

О. А. Журило, А. І. Барбова, С. В. Миронченко, А. В. Пустовалова СУЧАСНІ МЕТОДИ БАКТЕРІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ І ВИЗНАЧЕННЯ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ СТІЙКОСТІ ЗБУДНИКА ДО АНТИМІКОБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ

ДУ "Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського АМН України"

Зростаюча поширеність туберкульозу в усьому світі змушує по-новому поглянути на бактеріологічну діагностику захворювання і визначення медикаментозної стійкості (МС) *M. tuberculosis*, особливо у вперше виявлених хворих. Емпіричне припущення про МС збудника, засноване на відсутності ефекту від стандартного режиму терапії хворих на туберкульоз, іде в минуле. Подібний метод є небезпечним і шкідливим.

Стандартизація системи виділення МБТ із патологічного матеріалу і визначення їх МС вимагає використання технологій з оптимальним співвідношенням вартості і часу дослідження. Ця система буде економічно доступною в нашій країні та забезпечить найкращі результати в тому випадку, якщо нативні зразки будуть надходити безпосередньо у великі регіональні лабораторії з великим об'ємом роботи, оснащені відповідним обладнанням, де персонал має хорошу фахову підготовку. Ці стратегічні принципи підтримує ВООЗ і рекомендує країнам із високим рівнем захворюваності на туберкульоз [1, 2].

Останні успіхи в області молекулярної біології і просування у вивченні молекулярних основ МС *M. tuberculosis* дали нові методи швидкого виявлення МБТ у дослідному матеріалі і визначення їх МС. Проте, частково через дорожнечу впровадження, нові методики дотепер не можуть застосовуватися в більшості лабораторій, особливо у країнах, де туберкульоз представляє дуже серйозну проблему. Введення радіометричної системи ВАСТЕС® та її адаптація для проведення досліджень МС *M. tuberculosis* (ВАСТЕС® TB-460) стали проривом в експрес-виявленні росту мікобактерій і у визначенні їх МС. ВАСТЕС® зараз використовується в багатьох лабораторіях всього світу, в основному у розвинених країнах, ресурси яких дозволяють регулярно застосовувати цю дорогу автоматизовану методику. В Україні радіометрична система ВАСТЕС® до сьогодні не використовується.

Лабораторіям терміново потрібні швидкі і надійні методи виділення МБТ і визначення їх МС. Подібні методики були б доцільні не тільки для лікування хворих, але і для моніторингу за МС в регіонах.

Діагностичні методи можуть бути розділені на дві великі групи: *генотипові* і *фенотипові*. В даному огляді літератури представлено традиційні і нові фенотипові методи індикації і ідентифікації мікобактерій туберкульозу та визначення їх медикаментозної стійкості.

Виявлення комплексу *M. tuberculosis* у клінічних зразках є одним із основних діагностичних підходів у фтизіатрії. Однак, швидкий метод бактеріоскопії має низьку чутливість. Метод мікроскопічного дослідження кислотостійких бактерій із забарвленням за Цилям-Нільсеном дозволяє протягом доби отримати результати, але він має низьку чутливість — 33,0 %. Люмінесцентна мікроскопія збільшує чутливість бактеріоскопії на 10,0—30,0 %. Така

мікроскопія із забарвленням аураміном є високоспецифічною (99,0 %). Бактеріологічні методи більш інформативні, діагностична специфічність — 100 %, аналітична чутливість методу 100—200 мікробних клітин в 1,0 мл матеріалу. Проте, для отримання відповіді з використанням щільних яєчних середовищ необхідно 4—8 тижнів [3—7].

Труднощі у виявленні мікобактерій, не дивлячись на збільшення частоти захворюваності туберкульозом і тяжкість його перебігу, пов'язані, з одного боку, з великим відсотком олігобацилярних хворих, а з іншого — з мінливістю збудника. Крім того, такі біологічні особливості МБТ, як повільний ріст (3—4 тижні) й особливі поживні середовища, також вносять ряд складностей у діагностику туберкульозу [8].

Жодне з існуючих поживних середовищ не відповідає оптимальним вимогам, у зв'язку із чим для підвищення результативності методів бактеріологічної діагностики рекомендують користуватися паралельно двома — трьома різними середовищами. Традиційно в бактеріології використовується поживне середовище Левенштейна-Єнсена. До недоліків цього середовища відносяться низька частота індикації мікобактерій з досліджуваного матеріалу, довгі терміни появи перших колоній. Спроби створити поживне середовище не менш чутливе, ніж середовище Левенштейна-Єнсена, закінчилось розробкою середовища Фінна-2 [9].

Використання комплексу різних за хімічним складом середовищ частково вирішує проблему так званих, "видимих мікобактерій, що не ростуть". Зростаюча метаболічна мінливість мікобактеріальної популяції є основою парадоксальних ситуацій, коли навіть при наявності гіпербацилярності, що виявляється мікроскопічно, ріст культури отримують тільки на одному із різновидів середовищ. Потреба у використанні комплексу середовищ збільшується при олігобацилярності, періодичному одnorазовому бактеріовиділенні [10, 11, 12].

Проблема розробки швидких, високочутливих і специфічних методів діагностики туберкульозу є дуже актуальною. Враховуючи відносно низьку чутливість бактеріоскопії і тривалість методів культуральних досліджень, які тривають до 12 тижнів, експрес-діагностику збудника дозволяють проводити молекулярні методи. Але у клінічній практиці першочергове значення набувають лабораторні методи, які з більшою вірогідністю дозволяють верифікувати туберкульоз легень та позалегенові форми туберкульозу, а найбільш надійною ознакою захворювання на туберкульоз є виділення *M. tuberculosis* з патологічного матеріалу та визначення її МС [13].

Відомо, що традиційні мікробіологічні методи не в змозі швидко впоратися із завданнями виявлення *M. tuberculosis* і тим більше визначення її МС.

Однак, слід зазначити, що для практичного фтизіатра не настільки важливо бактеріологічне підтвердження діагнозу, як спектр МС виділеного від хворого штаму *M. tuberculosis*, особливо вперше виявленого клінічного ізоляту.

Основна вимога до дослідження МС — здатність розрізнити чутливі і стійкі штами *M. tuberculosis*. Таку відмінність цілком можливо провести традиційними фенотипічними методами. Справа у тому, що ізоляти *M. tuberculosis* від раніше не лікованих хворих досить однорідні за своєю чутливістю, що підтверджується досить вузьким діапазоном їх мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) традиційних антимікобактеріальних препаратів (АМБП) [14, 15]. Згідно із класичним визначенням МС штаму *M. tuberculosis*, стійкий штам це такий, який значимо відрізняється за ступенем чутливості від "дикого" штаму, який ніколи не стикався із АМПБ [16, 17]. Концентрації препаратів, за якими проводиться поділ штамів на чутливі і стійкі, так звані "критичні концентрації", повинні лежати десь між вищою МІК для "диких" штамів і нижчою — для тих ізолятів, що вважаються стійкими. Завдяки успіхам, досягнутим молекулярною біологією, ми, імовірно, зможемо дати нове визначення стійкості. При цьому не виключена поява нових проблем, особливо, якщо врахувати, що для ряду препаратів існує кілька генетичних механізмів, відповідальних за низький і високий рівень стійкості [18]. Також слід мати на увазі, що фенотипові відмінності в ступені стійкості можуть відображати різні частки стійких мутантів у бактеріальній популяції.

Дослідження МС, які засновані на культивуванні мікобактерій на щільному яєчному або агаровому середовищі, можуть проводитися прямим або непрямим методом. У прямому дослідженні набір середовищ із препаратом і без нього інокулюється концентрованим зразком. У непрямому дослідженні проводиться інокуляція середовища чистою культурою, отриманою в результаті росту на щільному середовищі (Левенштейна-Єнсена, агар 7Н10 або 7Н11). Може бути використана і бульйонна культура 7Н9, яка вирощена до стандарту № 1 за Мак-Фарлендом (5–8 діб), а в якості інокулята використовуються два розведення, 10^{-3} і 10^{-5} . Перевага прямого дослідження перед непрямим полягає у тому, що в першому випадку результати можуть бути отримані раніше (протягом 3 тижнів у чашках Петрі з агаром) і краще представляють вихідну бактеріальну популяцію.

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* [17, 18]. Найпоширенішим, впровадженим лабораторією Національного інституту фтизіатрії і пульмонології (НІФП) у роботу всіх мікобактеріологічних лабораторій України 3 рівня є метод пропорцій [16, 19, 20].

Розчини відповідних препаратів додаються в середовище перед її згортанням. В контрольні пробірки препарат не вноситься. Середовище розливається в скошеному положенні в пробірки, які поміщають в апарат для коагуляції. Остаточні концентрації препаратів у такому середовищі для спрощеного варіанту дослідження наведено в Наказі № 45 МОЗ України від 06.02.2002 р. [19]. В оригінальному стандартному варіанті потрібні додаткові концентрації [17, 18]. 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 кожну пробірку. Пробірки з нещільно закритими пробками залишаються на 24–48 год. у скошеному положенні, щоб середовище абсорбувало інокулят, після чого пробки

щільно закриваються, а пробірки інкубуються при 37 °С у вертикальному положенні. 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 [17].

Цікавим представляється традиційний для деяких країн метод КС, який не використовується в Україні. Згідно з визначенням, КС — це відношення МІК штаму пацієнта до МІК МС референтного штаму — $H_{37}Rv$, визначених в одному експерименті [18, 19]. 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. Завдяки цій особливості, метод КС став не тільки найбільш точним, але й найдорожчим серед традиційних методів, що використовують тверді середовища, оскільки для нього потрібно велика кількість порцій середовища [17, 18]. При зчитуванні результатів після 4 тижнів інкубації "ріст" фіксується при наявності 20 або більш колоній, а МІК — по визначенню найменшої концентрації, у присутності якої число колоній — менше 20. Діапазон, необхідний для досліджуваного штаму, визначається варіацією МІК $H_{37}Rv$ [18].

До 2002 р. в Україні використовувався метод абсолютних концентрацій, який і в цей час поширений у країнах СНД [19]. Критичні концентрації, що створюються в середовищі за цим методом, загалом збігаються з концентраціями для методу пропорцій, однак власно "критична" концентрація повинна бути встановлена спеціально для кожної лабораторії. Ріст 20 або більше колоній у присутності цих концентрацій є показником стійкості. Для дослідження контрольного штаму ($H_{37}Rv$) потрібні додаткові концентрації.

Бактеріальні суспензії доводять за допомогою оптичного стандарту до щільності, еквівалентної 1,0 мг/мл, і розводять 1:50. Культури, що містять препарати, і дві контрольні пробірки без препаратів інкубуються при 37 °С протягом 4 тижнів, або протягом 5–6 тижнів, якщо ріст під час першого зчитування недостатній. Результати фіксуються в такий спосіб: +++++ при зливному рості, +++ при великій кількості окремих колоній, + при наявності 50–100 колоній і \pm при наявності 20–49 колоній. Пригнічення росту фіксується, якщо число колоній становить менш 20 при рості від +++++ до +++ у контрольних пробірках (без препарату) [19].

Все більше поширення у світі здобувають прямі і непрямі дослідження з використанням агару 7Н10/7Н11.

Крім основного обладнання, необхідного для дослідження на середовищі Левенштейна-Єнсена, вирощування культури на агарі 7Н10/7Н11 вимагає інкубатора, в якому створюється концентрація 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 [21].

Центри контролю над захворюваністю туберкульозом (ЦКЗ) рекомендують проводити дослідження на агарі 7Н10 [22] з концентраціями препаратів відповідних до методу пропорцій. Критична частка бактерій, при якій штам вважається стійким, дорівнює 1,0 % для всіх препаратів, які досліджуються методом пропорцій на агарі (а

не 10,0 %, як для деяких препаратів у методі пропорцій). Агарове середовище 7Н10 або 7Н11 звичайно готується з наявної у продажу агарової основи Міддлбука 7Н10, яка збагачується олієвою кислотою, альбуміном, декстрозою і каталазою (ОАДК) в кількості 10,0 % від об'єму охолодженого розчину агару. Відповідні робочі розчини препаратів, приготовлені із кратної кількості вихідного розчину, додаються для досягнення кінцевих концентрацій. Вміст кожного флакону розподіляється в одному із квадрантів у наборі стерильних, розділених на чотири частини, чашок, приблизно по 5,0 мл на квадрант, один квадрант із середовищем без препарату і три — із середовищем, що містить препарат. Після інкубації в темряві при 37 °С протягом 12 год. чашки Петрі із препаратами зберігаються в темряві у холодильнику, і використання їх допускається на протязі 4 тижнів після приготування.

Для кожного штаму використовується два ідентичних набори чашок, один із яких інокулюється розведенням 10^{-3} , а інший — 10^{-5} бактеріальної суспензії (як і в непрямому дослідженні), по оптичній щільності, відповідно до стандарту № 1 за МакФарлендом, по 0,1 мл на квадрант. Чашки Петрі інкубуються протягом 3-х тижнів при 35–37 °С у атмосфері з 10,0 % CO_2 . Результати можуть бути отримані й раніше, якщо штам виявляється "стійким". Відсоток стійких бактерій у популяції реєструється із розрахунку і порівняння числа колонієутворюючих одиниць (КУО) у квадрантах, що містять препарат і без нього [22].

Застосування запропонованого ЦКЗ варіанту методу пропорції має сенс, коли в лабораторії постійно досліджується значна кількість штамів. Якщо ж дослідженню підлягає невелике число культур, можна застосовувати іншу методику [23, 24]. Імпрегновані препаратами диски асептично поміщають у центр квадрантів чашок, і на кожний із них за допомогою піпетки наливають по 5,0 мл збагаченого ОАДК агару 7Н10. Диски повинні бути занурені в агар, чашки Петрі залишають на 12 год. при кімнатній температурі (5 °С для чашок з етамбуолом (Е)), щоб препарати дифундували в агар.

Слід звернути увагу, що деякі лабораторії в модифікаціях методу пропорцій на агарі користуються частіше агаром 7Н11, а не 7Н10, оскільки він забезпечує кращий ріст штамів із множинною МС, які не у всіх випадках ростуть на агарі 7Н10 [25].

Останнім часом з'явилося кілька систем на рідких середовищах (ВАСТЕС®, MGIT, ESP) для непрямого дослідження. Так, для системи ВАСТЕС® використовується бульйон 7Н12, який виробляється у флаконах 12В (по 4,0 мл у кожному), 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 [26, 27].

Істотною перевагою цієї методики є її здатність виявляти ріст 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 [28]. Середній загальний час, витрачений на первинну ізоляцію, плюс непряме дослідження, становить 18 діб [26]. Істотним недоліком системи ВАСТЕС® є проблема утилізації великого об'єму радіоактивних матеріалів (флаконів 12В), хоча радіоактивність їх у край низька. Інший не-

долік — це висока вартість. ВАСТЕС® дорожче кожної системи для твердих середовищ, однак, дешевше, ніж нові системи на нерадіоактивних рідких середовищах [29–34].

Нові фенотипові методики, як правило, засновані на культуральному методі і для інтерпретації результатів вимагають візуального виявлення колоній *M. tuberculosis*. Через повільність росту *M. tuberculosis*, на виконання цих методик іде кілька тижнів. Зараз впроваджується група нових фенотипових методів, які дозволяють одержати "експрес-результат" шляхом використання різних технологій для виявлення ранніх ознак росту мікобактерій: вимір метаболізму за допомогою кольорових індикаторів, визначення споживання кисню або рання візуалізація мікроколоній [34–38].

Одна із недавно розроблених систем експрес-виявлення росту мікобактерій — MGIT (Бектон Дікінсон, US). Система MGIT складається з скляних пробірок, що містять модифіковане рідке середовище Міддлбука 7Н91 із флуоресцентним датчиком кисню, вмонтованим у дно кожної пробірки. Після інокуляції мікобактерій споживання розчиненого кисню викликає флуоресценцію після освітлення УФ-лампою. 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. У дослідженнях система MGIT добре витримала порівняння з методом пропорцій на середовищі Левенштейна-Єнсена, на агаровому середовищі та із системою ВАСТЕС® [29–35, 39].

Виробник фірма "Бектон Дікінсон" налагодила продаж автоматизованої системи ВАСТЕС MGIT 960, яка використовує пробірки MGIT [35]. Система впроваджена в роботу лабораторії мікробіології НІФП, а з 2009 р. лабораторія мікробіології НІФП є головною в Україні за впровадженням цієї системи в роботу мережі бактеріологічних лабораторій 3 рівня України [39].

У 1997 р. з'явився фенотиповий культуральний метод — дослідження біологічно ампліфікованого фагу (Phab) [36]. 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*. При випробуванні на 46 клінічних ізолятах *M. tuberculosis* за допомогою цього дослідження вдалося правильно визначити стійкість до R в 44 із них (95,7%), а до H — в 40 (87,0 %). Результати були отримані через 3–4 доби. Теоретично дослідження можна виконувати безпосередньо на клінічних зразках, що ще більше скорочує час очікування результатів. При цьому слабким місцем дослідження є специфічність мікобактеріофага (D29), який використовується в даному методі. Цей фаг може інфікувати і інші мікобактерії. Дану проблему можна розв'язати, вибравши інший бактеріофаг або змінивши специфічність D29, але потрібні додаткові дослідження [40].

E-test, це одна комерційна система (АБ БЮДИСК, 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 інокульовано дослідним штамом. Після інкубації можна зчитувати МІК у крапці перетинання еліпсу (створеного пригніченням росту) зі смужкою. Через високий відсоток по-

милкової стійкості метод не може бути рекомендований для лабораторій. Висока вартість смужок також є недоліком методу [37, 41–44].

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

Солі тетразолія використовувалися для вивчення метаболізму і життєздатності ряду мікроорганізмів [44, 45, 46], а також для визначення токсичності з'єднань для еукаріотичних і прокаріотичних клітин [47, 48]. Уайко D. M. et al. (1995) [49] 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 флуорометрії. Для дослідження МС набір пробірок, що містять розведення кожного з АМПБ, 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 Н, R, E і S, порівнюючи результати з тими, що були отримані методом пропорцій на агарі; відсоток збігу між двома методами склав 98,0 % для Н, R, E, і 94,0 % — для S. Випробування показують, що цю систему можна успішно адаптувати для досліджень АМПБ 1-го і 2-го ряду.

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. В процесі оцінки експрес-виявлення і діагностики *M. tuberculosis* цей метод добре показав себе в порівнянні з традиційним на середовищі Левенштейна-Єнсена [50, 51, 52]. При його використанні, як експрес-методу дослідження МС *M. tuberculosis*, Schaberg T. et al. (1995) [38] показали, що для виявлення мікроколоній потрібно в середньому менше часу, ніж для дослідження традиційними культуральними методами: для хворих із позитивним мазком — 11 діб проти 62, а для хворих із негативним мазком — 35 діб проти 72. Поточні випробування методу виявлення мікроколоній, як експрес-дослідження МС до R, H і препаратів 2-го ряду, демонструють його прекрасну кореляцію з методом пропорцій. Таким чином, виявлення мікроколоній є альтернативним експрес-методом для лабораторій з обмеженими ресурсами.

Було запропоновано ще кілька методик експрес-виявлення і визначення МС *M. tuberculosis*. Наприклад, дослідження біолоюмінесценції було використано для виявлення АТФ, яка виробляється живою *M. tuberculosis* у присутності антибіотиків і без них. Дослідження біолоюмінесценції випробовувалося на препаратах 1-го ряду; протягом 5–7 діб були отримані результати, що добре корелювали з методом КС і системою ВАСТЕС[®] [53, 54]. Інший експрес-метод дослідження МС до H і S заснований на вимірі рівню міколових кислот із використанням високоточної рідинної хроматографії [55]; було проведено стандартизацію цього дослідження за допомогою *M. tuberculosis* H37Rv. Для одержання результатів необхідно було 3–4 доби. Це дослідження, однак, не було випробувано на клінічних ізолятах *M. tuberculosis*. Також було проведено дослідження МС за допомогою флуоцитометрії, ко-

ли *M. tuberculosis* мітилась діацетатом флуоресцеїну; методика була випробувана на 17 клінічних ізолятах. Результати були одержані через 3 доби [56, 57]. Нова культуральна система ESP II (Аккьюмед Інтернейшнл, США), яка виявляє зміну тиску в результаті споживання або виділення газу зростаючими мікобактеріями, також випробовувалася при дослідженні МС до 4-х препаратів 1-го ряду [58]. Відсоток збігу результатів ESP з результатами ВАСТЕС[®] за даними випробування на 20 клінічних і 30 контрольних штаммах *M. tuberculosis* склав від 93,0 до 100 %; для оцінки робочих характеристик системи ESP необхідні подальші дослідження. Недоліком цієї системи є потреба в складному обладнанні, що обмежує використання методу в країнах із загрозовою ситуацією на туберкульоз.

Таким чином, в останні роки з'явилося багато нових можливостей виявлення і визначення МС *M. tuberculosis*. Група технологій — фенотипові методи — є більше неоднорідною. Деякі з них вимагають дорогого обладнання. Інші являють собою нескладні методики, які легко впровадити у звичайних лабораторіях. Проте необхідне їх додаткове випробування, їх калібрування з метою досягнення прийнятної чутливості, специфічності і відтворюваності, перше ніж вони зможуть замінити традиційні методики.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Heifets, L.* Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* — a neglected problem at the turn of the century [Text] / L. Heifets, G. A. Cangelosi // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* — 1999. — № 3. — P. 564–581.
2. *Foulds, J.* New tools of the diagnosis of tuberculosis: the perspective of developing countries [Text] / J. Foulds, R. O'Brien // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* — 1998. — № 2. — P. 778–783.
3. *Henry, J. B.* Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods [Text] / J. B. Henry // 19-th Ed. — Philadelphia, 1996. — P. 1194–1209.
4. *Дорожкова, И. Р.* Современные возможности повышения эффективности микробиологической диагностики туберкулеза [Текст] / И. Р. Дорожкова // Материалы VI съезда фтизиатров Беларуси. — Минск, 1998. — С. 179–180.
5. *Хоменко, А. Г.* Современная тенденция в эпидемиологии туберкулеза и пути уменьшения резервуара инфекции [Текст] / А. Г. Хоменко // Проблемы туберкулеза. — 1997. — № 1. — С. 4–6.
6. *Bouvet, E.* Transmission nosocomiale de tuberculose multiresistante patmi le patients infecters par le VIH: en France, a Paris [Text] / E. Bouvet // *Bull. Epidemiolog. Hebdomadaire.* — 1991. — V. 45, № 7. — P. 1710–1716.
7. *Бочкарёв, Е. Г.* Генодиагностика во фтизиатрии [Текст] / Е. Г. Бочкарёв, Т. С. Денисова, Э. В. Генерозов. — Москва, 2000. — 25 с.
8. *Гольшевская, В. И.* Организационно-методические подходы к совершенствованию микробиологической диагностики туберкулеза в России [Текст] / В. И. Гольшевская, М. В. Шульгин, Э. В. Севастьянов // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2002. — № 12. — С. 3–7.
9. *Романенко, В. Ф.* Характеристика различных видов микобактерий туберкулеза, культивированных на не свойственном им хозяине [Текст] / В. Ф. Романенко, А. М. Дяченко, В. С. Козлов // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 1997. — № 2. — С. 49–51.
10. *Калков, Л. П.* Организационные вопросы лабораторного выявления туберкулеза [Текст] / Л. П. Калков, А. Л. Кучеров, В. А. Аникин // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 1995. — № 2. — С. 2–3.
11. *Генерозов, Э. В.* Молекулярная характеристика полирезистентных клинических штаммов *M. tuberculosis* из России [Текст] / Э. В. Генерозов, Т. А. Аколиан, В. М. Говорун // Материалы 3-ей Всероссийской конференции "Генодиагностика в современной медицине". — Москва, 2000. — С. 273–274.
12. *Салина, Т. Ю.* Сравнительное изучение эффективности разных методов диагностики туберкулеза [Текст] / Т. Ю. Салина, Т. И. Морозова, Э. А. Федотов // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2000. — № 2. — С. 43–44.

13. Радюк, С. Н. Полимеразная цепная реакция в диагностике туберкулеза [Текст] / С. Н. Радюк, К. А. Рыжов, Г. Р. Мацевич // Журнал микробиологии. — 1998. — № 3. — С. 95–98.
14. Heifets, L. B. Drug susceptibility tests in the management of chemotherapy of tuberculosis. Chapter 3, 89–121. In: Heifets L. B. (ed.), Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections. CRC Press, Boca Raton, 1991.
15. Heifets, L. Drug susceptibility testing in mycobacteriology [Text] / L. Heifets // Clin. Lab. Med. — 1996. — № 16. — P. 641–656.
16. Мікробіологічні основи проведення моніторингу за медикаментозною стійкістю штамів *M. tuberculosis* в Україні [Текст]: методичні рекомендації / Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України. — К., 2004. — 24 с.
17. *Mycobacteria*: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance [Text] / G. Canetti [et al.] // Bull. World Health Org. — 1963. — № 29. — P. 565–578.
18. Canetti, G. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programs [Text] / G. Canetti, W. Fox, A. Khomenko // Bull. World Health Org. — 1969. — № 41. — P. 21–43.
19. Інструкція з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції [Текст] / Ю. І. Феценко, О. А. Журило, А. І. Барбова // Наказ МОЗ України № 45. — К., 2002. — 118 с.
20. Трофімова, П. С. Удосконалення методів лабораторної діагностики туберкульозу на основі сучасних уявлень про біологію його збудника [Текст]: дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 // Трофімова Поліна Станіславівна. — Харків, 2007. — 164 с.
21. Telenti, A. Genetics of drug resistance in tuberculosis [Text] / A. Telenti // Clin. Chest. Med. — 1997. — № 18. — P. 55–64.
22. Kent P. T. Kubica G. P. Public Health Mycobacteriology. A guide for the Level III Laboratory. Centers for Disease Control., Atlanta, GA, 1985.
23. Wayne, L. G. Preparation of tuberculosis susceptibility testing medium by means of impregnated discs [Text] / L. G. Wayne, L. Krasnow // Am. J. Clin. Pathol. — 1966. — № 45. — P. 769–771.
24. Griffith, D. E. Drug susceptibility tests for tuberculosis using drug impregnated discs [Text] / D. E. Griffith, H. L. Barrett, H. L. Bodily // Am. J. Clin. Pathol. — 1967. — № 47. — P. 812–817.
25. McClatchy, J. K. Susceptibility testing of mycobacteria [Text] / J. K. McClatchy // Lab. Med. — 1978. — № 9. — P. 47–52.
26. 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 [Text] / G. Roberts, N. L. Goodman, L. Heifets // J. Clin. Microbiol. — 1983. — № 18. — P. 689–696.
27. Siddiqi, S. H. Evaluation of rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* [Text] / S. H. Siddiqi, J. P. Libonati, G. Middlebrook // J. Clin. Microbiol. — 1981. — № 13. — P. 908–912.
28. Heifets, L. Rapid automated methods (BACTEC system) in clinical mycobacteriology [Text] / L. Heifets // Sem. Respir. Inf. — 1986. — № 1. — P. 242–249.
29. 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 [Text] / S. Rusch-Gerdes, G. E. Pfiffer, M. Casal // J. Clin. Microbiol. — 2006. — № 44. — P. 688–692.
30. 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 [Text] / E. Tortoli, M. Benedetti, A. Fontanelli // J. Clin. Microbiol. — 2002. — № 40. — P. 607–610.
31. 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* [Text] / A. Kruuner, M. D. Yates, F. A. Drobniowski // J. Clin. Microbiol. — 2006. — № 44. — P. 811–818.
32. Yan, A. H. Comparison of the MB/BacT and BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria from clinical specimens [Text] / A. H. Yan, S. H. Tsai // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. — 2000. — № 37. — P. 25–30.
33. 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 [Text] / F. Alcaide, M. A. Benitez, J. M. Escriba // J. Clin. Microbiol. — 2000. — № 38. — P. 398–401.
34. Автоматизированные методы культурального определения *Mycobacterium tuberculosis* на жидких средах [Текст] / О. А. Иртуганова [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2001. — № 3. — С. 53–56.
35. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria [Text] / B. A. Hanna [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1999. — № 37. — P. 748–752.
36. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* [Text] / S. M. Wilson [et al.] // Nat. Med. — 1997. — № 3. — P. 465–468.
37. AB BIODISK. Susceptibility testing of mycobacteria. Etest technical guide no. 5 AB I BIODISK, N. A., Inc. Piscataway, N. J., 1996.
38. Rapid drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using conventional solid media [Text] / T. Schaberg [et al.] // Eur. Respir. J. — 1995. — № 8. — P. 1688–1693.
39. Застосування автоматизованої системи МГІТ для діагностики туберкульозу легень і визначення медикаментозної стійкості мікобактерій [Текст]: методичні рекомендації / Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України. — К., 2007. — 24 с.
40. McNeerney, R. TB: the return of the phage. A review of fifty years of mycobacteriophage research [Text] / R. McNeerney // Int. J. Tuberc. Lung Dis. — 1999. — № 3. — P. 179–184.
41. Lebrun, L. Evaluation of the Etest for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium avium* to clarithromycin [Text] / L. Lebrun // J. Antimicrob. Chemother. — 1996. — № 37. — P. 999–1003.
42. Evaluation of Etest for susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria [Text] / J. R. Biehle [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1995. — № 33. — P. 1760–1764.
43. Evaluation of Etest for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium chelonae* and *M. fortuitum* [Text] / S. E. Hoffner [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1994. — № 32. — P. 1846–1849.
44. Reliability of two novel methods, alamar and Etest, for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [Text] / S. M. Novak [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1993. — № 31. — P. 3056–3057.
45. Detection of vancomycin resistance in enterococci by the Alamar MIC system [Text] / R. J. Zabransky [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1995. — № 33. — P. 791–793.
46. Pfaller, M. A. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates [Text] / M. A. Pfaller, A. L. Barry // J. Clin. Microbiol. — 1994. — № 32. — P. 1992–1996.
47. Ahmed, S. A. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocyte: an alternative to H3-thymidine incorporation assay [Text] / S. A. Ahmed, R. M. Gogal, J. E. Walsh // J. Immunol. Methods. — 1994. — № 170. — P. 211–224.
48. Page, B. A. new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro [Text] / B. A. Page, M. Mage, C. Noel // Int. J. Oncol. — 1993. — № 3. — P. 473–76.
49. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis* [Text] / D. M. Yajko [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1995. — № 33. — P. 2324–2327.
50. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection [Text] / G. I. Mejia [et al.] // Int. J. Tuberc. Lung Dis. — 1999. — № 3. — P. 138–142.
51. Rapid detection of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria by microscopic observation of growth on Middlebrook 7H11 agar [Text] / P. Idigoras [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 1995. — № 14. — P. 6–10.
52. Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method [Text] / D. F. Welch [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1993. — № 31. — P. 2178–2184.
53. Nilsson, L. E. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by bioluminescence assay of micobacterial ATP [Text] / L. E. Nilsson, S. E. Hoffner, S. Ansehn // Amimicrob. Agents Chemother. — 1988. — № 32. — P. 1208–1212.
54. Evaluation of a bioluminescence assay for rapid antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria [Text] / B. Beckers [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. — 1985. — № 4. — P. 556–561.
55. Determination of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* through mycolic acid analysis [Text] / E. Garza-Gonzalez [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1997. — № 35. — P. 1287–1289.
56. Safe determination of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to antimycobacterial agents by flow cytometry [Text] / A.V. Moore [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1999. — № 37. — P. 479–483.
57. Flow cytometric testing of susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to ethambutol, isoniazid, and rifampin in 24 hours [Text] / S. M. Kirk [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1998. — № 36. — P. 1568–1573.
58. Bergmann, J. S. Evaluation of the ESP culture system II for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to four primary antituberculous drugs [Text] / J. S. Bergmann, G. L. Woods // J. Clin. Microbiol. — 1998. — № 36. — P. 2940–2943.