мікрочипи і секвенування ДНК [197, 222]. Зазначені технології мають свої сильні і слабкі сторони. Наприклад, секвенування забезпечує найбільш об'єктивну інформацію і надає можливість виявлення абсолютно нових мікроорганізмів, хоча цей метод може бути дорогим і трудомістким для вирішення деяких завдань. Він не може застосовуватися при скринінгових дослідженнях. Середню позицію серед цих методів за параметрами витрат, часу обробки, чутливості, специфічності і здатності виявляти нові мікроорганізми займають олігонуклеотидні мікрочипи або мікроматриці [197]. Мікрочипи потребують періодичної модифікації при виявленні нових мішеней (нових штамів, мутацій, SNP). Серед цих методів ПЛР є швидким, чутливим і недорогим методом. Він має певні обмежені можливості для мультиплексування, проте в останні роки нові модифікації значно розширили цю можливість. При аналізі наявності одночасно декількох організмів (наприклад, мікст-інфекції), може бути необхідним застосування й декількох ПЛР-тестів, що може нівелювати перевагу у низькій собівартості. ПЛР – високоспецифічна реакція, що є перевагою для виявлення мікроорганізму,

послідовність ДНК якого точно відома, але недоліком цієї реакції є неможливість її використання для відкриття нових видів, або штамів і для виявлення варіантів відомих видів. ПЛР є базовим методом молекулярно-генетичних досліджень мікроорганізмів і зокрема мікобактерій, спрямована на виявлення ДНК у діагностичному матеріалі.

ПЛР дає експоненціальне збільшення специфічної ділянки ДНК збудника: 20 циклів ПЛР призводять до збільшення вихідної ДНК в мільйон разів, що дозволяє візуалізувати результати методом електрофорезу в агарозному гелі. Основними характеристиками методу ПЛР є універсальність, висока чутливість і відносна простота виконання. ПЛР може слугувати одним з методів експрес-діагностики туберкульозу, а також при необхідності підтвердження діагнозу туберкульозу при негативних результатах традиційних мікробіологічних методів дослідження (мікроскопія, посів). Успішне лікування хворих на туберкульоз неможливо без контролю за ефективністю хіміотерапії. Відкритим є питання використання молекулярно-генетичних методів при контролі за ефективністю хіміотерапії. У ході її проведення, в той час як результати культурального і бактеріоскопічного методів були негативними, за допомогою ПЛР вдалося виявити *M. tuberculosis* у 27,0 % зразків через 2 місяці після початку лікування, в 13,0 % – через 3 місяці і в 7,0 % – через 6 місяців лікування. Але немає доказів, що це були життєздатні особини мікобактерій [107]. Теоретично ПЛР дозволяє виявити в дослідному матеріалі поодинокі клітини або навіть фрагменти ДНК збудника. Практично було показано, що межа чутливості становить 10 – 20 мікобактеріальних клітин при дослідженні чистої культури або 1000 клітин при дослідженні клінічного матеріалу [236].

У якості дослідного матеріалу для виділення ДНК використовуються зразки мокротиння, бронхо-альвеолярний лаваж, кров, сеча, цереброспінальна рідина, шлункові промивні води та багато іншого біологічного матеріалу [132, 228, 240]. Ефективність ПЛР для різних видів дослідного матеріалу може значно розрізнятися. Особливо яскраво переваги ПЛР проявляються при позалегеневих формах туберкульозної інфекції, коли етіологію захворювання

вдавалося встановити у 26,5 % випадків за допомогою ПЛР і лише у 14,5 % при культивуванні [106, 183, 263].

Чутливість ПЛР у великій мірі залежить від способу обробки клінічного матеріалу і способу виділення мікобактеріальної ДНК. Основними методами виділення геномної ДНК з мікобактерій є метод кип'ятіння, лужного лізису, фенол-хлороформної екстракції з використанням сорбенту (сіліки) та їхні модифікації. В даний час доступна велика кількість комерційних наборів для виділення ДНК з дослідного матеріалу (фірм Qiagen (США), Roche (Німеччина), Seegen Inc. (Корея), АмпліСенс (Росія) та ін.), в яких ДНК максимально очищується та позбавляється інгібіторів ПЛР [202].

Крім того, комерційні ПЛР тест-системи включають деякі компоненти, що можуть значно підвищити специфічність і чутливість реакції. Це можуть бути різні модифіковані варіанти Таq-полімераза, які дозволяють здійснювати так званий "hot start" ампліфікації, що запобігає накопиченню неспецифічних продуктів при низьких температурах початку реакції, MGB-білок (Minor Groove Binding), який зв'язується з малою борідкою ДНК і полегшує аннелінг праймерів до специфічних ділянок, та інші компоненти. Для запобігання крос-контaminaції ПЛР, яка є окремою важливою проблемою ПЛР-діагностики, у реакційну суміш додають фермент урацил-ДНК-глікозилазу, що розщеплює амплікони, отримані у попередніх тестах, у разі їхнього необачного потрапляння у суміш.

На сьогодні проведена величезна кількість досліджень оцінки ефективності ПЛР-аналізу на різних типах як респіраторних, так і не респіраторних зразків. Конкретні показники чутливості або проценту «позитивних» зразків часто важко порівнювати через дуже варіюючі схеми експериментів (ДНК-маркер, звичайна ПЛР/гніздова ПЛР), підбор груп хворих (вікові групи, легеневий туберкульоз і інші форми, результати аналізів бактеріоскопії та бактеріологічного дослідження) і типів зразків та інших факторів [129, 130]. Часто у вибірках превалюють респіраторні зразки з «позитивним» аналізом мікроскопічного дослідження, яке характеризується

загалом низькою чутливістю виявлення МБТ (до 50,0 % зразків можуть бути фальш-негативними). Чутливість ПЛР з мішенню інерційного елементу IS6110 загалом є найбільшою серед ДНК мішеней. Так, у роботі Eing V. R. et al. (1998) у змішаних зразках «позитивних» як за бактеріоскопією, так і за культурою, чутливість IS6110-ПЛР сягала 100 %, а у зразках «негативних» за бактеріоскопією – 63,6 % [132]. Для різних фрагментів IS6110 з використанням різних праймерів процент «позитивних» зразків може коливатися від 50,0 % до 100 % [139, 148, 153, 185, 214].

Базовим підходом у ПЛР є специфічна ПЛР. Ключовим моментом для специфічної ПЛР є підбір праймерів, які конструюються таким чином, щоб бути точно комплементарними ДНК або РНК певного організму. Це найбільш широко застосовуваний метод виявлення і ідентифікації представників *M. tuberculosis-complex* з використанням IS6110-специфічних праймерів [132, 136, 146]. Для підвищення специфічності і чутливості ПЛР з ген-специфічними маркерами (*mtp40*, *mpb64*, *hupB* та ін.), яка часто застосовується у так званих «домашніх» («in-house») ПЛР-системах, використовують таку найбільш просту модифікацію, як гніздова, або напівгніздова ПЛР [235]. Застосовують і інші модифікації. Так, для підвищення специфічності були запропоновані так звані Dual-priming oligonucleotide (DPO) [154, 155]. Найбільшу перевагу DPO забезпечують при SNP-генотипуванні, коли різниця між алельними варіантами мінімальна. Система на основі DPO була розроблена для диференціації *M. tuberculosis-complex* і *M. bovis* BCG на регіон RD1 [210].

Певною протилежністю специфічної ПЛР є ПЛР широкої специфічності («broad range»), яка використовує консервативні райони, що охоплюють варіабельні (між видами, лініями, або штамми) ділянки з подальшим уточненням варіабельних послідовностей і відповідних їм видів або штамів за допомогою цілої панелі різноманітних методів, найбільш точним з яких є секвенування. Інші методи включають:

– ПЛР у в сполученні із рестрикційним аналізом (ПДРФ). Рестрикційна ендонуклеаза (рестриктаза), що впізнає специфічні послідовності (сайти

рестрикції), розщеплює по них ДНК з утворенням різних фрагментів (профілів рестрикції, фінгерпринтів), довжину яких можна визначити за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. ПДРФ-маркери, завдяки їх чіткій приналежності до певних генетичних локусів, можуть не поступатися за інформативністю поширеним біохімічним маркерам (*hsp65*, *gyrB*) [123, 149]. Обмеженням методу є те, що певний SNP може не співпадати ні з яким сайтом рестрикції, або рестриктаза, що впізнає сайт, є рідкісною і дорогою.

– Метод SSCP. Заснований на виявленні різних конформацій одноланцюгових ДНК-фрагментів (які попередньо були розділені денатурацією) залежно від їх первинної послідовності при електрофорезі у неденатуруючому акриламідному гелі. Часто використовувався для виявлення мутацій у генах, асоційованих зі стійкістю до ПТП [142].

– Метод DGGE. Оснований на різній рухливості фрагментів із різними послідовностями при електрофорезі у денатуруючих умовах. Метод також часто використовувався для виявлення мутацій, відповідних за резистентність до ПТП [143].

– Алель-специфічна ПЛР. Існують різні модифікації методу. Метод ARMS (Amplification Refractory Mutation System) використовує у паралельних реакціях ПЛР різні праймери з кінцевими нуклеотидами, що припадають на SNP і відповідають послідовності з мутацією, або без [117]. Для широкомасштабного скринінгу SNP, асоційованих зі стійкістю до ПТП, метод було модифіковано таким чином, що праймери до SNP були сконструйовані за принципом «молекулярних буйків» («molecular beacons») та ампліфікацію проводили в реальному часі. Термодинамічні властивості таких шпилькоподібних («hairpin») праймерів дозволили значно підвищити здатність розрізняти різні SNP-варіанти [176].

– ПЛР у сполученні з гібридизацією є одним із методів виявлення поліморфних ділянок у геномі *M. tuberculosis-complex* і одночасно засобом підвищення чутливості й специфічності методу ПЛР для видової чи штамової ідентифікації *M. tuberculosis-complex* і загалом мікобактерій. Гібридизація – це

процес, у ході якого одноланцюгова нуклеїнова кислота – мішень при аннелінгу з комплементарною молекулою (зондом) утворює дволанцюговий дуплекс за рахунок класичних Уотсон-Кріковських взаємодій. В якості зонду можуть бути використані як молекули ДНК, так і РНК. Відповідно дуплекси можуть бути – ДНК/ДНК, ДНК/РНК та РНК/РНК. Цей метод є основою багатьох тест-систем з використанням мішеней гену 16S *rRNA* 16S-23S *rRNA* ITS (AccuProbe (Gen-Probe, США), Cobas Amplicor (Roche Molecular System, Branchburg, N. J.), INNO-LiPA *Mycobacteria* (Innogenetics, Бельгія)) [149, 195], а також технології мікрочипів. Споліготипування штамів *M. tuberculosis-complex* є прикладом застосування дот-блот гібридизації з тією різницею, що «зонд» і «проба» у цьому методі поміняні місцями – на фільтр нанесені послідовності відомих спейсерів, тоді як зондом слугує ДНК штама, що аналізується, тому метод отримав назву зворотної гібридизації [232]. Мікрочипи використовують у комплексних дослідженнях геному *M. tuberculosis* за багатьма маркерами – у першу чергу численними маркерами резистентності, фенотиповими маркерами, а також потенційними маркерами вірулентності [161, 217, 233, 234, 246]. Дослідження експресії генів *M. tuberculosis* відображають перехід у вивченні механізмів функціонування цього патогену на рівень системної біології [153, 246, 252].

– Поряд із ПЛР, яка використовує у якості матриці ДНК, застосовують зворотно-транскрипційну ПЛР (RT-PCR – зт-ПЛР), з кДНК (копійовану ДНК) у якості матриці, яка отримується при зворотній транскрипції мікобактеріальної РНК. ДНК-ПЛР не може розрізнити життєздатні і нежиттєздатні мікроорганізми, у той час як присутність у зразку мікобактеріальної мРНК вказує на наявність саме життєздатних мікроорганізмів [199, 223]. У роботі Li L. et al. (2010) мРНК *M. tuberculosis* у зразках мокротиння слугувала маркером бактеріального очищення у відповідь на протитуберкульозну терапію [237]. З тієї ж метою в іншій роботі була продемонстрована ефективність зт-ПЛР зі специфічними маркерами 85В (альфа антиген) та 16S *rRNA* у порівнянні з ДНК-

ПЛР до IS6110 [199]. Зт-ПЛР та культуральний методи демонстрували конкордатність у дослідженні генітального туберкульозу [250].

– Мультиплексні системи ПЛР. Одночасна ампліфікація багатьох фрагментів ДНК в одній і тій же пробірці отримала назву мультиплексної ПЛР (мПЛР). Такий підхід є надзвичайно актуальним для диференціальної діагностики туберкульозу (відокремлення видів *M. tuberculosis-complex* від НТМБ, видів *M. tuberculosis* і *M. bovis* та ін.). При одночасній ампліфікації багатьох типів цільових фрагментів, часто неможливо буває уникнути небажаних взаємодій праймерів і досягнути однаково ефективного синтезу всіх типів ДНК. мПЛР все ще не можна назвати стандартною процедурою. Зазвичай мПЛР не дозволяє проводити рівномірну ампліфікацію більше 5 – 10 цільових матриць.

мПЛР із мішенями міжгенного регіону *oxyR-ahpC* та гену *rpoB* була використана для диференційного виявлення клінічних ізолятів *M. tuberculosis-complex* та НТМБ із первинних культур. мПЛР на райони RD1, RD9 та ген *hsp65* була використана для виявлення у дітей зараження, викликаного вакцинним штамом BCG [126]. За допомогою DPO-праймерів була розроблена мПЛР для детекції та диференціації вірулентних членів *M. tuberculosis-complex* від *M. bovis* BCG [210]. П'ять мішеней на гени *katG*, *tabA-mhA* та *rpoB* були використані у мультиплексній алель-специфічній ПЛР (мас-ПЛР) для виявлення штамів стійких до ПТП [251]. Дещо відмінні мішені були використані з цією ж метою у іншій роботі [191]. Тривають пошуки шляхів підвищення специфічності ПЛР. Наприклад, у роботі Lira L. A. et al. (2011) для вирішення цього завдання використовували наночастки, так звані CdTe квантові точки [156]. Дві системи ПЛР у реальному часі з використанням принципу LightCycler та п'яти ДНК-мішеней були створені для комплексного алгоритму диференційного визначення видів-представників *M. tuberculosis-complex* у зразках культур [231].

– ПЛР у реальному часі (кількісна ПЛР). Можливість моніторингу ПЛР в реальному часі стало своєрідною революцією, як у кількісній оцінці ДНК і

РНК, так і загалом ПЛР-діагностиці. Переваги ПЛР в реальному часі для виявлення мікроорганізмів включають можливість кількісної оцінки, більшу чутливість, відтворюваність і точність, поліпшення контролю якості, швидкий аналіз і більш низький ризик контамінації через відсутність необхідності нанесення зразків на гель.

Найпростіший та дешевий варіант ПЛР у реальному часі з використанням інтеркалюючого барвника SYBR Green I дещо менше використовується у диференційній діагностиці *M. tuberculosis-complex* через неможливість мультиплексування. Метод потребує ретельної оптимізації, проте детекція за допомогою SYBR Green I характеризується високою чутливістю до ідентифікації однієї молекулярної мішені в реакційній суміші. ПЛР з SYBR Green I застосовували для визначення численних мутацій, відповідальних за резистентність з використанням шпилькоподібних праймерів [176]. Одиначні дослідження використовували SYBR Green I для визначення двох різних мішеней з аналізом і розділенням продуктів ПЛР за кривою плавлення [115].

У технологіях TaqMan, Molecular Beacons і LightCycler використовують мічені олігонуклеотидні проби. Системи на основі олігонуклеотидних проб потребують меншої оптимізації і дозволяють виконувати мультиплексну ПЛР.

Shrestha N. K. et al. (2003) використовували принцип LightCycler та мішень *16S rRNA* для диференційної діагностики мікобактерій *M. tuberculosis-complex* та НТМБ [138]. Аналіз кривих плавлення був застосований у роботі для диференціації видів НТМБ. Комерційна система «LightCycler® Mycobacterium Detection Kit» (Roche Diagnostics, Німеччина) для диференційного виявлення *M. tuberculosis*, *M. avium* і *M. kansasii* на основі гіперваріабельного регіону гену *16S rRNA* була розроблена на платформі LightCycler. У роботі Hristea A. et al. (2010) для визначення резистентності до R і H по одному набору праймерів та два набори проб були використані проти мішеней гену *rpoB* (стійкість до R) та *katG* і *inhA* (стійкість до H) [140].

Зусиллями представників комерційних (Cepheid, Sunnyvale, USA) і некомерційних організацій було розроблено автоматизований картриджний

діагностичний тест на основі проб Molecular Beacons – «Xpert MTB/RIF», який може одночасно визначати *M. tuberculosis* і стійкість до R [159]. Система використовує принцип напівгніздової ПЛР та складається з трьох пар праймерів та п'яти олігонуклеотидних проб. Мішенню проб для визначення стійкості до R є 81 п.н. район RDDR (http://tbevidence.org/documents/rescentre/sop/XpertMTB_Broch_R9_EU.pdf). У 2010 році ВООЗ схвалила Xpert MTB/RIF для використання в країнах, де туберкульоз є епідемічним захворюванням [254]. Лабораторні дослідження підтвердили ефективність системи, хоча були виявлені зразки, у яких резистентність не була підтверджена тестом на фенотипічну чутливість [159]. Таким чином, на наш погляд, безумовною є необхідність підтвердження результатів молекулярно-генетичних досліджень за допомогою системи Xpert MTB/RIF одним з тестів на фенотипічну чутливість.

Тест-системи на основі проб TaqMan використовували для SNP типування та виявлення основних шести ліній *M. tuberculosis-complex* людини і деяких епідеміологічно-значущих сімейств (Beijing) [248]. Система на основі ПЛР у реальному часі та TaqMan проб проявила високу чутливість при виявленні штамів стійких до ПТП із суміші чутливих і резистентних штамів (проблема так званої гетерорезистентності) [150]. Автори стверджують, що розроблена ними система здатна детектувати резистентний штам із суміші зі співвідношенням чутливих до стійких штамів 1000 до 1. У роботі Lira L. A. (2013) TaqMan у ПЛР використана мішень IS6110 для виявлення *M. tuberculosis-complex* із зразків мокротиння [160]. Комерційна тест-система «Cobas TaqMan MTB test» (Roche Diagnostics, Taiwan) використовує ген 16S *rRNA* у якості мішені. Незважаючи на те, що система рекомендована для аналізу як мікроскопічно «позитивних», так і «негативних» зразків (чутливість для «негативних» зразків була дуже високою – 79,5 %) [164], підкреслюється, що комерційні автоматичні системи виявлення *M. tuberculosis-complex* завжди повинні співставлятися із мікроскопією та культуральним дослідженням, і результати мають бути інтерпретовані з огляду на клінічні дані пацієнта [220].

Необхідно відмітити, що роль молекулярно-генетичної діагностики в клінічній практиці підвищується. Слід враховувати, що при постановці діагнозу результати ПЛР є додатковими і повинні порівнюватися з результатами бактеріологічного дослідження і навіть відповіді на специфічне лікування.

Таким чином, в останні роки з'явилося багато нових можливостей виявлення і визначення МС *M. tuberculosis*. При розробці цих методів була використана інформація про молекулярні механізми МС і нові підходи до виявлення росту мікобактерій. Перевага молекулярно-генетичних методів полягає в їх швидкості і специфічності. Однак складність цих методів і необхідність використовувати дуже дороге обладнання обмежують їх застосування в мережі бактеріологічних лабораторій ПТЗ України. Фенотипові методи, як група технологій, є досить неоднорідними. Деякі з них вимагають також вартісного обладнання.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводилось у клініці ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України» (Акредитаційний сертифікат № 011939, виданий Головною акредитаційною комісією МОЗ України, реєстраційний номер 8334, термін дії сертифікату – 26 березня 2017 р.) і в атестованій лабораторії мікробіології туберкульозу. Свідотство про атестацію № ПТ – 474/13, видане ДП «Укрметртестстандарт» 30.12.2013 р., чинне до 29.12.2018 р., яке засвідчує, що лабораторія атестована на підставі Закону України «Про метрологію та метрологічну діяльність», відповідає критеріям атестації вимірювальних лабораторій відповідно до вимог Правил уповноваження та атестації в державній метрологічній системі. Лабораторія атестована на проведення вимірювань показників об'єктів, згідно із галуззю, що наведена в додатку до свідоцтва. Лабораторія мікробіології має Дозвіл № 09–14 на роботу із збудниками III–IV груп патогенності для людини при проведенні бактеріологічних досліджень біологічних матеріалів від людини на наявність збудника туберкульозу і супровідну мікрофлору та санітарно-бактеріологічних досліджень з контролю об'єктів довкілля інституту терміном на 5 років (24.02.2014 р. – 23.02.2019 р.). Дозвіл видано Державною санітарно-епідеміологічною службою України та Київською міською режимною комісією.

Лабораторія мікробіології туберкульозу атестована Супранациональною референс-лабораторією (Латвія, Рига) за результатами проходження раунду зовнішньої оцінки якості для ТМЧ туберкульозу із загальною ефективністю 99,0 %. Сертифікат № 1 від 23 вересня 2014 р.

2.1. Об'єкти дослідження

Матеріалом досліджень слугували штами *M. tuberculosis*, які виділяли з клінічних зразків мокротиння від хворих на туберкульоз легень, що мали

стаціонарне лікування на базі ДУ НІФП НАМН України протягом 2012 – 2015 рр. Робота проводилась за планами НДР лабораторії мікробіології – А.07.08 (№ держреєстрації 0107U001214) і А.13.08 (№ держреєстрації 0113U000267).

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Первинна обробка матеріалу, виділення штамів мікобактерій, їх ідентифікація

Передпосівну обробку клінічного матеріалу з метою виділення *M. tuberculosis* здійснювали таким чином: 10,0 % Na_3PO_4 додавали в рівних об'ємах до зразка мокротиння, витримували при 37 °С протягом доби, потім центрифугували протягом 15 хв. при 3500 об/хв. Використовували також реактив NALC-NaOH (0,5 % стерильний розчин N-ацетил-L-цистеїну з 1,0 % гідроксиду натрію), який є більш щадним методом обробки клінічного матеріалу. Час експозиції після внесення реактиву – 20 хв. при 20 °С, потім проводили повторне центрифугування 20 хв. при 3500 об/хв. Засів здійснювали на щільне яєчно-сольове середовище Левенштейна-Єнсена. Посіви інкубували в термостаті при 37 °С протягом двох місяців. Щотижня переглядали пробірки з посівами. При підозрі на появу характерних колоній *M. tuberculosis* здійснювали мікроскопію препаратів забарвлених за Циль-Нільсеном [10, 58, 82, 95].

В роботі для посіву було використано також рідке живильне середовище Middlebrook 7H9 [10].

Для контролю придатності щільного яєчного середовища користувалися лабораторним штамом *M. tuberculosis* H₃₇R_v (1/47), який отримано з Інституту гігієни (м. Прага) в 1976 р.

Для ідентифікації виділених штамів мікобактерій використовували імунохроматографічний тест (ID MTB MGIT) і культурально-біохімічні тести: ніациновий тест, нітратредуктазний тест, визначення спроможності росту клінічних ізолятів мікобактерій на середовищі з саліциловокислим натрієм та

паранітробензойною кислотою з метою визначення належності виділених мікобактерій до туберкульозного комплексу [41, 82, 133, 165, 177].

Мікроскопічне дослідження методами світлової і люмінесцентної мікроскопії здійснювали за допомогою мікроскопів японського виробництва – OLYMPUS CX-21 і OLYMPUS BX-51.

Для вимірювання наважок препаратів використані ваги електронні і аналітичні (Італія). Повірка вимірювальних приладів проводилася своєчасно, що вказано в перевірочних сертифікатах метрологічного контролю.

2.2.2. Одержання первинної культури мікобактерій в системі BASTEC MGIT 960

Для деконтамінації, розрідження мокротиння і концентрації мікобактерій готували суміш N-ацетил-L-цистеїну з розчином BBL Mucorprep NALC-NaOH і додавали рівний об'єм цієї суміші до зразка мокротиння. Інкубували пробірку із сумішшю при кімнатній температурі протягом 15 хв. Центрифугували пробірки зі зразками протягом 20 хв. при прискоренні 3000 g, зливали супернатант із пробірок, потім до осаду додавали 0,8 – 1,0 мл стерильного фосфатного буферу (BBL Mucorprep Phosphate Buffer). Розводили PANTA (збагачуюча добавка MGIT Growth Supplement, яка складається з поліміксину В, амфотеріцину В, налідіксової кислоти, триметоприму, азлоциліну) і додавали 0,8 мл отриманого розчину до кожної пробірки MGIT безпосередньо перед посівом матеріалу. Пробірки поміщали в систему BASTEC MGIT 960 та інкубували [10].

Дія системи заснована на реєстрації флюоресценції, що виникає в пробірці при поглинанні зростаючими мікобактеріями кисню із рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9. Флюорохром, що запаяний у силікон, утримується на дні пробірки. Спочатку концентрація кисню в рідкому середовищі є досить великою, цей факт викликає гасіння флюоресценції. При наявності мікобактерій і їх наступному рості концентрація кисню в середовищі зменшується, що викликає флюоресценцію та подальше її посилення.

Флюоресценція стає видимою при опроміненні пробірки ультрафіолетовим світлом і автоматично реєструється фотодатчиками, які вмонтовані в прилад BACTEC MGIT 960. Інтенсивність світіння прямо пропорційна рівню витрати кисню і реєструється в одиницях росту GU (growth units).

Пробірки MGIT з рідким середовищем, які підготовлені до інкубації та інокульовані попередньо обробленими зразками клінічного матеріалу, встановлюють в систему BACTEC MGIT 960. Посіви інкубуються при температурі 37 °С, де пробірки проходять моніторинг ступеня флюоресценції кожні 60 хв. Ріст мікобактерій і інших бактерій викликає посилення флюоресценції. У випадку з *M. tuberculosis* проба вважається позитивною, якщо спостерігається близько 10⁵ – 10⁶ колонієутворюючих одиниць в 1,0 мл середовища. Прилад оцінює пробу як негативну при відсутності росту протягом 6 тижнів (42 доби).

Про появу «позитивної» пробірки прилад повідомляє появою червоної індикації на зовнішній панелі відповідного блоку, а також звуковим сигналом.

Рідина з «позитивної» пробірки повинна бути використана для:

- посіву на кров'яний агар для контролю контамінації;
- субкультивування на щільному живильному середовищі Левенштейна-Єнсена (далі – щільне середовище) і на середовищі з саліциловокислим натрієм/паранітробензойною кислотою;
- приготування мазків для виявлення наявності корд-фактору та підтвердження кислотостійкості.

При наявності сумнівів у правильності негативного результату (тобто мутність, зернистість і т. п.) також необхідно приготувати мазки для мікроскопічного дослідження, зробити посів матеріалу для наступного культивування на щільне середовище і на кров'яний агар для контролю контамінації. Якщо результати мікроскопії мазків залишаються негативними, контамінація відсутня і росту на щільному середовищі немає протягом 8 тижнів, видається негативна відповідь.

Для ідентифікації культур мікобактерій, виявлених у пробірках MGIT в рідкому середовищі з позитивним результатом забарвлення кислотостійких штамів мікобактерій, використовували експрес-метод хроматографічного імуноаналізу для якісного визначення антигену комплексу *M. tuberculosis*, який дозволяє виявляти *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* і *M. microti*. Ідентифікаційний тест Tbc ID виявляє MPT64, фракцію білка мікобактерій, яка виділяється з клітин комплексу MТВс у процесі культивування. При розміщенні зразків у обладнання для тестування антиген MPT64 зв'язується з антитілами до MPT64, кон'югованими з видимими частками на тестовій смужці. Комплекс антиген-кон'югат переміщується по тестовій смужці в область реакції й захоплюється іншим специфічним антитілом до MPT64, нанесеним на мембрану. Якщо в зразку присутній антиген MPT64, спостерігається кольорова реакція мічених часток колоїдного золота, яка проявляється у вигляді смуги від рожевого до червоного кольору [177].

2.2.3. Дослідження медикаментозної стійкості мікобактерій в системі ВАСТЕС MGIT 960

Стандартні концентрації препаратів для використання в системі ВАСТЕС MGIT 960 (мкг/мл): S – 1,0; H – 0,1; R – 1,0; E – 5,0; Z – 100,0. Препарати розчиняли шляхом додавання 4,0 мл стерильної дистильованої води у флакони з S, H, R і E і 2,5 мл води у флакон з Z та додавали по 100 мкл розчину у відповідні пробірки MGIT. Додавали по 800 мкл відповідних добавок у пробірки із препаратами й контрольні пробірки (добавку PZA – у пробірку з Z й Z контроль; добавку SIRE – у пробірки з S, H, R, E і SIRE контроль).

Культура була придатною для посіву на ТМЧ протягом 5 діб. Процедури підготовки культури для визначення МС трохи розрізнялися залежно від «віку» культур. Для культури «віком» 1 – 2 доби: гомогенізували рідину, осаджали протягом 5 – 10 хв., надосадову рідину використовували для інокуляції пробірок із препаратами. Для культури «віком» 3 – 5 доби: гомогенізували рідину, осаджали протягом 5 – 10 хв., поміщали в окрему пробірку 1,0 мл

надосадової рідини й розводили її 4,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl, одержавши, таким чином, розведення 1:5. Використовували його для інокуляції пробірок із препаратами.

Для підготовки контролів (без препаратів) використовували розведення суспензії мікобактерій 1:100 для посіву в пробірки SIRE. Для цього додавали 0,1 мл суспензії мікроорганізмів (надосадової рідини 1 – 2-денної культури або розведення 1:5 для 3 – 5 денної культури) у пробірку з 10,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl. Добре перемішували й використовували для посіву в контрольні пробірки.

Тривалість проведення визначення МС у системі звичайно становить від 4 до 21 доби. Система ВАСТЕС MGIT 960 проводить автоматичний моніторинг росту мікобактерій і повідомляє про завершення тесту при досягненні певного значення каламутності середовища в контрольній пробірці. При одержанні такого повідомлення всі пробірки, у які був посіяний даний матеріал, виймалися із приладу для одержання остаточного результату дослідження [10, 82].

2.2.4. Молекулярно-генетичні методи дослідження

У роботі використано дві молекулярно-генетичні системи, які використовуються для ідентифікації мікобактерій і швидкого визначення їх МС: GeneXpert і гібридизація з типоспецифічними зондами GenoType.

Система GeneXpert є інтегрованим діагностичним обладнанням, яке виконує обробку зразків і ПЛР у реальному часі для діагностики *in vitro*, яке застосовується з метою виявлення:

- ДНК *M. tuberculosis complex* у зразках мокротиння або концентрованих осадах, отриманих із зразків індукованого або спонтанного мокротиння, незалежно від того, чи були виявлені КСБ в мазках мокротиння;
- мутації гена *rpoB*, пов'язаних зі стійкістю до R у зразках.

Система GeneXpert призначена для аналізу зразків, які отримані від пацієнтів, що раніше не одержували лікування, у яких туберкульоз

запідозрений на підставі клінічних даних. В системі автоматично виконуються наступні процеси – обробка зразків, ампліфікація нуклеїнових кислот і виявлення цільової послідовності в простих і складних зразках з використанням ПЛР у реальному часі і ПЛР зі зворотною транскрипцією. Система складається з аналізатора, персонального комп'ютера, сканера штрих-кодів і програмного забезпечення для керування процесом аналізу зібраних зразків і перегляду результатів. Для роботи із системою потрібні одноразові картриджі GeneXpert, які містять реактиви для ПЛР і в яких відбувається ПЛР. Оскільки картриджі являють собою замкнені системи для проведення реакції, виключена перехресна контамінація між зразками.

Картриджі GeneXpert містять реактиви для виявлення МБТ і стійкості до R, а також контроль обробки зразка. Праймери тесту GeneXpert ампліфікують фрагмент гена *groB*, що містить 81 пару основ центральної ділянки. Зонди дозволяють відрізнити консервативну послідовність мікобактерій «дикого типу» від мутацій центральної ділянки, пов'язаних зі стійкістю до R [145, 168, 169, 170, 184, 212, 258, 259, 260, 261].

Призначення системи GenoType і наборів реагентів:

– набори GenoType Mycobacteria Direct і GenoType Mycobacteria CM 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 НТМБ: *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 значущих асоційованих мутацій гена *groB*, (кодує β -субодиницю РНК полімерази). Для виявлення стійкості до INH, досліджують ген *katG*, (кодує каталазу, пероксидазу) і область перегляду в гені *inhA* (кодує NADH еноіл АСР редуктазу);

– набір GenoType MTBRsl був застосований для визначення стійкості до Q, аміноглікозидів/циклічних пептидів, а також E в позитивних зразках мокротиння. Визначення MC до Q можливо при детекції найбільш значущих асоційованих мутацій гена *gyrA* (кодує α -субодиницю ДНК гірази). Для виявлення MC до аміноглікозидів/циклічних пептидів досліджується ген 16S rРНК 9 (*rrs*) і для виявлення MC до E – ген *embB* відповідно (ці гени разом з генами *embA* і *embC* кодують арабінозилтрансферазу).

Процедура проведення тестування підрозділяється на три етапи: виділення ДНК із матеріалу, що культивується, мультиплексна ампліфікація з біотинілірованими праймерами і реверс гібридизація.

Після хімічної денатурації, одноланцюгові амплікони зв'язуються із зондами (гібридизація). Високо специфічне зв'язування комплементарних ланцюгів ДНК обумовлено жорсткими умовами, які створюються в результаті оптимальної комбінації складу буфера і температури. Таким чином, зонди можуть вірогідно розпізнавати кілька варіантів послідовностей у області гена, який 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, яка стає видимою на мембрані стрипів, як кольоровий преципітат. Оцінка проводиться комп'ютерною програмою автоматично [77, 78, 166, 173, 215, 218].

2.3. Статистична обробка отриманих результатів

Зберігання результатів досліджень та їх математична обробка виконувались за допомогою ліцензійних програмних продуктів, які входять до пакету Microsoft Office Professional 2007, ліцензія Russian Academic OPEN No Level № 43437596. При виконанні розрахунків використовувались функції програми Excel.

Дані лабораторного обстеження пацієнтів оброблювалися та обчислювалися за параметричними методами статистики. Порівняння середніх

групових значень та оцінка достовірності відмінностей проводилося за параметричними методами статистики із застосуванням t-критерію Ст'юдента.

Параметричні методи використовували при обчисленні даних досліджень у разі значної кількості однорідних спостережень на ПК IBM PCXT за програмою WINDOWS Microsoft EXCEL, які відповідали закону нормального розподілення Гауса. Критерій Ст'юдента застосовували при рівномірному розподіленні варіаційного ряду [54].

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ З ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ВИДІЛЕННЯ МІКОБАКТЕРІЙ З КЛІНІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ХВОРИХ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ В СИСТЕМІ ВАСТЕС MGIT 960

Для своєчасної і правильної постановки діагнозу та призначення адекватної терапії дуже важливо швидко і точно виявити наявність мікобактерій у клінічних зразках та визначити їх чутливість до ПТП [7, 14, 42, 82].

Культуральна діагностика туберкульозу на сьогодні переживає принципові зміни, пов'язані із впровадженням у практику систем культивування мікобактерій в рідких середовищах, однією з них є ВАСТЕС MGIT 960. Застосування цієї системи комп'ютерної діагностики росту мікобактерій показало її ефективність в порівнянні з традиційними методами культуральної діагностики із застосуванням щільних середовищ [1, 10, 82].

При проведенні досліджень було застосовано систему ВАСТЕС MGIT 960, яка дозволяє використовувати для роботи рідке середовище та призначена для прискореної бактеріологічної діагностики туберкульозу і визначення чутливості мікобактерій до ПТП.

В процесі проведення експериментальних досліджень з підвищення ефективності виділення збудника з клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень в системі ВАСТЕС MGIT 960 було вивчено 281 культуру, що були «позитивними» в автоматизованій системі. Результати досліджень наведені в табл. 3.1.

Як видно з табл. 3.1 у 281 випадку було виявлено «позитивний» результат за інтенсивністю світіння при опроміненні ультрафіолетом в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Результати досліджень культур мікобактерій, що були «позитивними» в системі BACTEC MGIT 960

| «Позитивні» культури в системі BACTEC MGIT 960 | Кількість «позитивних» культур | |
|---|--------------------------------|------------|
| | абс | M ± m, % |
| Культури з наявністю корд-фактору і відсутністю росту на кров'яному агарі | 239 | 85,1 ± 2,1 |
| Культури без корд-фактору і з відсутністю росту на кров'яному агарі | 42 | 14,9 ± 2,1 |
| Всього «позитивних» культур | 281 | 100 |

Інтенсивність світіння прямо пропорційна рівню витрати кисню і реєструється в одиницях росту, які не являються колонієутворюючими одиницями мікобактерій, а лише свідчать про інтенсивність поглинання кисню. Наявність корд-фактору є безперечним доказом наявності мікобактерій у пробірці MGIT, а відсутність росту на кров'яному агарі свідчить про те, що в «позитивній» пробірці на рідкому середовищі відсутні супутні мікроорганізми. Як видно з табл. 3.1, у 85,1 % випадків було констатовано присутність життєздатних мікобактерій, які росли в рідкому середовищі і виявлялися за допомогою флуоресценції. Всі ці проби в подальшому були використані для постановки ТМЧ.

У 14,9 % випадків (табл. 3.1) в системі BACTEC MGIT 960 були виявлені «позитивні» пробірки. В той же час додаткові дослідження показали відсутність корд-фактору в цих пробірках MGIT, а також відсутність росту на кров'яному агарі. Таким чином, проведені дослідження показали, що в даних пробірках MGIT з рідким середовищем немає супутньої мікрофлори, але ці культури поки не можуть вважатися «позитивними».

Ми припустили, що пробірки MGIT, які були «позитивними» в системі BACTEC MGIT 960, не давали на кров'яному агарі росту, тобто були вільними

від супутньої мікрофлори, та були негативними за наявністю корд-фактору, можуть містити мікобактерії, але в дуже малих кількостях з підвищеним обміном речовин, що і було зареєстровано системою BACTEC MGIT 960 в одиницях росту. Також можна припустити, що пробірка MGIT може містити мікст-культури мікобактерій. У випадках, коли у пробі є в наявності більше одного виду мікобактерій з різною швидкістю росту, швидкоростучі мікобактерії можуть викликати позитивну флуоресценцію раніше ніж мікобактерії з повільним ростом.

Враховуючи той факт, що «позитивну» пробірку MGIT неможливо повторно завантажити в систему BACTEC MGIT 960, для продовження подальших досліджень усі пробірки з «позитивними» результатами на рідкому середовищі після культивування в системі BACTEC MGIT 960, але які не містили корд-фактору і були негативними за результатами посіву на кров'яний агар, розташовували в термостаті й інкубували 3 доби при 37 °С, тобто підрощували культуру. Якщо пробі містять мікобактерії, інкубація в термостаті приведе до їх розмноження та в подальшому – до появи корд-фактору при дослідженні методом світлової мікроскопії.

Термін культивування пробірок MGIT в термостаті до появи корд-фактору був встановлений нами експериментально в наступний спосіб. 42 пробірки MGIT з «позитивними» результатами на рідкому живильному середовищі після культивування в системі BACTEC MGIT 960, але які не містили корд-фактору і були негативними за результатами посіву на кров'яний агар, інкубували в термостаті при 37 °С протягом 4 днів із визначенням наявності корд-фактору на 2-у, 3-ю і 4-у добу. Результати досліджень представлено в табл. 3.2.

Як видно з даних табл. 3.2, за чотири доби в 45,2 % випадків спостерігалася поява корд-фактору при інкубації «позитивних» пробірок MGIT в термостаті при 37 °С. При цьому саме на 4-ту добу більшість «позитивних» культур набувала корд-фактор – 21,4 %. Нас не цікавила поява корд-фактору з 5-ої доби інкубації, тому що за стандартною методикою, «позитивна» пробірка, яка була

вилучена з системи ВАСТЕС MGIT 960 понад 5-ти діб, стає непридатною для проведення ТМЧ в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Таблиця 3.2

Залежність появи корд-фактору від терміну культивування «позитивних» пробірок MGIT

| Матеріал | Кількість досліджень | Виявлення корд-фактору після інкубації, доба | | | | | | Наявність корд-фактору після інкубації | |
|---|----------------------|--|-----------|-------|------------|----------|------------|--|------------|
| | | друга | | третя | | четверта | | абс | М ± m, % |
| | | абс | М ± m, % | абс | М ± m, % | абс | М ± m, % | | |
| «Позитивні» пробірки MGIT за одиницями росту (GU) | 42 | 3 | 7,1 ± 3,9 | 7 | 16,7 ± 2,3 | 9 | 21,4 ± 6,3 | 19 | 45,2 ± 7,6 |

В таких випадках її необхідно субкультивувати, тобто провести повторне культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960. Отже втрачається значення самого методу інкубації в системі як експрес-методу.

Після інкубації протягом 4 діб залишилось 54,8 % проб (23 культури), які були визначені системою ВАСТЕС MGIT 960 як «позитивні», але, які не мали корд-фактору. Ці пробірки в подальшому використовували для субкультивування на щільному середовищі, переглядали ці посіви протягом 10 тижнів і лише після цього у випадку відсутності росту, видавали негативну відповідь в клініку.

Як відзначалося вище, посилення флуоресценції спостерігається лише при рості мікроорганізмів, а інтенсивність світіння прямо пропорційна рівню витрат кисню та реєструється в одиницях росту, але в момент «позитивної» відповіді системи не завжди кількість одиниць росту є достатнім для його реєстрації, тобто не відповідає рівню 105 – 106 колонієутворюючих одиниць на

1,0 мл середовища, що є необхідним для «позитивної» відповіді при мікроскопії (наявність корд-фактору). Таким чином, доцільно використовувати щільне середовище зі зниженою концентрацією бактерицидного барвника малахітового зеленого і спробувати виділити мікобактерії. У цьому напрямку була проведена наступна робота.

Ми спробували запропонувати таке щільне середовище, яке могло б використовуватися для отримання росту культур мікобактерій при субкультивуванні «позитивних» пробірок MGIT після системи ВАСТЕС MGIT 960, які не містять корд-фактору і являються негативними за результатами посіву на кров'яний агар.

Класичне щільне живильне середовище Левенштейна-Єнсена використовується для виділення культур мікобактерій. Згідно з рекомендаціями Міжнародного союзу по боротьбі з туберкульозом і хворобами легень для практичних лабораторій, краще використовувати середовище з наступним вмістом.

Інгредієнти щільного середовища.

Суша основа: фосфат калію однозаміщений, безводний (KH_2PO_4) – 2,4 г, сульфат магнію – 0,24 г, цитрат магнію – 0,6 г, L-аспарагін – 3,6 г, гліцерин хімічно чистий – 12,0 мл, дистильована вода – до 600 мл. Всі інгредієнти розчиняються в дистильованій воді при нагріванні. Стерилізуються автоклавуванням при 121°C протягом 30 хв. Отриманий розчин охолоджується до кімнатної температури і зберігається в холодильнику. Окремо готується 2,0 % розчин малахітового зеленого – 2,0 г в стерильній дистильованій воді (100 мл). Наважка малахітового зеленого розчиняється в дистильованій стерильній воді, флакон з 2,0 % розчином витримується в термостаті 1 добу. Потім фільтрується через паперовий фільтр.

За загальноприйнятою методикою готуються гомогенізатор курячих яєць, до якого додається 2,0 % розчин малахітового зеленого та сольовий розчин.

Середовище Левенштейна-Єнсена має наступний склад: розчин мінеральних солей – 600 мл, 2,0 % розчин малахітового зеленого – 20,0 мл,

гомогенізовані яйця 20 – 25 штук (залежно від розміру) до 1000 мл. Готове живильне середовище розливається в стерильні пробірки по 5,0 мл і згортається в скошеному положенні при температурі 85 °С протягом 20 хв.

Таким чином, до середовища Левенштейна-Єнсена додається 20,0 мл 2,0 % розчину малахітового зеленого. Цей інгредієнт проявляє бактерицидну дію на супутню мікрофлору, яка міститься у зразках дослідного матеріалу при посіві їх на середовище Левенштейна-Єнсена для виділення збудника туберкульозу, оскільки деконтамінація деяких дуже забруднених зразків клінічного матеріалу при проведенні передпосівної обробки не може повністю інгібувати ріст неспецифічної мікрофлори.

Оскільки наші подальші дослідження були спрямовані на отримання культур мікобактерій з позитивних зразків після системи ВАСТЕС MGIT 960, які були негативними за наявністю корд-фактору та негативними за результатами посіву на кров'яний агар, тобто які не містили супутньої бактеріальної мікрофлори, ми припустили, що зниження концентрації малахітового зеленого в середовищі Левенштейна-Єнсена при субкультивуванні позитивних пробірок MGIT буде сприяти інтенсивному росту колоній мікобактерій та прискорить процес їх субкультивування на щільному середовищі.

Метою нашого дослідження було дослідити найменшу концентрацію малахітового зеленого при якій в середовищі Левенштейна-Єнсена зберігалася інгібуюча дія щодо росту неспецифічної мікрофлори. Для цього нами було виготовлене щільне середовище Левенштейна-Єнсена в чашках Петрі з різними концентраціями малахітового зеленого в 20,0 мл: 2,0 %, 1,0 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,2 %, 0,1 %. Інокуляцію середовища проводили культурою *Candida albicans* № 755. Готували суспензію з концентрацією $1,5 \times 10^8$ бактеріальних клітин в 1,0 мл, тобто 0,5 McF. Інкубацію посівів здійснювали в термостаті при 37 °С, переглядали щодня. Результати досліджень наведені в табл. 3.3.

З табл. 3.3 видно, що середовище Левенштейна-Єнсена з концентрацією малахітового зеленого від 2,0 % до 0,25 % мало інгібуючу дію щодо штаму *Candida albicans* № 755.

Таблиця 3.3

Інгібуюча дія середовища Левенштейна-Єнсена з різними концентраціями малахітового зеленого щодо неспецифічної мікрофлори, n = 24, M ± m

| Концентрація малахітового зеленого в 20,0 мл, % | Інтенсивність росту штаму <i>Candida albicans</i> № 755 на середовищі Левенштейна-Єнсена |
|---|--|
| 2,0 | ріст відсутній |
| 1,0 | ріст відсутній |
| 0,5 | ріст відсутній |
| 0,25 | ріст відсутній |
| 0,2 | 8,0 ± 1,4 |
| 0,1 | 15,0 ± 1,7 |

Зменшення концентрації даного реактиву в 20,0 мл дистильованої стерильної води до 0,2 % і далі приводило до росту штаму *Candida albicans*, тобто в таких концентраціях бактерицидна дія середовища Левенштейна-Єнсена по відношенню до супутньої мікрофлори припинялась.

Наші дослідження показали, що 0,25 % малахітового зеленого в 20,0 мл дистильованої стерильної води є найменшою концентрацією даного реагенту при якій зберігається його інгібуюча дія щодо росту неспецифічної мікрофлори в середовищі Левенштейна-Єнсена.

Подальші наші дослідження були спрямовані на вивчення залежності інтенсивності росту збудника туберкульозу на середовищі Левенштейна-Єнсена від концентрації малахітового зеленого, який є одним з інгредієнтів середовища. Нами було проведено дослідження щодо можливості зниження концентрації даного реагенту для отримання позитивної культури мікобактерій.

Ми виходили з того, що при посіві 0,1 мл суспензії, яка містить 3000 клітин *M. tuberculosis* H₃₇R_v на середовище Левенштейна-Єнсена з 2,0 % малахітового зеленого, виростає в середньому 25 – 30 колоній МБТ. Враховуючи цей факт, а також можливість росту неспецифічної мікрофлори при концентрації малахітового зеленого від 0,2 %, ми обмежились вивченням наступних концентрацій малахітового зеленого, які були внесені в середовище Левенштейна-Єнсена в чашки Петрі: 2,0 %; 1,0 %; 0,5 %; 0,25 % в 20,0 мл дистильованої стерильної води. В кожну чашку вносили по 0,1 мл суспензії МБТ із розведенням 3×10^3 . Результати досліджень наведені в табл. 3.4.

Таблиця 3.4

**Залежність інтенсивності росту *M. tuberculosis* на середовищі Левенштейна-Єнсена з різними концентраціями малахітового зеленого,
n = 24, M ± m**

| Концентрація малахітового зеленого в середовищі Левенштейна-Єнсена | Середня кількість колоній <i>M. tuberculosis</i> , що вирости в чашках Петрі: |
|--|---|
| 2,0 % | 14,0 ± 1,7* |
| 1,0 % | 19,0 ± 1,9* |
| 0,5 % | 25,0 ± 2,2* |
| 0,25 % | 28,1 ± 2,4* |

Примітка. * – пряма висока кореляція між показниками концентрації малахітового зеленого $r = 0,74$; $p < 0,001$ та середньою кількістю колоній МБТ.

Як видно з даних табл. 3.4, найбільша кількість колоній МБТ – в середньому 28,1, спостерігалась при посіві 0,1 мл суспензії, яка містила 3000 бактеріальних клітин штаму *M. tuberculosis* H₃₇R_v на середовище Левенштейна-Єнсена з 0,25 % розчином малахітового зеленого в 20,0 мл дистильованої стерильної води. На середовищі з вмістом 2,0 % малахітового зеленого в 20,0

мл дистильованої стерильної води інтенсивність росту колоній МБТ була в 2 рази нижче, ніж у попередньому дослідженні.

Важливо також відмітити, що додавання в середовище Левенштейна-Єнсена 1,0 % та 0,5 % розчину малахітового зеленого в 20,0 мл дистильованої стерильної води хоча й призводило до поступового збільшення інтенсивності росту колоній МБТ в середовищі Левенштейна-Єнсена в середньому до 19 та 25 колоній, але їх було значно менше ніж на середовищі з концентрацією малахітового зеленого 0,25 % в 20,0 мл дистильованої стерильної води.

Таким чином, при порівнянні показників середньої кількості колоній *M. tuberculosis*, що вирости в чашках Петрі при різних концентраціях малахітового зеленого в середовищі Левенштейна-Єнсена, виявлено що при концентрації малахітового зеленого 0,25 % 20,0 мл дистильованої стерильної води вироста найбільша кількість колоній (між показниками існує пряма висока кореляція $r = 0,74$; $p < 0,001$). Враховуючи отримані нами результати досліджень, доцільним є використання середовища Левенштейна-Єнсена з концентрацією малахітового зеленого 0,25 % в 20,0 мл дистильованої стерильної води для субкультивування позитивних пробірок MGIT, які не давали ріст на кров'яному агарі, тобто були вільними від супутньої мікрофлори та були негативними за наявністю корд-фактору.

В подальших дослідженнях ми звернули увагу на одну із складових класичного середовища Левенштейна-Єнсена – амінокислоту L-аспарагін. В проведених нами попередніх дослідженнях було доведено, що заміна L-аспарагіна на L-аспарагінову кислоту абсолютно не знижує ростові здібності середовища. Однак, звертає увагу, той факт, що L-аспарагінова кислота в 2, 6 рази дешевше L-аспарагіна. Нами було проведено декілька експериментів.

Було виготовлено дві серії середовища Левенштейна-Єнсена, але без малахітового зеленого, яке було розлите в чашки Петрі. Середовище згорталось в апараті при температурі 85 °C протягом 30 хв.

У першій серії досліджень до складу середовища була внесена амінокислота L-аспарагін у кількості 3,6 г на 600 мл дистильованої води, у

другій серії – L-аспарагін був замінений на L-аспарагінову кислоту в аналогічній кількості. В якості тест-культури було використано стандартний штам *M. tuberculosis* H₃₇R_v. З 14-добової культури *M. tuberculosis* H₃₇R_v готували суспензію з вмістом бактеріальних клітин 1 McF (3×10^8 кл/мл) в ізотонічному розчині хлориду натрію. Потім готували наступні розведення бактеріальної суспензії: 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 . У чашки Петрі з приготовленим середовищем Левенштейна-Єнсена засівали по 0,1 мл бактеріальної суспензії з розведень 10^3 – 10^6 . Посіви інкубували в термостаті при 37 °С до появи колоній *M. tuberculosis*. Щодня переглядали посіви, при появі росту визначали кількість колоній МБТ. Результати досліджень наведено в табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Залежність інтенсивності росту *M. tuberculosis* H₃₇R_v від різних концентрацій L-аспарагіну і L-аспарагінової кислоти в середовищі Левенштейна-Єнсена, n = 24, M ± m

| Середовище Левенштейна-Єнсена з 0,25 % малахітового зеленого в 20,0 мл дистильованої стерильної води з: | Розведення бактеріальної суспензії <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ R _v , які були досліджені, клітин/мл | Інтенсивність росту <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ R _v , кількість колоній МБТ |
|---|---|---|
| L-аспарагіном | 3×10^3 | 24,6 ± 1,4* |
| | 3×10^4 | 2 + |
| | 3×10^5 | 4+ |
| | 3×10^6 | 4 + |
| L-аспарагіновою кислотою | 3×10^3 | 29,7 ± 1,5 |
| | 3×10^4 | 2 + |
| | 3×10^5 | 4 + |
| | 3×10^6 | 4 + |

Примітки:

2 + – ріст 100 – 200 колоній *M. tuberculosis*.

4 + – ріст понад 500 колоній *M. tuberculosis*.

* – $p < 0,001$, $t = 2,55$ при порівнянні інтенсивності росту *M. tuberculosis* H₃₇R_v на середовищі Левенштейна-Єнсена з L-аспарагіном та L-аспарагіновою кислотою.

Як видно з даних табл. 3.5, при посіві на середовище Левенштейна-Єнсена з 0,25 % малахітового зеленого в 20,0 мл дистильованої стерильної води з L-аспарагіном при посіві 0,1 мл суспензії, яка містить 3000 клітин *M. tuberculosis* H₃₇R_v виросло в середньому $24,6 \pm 10,3$ колоній МБТ, при посіві на середовище Левенштейна-Єнсена з 0,25 % малахітового зеленого в 20,0 мл дистильованої стерильної води з L-аспарагіновою кислотою такої ж кількості мікробних клітин виросло у середньому 29,7 колоній МБТ, що на 5,1 % більше ($p < 0,001$, $t = 2,55$). Різниця показників є суттєво значимою і статистично доведеною, тому що $t > 2,0$. Враховуючи цей показник, а також той факт, що L-аспарагінова кислота в 2,6 дешевше L-аспарагіна, доцільно в нашому дослідженні додавати в середовище Левенштейна-Єнсена саме L-аспарагінову кислоту.

Надалі нас цікавив вплив кількості внесеної в середовище L-аспарагінової кислоти на ріст *M. tuberculosis*. Було випробувано 3 концентрації L-аспарагінової кислоти: 2,0 г, 3,6 г і 5,2 г, які були внесені в середовищі Левенштейна-Єнсена з 0,25 % малахітового зеленого.

В якості тест-культури використовували стандартний штам *M. tuberculosis* H₃₇R_v. З 14-добової культури *M. tuberculosis* H₃₇R_v готували суспензію з вмістом бактеріальних клітин 3×10^3 кл/мл в ізотонічному розчині хлориду натрію. В середовище Левенштейна-Єнсена з різним вмістом L-аспарагінової кислоти засівали по 0,1 мл отриманої суспензії. Посіви інкубували в термостаті при 37 °С до появи колоній *M. tuberculosis*. Щодня переглядали посіви, при появі росту визначали кількість колоній МБТ. Результати досліджень, що були отримані, наведено в табл. 3.6.

Як видно з даних табл. 3.6, найбільш інтенсивний ріст МБТ – 29,7 колоній МБТ, спостерігався при посіві 0,1 мл суспензії, яка містила 3000 клітин *M. tuberculosis* H₃₇R_v на середовище Левенштейна-Єнсена з 0,25 % малахітового зеленого в 20,0 мл дистильованої стерильної води з L-аспарагіновою кислотою в кількості 3,6 г. При додаванні в середовище Левенштейна-Єнсена L-аспарагінової кислоти в кількості 2,0 г виросло в

середньому 20,2 мікробних клітин МБТ, що було в 1,4 рази нижче, ніж при попередньому дослідженні ($p < 0,001$, $t = 4,5$).

Таблиця 3.6

Залежність інтенсивності росту *M. tuberculosis* H₃₇R_v в середовищі Левенштейна-Єнсена з 0,25 % малахітового зеленого від різних концентрацій L-аспарагінової кислоти, n = 24, M ± m

| Середовище Левенштейна-Єнсена з 0,25 % малахітового зеленого в 20,0 мл дистильованої стерильної води з: | Розведення бактеріальної суспензії <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ R _v , які були досліджені, клітин/мл | Інтенсивність росту <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ R _v , кількість колоній МБТ |
|---|---|---|
| L-аспарагінова кислота (2,0 г) | 3 x 10 ³ | 20,2 ± 1,3* |
| L-аспарагінова кислота (3,6 г) | 3 x 10 ³ | 29,7 ± 1,6 |
| L-аспарагінова кислота (5,2 г) | 3 x 10 ³ | 29,4 ± 1,6 [•] |

Примітки:

* – $p < 0,001$, $t = 4,5$ при порівнянні показників росту *M. tuberculosis* H₃₇R_v на середовищі з 2,0 г і 3,6 г L-аспарагінової кислоти.

[•] – $p > 0,001$, $t = 0,13$ при порівнянні показників росту *M. tuberculosis* H₃₇R_v на середовищі з 3,6 г і 5,2 г L-аспарагінової кислоти.

Різниця показників є суттєво значимою і статистично доведеною, тому що $t > 2,0$. Збільшення концентрації L-аспарагінової кислоти до 5,2 г не приводило до зростання інтенсивності росту *M. tuberculosis* H₃₇R_v ($p > 0,001$, $t = 0,13$). Різниця показників не суттєва, статистично не значуща, тому що $t < 2,0$. Враховуючи вищевикладене, оптимальним є внесення в середовище Левенштейна-Єнсена 3,6 г L-аспарагінової кислоти.

Таким чином, проведені нами дослідження довели, що при інкубації в термостаті при 37 °С протягом 4 діб пробірки MGIT з «позитивними»

результатами на рідкому живильному середовищі після культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960, але які не містили корд-фактору і були негативними за результатами посіву на кров'яний агар, 45,2 % проб набувають корд-фактор і стають придатними для подальшої постановки ТМЧ в апараті ВАСТЕС MGIT 960 на рідкому середовищі.

Наші дослідження показали, що 0,25 % малахітового зеленого в 20,0 мл дистильованої стерильної води є найменшою концентрацією даного реагенту в середовищі Левенштейна-Єнсена, при якій зберігається його інгібуюча дія щодо росту неспецифічної мікрофлори при субкультивуванні проб з позитивним результатом на рідкому живильному середовищі після культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960, але які не містять корд-фактор і є негативними за результатами посіву на кров'яний агар.

Тобто, отримані дані довели, що доцільним є додавання в середовище Левенштейна-Єнсена L-аспарагінової кислоти в концентрації 3,6 г для подальшого субкультивування позитивних проб MGIT після апарату ВАСТЕС MGIT 960, але які не містять корд-фактор і є негативними за наявністю корд-фактору за результатами посіву на кров'яний агар.

Частина наведених даних увійшла в статтю: Експериментальні дослідження по підвищенню ефективності виділення мікобактерій з клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень з використанням рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 // А. І. Барбова, О. А., Журило, Н. М. Алієва, П. С. Трофімова, С. В. Миронченко // Укр. пульмонологіч. журнал. – 2015. – № 3. – С. 56–60 [38].

РОЗДІЛ 4

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЩОДО ВИДІЛЕННЯ МІКОБАКТЕРІЙ ТРАДИЦІЙНИМ СПОСОБОМ ТА З ВИКОРИСТАННЯМ РІДКОГО ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА І МОДИФІКОВАНОГО ЩІЛЬНОГО ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА В СИСТЕМІ ВАСТЕС MGIT 960

Протягом останніх десятиліть культуральна діагностика туберкульозу базувалась на використанні традиційних щільних яєчних живильних середовищ. Сучасний етап розвитку діагностичних методів туберкульозу характеризується впровадженням нових технологій, в першу чергу, систем заснованих на використанні рідких живильних середовищ.

Метод культуральної діагностики туберкульозу за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960 включає паралельний посів зразків дослідного матеріалу як на рідке, так і на щільне середовище.

Нами було проведено 698 досліджень зразків дослідного матеріалу в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 та паралельно на щільному середовищі. Результати культивування зразків дослідного матеріалу з використанням різних живильних середовищ наведені в табл. 4.1.

Як видно із даних табл. 4.1 із 698 зразків мокротиння, досліджених методом посіву в рідке середовище в системі ВАСТЕС MGIT 960 та на щільне середовище, 547 проб (78,4 %) були позитивними на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена. Серед зразків, що були негативними за результатами посіву на щільне середовище, методом культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960 в рідкому середовищі було виявлено 96 позитивних проб (13,7 %).

Таким чином, за допомогою цих двох методів культуральної діагностики на різних живильних середовищах бактеріовиділення було підтверджено в 92,1% випадків. Усі ці культури були позитивними за методом культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960, тоді як позитивних культур за методом посіву на

середовище Левенштейна-Єнсена було виявлено 78,4 %. Метод виділення культур в апараті з використанням рідкого живильного середовища майже в 1,2 рази достовірно перевищує діагностичну ефективність методу посіву на щільному середовищі ($p < 0,001$).

Таблиця 4.1

**Результати культурального дослідження на туберкульоз зразків
мокротиння з використанням рідкого та щільного
живильних середовищ**

| Культуральні дослідження з використанням різних живильних середовищ | Результативність методів | |
|---|--------------------------|-------------|
| | абс | М ± m, % |
| Рідке середовище в системі ВАСТЕС «+» Щільне середовище Левенштейна-Єнсена «+» | 547 | 78,4 ± 1,6 |
| Рідке середовище в системі ВАСТЕС «+» Щільне середовище Левенштейна-Єнсена «-» | 96 | 13,7 ± 1,3 |
| Рідке середовище в системі ВАСТЕС «-» Щільне середовище Левенштейна-Єнсена «+» | 0 | 0 |
| Рідке середовище в системі ВАСТЕС «-» Щільне середовище Левенштейна-Єнсена «-» | 55 | 7,9 ± 1,0 |
| Всього позитивних результатів в системі ВАСТЕС | 643 | 92,1 ± 1,0* |
| Позитивних посівів на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена | 547 | 78,4 ± 1,6 |
| Всього досліджень | 698 | 100 |

Примітки:

«+» – позитивний результат.

«-» – негативний результат.

* – $p < 0,001$ при порівнянні культуральних досліджень в системі ВАСТЕС MGIT 960 і на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена.

При проведенні порівняльного аналізу методів культивування зразків мокротиння в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 та щільному середовищі важливу складову мають строки виділення культур мікобактерій. Нами були проведені подальші дослідження для вивчення цього питання.

Відомо, що метод бактеріоскопії є менш чутливим методом дослідження, ніж метод посіву. Тому, якщо методом світлової мікроскопії в пробах клінічного матеріалу знайдені КСБ, то посів цих зразків на будь-яке живильне середовище повинен бути стовідсотково позитивним. Якщо цього не відбувається це вказує на технічні недоліки в роботі лабораторії. Тому для проведення подальших культуральних досліджень з використанням рідких і щільних живильних середовищ ми відібрали зразки мокротиння, в яких за методом світлової мікроскопії були виявлені КСБ. Усі ці зразки перед посівом на рідкі та щільні живильні середовища були оброблені відповідно до стандартної методики та посіяні на живильні середовища. Посіви інкубували при 37 °С. Появу позитивних результатів реєстрували та аналізували. Отримані в ході виконання досліджень результати наведені в табл. 4.2.

Як видно з табл. 4.2 середня тривалість росту культур в рідкому середовищі склала 11,5 діб, середня тривалість росту культур мікобактерій на щільному середовищі склала 33,2 дня. Отримані результати свідчать про те, що терміни виділення збудника туберкульозу за допомогою рідкого середовища при культивуванні зразків в системі ВАСТЕС MGIT 960 скорочуються на 20,1 діб, або в 3,1 рази в порівнянні з культивуванням збудника туберкульозу на щільному середовищі з високим ступенем достовірності ($p < 0,001$).

Як було зазначено вище, методика виділення мікобактерій в системі ВАСТЕС MGIT 960, окрім посіву оброблених зразків клінічного матеріалу на рідке середовище включає також субкультивування позитивних проб MGIT на щільному середовищі після вирощування їх в системі ВАСТЕС MGIT 960. В попередніх дослідженнях була запропонована модифікація щільного середовища, яке містить 0,25 % малахітового зеленого та з 3,6 г L-аспарагінової кислоти. Це середовище було запропоновано для підвищення ефективності

субкультивування позитивних проб MGIT після системи BACTEC MGIT 960, які є негативними за наявністю корд-фактору та за результатами посіву на кров'яний агар.

Таблиця 4.2

Порівняльний аналіз термінів росту культур мікобактерій на рідких і щільних середовищах при посіві зразків мокротиння, що були позитивними за методом світлової мікроскопії

| Матеріал | Кількість досліджень | Середня тривалість росту культур, дні | |
|-------------------------|----------------------|---------------------------------------|---|
| | | рідке середовище Middlebrook 7H9 | щільне середовище Левенштейна-Єнсена |
| | | M ± m | M ± m |
| Зразки мокротиння з КСБ | 224 | 11,5 ± 0,4* | 31,6 ± 0,7 |

*Примітка. * – $p < 0,001$ при порівнянні показників середньої тривалості росту культур на рідкому та щільному середовищах.*

Для нас представляв інтерес дослідження тривалості субкультивування «позитивних» проб MGIT на традиційному та модифікованому середовищі Левенштейна-Єнсена після культивування в системі BACTEC MGIT 960. Результати досліджень представлені в табл. 4.3.

Як видно з табл. 4.3, середня тривалість субкультивування культур на класичному середовищі Левенштейна-Єнсена в середньому складає 13,4 доби, середня тривалість субкультивування позитивних культур після системи BACTEC MGIT 960 на модифікованому щільному середовищі складає 7,4 доби. Отримані результати свідчать про те, що терміни субкультивування за допомогою модифікованого середовища на 6 днів, або в 1,8 разів менше, ніж на класичному середовищі Левенштейна-Єнсена з високим ступенем достовірності ($p < 0,001$).

Вивчення тривалості субкультивування на традиційному та модифікованому середовищі Левенштейна-Єнсена позитивних проб після культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960

| Матеріал | Кількість досліджень | Середня тривалість субкультивування, дні | |
|--|----------------------|--|--|
| | | традиційне середовище Левенштейна-Єнсена | модифіковане середовище Левенштейна-Єнсена |
| | | $M \pm m$ | $M \pm m$ |
| Позитивні зразки після культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960 | 224 | $13,4 \pm 0,8$ | $7,4 \pm 0,6^*$ |

*Примітка. * – $p < 0,001$ при порівнянні показників середньої тривалості субкультивування позитивних зразків на класичному та модифікованому середовищі Левенштейна-Єнсена.*

Проведені нами дослідження дозволили провести порівняльний аналіз щодо виділення мікобактерій з використанням двох різних комплексних методичних підходів:

– застосування рідкого середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960 і субкультивуванні «позитивних» проб MGIT на класичному середовищі Левенштейна-Єнсена;

– застосування рідкого середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960 і субкультивуванні «позитивних» проб MGIT на модифікованому середовищі Левенштейна-Єнсена.

Результати досліджень щодо порівняльного аналізу комплексного застосування методів наведені в табл. 4.4.

Порівняльний аналіз щодо виділення мікобактерій з використанням двох різних комплексних методичних підходів культивування та субкультивування

| Матеріал | Кількість досліджень | Середня тривалість виділення мікобактерій, дні | |
|-------------------------|----------------------|--|--|
| | | рідке середовище та класичне середовище Левенштейна-Єнсена | рідке середовище та модифіковане середовище Левенштейна-Єнсена |
| | | M ± m | M ± m |
| Зразки мокротиння з КСБ | 224 | 24,9 ± 0,3 | 18,9 ± 0,3* |

*Примітка. * – $p < 0,001$ при порівнянні показників середньої тривалості виділення мікобактерій з використанням рідкого і класичного середовищ та рідкого і модифікованого середовищ.*

Як видно з табл. 4.4, середня тривалість виділення мікобактерій із застосуванням рідкого середовища та модифікованого середовища Левенштейна-Єнсена для субкультивування складає 18,9 днів, що на 6 днів, або в 1,3 рази менше тривалості виділення мікобактерій із застосуванням рідкого середовища та класичного середовища Левенштейна-Єнсена для субкультивування з високим ступенем достовірності ($p < 0,001$).

Таким чином, в результаті проведених досліджень доведено, що діагностична ефективність виділення культур в системі ВАСТЕС MGIT 960 з використанням рідкого середовища складає 92,1 %, що майже в 1,2 рази достовірно перевищує діагностичну ефективність методу посіву на щільному середовищі.

Встановлено, що середня тривалість росту культур в рідкому середовищі склала 11,5 діб, при цьому терміни виділення збудника туберкульозу за допомогою рідкого середовища при культивуванні зразків в системі ВАСТЕС MGIT 960 скорочуються на 20,1 діб, або в 3,1 рази в порівнянні з культивуванням збудника туберкульозу на щільному середовищі.

Встановлено, що середня тривалість субкультивування «позитивних» культур після системи ВАСТЕС MGIT 960 на модифікованому щільному середовищі складає 7,4 доби, що на 6 днів, або в 1,8 разів менше, ніж на класичному середовищі Левенштейна-Єнсена.

Проведені дослідження свідчать, що середня тривалість виділення мікобактерій із застосуванням рідкого середовища та модифікованого середовища Левенштейна-Єнсена для субкультивування складає 18,9 днів, що на 6 днів, або в 1,3 рази менше тривалості виділення мікобактерій із застосуванням рідкого середовища та класичного середовища Левенштейна-Єнсена для субкультивування.

Представлені дані дослідження повністю увійшли в статтю: Експериментальні дослідження по підвищенню ефективності виділення мікобактерій з клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень з використанням рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 // А. І. Барбова, О. А., Журило, Н. М. Алієва, П. С. Трофімова, С. В. Миронченко // Укр. пульмонологіч. журнал. – 2015. – № 3. – С. 56–60 [38].

Частково увійшли в статтю: Варіанти моно- і полірезистентності МБТ до протитуберкульозних препаратів 1 ряду у хворих з новими і повторними випадками туберкульозу / А. І. Барбова, С. О. Черенько, Г. В. Старичек, О. В. Аврамчук, М. В. Погребна, Н.М. Алієва // Туберкульоз. Легеневі хвороби. ВІЛ-інфекція. – 2016. – № 1. – С. 23–36 [21].

РОЗДІЛ 5

**ОБГРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ СИСТЕМИ ВАСТЕС MGIT 960
ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ КЛІНІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ХВОРИХ НА
ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ ЗАЛЕЖНО ВІД КЛІНІЧНОЇ КАТЕГОРІЇ
ТУБЕРКУЛЬОЗНОГО ПРОЦЕСУ**

Нами були проведені дослідження щодо експериментально-клінічного обґрунтування застосування системи ВАСТЕС MGIT 960 для бактеріологічних досліджень зразків клінічного матеріалу пацієнтів з встановленим клінічним діагнозом та з різними клінічними категоріями туберкульозного процесу.

Для аналізу отриманих даних на основі Ф. № 252-2/о «Лабораторний реєстраційний журнал (культуральні дослідження) ТБ 04/2», який затверджений наказом МОЗ України від 02.09.2009 № 657 «Про затвердження форм первинної облікової документації і форм звітності з туберкульозу та інструкцій щодо їх заповнення» була створена база даних на паперових носіях, які містили повний об'єм відомостей щодо використання методів досліджень та їх результати.

В базу ввійшли відомості про дату посіву, лабораторний номер зразка, прізвище ім'я по батькові пацієнтів, відділення, матеріал, випадок, клінічна категорія, результати мікроскопії осаду за методом Циль-Нільсена, результат посіву осаду на щільне середовище Левенштейна-Єнсена, дата отримання результату, результати росту в системі ВАСТЕС MGIT 960, дата отримання результату, ідентифікація культур при позитивному рості в ВАСТЕС MGIT 960, яка включає в себе мікроскопію за методом Циль-Нільсена та ріст на кров'яному агарі, результати субкультивування на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена та результати ТМЧ до препаратів 1-го ряду в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Перераховані вище дані дали змогу зібрати повну і достовірну інформацію щодо результатів досліджень клінічного матеріалу пацієнтів з підозрою на туберкульоз та хворих з встановленим клінічним діагнозом

залежно від клінічної категорії та випадку захворювання, кількості днів для отримання результатів досліджень на рідкому середовищі Middledrook 7H9 та на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена, інтенсивності росту, а також зробити відбір даних, що фіксувалися в спеціально розробленій комп'ютерній базі даних в програмі MS Excel.

Бактеріоскопічні дослідження та посів клінічного матеріалу на рідке живильне середовище Middledrook 7H9 і на щільне середовище Левенштейна-Єнсена проводили згідно зі стандартною методикою, що регламентує дослідження за допомогою системи BACTEC MGIT 960.

Після проведення бактеріологічних досліджень та отримання відповідних даних було проведено їх зведення, аналіз та статистична обробка інформації.

Для оцінки та порівняння результатів досліджень, що були позитивними в системі BACTEC MGIT 960, за допомогою фільтрів в програмі MS Excel, була зроблена вибірка з бази даних за такими показниками: «позитивний» результат в рідкому живильному середовищі Middledrook 7H9 в системі BACTEC MGIT 960; наявність корд-фактору при проведенні бактеріоскопії за методом Циль-Нільсена з позитивних проб; результат росту на кров'яному агарі. Було підраховано загальну кількість варіантів, розраховано середню похибку та достовірність показників.

Для оцінки та порівняння результатів появи корд-фактору від терміну культивування «позитивних» пробірок MGIT були розроблені таблиці в програмі MS Excel і за допомогою фільтрів були виділені:

- дата позитивного результату в системі BACTEC MGIT 960;
- дата виявлення корд-фактору після інкубації;
- підрахунок днів.

Було підраховано загальну кількість варіантів, розраховано середню похибку та достовірність показників.

Для оцінки та порівняння термінів росту культур мікобактерій в рідкому живильному середовищі і щільному середовищі Левенштейна-Єнсена при

посіві зразків мокротиння, які були позитивними за методом світлової мікроскопії, була зроблена вибірка з бази даних, побудовані таблиці варіаційного ряду та підраховано середнє арифметичне та її параметри, достовірність відмінностей, а також статистична значимість показника.

У ході досліджень нами було проведено аналіз щодо ефективності виділення збудника туберкульозу зі зразків клінічного матеріалу від хворих з різними клінічними категоріями захворювання на туберкульоз. Нами було визначено відсоток бактеріологічного підтвердження діагнозу різними методами культуральної діагностики – за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960 в рідкому середовищі та на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена. Було проаналізовано дані про визначення бактеріовиділювачів I-ої, II-ої та IV-ої клінічної категорії захворювання на туберкульоз. Результати отриманих даних наведені в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Виявлення бактеріовиділювачів *M. tuberculosis* за клінічними категоріями захворювання на туберкульоз

| Клінічні категорії захворювання | Всього | Результати культуральної діагностики | | | | | |
|---------------------------------|--------|--|-------------|--|------------|--|------------|
| | | рідке середовище, (+)/щільне середовище, (+) | | рідке середовище, (+)/щільне середовище, (-) | | рідке середовище, (-)/щільне середовище, (-) | |
| | | абс | М ± m, % | абс | М ± m, % | абс | М ± m, % |
| I | 498 | 314 | 63,0 ± 2,2* | 112 | 22,5 ± 1,9 | 72 | 14,5 ± 1,6 |
| II | 54 | 29 | 53,7 ± 6,7* | 11 | 20,4 ± 5,4 | 14 | 25,9 ± 5,9 |
| IV | 143 | 136 | 95,1 ± 1,8* | 3 | 2,1 ± 1,2 | 4 | 2,8 ± 1,4 |
| Всього | 695 | 479 | 68,9 ± 1,8* | 126 | 18,2 ± 1,4 | 90 | 12,9 ± 1,3 |

Примітки:

* – $p < 0,001$ (при порівнянні показників ефективності діагностики за допомогою рідкого і щільного та лише рідкого середовища).

(+) – наявність росту мікобактерій.

(-) – відсутність росту мікобактерій.

Як свідчать дані з табл. 5.1, для всіх клінічних категорій прослідковується однакова закономірність – культивування зразків клінічного матеріалу лише в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 додатково виявляє у середньому 18,2 % бактеріовиділювачів у порівнянні з методом бактеріологічної діагностики з використанням щільного середовища ($p < 0,001$). При цьому важливо відмітити, що всі бактеріовиділювачі, які були виявлені в кожній клінічній категорії були в 100 % підтверджені методом посіву в рідке середовище в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Також важливо відмітити, що найбільший відсоток додаткових позитивних результатів культуральних досліджень, який бувотриманий лише за рахунок використання рідкого середовища зафіксований при посіві зразків клінічного матеріалу хворих I-ої клінічної категорії. При цьому було виявлено додатково 22,5 % бактеріовиділювачів.

Проведені дослідження дозволили встановити також відсоток позитивних результатів культурального дослідження в системі ВАСТЕС MGIT 960 при посіві зразків мокротиння від хворих на туберкульоз II-ої категорії. Так, лише за допомогою даної методики додатково було діагностовано 20,4 % бактеріовиділювачів.

Аналіз результатів показав, що найменш інформативними, щодо використання лише рідкого середовища для виявлення бактеріовиділювачів, були показники бактеріологічної діагностики клінічних зразків від хворих IV-ої клінічної категорії. В цих випадках було виявлено лише 2,1 % бактеріовиділювачів додатково до результатів культуральних досліджень з використанням традиційного щільного середовища Левенштейна-Єнсена.

В подальших дослідженнях нас цікавило визначення відсотка бактеріовиділювачів в різних клінічних категоріях хворих за допомогою культуральних методів дослідження в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 та на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена. В ході досліджень нами було проаналізовано дані про виявлення бактеріовиділювачів із 695

хворих із різними випадками туберкульозу. Результати досліджень наведені в табл. 5.2.

Таблиця 5.2

**Виявлення бактеріовиділювачів *M. tuberculosis*
(за випадком захворювання)**

| Характеристика випадку | Всього | Результати культуральної діагностики | | | | | |
|------------------------|--------|--|-------------|--|------------|--|------------|
| | | рідке середовище (+) / щільне середовище (+) | | рідке середовище (+) / щільне середовище (-) | | рідке середовище (-) / щільне середовище (-) | |
| | | абс | М ± m, % | абс | М ± m, % | абс | М ± m, % |
| ВДТБ | 452 | 315 | 69,7 ± 2,2* | 100 | 22,1 ± 1,9 | 37 | 8,3 ± 1,3 |
| РТБ | 72 | 46 | 63,9 ± 5,6* | 14 | 19,4 ± 4,6 | 12 | 16,7 ± 0,5 |
| МРТБ | 81 | 72 | 88,9 ± 3,5* | 1 | 1,2 ± 1,2 | 8 | 9,9 ± 0,3 |
| РМРТБ | 59 | 36 | 61,0 ± 6,3* | 17 | 28,8 ± 5,8 | 6 | 10,2 ± 3,9 |
| ХТБ | 31 | 31 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Всього | 695 | 500 | 71,9 ± 1,7* | 132 | 18,9 ± 1,5 | 63 | 9,2 ± 1,1 |

Примітки:

* – $p < 0,001$ (при порівнянні показників ефективності діагностики за допомогою рідкого та щільного і лише рідкого середовища).

(+) – наявність росту мікобактерій.

(-) – відсутність росту мікобактерій.

З даних табл. 5.2. видно, що з 695 хворих з різними випадками туберкульозу бактеріовиділювачами були 632 хворих – 90,8 %. Всі ці випадки були підтверджені методом посіву в рідке середовище в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Проведені дослідження свідчать, що метод культивування зразків клінічного матеріалу в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 є

більш ефективним при проведенні бактеріологічної діагностики випадків туберкульозу, ніж метод культивування з використанням традиційного щільного середовища Левенштейна-Єнсена. Так, з 632 випадків туберкульозу з бактеріовиділенням 500 (71,9 %) були виявлені за двома методами культуральної діагностики, при цьому 132 (18,9 %) випадків додатково були діагностовані лише за допомогою рідкого середовища.

Як свідчать дані табл. 5.2, метод культуральної діагностики в системі ВАСТЕС MGIT 960 є інформативнішим для визначення бактеріовиділювачів з діагнозом ВДТБ. Так, з цим діагнозом нами було виявлено 22,1 % бактеріовиділювачів лише за допомогою рідкого живильного середовища.

З табл. 5.2 також видно, що за допомогою лише рідкого середовища було виявлено 19,4 % бактеріовиділювачів з рецидивами туберкульозу.

За даними табл. 5.2, найбільш ефективним є використання рідкого середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960 для виявлення бактеріовиділювачів з ризиком розвитку мультирезистентного туберкульозу (МРТБ). Але в таких випадках слід розділяти хворих, у яких під час лікування може розвинується мультирезистентність і пацієнтів, які є контактними особами з хворими, у яких встановлений діагноз МРТБ.

Нами були проведені дослідження клінічного матеріалу лише від контактних осіб. Дані, які наведені в табл. 5.2, свідчать про те, що бактеріовиділення було виявлено в 17 випадках МРТБ, в тому числі за допомогою лише рідкого середовища було діагностовано 28,8 % бактеріовиділювачів.

З табл. 5.2 видно, що найменш ефективним є використання методу культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960 клінічних зразків від хворих з встановленим діагнозом МРТБ було виявлено лише 1,2 %. При цьому за допомогою обох методів культуральної діагностики, що використовувалися нами одночасно, загалом було визначено 88,9 % бактеріовиділювачів з МРТБ.

Проведені нами дослідження довели, що недоцільним є використання рідкого середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960 для виявлення

бактеріовиділювачів з діагнозом хронічного туберкульозу (ХТБ), оскільки всі випадки були підтвержені при культивуванні зразків клінічного матеріалу методом посіву на щільне середовище Левенштейна-Єнсена (див. табл. 5.2).

При використанні рідкого середовища Middledrook 7H9 інтерес представляла можливість його застосування для встановлення бактеріовиділення при обстеженні клінічного матеріалу дітей. Оскільки діти є контингентом, у яких дуже рідко виділяють мікобактерії, нами сумісно з відділенням фтизіопедіатрії було налагоджено збір діагностичного матеріалу, який, на думку клініцистів, мав би важливе діагностичне значення. Змиви з ротоглотки дітей досліджували тричі методом посіву на рідке та щільне середовища. Результати досліджень наведені в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

**Виявлення бактеріовиділювачів *M. tuberculosis* серед дітей
з використанням різних середовищ при культивуванні**

| Всього обстежено дітей | Результати культуральної діагностики | | | | | |
|------------------------------|--|------------|--|------------|--|------------|
| | рідке середовище (+) / щільне середовище (+) | | рідке середовище (+) / щільне середовище (-) | | рідке середовище (-) / щільне середовище (-) | |
| | абс | М ± m, % | абс | М ± m, % | абс | М ± m, % |
| 110 | 6 | 5,5 ± 2,1* | 15 | 13,6 ± 4,4 | 89 | 80,9 ± 5,0 |

Примітки:

* – $p < 0,001$ при порівнянні показників ефективності культуральної діагностики за допомогою рідкого та щільного та лише рідкого середовища.

(+) – наявність росту мікобактерій.

(-) – відсутність росту мікобактерій.

З даних табл. 5.3 видно, що метод культивування зразків клінічного матеріалу в рідкому середовищі виявив 13,6 % бактеріовиділювачів, що майже у 2,7 разів більше, ніж діагностика бактеріовиділення у дітей на щільному

середовищі Левенштейна-Єнсена, яка складає 5,5 % ($p < 0,001$). Тобто, використання системи ВАСТЕС MGIT 960 для виявлення бактеріовиділення у дітей є доцільним та перспективним.

Таким чином, проведені нами дослідження показали, що культивування зразків клінічного матеріалу від хворих із різними категоріями захворювання на туберкульоз лише в системі ВАСТЕС MGIT 960 в рідкому живильному середовищі дозволило виявити додатково в середньому 18,2 % бактеріовиділювачів у порівнянні з методом бактеріологічної діагностики з використанням класичного середовища Левенштейна-Єнсена.

Отримані дані підтвердили доцільність використання рідкого середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960 для пацієнтів 1-ої клінічної категорії, у яких бактеріовиділення за допомогою лише цієї методики виявляється додатково у 22,5 % випадків.

Найменш інформативними є використання рідкого середовища для виявлення бактеріовиділювачів при дослідженні зразків клінічного матеріалу від хворих IV-ої клінічної категорії. В цих випадках виявляється додатково в середньому лише 2,1 % бактеріовиділювачів.

Метод культивування зразків клінічного матеріалу в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 є більш ефективним при проведенні бактеріологічної діагностики випадків туберкульозу, ніж метод культивування з використанням традиційного щільного середовища Левенштейна-Єнсена. Лише за допомогою рідкого середовища в середньому додатково виявляється 18,9 % випадків туберкульозу.

Дуже інформативним є використання рідкого середовища для визначення бактеріовиділювачів з діагнозом ВДТБ, у яких бактеріовиділення лише за допомогою культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960 виявляється у середньому на 22,1 % більше випадків у порівнянні з культивуванням на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена; для діагностики РТБ, при цьому в середньому виявляється додатково 19,4 % бактеріовиділювачів; для обстеження

пацієнтів, що знаходилися в контакті з хворими на МРТБ – 28,8 % бактеріовиділювачів.

Доцільним та перспективним є використання рідкого середовища для діагностики туберкульозу у дітей, які дуже рідко є бактеріовиділювачами. Методом культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960 можливо виявити МБТ в середньому в 13,6 % дітей з клінічним діагнозом «туберкульоз».

Найменш ефективним є використання методу культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960 клінічних зразків від хворих з встановленим діагнозом МРТБ – виявляється лише 1,2 % пацієнтів додатково до методу посіву на щільне середовище.

Проведені нами дослідження довели, що недоцільним є використання рідкого середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960 для виявлення бактеріовиділювачів із діагнозом ХТБ, оскільки всі випадки були підтверджені при культивуванні зразків клінічного матеріалу методом посіву на щільне середовище Левенштейна-Єнсена.

Частина представлених даних увійшла в статтю: Варіанти моно- і полірезистентності МБТ до протитуберкульозних препаратів 1 ряду у хворих з новими і повторними випадками туберкульозу / А. І. Барбова, С. О. Черенько, Г. В. Старичек, О. В. Аврамчук, М. В. Погребна, Н. М. Алієва // Туберкульоз. Легеневі хвороби. ВІЛ-інфекція. – 2016. – № 1. – С. 23–36 [21].

РОЗДІЛ 6

ВИЗНАЧЕННЯ КРИТЕРІЇВ РЕЗИСТЕНТНОСТІ *M. TUBERCULOSIS* ДО ПРЕПАРАТІВ 2-ГО І РЕЗЕРВНОГО РЯДУ В РІДКОМУ ЖИВИЛЬНОМУ СЕРЕДОВИЩІ MIDDLEBROOK 7H9 В СИСТЕМІ ВАСТЕС MGIT 960

Сучасний етап розвитку діагностичних методів туберкульозу характеризується впровадженням нових технологій, в першу чергу, систем із комп'ютерною детекцією росту мікобактерій, заснованих на використанні рідких живильних середовищ, які призначені для прискореного виділення збудника туберкульозу та визначення спектру його медикаментозної стійкості. Однією з них є система ВАСТЕС MGIT 960, яка призначена для прискореної бактеріологічної діагностики туберкульозу і визначення МС мікобактерій до препаратів 1-го ряду, але й не виключає можливості визначення чутливості мікобактерій і до медикаментозних препаратів 2-го і резервного ряду [1, 62, 82].

Збільшення частоти MDR-туберкульозу в світі призвело до широкого використання препаратів 2-го і резервного ряду для лікування таких форм захворювання. Оскільки препарати 2-го і резервного ряду є високовартісними, їх призначення в кожному випадку потребує клінічного і бактеріологічного обґрунтування. Тому, на сучасному етапі наявність стандартизованих методик визначення МС до препаратів 2-го і резервного ряду є вкрай необхідною. Наші дослідження були спрямовані на пошук шляхів, які могли б забезпечити швидке отримання надійних і точних результатів ТМЧ до препаратів 2-го і резервного ряду [77, 165, 230].

В результаті впровадження в практичну діяльність бактеріологічних лабораторій 3-го рівня протитуберкульозних закладів України рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 з використанням системи ВАСТЕС MGIT 960, скоротилися терміни визначення МС до препаратів 1-го ряду. Нами було зроблено припущення, що аналогічні результати можливо одержати при вивченні МС *M. tuberculosis* до препаратів 2-го ряду (Et, Cm, Pt, Ofx, Mfx, Lfx,

Am, Km) і резервного препарату – Lzd в середовищі Middlebrook 7H9 з використанням системи ВАСТЕС MGIT 960 [1, 73].

Основою досліджень було визначення критерію МС, яким є “критична” концентрація препаратів. “Критична” концентрація – один з критеріїв резистентності. Це строго визначена кількість кожного медикаментозного препарату, яку повинно містити середовище для постановки ТМЧ. У якості контролю в роботі була використана контрольна міжнародна панель, що була надіслана в лабораторію мікробіології з Супранациональної лабораторії ВООЗ (м. Рига, Латвія) та включала 40 штамів *M. tuberculosis* з відомими результатами МС до препаратів 2-го і резервного ряду, які були визначені на щільному живильному середовищі Левенштейна-Єнсена методом пропорцій (20 штамів *M. tuberculosis* з чутливістю і 20 штамів *M. tuberculosis* з МС до препаратів 2-го і резервного ряду).

Використання методу пропорції на щільному середовищі при визначенні МС штамів *M. tuberculosis* до препаратів 2-го і резервного ряду було обумовлено тим, що основою визначення МС на рідких середовищах в системі ВАСТЕС MGIT 960 також є метод пропорцій. Принцип методу пропорцій полягає у визначенні співвідношення (пропорції) між чутливими і стійкими до препаратів в “критичних” концентраціях особинами в популяції штаму *M. tuberculosis*, який виділено від хворого на туберкульоз. Таким чином, наша задача полягала в тому, щоб за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960 знайти такі «критичні» концентрації препаратів 2-го і резервного ряду в рідких середовищах, які після інокуляції контрольними штамми *M. tuberculosis* підтвердили б еквівалентність результатів МС *M. tuberculosis*, що були отримані на щільному та рідкому середовищі.

Метою досліджень було підвищення ефективності і стандартизація методу визначення МС *M. tuberculosis* до препаратів 2-го і резервного ряду шляхом використання рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960.

При приготуванні наважки препаратів 2-го ряду і Lzd нами була врахована потенція кожного з препаратів та зроблено відповідне перерахування на вміст активної речовини кожній чистій субстанції препарату. Для розчинення субстанцій препаратів Cm, Am, Km та Lzd використовувалась стерильна дистильована вода, чисті субстанції препаратів Et і Pt розчиняли в димексидсульфоксиді (DMSO), чисті субстанції препаратів Ofx, Mfx і Lfx розчиняли в 0,1 N NaOH. Всі розчини розливали в пробірки типу Eppendorf по 0,5 мл та зберігали при температурі (-70°C). Для проведення досліджень необхідну кількість пробірок розморожували, залишки відбраковували та знищували [82].

Дослідження були проведені в два етапи. На 1-му етапі була відпрацьована методика базового тесту та був визначений діапазон антибактеріальних тестових концентрацій для препаратів 2-го і резервного ряду. Нами було досліджено по декілька концентрацій кожного з препаратів. Було враховано «критичні» концентрації препаратів 2-го і резервного ряду, які використовуються для тестування на щільних середовищах, оскільки вони залежать від мінімальної інгібуючої концентрації (MIC) кожного з препаратів (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

**Концентрації препаратів 2-го і резервного ряду, які
були використані на 1-му етапі досліджень**

| Препарати | Концентрації препаратів, (мкг/мл) |
|-----------|---|
| Ofx | 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 |
| Mfx | 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 |
| Lfx | 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 |
| Et | 40,0; 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625 |
| Pt | 40,0; 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625 |
| Cm | 40,0; 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625 |
| Am | 40,0; 20,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625 |
| Lzd | 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625 |

Оскільки “критичні” концентрації фторхінолонових антибіотиків в щільному середовищі є нижчими в порівнянні з іншими препаратами 2-го ряду, ми врахували необхідність приготування серії розведень з більш низькими концентраціями даних препаратів.

Для приготування робочих розведень препаратів 2-го і резервного ряду використовували чисті субстанції препаратів. Насамперед готували робочі розведення препаратів. Для приготування 1-го розведення використовували відповідні наважки хімічно чистих субстанцій препаратів, які розчиняли в відповідній рідині. Подальші робочі розведення готували з наступних розведень шляхом додавання стерильної дистильованої води. Кінцеві концентрації препаратів в рідкому середовищі Middlebrook 7H9 готували шляхом додавання по 0,1 мл відповідних розведень препаратів 2-го і резервного ряду, які були підготовлені раніше, до пробірок MGIT, кожна з котрих містила 7,0 мл бульйону Middlebrook 7H9, 0,8 мл збагачуючої добавки та 0,5 мл бактеріальної суспензії культур *M. tuberculosis* контрольної панелі.

Перше розведення Ofx, Lfx та Mfx (1680 мкг/мл) готували шляхом додавання до 16,8 мг активних речовин чистих субстанцій 10,0 мл 0,1 N NaOH, а Am і Lzd – шляхом додавання до 16,8 мг активних речовин 10,0 мл стерильної дистильованої води. Наступні розведення готували за схемою, що наведена в табл. 6.2.

З отриманих робочих розведень Ofx, Mfx, Lfx, Am і Lzd в подальшому готували наступні розведення з різним вмістом препаратів в рідкому середовищі для подальших досліджень в системі BACTEC MGIT 960 (табл. 6.3).

**Приготування робочих розведень офлоксацину, моксифлоксацину,
левофлоксацину, амікацину і лінезоліду**

| Номер робочого розведення препаратів | Концентрація препаратів Ofx, Lfx, Mfx, Am і Lzd в робочих розведеннях, мкг/мл | Кількість рідких інгредієнтів, мл | |
|---|--|-----------------------------------|------------------|
| | | робоче розведення | H ₂ O |
| 2 | 840 | 1,0 мл 1-го розведення | 1,0 |
| 3 | 420 | 1,0 мл 2-го розведення | 1,0 |
| 4 | 210 | 1,0 мл 3-го розведення | 1,0 |
| 5 | 105 | 1,0 мл 4-го розведення | 1,0 |
| 6 | 50,25 | 1,0 мл 5-го розведення | 1,0 |

Таблиця 6.3

**Приготування концентрацій офлоксацину, моксифлоксацину,
левофлоксацину, амікацину і лінезоліду в рідкому середовищі MGIT**

| Концентрація препаратів Ofx, Lfx, Mfx, Am і Lzd в рідкому середовищі MGIT, мкг/мл | Кількість відповідного розведення препаратів Ofx, Lfx, Mfx, Am і Lzd що додавали до 8,4 мл вмісту пробірки MGIT |
|---|---|
| 20,0 | 0,1 мл (1680 мкг/мл) |
| 10,0 | 0,1 мл (840 мкг/мл) |
| 5,0 | 0,1 мл (420 мкг/мл) |
| 2,5 | 0,1 мл (210 мкг/мл) |
| 1,25 | 0,1 мл (105 мкг/мл) |
| 0,625 | 0,1 мл (50,25 мкг/мл) |

Перше розведення Et і Pt (6720 мкг/мл) готували шляхом додавання до 33,6 мг активних речовин 5,0 мл DMSO, а Km і Cm (6720 мкг/мл) – шляхом додавання до 33,6 мг активних речовин 5,0 мл стерильної дистильованої води. Наступні розведення готували за схемою, що наведена в табл. 6.4.

Таблиця 6.4

Приготування робочих розведень етіонаміду, протіонаміду, канаміцину і капреоміцину

| Номер робочого розведення препаратів | Концентрація Et, Pt, Km і Cm в робочих розведеннях, мкг/мл | Кількість рідких інгредієнтів, мл | |
|---|--|-----------------------------------|------------------|
| | | робоче розведення | H ₂ O |
| 2 | 3360 | 1,0 мл 1-го розведення | 1,0 |
| 3 | 1680 | 1,0 мл 2-го розведення | 1,0 |
| 4 | 840 | 1,0 мл 3-го розведення | 1,0 |
| 5 | 420 | 1,0 мл 4-го розведення | 1,0 |
| 6 | 210 | 1,0 мл 5-го розведення | 1,0 |
| 7 | 105 | 1,0 мл 6-го розведення | 1,0 |
| 8 | 50,25 | 1,0 мл 7-го розведення | 1,0 |

З отриманих робочих розведень Et, Pt, Km і Cm готували наступні розведення з різним вмістом препаратів в рідкому середовищі для досліджень в системі ВАСТЕС MGIT 960 (табл. 6.5).

Підготування культур *M. tuberculosis*, що вирости на щільному живильному середовищі та інокуляцію рідкого середовища здійснювали у відповідності до стандартного протоколу визначення МС в системі ВАСТЕС MGIT 960 до препаратів 1-го ряду. Пробірки з препаратами 2-го і резервного ряду разом з контролями розміщували в так звані “транспортувальні” контейнери зі штрих-кодом та вставляли в гнізда системи ВАСТЕС MGIT 960

як “невідомі ліки” з урахуванням особливостей вводу даних для визначення МС. При цьому для тестування кожного з препаратів, незалежно від кількості пробірок з різними його концентраціями, використовувався окремий “транспортувальний” контейнер з особистим штрих-кодом.

Таблиця 6.5

Приготування концентрацій етіонаміду, протіонаміду і капреоміцину в рідкому середовищі MGIT

| Концентрація Et, Pt, Km і Cm в рідкому середовищі MGIT, мкг/мл | Кількість відповідного розведення Et, Pt, Km і Cm, що додавали 8,4 мл до вмісту пробірки MGIT |
|--|---|
| 40,0 | 0,1 мл (3360 мкг/мл) |
| 20,0 | 0,1 мл (1680 мкг/мл) |
| 10,0 | 0,1 мл (840 мкг/мл) |
| 5,0 | 0,1 мл (420 мкг/мл) |
| 2,5 | 0,1 мл (210 мкг/мл) |
| 1,25 | 0,1 мл (105 мкг/мл) |
| 0,625 | 0,1 мл (50,25 мкг/мл) |

При інкубації посівів система BASTEC MGIT 960 сигналізувала про “повну” ємність коли показник росту в контролі досягав 400 GU. У цій точці показників GU, за якими здійснюється оцінка росту мікобактерій в пробірках з різним вмістом препаратів 2-го і резервного ряду, система проводила вибірку результатів, дані роздруковували та інтерпретували. Якщо показник GU в пробірках з препаратами був вищим ніж 100 GU при інтенсивності росту в контролі 400, штами визначали як резистентні до даних концентрацій препаратів, а якщо показник GU в пробірках з препаратами був нижчим ніж 100 GU при інтенсивності росту в контролі 400, штами визначали як чутливі до даних концентрацій препаратів.

При коректному виконанні тесту інтенсивність росту в контролі повинна завжди бути постійною величиною – 400 GU. Вивчення низки концентрацій кожного з препаратів в рідкому живильному середовищі повинно привести до того, щоб експериментальним шляхом визначити таку концентрацію кожного із вищезазначених препаратів, при якій будуть рости стійкі штами *M. tuberculosis* контрольної панелі з інтенсивністю росту 100 GU та не будуть давати ріст штами *M. tuberculosis* контрольної панелі, які є чутливими. Ця концентрація буде вважатися “критичною” при дослідженні в рідкому середовищі.

Результати тестування на МС штамів *M. tuberculosis* контрольної панелі в системі ВАСТЕС MGIT 960 в рідкому середовищі були проаналізовані для кожної концентрації препаратів 2-го і резервного ряду та стали основою для планування наступного етапу досліджень.

Результати титрування штамів *M. tuberculosis* на рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 з різними концентраціями препаратів наведені в табл. 6.6. Як видно із табл. 6.6, зменшення концентрації Et в рідкому середовищі приводило до збільшення одиниць росту штамів *M. tuberculosis* контрольної панелі, що були стійкими до препаратів 2-го ряду. Звертає на себе увагу той факт, що ріст штамів з МС почався при концентрації Et 10,0 мкг/мл, але оскільки інтенсивність росту була незначною – менше ніж 100 одиниць росту, то ці штами вважалися чутливими до даної концентрації Et, при концентрації препарату 2,5 мкг/мл спостерігався інтенсивний ріст *M. tuberculosis* – 100 GU при інтенсивності у контролі – 400 GU, подальше зменшення концентрації препарату приводило до збільшення інтенсивності росту штамів *M. tuberculosis*. Важливо відмітити, що чутливі штами *M. tuberculosis* контрольної панелі при різних концентраціях Et в рідкому середовищі, росту не дали. Тому, до Et найменша концентрація, при якій спостерігався ріст *M. tuberculosis* 100 GU, вважається «критичною». Така концентрація становила 5,0 мкг/мл.

Результати дослідження штамів *M. tuberculosis* в рідкому живильному середовищі з різними концентраціями Cm показали, що ріст штамів почався при концентрації препарату 5,0 мкг/мл. Але виявився незначним – 41 GU, ріст стійких штамів *M. tuberculosis* – 100 GU відбувався при концентрації Cm 2,5 мкг/мл, інтенсивність у контролі була 400 GU. Ріст чутливих штамів при такій концентрації не спостерігався. Тому для Cm концентрація 2,5 мкг/мл може вважатися “критичною” при визначенні МС *M. tuberculosis* в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Аналогічно зменшення концентрації Pt в рідкому середовищі приводило до збільшення GU штамів *M. tuberculosis* контрольної панелі, що були стійкими до цього препарату. Звертає на себе увагу той факт, що ріст штамів почався при концентрації Pt 5,0 мкг/мл, але оскільки інтенсивність росту була незначною – менше ніж 100, тому ці штами вважалися чутливими до даної концентрації Pt, а при концентрації препарату 2,5 мкг/мл спостерігався інтенсивний ріст *M. tuberculosis* – 100 GU при рості у контролі 400 GU, подальше зменшення концентрації препарату приводило до збільшення інтенсивності росту штамів *M. tuberculosis*. Важливо відмітити, що чутливі штами *M. tuberculosis* контрольної панелі при різних концентраціях Pt в рідкому середовищі, росту не дали. Тому, найменша концентрація до Pt, при якій спостерігався ріст *M. tuberculosis* більше ніж 100 GU, вважається «критичною» та вона склала 2,5 мкг/мл.

Ріст штамів *M. tuberculosis* за присутності препарату Km почався при його концентрації 5,0 мкг/мл. Але виявився незначним – 68 GU, ріст стійких штамів МБТ – 100 GU відбувався при концентрації Km 2,5 мкг/мл, інтенсивність у контролі була 400 GU. Ріст чутливих штамів при даній концентрації не спостерігався. Тому для Km концентрація 2,5 мкг/мл може вважатися “критичною” при визначенні МС *M. tuberculosis* в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Результати досліджень показали (табл. 6.6), що ріст стійких штамів *M. tuberculosis* спостерігався при концентрації Ofx 2,5 мкг/мл, Lfx – при

концентрації 2, 5 мкг/мл, Am і Lzd – при концентрації 1,25 мкг/мл, Mfx – при концентрації 0,625 мкг/мл. Але інтенсивність росту штамів *M. tuberculosis* була нижчою, ніж показник 100 GU при інтенсивному рості в контролі. Було встановлено, що при обраних нами концентраціях вищезгаданих препаратів жодний стійкий штам *M. tuberculosis* контрольної панелі не дав інтенсивність росту 100 GU, низькі концентрації препаратів в рідкому середовищі сприяли більш інтенсивному росту *M. tuberculosis* – 200 GU і більше. Тому нами не була визначена «критична» концентрація для цих препаратів.

Для визначення «критичних» концентрацій необхідно було провести подальші дослідження. Для цього потрібно було обрати додаткові концентрації препаратів в інтервалах значень показників, при яких спостерігався би ріст *M. tuberculosis* від мінімальної інтенсивності до 200 GU з метою визначення концентрації препаратів, за якої інтенсивність росту *M. tuberculosis* була б на рівні 100 GU. Для Ofx та Lfx подальші дослідження були проведені в інтервалі концентрацій 2,5 – 1,25 мкг/мл, для Am, Mfx і Lzd – в інтервалі 1,25 – 0,25 мкг/мл. Тому 2-ий етап наших досліджень був присвячений визначенню “критичних” концентрацій Ofx, Lfx, Mfx, Am і Lzd в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Для більш точних результатів в обраних інтервалах концентрацій послідовний крок розведення складав 0,25 мкг/мл для кожного з вищезгаданих препаратів. Результати проведених досліджень представлені в табл. 6.7 і 6.8.

Результати досліджень показали, що 2,0 мкг/мл є найменшою концентрацією Ofx і Lfx, при якій відбувався інтенсивний ріст стійких штамів МБТ – 100 GU при інтенсивності росту в контролі 400 GU. Ріст чутливих штамів при даній концентрації не спостерігався. Тому, для Ofx і Lfx концентрація 2,0 мкг/мл може вважатися «критичною» при визначенні МС *M. tuberculosis* в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Аналогічно при концентрації Am і Lzd в рідкому живильному середовищі 1,0 мкг/мл інтенсивність росту стійких штамів *M. tuberculosis* сягала 100 GU при інтенсивності росту в контролі 400 GU.

Визначення «критичних» концентрацій офлоксацину і левофлоксацину для ТМЧ *M. tuberculosis* в рідкому середовищі в системі BACTEC MGIT

960

| Штами <i>M. tuberculosis</i> контрольної панелі | Інтенсивність росту (GU) <i>M. tuberculosis</i> при різних концентраціях препаратів (мкг/мл) в рідкому середовищі | | | | | | Інтенсивність росту в контролі (GU) |
|---|---|------|-----|------|-----|------|---|
| | 2,5 | 2,25 | 2,0 | 1,75 | 1,5 | 1,25 | |
| | офлоксацин | | | | | | |
| Стійкі | 0 | 52 | 100 | 142 | 187 | 247 | 400 |
| Чутливі | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 400 |
| | левофлоксацин | | | | | | |
| Стійкі | 0 | 63 | 100 | 156 | 192 | 264 | 400 |
| Чутливі | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 400 |

Таблиця 6. 8

Визначення «критичних» концентрацій амікацину, лінезоліду і моксифлоксацину для ТМЧ *M. tuberculosis* в рідкому середовищі в системі

BACTEC MGIT 960

| Штами <i>M. tuberculosis</i> контрольної панелі | Інтенсивність росту (GU) <i>M. tuberculosis</i> при різних концентраціях препаратів (мкг/мл) в рідкому середовищі | | | | | Інтенсивність росту в контролі (GU) |
|--|---|-----|------|-----|------|---|
| | 1,25 | 1,0 | 0,75 | 0,5 | 0,25 | |
| | амікацин | | | | | |
| Стійкі | 71 | 100 | 153 | 209 | 256 | 400 |
| Чутливі | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 400 |
| | лінезолід | | | | | |
| Стійкі | 84 | 100 | 167 | 224 | 267 | 400 |
| Чутливі | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 400 |
| | моксифлоксацин | | | | | |
| Стійкі | 32 | 54 | 82 | 100 | 243 | 400 |
| Чутливі | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 400 |

Росту чутливих штамів при даній концентрації не спостерігали. Зазначена концентрація Am і Lzd може вважатися «критичною» при визначенні МС МБТ в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Інтенсивний ріст стійких штамів *M. tuberculosis* – 100 GU за присутності препарату Mfx відбувався при його концентрації 0,5 мкг/мл. Ріст чутливих штамів при даній концентрації не спостерігався. Тому для Mfx концентрація 2,5 мкг/мл може вважатися “критичною” при визначенні МС МБТ в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Таким чином, проведені дослідження, дали можливість визначити “критичні” концентрації препаратів 2-го ряду – етіонаміду (5,0 мкг/мл), капреоміцину (2,5 мкг/мл), протіонаміду (2,5 мкг/мл), амікацину (1,0 мкг/мл), офлоксацину (2,0 мкг/мл), моксифлоксацину (0,5 мкг/мл), левофлоксацину (2,0 мкг/мл), канаміцину (2,5 мкг/мл) і резервного препарату – лінезоліду (1,0 мкг/мл) при використанні їх для тесту медикаментозної чутливості в рідкому середовищі із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960.

Отримані результати є принципово важливими, тому що вперше в Україні вони дозволили розробити стандартну методику визначення медикаментозної стійкості *M. tuberculosis* з використанням рідкого живильного середовища до широкого спектру препаратів 2-го ряду і резервного препарату – лінезоліду із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960, яка впроваджена в роботу бактеріологічних лабораторій 3 рівня мережі протитуберкульозних закладів країни.

Опублікована стаття: Визначення критеріїв резистентності *M. tuberculosis* до препаратів 2-го і резервного ряду за допомогою рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 / А. І. Барбова, О. А. Журило, Н. М. Алієва, Л. М. Сладкова // Укр. пульмонол. журн. – 2017. – № 1. – С. 47–52 [25].

Отримано патент на корисну модель: Пат. 99799 Україна, МПК⁹ С 12 N 1/02, С 12 Q 1/02. Спосіб визначення чутливості *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів в дослідному матеріалі хворих на туберкульоз

легень / Журило О. А. , Барбова А. І., Алієва Н. М., Трофімова П. С., Миронченко С. В.; заявник та власник патенту ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України». – № u 201414019 ; заявл. 29.12.14 ; опубл. 25.06.15, Бюл. № 12. – 1 с [70].

Видани інформаційні листи:

Спосіб визначення чутливості *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів в дослідному матеріалі хворих на туберкульоз легень: інформаційний лист / О. А. Журило, А. І. Барбова, Н. М. Алієва, П. С. Трофімова, С. В. Миронченко ; ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України». – К. : НІФП, 2015. – 4 с [89].

Алгоритм бактеріологічного обстеження на туберкульоз внутрішньо переміщених осіб з регіонів із високою захворюваністю туберкульозом та біженців з тимчасово окупованих територій України : інформаційний лист / А. І. Барбова, О. А. Журило, Н. М. Алієва, Н. А. Рохманова ; НІФП НАМН України. – К. : НІФП, 2015. – 4 с [5].

Визначення критеріїв резистентності *M. tuberculosis* до препаратів 2-го і резервного ряду за допомогою рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 / А. І. Барбова, О. А. Журило, Н. М. Алієва, Л. М. Сладкова // Укр. пульмонол. журн. – 2017. – № 1. – С. 47–52 [25].

Критерій резистентності мікобактерій туберкульозу до канаміцину в рідкому живильному середовищі Міддлбрук 7H9 в системі ВАСТЕС 960 : інформаційний лист / О. А. Журило, А. І. Барбова, П. С. Трофімова, С. В. Миронченко, Н. М. Алієва ; НІФП НАМН України. – К. : НІФП, 2015. – 4 с [51].

РОЗДІЛ 7

ВИЗНАЧЕННЯ СХЕМИ ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ШВИДКОЇ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ І ФЕНОТИПІЧНОЇ СИСТЕМИ ВАСТЕС MGIT 960. РОЗРОБКА ДІАГНОСТИЧНОГО АЛГОРИТМУ

7.1. Встановлення особливостей використання систем GeneXpert і ВАСТЕС MGIT 960 для швидкої діагностики туберкульозу та обґрунтування оптимальної схеми їх комплексного застосування

Використання в практиці роботи мережі бактеріологічних лабораторій ПТЗ України сучасних генотипічних і фенотипічних методів діагностики туберкульозу необхідно для того, щоб максимально скоротити терміни індикації і ідентифікації мікобактерій та визначення їх МС до ПТП. Дуже важливим аспектом є розробка алгоритмів їх комбінованого застосування, а їх впровадження в практику може істотно підвищити ранню виявляемість хворих, у тому числі – з малими формами туберкульозу і позалегеневим туберкульозом. Вони є перспективними при обстеженні дітей, контактних і олігобацилярних хворих.

Досліджували клінічні зразки мокротиння від хворих на туберкульоз легень, що лікувались в стаціонарі Інституту.

В роботі використана молекулярно-генетична система GeneXpert. Ця система є інтегрованим діагностичним обладнанням, яке виконує обробку зразків і ПЛР у реальному часі для діагностики *in vitro* з метою виявлення ДНК *M. tuberculosis-complex* у зразках мокротиння та мутацій гена *rpoB*, пов'язаних зі стійкістю до R у зразках, які отримані від пацієнтів із групи ризику. В системі використовуються одноразові картриджі GeneXpert, що містять реактиви для ПЛР. Праймери тесту GeneXpert ампліфікують фрагмент гена *rpoB*, що містить 81 пару основаній центральної ділянки. Зонди дозволяють відрізнити

консервативну послідовність мікобактерій «дикого типу» від мутацій центральної ділянки, пов'язаних зі стійкістю до R. Оцінка проводиться комп'ютерною програмою автоматично.

Для проведення молекулярно-генетичних досліджень у системі GeneXpert були відібрані 1614 зразків мокротиння від хворих на туберкульоз, з них 846 ($52,4 \pm 1,2$) % зразків мали КСБ та різний ступінь градації позитивного результату мазку (КСБ+), а 768 ($47,6 \pm 1,2$) % зразків були негативними за методом прямої мікроскопії за Циль-Нільсеном на наявність КСБ (КСБ-) (табл.7.1). Досліджувалися всі зразки мокротиння незалежно від результатів бактеріоскопії, але, результативність роботи системи GeneXpert була оцінена окремо для проб мокротиння, що були позитивними або негативними за мазком.

Таблиця 7.1

Результати дослідження зразків мокротиння за допомогою системи GeneXpert

| Зразки мокротиння з | Кількість зразків мокротиння | | | | |
|---------------------------|------------------------------|------------------|---------------|----------------|--------|
| | GeneXpert (+) | | GeneXpert (-) | | Всього |
| | абс | М ± m, % | абс | М ± m, % | |
| КСБ(+) | 618 | $73,0 \pm 1,5^*$ | 228 | $27,0 \pm 1,5$ | 846 |
| КСБ(-) | 360 | $46,9 \pm 1,8^*$ | 408 | $53,1 \pm 1,8$ | 768 |
| Всього | 978 | $60,6 \pm 1,2$ | 636 | $39,4 \pm 1,2$ | 1614 |

Примітки:

(+) – позитивний результат.

(-) – негативний результат.

* – $p < 0,01$ при порівнянні результатів позитивності зразків мокротиння КСБ(+) та КСБ(-) в системі GeneXpert.

У ході дослідження в системі GeneXpert із 1614 зразків мокротиння 978 зразків містили *M. tuberculosis-complex*, що склало 60,6 %. При цьому 618 проб

з КСБ(+) та 360 проб мокротиння з КСБ(-) при дослідженні в системі GeneXpert були позитивними, тобто містили ДНК *M. tuberculosis-complex*, показник «позитивності» результату склав 73,0 % та 46,9 % відповідно. При використанні системи GeneXpert кількість позитивних результатів, що були отримані з проб мокротиння з КСБ(+) в 1,56 разів перевищують аналогічний показник дослідження проб мокротиння, що були негативними за мазком ($p < 0,01$).

Додатковий аналіз отриманих даних показав, що діагностична ефективність в системі GeneXpert щодо дослідження зразків мокротиння залежить, в першу чергу, від в'язкості мокротиння, а вона може бути достатньо високою. Нами були зроблені припущення, що при дослідженні зразків мокротиння після проведення передпосівної обробки, коли здійснюється гомогенізація мокротиння, показник позитивності результатів досліджень може зрости. Тому на наступному етапі роботи в системі GeneXpert були досліджені наявність ДНК *M. tuberculosis-complex* зразки концентрованого мокротиння з КСБ(+) та КСБ(-) після проведення передпосівної обробки. Результати досліджень представлені в табл. 7.2.

Як свідчать дані табл. 7.2, після проведення передпосівної обробки зразків мокротиння з КСБ(+) та КСБ(-) результативність позитивних досліджень на туберкульоз, що були виявлені в системі GeneXpert, збільшилась майже в 1,23 рази. Для позитивних на КСБ зразків мокротиння відсоток молекулярно-генетичного підтвердження результатів на туберкульоз складав 88,7, для негативних за мазком зразків мокротиння цей показник складав 59,4 ($p < 0,01$).

Таким чином, доведена доцільність використання концентрованих зразків мокротиння при проведенні дослідження на туберкульоз в системі GeneXpert. Також підтверджена діагностична цінність дослідження негативних за результатами бактеріоскопії зразків мокротиння в системі GeneXpert. Результати досліджень показали, що лише 88,7 % позитивних за мазком проб мокротиння підтвердили наявність ДНК *M. tuberculosis-complex* за допомогою системи GeneXpert. Слід відмітити, що при індикації дана система реєструє

позитивний результат лише у випадку наявності у пробі *M. tuberculosis-complex*. Якщо в пробі містяться мікобактерії нетуберкульозного комплексу, то дана система не видає «позитивний» сигнал.

Таблиця 7.2

Результати порівняльних досліджень зразків концентрованого і не концентрованого мокротиння з КСБ(+) та КСБ(-) в системі GeneXpert

| Зразки мокротиння за результатом мікроскопії | Кількість зразків мокротиння з результатом GeneXpert(+) | | | | |
|--|--|--------------|--------------------------------------|--------------|--------|
| | Зразки не концентрованого мокротиння | | Зразки концентрованого мокротиння | | Всього |
| | абс | М ± m, % | абс | М ± m, % | абс |
| КСБ(+) | 618 | 73,0 ± 1,5* | 750 | 88,7 ± 1,1* | 846 |
| КСБ(-) | 360 | 46,9 ± 1,8** | 456 | 59,4 ± 1,8** | 768 |
| Всього | 978 | 60,6 ± 1,2• | 1206 | 74,7 ± 1,1• | 1614 |

Примітки:

(+) – позитивний результат.

(-) – негативний результат.

* – $p < 0,01$ при порівнянні позитивних результатів зразків не концентрованого та концентрованого мокротиння з КСБ(+) в системі GeneXpert.

** – $p < 0,01$ при порівнянні позитивних результатів зразків не концентрованого та концентрованого мокротиння з КСБ(-) в системі GeneXpert.

• – $p < 0,01$ при порівнянні загального позитивного показника зразків не концентрованого та концентрованого мокротиння з КСБ(+) та КСБ(-) в системі GeneXpert.

Негативний результат тесту при позитивній бактеріоскопії, особливо, коли в пробі спостерігаються поодинокі КСБ, також може бути пов'язаний з тим, що кількість бактерій в таких зразках є нижчою за рівень виявлення (динамічний діапазон) щодо молекулярно-генетичного тесту.

В подальшому нами були проведені порівняльні дослідження щодо діагностичної ефективності молекулярно-генетичного методу з використанням системи GeneXpert та методу посіву раніше відібраних позитивних та негативних за результатами бактеріоскопії зразків концентрованого мокротиння в системі ВАСТЕС MGIT 960. Для отримання достовірних результатів порівняльні дослідження для позитивних та негативних за мазком зразків мокротиння були проведені окремими серіями.

Із 846 зразків мокротиння, що були позитивним на туберкульоз за результатами бактеріоскопічного та культурального досліджень, система GeneXpert виявила 732 ($86,6 \pm 1,2$) % позитивні проби. В той же час у 18 випадках ($2,1 \pm 0,5$) % молекулярно-генетичним методом були виявлені ДНК *M. tuberculosis-complex* при негативних результатах посіву ($p < 0,01$). Детальний аналіз цих випадків показав, що в зазначених пробах мокротиння життєздатність мікобактерій була знижена, оскільки хворі, що їх виділяли були раніше лікованими, тому молекулярно-генетичний метод і бактеріоскопічні дослідження констатували наявність мікобактерій в пробах, а метод посіву виявився неінформативним.

В той же час, було відмічено, що метод посіву на ($11,3 \pm 1,1$) % ($p < 0,01$) [ВАСТЕС MGIT(+) / GeneXpert(-) – 96 випадків] є більш інформативним, ніж молекулярно-генетичний метод в системі GeneXpert, оскільки дає можливість виділяти мікобактерії як туберкульозного, так і не туберкульозного комплексу, на відміну від зазначеного методу молекулярно-генетичної діагностики.

Як видно з даних, представлених в табл. 7.3, рівень виявлення комплексу *M. tuberculosis* для зразків мокротиння з негативними результатами мікроскопії та бактеріологічним підтвердженням складає 456 ($59,4 \pm 1,8$) % для системи GeneXpert. З 312 ($40,6 \pm 1,7$) % зразків мокротиння, що дали

негативний результат дослідження в системі GeneXpert, були отримані культури *M. tuberculosis-complex* методом посіву в рідкому середовищі. Культуральний метод дослідження мав більшу діагностичну цінність на 40,6 %, ніж генетичний метод діагностики системи GeneXpert ($p < 0,01$).

Таблиця 7.3

Результати порівняльного дослідження культурального та молекулярно-генетичного методів діагностики туберкульозу зразків мокротиння негативних за результатами бактеріоскопії

| Методи дослідження | Кількість зразків мокротиння | |
|------------------------------|------------------------------|-------------|
| | абс | М ± m, % |
| ВАСТЕС MGIT(+), GeneXpert(+) | 456 | 59,4 ± 1,8* |
| ВАСТЕС MGIT(+), GeneXpert(-) | 312 | 40,6 ± 1,7* |
| Всього | 768 | 100 |

Примітки:

(+) – позитивний результат.

(-) – негативний результат.

* – $p < 0,01$ при порівнянні кількості зразків мокротиння з позитивними результатами посіву і молекулярно-генетичного дослідження та зразків мокротиння з позитивним посівом і негативними результатами молекулярно-генетичного дослідження.

Таким чином, при застосуванні системи GeneXpert і методу мікроскопії для досліджень на туберкульоз, необхідним є паралельне здійснення посіву дослідного матеріалу на рідке середовище для виявлення життєздатності мікобактерій. Та недоцільним є використання системи GeneXpert для обстеження хворих в ході лікування для контролю хіміотерапії.

Важливо відмітити, що за технічними можливостями система GeneXpert може визначати тільки наявність або відсутність МС до R, що вважається так званім «маркером» мультирезистентності. Тому важливо було провести порівняльний аналіз результатів стійкості до R за результатами досліджень в

системі GeneXpert та результатів ТМЧ в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960, яке дає можливість визначати монорезистентність до R та мультирезистентність (R + H) штамів *M. tuberculosis-complex*.

Нами були відібрані 1242 зразки концентрованого мокротиння від хворих на вперше діагностований туберкульоз легень, які дали ріст культури мікобактерій в системі ВАСТЕС MGIT 960. В рідкому середовищі був проведений ТМЧ до ПТП 1-го ряду, в тому числі до R і H.

Із 762 зразків мокротиння, що мали стійкість до R в системі GeneXpert, 714 ($93,7 \pm 0,9$) % виявилися мультирезистентними при визначенні стійкості в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT. При цьому рівень виділення монорезистентних до R штамів склав 30 штамів МБТ ($3,9 \pm 0,7$) %. Також в ході дослідження нами були виявлені 18 ($2,4 \pm 0,5$) % штамів *M. tuberculosis-complex*, які за результатами досліджень в системі GeneXpert, були стійкими до R, але за результатами фенотипічного визначення стійкості були чутливими ($p < 0,01$). Це може бути пов'язаним з тим, що точкові мутації відбулися лише в 2-х ділянках гену *rpoB* з 5-ти, тому фенотипічна стійкість може не бути визначена.

Проведені дослідження довели, що відсоток діагностованих випадків МР ТБ за допомогою системи GeneXpert і фенотипічного методу діагностики в системі ВАСТЕС MGIT 960 складає ($93,7 \pm 0,9$) %, що свідчить про те, що молекулярно-генетична система може використовуватися для швидкої діагностики, насамперед, МРТБ.

Таким чином, дослідження на туберкульоз в системі GeneXpert показана доцільність використання концентрованих зразків мокротиння і діагностична цінність дослідження негативних за результатами бактеріоскопії зразків мокротиння. Доведений високий рівень позитивних результатів таких досліджень (59,4 %).

Необхідним є паралельне дослідження клінічного матеріалу методом посіву на рідке середовище в системі ВАСТЕС MGIT 960. Недоцільним є

використання системи GeneXpert для обстеження хворих у ході лікування з метою контролю хіміотерапії.

Система GeneXpert може використовуватися для швидкої діагностики МРТБ [співпадіння діагностики випадків МР ТБ молекулярно-генетичним і фенотипічним методами складає $(93,7 \pm 0,9) \%$].

7.2. Встановлення особливостей використання систем GenoType і BACTEC MGIT 960 для швидкої діагностики туберкульозу, визначення чутливості *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів 1-го і 2-го ряду та обґрунтування оптимальної схеми їх комплексного застосування

Метою цього фрагменту дослідження було підвищення ефективності і стандартизація методів лабораторної діагностики туберкульозу шляхом використання молекулярно-генетичної системи GenoType і рідкого середовища в системі BACTEC MGIT 960.

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 таких зразків клінічного матеріалу. Дана система дозволяє виділити ДНК мікобактерій і провести їх ідентифікацію. Для дослідження було відібрано 684 зразка 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*, а 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 (0,9 %) випадках – *M. kansasii*. Результати досліджень за допомогою системи гібридизації з типоспецифічними зондами GenoType представлені в табл. 7.4.

Таблиця 7.4

Результати досліджень зразків мокротиння за допомогою молекулярно-генетичної системи GenoType, n = 684

| 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 | М ± m, % | абс | М ± m, % | абс | М ± m, % | абс | М ± 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 позитивних результатів зразків неконцентрованого та концентрованого мокротиння в системі GenoType.

З даних табл. 7.4 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 BACTEC MGIT 960. Результати досліджень представлені в табл. 7.5.

Таблиця 7.5

Порівняння результативності двох методів діагностики *M. tuberculosis* при використанні позитивних за результатами бактеріоскопії зразків мокротиння

| Методи дослідження | Кількість зразків мокротиння | |
|--------------------|------------------------------|----------|
| | абс | М ± m, % |
| BACTEC MGIT(+) | 846 | 100 |
| GenoType(+) | 846 | 100 |

Примітка. (+) – позитивний результат.

Нами був досліджений 846 зразок мокротиння з позитивними результатами бактеріоскопії. З табл. 7.5 видно, що всі зразки мокротиння, що давали ріст при дослідженні методом посіву в системі BACTEC 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 в системі BACTEC MGIT 960 із мокротиння пацієнтів із 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 у 756 (95,5 %) випадках, у 36 (4,5 %) позитивних пробірках MGIT

при мікроскопії були виявлені окремі КСБ, які не утворювали корд-фактору. Це дало нам підставу припустити, що дані культури мікобактерій не належать до комплексу *M. tuberculosis* і потребують подальшої ретельної ідентифікації.

Всі культури мікобактерій, що були отримані з позитивних пробірок MGIT досліджувалися за допомогою імунохроматографічного ідентифікаційного тесту ID MTB 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-фактору, віднесені до мікобактерій нетуберкульозного комплексу.

На наступному етапі всі культури мікобактерій були досліджені за допомогою молекулярно-генетичної системи GenoType. Результати досліджень представлені в табл. 7.6.

Таблиця 7.6

**Порівняння результатів дослідження зразків мокротиння в системі
ВАСТЕС MGIT 960 і системі GenoType з набором Mycobacteria Direct**

| Методи дослідження | Кількість штамів мікобактерій | |
|---|-------------------------------|-------------|
| | абс | М ± m, % |
| ВАСТЕС MGIT, корд-фактор (+) ID MTB MGIT (+) GenoType Mycobacteria Direct (+) | 756 | 95,5 ± 0,7* |
| Корд-фактор (-) ID MTB MGIT (-) GenoType Mycobacteria Direct (+) | 36 | 4,5 ± 0,7* |
| Всього | 792 | 100 |

Примітки:

(+) – позитивний результат, (-) – негативний результат.

* – $p < 0,01$ 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. 7.6 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 MTB 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-фактору, тому їх можна було віднести до комплексу не туберкульозних мікобактерій [68, 69, 82, 121]. Наступним етапом 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, але й інформація щодо резистентності штаму МБТ, суттєвим чинником є отримання в короткий термін профілю МС виділених мікобактерій. Тому нами були проведені дослідження щодо обґрунтування використання молекулярно-генетичної системи GenoType для швидкого визначення МС мікобактерій.

Наші дослідження були спрямовані на визначення МС *M. tuberculosis-complex* в системі GenoType та наборами реагентів GenoType MTBDRplus та GenoType MTBDRsl для визначення МС до INH і RIF, Q, аміноглікозидів/циклічних пептидів та E 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. 7.7.

Результати молекулярно-генетичного дослідження МС мікобактерій щодо профілю резистентності штамів МР ТБ, тобто стійких до INH і RIF одночасно співпали в 95,5 % (894 штами) з результатами фенотипічного тестування методом пропорцій в системі BACTEC MGIT 960.

Таблиця 7.7

**Результати порівняльного аналізу мультирезистентних штамів
M. tuberculosis за допомогою молекулярно-генетичної системи
GenoType MTBDRplus і системи BACTEC MGIT 960**

| Методи дослідження | Кількість штамів | |
|---|------------------|-------------|
| | абс | М ± 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:

(+) – позитивний результат.

(-) – негативний результат.

* – $p < 0,01$ 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 визначення монорезистентності до RIF, або в комбінації з іншими ПТП, крім INH за допомогою двох методів не відрізнялись між собою и повністю співпадали (табл. 7.8).

За допомогою набору GenoType MTBDRplus нами було досліджено 348 штамів МБТ з резистентністю до INH і співставлені з результатами ТМЧ в системі BACTEC MGIT 960. В табл. 7.9 представлені результати порівняння

результатів фено- та генотипічного методів щодо резистентності до ІНН.

Таблиця 7.8

Результати порівняльного аналізу медикаментозної стійкості до рифампіцину за допомогою молекулярно-генетичної системи GenoType (набір MTBDRplus) і системи BACTEC MGIT 960

| Методи дослідження | Кількість штамів | |
|---|------------------|----------|
| | абс | М ± m, % |
| GenoType MTBDRplus RIF (+) BACTEC MGIT RIF (+) | 102 | 100 |
| Всього | 102 | 100 |

Примітки:

(+) – позитивний результат.

(-) – негативний результат.

Таблиця 7.9

Результати порівняльного аналізу медикаментозної стійкості до ізоніазиду за допомогою системи GenoType (набір MTBDRplus) та системи BACTEC MGIT 960

| Методи дослідження | Кількість штамів | |
|---|------------------|-------------|
| | абс | М ± 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:

(+) – позитивний результат.

(-) – негативний результат.

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

Було виявлено, що при наявності мутацій, що асоційовані з резистентністю до ІНН, лише в 93,1 % випадках спостерігалась МС *M. tuberculosis* до ІНН при проведенні ТМЧ в рідкому середовищі Middlebrook 7Н9.

Нами були виконані дослідження щодо порівняння показників резистентності до ПТП 2-го ряду, виявлених за допомогою молекулярно-генетичного і фенотипічного методів. Для цього було 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 Ofx, Am, Cm та Е було застосовано рідке середовище в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Результати порівняльних досліджень представлені в табл. 7.10.

З табл. 7.10. видно, що при наявності мутацій 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 Е 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-фенотипічних методів.

**Результати порівняльного аналізу медикаментозної стійкості
M.tuberculosis до фторхінолонів, аміноглікозидів/циклічних пептидів та
етамбутолу за допомогою систем GenoType і ВАСТЕС MGIT 960, n = 318**

| Методи дослідження | Кількість штамів | |
|--|------------------|-------------|
| | абс | М ± m, % |
| GenoType MTBDRsl Q (+) ВАСТЕС MGIT 960 Ofx (+) | 288 | 90,6 ± 1,6* |
| GenoType MTBDRsl Q (+) ВАСТЕС MGIT 960 Ofx (-) | 30 | 9,4 ± 1,6* |
| GenoType MTBDRsl аміноглікозиди/ циклічні пептиди (+) ВАСТЕС MGIT 960 Am (+) | 299 | 94,0 ± 1,3* |
| GenoType MTBDRsl аміноглікозиди/ циклічні пептиди (+) ВАСТЕС MGIT 960 Am(-) | 19 | 6,0 ± 1,3* |
| GenoType MTBDRsl аміноглікозиди/ циклічні пептиди (+) ВАСТЕС MGIT 960 Cm (+) | 302 | 94,9 ± 1,2* |
| GenoType MTBDRsl аміноглікозиди/ циклічні пептиди (+) ВАСТЕС MGIT 960 Cm(-) | 16 | 5,1 ± 1,2* |
| GenoType MTBDRsl E (+) ВАСТЕС MGIT 960 E(+) | 206 | 64,2 ± 2,7* |
| GenoType MTBDRsl E (+) ВАСТЕС MGIT 960 E (-) | 112 | 35,8 ± 2,7* |

Примітки:

(+) – позитивний результат.

(-) – негативний результат.

* – $p < 0,01$ 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.

Молекулярно-генетичні методи використовують 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).

Таким чином, впровадження в діагностичні дослідження на туберкульоз системи GenoType дозволило швидко проводити ідентифікацію виділених мікобактерій та диференціацію не туберкульозних штамів мікобактерій.

Результати молекулярно-генетичного дослідження мультирезистентності в системі GenoType MTBDRplus співпадають в 95,5 % з результатами фенотипічного тестування методом пропорцій. Дані визначення монорезистентності до R, або в комбінації з іншими ПТП, крім H за допомогою методу молекулярно-генетичного тестування в системі GenoType MTBDRplus та фенотипічного методу визначення MC не відрізнялися між собою і повністю співпадали.

Виявлено, що при наявності мутацій, що асоційовані з резистентністю до H, лише в 93,1 % випадках спостерігається MC MBT до H при проведенні тесту в рідкому середовищі. При наявності мутації в генах, що відповідають за MC до Q, в рідкому середовищі 90,6 % мають MC до Ofx. Штами мікобактерій, в ДНК яких були виявлені мутації в генах, асоційованих з MC 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 до 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.

Наявність мутацій в генах, що асоційовані з MC до ПТП, не завжди підтверджується фенотипічними методами досліджень. Тому використання

технології GenoType для визначення мутацій в генах мікобактерій, що відповідають за МС до ПТП, обов'язково потребує паралельної постановки ТМЧ в рідкому середовищі.

7.3. Розробка алгоритму гено-фенотипічної діагностики туберкульозу

На сьогоднішній день в Україні зберігає актуальність низка питань з лабораторної діагностики туберкульозу, зокрема питання бактеріологічної діагностики випадків МР ТБ, що проводиться в лабораторіях 3-го рівня, які функціонують в складі високоспеціалізованих ПТЗ України.

Необхідними умовами для здійснення своєчасної, якісної та ефективної мікробіологічної діагностики випадків ТБ має бути чіткий алгоритм щодо відбору хворих для таких досліджень, протокол стандартних процедур і методик дослідження та забезпечення лабораторій необхідним лабораторним обладнанням відповідно до нормативних документів МОЗ України. Усі лабораторії 3-го рівня обласних ПТЗ України на сьогодні забезпечені всім необхідним сучасним обладнанням для здійснення гено-фенотипічної діагностики ТБ:

- генетичними системами GeneXpert – для попереднього та швидкого виявлення хворих з резистентністю до R (тобто, з високим ризиком МРТБ);
- системами ВАСТЕС MGIT 960 – для прискореного виділення МБТ та фенотипічного підтвердження діагнозу ТБ в рідкому середовищі, а також для прискореного визначення МС МБТ до решти препаратів 1-го і 2-го ряду;
- витратними матеріалами для проведення традиційних мікробіологічних досліджень з виділенням МБТ та постановкою ТМЧ до препаратів 1-го і 2-го ряду на щільному середовищі.

Виходячи з отриманих нами даних, для здійснення своєчасної, якісної та ефективної діагностики випадків ТБ необхідними умовами, в першу чергу, є організація збору якісного інформативного матеріалу в достатній кількості, забезпечення відповідних умов зберігання та транспортування зразків до

лабораторії 3-го рівня. Матеріал на діагностичні дослідження необхідно збирати до початку лікування, якщо не існує такої можливості – не пізніше 7 діб від початку лікування. Потрібно одержувати спонтанно виділене мокротиння, в іншому разі слід використовувати індукцію мокротиння або бронхоальвеолярний лаваж; у дітей, які не можуть зібрати мокротиння, слід застосувати індукцію мокротиння, якщо це можна зробити безпечно, третій варіант – шлункові змиви.

Зібраний діагностичний матеріал необхідно якомога швидко доставити в бактеріологічну лабораторію. Якщо це неможливо, мокротиння можна зберігати при $t + (4 - 6) ^\circ\text{C}$ до 3-х діб (для виключення контамінації проб неспецифічною мікрофлорою, яка завжди міститься в пробах мокротиння та розмножується скоріше, ніж мікобактерії туберкульозу); ексудати, спинномозкову рідину можна зберігати до 8 год. Заморожувати діагностичний матеріал перед доставкою не рекомендується, за необхідності може бути використане швидке заморожування при $t - (25 - 30) ^\circ\text{C}$, і розморожувати матеріал дозволяється тільки 1 раз перед початком дослідження.

Зі спеціалізованих лабораторій ПТЗ України 2-го рівня до лабораторій 3-го рівня з метою швидкої попередньої (генотипічної) та прискореної підтверджуючої (мікробіологічної на рідких середовищах) діагностики ТБ має доставлятися по 1 зразку мокротиння від:

- усіх хворих I – III кат. з позитивним мазком мокротиння – перед початком лікування та у випадках продовження бактеріовиділення після завершення пролонгованої на 1 місяць інтенсивної фази (ІФ) лікування;

- хворих тих самих категорій з негативним мазком, якщо ці хворі: діти-підлітки (вікова група до 17 років) з підозрою на ТБ; контактні особи з вогнищ МРТБ; ВІЛ-інфіковані; пацієнти, які лікувались раніше від туберкульозу, і яким повторно був встановлений діагноз легеневого туберкульозу (невдале лікування, рецидив, відрив), тобто пацієнти з рецидивом, після невдачі лікування чи відриву і в анамнезі хвороби яких немає даних про стійкість до R; пацієнти, які народжені в іноземній країні з високим рівнем захворюваності на ТБ.

7.3.1. Алгоритм лабораторної діагностики випадку туберкульозу

Схематичний лабораторний алгоритм з використанням системи GeneXpert наводимо на рис. 7.1.

В лабораторії 3-го рівня з одного зразка отриманого мокротиння після здійснення передпосівної обробки з утвореного осаду проводять комплекс наступних досліджень:

1. Фенотипічних – посів досліджуваного матеріалу в рідке середовище з подальшою інкубацією в системі BACTEC MGIT 960, яке включає:

- а) безпосередньо посів осаду матеріалу в 1 пробірку з рідким середовищем;
- б) посів осаду матеріалу на 1 пробірку з щільним середовищем;
- в) бактеріоскопічне дослідження мазка мокротиння з осаду матеріалу.

2. Генетичних – дослідження осаду матеріалу в системі GeneXpert, яке складається із виявлення *M. tuberculosis-complex* та визначення стійкості до R.

В разі відсутності реагентів для системи BACTEC MGIT 960, бактеріологічна лабораторія 3-го рівня замість посіву в рідке середовище здійснює посів матеріалу на 2 пробірки щільного середовища.

Проведення такого комплексу досліджень з однієї проби матеріалу є дуже важливим.

7.3.2. Алгоритм дій після отримання результату дослідження з системи GeneXpert

Схематичний клініко-діагностичний алгоритм з використанням системи GeneXpert наведений на рис. 7.2.

Виявлені МБТ. Встановлена стійкість до R. Випадок з ризиком розвитку МРТБ.

У день проведення дослідження результат і медична документація хворого мають бути передані лікуючому лікарю та подані на найближче засідання Центральної лікарської консультативної комісії (консиліуму) із хіміорезистентного туберкульозу (ЦЛКК ХР ТБ).

ЦЛКК ХР ТБ має оперативно прийняти рішення щодо початку лікування хворого згідно зі стандартним режимом терапії ХТ за IV категорією відповідно до діючої нормативно-правової бази.

У разі попереднього отримання результатів дослідження з системи GeneXpert щодо наявності МБТ і стійкості до R в лабораторії після виділення культури мікобактерії в рідкому середовищі в системі VASTEC MGIT 960 проводиться ТМЧ одночасно до ПТП 1-го й 2-го ряду в рідкому середовищі (те саме стосується досліджень на щільному середовищі), обов'язковим є проведення ідентифікації за допомогою імунохроматографічного тесту.

Із числа ПТП 1-го ряду чутливість треба визначати до усіх препаратів, включаючи S та Z (в рідкому середовищі).

Із числа ПТП 2-го ряду чутливість треба визначати до Km або Am, Cm, Lfx або Ofx та Mfx (розширення спектру ТМЧ на препарати 4 групи – тільки за індивідуальним призначенням лікаря для хворих з високим ризиком невдачі лікування за 4.1–2.(A) кат.:



Рисунок 7.1 – Лабораторний алгоритм мікробіологічної діагностики туберкульозу з використанням системи GeneXpert

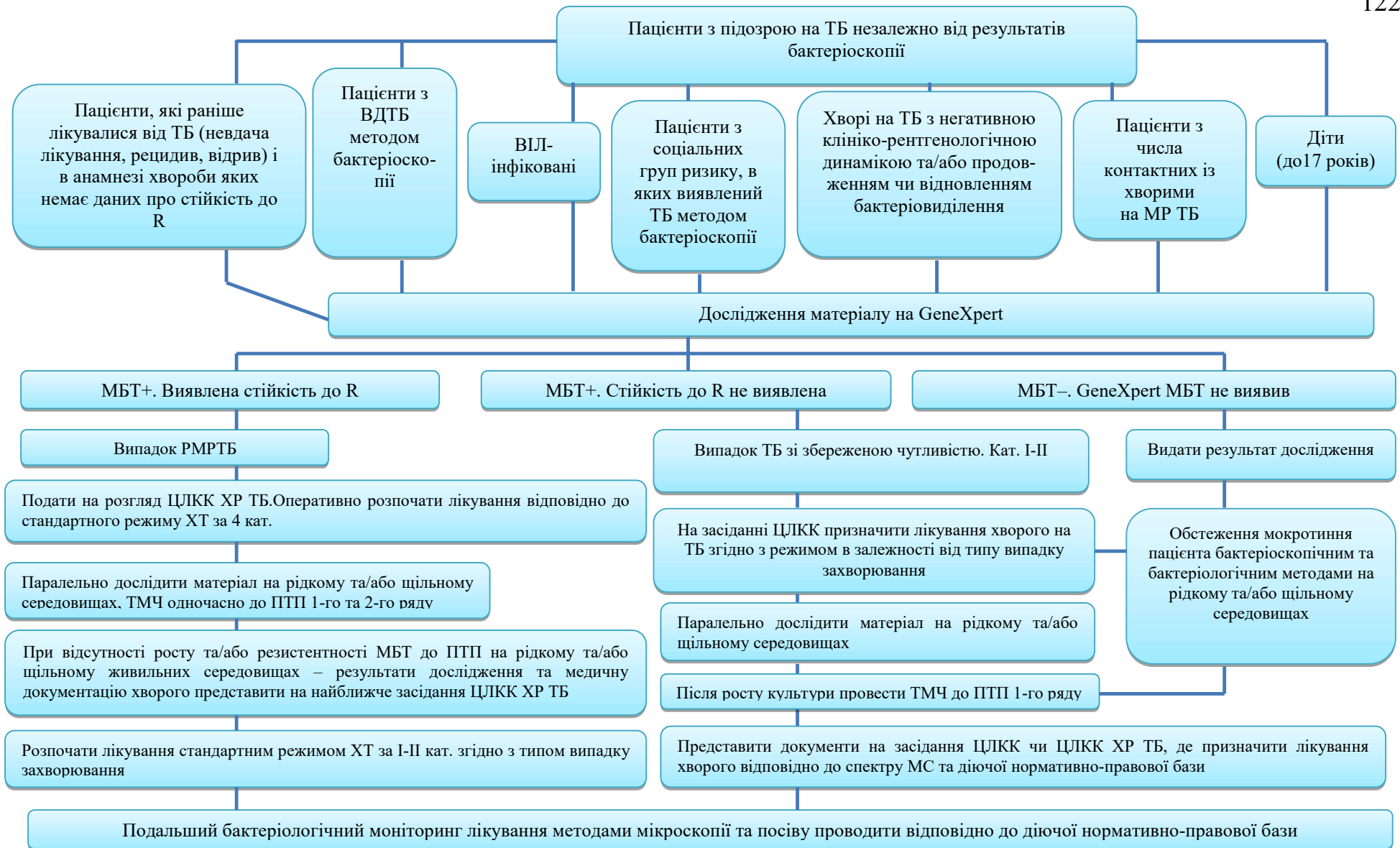


Рисунок 7.2 – Клініко-діагностичний алгоритм мікробіологічної діагностики туберкульозу з використанням системи GeneXpert

а) у разі продовження бактеріовиділення за мазком після перших 4-х місяців лікування;

б) у випадках повторного залучення хворих до лікування за 4.1–2.(А) категорією – рецидивів після попереднього неефективного лікування за цими категоріями тощо.

Після отримання росту культури і результатів ТМЧ до ПТП 1-го і 2-го ряду, необхідно повторно представити результати аналізів і медичну документацію хворого на ЦЛКК ХР ТБ з метою корекції режиму лікування хворого відповідно до спектру МС.

При відсутності росту та/або резистентності мікобактерій до ПТП на рідкому та/або щільному середовищах необхідно результати дослідження і медичну документацію хворого представити на найближче засідання ЦЛКК ХР ТБ та розпочати лікування стандартним режимом ХТ за I–II кат. згідно до характеристики випадку захворювання.

Подальший бактеріологічний моніторинг лікування необхідно проводити бактеріоскопічним і культуральним методами дослідження відповідно до діючої нормативно-правової бази.

МБТ виявлені. Стійкість до R не встановлена. Випадок ТБ зі збереженою чутливістю до R. Кат. I–II.

В день проведення дослідження результат має бути переданий лікуючому лікарю і поданий на найближче засідання ЦЛКК.

ЦЛКК має оперативно прийняти рішення щодо початку лікування хворого на туберкульоз згідно з режимом хіміотерапії в залежності від характеристики випадку захворювання.

Після отримання результату з системи GeneXpert щодо наявності МБТ бактеріологічна лабораторія обов'язково паралельно проводить культуральні дослідження на рідких та/або щільних середовищах.

Після виділення культури в рідкому середовищі в системі VASTEC MGIT 960 (1 зразок) та проведення ідентифікації *M. tuberculosis-complex* за допомогою імунохроматографічного тесту ТМЧ проводиться тільки до ПТП 1-

го ряду (за виключенням хворих з вогнищ МР ТБ, для яких паралельно ставляться ТМЧ і до ПТП 2-го ряду за стандартним переліком). Якщо за результатами ТМЧ виявлена стійкість до R та H, здійснюється ТМЧ до препаратів 2-го ряду в рідкому середовищі (за стандартним переліком).

Після отримання росту культури і результатів ТМЧ до ПТП 1-го ряду, лікар подає повторно документи на засідання ЦЛКК (МБТ чутливі до ПТП) чи ЦЛКК ХР ТБ (МБТ стійкі до ПТП), де призначається лікування хворого відповідно до спектру МС до ПТП та діючої нормативно-правової бази.

Подальший бактеріологічний моніторинг лікування необхідно проводити бактеріоскопічним і культуральним методами дослідження відповідно до діючої нормативно-правової бази.

МБТ не виявлено системою GeneXpert.

Необхідно провести обстеження мокротиння пацієнта бактеріоскопічним і культуральним методами дослідження з використанням рідких та/або щільних середовищ.

Якщо буде виділена культура МБТ в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960, бактеріологічна лабораторія проводить ТМЧ до ПТП 2-го ряду (за виключенням хворих з вогнищ МР ТБ, для яких паралельно ставляться ТМЧ до ПТП 2-го ряду за стандартним переліком). Якщо за результатами ТМЧ виявлена стійкість до R та H, здійснюється ТМЧ до препаратів 2-го ряду в рідкому живильному середовищі (за стандартним переліком).

В усіх випадках (варіанти 1 – 3) у разі відсутності реагентів для ТМЧ для системи ВАСТЕС MGIT 960 бактеріологічна лабораторія здійснює визначення МС за допомогою щільних середовищ за стандартним переліком тестів до ПТП 1-го та 2-го рядів (критерії для розширення спектру ТМЧ – див. вище).

Залежно від результатів посіву мокротиння й дослідження МС призначається лікування на ЦЛКК (МБТ чутливі до ПТП) чи ЦЛКК ХР ТБ (МБТ стійкі до ПТП).

7.3.3. Використання системи гібридизації із типоспецифічними зондами (GenoType)

Система GenoType використовується тільки в лабораторіях з бактеріологічної діагностики туберкульозу 3-го рівня та призначена для діагностики ТБ із ідентифікацією мікобактерій та визначенням чутливості до R, H, Q, аміноглікозидів/циклічних пептидів і E. Призначається для обстеження наступних груп пацієнтів із суворим дотриманням наступної послідовності та пріоритетності діагностичного алгоритму:

В якості первинного діагностичного тесту незалежно від результату бактеріоскопії на КСБ (М + чи М –):

- 1) ВІЛ-інфіковані пацієнти з підозрою на ТБ.
- 2) Пацієнти з підозрою на легеневий ТБ та з ризиком наявності МРТБ (групи ризику відповідно до національного керівництва):
 - пацієнти з числа контактних із МРТБ хворими;
 - пацієнти, які лікувались раніше від ТБ і яким повторно був встановлений діагноз легеневого ТБ (невдале лікування, рецидив, відрив), тобто пацієнти з рецидивом, після невдачі лікування чи відриву і в анамнезі хвороби яких немає даних про стійкість до R і H;
 - пацієнти, які народжені в іноземній країні із високим рівнем захворюваності.

3) Діти-підлітки (вікова група до 17 років) з підозрою на ТБ.

В якості вторинного діагностичного тесту після бактеріоскопії на КСБ (М +):

- 1) Хворі на ТБ з негативною клініко-рентгенологічною динамікою та/або продовженням чи відновленням бактеріовиділення (з метою прискорення виявлення вторинної МС МБТ під час лікування);
- 2) Пацієнти з соціальних груп ризику, в яких виявлений легеневий ТБ методом бактеріоскопії;
- 3) Хворі з ВДТБ методом бактеріоскопії.

Для дослідження використовується дослідний матеріал (позитивний зразок мокротиння, підтверджений бактеріоскопічно; культура мікобактерій, що виросла на рідкому та/або щільному середовищі).

7.3.4. Алгоритм дій після отримання результату дослідження з системи GenoType

Схематичний клініко-діагностичний алгоритм застосування системи GenoType представлені на рис. 7.3.

Незалежно від отриманого результату дослідження в системі GenoType бактеріологічна лабораторія обов'язково паралельно проводить культуральні дослідження на рідких та/або щільних середовищах.

1. МБТ виявлені. Встановлена стійкість до R і H. Випадок з РМРТБ.

Після отримання результатів дослідження в системі GenoType щодо наявності МБТ і стійкості до R та H необхідно обов'язково одночасно визначати МС до ПТП 1-го і 2-го ряду на рідких та/або щільних середовищах. Також необхідно використати систему GenoType для визначення стійкості до Q, аміноглікозидів/циклічних пептидів та E. Ці дослідження необхідно провести в той же день або в наступний. Використовується для дослідження одна й та сама проба дослідного матеріалу.

Результати дослідження в системі GenoType і медичну документацію хворого необхідно представити на найближче засідання ЦЛКК ХР ТБ.

ЦЛКК ХР ТБ має оперативно (в день отримання від лікаря медичної документації та результату дослідження в системі GenoType) призначити лікування хворого згідно зі стандартним режимом ХТ за IV кат. відповідно до діючої нормативно-правової бази.

Після отримання росту культури і результатів тесту МС до ПТП 1-го та 2-го ряду, необхідно повторно представити результати аналізів та медичну документацію хворого на ЦЛКК ХР ТБ з метою корекції режиму лікування хворого відповідно до спектру МС.

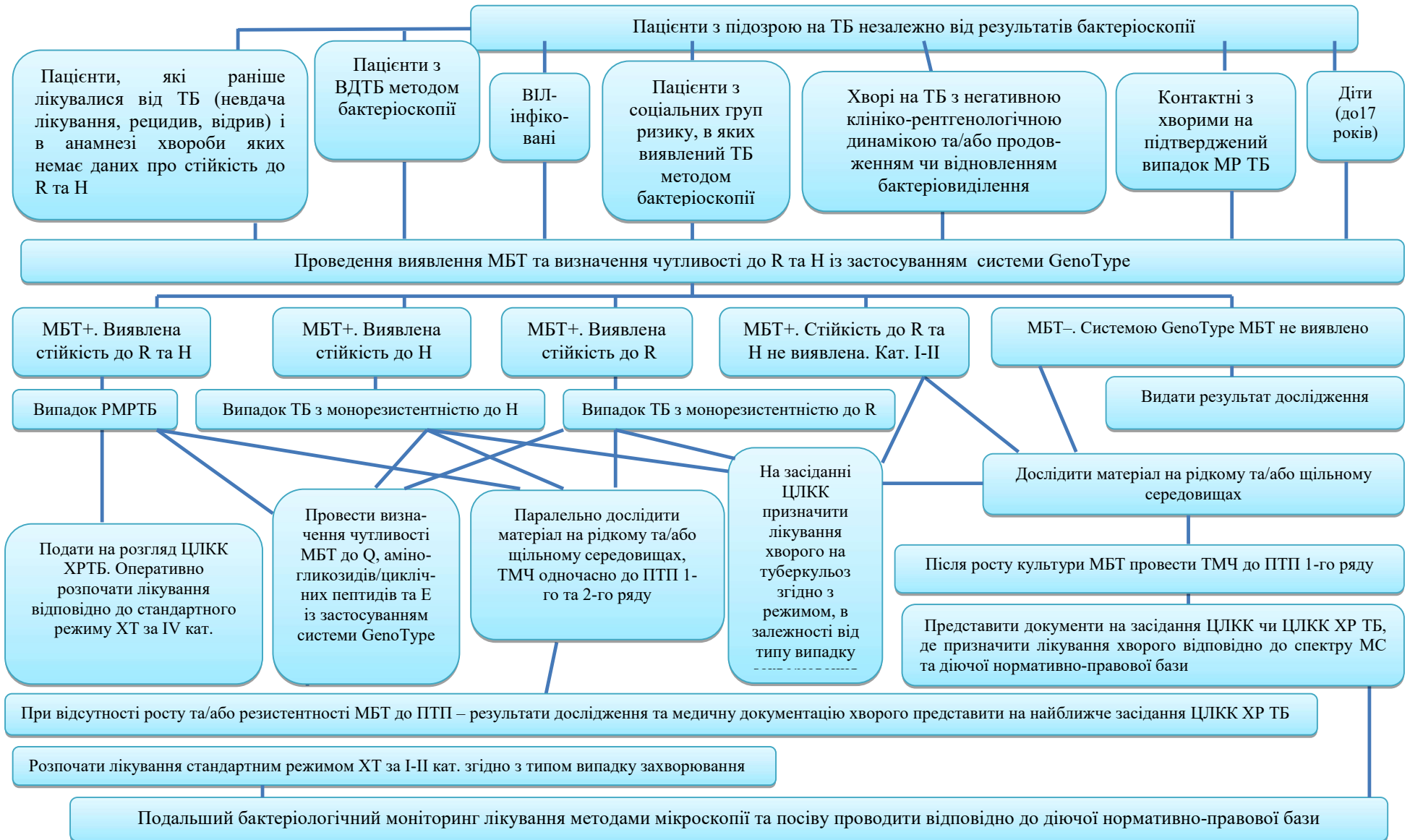


Рисунок 7.3 – Клініко-діагностичний алгоритм діагностики туберкульозу з використанням системи GenoType

При відсутності росту та/або резистентності мікобактерій до ПТП на рідкому та/або щільному середовищах необхідно результати дослідження й медичну документацію хворого представити на найближче засідання ЦЛКК ХР ТБ та розпочати лікування стандартним режимом ХТ за I–II кат. згідно з типом випадку захворювання.

Подальший бактеріологічний моніторинг лікування необхідно проводити бактеріоскопічним і культуральним методами дослідження відповідно до діючої нормативно-правової бази.

2. МБТ виявлені. Встановлена стійкість їх до R і чутливість до H. Випадок ТБ зі збереженою чутливістю до H. Кат. I.

Необхідно за допомогою системи GenoType визначити стійкість до Q, аміноглікозидів/циклічних пептидів і E та визначити одночасно МС до ПТП 1-го і 2-го ряду на рідких та/або щільних середовищах. Ці дослідження необхідно провести в цей же день або в наступний. Використовується для дослідження одна й та сама проба дослідного матеріалу.

Результати дослідження і медичну документацію хворого необхідно представити на найближче засідання ЦЛКК ХР ТБ.

ЦЛКК ХРТБ має оперативно (в день отримання від лікаря медичної документації та результату дослідження в системі GenoType) призначити лікування хворого згідно з режимом ХТ при монорезистентності до R.

Після отримання росту культури і результатів ТМЧ до ПТП 1-го і 2-го ряду, необхідно повторно представити результати аналізів та медичну документацію хворого на ЦЛКК ХР ТБ з метою корекції режиму лікування хворого відповідно до спектру МС.

При відсутності росту та/або резистентності мікобактерій до ПТП на рідкому та/або щільному середовищах необхідно результати дослідження і медичну документацію хворого представити на найближче засідання ЦЛКК ХР ТБ та розпочати лікування стандартним режимом ХТ за I–II кат. згідно з типом випадку захворювання.

Подальший бактеріологічний моніторинг лікування необхідно проводити бактеріоскопічним і культуральним методами дослідження відповідно до діючої нормативно-правової бази.

3. МБТ виявлені. Встановлена стійкість їх до H і чутливість до R: випадок ТБ зі збереженою чутливістю до R. Кат. I–II.

Необхідно за допомогою системи GenoType визначити стійкість до Q, аміноглікозидів/циклічних пептидів і E та визначити МС одночасно до ПТП 1-го і 2-го ряду на рідких та/або щільних середовищах.

Результати дослідження й медичну документацію хворого необхідно представити на найближче засідання ЦЛКК ХР ТБ.

ЦЛКК ХР ТБ має оперативно (в день отримання від лікаря медичної документації і результату дослідження в системі GenoType) призначити лікування хворого згідно з режимом ХТ при монорезистентності до H.

Після отримання росту культури й результатів ТМЧ до ПТП 1-го і 2-го ряду необхідно повторно представити результати аналізів та медичну документацію хворого на ЦЛКК ХР ТБ з метою корекції режиму лікування хворого відповідно до спектру МС.

При відсутності росту та/або резистентності мікобактерій до ПТП на рідкому та/або щільному середовищах необхідно результати дослідження і медичну документацію хворого представити на найближче засідання ЦЛКК ХР ТБ та розпочати лікування стандартним режимом ХТ за I–II кат. згідно з типом випадку захворювання.

Подальший бактеріологічний моніторинг лікування необхідно проводити бактеріоскопічним і культуральним методами дослідження відповідно до діючої нормативно-правової бази.

4. МБТ виявлені. Встановлено, що мікобактерії чутливі до R і H. Кат. I–II.

Результати дослідження й медичну документацію хворого необхідно представити на найближче засідання ЦЛКК та розпочати лікування стандартним режимом ХТ за I–II кат. згідно з типом випадку захворювання.

Бактеріологічна лабораторія обов'язково паралельно проводить культуральні дослідження на рідких та/або щільних середовищах.

Після отримання росту культури і результатів ТМЧ до ПТП 1-го ряду, лікар подає повторно документи на засідання ЦЛКК (МБТ чутливі до ПТП) чи ЦЛКК ХР ТБ (МБТ стійкі до ПТП), де призначається лікування хворого відповідно до спектру МС до ПТП та діючої нормативно-правової бази.

Подальший бактеріологічний моніторинг лікування необхідно проводити бактеріоскопічним і культуральним методами дослідження відповідно до діючої нормативно-правової бази.

Таким чином, на підставі отриманих дослідних даних та проведеного аналітичного аналізу встановлено загальні підходи до діагностики туберкульозу з використанням сучасних гено-фенотипічних методів. Молекулярно-генетичні 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 середовищах, не використовуються для бактеріологічного моніторингу лікування хворих на туберкульоз (для цього застосовуються бактеріоскопія мазків мокротиння і культуральні дослідження на рідких та/або щільних середовищах).

Обґрунтування оптимальної схеми комплексного використання щільного і рідкого середовищ в системі ВАСТЕС MGIT 960 і молекулярно-генетичних систем для швидкої діагностики туберкульозної інфекції (GeneXpert і GenoType) довело, що при використанні системи GeneXpert кількість позитивних результатів, що були отримані з проб мокротиння з КСБ(+), більше, ніж в 1,5 рази перевищували аналогічний показник при дослідженні проб мокротиння, що були негативними за мазком (відповідно 73,0 % і 46,9 %). Після проведення передпосівної обробки зразків мокротиння з КСБ(+) та КСБ(-) результативність досліджень на туберкульоз в системі GeneXpert збільшилась на 14,1 %. Показано діагностичну цінність дослідження негативних за результатами бактеріоскопії зразків мокротиння в системі

GeneXpert і доведена висока позитивність таких досліджень, яка за нашими даними склала 59,4 %. Доведено, що недоцільним є використання системи GeneXpert для обстеження хворих в ході лікування. Проведені дослідження довели, що відсоток діагностованих випадків мультирезистентного туберкульозу за допомогою системи GeneXpert і фенотипового методу діагностики в апараті ВАСТЕС MGIT 960 загалом складає 93,7 %, і тому дана генетична система може використовуватися для швидкої діагностики, насамперед, мультирезистентного туберкульозу.

Впровадження в діагностичні дослідження на туберкульоз системи GenoType дозволило швидко проводити ідентифікацію виділених мікобактерій та диференціацію НТМБ (*M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii* та ін.). Результати молекулярного дослідження мультирезистентності в системі GenoType MTBDRplus співпадають у 95,5 % із результатами фенотипічного тестування методом пропорцій. Дані визначення монорезистентності до R, або в комбінації з іншими ПТП, крім H, за допомогою методу генетичного тестування в системі GenoType MTBDRplus та фенотипічних методів визначення медикаментозної чутливості не відрізняються між собою й повністю співпадають. 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. Виявлено, що при наявності мутацій, що асоційовані з резистентністю до H, лише в 93,1 % випадках спостерігається МС МБТ до H при проведенні тесту в рідкому середовищі. При наявності мутації в генах, що відповідають за МС до Q, в рідкому середовищі лише 90,6 % мають МС до Ofx.

Нами розроблено алгоритм використання системи GeneXpert і GenoType з іншими сучасними бактеріологічними методами, які запропоновано впровадити в практику роботи бактеріологічних лабораторій ПТЗ України. Це дозволить покращити якість і своєчасність діагностики туберкульозу.

За матеріалами викладеного фрагменту дисертаційного дослідження було розроблено та отримано Деклараційний патент України на корисну модель № 99799 від 25.06.2015 «Спосіб визначення чутливості *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів в дослідному матеріалі хворих на туберкульоз легень» [70], а також розроблено інформаційний лист [89].

Були опубліковані наступні статті:

Використання нової молекулярно-генетичної системи GeneXpert і рідкого живильного середовища в системі ВАСТЕС MGIT для швидкої діагностики туберкульозу / А. І. Барбова, О. А. Журило, Н. М. Алієва // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика. – 2015. – С. 423–430 [9].

Використання нової молекулярно-генетичної системи GenoType і рідкого живильного середовища для швидкої діагностики туберкульозу // А. І. Барбова, Л. В. Гайова, О. А. Журило, П. С. Трофімова, Н. М. Алієва // Scientific J. «ScienceRise». – 2015. – № 10/3 (15). – С. 29–37 [26].

Порівняльна характеристика якості життя та стану здоров'я хворих інфільтративним туберкульозом легень в динаміці на різних етапах медичної реабілітації / Ю. П. Цапенко, М. Г. Бойко, О. О. Краєвська, Н. М. Алієва, Ю. О. Красношапка // Світ медицини та біології. – 2012. – № 3. – С. 112–115 [74].

Були опубліковані тези:

Епідеміологічний нагляд за медикаментозною стійкістю збудника туберкульозу в Україні / А. І. Барбова, О. А. Журило, П. С. Трофімова // V міжнародн. мед. конгрес «Впровадження сучасних досягнень у практику охорони здоров'я України»: Тез. доп. – Київ, 2016. – С.10–11 [39].

Ефективність комплексного застосування гено- та фенотипових методів бактеріологічної діагностики туберкульозу / О. А. Журило, А. І. Барбова, // V міжнародн. мед. конгрес «Впровадження сучасних досягнень у практику охорони здоров'я України»: Тез. доп. – Київ, 2016. – С.19 [40].

РОЗДІЛ 8

ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ СИСТЕМ GENEXPERT ТА GENOTYPE ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ КЛІНІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ПІДОЗРОЮ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ТА ХВОРИХ ІЗ ВСТАНОВЛЕНИМ ДІАГНОЗОМ ЗАЛЕЖНО ВІД КЛІНІЧНОЇ КАТЕГОРІЇ ЗАХВОРЮВАННЯ

У ході виконання наукової роботи нами були розпочаті дослідження щодо експериментально-клінічного обґрунтування застосування систем GeneXpert і GenoType для досліджень зразків клінічного матеріалу пацієнтів із підозрою на туберкульоз та з встановленим клінічним діагнозом з різними клінічними категоріями.

Для аналізу отриманих нами даних на основі Ф № 252-2/о «Лабораторний реєстраційний журнал (культуральні дослідження) ТБ 04/2», який затверджений Наказом МОЗ України від 02.09.2009 № 657 «Про затвердження форм первинної облікової документації і форм звітності з туберкульозу та інструкцій щодо їх заповнення» була створена база даних на паперових носіях, які містили повний об'єм відомостей щодо використання методів досліджень та їх результати.

Для дослідження відбирали зразки матеріалу від хворих із підозрою на туберкульоз від хворих I-ої категорії з ВДТБ, хворих II-ої категорії з РТБ та хворих III-ої категорії.

Враховувалися дані про дату молекулярно-генетичного дослідження, лабораторний номер зразка, прізвище, ім'я та по батькові пацієнтів, відділення, матеріал, випадок, клінічну категорію, результати мікроскопії осаду за методом Циль-Нільсена, результат росту в системі ВАСТЕС MGIT 960, дату отримання результату, ідентифікацію культур при позитивному рості в ВАСТЕС MGIT 960, яка включає в себе мікроскопію за методом Циль-Нільсена, ріст на кров'яному агарі, результати імунохроматографічного MGIT TBc ID та

результати ТМЧ до препаратів 1-го ряду в системі ВАСТЕС MGIT 960. Після проведення молекулярно-генетичних і бактеріологічних досліджень та отримання відповідних даних було проведено їх зведення, аналіз, обробку й обчислення статистичної інформації.

Для оцінки та порівняння результатів досліджень була зроблена вибірка за показниками молекулярно-генетичних та культуральних досліджень окремо для проб з позитивними та негативними результатами бактеріоскопії за методом Циль-Нільсена. Такий аналіз даних був обумовлений тим, що за версією 1,0 системного забезпечення програми досліджень GenoType, існує можливість дослідження зразків мокротиння з наявністю КСБ. В той же час чутливість системи GeneXpert, за даними виробника, є вищою при дослідженні клінічного матеріалу з позитивними результатами бактеріоскопії. Було підраховано загальну кількість варіантів, розраховано середню похибку та достовірність результатів.

В ході досліджень нами був проведений аналіз ефективності визначення збудника туберкульозу в зразках клінічного матеріалу, який був направлений в лабораторію мікробіології від хворих із різними клінічними категоріями захворювання на туберкульоз. Був визначений відсоток підтвердження діагнозу різними методами діагностики – за допомогою молекулярно-генетичних систем: GeneXpert і GenoType, системи ВАСТЕС MGIT 960 в рідкому середовищі. Проаналізовані дані щодо визначення мікобактерій у хворих I-ої, II-ої та III-ої клінічної категорії захворювання на туберкульоз. Результати отриманих даних наведені в табл. 8.1 і 8.2.

Як свідчать дані табл. 8.1, за допомогою двох молекулярних методів діагностики було підтверджено наявність ДНК *M. tuberculosis-complex* у 88,8 % хворих з ВДТБ I-ої та у 81,4 % хворих на РТБ II-ої категорій із позитивним мазком, при цьому в усіх випадках було також підтверджено життєздатність виділених мікобактерій за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960.

Виявлення наявності мікобактерій у зразках мокротиння з КСБ у хворих із різними клінічними категоріями захворювання на туберкульоз, (М ± m) %

| Клінічні категорії захворювання | Результати діагностики | | | | | | Всього го |
|---------------------------------|------------------------|--------------|----------------|-------------|----------------|--------------|-----------|
| | GeneXpert (+) | | GeneXpert (-) | | GeneXpert (+) | | |
| | GenoType(+) | | GenoType(-) | | GenoType(+) | | |
| | ВАСТЕС MGIT(+) | | ВАСТЕС MGIT(-) | | ВАСТЕС MGIT(+) | | |
| | абс | М ± m | абс | М ± m | абс | М ± m | абс |
| I | 522 | 88,8 ± 1,3* | 0 | 0 | 66 | 11,2 ± 1,3* | 588 |
| II | 210 | 81,4 ± 2,4** | 18 | 7,0 ± 1,5** | 30 | 11,6 ± 2,0** | 258 |
| Всього | 732 | 86,5 ± 1,2 | 18 | 2,1 ± 0,5 | 96 | 1,4 ± 1,1 | 846 |

Примітки:

* – $p < 0,001$ при порівнянні показників діагностичної ефективності молекулярно-генетичних і фенотипічних методів у хворих I-ої категорії.

** – $p < 0,001$ при порівнянні показників діагностичної ефективності молекулярно-генетичних і фенотипічних методів у хворих II-ої категорії.

(+) – наявність мікобактерій.

(-) – відсутність мікобактерій.

У хворих II-ої категорії за допомогою лише генетичних систем було додатково виявлено наявність ДНК *M. tuberculosis-complex* в 7,0 % випадках, однак при цьому не спостерігалось росту мікобактерій в рідкому середовищі. Аналізуючи дані таблиці, важливо відмітити, що система GenoType дозволила виявити додатково 11,2 % та 11,6 % бактеріовиділювачів серед хворих I-ої та II-ої категорії відповідно. Життєздатність цих мікобактерій була підтверджена в рідкому середовищі. Однак у зв'язку з тим, що система GeneXpert не виявила позитивного результату при проведенні досліджень цих зразків, можна

Виявлення наявності мікобактерій в зразках мокротиння, негативних за мазком у хворих з різними клінічними категоріями захворювання на туберкульоз, (M ± m) %

| Клінічні категорії захворювання | Результати діагностики | | | | | | Всього |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------|---------------------------------|------------|----------------------------------|---------------|--------|
| | GeneXpert (+) ВАСТЕС MGIT(+) | | GeneXpert (-) ВАСТЕС MGIT(+) | | GeneXpert (-) ВАСТЕС MGIT (-) | | |
| | абс | M ± m | абс | M ± m | абс | M ± m | |
| I | 216 | 76,6 ± 2,5* | 18 | 6,4 ± 1,4* | 48 | 17,0 ± 2,2* | 282 |
| II | 144 | 80,0 ± 3,0** | 0 | 0 | 36 | 20,0 ± 3,0** | 180 |
| III | 96 | 31,4 ± 2,6*** | 0 | 0 | 210 | 68,6 ± 2,6*** | 306 |
| Всього | 456 | 59,4 ± 1,8 | 18 | 2,3 ± 0,5 | 294 | 38,3 ± 1,8 | 768 |

Примітки:

* – $p < 0,001$ при порівнянні показників діагностичної ефективності молекулярно-генетичних і фенотипічних методів у хворих I-ої категорії.

** – $p < 0,001$ при порівнянні показників діагностичної ефективності молекулярно-генетичних і фенотипічних методів у хворих II-ої категорії.

*** – $p < 0,001$ при порівнянні показників діагностичної ефективності молекулярно-генетичних і фенотипічних методів у хворих III-ої категорії.

(+) – наявність мікобактерій.

(-) – відсутність мікобактерій.

зробити припущення що виявлені мікобактерії не належать до туберкульозного комплексу.

Важливо відмітити, що найбільший відсоток позитивних результатів молекулярних досліджень був зафіксований при дослідженні зразків клінічного матеріалу хворих I-ої клінічної категорії. При цьому було виявлено загалом 88,8 % бактеріовиділювачів.

Як свідчать дані табл. 8.2, за допомогою молекулярно-генетичного методу діагностики було підтверджено наявність ДНК *M. tuberculosis-complex* у 59,4 % хворих з ВДТБ I-ої, II-ої та III-ої категорії з негативним мазком, при цьому в усіх випадках було також підтверджено життєздатність виділених мікобактерій за допомогою системи VASTEC MGIT 960. Найбільша ефективність застосування молекулярно-генетичного методу виявилась у хворих II-ої категорії – 80,0 %. Дуже важливим є факт підтвердження бактеріовиділення в 31,3 % випадків у хворих III-ої категорії, які мають завжди негативний результат бактеріоскопії, що унеможлиблює швидке виявлення бактеріовиділювачів серед хворих даної клінічної категорії.

Аналізуючи дані табл. 8.2, слід відмітити, що при дослідженні негативних за мазком зразків мокротиння від хворих II-ої та III-ої клінічних категорій молекулярні дослідження є дуже інформативними та в 4 рази виявляють більше бактеріовиділювачів, ніж метод посіву в рідке середовище. Для хворих III-ої клінічної категорії, навпаки, діагностична ефективність методу посіву за допомогою системи VASTEC MGIT 960 в 2 рази перевищує молекулярний метод діагностики в системі GeneXpert. При обстеженні клінічного матеріалу від хворих I-ої категорії також було виявлено в 6,4 % випадків ріст культури в автоматизованій системі в рідкому середовищі при негативному результаті в молекулярно-генетичній системі. Оскільки в цих випадках при бактеріоскопії виділеної культури з позитивних пробірок MGIT не виявлено утворення корд-фактору, можна зробити припущення, що виявлені мікобактерії не належать до туберкульозного комплексу.

Таким чином, виконана робота з метою експериментально-клінічного обґрунтування застосування систем GeneXpert і GenoType для досліджень зразків клінічного матеріалу пацієнтів з підозрою на туберкульоз та з встановленим клінічним діагнозом із різними клінічними категоріями, показала високу ефективність виявлення бактеріовиділювачів серед хворих як з позитивними, так і з негативними результатами мазку мокротиння на КСБ. Однак чутливість методу GeneXpert при дослідженні зразків мокротиння з наявністю КСБ майже на 28,0 % перевищує аналогічні показники при дослідженні зразків мокротиння без наявності КСБ.

Встановлено, що генетичні системи дозволили виявити додатково 11,2 % та 11,6 % бактеріовиділювачів серед хворих I-ої та II-ої категорій відповідно. Найбільший відсоток позитивних результатів молекулярних досліджень був зафіксований при дослідженні зразків клінічного матеріалу хворих I-ої клінічної категорії (88,8 %). При використанні системи GeneXpert при дослідженні негативних за мазком зразків мокротиння від хворих II-ої та III-ої клінічних категорій молекулярні дослідження є дуже інформативними та в 4 рази виявляють більше бактеріовиділювачів, ніж метод посіву в рідке середовище.

Таким чином, на підставі отриманих даних обґрунтовано застосування молекулярно-генетичних систем GenoType і GeneXpert для досліджень клінічного матеріалу пацієнтів із підозрою на туберкульоз та хворих із встановленим клінічним діагнозом у залежності від клінічної категорії захворювання.

Частина представлених даних увійшли в статтях:

Використання нової молекулярно-генетичної системи GeneXpert і рідкого живильного середовища в системі VASTEC MGIT для швидкої діагностики туберкульозу / А. І. Барбова, О. А. Журило, Н. М. Алієва // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика. – 2015. – С. 423–430 [9].

Використання нової молекулярно-генетичної системи GenoType і рідкого живильного середовища для швидкої діагностики туберкульозу // А. І. Барбова, Л. В. Гайова, О. А. Журило, П. С. Трофімова, Н. М. Алієва // Scientific J. «ScienceRise». – 2015. – № 10/3 (15). – С. 29–37 [26].

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Несприятлива епідемічна ситуація з туберкульозу в Україні потребує постійного удосконалення методів виявлення та діагностики захворювань на туберкульоз серед населення з метою зниження інфікованості, захворюваності та зменшення резервуару туберкульозної інфекції [88, 93, 96, 97, 99, 203].

Під час епідемії туберкульозу в країні одним із пріоритетних напрямків в системі протитуберкульозних заходів є підвищення рівня ефективності своєчасної діагностики. На бактеріологічні лабораторії покладається особлива функція у питаннях діагностики заразних випадків захворювання на туберкульоз та моніторингу ефективності процесу лікування. Саме тому важливим напрямком удосконалення та оптимізації роботи лабораторій ПТЗ країни є обов'язкова стандартизація основних бактеріологічних і молекулярно-генетичних методів. Впровадження їх в роботу дозволяє отримати результати, які можуть бути порівняні з результатами досліджень інших лабораторій, що дасть можливість своєчасно виявляти та реагувати на помилки в діагностиці, проводити оптимальне специфічне лікування хворих, оптимізувати та полегшити навчання фахівців, оцінити якість роботи лабораторій, окремих фахівців та проводити відповідний контроль ефективності лабораторних досліджень [18, 22, 33, 41, 55, 57, 58, 82, 188, 206, 245, 257].

Мікробіологічні дослідження з діагностики туберкульозу є найважливішою складовою діагностичного процесу як на етапі постановки діагнозу "туберкульоз", так і при контролі ефективності хіміотерапії. Відповідно до наказу МОЗ України від 06.02.02. № 45 "Про затвердження інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції" в країні визначена мережа лабораторій з діагностики туберкульозу і втілена система лабораторних досліджень діагностики туберкульозу.

Культуральний метод дослідження до сьогодні залишається «золотим стандартом» в діагностиці туберкульозу. Виявлення *M. tuberculosis* в діагностичному матеріалі бактеріологічними методами дозволяє підтвердити достовірність поставленого діагнозу «туберкульоз».

У зв'язку з родовими особливостями, культивування *M. tuberculosis* потребує особливих умов, відмінних від умов культивування інших мікроорганізмів. Тривалий час росту культури обумовлює необхідність попередньої обробки матеріалу з метою знищення в пробі не мікобактеріальної мікрофлори. Відносна стійкість мікобактерій до дії лугів і кислот визначає умови обробки, при яких зниження життєздатності мікобактерій порівняно невелике, а нетуберкульозні мікроорганізми гинуть. Проте підібрати ідеальні умови обробки повністю не вдається і процедура деконтамінації мокротиння істотно впливає на результативність культурального методу.

При використанні класичних щільних середовищ на яєчній основі термін позитивного результату складає 3–5 тижнів, проте для окремих культур, особливо виділених від пацієнтів, які раніше отримували лікування, цей час перевищує 10 тижнів. Негативний результат видається після 10 тижнів (2,5 місяців) культивування. Використання рідких середовищ значно скорочує терміни появи росту для більшості культур. За рекомендаціями виробників автоматичних систем реєстрації росту мікобактерій, які працюють на рідких середовищах Middlebrook, час видачі негативного результату, становить 42 доби.

Для підвищення ефективності діагностики туберкульозу перспективним є поєднання молекулярно-генетичної діагностики із наступним культуральним дослідженням в рідких середовищах [6, 73, 82, 96, 97, 114, 189, 204, 209]. Впровадження в практику роботи лабораторій схем гено- і фенотипічної діагностики туберкульозу сприяє максимальному скороченню термінів індикації та ідентифікації мікобактерій. Комбіноване використання цих методів дозволяє отримати більш повну інформацію щодо збудника туберкульозу та здійснити його виділення із організму людини у випадках захворювання на

олігобацилярний туберкульоз [6, 11, 82, 92, 189, 256]. До того ж, одночасне використання бактеріоскопічного, культурального і молекулярно-генетичного методів дослідження сприяє швидкій постановці діагнозу.

Використання сучасних фенотипічних і молекулярно-генетичних методів у вивченні біології мікобактерій, застосування в практиці охорони здоров'я молекулярно-генетичних методів у сполученні з рутинними і найновішими фенотипічними методами, дозволить покращити діагностику збудника в бактеріологічних лабораторіях ПТЗ України.

У зв'язку з вищевикладеним, метою наших досліджень було підвищення ефективності діагностики туберкульозу, стандартизація виділення мікобактерій і визначення їх медикаментозної стійкості у хворих на туберкульоз легень в рідкому живильному середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 та обґрунтування комбінованого використання її з новими молекулярно-генетичними системами для швидкої діагностики туберкульозної інфекції.

Поставлена мета передбачала вирішення наступних завдань:

1. Провести порівняльні дослідження щодо виділення мікобактерій традиційним способом та з використанням рідкого живильного середовища і модифікованого щільного живильного середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960.

2. Обґрунтувати застосування системи ВАСТЕС MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень в залежності від клінічної категорії туберкульозного процесу.

3. Дослідити критерії резистентності *M. tuberculosis* до препаратів 2-го і резервного ряду в рідкому живильному середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 і розробити стандартні операційні процедури для визначення медикаментозної стійкості до цих препаратів в системі ВАСТЕС MGIT 960.

4. Обґрунтувати оптимальну схему комплексного використання рідкого живильного середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960 і молекулярно-генетичних систем GeneXpert і GenoType для швидкої діагностики

туберкульозної інфекції та створити діагностичний алгоритм їх комплексного використання при виявленні мікобактерій туберкульозу.

На початку наших досліджень були проведені порівняльні дослідження щодо виділення мікобактерій традиційним способом та з використанням рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі BACTEC MGIT 960 і модифікованого щільного живильного середовища Левенштейна-Єнсена та обґрунтовано застосування системи BACTEC MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень в залежності від клінічної категорії туберкульозного процесу.

У процесі проведення експериментальних досліджень з підвищення ефективності виділення збудника з клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень в системі BACTEC MGIT 960 було вивчено 281 культуру, що були «позитивними» в автоматизованій системі. В цих випадках було виявлено «позитивний» результат за інтенсивністю світіння при опроміненні ультрафіолетовим світлом в системі BACTEC MGIT 960. Відомо, що інтенсивність світіння прямо пропорційна рівню витрати кисню і реєструється в одиницях росту, які не являються колонієутворюючими одиницями мікобактерій, а лише свідчать про інтенсивність поглинання кисню. Наявність корд-фактору є безперечним доказом наявності мікобактерій у пробірці MGIT, а відсутність росту на кров'яному агарі свідчить про те, що в «позитивній» пробірці на рідкому середовищі відсутні супутні мікроорганізми.

У 85,1 % випадків було констатовано присутність життєздатних мікобактерій, які росли в середовищі і виявлялися за допомогою флуоресценції. Ще у 14,9 % випадків в системі BACTEC MGIT 960 були виявлені «позитивні» пробірки. В той же час додаткові дослідження показали відсутність корд-фактору, а також відсутність росту на кров'яному агарі. Таким чином, проведений аналіз дослідження показав, що в даних пробірках MGIT з рідким середовищем немає супутньої мікрофлори, але ці культури поки не можуть вважатися «позитивними».

Ми припустили, що ці пробірки MGIT можуть містити мікобактерії, але в дуже малих кількостях, але з підвищеним обміном речовин, що і було зареєстровано системою ВАСТЕС MGIT 960 в одиницях росту. Також можна припустити, що пробірка MGIT може містити мікст-культури мікобактерій. У випадках, коли у пробі в наявності більше одного виду мікобактерій з різною швидкістю росту, швидкозростаючі мікобактерії можуть викликати позитивну флуоресценцію раніше ніж мікобактерії з повільним ростом.

Враховуючи той факт, що «позитивну» пробірку MGIT неможливо повторно завантажити в систему ВАСТЕС MGIT 960, для продовження досліджень всі пробірки з «позитивними» результатами на рідкому середовищі після культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960, але які не містили корд-фактору і були негативними за результатами посіву на кров'яний агар, ми розташовували в термостаті й інкубували 3 доби при 37 °С, тобто підрощували культури. Оскільки було припущення, що якщо проби містять мікобактерії, інкубація в термостаті приведе до їх розмноження та в подальшому – до появи корд-фактору при дослідженні методом світлової мікроскопії.

За чотири доби в 45,2 % (42 пробірки MGIT) випадків спостерігалася поява корд-фактору при інкубації «позитивних» пробірок MGIT в термостаті при 37 °С. При цьому саме на 4-ту добу більшість «позитивних» культур набувала корд-фактор – 21,4 %. Нас не цікавила поява корд-фактору з 5-ої доби інкубації, тому що за стандартною методикою, «позитивна» пробірка, яка була вилучена з системи ВАСТЕС MGIT 960 понад 5-ти діб, стає непридатною для проведення ТМЧ в системі ВАСТЕС MGIT 960, в таких випадках її необхідно субкультивувати, тобто провести повторне культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960. Отже втрачається сенс власне самого методу інкубації в системі як експрес-методу.

Після інкубації протягом 4 діб залишилось 54,8 % проб (23 культури), які були визначені системою ВАСТЕС MGIT 960 як «позитивні», але, які не мали корд-фактору. Ці пробірки в подальшому використовували для субкультивування на середовищі Левенштейна-Єнсена, переглядали ці посіви

протягом 10 тижнів і лише після цього, у випадку відсутності росту, видавали негативну відповідь в клініку.

Як відзначалося вище, посилення флуоресценції спостерігається лише при рості мікроорганізмів, а інтенсивність світіння прямо пропорційна рівню витрати кисню та реєструється в одиницях росту, але в момент «позитивної» відповіді системи не завжди кількість одиниць росту є достатньою для реєстрації, відповідає рівню 105 – 106 КУО на 1,0 мл середовища, що є необхідним для «позитивної» відповіді при мікроскопії (наявність корд-фактору). Таким чином, на нашу думку, доцільно використовувати середовище Левенштейна-Єнсена зі зниженою концентрацією бактерицидного барвника малахітового зеленого і спробувати виділити ці мікобактерії. У цьому напрямку нами було проведене окреме дослідження.

Ми запропонувати таке щільне середовище, яке могло використовуватися для отримання росту культур мікобактерій при субкультивуванні «позитивних» пробірок MGIT після системи BACTEC MGIT 960, які не містять корд-фактору і являються негативними за результатами посіву на кров'яний агар. Наші дослідження показали, що 0,25 % малахітового зеленого в 20,0 мл дистильованої стерильної води є найменшою концентрацією даного реагенту в середовищі Левенштейна-Єнсена, за якої зберігається його інгібуюча дія щодо росту неспецифічної мікрофлори при субкультивуванні проб з «позитивним» результатом на рідкому середовищі після культивування в системі BACTEC MGIT 960, але які не містять корд-фактор і є негативними за результатами посіву на кров'яний агар. Також отримані дані довели, що доцільним є додавання в середовище Левенштейна-Єнсена L-аспарагінової кислоти в концентрації 3,6 г для подальшого субкультивування «позитивних» проб MGIT після системи BACTEC MGIT 960.

Метод культуральної діагностики туберкульозу за допомогою системи BACTEC MGIT 960 включає паралельний посів зразків дослідного матеріалу як на рідке середовище Middlebrook 7H9, так і на щільне середовище. Нами було проведено 698 досліджень зразків дослідного матеріалу в рідкому середовищі

Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 та паралельно на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена.

Із 698 зразків мокротиння 547 проб (78,4 %) були позитивними на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена. Серед зразків, що були негативними за результатами посіву на щільне середовище Левенштейна-Єнсена, методом культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960 в рідкому середовищі Middlebrook 7H9 було виявлено 96 позитивних проб (13,7 %).

Серед проб мокротиння, що були негативними за результатом культивування в системі в рідкому середовищі, не було виявлено культур мікобактерій на щільному середовищі. Таким чином, за допомогою цих двох методів культуральної діагностики на різних середовищах бактеріовиділення було підтверджено в 92,1 % випадків. Всі ці культури були позитивними за методом культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960, позитивних культур за методом посіву на середовище Левенштейна-Єнсена було виявлено 78,4 %. Метод виділення культур в системі з використанням рідкого середовища майже в 1,2 рази достовірно перевищує діагностичну ефективність методу посіву на щільному середовищі ($p < 0,001$).

При проведенні порівняльного аналізу методів культивування зразків мокротиння в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 та щільному середовищі Левенштейна-Єнсена нас цікавили строки виділення культур мікобактерій. Нами були проведені подальші дослідження щодо вивчення цього питання.

Відомо, що метод бактеріоскопії є менш чутливим методом дослідження, ніж метод посіву. Тому, якщо методом світлової мікроскопії в пробах клінічного матеріалу знайдені КСБ, то посів цих зразків на будь-яке живильне середовище повинен бути стовідсотково позитивним. Якщо цього не відбувається, то це вказує на технічні недоліки в роботі лабораторії. Тому для проведення подальших культуральних досліджень з використанням рідких і щільних середовищ ми відібрали зразки мокротиння, в яких за методом світлової мікроскопії були виявлені КСБ. Усі ці зразки перед посівом на рідкі та

щільні живильні середовища були оброблені відповідно до стандартної методики та посіяні на живильні середовища. Посіви інкубували при 37 °С. Появу позитивних результатів реєстрували та аналізували.

Середня тривалість росту культур в рідкому середовищі Middlebrook 7H9 склала 11,5 діб, середня тривалість росту культур мікобактерій на щільному середовищі склала 33,2 дні. Отримані результати свідчать про те, що терміни виділення збудника туберкульозу за допомогою рідкого середовища при культивуванні зразків в системі BACTEC MGIT 960 скорочуються на 20,1 діб, або в 3,1 рази в порівнянні з культивуванням збудника туберкульозу на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена з високим ступенем достовірності ($p < 0,001$).

Як було зазначено вище, методика виділення мікобактерій в системі BACTEC MGIT 960, крім посіву оброблених зразків клінічного матеріалу на рідке середовище, включає також субкультивування позитивних проб MGIT на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена після вирощування їх в системі BACTEC MGIT 960. Нами була запропонована модифікація щільного середовища, яке містить 0,25 % малахітовий зелений та з 3,6 г L-аспарагінової кислоти. Середня тривалість субкультивування культур на класичному середовищі Левенштейна-Єнсена в середньому складає 13,4 доби, середня тривалість субкультивування позитивних культур після апарату BACTEC MGIT 960 на модифікованому щільному середовищі складає 7,4 доби. Отримані результати свідчать про те, що терміни субкультивування за допомогою модифікованого середовища на 6 днів, або в 1,8 разів менше, ніж на класичному середовищі Левенштейна-Єнсена з високим ступенем достовірності ($p < 0,001$).

Проведені нами дослідження дозволили провести порівняльний аналіз щодо виділення мікобактерій з використанням двох різних комплексних методичних підходів:

– застосування рідкого середовища в системі BACTEC MGIT 960 і субкультивуванні позитивних проб MGIT на класичному середовищі Левенштейна-Єнсена;

– застосування рідкого середовища в системі BACTEC MGIT 960 і субкультивуванні позитивних проб MGIT на модифікованому середовищі Левенштейна-Єнсена.

Середня тривалість виділення мікобактерій із застосуванням рідкого середовища Middlebrook 7H9 та модифікованого середовища Левенштейна-Єнсена для субкультивування складає 18,9 днів, що на 6 днів, або в 1,3 рази менше тривалості виділення мікобактерій з застосуванням рідкого середовища Middlebrook 7H9 та класичного середовища Левенштейна-Єнсена для субкультивування з високим ступенем достовірності ($p < 0,001$).

Нами були проведені дослідження щодо експериментально-клінічного обґрунтування застосування системи BACTEC MGIT 960 для бактеріологічних досліджень зразків клінічного матеріалу пацієнтів із встановленим клінічним діагнозом та з різними клінічними категоріями туберкульозного процесу.

Для всіх клінічних категорій прослідковується однакова закономірність – культивування зразків клінічного матеріалу лише в рідкому середовищі в системі BACTEC MGIT 960 додатково виявляє у середньому 18,2 % бактеріовиділювачів у порівнянні з методом бактеріологічної діагностики з використанням щільного середовища Левенштейна-Єнсена ($p < 0,001$). При цьому важливо відмітити, що всі бактеріовиділювачі, які були виявлені в кожній клінічній категорії були в 100 % підтверджені методом посіву в рідке середовище в системі BACTEC MGIT 960.

Важливо відмітити, що найбільший відсоток додаткових позитивних результатів культуральних досліджень, який отриманий лише за рахунок використання рідкого середовища, був зафіксований при посіві зразків клінічного матеріалу хворих I-ої клінічної категорії. При цьому було виявлено додатково 22,5 % бактеріовиділювачів.

Проведені дослідження дозволили встановити також відсоток позитивних результатів культурального дослідження в системі ВАСТЕС MGIT 960 при посіві зразків мокротиння від хворих на туберкульоз II-ої категорії. Так, лише за допомогою даної методики додатково було діагностовано 20,4 % бактеріовиділювачів.

Аналіз результатів показав, що найменш інформативними, щодо використання лише рідкого середовища для виявлення бактеріовиділювачів, були показники бактеріологічної діагностики клінічних зразків від хворих IV-ої клінічної категорії. В цих випадках було виявлено тільки 2,1 % бактеріовиділювачів додатково до результатів культуральних досліджень з використанням традиційного щільного середовища Левенштейна-Єнсена.

В подальших дослідженнях нас цікавило виявлення відсотка бактеріовиділювачів в різних групах діагнозу за допомогою культуральних методів дослідження в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 та на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена. В ході досліджень нами було проаналізовано дані про виявлення бактеріовиділювачів із 695 хворих із різними випадками туберкульозу.

Із 695 хворих із різними випадками туберкульозу бактеріовиділювачами були 632 хворих – 90,8 %. Усі ці випадки були підтверджені методом посіву в рідке живильне середовище в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Проведені дослідження свідчать, що метод культивування зразків клінічного матеріалу в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 є більш ефективним при проведенні бактеріологічної діагностики випадків туберкульозу, ніж метод культивування з використанням традиційного щільного середовища Левенштейна-Єнсена. Так, з 632 випадків туберкульозу з бактеріовиділенням лише 500 (71,9 %) були виявлені за двома методами культуральної діагностики, при цьому 132 (18,9 %) випадків додатково були діагностовано лише за допомогою рідкого середовища.

Встановлено, що метод культуральної діагностики в системі ВАСТЕС MGIT 960 є інформативнішим для визначення бактеріовиділювачів з діагнозом

ВДТБ. Так, з цим діагнозом нами було виявлено 22,1 % бактеріовиділювачів лише за допомогою рідкого живильного середовища.

За допомогою лише рідкого середовища було виявлено 19,4 % бактеріовиділювачів з рецидивами туберкульозу.

Найбільш ефективним є використання рідкого середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960 для виявлення бактеріовиділювачів з ризиком розвитку мультирезистентного туберкульозу (МРТБ). Але в даному випадку потрібно розділяти хворих, у яких під час лікування може розвинується мультирезистентність і пацієнтів, які є контактними особами з хворими, у яких встановлений діагноз МРТБ.

Нами були проведені дослідження клінічного матеріалу лише від контактних осіб. Бактеріовиділення було виявлено в 17 випадках МРТБ, в тому числі – за допомогою лише рідкого середовища було діагностовано 28,8 % бактеріовиділювачів.

Найменш ефективним є використання методу культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960 клінічних зразків від хворих з встановленим діагнозом МРТБ додатково було виявлено лише 1,2 %. При цьому за допомогою обох методів культуральної діагностики, що використовувалися нами одночасно, було визначено 88,9 % бактеріовиділювачів з МРТБ.

Проведені дослідження довели, що недоцільним є використання рідкого середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960 для виявлення бактеріовиділювачів з діагнозом хронічного туберкульозу (ХТБ), оскільки всі випадки були підтвержені при культивуванні зразків клінічного матеріалу методом посіву на щільне середовище Левенштейна-Єнсена.

При використанні рідкого середовища Middledrook 7H9 інтерес представляла можливість його застосування для встановлення бактеріовиділення при обстеженні клінічного матеріалу дітей. Оскільки діти є контингентом, у яких дуже рідко виділяють мікобактерії, нами сумісно з відділенням фтизіопедіатрії було налагоджено збір діагностичного матеріалу, який, на думку клініцистів, мав би важливе діагностичне значення. Змиви з

роголотки дітей досліджували тричі методом посіву на рідке та щільне середовища. Метод культивування зразків клінічного матеріалу в рідкому середовищі виявив 13,6 % бактеріовиділювачів, що майже у 2,7 разів більше, ніж діагностика бактеріовиділення у дітей на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена, яка складає 5,5 % ($p < 0,001$). Тобто, використання системи ВАСТЕС MGIT 960 для виявлення бактеріовиділення у дітей є дуже доцільним та перспективним.

Система ВАСТЕС MGIT 960 призначена для прискореної бактеріологічної діагностики туберкульозу і визначення МС мікобактерій до препаратів 1-го ряду, але не виключає можливості визначення чутливості мікобактерій і до медикаментозних препаратів 2-го і резервного ряду [63].

Збільшення частоти випадків МРТБ в світі призвело до широкого використання препаратів 2-го і резервного ряду для лікування таких форм захворювання. Оскільки препарати 2-го і резервного ряду є високовартісними, їх призначення в кожному випадку потребує клінічного і бактеріологічного обґрунтування. Тому, на сучасному етапі наявність стандартизованих методик визначення МС до препаратів 2-го і резервного ряду є вкрай необхідним. Наші дослідження були спрямовані на пошук шляхів, які могли б забезпечити швидке отримання надійних і точних результатів ТМЧ до препаратів 2-го і резервного ряду.

В результаті впровадження в практичну діяльність бактеріологічних лабораторій 3-го рівня ПТЗ України рідкого середовища Middlebrook 7H9 з використанням системи ВАСТЕС MGIT 960, скоротилися терміни визначення МС до препаратів 1-го ряду. Нами було зроблено припущення, що потрібні результати можливо одержати також при вивченні МС мікобактерій до препаратів 2-го ряду: Et, Cm, Pt, Ofx, Mfx, Lfx, Am і резервного ряду Lzd в середовищі Middlebrook 7H9 з використанням системи ВАСТЕС MGIT 960.

Основою досліджень було визначення критерію МС, а саме – «критичної» концентрації препаратів. «Критична» концентрація – один з критеріїв резистентності. Це строго визначена кількість кожного

медикаментозного препарату, яку повинно містити середовище для постановки ТМЧ. В якості контролю в роботі була використана контрольна міжнародна панель, що була надіслана в лабораторію мікробіології з Супранациональної лабораторії ВООЗ (м. Рига, Латвія) та включала 40 штамів *M. tuberculosis* з відомими результатами МС до препаратів 2-го і резервного ряду, які були визначені на щільному живильному середовищі Левенштейна-Єнсена методом пропорцій (20 штамів *M. tuberculosis* з чутливістю і 20 штамів *M. tuberculosis* з МС до препаратів 2-го і резервного ряду) [192, 194].

Використання методу пропорції на щільному середовищі при визначенні МС штамів *M. tuberculosis* до препаратів 2-го і резервного ряду було обумовлено тим, що основою визначення МС на рідких середовищах в системі ВАСТЕС MGIT 960 також є метод пропорцій. Принцип методу пропорцій полягає у визначенні співвідношення (пропорції) між чутливими і стійкими до препаратів в “критичних” концентраціях особинами в популяції штаму *M. tuberculosis*, який виділено від хворого на туберкульоз. Таким чином, наша задача полягала в тому, щоб за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960 знайти такі «критичні» концентрації препаратів 2-го і резервного ряду в рідких середовищах, які після інокуляції контрольними штамми *M. tuberculosis* підтвердили б еквівалентність результатів МС *M. tuberculosis*, що були отримані на щільному та рідкому середовищі.

При приготуванні наважки препаратів 2-го ряду і резервного ряду нами була врахована потенція кожного з препаратів та зроблено відповідне перерахування на вміст активної речовини кожної чистої субстанції препарату. Для розчинення чистих субстанцій Am, Cm та Lzd використовувалась стерильна дистильована вода, чисті субстанції Et і Pt розчиняли в димексидсульфоксиді (DMSO), чисті субстанції Ofx, Mfx і Lfx розчиняли в 0,1 N NaOH. Всі розчини розливали в пробірки типу Eppendorf по 0,5 мл та зберігали при температурі (-70°C).

Дослідження були проведені в два етапи. На 1-му етапі була відпрацьована методика базового тесту та був визначений діапазон

антибактеріальних тестових концентрацій для препаратів 2-го і резервного ряду. Нами було досліджено по декілька концентрацій кожного з препаратів. Було враховано «критичні» концентрації препаратів 2-го і резервного ряду, які використовуються для тестування на щільних середовищах, оскільки вони залежать від МІК кожного з препаратів.

Підготування культур *M. tuberculosis*, що вирости на щільному живильному середовищі та інокуляцію рідкого середовища здійснювали у відповідності до стандартного протоколу визначення МС в системі ВАСТЕС MGIT 960 до препаратів 1-го ряду. Пробірки з препаратами 2-го і резервного ряду разом з контролями розміщували в так звані “транспортувальні” контейнери зі штрих-кодом та вставляли в гнізда системи ВАСТЕС MGIT 960 як “невідомі ліки” з урахуванням особливостей внесення даних для визначення МС. При цьому для тестування кожного з препаратів, незалежно від кількості пробірок з різними його концентраціями, використовувався окремий “транспортувальний” контейнер з особистим штрих-кодом.

При інкубації посівів система ВАСТЕС MGIT 960 сигналізувала про “повну” ємність коли показник росту в контролі досягав 400 одиниць росту (GU). У цій точці показників GU, за якими здійснюється оцінка росту мікобактерій в пробірках з різним вмістом препаратів 2-го і резервного ряду, система проводила вибірку результатів, дані роздруковували та інтерпретували. Якщо показник GU в пробірках з препаратами був вищим ніж 100 одиниць при інтенсивності росту в контролі 400, штами визначались резистентними даних концентрацій препаратів, якщо показник GU в пробірках з препаратами був нижчим ніж 100 одиниць при інтенсивності росту в контролі 400, штами визначались чутливими до даних концентрацій препаратів.

При коректному виконанні тесту інтенсивність росту в контролі повинна завжди бути постійною величиною – 400 одиниць GU. Вивчення низки концентрацій кожного з препаратів в рідкому живильному середовищі повинно було привести до того, щоб експериментальним шляхом знайти таку концентрацію для кожного із вищезазначених препаратів, при якій будуть

росту стійкі штами МБТ контрольної панелі з інтенсивністю росту 100 одиниць та не будуть давати росту штами МБТ контрольної панелі, які є чутливими. Ця концентрація буде вважатися “критичною” при дослідженні в рідкому середовищі.

Результати тестування на МС штамів МБТ контрольної панелі в системі ВАСТЕС MGIT 960 на рідкому середовищі були проаналізовані для кожної концентрації препаратів 2-го і резервного ряду.

Проведені дослідження, дали можливість визначити “критичні” концентрації препаратів 2-го ряду – Et (5,0 мкг/мл), Cm (2,5 мкг/мл), Pt (2,5 мкг/мл), Am (1,0 мкг/мл), Ofx (2,0 мкг/мл), Mfx (0,5 мкг/мл), Lfx (2,0 мкг/мл) і резервного препарату – Lzd (1,0 мкг/мл) при використанні їх для ТМЧ в рідкому середовищі із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960.

Отримані дані є дуже важливими, тому що вперше в Україні дозволили розробити стандартну методику визначення МС *M. tuberculosis* з використанням рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 до препаратів 2-го ряду і резервного препарату – Lzd із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960, яка вже впроваджена в роботу бактеріологічних лабораторій 3 рівня ПТЗ України. Відомо, що МС збудника є важливою причиною невдач лікування хворого на туберкульоз. Тактика лікування, заснована на не достовірних результатах ТМЧ, може суттєво зашкодити хворому.

Використання в практиці роботи мережі бактеріологічних лабораторій ПТЗ України сучасних генотипічних і фенотипічних методів діагностики туберкульозу необхідно для того, щоб максимально скоротити терміни індикації і ідентифікації мікобактерій та визначення їх МС до ПТП. Дуже важливим завданням є розробка стандартизованих алгоритмів їх комбінованого застосування.

У дослідженнях ми використали 2 молекулярно-генетичні системи GeneXpert і GenoType.

Для проведення досліджень в системі GeneXpert були відібрані 1614 зразків мокротиння від хворих на туберкульоз, з них 846 (52,4 ± 1,2) % зразків

мали КСБ з різним ступенем градації позитивного результату мазку, а 768 (47,6 \pm 1,2) % зразків були негативними за методом прямої мікроскопії за Циль-Нільсеном на наявність КСБ. Досліджувалися всі зразки мокротиння незалежно від результатів бактеріоскопії, але, результативність роботи системи GeneXpert була оцінена окремо для проб мокротиння, що були позитивними та негативними за мазком.

В ході дослідження в системі GeneXpert із 1614 зразків мокротиння 978 зразків містили *M. tuberculosis-complex*, що склало 60,6 %. При цьому 618 проб з КСБ(+) та 360 проб мокротиння з КСБ(-) при дослідженні в системі GeneXpert були позитивними, тобто містили ДНК *M. tuberculosis-complex*, показник «позитивності» результату склав 73,0 % та 46,9 % відповідно. При використанні системи GeneXpert кількість позитивних результатів, що були отримані з проб мокротиння з КСБ(+) в 1,56 разів перевищують аналогічний показник дослідження проб мокротиння, що були негативними за мазком ($p < 0,01$).

Аналіз отриманих даних показав, що діагностична ефективність системи GeneXpert при дослідженні зразків мокротиння залежить, в першу чергу, від в'язкості мокротиння, а вона може бути достатньо високою. Нами були зроблені припущення, що при дослідженні зразків мокротиння після проведення передпосівної обробки, коли здійснюється гомогенізація мокротиння, показник «позитивності» результатів досліджень може зрости. Тому на наступному етапі в системі GeneXpert були досліджені на наявність ДНК *M. tuberculosis-complex* зразки концентрованого мокротиння з КСБ(+) та КСБ(-) після проведення передпосівної обробки.

Після проведення передпосівної обробки зразків мокротиння з КСБ(+) та КСБ(-) результативність досліджень на туберкульоз, що були виявлені в системі GeneXpert, збільшилась майже в 1,23 рази. Для позитивних на КСБ зразків мокротиння відсоток молекулярно-генетичного підтвердження позитивних результатів на туберкульоз складав 88,7 %, для негативних за мазком зразків мокротиння цей показник складав 59,4 % ($p < 0,01$).

Таким чином, показана доцільність використання концентрованих

зразків мокротиння при проведенні дослідження на туберкульоз в системі GeneXpert. Також, показана діагностична цінність дослідження негативних за результатами бактеріоскопії зразків мокротиння в системі GeneXpert.

Результати досліджень показали, що лише 88,7 % позитивних за мазком проб мокротиння підтвердили наявність ДНК *M. tuberculosis-complex* за допомогою системи GeneXpert. Слід відмітити, що при індикації дана система реєструє позитивний результат лише в випадку наявності у пробі *M. tuberculosis-complex*. Якщо в пробі містяться мікобактерії нетуберкульозного комплексу, дана система не видає «позитивний» сигнал. Негативний результат даного тесту при позитивній бактеріоскопії, особливо, коли в пробі спостерігаються поодинокі КСБ, також може бути пов'язаний з тим, що кількість бактерій в таких зразках є нижчою за межу виявлення (динамічний діапазон) щодо молекулярно-генетичного тесту.

Нами були проведені порівняльні дослідження щодо діагностичної ефективності молекулярно-генетичного методу з використанням системи GeneXpert та методу посіву раніше відібраних позитивних та негативних за результатами бактеріоскопії зразків концентрованого мокротиння в системі ВАСТЕС MGIT 960. Для отримання достовірних результатів порівняльні дослідження для позитивних та негативних за мазком зразків мокротиння були проведені окремо.

Із 846 зразків мокротиння, що були позитивним на туберкульоз за результатами бактеріоскопічного та культурального досліджень, система GeneXpert виявила 732 ($86,6 \pm 1,2$) % позитивні проби. В той же час у 18 випадках ($2,1 \pm 0,5$) % молекулярно-генетичним методом були виявлені ДНК *M. tuberculosis-complex* при негативних результатах посіву ($p < 0,01$). Детальний аналіз цих випадків показав, що в зазначених пробах мокротиння життєздатність мікобактерій була знижена, оскільки хворі, що їх виділяли були раніше лікованими, тому молекулярно-генетичний метод і бактеріоскопічні дослідження констатували наявність мікобактерій в пробах, а метод посіву виявився неінформативним.

В той же час, було відмічено, що метод посіву на $(11,3 \pm 1,1) \%$ ($p < 0,01$) [ВАСТЕС MGIT(+), GeneXpert(-) – 96 випадків] є більш інформативним, ніж молекулярно-генетичний метод в системі GeneXpert, оскільки дає можливість виділяти мікобактерії як туберкульозного, так і не туберкульозного комплексу, на відміну від зазначеного методу молекулярно-генетичної діагностики.

Рівень виявлення комплексу *M. tuberculosis* для зразків мокротиння з негативними результатами мікроскопії та бактеріологічним підтвердженням склав $456 (59,4 \pm 1,8) \%$ для системи GeneXpert. З $312 (40,6 \pm 1,7) \%$ зразків мокротиння, що дали негативний результат дослідження в системі GeneXpert, були отримані культури *M. tuberculosis-complex* методом посіву в рідкому середовищі. Тобто, культуральний метод дослідження мав більшу діагностичну цінність на $40,6 \%$, ніж метод діагностики в системі GeneXpert ($p < 0,01$).

Таким чином, при застосуванні системи GeneXpert і методу мікроскопії для досліджень на туберкульоз, необхідним є паралельне здійснення посіву дослідного матеріалу на рідке середовище для виявлення життєздатності мікобактерій. Недоцільним є використання системи GeneXpert для обстеження хворих в ході лікування для контролю хіміотерапії.

Важливо відмітити, що за технічними можливостями система GeneXpert може визначати тільки наявність або відсутність МС до R, що вважається так званим «маркером» мультирезистентності. Тому, важливим було провести порівняльний аналіз результатів стійкості до R за результатами досліджень в системі GeneXpert з результатами ТМЧ в рідкому живильному середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960, який дає можливість визначати монорезистентність до R та мультирезистентність (R + H) штамів *M. tuberculosis-complex*.

Нами були відібрані 1242 зразки концентрованого мокротиння від хворих на ВДТБ, які дали ріст культури мікобактерій в системі ВАСТЕС MGIT 960. В рідкому середовищі був здійснений ТМЧ до ПТП 1-го ряду, в тому числі до R і H.

Із 762 зразків мокротиння, що мали стійкість до R в системі GeneXpert,

714 ($93,7 \pm 0,9$) % виявилися мультирезистентними при визначенні стійкості в рідкому живильному середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960. При цьому рівень виділення монорезистентних до R штамів був 30 штамів МБТ ($3,9 \pm 0,7$) %. Також в ході дослідження нами були виявлені 18 ($2,4 \pm 0,5$) % штамів *M. tuberculosis-complex*, які за результатами досліджень в системі GeneXpert, були стійкими до R, але за результатами фенотипічного визначення стійкості були чутливими ($p < 0,01$). Це може бути пов'язаним з тим, що точкові мутації відбулися лише в 2-х ділянках гену *rpoB* з 5-ти, тому фенотипічна стійкість могла бути не визначена.

Проведені дослідження продемонстрували, що відсоток діагностованих випадків МР ТБ за допомогою системи GeneXpert і фенотипічного методу діагностики в системі ВАСТЕС MGIT 960 склав ($93,7 \pm 0,9$) % і тому дана молекулярно-генетична система може використовуватися для швидкої діагностики, насамперед, МР ТБ.

При роботі з системою 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 таких зразків клінічного матеріалу. Дана система дозволяє виділити ДНК мікобактерій і провести їх ідентифікацію. Для дослідження було відібрано 684 зразка мокротиння з позитивними результатами бактеріоскопії при забарвленні за методом Циля-Нільсена. 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 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 GenoType і культурального методу діагностики за допомогою системи BACTEC MGIT 960.

Нами було досліджено 846 зразків мокротиння з позитивними результатами бактеріоскопії. Всі зразки мокротиння, що давали ріст при дослідженні методом посіву в системі BACTEC 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 системи GenoType нами були проведені дослідження з ідентифікації 792 клінічних ізолятів мікобактерій, які були отримані в рідкому середовищі Middlebrook 7H9 в системі BACTEC 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 у 756 (95,5 %) випадках, у 36 (4,5 %) позитивних пробірках MGIT при мікроскопії були виявлені окремі КСБ, які не утворювали корд-фактору. Це дало нам підставу припустити, що дані культури мікобактерій не належать до комплексу *M. tuberculosis* і потребують подальшої ідентифікації.

Всі культури мікобактерій, що були отримані з позитивних пробірок MGIT досліджувалися за допомогою тесту ID MTB MGIT. Виявилось, що 756 (95,5 %) культур, які мали корд-фактор, були ідентифіковані, як *M. tuberculosis-complex*, а 36 (4,5 %) культур, що не утворювали корд-фактору, віднесені до мікобактерій нетуберкульозного комплексу.

На наступному етапі всі культури мікобактерій були досліджені за допомогою системи GenoType.

756 (95,5 %) штамів мікобактерій, які були виділені в системі ВАСТЕС MGIT 960, утворювали корд-фактор та були позитивними за результатами ідентифікаційного тесту ID MTB MGIT, при проведенні 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-фактору, тому їх можна було віднести до комплексу НТМБ [68, 69, 82, 101]. 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, а найбільш суттєвим чинником є отримання в короткий термін профілю МС виділених мікобактерій, нами були розпочаті дослідження щодо обґрунтування використання системи GenoType для швидкого визначення МС мікобактерій.

Наші дослідження були спрямовані на визначення МС *M. tuberculosis-complex* в системі GenoType та наборами реагентів GenoType MTBDRplus та GenoType MTBDRsl для визначення МС до H і R, Q, аміноглікозидів/циклічних пептидів та E 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 молекулярно-генетичного дослідження МС мікобактерій щодо профілю резистентності штамів МРТБ, тобто стійких до H і R одночасно співпали в 95,5 % (894 штами) з результатами фенотипічного тестування методом пропорцій в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Результати визначення монорезистентності до R, або в комбінації з іншими ПТП, крім H за допомогою двох методів не відрізнялись між собою и повністю співпадали.

За допомогою набору GenoType MTBDRplus нами було досліджено 348 штамів МБТ з резистентністю до H і співставлені з результатами ТМЧ у системі ВАСТЕС MGIT 960.

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

Нами були виконані дослідження щодо порівняльного вивчення показників резистентності до ПТП 2-го ряду, виявлених за допомогою молекулярно-генетичного і фенотипічного методів. Для цього було 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 E. Для визначення МС фенотипічним методом до Ofx, Am, Cm та E було застосовано рідке середовище в системі ВАСТЕС MGIT 960.

При наявності мутацій 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 МС 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 BACTEC 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 даних та проведеного аналізу встановлено загальні підходи до діагностики туберкульозу та хіміорезистентного туберкульозу з використанням сучасних гено-фенотипічних методів. Молекулярно-генетичні 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 середовищах, не використовуються для бактеріологічного моніторингу лікування хворих на туберкульоз (для цього застосовуються бактеріоскопія мазків мокротиння і культуральні дослідження на рідких та/або щільних середовищах).

На сьогоднішній день в Україні особливу актуальність набувають, окрім питань лабораторної діагностики туберкульозу, питання бактеріологічної діагностики випадків МРТБ, що проводиться в лабораторіях 3-го рівня, які функціонують в складі ПТЗ України.

Необхідними умовами для здійснення своєчасної, якісної та ефективної бактеріологічної діагностики випадків ТБ має бути чіткий алгоритм щодо відбору хворих для таких досліджень, наявність стандартних процедур і методик дослідження та забезпечення лабораторій необхідним лабораторним обладнанням відповідно до нормативних документів МОЗ України. Усі лабораторії 3-го рівня обласних ПТЗ України на сьогодні забезпечені всім необхідним сучасним обладнанням для здійснення гено-фенотипічної діагностики ТБ:

– генетичними системами GeneXpert – для попереднього та швидкого виявлення хворих з резистентністю до R (тобто, з високим ризиком МРТБ);

– системами ВАСТЕС MGIT 960 – для прискореного виділення МБТ та фенотипічного підтвердження діагнозу ТБ в рідкому середовищі, а також для прискореного визначення МС МБТ до решти препаратів 1-го і 2-го ряду;

– витратними матеріалами для проведення традиційних бактеріологічних досліджень з виділенням МБТ та постановкою ТМЧ до препаратів 1-го і 2-го ряду на щільному середовищі.

До того ж, для проведення діагностики випадків ТБ необхідними умовами, в першу чергу, є організація збору якісного інформативного матеріалу в достатній кількості, забезпечення відповідних умов зберігання та транспортування зразків до лабораторій 3-го рівня.

Зі спеціалізованих лабораторій ПТЗ України 2-го рівня до лабораторій 3-го рівня з метою швидкої попередньої (генотипічної) та прискореної підтверджуючої (мікробіологічної на рідких середовищах) діагностики ТБ доставляється по 1 зразку мокротиння від:

– усіх хворих I – III кат. з позитивним мазком мокротиння – перед початком лікування та у випадках продовження бактеріовиділення – після завершення пролонгованої на 1 місяць ІФ лікування;

– хворих тих самих категорій з негативним мазком, якщо ці хворі: діти-підлітки (вікова група до 17 років) з підозрою на ТБ; контактні особи з вогнищ МРТБ; ВІЛ-інфіковані; пацієнти, які лікувались раніше від туберкульозу, і яким повторно був встановлений діагноз легеневого туберкульозу (невдале лікування, рецидив, відрив), тобто пацієнти з рецидивом, після невдачі лікування чи відриву і в анамнезі хвороби яких немає даних про стійкість до R; пацієнти, які народжені в іноземній країні з високим рівнем захворюваності на ТБ.

У лабораторії 3-го рівня з одного зразка отриманого мокротиння після здійснення передпосівної обробки з утвореного осаду проводять комплекс наступних досліджень:

1. Фенотипічних – посів досліджуваного матеріалу в рідке середовище з подальшою інкубацією в системі ВАСТЕС MGIT 960, яке включає:

а) безпосередньо посів осаду матеріалу в 1 пробірку з рідким середовищем;

б) посів осаду матеріалу на 1 пробірку зі щільним середовищем;

в) бактеріоскопічне дослідження мазка мокротиння з осаду матеріалу.

2. Генетичних – дослідження осаду матеріалу в системі GeneXpert, яке складається із виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу та визначення стійкості до R.

В разі відсутності реагентів для системи BACTEC MGIT 960, бактеріологічна лабораторія 3 рівня замість посіву в рідке середовище здійснює посів матеріалу на 2 пробірки щільного середовища.

Проведення такого комплексу досліджень з *однієї проби матеріалу* є принциповим.

Нами розроблено алгоритм використання систем GeneXpert і GenoType у комплексі з сучасними бактеріологічними методами, які ми пропонуємо впроваджувати в практику роботи бактеріологічних лабораторій ПТЗ України. Це дозволить покращити якість і своєчасність діагностики туберкульозу.

У ході виконання наукової роботи нами були розпочаті дослідження щодо експериментально-клінічного обґрунтування застосування систем GeneXpert і GenoType для досліджень зразків клінічного матеріалу пацієнтів з підозрою на туберкульоз та з встановленим клінічним діагнозом та різними клінічними категоріями.

За допомогою двох молекулярних методів діагностики було підтверджено наявність ДНК *M. tuberculosis-complex* у 88,8 % хворих з ВДТБ I-ої і у 81,4 % хворих на РТБ II-ої категорій із позитивним мазком, при цьому в усіх випадках було також підтверджено життєздатність виділених мікобактерій за допомогою системи BACTEC MGIT 960. У хворих II-ої категорії за допомогою лише генетичних систем було додатково виявлено наявність ДНК *M. tuberculosis-complex* в 7,0 % випадках, однак при цьому не спостерігалось росту мікобактерій в рідкому середовищі. Важливо відмітити, що система GenoType дозволила виявити додатково 11,2 % та 11,6 % бактеріовиділювачів

серед хворих I-ої та II-ої категорії відповідно. Життєздатність цих мікобактерій була підтверджена в рідкому середовищі. Однак у зв'язку з тим, що система GeneXpert не виявила позитивного результату при проведенні досліджень цих зразків, можна зробити припущення, що виявлені мікобактерії не належать до туберкульозного комплексу.

Важливо відмітити, що найбільший відсоток позитивних результатів молекулярних досліджень був зафіксований при дослідженні зразків клінічного матеріалу хворих I-ої клінічної категорії. При цьому було виявлено 88,8 % бактеріовиділювачів.

За допомогою молекулярно-генетичного методу діагностики було підтверджено наявність ДНК *M. tuberculosis-complex* у 59,4 % хворих з ВДТБ I-ої, II-ої та III-ої категорії з негативним мазком, при цьому в усіх випадках було також підтверджено життєздатність виділених мікобактерій за допомогою системи BASTEC MGIT 960. Найбільша ефективність астосування молекулярно-генетичного методу виявлена серед хворих II-ої категорії – 80,0 %. Дуже важливим є факт підтвердження бактеріовиділення в 31,3 % випадків у хворих III-ої категорії, які мають завжди негативний результат бактеріоскопії і тому неможливим є швидке виявлення бактеріовиділювачів серед хворих даної клінічної категорії.

Важливо відмітити, що при дослідженні негативних за мазком зразків мокротиння від хворих II-ої та III-ої клінічних категорій молекулярні дослідження є дуже інформативними та в 4 рази виявляють більше бактеріовиділювачів, ніж метод посіву в рідке середовище. Для хворих III-ої клінічної категорії, навпаки, діагностична ефективність методу посіву за допомогою системи BASTEC MGIT 960 в 2 рази перевищує метод діагностики в системі GeneXpert. При обстеженні клінічного матеріалу від хворих I-ої категорії також було виявлено в 6,4 % випадків ріст культури в автоматизованій системі в рідкому середовищі при негативному результаті в молекулярно-генетичній системі. Оскільки в цих випадках при бактеріоскопії виділеної культури з позитивних пробірок MGIT не було виявлено утворення корд-

фактору, можна зробити припущення, що виявлені мікобактерії не належать до туберкульозного комплексу.

Таким чином, дослідження, що були нами розпочаті з метою експериментально-клінічного обґрунтування застосування систем GeneXpert і GenoType для досліджень зразків клінічного матеріалу пацієнтів з підозрою на туберкульоз та з встановленим клінічним діагнозом та різними клінічними категоріями, показали високу ефективність виявлення бактеріовиділювачів серед хворих як з позитивними, так і з негативними результатами мазку мокротиння на КСБ. На підставі отриманих даних обґрунтовано застосування систем GenoType і GeneXpert для досліджень клінічного матеріалу пацієнтів з підозрою на туберкульоз та хворих з встановленим клінічним діагнозом в залежності від клінічної категорії захворювання.

Опубліковано монографію: Стратегічні напрями розвитку лабораторної діагностики туберкульозу в Україні / Ю. І. Феценко, О. А. Журило, А. І. Барбова, О. Э. Хейло, О. Р. Сметаніна, М. М. Карнаухова, Н. А. Гріцова, Н. М. Алієва. – К. : «Здоров'я», 2017. – 120 с. [90].

ВИСНОВКИ

В роботі вирішено актуальне наукове завдання сучасної мікробіології – підвищено ефективність лабораторної діагностики туберкульозу, стандартизовано виділення мікобактерій з визначенням їх медикаментозної стійкості у хворих на туберкульоз легень в рідкому середовищі в системі BASTEC MGIT 960, обґрунтовано її використання в комбінації з новими молекулярно-генетичними системами для швидкої діагностики туберкульозної інфекції GeneXpert MTB/RIF і GenoType, розроблено алгоритм лабораторної діагностики і визначення чутливості до протитуберкульозних препаратів *M. tuberculosis*.

1. Використання модифікованого щільного середовища для субкультивування позитивних зразків після вирощування в системі BASTEC MGIT 960 дозволяє скоротити середню тривалість субкультивування позитивних культур у 1,8 рази, тобто на 7,4 доби; середню тривалість виділення мікобактерій в 1,3 рази. Діагностична ефективність виділення культур мікобактерій в системі BASTEC MGIT 960 склала 92,1 %, що достовірно перевищує діагностичну ефективність методу посіву на щільне середовище Левенштейна-Єнсена: середня тривалість росту культур в рідкому середовищі склала 11,5 діб, що в 3,1 рази менше за терміни культивування збудника туберкульозу на класичному щільному середовищі.

2. Культивування зразків клінічного матеріалу від хворих з різними клінічними категоріями захворювання на туберкульоз за допомогою системи BASTEC MGIT 960 дозволило виявити додатково в середньому 18,2 % бактеріовиділювачів у порівнянні з класичним культуральним методом діагностики. Використання рідкого середовища доцільно в першу чергу для пацієнтів I-ої клінічної категорії, у яких бактеріовиділення додатково виявлено в 22,5 % випадків. Використання рідкого середовища доцільно для визначення бактеріовиділювачів з діагнозом вперше діагностований туберкульоз легень, у

яких додатково виявляється в середньому 22,1 % випадків; для діагностики рецидивів туберкульозу, при цьому в середньому виявляється додатково 19,4 % бактеріовиділювачів та при обстеженні пацієнтів, що знаходилися в контакті з хворими на мультирезистентний туберкульоз, додатково виявляється 28,8 % бактеріовиділювачів. Доцільним є використання рідкого середовища для діагностики туберкульозу у дітей, тому що культивування в системі BASTEC MGIT 960 дає можливість виявити *M. tuberculosis* у 13,6 % дітей з клінічним діагнозом «туберкульоз», що майже у 2,7 разів більше, ніж діагностика бактеріовиділення у дітей на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена, яка була ефективною лише у 5,5 % випадків.

3. Визначення “критичних” концентрацій препаратів 2-го ряду – етіонаміду (5,0 мкг/мл), капрпеоміцину (2,5 мкг/мл), офлоксацину (2,0 мкг/мл), амікацину (1,0 мкг/мл), моксифлоксацину (0,5 мкг/мл), левофлоксацину (2,0 мкг/мл), піразинаміду (2,5 мкг/мл) і резервного ряду – лінезоліду (1,0 мкг/мл) при використанні їх для тесту медикаментозної чутливості в рідкому середовищі із застосуванням системи BASTEC MGIT 960 дозволило вперше в Україні розробити стандартну методику визначення медикаментозної стійкості *M. tuberculosis* в системі BASTEC MGIT 960 до препаратів 2-го ряду і резервного препарату – лінезоліду.

4. Застосування систем GeneXpert MTB/RIF, GenoType і BASTEC MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень за діагностичною цінністю переважає класичний бактеріологічний метод дослідження хворих на туберкульоз легень і пацієнтів з підозрою на туберкульоз. Ефективність комбінованого застосування систем GeneXpert MTB/RIF і BASTEC MGIT 960 при діагностиці випадків МРТБ складає 93,7 %, що дає підстави використовувати дані системи для швидкої діагностики, насамперед, випадків мультирезистентного туберкульозу. Обґрунтовано застосування молекулярно-генетичних систем GenoType і GeneXpert MTB/RIF для досліджень клінічного матеріалу пацієнтів з підозрою на туберкульоз та хворих з встановленим клінічним діагнозом залежно від клінічної категорії

захворювання на підставі того, що вони дозволяють додатково виявити 11,2 % та 11,6 % бактеріовиділювачів серед хворих I-ої та II-ої категорій відповідно.

5. Розроблено лабораторний діагностичний алгоритм комплексного використання при виявленні *M. tuberculosis* і визначенні їх медикаментозної стійкості сучасних гено-фенотипічних систем (GeneXpert MTB/RIF, GenoType і VASTEC MGIT 960), суть якого полягає в тому, що в лабораторіях 3-го рівня України, по-перше, в процесі індикації і ідентифікації *M. tuberculosis* комплекс досліджень з використанням гено-фенотипічних систем потрібно здійснювати з **однієї проби** отриманого мокротиння після передпосівної обробки з **утвореного осаду**; по-друге, обґрунтований і запропонований об'єм лабораторних досліджень необхідно проводити залежно від клінічної категорії процесу та випадку захворювання на туберкульоз легень.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Необхідним є впровадження запропонованих та стандартизованих нами мікробіологічних методик, оскільки вони дозволяють підвищити рівень виділення мікобактерій та визначення їх медикаментозної стійкості до протитуберкульозних препаратів. Застосування модифікованих методик дозволяє забезпечити стандартизацію постановки ТМЧ в рідкому середовищі із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960 в Україні.

2. Обґрунтованим є застосування молекулярно-генетичних методів діагностики туберкульозу в мережі лабораторій ПТЗ України. Доцільним є комплексне використання фено-генотипічних методів дослідження в лабораторіях 3 рівня, тобто на рівні обласних ПТЗ України.

3. Створений алгоритм використання систем GeneXpert і GenoType з сучасним бактеріологічним методом з використанням рідкого середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960, слід широко використовувати в практиці роботи бактеріологічних лабораторій ПТЗ України. Алгоритм гено-фенотипічної діагностики туберкульозу регламентований Наказом МОЗ України № 620 від 04.09.2014 р.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Автоматизированные методы культурального определения *Mycobacterium tuberculosis* на жидких средах / О. А. Иртуганова, Н. С. Смирнова, И. В. Сологодская [та ін.] // Проблемы туберкулеза. – 2001. – № 3. – С. 53 – 56.
2. Адамбекова А. Д. Анализ XPERT MTB/RIF на основе автоматизированной полимеразно-цепной реакции в лабораторной диагностике туберкулеза / А. Д. Адамбекова, А. Ш. Алишеров, Г. И. Калмамбетова // Вестник КГМА им. И. К. Ахунбаева. – 2013. – № 3. – С. 5–8.
3. Адамбекова А. Д. Тест Xpert MTB/RIF для диагностики туберкулеза и устойчивости к рифампицину – результаты внедрения в Кыргызской республике / А. Д. Адамбекова, Д. А. Адамбеков, В. И. Литвинов // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – Т. 91, № 1. – С. 34–36.
4. Александріна Т. А. Особливості епідемії туберкульозу в Україні / Т. А. Александріна // Голов. мед. сестра. – 2014. – № 3. – С. 43–45.
5. Алгоритм бактеріологічного обстеження на туберкульоз внутрішньо переміщених осіб з регіонів із високою захворюваністю туберкульозом та біженців з тимчасово окупованих територій України: інформаційний лист / А. І. Барбова, О.А. Журило, Н. М. Алієва; НІФП НАМН України. – К.: НІФП, 2015. – 4 с.
6. Алгоритм діагностики хіміорезистентного туберкульозу з комплексним використанням гено- та фенотипічних методів в бактеріологічних лабораторіях протитуберкульозних закладів України: методичні рекомендації / О. А. Журило, А.І. Барбова, С.О. Черенько; ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України». – К.: НІФП, 2013. – 24 с.
7. Бактериологическая диагностика туберкулёза / Н. В. Росликова, Г.Н. Гололобова, Л.И. Шишакова // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2011. – № 4. – С. 137.

8. Баранов А. А. Применение методов молекулярной биологии для исследования микобактерий туберкулеза / А. А. Баранов, А. О. Марьяндышев // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 4. – С. 3–7.

9. Барбова А. І. Використання нової молекулярно-генетичної системи GeneXpert і рідкого живильного середовища в системі ВАСТЕС MGIT для швидкої діагностики туберкульозу / А. І. Барбова, О. А. Журило, Н. М. Алієва // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. – 2015. – С. 423–430.

10. Барбова А. І. Застосування автоматизованої системи MGIT для діагностики туберкульозу легень і визначення медикаментозної стійкості мікобактерій: методичні рекомендації / А. І. Барбова, Г. А. Жемкова, О. А. Журило; Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України. – К: ІФП, 2007. – 24 с.

11. Бастиан И. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью / И. Бастиан, Ф. Порталс. – М.: Новости, 2003. – 368 с.

12. Бегимбетова В. Н. Особенности эпидемиологического процесса туберкулеза с лекарственной устойчивостью на территории г. Ельца в период 2004-2012 гг / В. Н. Бегимбетова // Современная наука: актуальные проблемы и пути их решения. – 2014. – № 7. – С. 81–87.

13. Березняков И. Г. Резистентность к антибиотикам: причины, механизмы, пути преодоления / И. Г. Березняков, В. В. Страшный // Клин. антибиотикотерапия. – 2001. – № 4. – С. 18–22.

14. Блум Б. Р. Туберкулёз: патогенез, защита, контроль / Б. Р. Блум, М. А. Карачунский. – М.: « Медицина», 2002. – 392 с.

15. Биологические свойства клинических изолятов *M. tuberculosis* / И. Г. Шемякин, Н. В. Степанишена, О. В. Коробова [та ін.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – № 1. – 2002. – С. 7–11.

16. Борисова Л. І. Аналіз епідеміологічної ситуації з туберкульозу в зонах радіоекологічного контролю Вінницької області в період 1986-2010 роки / Л. І. Борисова, С. В. Зайков // Інфекційні хвороби. – 2014. – № 1. – С. 66–68.

17. Боровицкий В. С. Туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью микобактерий и ВИЧ-инфекция // Пульмонология. – 2013. – Вып. 2. – С. 109–113.
18. Боротьба з туберкульозом в Україні: дайджест-огляд // Голов. мед. сестра. – 2014. – № 3. – С. 41–49.
19. Бочкарёв Е. Г. Генодиагностика во фтизиатрии / Е. Г. Бочкарёв, Т. С. Денисова, Э. В. Генерозов. – М., 2000. – 25 с.
20. Бутов Д. О. Асоціація між геном ґроВ *Mycobacterium tuberculosis* та поліморфізмом генів інтерлейкінів, С-реактивного білка у хворих на мультирезистентний туберкульоз легень / Д. О. Бутов // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція – 2016. – № 2. – С.44–49.
21. Варіанти моно- і полірезистентності МБТ до протитуберкульозних препаратів 1 ряду у хворих з новими і повторними випадками туберкульозу / А. І. Барбова, С.О. Черенько, Г.В. Старичек [та ін.] // Туберкульоз. Легеневі хвороби. ВІЛ-інфекція. – 2016. – № 1. – С. 23–36.
22. Варганян Ф. Е. Туберкулез: проблемы и научные исследования в странах мира / Ф. Е. Варганян, К. П. Шаховский // Проблемы туберкулеза. – 2002. – № 2. – С. 48–50.
23. ВООЗ. Глобальна доповідь щодо боротьби з туберкульозом. – Женева: Всесвітня організація охорони здоров'я, 2014. – 102 р.
24. ВООЗ. Глобальна доповідь щодо боротьби з туберкульозом. – Женева: ВООЗ, 2015. – 87 р.
25. Визначення критеріїв резистентності *M.tuberculosis* до препаратів 2-го і резервного ряду за допомогою рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 / А. І. Барбова , О.А. Журило, Н.М. Алієва [та ін.] // Укр. пульмонол. журнал. – 2017. – № 1. – С. 47–52.
26. Використання нової молекулярно-генетичної системи GenoType і рідкого живильного середовища для швидкої діагностики туберкульозу // А. І. Барбова, Л.В. Гайова, О.А. Журило [та ін.] // Scientific J. «ScienceRise». – 2015. – № 10/3 (15). – С. 29–37.
27. Выявление и диагностика туберкулеза на современном этапе / А. М. Червоная [и др.] // Голов. мед. сестра. – 2014. – № 1. – С. 8–11.

28. Выявление мутаций в геноме *Mycobacterium tuberculosis*, приводящих к устойчивости к фторхинолонам, методом гибридизации на биологических микрочипах / О. В. Антонова, Д. А. Грядунова, С. А. Лапа [и др.] // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. – 2008. – Т. 145, № 1. – С. 115–120.

29. Гайович А. І. Полірезистентність мікобактерій туберкульозу у хворих на туберкульоз легень та їх вплив на результати лікування / А. І. Гайович, В. М. Вайс // Тези доповідей III з'їзду фтизіатрів і пульмонологів України, 2003 р. // Укр. пульмонол. журн. – 2003. – № 3. – С. 141.

30. Генерозов Э. В. Молекулярная характеристика полирезистентных клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* из России / Э. В. Генерозов, Т. А. Акопян, В. М. Говорун // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2000. – № 1. – С. 7–11.

31. Геномний аналіз визначає мішені конвергентної позитивної селекції резистентної до протитуберкульозних препаратів мікобактерії туберкульозу / M. R. Farhat, V. J. Shapiro, K. J. Kieser [et al.] // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2015. – № 1. – С. 5–13.

32. Голева Н. Туберкульоз – соціальна проблема / Н. Голева // Практика упр. мед. закладом. – 2014. – № 1. – С. 22–35.

33. Гольшевская В. И. Организационно-методические подходы к совершенствованию микробиологической диагностики туберкулеза в России / В. И. Гольшевская, М. В. Шульгина, Л. П. Мартинова // Проблемы туберкулеза. – 2002. – № 12. – С. 3–7.

34. Гранкіна Н. В. Актуальні питання раннього виявлення соціально небезпечних захворювань у закладах первинної медико-санітарної допомоги Дніпропетровської області / Н. В. Гранкіна, Н. Є. Марченко // Україна. Здоров'я нації. – 2016. – № 1/2. – С. 233–234.

35. Гращенкова О. В. Частота и структура лекарственной устойчивости МБТ у заболевших, контактных и источников инфекции / О. В. Гращенкова, Б. И. Вишневский // Материалы конф., посвященной памяти М. М. Авербаха «Туберкулез сегодня: проблемы и перспективы»: тезисы докл. – М., 2000. – С. 194–195.

36. Дорожкова И. Р. Современные возможности повышения эффективности микробиологической диагностики туберкулеза / И. Р. Дорожкова // Материалы VI съезда фтизиатров Беларуси. – Минск, 1998. – С. 179–180.

37. Драбкина Р. Й. Микробиология туберкулёза / Драбкина Р. Й. – М.: Медгиз, 1963. – 255 с.

38. Експериментальні дослідження по підвищенню ефективності виділення мікобактерій з клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень з використанням рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 / А. І. Барбова, О.А. Журило, П.С. Трофімова [та ін.] // Укр. пульмонол. журнал. – 2015. – № 3. – С. 56–60.

39. Епідеміологічний нагляд за медикаментозною стійкістю збудника туберкульозу в Україні / А. І. Барбова, О. А. Журило, П. С. Трофімова // V міжнародний медичний конгрес «Впровадження сучасних досягнень у практику охорони здоров'я України»: тез. доп. – Київ, 2016. – С.10–11.

40. Ефективність комплексного застосування гено- та фенотипових методів бактеріологічної діагностики туберкульозу / О. А. Журило, А. І. Барбова, П. С. Трофімова [та ін.] // V міжнародний медичний конгрес «Впровадження сучасних досягнень у практику охорони здоров'я України»: Тез. доп. – Київ, 2016. – С.19.

41. Журило О. А. Визначення основних тестів ідентифікації мікобактерій / О. А. Журило, А. І. Барбова, С. В. Миронченко // Укр. пульмонол. журн. – 2009. – № 3. – С. 20–23.

42. Земскова З. С. Современная концепция патогенеза туберкулеза / З. С. Земскова, И. Р. Дорожкова, М. А. Карачунский // Материалы науч.-практ. конф. «Молекулярные основы патогенеза и диагностики туберкулёза и другой легочной патологии». – М., 1995. – С. 17–18.

43. Значение полимеразной цепной реакции и иммуноферментного анализа в диагностике мочеполового туберкулёза / К. Муқанбаев, М. А. Владимирская, Л. К. Шипина [и др.] // Материалы конф., посвященной памяти М. М. Авербаха «Туберкулез сегодня: проблемы и перспективы. – М.: МНПЦБТ, 2000. – С. 79–80.

44. Ільницький І. Г. Особливості епідеміології та перебігу туберкульозу в західному регіоні України / І. Г. Ільницький, О. П. Костик, М. І. Сокедлашвілі // Укр. пульмонол. журн. – 2005. – № 1. – С. 8–11.

45. Казенный Б. Я. Клиническое и эпидемиологическое значение первичной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза: автореф. дис. на соиск. науч. степень канд. мед. наук: 14.01.26 / Казенный Борис Яковлевич; Центральный НИИ туберкулеза РАМН. – М., 2004. – 20 с.

46. Капков Л. П. Организационные вопросы лабораторного выявления туберкулеза / Л. П. Капков, А. Л. Кучеров, В. А. Аникин // Проблемы туберкулеза. – 1995. – № 2. – С. 2–3.

47. Клиническая значимость молекулярно-биологических методов при туберкулёзе органов дыхания у детей / Ю. Э. Овчинникова, А. А. Страшинова, Н. В. Корнева [и др] // Туберкулез и болезни легких. – 2013. – № 10. – С. 31–35.

48. Клінко-бактеріологічна характеристика хворих на туберкульоз легень з хімірезистентними формами збудника / О. В. Павленко, І.О. Новожилова, Н. П. Шваєнко [та ін.] // Укр. пульмонол. журн. – 2002. – № 4. – С. 31–33.

49. Ковальчук А. Ю. Характеристика соціально-демографічної ситуації та соціально значущих захворювань в Україні // Укр. мед. часопис. – 2014. – № 1. – С. 29–33.

50. Корецкая Н. М. Биологические свойства возбудителя у больных туберкулезом легких при различных путях выявления заболевания / Н. М. Корецкая, А. Н. Наркевич // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. – 2014. – № 7. – С. 77–81.

51. Критерій резистентності мікобактерій туберкульозу до канаміцину в рідкому живильному середовищі Міддлбрук 7Н9 в системі ВАСТЕС 960: інформаційний лист / О. А. Журило, А.І. Барбова, П.С. Трофімова,; НІФП НАМН України. – К.: НІФП, 2015. – 4 с.

52. Кричевская Н. А. Роль молекулярно-генетических методов исследования лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза в лечении больных деструктивным специфическим процессом легких // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. – С. 290–291.

53. Кучер Т. С. Причини неефективності лікування вперше виявлених хворих на туберкульоз органів дихання / Т. С. Кучер, Н. О. Лаптева // Матеріали 2-го з'їзду фтизіатрів і пульмонологів України. – Київ, 1998. – С. 19–22.
54. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. А. Чубенко, П. Н. Бабич. – М.: [б. и.], 2001. – 320 с.
55. Ліпкан Г. М. Лабораторна діагностика туберкульозу та контроль за якістю бактеріоскопічних досліджень / Г. М. Ліпкан, Т. В. Іваненко, А. І. Барбова. – К.: Медицина, 2006. – 128 с.
56. Ляшенко А. А. Методи генотипирования во фтизиатрии / А. А. Ляшенко // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2015. – № 1 (20). – С. 98–103.
57. Мельник В. М. Проблеми стандартизації епідеміологічного контролю за резистентністю до антимікобактеріальних препаратів в Україні та шляхи їх вирішення / В. М. Мельник // Укр. хіміотерапевт. журн. – 1999. – № 3. – С. 8–11.
58. Мікробіологічні основи проведення моніторингу за медикаментозною стійкістю штамів *M. tuberculosis* в Україні: методичні рекомендації / Ю. І. Фещенко, В.М. Мельник, Л.І. Миколишин; Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України. – К.:, 2004. – 24 с.
59. Множественная лекарственная устойчивость микобактерий и ее влияние на эффективность лечения больных туберкулезом в пенитенциарных учреждениях Архангельской области / А. О. Марьяндышев, Н. И. Низовцева, П. Г. Гломозда. [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2005. – № 5. – С. 19–22.
60. Можливості генодіагностики при кістково-суглобовому туберкульозі / Г. Г. Голка, А. Г. Істомін, І. В. Гресько [та ін.] // Новости медицины и фармации. Травма. – 2014. – Т. 15, № 2. – С. 94–98.
61. Москаленко В. Ф. Досягнення та перспективи розвитку фтизіатрії / В. Ф. Москаленко, В. І. Петренко // Голов. мед. сестра. – 2014. – № 3. – С. 47–49.

62. Наказ МОЗ України від 04.09.2014 року № 620 «Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги «Туберкульоз». – К., 2014. – 181 с.

63. Нетуберкулезные микобактерии как возбудители заболеваний человека / Т. Ф. Оттен // Сб. науч. тр. – Санкт-Петербург, 2004. – С. 24–28.

64. Новые технологии определения лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* / О. И. Скотникова, В. М. Михайлович, Е. Ю. Носова [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2004. – № 6. – С. 37–40.

65. Определение лекарственной устойчивости и генотипирование клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* при помощи экспериментального набора "ТБ-ТЕСТ" / Ю. А. Беспярых, Е. А. Шитикова, Д. В. Зименков [и др.] // Пульмонология. – 2013. – № 4. – С. 77–81.

66. Определитель бактерий Берджи / Дж. Хоулт, Н. Криля, П. Синта, [и др.] – М.: Мир, 1997, 9-е изд. – 800 с.

67. Особливості сучасної ситуації з туберкульозу в Україні / Ю. І. Фещенко, В. М. Мельник, С. В. Зайков [та ін.] // Укр. пульмонол. журнал. – 2016. – № 1. – С. 5–9.

68. Оттен Т. Ф. Микобактериоз легких: клиничко-бактериологические критерии диагностики / Т. Ф. Оттен // БЦЖ о туберкулезе. – 1999. – № 3. – С. 16–19.

69. Оттен Т. Ф. Микобактериоз / Т. Ф. Оттен, А. В. Васильев. – Санкт-Петербург.: Мед. пресса, 2005. – 218 с.

70. Пат. 99799 Україна, МПК9 С 12 N 1/02, С 12 Q 1/02. Спосіб визначення чутливості *M.tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів в дослідному матеріалі хворих на туберкульоз легень / О. А. Журило, А.І. Барбова, П.С. Трофімова; заявник і патентовласник ДУ «Націонал. ін.-т фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМНУ». – № u 201414019; заявл. 29.12.14; опубл. 25.06.15, Бюл. № 12. – 1 с.

71. Перспективи подолання туберкульозу в Україні / Л. Д. Годоріко, В. І. Петренко, О. С. Шевченко // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2016. – № 1. – С. 72–78.

72. Петренко В. І. Сучасний погляд на проблему поєднаної потрійної інфекції: туберкульозу, ВІЛ/СНІДу, гепатитів В і С / В. І. Петренко // Голов. мед. сестра. – 2014. – № 3. – С. 46–47.

73. Попов С. А. Основные направления развития лабораторной диагностики туберкулеза / С. А. Попов, Т. П. Сабгайда // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 11. – С. 3–13.

74. Порівняльна характеристика якості життя та стану здоров'я хворих інфільтративним туберкульозом легень в динаміці на різних етапах медичної реабілітації / Ю. П. Цапенко, М.Г. Бойко, М.В. Куліш [та ін.] // Світ медицини та біології. – 2012. – № 3. – С. 112–115.

75. Потенциальные возможности лабораторной диагностики для повышения эффективности лечения больных туберкулезом с лекарственно устойчивым возбудителем / С. А. Попов, Т. П. Сабгайда, Г. Н. Можокіна // Рос. мед. журнал. – 2016. – Т. 22, № 1. – С. 42–47.

76. Радюк С. Н. Полимеразная цепная реакция в диагностике туберкулеза / С. Н. Радюк, К. А. Рыжов, Г. Р. Мацеевич // Журн. микробиологии. – 1998. – № 3. – С. 95–98.

77. Результаты применения метода GenoType MTBDRSL для определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулёза к этамбутолу, офлоксацину, канамицину и капреомицину в Архангельской области / П. И. Елисеев, И. В. Тарасова, Е. И. Никишова [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2013. – № 1. – С. 32–36.

78. Результаты применения методов GenoType MTBDRplus и BACTEC MGIT для определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза / П. И. Елисеев, Г. П. Горина, Е. И. Никишова [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 6. – С. 31–34.

79. Романенко В. Ф. Характеристика различных видов микобактерий туберкулеза, культивированных на не свойственном им хозяине / В. Ф. Романенко, А. М. Дяченко, В. С. Козлов // Проблемы туберкулеза. – 1997. – № 2. – С. 49 – 51.

80. Салина Т. Ю. Молекулярно-генетические особенности лекарственной устойчивости к рифампицину и распространенность мутаций в гене groV на

территории Саратовской области / Т. Ю. Салина, Т. И. Морозова // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – № 4. – С. 26–29.

81. Сибірна Р. І. Стійкість до протитуберкульозних препаратів штамів *M. tuberculosis*, виділених від хворих / Р. І. Сибірна, Г. В. Яворська // Мікробіологічний журн. – 2001. – Т. 63, № 4. – С. 91–95.

82. Стандарти бактеріологічної діагностики туберкульозу в лабораторіях протитуберкульозних закладів України / О. А. Журило, А. І. Барбова, Т. Г. Глушкевич. – Кіровоград: Поліум, 2012. – 190 с.

83. Степаншина В. Н. Детекция и характеристика мутаций в гене *gro В* резистентности к R клинических штаммов *M. tuberculosis* / В. Н. Степаншина // Проблемы туберкулеза. – 1999. – № 2. – С. 39–43.

84. Степаншина В. Н. Молекулярные механизмы устойчивости к R и H клинических штаммов *M. tuberculosis* / В. Н. Степаншина, И. Г. Шемякин // Проблемы туберкулеза. – 2000. – № 1. – С. 32–40.

85. Степаншин Ю. Г. Молекулярные механизмы устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к лекарственным препаратам / Ю. Г. Степаншин, В. Н. Степаншина, И. Г. Шемякин // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – № 4. – С. 39–42.

86. Стерликов С. А. Проблема борьбы с лекарственно устойчивым туберкулезом в Российской Федерации / С. А. Стреликов // Здоровье населения и среда обитания. – 2014. – № 6. – С. 21–23.

87. Стерликов С. А. Роль микробиологического обследования в программе борьбы с туберкулезом легких в России / С. А. Стерликов, С. А. Попов, Т. П. Сабгайда // Здоровоохранение Российской Федерации. – 2014. – № 2. – С. 30–34.

88. Скотникова О. И. *Mycobacterium tuberculosis*, её выявление и определение лекарственной резистентности / О. И. Скотникова, А. Ю. Соболев, Е. Ю. Носова // Материалы конф., посвященной памяти М. М. Авербаха «Туберкулёз сегодня»: проблемы и перспективы». – М., 2000. – С. 84–85.

89. Спосіб визначення чутливості *M.tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів в дослідному матеріалі хворих на туберкульоз легень:

інформаційний лист / О. А. Журило, А.І. Барбова, П.С. Трофимова; НІФП ДУ НАМН України. – К.: НІФП, 2015. – 4 с.

90. Стратегічні напрями розвитку лабораторної діагностики туберкульозу в Україні / Ю. І. Феценко, О. А. Журило, А. І. Барбова – К.: ВСВ «Медицина», 2017. – 120 с.

91. Сучасні методи виявлення збудника туберкульозу та його медикаментозної чутливості при туберкульозі органів дихання / М. М. Савула, Н.М. Лопушанська, Л.Р. Проць [та ін.] // Інфекційні хвороби. – 2016. – № 1. – С. 49–51.

92. Сучасні тенденції вивчення проблем туберкульозу: до дня науки присвячується: [Електронний ресурс] / Ю. І. Феценко, В.М. Мельник, С.О. Черенько [та ін.]. – Режим доступу: URL <http://ifp.pulm/doc/staff/naukday2013.pdf>.

93. Туберкульоз із розширеною резистентністю до протитуберкульозних препаратів: ситуація в Україні / В. М. Петренко, С. О. Черенько, Н. А. Литвиненко [та ін.] // Укр. пульмонол. журн. – 2007. – № 3. – С. 35–39.

94. Феценко Ю. І. Етапи боротьби з туберкульозом та програма DOTS / Ю. І. Феценко // Укр. медич. часопис. – 2005. – № 3. – С. 5–12.

95. Феценко Ю. І. Інструкція з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції / Ю. І. Феценко, О. А. Журило, А. І. Барбова [та ін.] // Наказ МОЗ України № 45. – К., 2002. - 118 с.

96. Феценко Ю. І. Організація протитуберкульозної допомоги населенню / Ю. І. Феценко, В. М. Мельник. – К: Здоров'я, 2006. – 656 с.

97. Феценко Ю. І. Основи клінічної фтизіатрії / Ю. І. Феценко, В. М. Мельник, І. Г. Ільницький. – Львів: Атлас, 2007. – 1168 с.

98. Феценко Ю. І., Мельник В. М., Коблянська А. В. / Хіміорезистентний туберкульоз. – К.: Здоров'я, 2003. – 133 с.

99. Феценко Ю. І. Туберкульоз легень в період епідемії: епідеміологічні, клініко-діагностичні, лікувально-профілактичні та організаційні аспекти / Ю. І. Феценко, В. М. Мельник. – К: Логос, 1998. – 282 с.

100. Фигероа А. Обнаружение возбудителя туберкулеза и определение его устойчивости к рифампицину культуральными и молекулярно-генетическими

методами у больных туберкулезом легких / А. Фигероа, Е. А. Долгова, Д. А. Белов // Молекулярная диагностика–2014, VIII Всероссийская науч.-практ. конф. – 2014. – С. 110–111.

101. Фигероа А. Этиологическая диагностика заболеваний, вызываемых микобактериями / А. Фигероа, Д. Т. Леви // Инфекционные болезни. – 2014. – № 2. – С. 95–99.

102. Филогенетический анализ *M. tuberculosis*, выделенных у больных химиорезистентным туберкулезом легких / П. И. Потейко, А.П. Герилевич, А.В. Рогожин [и др.] // Туберкулез, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2016. – № 1. – С. 273–276.

103. Хіміорезистентний туберкульоз: поширеність та профіль стійкості мікобактерій туберкульозу до антимікобактеріальних препаратів / В. М. Мельник, І. О. Новожилова, В. Г. Матусевич [та ін.] // Укр. пульмонол. журн. – 2013. – № 3. – С. 19–23.

104. Хоменко А. Г. Современная тенденция в эпидемиологии туберкулёза и пути уменьшения резервуара инфекции / А. Г. Хоменко // Проблемы туберкулёза. – 1997. – № 1. – С. 4–6.

105. Частота та профіль медикаментозної резистентності *Mycobacterium tuberculosis* у ВІЛ-інфікованих хворих на мультирезистентний туберкульоз і туберкульоз із розширеною резистентністю залежно від випадку туберкульозу / О. В. Панасюк, Л. А. Коломійчук, Л. С. Ничипоренко [та ін.] // Туберкулез, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2015. – № 3. – С. 31–34.

106. Черноусова Л. Н. Современные тенденции и возможности микробиологической диагностики туберкулеза / Л. Н. Черноусова // Русский медицинский журн. – 2002. – Т. 10, № 16. – С. 1–5.

107. Черноусова Л. Н. Роль ПЦР-анализа в комплексных бактериологических анализах во фтизиатрии / Л. Н. Черноусова, Е. Е. Ларинова, Є. В. Севастьянова // Проблемы туберкулеза. – 2001. – № 3. – С. 58–60.

108. Эффективность системы ВАСТЕС MGIT 960 для исследования операционного материала больных туберкулезным спондилитом / Н. С.

Соловьева, О. А. Маничева, Л. Н. Стеклова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 12. – С. 45–47.

109. Эффективные пути решения проблемы туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью в Республике Беларусь / Е. М. Скрягина, Г. Л. Гуревич, А. П. Астровко [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – № 3. – С. 18-23.

110. AB BIODISK. Susceptibility testing of mycobacteria: Etest technical guide no. 5 AB I BIODISK // N. A., Inc. Piscataway, N. J. – 1996.

111. Adikarama C. P. DNA probe based colorimetric method for detection of rifampicin resistance of Mycobacterium tuberculosis / C. P. Adikarama, J. Perera, S. S. Wijesundera // J. of Microbiol. Methods. – 2014. – Vol. 14. – P. 617–628.

112. Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test / D. L. Stephen, P. Mwaba, M. Bates [et al.] // The Lancet Infect. Dis. – 2013. – Vol. 13. – P. 349–361.

113. Ahmed S. A. A new rapid and simple on-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocyte: an alternative to H3-thymidine incorporation assay / S. A. Ahmed, R. M. Gogal, J. E. Walsh // J. Immunol. Methods. – 1994. – № 170. – P. 211–224.

114. Alcaide F. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe / F. Alcaide, M. A. Benitez, J. M. Escriba // J. Clin. Microbiol. – 2000. – № 38. – P. 398–401.

115. Amplicon DNA melting analysis for the simultaneous detection of Brucella spp. and M. tuberculosis complex. Potential use in rapid differential diagnosis between extra pulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis / R. Sanjuan-Jimenez, J. D. Colmenero, P. Bermúdez, [et al.] // PloS One. – 2013. – № 8 (3). – e58353.

116. Amsterdam Declaration to Stop TB: A Call for Accelerated Action Against Tuberculosis / WHO / TB. – Amsterdam, 2000. – 31 p.

117. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) / C. R. Newton, A. Graham, L. E. Heptinstall, [et al.] // Nucleic Acids Res. – 1989. – Vol. 17, № 7. – P. 2503–2516.

118. Antituberculosis Drug Resistance in the World: The WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1994-1997 / WHO / TB. – Geneva. – 1997. – 72 p.

119. Bodmer T. Diagnosing Pulmonary Tuberculosis with the Xpert MTB/RIF Test / T. Bodmer, A. Ströhle // *J. Vis. Exp.* – 2013. – Vol. 62. – P. 3547.

120. Can a Simple Flotation Method Lower the Limit of Detection of Mycobacterium tuberculosis in Extra pulmonary Samples Analyzed by the GeneXpert MTB/RIF Assay? / N. Taylor, R. L. Gaur, E. J. Baron [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2013. – Vol. 50. – P. 2272–2276.

121. Canetti G. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programs / G. Canetti, W. Fox, A. Khomenko // *Bull. World Health Org.* – 1969. – № 41. – P. 21–43.

122. Can mycobacterial katG genetic changes in isoniazid-resistant tuberculosis influence human disease features? / P. Escalante, R. McKean-Cowdi, S. V. Ramaswamy [et al.] // *The Intern. J. of Tuberculosis and Lung Dis.* – 2013. – Vol. 17. – P. 644–651.

123. Capillary electrophoretic restriction fragment length polymorphism patterns for the Mycobacterial hsp65 gene / H. T. Ho, P. L. Chang, C. C. Hung [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42, № 8. – P. 3525–3531.

124. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (rpoB) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains from New York City and Texas / V. Kapur, L. L. Li, S. Iordanescu [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1994. – Vol. 32, № 4. – P. 1095–1098.

125. Choi H. W. Cost-effectiveness of Xpert® MTB/RIF for diagnosing pulmonary tuberculosis in the United States / H. W. Choi, K. Miele, D. Dowdy // *The Intern. J. of Tuberculosis and Lung Dis.* – 2014. – Vol. 17. – P. 1328–1335.

126. Clinical utility of RD1, RD9 and hsp65 based PCR assay for the identification of BCG in vaccinated children / J. W. Teo, J. W. Cheng, R. Jureen [et al.] // *BMC Res. Notes.* – 2013. – Vol. 29, № 6 (1). – P. 434.

127. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* *girA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations / H. E. Takiff, L. Salazar, C. Guerrero [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1994. – № 38. – P. 773–780.

128. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis* / D. M. Yajko, J. J. Madej, M. V. Lancaster, [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – № 33. – P. 2324–2327.

129. Comparative study of Amplicor *Mycobacterium* PCR and conventional methods for the diagnosis of pleuritis caused by mycobacterial infection / S. Mitarai, H. Shishido, A. Kurashima [et al.] // *J. Tuberc. Lung. Dis.* – 2000. – № 4. – P. 871–876.

130. Comparison of Amplicor, in-house polymerase chain reaction, and conventional culture for the diagnosis of tuberculosis in children / D. Gomez-Pastrana, R. Torronteras, P. Caro [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 32. – P. 17–22.

131. Comparison of four DNA extraction methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR and its clinical application in pulmonary tuberculosis / S. Pan, B. Gu, H. Wang [et al.] // *J. Thorac. Dis.* – 2013. – Vol. 5, № 3. – P. 251–257.

132. Comparison of Roche Cobas Amplicor *M. tuberculosis* assay with in-house PCR and culture for detection of *M. tuberculosis* / B. R. Eing, A. Becker, A. Sohns [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – Vol. 36, № 7. – P. 2023–2029.

133. Comparison of the MGIT TBc immunochromatographic assay with the Accuprobe Gen-Probe TB assay for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex: results from a low-burden tuberculosis setting / S. A. Roberts, O. Lowe, S. Pandey [et al.] // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 74, № 4. – P. 415–416.

134. Comparison of the performance of TK system with LJ and MGIT methods in the diagnosis of tuberculosis / B. Feyzioglu, M. Dogan, O. O. Sanli [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2014. – Vol. 7, № 4. – P. 1084–1088.

135. Cost-effectiveness of Xpert® MTB/RIF for diagnosing pulmonary tuberculosis in the United States / H. W. Choi, K. Miele, D. Dowdy [et al.] // *The Intern. J. of Tuberculosis and Lung Dis.* – 2013. – Vol. 17. – P. 1328–1335.

136. Demonstration of homology between IS6110 of *M. tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp / L. Kent, T. D. McHugh, O. Billington [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – Vol. 33. – P. 2290–2293.

137. Detecting novel genetic variants associated with isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* / S. Sheka, Z. X. Yeo, J. C. L. Wong [et al.] // *Plos One.* – 2014. – Vol. 9: e102383.

138. Detection and differentiation of *M. tuberculosis* and nontuberculosis mycobacterial isolates by real-time PCR / N. K. Shrestha, M. J. Tuohy, G. S. Hall, [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, № 11. – P. 5121–5126.

139. Detection of *M. tuberculosis* in clinical samples by two-step polymerase chain reaction and nonisotopic hybridization methods / R. M. Shawar, F. A. el-Zaatari, A. Nataraj, [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1993. – Vol. 31, № 1. – P. 61–65.

140. Detection of *M. tuberculosis* resistance mutations to rifampin and isoniazid by real-time PCR / A. Hristea, D. Otelea, S. Paraschiv [et al.] // *Indian. J. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 28, № 3. – P. 211–216.

141. Detection of *M. tuberculosis* using DNA chips combined with an image analysis system / T-S. Huang, Y. C. Liu, C. H. Bair [et al.] // *The Intern. J. of Tuberculosis and Lung Disease.* – 2008. – Vol. 12, № 1. – P. 33–38.

142. Detection of rifampin resistance by single-strand polymorphism analysis of cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis of the central nervous system / P. Scarpellini, S. Braglia, A. M. Brambilla [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35, № 11. – P. 2802–2806.

143. Detection of rifampin resistance in *M. tuberculosis* by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis / P. Scarpellini, S. Braglia, P. Carrera [et al.] // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 1999. – Vol. 43, № 10. – P. 2550–2554.

144. Detection of vancomycin resistance in enterococci by the Alamar MIC system / R. J. Zabransky, A. R. Dinuzzo, G. L. Woods // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – № 33. – P. 791–793.

145. Determinants of PCR performance (Xpert MTB/RIF), including bacterial load and inhibition, for TB diagnosis using specimens from different body compartments / G. Theron, J. Peter, G. Calligaro [et al.] // *Scientific Reports.* – 2014. – Vol. 4. – P. 1–10.

146. Determination of the sensitivity of PCR assays different target DNAs for the detection of *M. tuberculosis* / C. Y. Wei, C. N. Lee, C. H. Chu [et al.] // *J. Med. Sci.* – 1999. – Vol. 15, № 7. – P. 396–405.

147. Diagnostic accuracy of Xpert® MTB/RIF on bronchoscope specimens in patients with suspected pulmonary tuberculosis // H. Y. Lee, M. W. Seong, S. S. Park [et al.] // *The Intern. J. of Tuberculosis and Lung Dis.* – 2014. – Vol. 17. – P. 917–921.

148. Diagnostic appraisal of simultaneous application of two nested PCRs targeting VHB64 gene and IS6110 region for rapid detection of *M. tuberculosis* genome in culture proven clinical specimens / K. L. Therese, R. Gayathri, L. Dhanurekha, [et al.] // *Indian. J. Med. Microbiol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 366–369.

149. Rapid differentiation of “*Mycobacterium canettii*” from other *M. tuberculosis* complex organisms by PCR-restriction analysis of the *hsp65* gene / K. S. Goh, E. Legrand, C. Sola [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – Vol. 39, № 10. – P. 370–375.

150. Digital PCR to detect and quantify heteroresistance in drug resistant *M. tuberculosis* / S. Pholwat, S. Stroup, S. Foongladda [et al.] // *PloS One.* – 2013. – № 8 (2). – e57238.

151. Direct and early detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampicin resistance from sputum smears / R. Bhutia, K. Narain, K. R. Devi, [et al.] // *The Intern. J. of Tuberc. and Lung Dis.* – 2013. – Vol. 17, № 2. – P. 258–261.

152. Direct detection of *M. tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization / F. S. Nolte, B. Metchock, J. E. McGowan, [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1993. – Vol. 31. – P. 1777–1782.

153. Dissection of the heat-shock response in *M. tuberculosis* using mutants and microarrays / G. R. Stewart, L. Wernisch, R. Stabler [et al.] // *Microbiology.* – 2002. – Vol. 148, № 10. – P. 3129–3138.

154. Dual priming oligonucleotides for broad-range amplification of the bacterial 16S rRNA gene directly from human clinical specimens / O. Kommedal, K. Simmon, D. Karaca [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol. 50, № 4. – P. 1289–1294.

155. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene / J. Y. Chun, K. J Kim, I. T. Hwang [et al.] // *Nucleic. Acids. Res.* – 2007. – Vol. 35, № 6. – P. 40.

156. Enhanced specificity of multiplex polymerase chain reaction via CdTe quantum dots / L. A. Liang, C. Ma, Y. Zhu [et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* – 2011. – Vol. 6, № 1. – P. 51.

157. Evaluation of Etest for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium chelonae* and *M. fortuitum* / S. E. Hoffner, L. Klintz, B. Olsson-Liljequist [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1994. – № 32. – P. 1846–1849.

158. Evaluation of Etest for susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria / J. R. Biehle, S. J. Cavalieri, M. A. Saubolle, [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – № 33. – P. 1760–1764.

159. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for the detection of *M. tuberculosis* and resistance to rifampin in clinical specimens / E. Bunsow, M. J. Ruiz-Serrano, R. P. López [et al.] // *J. Infect.* – 2013. – Vol. 49, № 12. – P. 338–343.

160. Evaluation of a IS6110-TaqMan real-time PCR assay to detect *M. tuberculosis* in sputum samples of patients with pulmonary TB / L. A. Lira, F. C. Santos, M. S. Carvalho [et al.] // *J. Appl. Microbiol.* – 2013. – Vol. 114, № 4. – P. 1103–1108.

161. Evolution of hybridization on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *M. tuberculosis* / D. Gryadunov, V. Mikhailovich, S. Lapa [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2005. – Vol. 11, № 7. – P. 531–539.

162. Evolution of peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization for identification of clinically relevant mycobacteria in clinical specimens and tissue sections / M. Lefmann, B. Schweickert, P. Buchholz, [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44, № 10. – P. 3760–3737.

163. Evaluation of the AID TB Resistance Line Probe Assay for Rapid Detection of Genetic Alterations Associated with Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Strains / C. Ritter, K. Lucke, F. A. Sirgel [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 52. – P. 940–946.

164. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB test for direct detection of *M. tuberculosis* complex in respiratory specimens / Y. C. Yang, P. L. Lu, S. C. Huang [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2011. – Vol. 49, № 3. – P. 797–801.

165. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 System in Combination with the MGIT TBc Identification Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens / P.-L. Lu, Y.-C. Yang, S. C. Huang [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2011. – Vol. 49, № 6. – P. 2290–2292.

166. Evaluation of the GenoType *Mycobacteria* Direct assay for the simultaneous detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and four atypical mycobacterial species in smear-positive respiratory specimens / A. L. Seagar, C. Prendergast, F. X. Emmanuel [et al.] // *J. Med. Microbiol.* – 2008. – Vol. 57. – P. 605–611.

167. Evaluation of the MTBDRsl test for detection of second-line-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / V. S. Kiet, N. T. Lan, D. D. An, [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48, № 8. – P. 2934–2939.

168. Evaluation of the xpert MTB/RIF assay at a tertiary care referral hospital in a setting where tuberculosis and HIV infection are highly endemic / J. O’Grady, M. Bates, L. Chilukutu, [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 55, № 9. – P. 1171–1178.

169. Evaluation of the Xpert® MTB/Rif test, microscopic observation drug susceptibility test and nitrate reductase assay, for rapid and accurate diagnosis of smear-negative tuberculosis in HIV patients / S. Walusimbi, F. Bwanga, A. DeCosta [et al.] // *Intern. J. of Mycobacteriology.* – 2014. – Vol. 2. – P. 148–155.

170. Exploring alternative Biomaterials for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in HIV-Negative Patients by Use of the GeneXpert MTB/RIF Assay / S. Shenai, D. Amisano, K. Ronacher, [et al.] // *J. of Clin. Microb.* – 2014. – Vol. 83. – P. 4161–4166.

171. Foulds J. New tools of the diagnosis of tuberculosis: the perspective of developing countries / J. Foulds, R. O’Brien // *Int. J. Tuber. Lung Dis.* – 1998. – № 2. – P. 778–783.

172. Fox L. Resurgence de la tuberculose multiresistante au Medicaments / L. Fox, T. Schaberg // Publ. Assoc. Anciens. Deves. – 2001. – Vol. 60, № 137. – P. 117–122.

173. GenoType MTBDRsl for molecular detection of second-line-drug and ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis strains and clinical samples / A. Lacoma, N. García-Sierra, C. Prat [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2013. – Vol. 50. – P. 30–36.

174. Global tuberculosis report 2013. – WHO. – 2013. – P. 1–97.

175. Griffith D. E. Nontuberculous mycobacteria lung disease // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 23, № 2. – P. 185–190.

176. Hazbon M. N. Hairpin primers for simplified single-nucleotide polymorphism analysis of M. tuberculosis and other organisms / M. N. Hazbon, D. Alland // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42, № 3. – P. 1236–1242.

177. Hirano K. Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB-negative Mycobacterium tuberculosis isolates / K. Hirano, A. Aono, M. Takahashi // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 42. – P. 390–392.

178. Heifets L. B. Drug susceptibility testing in mycobacteriology : a neglected problem at the turn of the century / L. B. Heifets // Clin. Lab. Med. – 1996. – № 16. – P. 641–656.

179. Heifets L. B. Drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis – a neglected problem at the turn of the century / L. B. Heifets, G. A. Cangelosi // Int. J. Tuber. Lung. Dis. – 1999. – № 3. – P. 564–581.

180. Heifets L. B. Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections / Heifets L. B. – London: CRC Press, 1991. – 235 p.

181. Heifets L. B. Rapid automated methods (BACTEC system) in clinical mycobacteriology / L. B. Heifets // Sem. Respir. Inf. – 1986. – № 1. – P. 242–249.

182. Henry J. B. Clinical diagnosis and management by laboratorii methods. – Philadelphia, 1996, 19-th Ed. – P. 1194–1209.

183. Identification of M. tuberculosis DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy / W. L. Salo, A. C. Aufderheide, J. Buikstra [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – Vol. 91, № 6. – P. 2091–2094.

184. Impact of GeneXpert MTB/RIF assay on triage of respiratory isolation rooms for in patients with presumed tuberculosis: a hypothetical trial / L. H. Chaisson, M. Roemer, D. Cantu [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 59, № 10. – P. 1353–1360.

185. Improved detection of *M. tuberculosis* in Peruvian children by use of a hemi nested IS6110 polymerase chain reaction assay / S. N. Montenegro, R. H. Gilman, P. Sheen, [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 36. – P. 16–23.

186. Incidence of multidrug-resistant tuberculosis disease in children: systematic review and global estimates / H. E. Jenkins, A. W. Tolman, C. M. Yuen [et al.] // *Lancet.* – 2014. – Vol. 383. – P. 1572–1579.

187. Iseman M. D. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis / M. D. Iseman // *N. Engl. J. Med.* – 1993. – Vol. 329. – P. 784–791.

188. Jafari C. Comparison of molecular and immunological methods for the rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis / C. Jafari, M. Ernst, B. Kalsdorf // *The Intern. J. of Tuberculosis and Lung Dis.* – 2013. – Vol. 17. – P. 1459–1465.

189. Katila M. L. Accelerated detection and identification of mycobacteria with MGIT 960 and COBAS AMPLICOR systems / M. L. Katila, P. Katila, R. Erkinjuntti-Pekkanen // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol. 38. – P. 960–964.

190. Kent P. T. Public health Mycobacteriology. a guide for the level III laboratory centers for disease control. / P. T. Kent, G. P. Kubica. – Atlanta, GA, 1985. – 207 p.

191. Khosravi A. D. Detection of genomic mutations in *katG*, *inhA* and *rpoB* genes of *M. tuberculosis* isolates using polymerase chain reaction and multiplex allele-specific polymerase chain reaction / A. D. Khosravi, H. Goodarzi, S. M. Alavi // *Braz. J. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 16, № 1. – P. 57–62.

192. Kim S. J. Drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* against second line and newer anti-tuberculosis drugs: drug resistance criteria / S. J. Kim // *Intern. J. Tuberc. and Lung Dis.* – 2001. – Vol. 5, № 11. – S. 1. – P. 4.

193. Kochi A. Multidrug resistance and its control / A. Kochi, B. Vareldzis, K. Styblo // *Res. Microbiol.* – 1994. – № 144. – P. 104–110.

194. Kruuner A. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial testing and determination of critical concentrations of first- and second-line antimicrobial drugs

with drug-resistant clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* / A. Kruuner, M. D. Yates, F. A. Drobniowski // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – № 44. – P. 811–818.

195. Lebrun L. Evaluation of the E-test for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium avium* to clarithromycin / L. Lebrun // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1996. – № 37. – P. 999–1003.

196. Matteelli A. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management / A. Matteelli, A. Roggi, A. C. Carvalho // *Clinical Epidemiology.* – 2014. – Vol. 6. – P. 111–118.

197. McLoughlin K. S. Microarrays for Pathogen Detection and Analysis / K. S. McLoughlin // *Brief Funct Genomics.* – 2011. – Vol. 10, № 6. – P. 342–353.

198. McNerney R. TB: the return of the phage. A review of fifty years of mycobacteriophage research / R. McNerney // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 1999. – № 3. – P. 179–184.

199. Measurement of sputum *M. tuberculosis* messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy / L. E. Desjardin, M. D. Perkins, K. Wolski [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1999. – Vol. 160, № 1. – P. 203–210.

200. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection / G. I. Mejia, L. Castrillon, H. Trujillo [et al.] // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 1999. – № 3. – P. 138–142.

201. Migrants and tuberculosis: analysing epidemiological data with ethnography / J. Littleton, J. Park, C. Thornley [et al.] // *Australian and New Zealand J. of Public Health.* – 2008. – Vol. 32, № 2. – P. 142–149.

202. Millar B. C. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections / B. C. Millar, J. Xu, J. E. Moore // *Curr. Issues. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 9, № 1. – P. 21–39.

203. Mixed *Mycobacterium tuberculosis* complex infections and false-negative results for rifampin resistance by GeneXpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes / N. M. Zetola, S. S. Shin, K. A. Tumedi [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 52. – P. 2422–2429.

204. Molecular and phenotypic characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to anti-tuberculosis drugs / B. R. Imperiale, M. J. Zumárraga, A. B. Di

Giulio [et al.] // *The Intern. J. of Tuberc. and Lung Dis.* – 2014. – Vol. 17. – P. 1088–1093.

205. Müller R. Genotyping of ancient *Mycobacterium tuberculosis* strains reveals historic genetic diversity / R. Müller, C. A. Roberts, T.A. Brown // *Proc. Biol. Sci.* – 2014. – Vol. 281– P. 1781.

206. Multidrug-resistant tuberculosis in the United Kingdom and Lithuania / X. Gonzalo, D. C. Hutchison, F. A. Drobniewski [et al.] // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2014. – Vol. 18, № 6. – P. 663–665.

207. *Mycobacteria*: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance / G. Canetti, S. Froman, J. Grosset [et al.] // *Bull. World Health Org.* – 1963. – № 29. – P. 565–578.

208. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa / G. E. Pfyffer, R. Auckenthaler, J. D. van Embden [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 1998. – № 4. – P. 631–634.

209. Ng K. P. Identification of *Mycobacterium* species following growth detection with the BACTEC MGIT 960 system by DNA line probe assay / K. P. Ng, D. V. Rukumani, J. Chong // *Intern. J. of Mycobacteriology.* – 2014. – Vol. 61. – P. 997–1005.

210. Novel multiplex PCR using dual-priming oligonucleotides for detection and discrimination of the *M. tuberculosis* complex and *M. bovis* BCG / H. R. Lee, S. Y. Kim, H. E. Chang [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48, № 12. – P. 4612–4614.

211. Novel real-time simultaneous amplification and testing method to accurately and rapidly detect *Mycobacterium tuberculosis* complex / Z. Cui, Y. Wang, L. Fang, [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2013. – Vol. 50. – P. 646–650.

212. Nicol M. P. Using Xpert MTB/RIF / M. P. Nicol, A. Whitelaw, W. Stevens // *Current Respiratory Medicine Reviews.* – 2013. – Vol. 9. – P. 187–192.

213. Occurrence of *rpoB* mutations in isoniazid-resistant but rifampin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Germany / S. Andres, D. Hillemann, S. Rüsç-Gerdes [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58. – P. 590–592.

214. Ogusku M. M. Analysis of different primers used in the PCR method: diagnosis of tuberculosis in the State of Amazonas, Brazil / M. M. Ogusku, J. I. Salem // *J. Bras. Pneumol.* – 2004. – Vol. 30, № 4. – P. 343–349.

215. Ouassa T. GenoType MTBDRplus as a complementary tool for the typing of *Mycobacterium tuberculosis* / T. Ouassa, G. Y. Loukou, H. Faye-Kette // *Advances in Infectious Diseases.* – 2014. – Vol. 4. – P. 26–29.

216. Page B. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro / B. A. Page, M. Mage, C. Noel // *Int. J. Oncol.* – 1993. – № 3. – P. 473–476.

217. Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays / J. B. Fan, X. Chen, M. K. Halushka [et al.] // *Genome Res.* – 2000. – Vol. 10, № 6. – P. 853–860.

218. Performance of the MTBDRsl assay in Georgia / N. Tukvadze, N. Bablishvili, R. Apsindzelashvili [et al.] // *The Intern. J. of Tuberculosis and Lung Disease.* – 2014. – Vol. 18. – P. 233–239.

219. Pfaller M. A. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates / M. A. Pfaller, A. L. Barry // *J. Clin. Microbiol.* – 1994. – № 32. – P. 1992–1996.

220. Piersimoni C. Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of *M. tuberculosis* Complex in Clinical Samples / C. Piersimoni, C. Scarparo // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, № 12. – P. 5355–5365.

221. Predicting Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Phenotypes with Genetic Mutations / T. C. Rodwell, F. Valafar, J. Douglas [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 52. – P. 781–789.

222. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review / M. A. Valones, R. L. Guimarães, L. A. Cavalcanti Brandão, [et al.] // *Braz. J. Microbiol.* – 2009. – Vol. 40, № 1. – P. 1–11.

223. Quantitative analysis of mRNA as marker for viability of *M. tuberculosis* / T. J. Hellyer, L. E. DesJardin, G. L. Hehman [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 37. – P. 290–295.

224. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* using a novel ultrafast chip-type real-time polymerase chain reaction / S. H. Lee, S. W. Kim, S. Lee [et al.] // *Chest.* – 2014. – Vol. 146, № 5. – P. 1319–1326.

225. Rapid detection of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria by microscopic observation of growth on Middlebrook 7H11 agar / P. Idigoras, E. Pérez-Trallero, M. Alcorta [et al.] // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1995. – № 14. – P. 6–10.

226. Raviglione O. B. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic / O. B. Raviglione, D. E. Snider, A. Kochi // *JAMA.* – 1995. – Vol. 273. – P. 220–226.

227. Reliability of two novel methods, alamar and Etest, for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / S. M. Novak [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1993. – № 31. – P. 3056–3057.

228. Rimek D. Performance of an IS6110-based PCR assay and the Cobas Amplicor MTB PCR system for detection of *M. tuberculosis* complex DNA in human lymph node samples / D. Rimek, S. Tyagi, R. Kappe // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – Vol. 40, № 8. – P. 3089–3092.

229. Roberts G. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens / G. Roberts, N. L. Goodman, L. Heifets // *J. Clin. Microbiol.* – 1983. – № 18. – P. 689–696.

230. Rusch-Gerdes S. Multi-center laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials / S. Rusch-Gerdes, G. E. Pfiffer, M. Casal // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – № 44. – P. 688–692.

231. SeekTB, a two-stage multiplex real-time PCR-based method for differentiation of the *M. tuberculosis* complex / K. Reddington [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol. 50, № 7. – P. 2203–2206.

232. Simultaneous detection and strain differentiation of *M. tuberculosis* for diagnosis and epidemiology / J. Kamerbeek, L. Schouls, A. Kolk [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35. – P. 907–914.

233. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays / T. R. Gingeras [et al.] // *Genom. Res.* – 1998. – Vol. 8, № 5. – P. 531–539.

234. Species differentiation and antibiotic susceptibility testing with DNA microarrays / G. Vernet, G. Ghandour, E. Wang [et al.] // *J. Appl. Microbiol.* – 2004. – Vol. 96, № 1. – P. 59–68.

235. Specific detection of *M. tuberculosis* by *mtp40* nested PCR / A. Gori, F. Franzetti, G. Marchetti [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. – Vol. 34, № 11. – P. 28–66.

236. Specific detection of *M. tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction / P. W. Hermans, A. R. Schuitema, D. Van Soolingen [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1990. – Vol. 28, № 6. – P. 1204–1213.

237. Sputum *M. tuberculosis* RNA as a marker of bacteriologic clearance in response to antituberculosis therapy / L. Li, C. S. Mahan, M. Palaci [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48, № 1. – P. 46–51.

238. Standardised PCR-based molecular epidemiology of tuberculosis / C. Allix-Beguec, P. Supply, M. Wanlin [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2008. – Vol. 31. – P. 1077–1084.

239. Study of the rifampin monoresistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis* / Y. Pang, J. Lu, Y. Wang [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57. – P. 893–900.

240. Tanaka M. M. Detecting emerging strains of tuberculosis by using spoligotypes / M. M. Tanaka, A. R. Francis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 15266–15271.

241. Telenti A. Genetics of drug resistance in tuberculosis / A. Telenti // *Clin. Chest. Med.* – 1997. – № 18. – P. 55–64.

242. The diagnostic accuracy of the GenoType[®] MTBDRsl assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs / G. Theron, J. Peter, M. Richardson [et al.] // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2014. – Vol. 10. – P. 1–23.

243. Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method / D. F. Welch, A. P. Guruswamy, S. J. Sides [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1993. – № 31. – P. 2178–2184.

244. Tortoli E. Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460TB method and the agar plate method

of proportion / E. Tortoli, M. Benedetti, A. Fontanelli // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – № 40. – P. 607–610.

245. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis in the USA: a cross-sectional study / P. K. Moonan, L. D. Teeter, K. Salcedo [et al.] // *Lancet Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 13. – P. 777–784.

246. Tsolaki A. G. Functional and evolutionary genomics of *M. tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains / A. G. Tsolaki, A. E. Hirsh, K. DeRiemer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101, № 4. – P. 865–870.

247. Tuberculosis/mycobacteria PCR to detect *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory tract samples: evaluation of clinical data / F. P. Rozales, Y. Glupczynski, J. Degraux [et al.] // *Epidemiology and Infection.* – 2014. – Vol. 142. – P. 1517–1523.

248. Two new rapid SPN-typing methods for classifying *M. tuberculosis* complex into the main phylogenetic lineages / D. Stucki, B. Malla, S. Hostettler [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 20, № 7. – e41253.

249. Universal access to care for multidrug-resistant tuberculosis: an analysis of surveillance data / D. Falzon, E. Jaramillo, F. Wares [et al.] // *Lancet Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 13. – P. 690–697.

250. Utility of reverse transcriptase PCR and DNA-PCR in the diagnosis of female genital tuberculosis / T. Rana, U. B. Singh, V. Kulshrestha [et al.] // *J. Med. Microbiol.* – 2011. – Vol. 60, № 4. – P. 486–491.

251. Use of multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) to detect multidrug-resistant tuberculosis in Panama / B. S. Chia, F. Lanzas, D. Rifat, [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – № 7 (7). – e40456.

252. Venkataraman B. A new microarray platform for whole-genome expression profiling of *M. tuberculosis* / B. Venkataraman, M. Vasudevan, A. Gupta // *J. Microbiol. Methods.* – 2013. – Vol. 20, № 12. – pii: S0167–7012(13)00376–X.

253. Whole-genome-based *Mycobacterium tuberculosis* surveillance: a standardized, portable, and expandable approach / T. A. Kohl, R. Diel, D. Harmsen [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 52. – P. 2479–2486.

254. WHO. Global tuberculosis report. – Geneva: WHO, 2013. – 97 p. – Режим доступа: http://www.who.int/tb/publications/global_report/ruindex.html.

255. WHO. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis: report № 5. – Geneva: WHO, 2015. – 147 p.

256. Williams-Bouyer N. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP Culture System II for growth and detection of Mycobacteria / N. Williams-Bouyer, R. Yorke, H. I. Lee // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – № 38. – P. 4167–4170.

257. World Health Organization. The WHO/IUTLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World / WHO. – Geneva, 2000. – 187 p.

258. Xpert MTB/RIF as a measure of sputum bacillary burden. variation by HIV status and immunosuppression / C. F. Hanrahan, G. Theron, J. Bassett [et al.] // *American J. of Respiratory and Critical Care Medicine.* – 2014. – Vol. 189. – P. 1426–1434.

259. Xpert MTB/RIF assay shortens airborne isolation for hospitalized patients with presumptive tuberculosis in the United States / C. K. Lippinc, M. B. Miller, E. B. Popowitch [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 59, № 2. – P. 186–192.

260. Xpert[®] MTB/RIF in pleural fluid for the diagnosis of tuberculosis / J. M. Porcel, R. Palma, L. Valdés [et al.] // *The Intern. J. of Tuberculosis and Lung Disease.* – 2013. – Vol. 17. – P. 1217–1219.

261. Xpert MTB/RIF testing in a low tuberculosis incidence, high-resource setting: limitations in accuracy and clinical impact / H. Sohn, A. D. Aero, D. Menzies [et al.] // *Clin Infect Dis.* – 2014. – Vol. 58, № 7. – P. 970–976.

262. Yan A. H. Comparison of the MB/BacT and BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria from clinical specimens / A. H. Yan, S. H. Tsai // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2000. – № 37. – P. 25–30.

263. Zink A. R. Molecular strain identification of the M. tuberculosis complex in archive a tissue samples / A. R. Zink, A. G. Nerlich // *J. Clin. Pathol.* – 2004. – Vol. 57, № 11. – P. 1185–1192.

**ДОДАТКИ
ДОДАТОК А**

| | |
|---------------------------------------|--|
| МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ | |
| НАКАЗ | |
| 28.07.2016 № 786 | |
| | Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 03 жовтня 2016 р. за № 1311/29441 |

Про затвердження Положення про систему управління якістю досліджень в лабораторіях, що здійснюють мікробіологічну діагностику туберкульозу

Відповідно до підпункту 15 пункту 1 [додатка 2](#) до Загальнодержавної цільової соціальної програми протидії захворюванню на туберкульоз на 2012 - 2016 роки, затвердженої Законом України від 16 жовтня 2012 року № 5451-VI, та з метою ефективної діагностики випадків туберкульозу. НАКАЗУЮ:

1. Затвердити [Положення про систему управління якістю досліджень в лабораторіях, що здійснюють мікробіологічну діагностику туберкульозу](#) (далі - Положення), що додається.

2. Міністру охорони здоров'я Автономної Республіки Крим, керівникам структурних підрозділів з питань охорони здоров'я обласних, Київської та Севастопольської міських державних адміністрацій, керівникам закладів охорони здоров'я, що здійснюють мікробіологічну діагностику туберкульозу, забезпечити виконання цього наказу.

3. Управління громадського здоров'я у встановленому порядку забезпечити подання цього наказу на державну реєстрацію до Міністерства юстиції України.

4. Контроль за виконанням цього наказу покласти на заступника Міністра Ілика Р.Р.

5. Цей наказ набирає чинності з дня його офіційного опублікування.

| | |
|---------|---|
| Міністр | В. Шафранський |
| | ЗАТВЕРДЖЕНО Наказ Міністерства охорони здоров'я України 28.07.2016 № 786 |
| | Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 03 жовтня 2016 р. за № 1311/29441 |

ПОЛОЖЕННЯ
про систему управління якістю досліджень в лабораторіях, що здійснюють
мікробіологічну діагностику туберкульозу

I. Загальні положення

1. Це Положення встановлює основні підходи до створення і функціонування системи управління якістю досліджень в лабораторіях, що здійснюють мікробіологічну діагностику туберкульозу, спрямованої на підвищення ефективності лікувально-діагностичного процесу, зменшення невикористаних витрат та ризиків для пацієнтів, зниження захворюваності та смертності, збільшення очікуваної тривалості життя населення України.

2. Дія цього Положення поширюється на заклади охорони здоров'я державної та комунальної форм власності, які забезпечують забір, транспортування матеріалу та проведення мікробіологічних досліджень з метою діагностики туберкульозу.

3. Положення базується на загальних вимогах, викладених у державних стандартах системи управління якістю та рекомендаціях міжнародних організацій.

4. У цьому Положенні терміни вживаються у таких значеннях:

внутрішній контроль якості бактеріологічних досліджень - ефективний і систематичний моніторинг та забезпечення відповідності усіх лабораторних процесів затвердженим стандартним операційним процедурам (далі - СОП) та встановленим стандартам;

зовнішній контроль (або зовнішня оцінка) якості досліджень - система об'єктивного оцінювання організації та результатів роботи лабораторної мережі;

система управління якістю (менеджмент якості) - скоординовані дії всіх зацікавлених сторін щодо якості, які направляють та контролюють діяльність закладів охорони здоров'я та лабораторій, що здійснюють мікробіологічну діагностику туберкульозу;

якість лабораторних досліджень - точність, надійність та своєчасність результатів, що проводяться;

II. Система заходів з управління якістю мікробіологічних досліджень

1. Основним завданням лабораторій, що здійснюють мікробіологічну діагностику туберкульозу, є забезпечення достовірною лабораторною діагностичною інформацією закладів охорони здоров'я.

Система заходів з управління якістю має гарантувати достовірність та відтворюваність результатів мікробіологічних досліджень.

2. Система управління якістю мікробіологічних досліджень передбачає: планування, забезпечення, контроль та відповідність сучасним вимогам.

3. Планування якості мікробіологічних досліджень полягає у визначенні точності, яка досягається із застосуванням наявних у розпорядженні лабораторій технічних засобів, поживних середовищ, інших реагентів та витратних матеріалів, при мінімальних витратах робочого часу і лабораторних матеріалів, з урахуванням медично обґрунтованих вимог.

4. Планування заходів для забезпечення якості лабораторних досліджень є обов'язком завідувача лабораторії.

5. Забезпечення якості мікробіологічних досліджень полягає у здійсненні заходів, що створюють необхідні умови для отримання гарантовано достовірної лабораторної інформації, яка адекватно відображає відсутність/наявність збудника туберкульозу, його стійкість/чутливість до протитуберкульозних препаратів, ступінь інфікування. Заходи щодо забезпечення якості здійснюються:

на центральному рівні;

на регіональному рівні;

на рівні окремого закладу охорони здоров'я;

на рівні окремої лабораторії.

6. Забезпечення якості мікробіологічних досліджень на національному рівні системи охорони здоров'я України полягає в розробці нормативно-правових актів, експертизі якості та безпеки медичних виробів: засобів виміральної техніки, поживних середовищ,

реагентів, тест-систем, стандартних зразків, допоміжного обладнання та іншого оснащення, призначеного для використання в закладах охорони здоров'я країни, введення їх в обіг та експлуатацію.

7. Забезпечення якості мікробіологічних досліджень на рівні окремого закладу охорони здоров'я полягає в:

- забезпеченні лабораторії приміщенням, яке відповідає вимогам біологічної безпеки;
- належному матеріально-технічному та метрологічному забезпеченні лабораторного процесу, в тому числі діагностичними препаратами гарантованої якості;
- сприяттє ефективному функціонуванню системи підвищення професійної підготовки фахівців;

розробці та здійсненні персоналом клінічних підрозділів закладу охорони здоров'я заходів, що попереджують негативний вплив факторів преаналітичного етапу (порушення правил забору, маркування, первинної обробки, зберігання, транспортування зразків біологічного матеріалу, оформлення супровідної документації, вхідний та систематичний контроль діагностичних препаратів), аналітичного та постаналітичного етапів (неадекватна інтерпретація результатів дослідження) на якість результатів мікробіологічних досліджень.

Розробка і здійснення заходів забезпечення якості мікробіологічних досліджень на рівні окремого закладу охорони здоров'я є обов'язком керівника цього закладу.

8. Забезпечення якості лабораторних досліджень на рівні окремої лабораторії полягає в розробці і здійсненні заходів, що перешкоджають отриманню недостовірної лабораторної інформації та упереджують негативний вплив факторів:

- преаналітичного етапу (порушення правил маркування, реєстрації, зберігання, первинної обробки біологічного матеріалу, ведення обліково-звітної медичної документації тощо);

- аналітичного етапу (порушення методики або умов виконання мікробіологічних досліджень, вимог до експлуатації засобів вимірювальної техніки, придбання та використання діагностичних препаратів та інших витратних матеріалів, не дозволених до використання, тощо);

- постаналітичного етапу (оцінка правильності результатів мікробіологічних досліджень, їх інтерпретація та аналіз).

Обов'язково здійснюється оцінка функціональних характеристик (правильність, відтворюваність результатів, чутливість, специфічність тощо) кожної серії медичних виробів, отриманих лабораторіями для використання, шляхом верифікації. На підставі результатів оцінки лабораторія приймає рішення про можливість їх використання або подає рекламацію.

9. Контроль якості забезпечує постійну оцінку лабораторних процесів, проміжних та кінцевих результатів, оцінку ефективності запроваджених дій з використанням цільового аналізу та аудиту.

10. Контроль якості лабораторних досліджень полягає в розробці та здійсненні системи контрольних заходів на центральному, регіональному рівнях, на рівні окремого закладу і конкретної лабораторії для виявлення та відстеження похибок, які можуть проявитися у процесі виконання мікробіологічних досліджень та надати недостовірну лабораторну інформацію.

11. Метою зовнішньої оцінки якості лабораторних досліджень є оцінка правильності та достовірності результатів мікробіологічних досліджень (бактеріоскопічних, культуральних, молекулярно-генетичних тощо), які виконуються в лабораторіях різних закладів охорони здоров'я.

12. Зовнішня оцінка якості мікробіологічної діагностики туберкульозу проводиться в таких формах:

- кураторські візити уповноважених представників лабораторій вищого рівня;
- експертиза мікроскопічних досліджень, які зберігаються в лабораторії, для підтвердження їх достовірності;

підтвердження виділених культур (контроль правильності ідентифікації мікроорганізмів та/або правильності визначення їх медикаментозної стійкості);
тестування комплексу мазків для бактеріоскопії («панельне» тестування);
тестування набору культур щодо ідентифікації та визначення їх чутливості до протитуберкульозних препаратів.

13. Кратність кураторських візитів, етапів зовнішнього контролю якості мікробіологічних досліджень визначається за результатами попередніх етапів зовнішньої оцінки якості та професійним рівнем лабораторії, яку перевіряють, але не менше ніж 1 раз на рік, для проблемних лабораторій (лабораторії, в яких при попередньому кураторському візиті не проводили зовнішню оцінку якості) - не менше ніж 2 рази на рік.

Якщо результати «панельного» тестування незадовільні, лабораторія-куратор (лабораторія вищого рівня) здійснює кураторський візит у проблемну лабораторію для з'ясування причин помилок та навчання персоналу, після чого проводиться повторна (позачергова) зовнішня оцінка якості.

14. Участь у щорічних раундах зовнішньої оцінки якості є обов'язковою для лабораторій з діагностики туберкульозу всіх рівнів та враховується при їх акредитації. Разом з тим допускається участь лабораторій в інших програмах зовнішньої оцінки якості (міжнародних та регіональних).

15. Організує проведення зовнішньої оцінки якості мікробіологічних досліджень, а також здійснює аналіз отриманих результатів Центральна референс-лабораторія з мікробіологічної діагностики туберкульозу Міністерства охорони здоров'я України або інша лабораторія з мікробіологічної діагностики туберкульозу II - III рівнів, уповноважена на цей вид діяльності.

На кожний щорічний раунд зовнішньої оцінки мікробіологічних досліджень якості складається відповідна програма з урахуванням мети контролю.

Центральна референс-лабораторія з мікробіологічної діагностики туберкульозу МОЗ спільно з лабораторіями II - III рівнів беруть участь у:

розробці методів зовнішньої оцінки якості мікробіологічних досліджень при виявленні, діагностиці і лікуванні туберкульозу;

розробці графіка проведення етапів зовнішньої оцінки якості;

підготовці супровідної документації до контрольних зразків для учасників чергового етапу зовнішньої оцінки якості;

аналізі результатів зовнішньої оцінки якості мікробіологічних досліджень;

виготовлення контрольних зразків і виконанні їх експертного аналізу;

інформуванні лабораторій про результати оцінки виконаних мікробіологічних досліджень, наданні консультативно-методичної допомоги окремим лабораторіям;

підготовці інформації для органів управління охороною здоров'я щодо якості лабораторної діагностики туберкульозу в окремих закладах, адміністративно-територіальних одиницях і в цілому в Україні.

16. Внутрішньолабораторний контроль якості обов'язковий для всіх видів досліджень, які виконуються в лабораторії. Порядок проведення внутрішньолабораторного контролю якості затверджується у закладі охорони здоров'я.

17. Організація внутрішньолабораторного контролю якості досліджень є обов'язком завідувача лабораторії.

18. Регулярна зовнішня оцінка якості та внутрішньолабораторний контроль якості доповнюють, але не замінюють один одного. Зовнішня оцінка якості спрямована на виявлення систематичних помилок і забезпечення єдності вимірювань на всій території України, а внутрішньолабораторний контроль якості призначений для підтримки стабільності аналітичної системи, виявлення та усунення неприпустимих випадкових і систематичних похибок.

19. Система управління (менеджмент) якістю передбачає поетапне запровадження та управління всіма основними елементами системи:

організація та управління;
персонал;
обладнання;
закупівля необхідних матеріалів та їх інвентарний облік;
контроль процесів;
управління інформацією;
документи та записи;
оцінка та аудит;
обслуговування пацієнтів.

Елементи системи впроваджуються в тій послідовності, яка найкраще підходить кожній лабораторії.

За розробку, впровадження, підтримку та постійне поліпшення системи управління якістю відповідає завідувач лабораторії та керівник закладу охорони здоров'я, що здійснює мікробіологічну діагностику туберкульозу.

В.о. начальника Управління
громадського здоров'я

Н. Півень

ДОДАТОК Б

АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар ДУ «Національний інститут фтизіатрії
і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»
канд. мед. наук Л. В. Кучугура-Кучеренко

_____ листопада 2016 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТУ НАУКОВОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ДУ «НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ФТИЗІАТРІЇ І ПУЛЬМОНОЛОГІЇ ІМ. Ф. Г. ЯНОВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»

1. Найменування пропозиції для впровадження: «Алгоритм бактеріологічного обстеження на туберкульоз внутрішньо переміщених осіб з регіонів із високою захворюваністю туберкульозом та біженців з тимчасово окупованих територій України».

2. Установа-розробник: ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України».

Укладачі: Барбова А. І., канд. мед. наук, ст. наук. співроб.; Журило О. А., д-р мед. наук, доцент; Алієва Н. М., зав. бактеріологічним відділом КДЛ Полтавського клінічного ОПТД; Рохманова Н. А. зав. бактеріологічною лабораторією Запорізьського ОПТД.

3. Джерело інформації: Алгоритм бактеріологічного обстеження на туберкульоз внутрішньо переміщених осіб з регіонів із високою захворюваністю туберкульозом та біженців з тимчасово окупованих територій України [Текст] : інформаційний лист / А. І. Барбова [та ін.] ; ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України». – Київ, 2015. – 4 с.

4. Де і коли впроваджено: в лабораторії мікробіології туберкульозу і НЗЛ ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України» за період з 27 січня 2016 р. по 20 листопада 2016 р.

5. Ефективність впровадження: оптимізовано повне гено-фенотипічне обстеження на туберкульоз внутрішньо переміщених осіб з регіонів з високою захворюваністю на туберкульоз.

6. Зауваження: немає.

Відповідальний за впровадження

Зав. лабораторією мікробіології

«20» листопада 2016 р.



Л. І. Пісковець

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»
канд. мед. наук Л. В. Кучугура-Кучеренко



“ 20 ” листопада 2016 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТУ НАУКОВОГО ДОСЛІДЖЕННЯ
ДУ «НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ФТИЗІАТРІЇ І ПУЛЬМОНОЛОГІЇ
ІМ. Ф. Г. ЯНОВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»**

1. Найменування пропозиції для впровадження: Спосіб визначення чутливості *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів в дослідному матеріалі хворих на туберкульоз легень.

2. Установа-розробник: ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України».

Укладачі: Журило О. А., д-р мед. наук, доцент; Барбова А. І., канд. мед. наук, ст. наук. співроб.; Трофімова П. С., канд. мед. наук, наук. співроб.; Миронченко С. В., канд. мед. наук, мол. наук. співроб.; Алієва Н. М., лікар-бактеріолог.

3. Джерело інформації: Журило, О. А. Спосіб визначення чутливості *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів в дослідному матеріалі хворих на туберкульоз легень [Текст] : інформаційний лист / О. А. Журило [та ін.] ; ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України». – Київ : НІФП НАМН, 2015. – 4 с.

4. Де і коли впроваджено: в лабораторії мікробіології туберкульозу і НЗЛ ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»

за період з 27 січня 2016 р. по 20 листопада 2016 р.

5. Ефективність впровадження: підвищення точності визначення чутливості мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів I-го і II-го ряду в 1,23 рази.

6. Зауваження: немає.

Відповідальний за впровадження:

Зав. лабораторією мікробіології туберкульозу і НЗЛ

«20» листопада 2016 р.

Л. І. Пісковець

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»
канд. мед. наук Л. В. Кучугура-Кучеренко



«20» листопада 2016 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТУ НАУКОВОГО ДОСЛІДЖЕННЯ
ДУ "НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ФТИЗІАТРІЇ І ПУЛЬМОНОЛОГІЇ
ІМ. Ф. Г. ЯНОВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"**

1. Найменування пропозиції для впровадження: Стаття «Варіанти моно- і полі резистентності МБТ до протитуберкульозних препаратів 1 ряду у хворих з новими і повторними випадками туберкульозу»

2. Установа-розробник: ДУ "Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України".

Укладачі: Барбова А. І., канд. мед. наук, ст. наук. співроб.; Черенько С. О., д-р. мед. наук, проф.; Аврамчук О.В., мол. наук. співроб. ; Погребна М. В., канд. мед. наук, ст. наук. співроб.; Алієва Н. М., зав. бактеріологічним відділом КДЛ Полтавського клінічного ОПТД.

3. Джерело інформації: Варіанти моно- і полі резистентності МБТ до протитуберкульозних препаратів 1 ряду у хворих з новими і повторними випадками туберкульозу [Текст] / А. І. Барбова [та ін.] // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2016. – № 1. – С. 23–26.

4. Де і коли впроваджено: в лабораторії мікробіології туберкульозу і НЗЛ ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України» за період з 27 квітня 2016 р. по 20 листопада 2016 р.

5. Ефективність впровадження: із отриманих даних орієнтовно розраховується контингент хворих із ізоніазид-, моно- і полірезистентним туберкульозом, який слід лікувати 12-місячним або подовженим 18-місячним режимом хіміотерапії.

6. Зауваження: немає.

Відповідальний за впровадження

Зав. лабораторією мікробіології

«20» листопада 2016 р.

Л. І. Пісковець

ДОДАТОК В

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Порівняльна характеристика якості життя та стану здоров'я хворих інфільтративним туберкульозом легень в динаміці на різних етапах медичної реабілітації / Ю.П. Цапенко, М.Г. Бойко, О.О. Краєвська, Н.М. Алієва, Ю.О. Красношарпа // Світ медицини та біології. – 2012. – № 3. – С. 112–115.

2. Барбова А. І. Використання нової молекулярно-генетичної системи GeneXpert і рідкого живильного середовища в системі ВАСТЕС MGIT для швидкої діагностики туберкульозу / А.І. Барбова, О.А. Журило, Н.М. Алієва // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика. – 2015. – С. 423–430.

3. Експериментальні дослідження по підвищенню ефективності виділення мікобактерій з клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень з використанням рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 / А.І. Барбова, О.А., Журило, Н.М. Алієва, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко // Український пульмонологічний журнал. – 2015. – № 3. – С. 56–60.

4. Використання нової молекулярно-генетичної системи GenoType і рідкого живильного середовища для швидкої діагностики туберкульозу / А.І. Барбова, Л.В. Гайова, О.А. Журило, П.С. Трофімова, Н.М. Алієва // Scientific J. «ScienceRise». – 2015. – № 10/3 (15). – С. 29–37.

5. Варіанти моно- і полірезистентності МБТ до протитуберкульозних препаратів 1 ряду у хворих з новими і повторними випадками туберкульозу / А.І. Барбова, С.О. Черенько, Г.В. Старичек, О.В. Аврамчук, М.В. Погребна, Н.М. Алієва // Туберкульоз. Легеневі хвороби. ВІЛ-інфекція. – 2016. – № 1. – С. 23–26.

6. Визначення критеріїв резистентності *M.tuberculosis* до препаратів 2-го і резервного ряду за допомогою рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 / А.І. Барбова, О.А. Журило, Н.М. Алієва,

Л.М. Сладкова // Український пульмонологічний журнал – 2017. – № 1. – С. 47–52.

7. Пат. 99799 Україна, МПК⁹ С 12 N 1/02, С 12 Q 1/02. Спосіб визначення чутливості *M.tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів в дослідному матеріалі хворих на туберкульоз легень / Журило О.А., Барбова А.І., Алієва Н.М., Трофімова П.С., Миронченко С.В.; заявник і патентовласник ДУ «Націонал. ін.-т фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМНУ». – № u 201414019; заявл. 29.12.14; опубл. 25.06.15, Бюл. № 12. – 1 с.

8. Спосіб визначення чутливості *M.tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів в дослідному матеріалі хворих на туберкульоз легень: інформаційний лист / О.А. Журило, А.І. Барбова, Н.М. Алієва, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко; НІФП ДУ НАМН України. – К.: НІФП, 2015. – 4 с.

9. Алгоритм бактеріологічного обстеження на туберкульоз внутрішньо переміщених осіб з регіонів із високою захворюваністю туберкульозом та біженців з тимчасово окупованих територій України: інформаційний лист / А.І. Барбова, О.А. Журило, Н.М. Алієва, Н.А. Рохманова; НІФП НАМН України. – К.: НІФП, 2015. – 4 с.

10. Критерій резистентності мікобактерій туберкульозу до канаміцину в рідкому живильному середовищі Міддлбрук 7Н9 в системі ВАСТЕС 960: інформаційний лист / О.А. Журило, А.І. Барбова, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко, Н.М. Алієва; НІФП НАМН України. – К.: НІФП, 2015. – 4 с.

11. Стратегічні напрями розвитку лабораторної діагностики туберкульозу в Україні / Ю.І. Фещенко, О.А. Журило, А.І. Барбова, О.Э. Хейло, О.Р. Сметаніна, М.М. Карнаухова, Н.А. Гріцова, Н.М. Алієва. – К.: ВСВ «Медицина», 2017. – 120 с.

12. Частота первинної медикаментозної резистентності мікобактерій туберкульозу у хворих на вперше діагностований деструктивний туберкульоз легень в Полтавській області / А.Г. Ярешко, А.К. Вородюхіна, Н.М. Алієва, Ю.В. Визір // XIII Конгрес Світової Федерації українських лікарських

товариств: Тез. доп. – Львів, 2010. – С. 269.

13. Динаміка частоти та профілю медикаментозної резистентності мікобактерій туберкульозу у хворих на вперше діагностований туберкульоз легень в Полтавській області / А.Г. Ярешко, М.Г. Бойко, М.В. Куліш, А.К. Вородюхіна, Н.М. Алієва // Матеріали V з'їзду фтизіатрів і пульмонологів України. – Київ, 2013. – С. 250.

14. Ефективність комплексного застосування гено- та фенотипових методів бактеріологічної діагностики туберкульозу / О.А. Журило, А.І. Барбова, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко, Н.М. Алієва, І.В. Дідик // V міжнародний медичний конгрес «Впровадження сучасних досягнень у практику охорони здоров'я України»: Тез. доп. – Київ, 2016. – С.19.

15. Епідеміологічний нагляд за медикаментозною стійкістю збудника туберкульозу в Україні / А.І. Барбова, О.А. Журило, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко, Н.М. Алієва // V міжнародний медичний конгрес «Впровадження сучасних досягнень у практику охорони здоров'я України»: Тез. доп. – Київ, 2016. – С.10–11.

ДОДАТОК Г

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. XIII конгрес Світової Федерації українських лікарських товариств (Львів, 01-03.10.2010 р.) – публікація;
2. V з'їзд фтизіатрів і пульмонологів України (Київ, 6-8.11.2013 р.) – усна доповідь і публікація;
3. Науково-практичний семінар «Мікробіологічні методи дослідження на туберкульоз та організація системи контролю якості при їх виконанні» (Київ, 16.09.2013 р.) – усна доповідь;
4. Науково-практичний семінар «Контроль якості культуральних методів діагностики туберкульозу» (Київ, 11.12.2014) – усна доповідь;
5. Республіканський науково-практичний семінар для бактеріологів протитуберкульозних закладів України «Прискорена мікробіологічна діагностика туберкульозу» (Київ, 24.04.2014) – усна доповідь;
6. V ювілейний міжнародний медичний конгрес «Впровадження сучасних досягнень у практику охорони здоров'я України» (Київ, 19-21.04.2016 р.) – усна доповідь і публікація;
7. Науково-практична конференція «Актуальні питання ведення хворих на хіміорезистентний туберкульоз на стаціонарному і амбулаторному етапах» (Київ, 30.03.2017) – усна доповідь.