

О. А. Журило, А. І. Барбова, Л. М. Сладкова НОВІ ФЕНО-ГЕНОТИПІЧНІ ТЕХНОЛОГІЇ В ДІАГНОСТИЦІ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

ДУ «Національний інститут фізіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»

НОВЫЕ ФЕНО-ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА

А. А. Журило, А. И. Барбова, Л. М. Сладкова

Резюме

Широкое распространение медикаментозно устойчивого туберкулеза является общемировой проблемой, оказывая негативное влияние на ситуацию относительно туберкулеза в глобальном масштабе. Быстрая диагностика заболевания и раннее начало эффективного лечения, основанного на подборе персонализированных режимов химиотерапии, лежат в основе предотвращения распространения туберкулеза. Особое значение для диагностики туберкулеза имеют микробиологические методы, которые позволяют выявить этиологический фактор процесса и определить медикаментозную чувствительность возбудителя.

В обзоре рассматриваются актуальные методы микробиологической диагностики туберкулеза, включая классические микробиологические (микроскопия диагностического материала; культуральные исследования на плотных и жидких питательных средах) и современные молекулярно-генетические тесты (ДНК-стрипы; GeneXpert; мультиплексная ПЦР и др.).

В статье приведены данные относительно современных методов бактериологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза, представлена их результативность и роль в верификации диагноза «туберкулез». Доказана эффективность их комплексного использования с целью улучшения качества исследований и быстрого выявления больных, выделяющих *M. tuberculosis*. Оценивается место описанных методов в диагностическом алгоритме лабораторий фтизиатрического профиля. Рассматриваются перспективы диагностики туберкулеза, связанные с использованием новых технологий. Обобщена информация о современном состоянии микробиологической диагностики туберкулеза, подчеркивается важность разработки и внедрения в диагностический процесс новейших технологий.

Ключевые слова: туберкулез, микобактерии туберкулеза, медикаментозная стойкость, методы бактериологической диагностики, молекулярно-генетические технологии, ПЦР, секвенирование.

Укр. пульмонол. журнал. 2022;30(1):35–46.

Журило Олександр Анатолійович

ДУ «Національний інститут фізіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»

Завідувач лабораторії мікробіології і біохімії

Доктор мед. наук, професор

10, вул. М. Амосова, Київ, 03038, Україна

Тел/факс: 38044 275-54-30, microbio@ifp.kiev.ua

NEW PHENO-GENOTYPIC TECHNOLOGIES IN DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

O. A. Zhurilo, A. I. Barbova, L. M. Sladkova

Abstract

Widespread drug-resistant tuberculosis is a global problem and can have a negative impact on the global tuberculosis situation. Rapid diagnosis of the disease and early initiation of effective treatment based on the selection of personalized chemotherapy regimens are the basis for preventing the spread of tuberculosis. Microbiological methods which can justify the etiology of the process and determine the drug susceptibility of the pathogen are of particular importance for the diagnosis of tuberculosis.

The review is focused on current methods of microbiological diagnosis of tuberculosis, including classical microbiological (diagnostic microscopy; solid and liquid media cultures) and modern molecular genetic tests (DNA strips; GeneXpert; multiplex PCR and other).

The article presents data on modern methods of bacteriological and molecular genetic diagnosis of tuberculosis, their effectiveness and role in verifying the diagnosis of tuberculosis. The effectiveness of their integrated use to improve the quality of research and rapid detection of patients with *M. tuberculosis* has been proven. The place of the described methods in the diagnostic algorithm of tuberculosis laboratories is estimated. Further prospects for the diagnosis of tuberculosis associated with the use of new technologies are considered. The information on the current state of microbiological diagnostics of tuberculosis is generalized, the importance of development and introduction of the latest technologies in the diagnostic process is emphasized.

Key words: tuberculosis, mycobacteria tuberculosis, drug resistance, methods of bacteriological diagnostics, molecular genetic technologies, PCR, sequencing.

Ukr. Pulmonol. J. 2022;30(1):35–46.

Oleksandr A. Zhurilo

SI "National institute of phthisiology and pulmonology named by F.G. Yanovsky NAMS of Ukraine"

Head of Laboratory of Microbiology and Biochemistry

Doctor of medicine, professor

10, M. Amosova str., Kyiv, 03038, Ukraine

Tel/fax: 38044 275-54-30, microbio@ifp.kiev.ua

На сьогодні туберкульоз (ТБ) залишається однією з найактуальніших проблем сучасної медицини. До основних особливостей захворювання в сучасних умовах необхідно віднести збільшення захворюваності в групах ризику, високу смертність, ко-інфекцію ТБ/ВІЛ-СНІД, а також зміну біологічних особливостей популяції мікобактерій, найважливішою з яких є медикаментозна стійкість (МС) [1–5]. Вирішення проблеми ТБ неможливе без своєчасного виявлення хворих, застосування ефективних методів діагностики цього інфекційного захворювання та своєчасного призначення лікування [1, 5].

Частота виявлення *M. tuberculosis* залежить від багатьох чинників. Це передусім методи, які застосовуються для діагностики ТБ, та мають різну результативність, оснащення лабораторій, кваліфікація кадрів, інформативність зразків матеріалу, що доставляються, наявність біологічної безпеки при роботі із зразками, яка запобігає їх контамінації при проведенні досліджень [1–4].

Сучасні методи лабораторної діагностики ТБ можна умовно поділити на дві великі групи [1, 6, 7]:

— *фенотипічні методи*, які широко використовуються нині в бактеріологічних лабораторіях протитуберкульозних закладів (ПТЗ) України. Це бактеріоскопія світлова і люмінесцентна, а також культуральний метод

діагностики, який дозволяє здійснити виділення збудника, його ідентифікацію, визначити його МС;

— *молекулярно-генетичні технології*, які засновані на виявленні ДНК збудника, що дозволяє в подальшому провести його генетичну ідентифікацію та визначити локуси МС.

Сучасні фенотипічні методи у діагностиці туберкульозу

Найбільш простим методом мікробіологічного виявлення збудника ТБ стало бактеріоскопічне дослідження мазка мокротиння, забарвленого за методом Циля-Нільсена. Методом мікроскопії мазка виявляють кислостійкі бактерії (КСБ), переважна більшість з яких є *M. tuberculosis*. Він використовується в Україні в усіх лабораторіях первинної ланки для виявлення бактеріовиділювачів і в лабораторіях ПТЗ України для подальшого бактеріологічного підтвердження діагнозу [1]. КСБ мають яскраво-червоний колір на блакитному фоні (рис. 1). Жоден з існуючих сучасних методів діагностики не може поки ще витіснити мікроскопію за показником «вартість-ефективність».

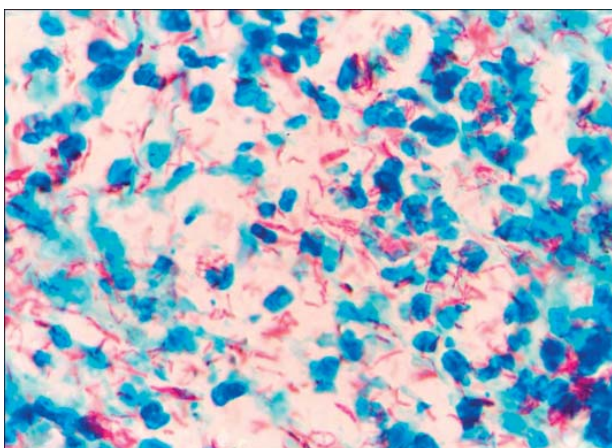


Рис. 1. Позитивний мазок мокротиння КСБ (3+) (забарвлення за Цилем-Нільсеном)

Метод бактеріоскопії простий, доступний, надійний, швидкий; легко піддається стандартизації; дозволяє порівнювати результати досліджень незалежно від того, де вони зроблені; полегшує навчання персоналу; дозволяє об'єктивно оцінити роботу; не вимагає дорогого високотехнологічного обладнання і дорогих витратних матеріалів, окремих робочих приміщень; дешевший в порівнянні з іншими методами дослідження; точно вказує на епідемічно небезпечні випадки, оскільки усі хворі з позитивним мазком фактично є справжніми випадками ТБ; при позитивному результаті дозволяє відразу призначити лікування (*емпіричне*).

Недоліком методу бактеріоскопії є низька чутливість — позитивний результат лише при наявності 5000–10000 клітин/мл рідини. При цьому виявляється не більше 50,0 % бактеріовиділювачів. Тому цей метод не дозволяє діагностувати випадки захворювання з незначним бактеріовиділенням (на ранніх стадіях хвороби); не дозволяє ідентифікувати кислостійкі нетуберкульозні мікобактерії (НТМБ) (збудники мікобактеріозів) при

виявленні їх в зразках клінічного матеріалу.

Слід звернути увагу керівників української фтизіатричної служби, що для підвищення ефективності та зниження вартості обстеження світовими експертами вносяться поправки до існуючих діагностичних алгоритмів, на наш погляд, не завжди обґрунтованих. Так, відповідно до останніх рекомендацій, ВООЗ пропонує відмовитися від проведення методів бактеріоскопії як неспецифічних маркерів з низькою чутливістю та замінити їх молекулярними експрес-тестами, а подальше мікроскопічне дослідження мазку мокротиння для оцінки бактеріального навантаження та ступеня контагіозності пацієнта проводити тільки при отриманні позитивного результату методу [8]. Однак, саме неспецифічність бактеріоскопії, тобто той факт, що вона виявляє будь-які кислостійкі бактерії, робить її незамінним методом діагностики, що не дозволяє пропустити випадки інфікування НТМБ, що викликають мікобактеріоз: при незастосуванні мікроскопії на першому етапі діагностики *M. tuberculosis* НТМБ будуть виключені з дослідження. Отже, виключення мікроскопії з першого етапу діагностичного алгоритму призведе до того, що хворі з мікобактеріозом випадуть з поля зору фтизіатрів або за відсутності належної видової диференціації та з урахуванням рідної резистентності інших мікобактерій будуть недостатньо діагностовані. Світова практика показує, що зі зниженням захворюваності на ТБ, зростає відсоток виявляємості хворих на мікобактеріоз, який, як відомо, дуже складно піддається лікуванню.

Культуральні дослідження — «золотий стандарт» лабораторної діагностики ТБ. Основна проблема культуральної діагностики ТБ пов'язана з тим, що *M. tuberculosis* відносяться до повільнозростаючих мікроорганізмів. Традиційно використовується культивування на щільних поживних середовищах, що дозволяє отримати видиме зростання культури в терміни від 2 тижнів до 3 міс, а потім провести тест медикаментозної чутливості (ТМЧ) до протитуберкульозних препаратів (ПТП), який займає від 3 до 4 тижнів. Отже, з моменту отримання діагностичного матеріалу до моменту встановлення медикаментозної чутливості (МЧ) *M. tuberculosis* на щільних поживних середовищах може пройти більше 3 місяців. В Україні до 2002 р. «золотим» стандартом бактеріологічної діагностики ТБ був культуральний метод виділення *M. tuberculosis* на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена (рис. 2).

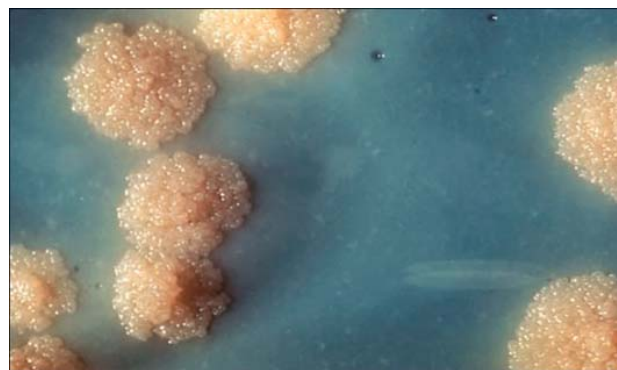


Рис. 2. Колонії *M. tuberculosis* на щільному поживному середовищі Левенштейна-Єнсена

Недоліком методу є велика тривалість дослідження — ріст мікобактерій та визначення профілю їх МС спостерігається не раніше ніж через 7–9 тижнів після здійснення посіву клінічного матеріалу. Це перешкоджає призначенню ефективного лікування у інтенсивну фазу лікування, що, в свою чергу, сприяє розповсюдженню хіміорезистентних форм ТБ [1, 7]. Тому головним напрямком удосконалення культуральної діагностики ТБ є скорочення часу здобуття результату дослідження. Прогрес у цій галузі досягнуто ще наприкінці минулого століття за рахунок розробки та впровадження комерційних систем культивування мікобактерій на рідких поживних середовищах з автоматизованою реєстрацією зростання, і відтоді не було запропоновано жодних інновацій. Сьогодні на ринку представлені три виробники автоматизованих систем на основі культивування в рідких середовищах: BACTEC MGIT (BD, США), BacT/ALERT3D (bioMérieux, Франція) та відносно новий продукт — платформа Mucolor TK (Salubris, Туреччина) [9–11].

Використання сучасних технологій культивування мікобактерій в рідких середовищах з автоматичною реєстрацією зростання дозволило скоротити терміни отримання культури в середньому до 10 діб, а також підвищити виявлення *M. tuberculosis* на 10,0–15,0 % порівняно з культивуванням на щільних поживних середовищах [10].

В Україні з 2002 р. використовується технологія BACTEC MGIT (рис. 3). Переваги автоматизованої системи культивування BACTEC MGIT перед культуральними дослідженнями на щільних поживних середовищах забезпечуються високою ефективністю стандартизованих та сертифікованих за ISO9001 виробництв реагентів та середовищ, а також підтримкою стандартних прото-



Рис. 3. Аналізатор мікробіологічний автоматичний BACTEC MGIT 960

колів досліджень. BACTEC MGIT дозволяє в короткий термін після отримання культури визначати МЧ до всіх ПТП I-го ряду та більшості препаратів II-го ряду [10, 12].

Індикація мікобактерій базується на використанні Mycobacteria Growth Indicator Tube. Основним компонентом системи є пробірка з модифікованим бульйоном Міддлбука 7H9, який підтримує ріст мікобактерій. У силікон на дні пробірки введений флуоресцентний компонент, чутливий до присутності кисню, що розчинений в бульйоні. Концентрація розчиненого кисню гасить випромінювання цієї речовини, і виявляється лише невелика флуоресценція. Надалі активно дихаючі мікобактерії споживають кисень та виділяють вуглекислий газ, що дозволяє спостерігати флуоресценцію речовини (рис. 4).



Рис. 4. Світіння позитивної культури *M. tuberculosis* в рідкому середовищі в апараті BACTEC MGIT 960

Система BACTEC MGIT 960 розцінює пробірку як позитивну, якщо кількість живих мікроорганізмів в ній досягло 1000 клітин/мл середовища. Прилад здійснює безперервний моніторинг пробірок з посівами (кожні 60 хв.). Автоматизована система BACTEC MGIT 960 являє собою якісний тест, що виконується протягом 4–42 днів. Прилад призначений також для проведення ТМЧ *M. tuberculosis* до ПТП I і II ряду (до 14 діб) [13, 14].

На сьогодні експерти з мікробіологічної діагностики ТБ визначили цей метод «золотим стандартом» діагностики ТБ, зважаючи на його стандартизацію, яка мінімізує людський фактор при приготуванні поживного середовища та оцінки росту мікобактерій. Дослідження за допомогою автоматизованої системи підвищує підтвердження ТБ у хворих з негативним мазком мокротиння в середньому на 20,0 % [15].

До недоліків методу відносять необхідність ручної пробопідготовки, що потребує суворого дотримання стандартів методики дослідження та вимог інфекційного контролю щодо біологічної безпеки при проведенні досліджень.

В Україні дослідження мокротиння в рідкому середовищі за допомогою мікробіологічної системи BACTEC MGIT 960 є необхідними складовими діагностичного алгоритму на ТБ згідно з Клінічним протоколом. Дослідження є доступним в усіх регіонах України. Зразки мокротиння з районів кожної з областей транспортують до лабораторії з мікробіологічної діагностики 3 рівня, яка зазвичай розташована в обласному ПТЗ України [1, 7].

Культуральні дослідження на ТБ не можуть виконуватися в приватних лабораторіях через їх біологічну небезпеку, необхідність приналежності до мережі з мікробіологічної діагностики ТБ з постійним зовнішнім контролем якості досліджень з боку Центральної референс-лабораторії МОЗ України, функції якої з 1997 р. виконує лабораторія мікробіології і біохімії туберкульозу НІФП НАМНУ, роботу якої, в свою чергу, контролює Супранациональна референс-лабораторія (м. Мюнхен, Німеччина) [3].

Системи з автоматичною реєстрацією зростання культури у рідкому середовищі є досконалим інструментом для проведення культуральної діагностики ТБ та постановки ТМЧ. Перевагами культуральної діагностики ТБ є можливість встановити остаточний діагноз при підозрі на ТБ; дозволяє: збільшити число виявлених випадків ТБ з бактеріовиділенням, нерідко на 20,0–40,0%; провести ідентифікацію і визначити МЧ виділеної культури і внести корективи в тактику лікування конкретного хворого; проводити епідагляд і моніторинг за МС збудника, що є інтегральною частиною визначення ефективності програм боротьби з ТБ; проводити діагностику випадків захворювання у пацієнтів з клінічними і рентгенологічними ознаками легеневого ТБ при повторно негативних результатах дослідження бактеріоскопії; діагностувати позалегенові форми ТБ і випадків захворювання у дітей; проводити контрольне обстеження хворих на ТБ з негативними результатами проведення стандартного курсу хіміотерапії і з ризиком наявності хіміорезистентних *M. tuberculosis*; проводити обстеження представників груп підвищеного ризику, у яких є симптоми захворювання. Чутливість методу 100 бактерійних клітин/мл матеріалу, що дозволяє діагностувати випадки захворювання у осіб з незначним бактеріовиділенням та у більш ранні терміни.

Молекулярно-генетичні тест-системи у діагностиці туберкульозу

У 1998 р. був повністю розшифрований геном *M. tuberculosis*. Це стало основою до розвитку і розробки молекулярно-генетичних методів діагностики ТБ. Виділення специфічних для генома *M. tuberculosis* нуклеотидних послідовностей ДНК використовуються в ПЛР-діагностиці ТБ. Скорочення термінів виявлення збудника, видової ідентифікації і визначення МС мікобактерій може бути досягнуто за рахунок застосування у лабора-

торній практиці молекулярно-генетичних методів. Їх використання дозволяє у найкоротші терміни проводити діагностику ТБ та визначити МС *M. tuberculosis* до ПТП, виявляти мікобактерії нетуберкульозного комплексу, призначити правильне лікування з самого початку (*emiotropna terapia при лікуванні ТБ*), що підвищує ефективність лікування, запобігає поширенню штамів мікобактерій з МС до ПТП [16].

Основою молекулярно-генетичних методів діагностики ТБ є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), що набула поширення в діагностиці різних інфекційних агентів, в тому числі мікобактерій. Принцип методу ПЛР полягає в ампліфікації, тобто багаторазовому збільшенні ділянок специфічної послідовності ДНК мікобактерій в мікрооб'ємі пробірки для ПЛР. Багаторазове подвоєння специфічних фрагментів ДНК призводить до збільшення їх кількості в геометричній прогресії до рівня, який дозволяє здійснити детекцію існуючими методами [17].

При оптимальному виборі гена для ампліфікації чи гена нуклеотидної послідовності цей метод характеризується високою силою, що дозволяє з високою специфічністю ідентифікувати збудник. Тести ампліфікації швидкі і безпечні. Перевагами методу є його висока специфічність (98,0–100 %), швидкість (результат 1–3 дні), висока чутливість у пацієнтів з позитивним мазком мокротиння ($\geq 95,0$ %), можливість проведення дослідження різних біологічних матеріалів.

До недоліків методу належить складність інтерпретації результатів (потребує спеціальної підготовки), висока вартість, низка чутливість у хворих з негативним мазком мокротиння (60,0–70,0 %) [17].

Ринок молекулярно-генетичних технологій сьогодні максимально насичений різноманітними розробками і, важливо розуміти, який із існуючих методів доцільно застосовувати у бактеріологічних лабораторіях різних рівнів. Нині щодо МЧ молекулярно-генетичними методами використовується кілька підходів. Усі вони засновані на знаннях про мутації, асоційовані з МС до того чи іншого ПТП [17–19].

Гібридизаційні технології визначення генотипної МС, засновані на зв'язуванні продуктів ПЛР зі специфічними зондами-олігонуклеотидами, іммобілізованими на матриці, яка є ДНК-стрипом, широко застосовуються в Україні та за кордоном. ДНК-стрипи є відносно недорогим методом, але мають досить низьку чутливість, а отже, можуть бути застосовані для зразків з позитивним мікроскопічним дослідженням або визначення генотипної МС у культур мікобактерій. На світовому ринку є кілька компаній-виробників ДНК-стрипів для визначення генотипної МС, два з яких (набори виробництва Hain Lifescience та INNO-LiPA) схвалені ВООЗ [15, 20].

В Україні (міста Київ, Харків, Львів, Миколаїв) застосовується ДНК-стрипова технологія виробництва Hain Lifescience (Німеччина): GenoType MTBDRplus, що дозволяє визначити МС *M. tuberculosis* до рифампіцину (R) і ізоніазиду (H) та GenoType MTBDRsl, призначений для визначення МС до фторхінолонів (Q), етамбутолу (E) та аміноглікозидів/циклічних пептидів. Група експертів ВООЗ за даними метааналізу відзначила високу специфічність ДНК-стрипової тест-системи на визначення МС

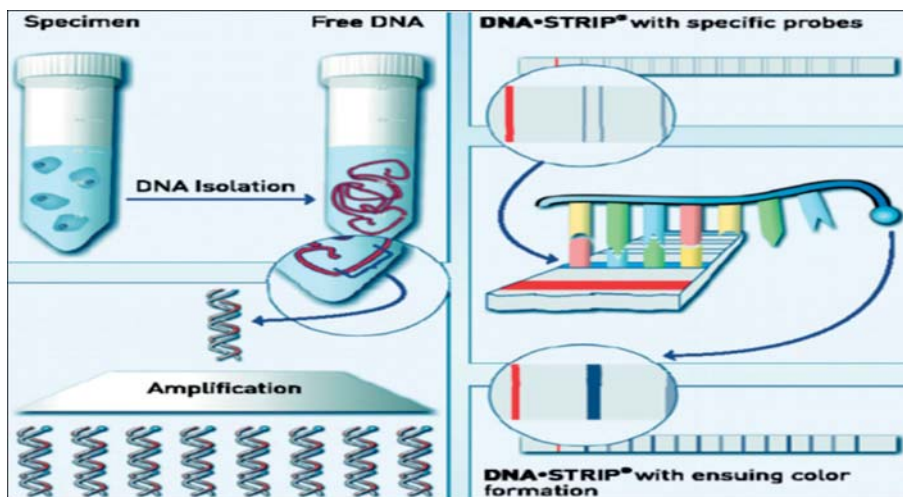


Рис. 5. Процедура проведення тесту GenoType MTBDR plus

до R та H (98,0 та 92,0 % відповідно до кожного препарату) та високу чутливість ($\geq 90,0\%$), а чутливість та специфічність тест-системи GenoType MTBDRsl була визнана задовільною ($\geq 70,0$ та $\geq 81,0\%$ відповідно) [15, 20].

Метод базується на ПЛР із використанням праймерів, що мічені біотином, для ампліфікації фрагменту генів, які пов'язані з MC. Далі відбувається гібридизація біотин-мічених продуктів із ДНК зондами, що іммобілізовані на мембранах, на яких містяться ДНК-зонди дикого типу (без мутацій) та ДНК-зонди для детекції відомих мутацій. Після чого проводиться візуалізація результатів гібридизації — ДНК *M. tuberculosis* та мутацій, що асоційовані з резистентністю — кольорові смужки на мембранах (рис. 5) [17].

Розшифрування мутацій та MC *M. tuberculosis* відбувається за допомогою комп'ютера або в ручному режимі (рис. 6).

Дана методика дозволяє проводити дослідження позитивних культур, виділених в рідкому середовищі із

застосуванням автоматизованої системи або на твердому поживному середовищі. Проте в даному випадку зростають витрати на одне дослідження [18]. Переваги даного методу полягають, насамперед, у швидкості (термін аналізу із зразка при позитивному мазку мокротиння або із культури складає 1–3 доби), безпечності, високій специфічності, високій чутливості при позитивному мазку мокротиння.

До недоліків методу відносять недостатню чутливість при негативних мазках мокротиння, високу вартість дослідження та наявність додаткових приміщень для проведення аналізу, які повинні відповідати вимогам щодо облаштування ПЛР приміщень. Низька чутливість методу (більше ніж 200 клітин/мл) та помірною доказова база для Q і низька — для ін'єкційних препаратів II ряду при застосуванні даного методу для визначення чутливості до ПТП II-го ряду є значними недоліками. Методика має складну систему детекції та вимагає наявності навчених кадрів та постійної системи підтримки практичних навичок [15].

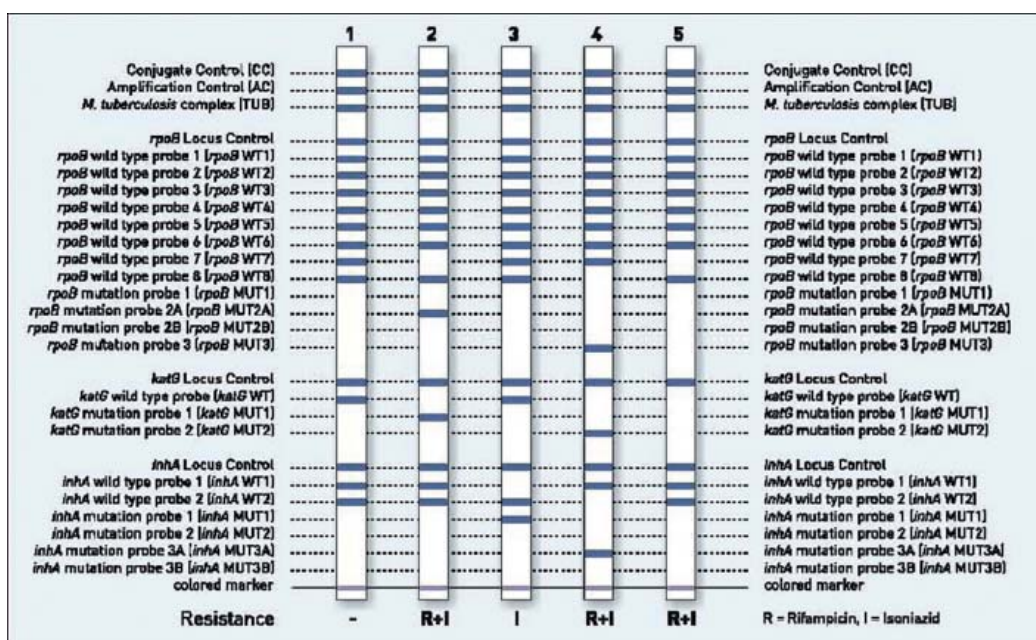


Рис. 6. Мутації в генах *M. tuberculosis*, які відповідальні за резистентність до R, H і комбінації H+R



Рис. 7. Автоматизована тест-система GeneXpert MTB/RIF

Для правильного та безпомилкового використання гібридизаційних технологій необхідне зонування лабораторії та наявність обладнання для різних процесів (виділення ДНК, ампліфікація, гібридизація та інтерпретація даних), тому визначення МЧ з використанням гібридизаційних технологій можливе тільки в великих обласних діагностичних центрах фтизіатричного профілю.

Сьогодні в Україні впроваджена ще одна тест-система — GeneXpert [19]. Картриджна технологія GeneXpert (Cepheid, США) дозволяє максимально спростити процес аналізу та в дуже короткі терміни (протягом 2 годин) одночасно виявляти видоспецифічні послідовності ДНК *M. tuberculosis* та з високою достовірністю визначати МС їх до R. Для діагностики МС до R застосовуються молекулярні зонди, що перекривають всю цільову поверхню гена *groB*. Застосування цієї тест-системи повністю виключає ризик контамінації, оскільки виділення ДНК і ампліфікація відбуваються послідовно в закритому картриджі. Тому метод може бути використаний у неспеціалізованих лабораторіях. Технологія була розроблена в США в 2009 р., схвалена ВООЗ та рекомендована для швидкої діагностики ТБ, особливо у країнах з високим рівнем поширеності ТБ та поширенням ВІЛ-інфекції. Дана технологія дозволяє виявляти МС до R з чутливістю 99,1 % та унеможлиблювати МС зі 100 % специфічністю.

Незважаючи на те, що використання картриджної технології для діагностики є дорогим для більшості країн з низьким і середнім рівнем економіки, для яких характерний високий рівень захворюваності на ТБ, технологія GeneXpert залишається домінуючою на світовому ринку продуктів для молекулярно-генетичної діагностики ТБ і продовжує активно розвиватися.

Система GeneXpert MTB/RIF є напівкількісною гніздовою ПЛР в реальному часі, здійснюється в картриджі та використовується для виявлення ДНК *M. tuberculosis* у зразках мокротиння або концентрованих осадів мокро-

тиння (лабораторія мікробіології НІФП перша в світі почала використовувати концентрований осад мокротиння, згодом це було схвалено ВООЗ та компанією-розробником — Cepheid); мутацій МС до R у зразках, отриманих від пацієнтів з ризиком резистентності до даного препарату (рис. 7) [19].

Тест-система GeneXpert закритого типу, в якій виділення та ампліфікація проводиться в одноразовому картриджі, попередня обробка діагностичного матеріалу зводиться до мінімальних маніпуляцій (рис. 8). Це дозволяє значно зменшити можливість контамінації матеріалу.

За даними ВООЗ, резистентність до R корелює з резистентністю до H. Резистентність до R і H (мультирезистентність) зазвичай свідчить про необхідність одночасного проведення повного тестування на МЧ до препаратів I-го і II-го ряду, але це можливо тільки після виділення культури мікобактерій [6].

Результат обробляється на комп'ютері та при наявності ДНК *M. tuberculosis complex* видається результат дослідження — позитивний/негативний, резистентність до R є/немає. Перевагами методу є швидкість (процес складає менше 2 годин), висока специфічність (100 %), висока чутливість для пацієнтів з позитивним мазком мокротиння (98,0 %), простий (необхідний мінімальний рівень навичок), не потребує окремих приміщень для проведення ПЛР.

До недоліків методу відносять можливість визначення МС збудника тільки до одного ПТП — R, що потребує подальших досліджень для діагностування мультирезистентного ТБ.

Для якісної діагностики і отримання достовірності даних результатів тест-системи GeneXpert MTB/RIF необхідно досліджувати правильно зібраний діагностичний матеріал. Пацієнт обов'язково повинен збирати мокротиння під наглядом медичного працівника.

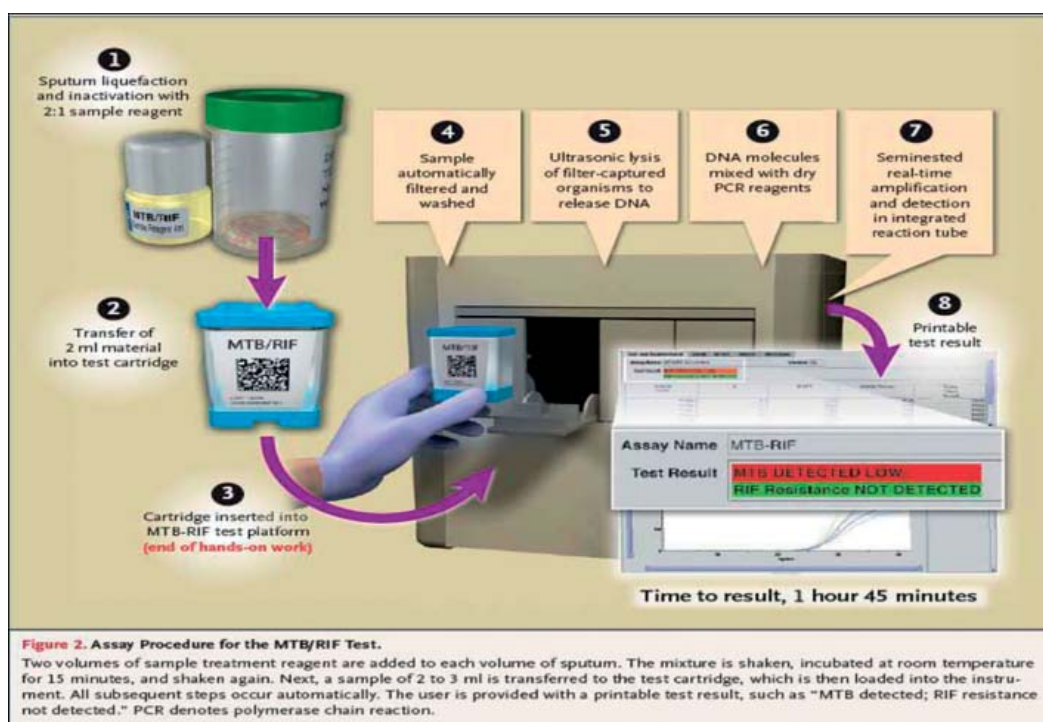


Рис. 8. Процес проведення дослідження в тест-системі GeneXpert MTB/RIF

Нещодавно компанія Cepheid випустила новий картридж Xpert MTB/RIF Ultra, який має більшу чутливість і вимагає меншого часу проведення аналізу порівняно зі своїм прототипом [23].

На відміну від попередньої версії Xpert MTB/RIF для підвищення чутливості тесту картридж Xpert MTB/RIF Ultra, крім гену *proB*, включає дві різні мультикопійні мішені ампліфікації (IS6110 і IS1081), використовується більша реакційна камера (50,0 мкл ПЛР-реакції в ультра проти 25,0 мкл в Xpert MTB/RIF). У нових картриджах Ultra використовується повністю вкладена ПЛР, більш швидке термоциклювання (негативний результат отримуємо за 65 хв., позитивний — за 77 хв.), а також поліпшені розчини та ферменти.

Проведені порівняльні дослідження зразків мокротиння з різною кількістю бактеріальних колонієутворюючих одиниць (КУО) на 1,0 мл від хворих на ТБ легень показали, що Xpert MTB/RIF Ultra має межу виявлення 11,8 КУО/мл, тоді як для Xpert MTB/RIF межа виявлення встановлена 114 КУО/мл, тобто нова система майже в 10 разів більш чутлива.

Для підвищення точності виявлення МС до R у тесті Xpert MTB/RIF Ultra використаний аналіз температури плавлення замість аналізу кривих флуоресценції ПЛР в реальному часі. Для визначення мутацій МС до R використовуються чотири зонди, що визначають область гена *proB*.

В тесті Xpert MTB/RIF Ultra для оцінки результату використовуються ті ж напівкількісні категорії, що і в Xpert MTB/RIF аналізі (високий, середній, низький і дуже низький), а також додана нова напівкількісна категорія «одиничні МТВ», яка відповідає найнижчому бактеріальному навантаженню. Результат «МТВ виявлено, одиничні» був доданий для підвищення ефективності виявлення *M. tuberculosis complex*.

Компанія Cepheid розробила також новий картридж Xpert MTB/XDR для підтвердження мультирезистентного ТБ та визначення широкої МС до збудника (визначає стійкий H, Q та аміноглікозидам).

У зразках, де виявлено *M. tuberculosis complex*, тест Xpert XDR/XDR може виявити мутації, пов'язані з резистентністю до H в генах *katG* і *fabG1*, міжгенної області *oxyR-ahpC* та промотору *inhA*; стійкість до етіонаміду (Et), пов'язана лише з мутаціями промотору *inhA*, мутації, пов'язані з резистентністю до Q, у областях, що визначають стійкість до кінолону *gyrA* та *gyrB*; і мутації, пов'язані з ін'єкційними препаратами II-го ряду (амікацин, канаміцин, капреоміцин) в гені *rrs* та області промотору *eis*. Інтерпретація результатів здійснюється програмним забезпеченням GeneXpert на підставі вимірів флуоресцентних сигналів і вбудованих алгоритмів розрахунку. В теперішній час тест Xpert XDR/XDR впроваджується в Україні.

Тест Xpert (Cepheid, США) був розроблений, оптимізований, валідований для виявлення туберкульозу шляхом дослідження мокротиння. Валідація даного методу лише для зразків мокротиння обмежують його застосування для досліджень інших видів дослідного матеріалу. Нами рекомендовано використовувати в картриджах Xpert MTB/RIF і Xpert MTB/RIF ULTRA для верифікації діагнозу «туберкульоз» не тільки мокротиння, а також різні позалегенові клінічні зразки (спинномозкова рідина, лімфатичні вузли та інші тканини, зразки з кісток і суглобів, бронхіальні аспірати або бронхоальвеолярні лаважі, шлункові аспірати, суглобова рідина, сеча, фекалії) та рекомендовані методики, які відпрацьовані в лабораторії мікробіології і біохімії НІФП НАМНУ [21]. Впровадження розробок лабораторії мікробіології і біохімії НІФП в Україні дозволить скоротити строки виявлення *M. tuberculosis*, з'явиться можливість верифікації ТБ у дітей і

олігобацилярних хворих, тестування позалегенового ТБ, підвищиться якість лабораторних досліджень.

Компанія Serheid оголосила про розробку нового продукту GeneXpert Omni — портативного приладу з акумуляторним живленням, призначеного для роботи з картриджами Xpert у периферійних лабораторіях або у «польових» умовах [22, 23].

Перспективною технологією визначення генотипної МС є мультиплексна ПЛР. Її основною перевагою порівняно з гібридаційними технологіями є відсутність етапу гібридації та оцінка результатів у режимі реального часу, що скорочує час аналізу, зводить до мінімуму ризик контамінації та оптимально для лабораторій із великим потоком аналізів. Сьогодні у світі існує чимала кількість подібних наборів, які не мають сертифікації ВООЗ, але схвалені національними наглядовими органами. Нові діагностичні системи, які були випущені на ринок лише торік, характеризуються низькою вартістю аналізу, швидким отриманням результату, високою надійністю та мобільністю обладнання. Для проведення аналізу використовуються картриджі чи чіпи нового покоління, які використовують технологію *lab-on-chip*. Наводимо декілька прикладів.

Тест Truenat MTB (Molbio Diagnostics, Індія) є ПЛР в режимі реального часу у форматі мікрочіпа, яка проходить в портативному пристрої з живленням від акумулятора. Результат одержують менш ніж за 1 годину. Обробка мокротиння та виділення ДНК здійснюється у приладі для підготовки зразків також з акумуляторним живленням з використанням протоколу на основі наночастинок. Чутливість і специфічність Truenat MTB можна порівняти з Xpert MTB/RIF [24].

Набір *Mycobacterium* iD Test-kit, що використовується в комплекті з інструментом Genedrive (Epistem Ltd., Великобританія), також призначений для виявлення ДНК збудника та визначення МС до R методом ПЛР у режимі реального часу. Для проведення тесту потрібна мінімальна підготовка діагностичного матеріалу, що полягає в нанесенні та інкубації зразка на спеціальному папері, що лізує, потім поміщається в картридж. Пристрій Genedrive дозволяє за один раз тестувати один зразок мокротиння (1 картридж) протягом однієї години з чутливістю та специфічністю понад 95,0 % [25].

Тест VereMTB (Veredus Laboratories, Сінгапур) випущений на ринок для використання тільки в дослідницьких цілях, але не для клінічної діагностики і використовується спільно з платформою VerePLEX Labon-Chip. Дана система дозволяє проводити тест на наявність у зразку *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. simiae/kansasii/scrofulaceum*, *M. abscessus/chelonae*, *M. xenopi* та *M. fortuitum*, а також визначати МС до R та H з межею детекції 100 геном-еквівалентів. Час отримання результату без урахування часу, що витрачається на виділення ДНК, не перевищує 3 години [26, 27].

Готуються до виходу на ринок і нові тест-системи, основний акцент у яких зроблений на можливості їх застосування у форматі point-of-care (біля ліжка), для чого створюються портативні інструменти з акумуляторним живленням, що забезпечують швидке отримання результату з мінімальною участю оператора. Вони, як і

описані вище тест-системи нового покоління, призначені для виявлення *M. tuberculosis* та визначення генотипної МС до R або, рідше, R і H [22].

Незважаючи на те, що було досягнуто успіхів у розробці методів молекулярної діагностики ТБ, складна процедура виділення ДНК залишається істотною перешкодою для повсюдного поширення цих технологій. Враховуючи, що як діагностичний матеріал при виявленні ТБ найчастіше використовується мокрота, що є в'язкою субстанцією внаслідок великого вмісту муцинів, до реагентів для пробопідготовки зразків мокротиння пред'являються особливі вимоги, обов'язковим з яких є ефективне розрідження зразка. Крім того, необхідно враховувати, що клітинна стінка представників роду *Mycobacterium* відрізняється високою міцністю та стійкістю до різних хімічних впливів.

В даний час на ринку доступні чотири платформи: m2000sp (Abbott Molecular, США), COBAS (Roche Diagnostics, Швейцарія) і високопродуктивна платформа компанії Hain Lifescience (Німеччина), що включає прилад GenoXtract 96 для виділення ДНК у форматі 96-лунокового планшета для подальшої ампліфікації (використовується в лабораторії мікробіології і біохімії НІФП НАМНУ) [22, 28, 29], а також BD MAX (BD, США), яка використовується в лабораторії Полтавського обласного ПТЗ [30]. Платформа ProT Workt WorkTop TruTip (Akonni Biosystems, США) перебуває у створенні. Всі закриті платформи виділення ДНК мають параметри, жорстко задані виробником, і пристосовані до роботи з реагентами і витратними матеріалами тієї ж фірми. Зміна робочого алгоритму неможлива. Незважаючи на те, що за рахунок цього забезпечується висока надійність результату, можливості діагностичної лабораторії виявляються обмеженими, прив'язуючи робочий процес до певного виробника.

Існуючі методи молекулярно-генетичної діагностики МС висувають різні вимоги до інфраструктури лабораторії та кваліфікації фахівців.

Видається доцільним на базі вже існуючих лабораторій використовувати автоматизовані станції для виділення ДНК, а для діагностики МС застосовувати гібридаційні або засновані на ПЛР в режимі реального часу методи, тим самим збільшивши пропускну здатність лабораторії. При обладнанні неспеціалізованих лабораторій акцент повинен бути зроблений на різних варіантах технологій, що мають на увазі мінімальну кваліфікацію персоналу і не потребують зонування приміщень, таких як GeneXpert і TrueNat.

Секвенування — майбутнє діагностики медикаментозностійкого туберкульозу

Аналізуючи подальші перспективи лабораторної діагностики ТБ, необхідно відзначити новітні технології секвенування, а саме секвенування нового покоління (Next Generation Sequencing, NGS), що прийшло на зміну методу Сенгера [31, 32]. Технології NGS здатні в короткий проміжок часу (години-дні) забезпечити прочитання ділянок бактеріальних геномів різної протяжності, які можуть бути зібрані в більш довгі або навіть цілі геномні послідовності з використанням біоінформатики. Завдяки

цьому з одного зразка можна отримати вичерпну інформацію про збудник, що включає видову ідентифікацію, визначення генетичних детермінант, асоційованих з МС до всього спектру ПТП, і визначити молекулярно-епідеміологічні маркери, що встановлюють належність до *M. tuberculosis* до світових штамових ліній.

В даний час на ринку представлено безліч платформ для NGS, у тому числі інструменти із середньою та високою пропускну здатністю, наприклад Bio-Rad Laboratories (GnuBio); Illumina (MiSeq [використовується в лабораторії мікробіології і біохімії туберкульозу НІФП НАМНУ] (рис. 9), HiSeq та NextSeq); Oxford Nanopore (minION, PromethION, GridION); PacBio (Sequel та RS2); Thermo Fisher (SOLiD, S5, індивідуальний genome machine [PGM], Proton); Qiagen (GeneReader) та Vela Diagnostics NGS platform (Singapore). Перераховані платформи відрізняються одна від одної розміром і вартістю одного читання і частотою помилок. Причому розмір читання часто є критичним параметром при роботі з мікобактеріями. Справа в тому, що геном *M. tuberculosis* містить множинні елементи, що повторюються, довжина яких становить від сотень до тисяч пар основ (п.о.). NGS, що забезпечують короткі читання (менше 1000 п.о.), наприклад, виробництва Illumina і Thermo Fisher, не здатні перекрити ці повтори, що унеможлиблює складання повного геному. Однак NGS, здатні робити довгі читання (більше 5000 п.о.), такі як технології PacBio і Oxford Nanopore, позбавлені такого недоліку [33, 34]. При цьому платформи, що здійснюють короткі читання, ідеальні для таргетного секвенування, що дозволяє детально вивчити послідовність будь-якого з генів, асоційованих з МС. Для визначення точної генетичної основи резистентності до більшості ПТП створено бази даних, такі як TBDrainDB та MUBII-TB-DB, що містять інформацію про мутації, асоційовані з МС [35-38]. Додатково розроблено програмний інструмент «TB profiler», заснований на інформації про МС *M. tuberculosis* до 11 препаратів внаслідок 1325 мутацій, що дозволяє обробити

дані секвенування та передбачити МС *in silico* [39]. Вже існують дослідження з достатньою мірою надійності, що передбачають МС за даними повногеномного секвенування культур *M. tuberculosis* [40, 41].

Існує ряд проблем, з якими може зіткнутися реалізація NGS у клінічних цілях [42, 43]. По-перше, це кількість та якість досліджуваної ДНК: можуть виникнути труднощі при тестуванні олігобацитарних клінічних зразків через недостатню кількість матеріалу для аналізу. Крім того, картина секвенування може бути спотворена внаслідок домішки неспецифічної ДНК мікрофлори. Тому сучасні пілотні дослідження як джерело ДНК використовують, як правило, чисту культуру збудника [41, 44].

По-друге, певну проблему для поширення NGS представляє величезний масив даних, отримуваний під час проведення досліджень. Обробка даних передбачає картування (mapping) або складання геному, визначення базового варіанта та порівняльний філогенетичний аналіз. Програмне забезпечення та алгоритми для кожного з цих етапів досить складні та потребують навичок біоінформатики. Частково вирішити цю проблему дозволить платформа Re-Seq, яка була запущена у квітні 2016 р. та дозволяє у вільному доступі будь-яким лабораторіям завантажувати та аналізувати дані NGS [45]. Отже, в даний час підготовка зразків, сама процедура секвенування та обробка отриманих даних є складним процесом, що вимагає участі висококваліфікованого персоналу. Тим не менш, у NGS-технологіях закладено великий потенціал для вдосконалення діагностики МС ТБ.

Той факт, що результати секвенування з визначенням МС до всього спектру ПТП можна отримати в середньому протягом 5 діб, роблять цей підхід безумовним лідером серед усіх діагностичних алгоритмів. І хоча технології секвенування в даний час недоступні для більшості країн з низьким та середнім рівнем економіки, проте вартість обладнання та реагентів продовжує знижуватися, а технології — удосконалюватися, і в найближчому майбутньому з'являться можливості широко поширити



Рис.9. Повногеномний секвенатор MiSeq (виробник Illumina)

технологію. Крім того, з розвитком нових схем терапії ТБ, у тому числі із застосуванням нових препаратів, паралельно мають розвиватися і діагностичні алгоритми, що дозволяють своєчасно виявляти випадки резистентності під час застосування нових схем. Повногеномне секвенування ідеально підходить для цих завдань. Підсумовуючи, можна сказати, що на сучасному етапі класичним методом мікробіологічної діагностики ТБ залишається культуральне дослідження, а для прискорення отримання результатів виявлення збудника та визначення МС запроваджено молекулярно-генетичні методи. Удосконаленню мікробіологічної діагностики ТБ, особливо МС форм, приділяється велике значення у світі. Нові розробки в галузі мікробіологічної діагностики ТБ спрямовані на скорочення часу отримання результату аналізу, підвищення специфічності та чутливості, зниження трудовитрат, мінімізацію кількості маніпуляцій з діагностичним матеріалом для підвищення біобезпеки, скорочення кількості та вартості необхідного обладнання.

Важливо відзначити, що на сучасному етапі розвитку діагностики ТБ визначення МЧ збудника молекулярно-генетичними методами є початковим етапом обстеження хворого, оскільки дозволяє з високою надійністю визначати резистентність до R, H та Q, що дає можливість визначати потік хворих на ТБ з МС на етапі надходження до стаціонару. Для повної діагностики необхідно застосування культуральних методів, оскільки діагностична цінність молекулярно-генетичних тестів визначення МС недостатня для призначення коректного режиму терапії.

У лабораторії мікробіології та біохімії туберкульозу НІФП використовується алгоритм діагностики, що ґрунтується на комбінації двох прискорених методів виявлення збудника та визначення його МЧ. На першому етапі проводиться скринінгове дослідження діагностичного матеріалу молекулярно-генетичними методами, що дозволяє за 1–2 дні отримати результати ідентифікації мутацій, пов'язаних із МС до R, H та Q, і таким чином встановити МС збудника до основних ПТП. За результатами цього етапу аналізу відбувається госпіталізація хворих із множинною МС до спеціалізованого відділення. На другому етапі проводиться визначення фенотип-

ної МС з використанням автоматизованої системи ВАСТЕС MGIT 960. За результатами цього етапу хворому призначається індивідуальна схема хіміотерапії, що включає максимально можливу кількість препаратів, до яких збереглася чутливість збудника. Вже зараз при дотриманні алгоритму у комбінації з клінічними методами можливе суттєве підвищення ефективності терапії МС ТБ.

Слід відзначити, що в лабораторії мікробіології і біохімії НІФП НАМНУ в теперішній час проводиться впровадження методик повногеномного і таргетного секвенування *M. tuberculosis*.

Заклучення

Сучасний стан бактеріологічної діагностики ТБ характеризується активним впровадженням в практичну діяльність високотехнологічних методів разом з існуючими класичними. Кожен з методів має свою діагностичну нішу, але незрівнянно більший ефект досягається при впровадженні «діагностичного ланцюжка», що полягає в поєднанні класичних фенотипічних методів з прискореними методами культуральної діагностики та молекулярно-генетичними технологіями. Саме такий підхід є раціональним і ефективним та всебічним при бактеріологічній верифікації діагнозу «туберкульоз».

Чи доцільно впроваджувати на сучасному етапі діагностики ТБ дорогі технології секвенування? На нашу думку, є доцільним. Лише кілька років тому метод ПЛР представлявся дорогим і сприймався скептично, поки не була напрацьована достатня доказова база. Поступове здешевлення ПЛР-технологій зробило ПЛР-діагностику ТБ, зокрема з МС, однією з найпоширеніших в Україні.

Також треба це віднести і до технологій NGS і вже сьогодні впроваджувати їх у діагностичну практику на базі мікробіологічних лабораторій великих фтизіатричних центрів. І тоді в міру розвитку та вдосконалення технології NGS у перспективі набудуть широкого поширення. Швидко, протягом кількох днів, отримання в одному тесті повної інформації про збудник сприятиме вдосконаленню діагностики ТБ і, як наслідок, підвищенню ефективності терапії, а також поглибленню знань про біологічні властивості збудника ТБ, що виведе заходи щодо контролю за ТБ на новий рівень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Фещенко ЮІ, Журило ОА, Барбова АІ. Лабораторна діагностика туберкульозної інфекції. К.: ВСВ «Медицина», 2019;304 с.
2. Фещенко ЮІ, Журило ОА, Барбова АІ, та ін. Стратегічні напрями розвитку лабораторної діагностики туберкульозу в Україні. К.: ВСВ «Медицина». 2017;120 с.
3. Журило ОА, Барбова АІ, Глушкевич ТГ, та ін. Система забезпечення якості бактеріологічних досліджень в закладах, що здійснюють мікробіологічну діагностику туберкульозу на різних рівнях надання медичної допомоги. — Кіровоград: «Поліум». 2013;71 с.
4. Глобальна доповідь щодо боротьби з туберкульозом. ВООЗ. Женева: ВООЗ. 2015;87 с.
5. Фещенко ЮІ, та ін. Туберкульоз із розширеною резистентністю: епідеміологічні аспекти, проблеми діагностики і лікування. Укр. пульмонолог. журн. 2013;(3)додаток:31–33.
6. Алгоритм лабораторної діагностики і моніторингу лікування туберкульозу легких і туберкульозу с лікарственою стійкістю на основі використання сучасних молекулярних методів. ВОЗ. Женева: ВОЗ, 2017, 29 с.
7. Журило ОА, Барбова АІ, Глушкевич ТГ, та ін. Стандарти бактеріологічної діагностики туберкульозу в лабораторіях протитуберкульозних закладів України. — Кіровоград: «Поліум». 2012;190 с.
8. ВОЗ. Европейское региональное бюро. Алгоритм лабораторной диагностики и мониторинга лечения туберкулеза легких и туберкулеза с лекарственной устойчивостью на основе применения современных быстрых молекулярных методов. WHO: Regional Office for Europe; 2017. WHO: Regional Office for Europe. 2017. Доступно по: <http://www.euro.who>.

REFERENCES

1. Feschenko Yul, Zhurilo OA, Barbova AI. *Laboratorna diagnostika tuberculoznoi infekcii* (Laboratory diagnosis of tuberculosis infection). K.: VSV «Medicina». 2019; 304 p.
2. Feschenko Yul, Zhurilo OA Barbova AI, ta in. *Strategichni napryami rozvitku laboratornoi diagnostiki tuberculozu v Ukraini* (Strategic directions of development of laboratory diagnostics of tuberculosis in Ukraine). K.: VSV «Medicina». 2017;120 p.
3. Zhurilo OA, Barbova AI, Glushkevich TG, ta in. *Sistema zabezpechennya yakosti bakteriolohichnich doslidzen v zakladach, sho zdysnuut microbiologichnu diagnostiku tuberculozu na riznich rinvnakh nadannya medichnoi dopomogi* (Quality assurance system for bacteriological research in institutions that perform microbiological diagnosis of tuberculosis at different levels of care). Kirovograd: «Polium». 2013;71 p.
4. *Globalna dopovid shodo borotbi z tuberculozom* (Global Report on Tuberculosis Control). WHOZ. Geneva: WHOZ. 2015;87 p.
5. Feschenko Yul, at al. *Tuberculos iz rozshirenoy rezistentnistu: epidemiologichni aspekti, problemi diagnostiki i likuvannya* (Tuberculosis with increased resistance: epidemiological aspects, problems of diagnosis and treatment). *Ukr. pulmonol. zhurn.* 2013;(3)dodatok:31–33.
6. *Algoritm laboratornoi diagnostiki i monitoringa lecheniya tuberculoza legkich i tuberculoza s lekarstvennoy ustoychivostu na osnovе primeneniya sovremennich bistrich molekularnich metodov* (Algorithm of laboratory diagnostics and monitoring of treatment of pulmonary tuberculosis and drug-resistant tuberculosis based on the use of modern fast molecular methods). WOZ. Geneva: WOZ. 2017;29 p.

- int/_data/assets/pdf_file/0004/336118/ELITBLaboratory_diag_algorithm_RUS.pdf?ua=1.
- Werngren J, Klintz L, Hoffner SE. Evaluation of a novel kit for use with the Bact/ALERT 3D system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(6):2130–2132. doi: 10.1128/JCM.02218-05.
 - Cruciani M, Scarparo C, Malena M, et al. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(5):2321–2325. doi: 10.1128/jcm.42.5.2321-2325.2004.
 - Ciftci IH, Karakece E. Comparative evaluation of TK SLC-L, a rapid liquid mycobacterial culture medium, with the MGIT system // *BMC Infect. Dis.* 2014;14:130. doi: 10.1186/1471-2334-14-130.
 - World Health Organization. WHO/CDS/TB/2018.5 Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. Geneva: WHO;2018.
 - Барбова АІ, та ін. Застосування автоматизованої системи MGIT для діагностики туберкульозу легень і визначення медикаментозної стійкості мікобактерій: методичні рекомендації (The use of automated MGIT system for the diagnosis of pulmonary tuberculosis and determination of drug resistance of mycobacteria: guidelines). Інститут фізіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України. Київ: ІФП. 2007;24 с.
 - Руководство по работе с системой BACTEC MGIT 960 / FAIND. 2006, 17 с.
 - Global tuberculosis report / WHO. Geneva : WHO. 2017;249 p.
 - Кричевская НА. Роль молекулярно-генетических методов исследования лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза в лечении больных деструктивным специфическим процессом легких // *Современные проблемы науки и образования.* 2014;(2):290–291. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=12350>
 - Молекулярные методы (гибридизация с ДНК зондами) для ускоренного скрининга пациентов с повышенным риском развития мультирезистентного туберкулеза / ВООЗ. Женева: ВООЗ. 2015;87 с.
 - Ritter C, et al. Evaluation of the AID TB Resistance Line Probe Assay for Rapid Detection of Genetic Alterations Associated with Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 2014;52:940–946. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.02597-13>
 - Руководство по внедрению диагностического теста Xpert MTB/Rif. Технические и операционные рекомендации; вопросы практического применения. ВОЗ. Женева: ВООЗ. 2014;48 с.
 - World Health Organization. WHO/HTM/TB/2013.01 The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs: expert group meeting report. Geneva: WHO. 2013. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78099>.
 - Журило ОА, Барбова АІ, Жеребко НМ, та ін., Використання альтернативних зразків в картриджах Gene Xpert MTB/RIF і Gene Xpert MTB/RIF Ultra для діагностики легеневого і позалегового туберкульозу та туберкульозу у дорослих і дітей в Україні: методичні рекомендації / НІФП НАМНУ. Київ. 2021; 19 с.
 - Pai M, Schito M. Tuberculosis diagnostics in 2015: landscape, priorities, needs, and prospects. *J. Infect. Dis.* 2015;211(2):21–28. doi: 10.1093/infdis/jiu803.
 - World Health Organization. WHO/HTM/TB/2017.04 WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF. Geneva: WHO. 2017. Available at: <https://www.who.int/tb/publications/2017/XpertUltra/en/>.
 - Nikam C, Kazi M, Nair C, et al. Evaluation of the Indian TrueNAT micro RT-PCR device with GeneXpert for case detection of pulmonary tuberculosis // *Int. J. Mycobacteriol.* 2014;3(3):205–210. doi: 10.1016/j.ijmyco.2014.04.003.
 - Castan P, de Pablo A, Fernandez-Romero N, et al. Point-of-care system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance in sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 2014;52(2):502–507. doi: 10.1128/JCM.02209-13.
 - Cabibbe AM, Miotto P, Moure R, et al. A lab-on-chip based platform for fast molecular diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 2015;53(12):3876–3880. doi: 10.1128/JCM.01824-15.
 - Lazzeri E, Santoro F, Oggioni MR, et al. Novel primer-probe sets for detection and identification of mycobacteria by PCR-microarray assay. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(11):3777–3779. doi: 10.1128/JCM.02300-12.
 - Hofmann-Thiel S, Molodtsov N, Antonenka U, et al. Evaluation of the Abbott Real-Time MTB and Real-Time MTB INH/RIF assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and resistance markers in respiratory and extrapulmonary specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2016;54(12):3022–3027. doi: 10.1128/JCM.01144-16.
 - Park KS, Kim JY, Lee JW, et al. Comparison of the Xpert MTB/RIF and Cobas TaqMan MTB assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51(10):3225–3227. doi: 10.1128/JCM.01335-13.
 - Zimmermann S, Dalpke A, Murray P, et al. Pre-validation of the BD Max MDR-TB assay for the rapid detection of MTBc DNA and mutations associated with rifampin and isoniazid resistance. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID); 2018 Apr 21–24; Madrid, Spain. 2018. Available at: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/material/?mid=61376.
 - Bertelli C, Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013;19(9):803–813. doi: 10.1111/1469-0691.12217.
 - Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1977;74(12):5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
 - Ashton PM, Nair S, Dallman T, et al. MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(3):296–300. doi: 10.1038/nbt.3103.
 - Sims D, Sudbery I, Illott NE, et al. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 2014;15(2):121–132. doi: 10.1038/nrg3642.
 - Flandrois JP, Lina G, Dumitrescu O. MUBII-TB-DB: a database of mutations associated with antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Bioinformatics.* 2014;15:107. doi: 10.1186/1471-2105-15-107.
 - Gardy JL. Towards genomic prediction of drug resistance in tuberculosis // *Lancet Infect. Dis.* 2015;15(10):1124–1125. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00088-2.
 - Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, et al. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med.* 2009;6(2):132–136. doi: 10.1371/journal.pmed.1000002.
 - Zhurilo OA, Barbova AI, Glushkevich TG, та ін. *Standarti bakteriologichnoi diagnostiki tuberculoso v laboratoriyach protituberculosisnih zakladiv Ukraini* (Standards of bacteriological diagnosis of tuberculosis in laboratories of anti-tuberculosis institutions of Ukraine). Kirovograd: «Polium». 2012;190 p.
 - WOZ. *Evropeiskoe regionalnoe buro. Algoritm laboratornoi diagnostiki i monitoring lecheniya tuberculoso legkikh s lekarstvennoy ustoychivostu na osnove primeneniya sovremennih bistrichnykh metodov.* WHO: Regional Office for Europe; 2017. WHO: Regional Office for Europe; 2017 (European Regional Office. Algorithm of laboratory diagnostics and monitoring of treatment of pulmonary tuberculosis and drug-resistant tuberculosis based on the use of modern fast molecular methods). Available at: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0004/336118/ELITBLaboratory_diag_algorithm_RUS.pdf?ua=1.
 - Werngren J, Klintz L, Hoffner SE. Evaluation of a novel kit for use with the Bact/ALERT 3D system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(6):2130–2132. doi: 10.1128/JCM.02218-05.
 - Cruciani M, Scarparo C, Malena M, et al. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(5):2321–2325. doi: 10.1128/jcm.42.5.2321-2325.2004.
 - Ciftci IH, Karakece E. Comparative evaluation of TK SLC-L, a rapid liquid mycobacterial culture medium, with the MGIT system. *BMC Infect. Dis.* 2014;14:130. doi: 10.1186/1471-2334-14-130.
 - World Health Organization. WHO/CDS/TB/2018.5 Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. Geneva: WHO;2018.
 - Barbova AI, та ін. *Zastosuvannya avtomatizovanoi sistemi MGIT dla diagnostiki tuberculoso legen i viznachennya medikamentoznoi stiykosti mikobakteriy: metodichni rekomendatsiyi* (The use of automated MGIT system for the diagnosis of pulmonary tuberculosis and determination of drug resistance of mycobacteria: guidelines). Institute of Tuberculosis and Pulmonology. FG Yanovsky Academy of Medical Sciences of Ukraine). IFP AMN Ukraini. Kyiv: IFP. 2007;24 p.
 - Rukovodstvo po rabote s sistemou BACTEC MGIT 960 / FAIND* (Manual for work with the VASTES MGIT 960 / FAIND system). 2006;17 p.
 - Global tuberculosis report / WHO. Geneva : WHO. 2017;249 p.
 - Krichevskiy NA. *Rol molekularno-geneticheskikh metodov issledovaniya lekarstvennoy ustoychivosti vuzbuditelya tuberkulosa v lechenii bolnih destruktivnim specificheskim processom legkikh* (The role of molecular genetic methods for the study of drug resistance of tuberculosis in the treatment of patients with destructive specific lung process). *Sovremennye problemi nauki i obrazovaniya.* 2014;(2):290–291. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=12350>
 - Molekularni metodi (gibridizatsiya s DNK zondami) dla uskorennoho skringinga pacientov s povishennim rizikom rozvittya multirezistentnoho tuberkuloza* (Molecular methods (hybridization with DNA probes) for accelerated screening of patients at increased risk of developing multidrug-resistant tuberculosis). WOZ. Geneva: WOZ. 2015;87 p.
 - Ritter C, et al. *Evaluation of the AID TB Resistance Line Probe Assay for Rapid Detection of Genetic Alterations Associated with Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Strains* (Xpert MTB / Rif Diagnostic Test Implementation Guide. Technical and operational recommendations; issues of practical application). *J. Clin. Microbiol.* 2014;52:940–946. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.02597-13>
 - Rukovodstvo po vnedreniu diagnosticheskogo testa Xpert MTB/Rif. Technicheskie i operatsionne rekomendatsiyi; voprosi prakticheskogo primeneniya* (Xpert MTB / Rif Diagnostic Test Implementation Guide. Technical and operational recommendations; issues of practical application). WOZ. Geneva: WOZ. 2014;48 p.
 - World Health Organization. WHO/HTM/TB/2013.01 The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs: expert group meeting report. Geneva: WHO;2013. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78099>.
 - Zhurilo OA, Barbova AI, Gerebko NM, et al. *Vikorisnanna alternativnih zrazviv v kartridzhach Gene Xpert MTB/RIF i Gene Xpert MTB/RIF Ultra dla dsagnostiki legenevogo i pozalegovevogo tuberculoso ta tuberculoso u droslich i ditey v Ukraini: metodichni rekomendatsiyi* (The use of alternative samples in gene cartridges Gene Xpert MTB / RIF and Gene Xpert MTB / RIF Ultra for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis and tuberculosis in adults and children in Ukraine «: guidelines). NIFP NAMNU. Kyiv. 2021;19 p.
 - Pai M, Schito M. Tuberculosis diagnostics in 2015: landscape, priorities, needs, and prospects. *J. Infect. Dis.* 2015;211(2):21–28. doi: 10.1093/infdis/jiu803.
 - World Health Organization. WHO/HTM/TB/2017.04 WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF. Geneva: WHO; 2017. Available from: <https://www.who.int/tb/publications/2017/XpertUltra/en/>.
 - Nikam C, Kazi M, Nair C, et al. Evaluation of the Indian TrueNAT micro RT-PCR device with GeneXpert for case detection of pulmonary tuberculosis // *Int. J. Mycobacteriol.* 2014;3(3):205–210. doi: 10.1016/j.ijmyco.2014.04.003.
 - Castan P, de Pablo A, Fernandez-Romero N, et al. Point-of-care system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance in sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 2014;52(2):502–507. doi: 10.1128/JCM.02209-13.
 - Cabibbe AM, Miotto P, Moure R, et al. A lab-on-chip based platform for fast molecular diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 2015;53(12):3876–3880. doi: 10.1128/JCM.01824-15.
 - Lazzeri E, Santoro F, Oggioni MR, et al. Novel primer-probe sets for detection and identification of mycobacteria by PCR-microarray assay. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(11):3777–3779. doi: 10.1128/JCM.02300-12.
 - Hofmann-Thiel S, Molodtsov N, Antonenka U, et al. Evaluation of the Abbott Real-Time MTB and Real-Time MTB INH/RIF assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and resistance markers in respiratory and extrapulmonary specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2016;54(12):3022–3027. doi: 10.1128/JCM.01144-16.
 - Park KS, Kim JY, Lee JW, et al. Comparison of the Xpert MTB/RIF and Cobas TaqMan MTB assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51(10):3225–3227. doi: 10.1128/JCM.01335-13.
 - Zimmermann S, Dalpke A, Murray P, et al. Pre-validation of the BD Max MDR-TB assay for the rapid detection of MTBc DNA and mutations associated with rifampin and isoniazid resistance. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID); 2018 Apr 21–24; Madrid, Spain. 2018. Available at: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/material/?mid=61376.

38. Prasanna A, Niranjana V. Classification of Mycobacterium tuberculosis DR, MDR, XDR isolates and identification of signature mutation pattern of drug resistance. *Bioinformatics*. 2019;15(4):261–268. doi: 10.6026/97320630015261.
39. Coll F, McNerney R, Preston MD, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med*. 2015;7(51):1–10. doi: 10.1186/s13073-015-0164-0.
40. Bradley P, Gordon NC, Walker TM, et al. Rapid antibiotic resistance predictions from genome sequence data for Staphylococcus aureus and Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Commun*. 2015;6:10063. doi: 10.1038/ncomms10063.
41. Pankhurst LJ, Del Ojo Elias C, Votintseva AA, et al. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study. *Lancet Respir. Med*. 2016;4(1):49–58. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00466-X.
42. Dippenaar A, Warren RM. Tuberculosis: Fighting an old disease with next-generation sequencing. *Elife*. 2015;4:e06782. doi: 10.7554/eLife.06782.
43. Lyon E, Cockerill FR, Bale SJ, et al. Next generation sequencing in clinical diagnostics: experiences of early adopters. *Clin. Chem*. 2015;61(1):41–49. doi: 10.1373/clinchem.2014.222687.
44. Walker TM, Kohl TA, Omar SV, et al. Whole-genome sequencing for prediction of Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study // *Lancet Infect. Dis*. 2015;15(10):1193–1202. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00062-6.
45. Schito M, Dolinger DL. A collaborative approach for «ReSeqing» Mycobacterium tuberculosis drug resistance: convergence for drug and diagnostic developers. *EBioMedicine*. 2015;2(10):1262–1265. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.10.008.
31. Bertelli C, Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect*. 2013;19(9):803–813. doi: 10.1111/1469-0691.12217.
32. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1977;74(12):5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
33. Ashton PM, Nair S, Dallman T, et al. MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. *Nat. Biotechnol*. 2015;33(3):296–300. doi: 10.1038/nbt.3103.
34. Sims D, Sudbery I, Llott NE, et al. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat. Rev. Genet*. 2014;15(2):121–132. doi: 10.1038/nrg3642.
35. Flandrois JP, Lina G, Dumitrescu O. MUBII-TB-DB: a database of mutations associated with antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:107. doi: 10.1186/1471-2105-15-107.
36. Gardy JL. Towards genomic prediction of drug resistance in tuberculosis // *Lancet Infect. Dis*. 2015;15(10):1124–1125. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00088-2.
37. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, et al. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med*. 2009;6(2):132–136. doi: 10.1371/journal.pmed.1000002.
38. Prasanna A, Niranjana V. Classification of Mycobacterium tuberculosis DR, MDR, XDR isolates and identification of signature mutation pattern of drug resistance. *Bioinformatics*. 2019;15(4):261–268. doi: 10.6026/97320630015261.
39. Coll F, McNerney R, Preston MD, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med*. 2015;7(51):1–10. doi: 10.1186/s13073-015-0164-0.
40. Bradley P, Gordon NC, Walker TM, et al. Rapid antibiotic resistance predictions from genome sequence data for Staphylococcus aureus and Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Commun*. 2015;6:10063. doi: 10.1038/ncomms10063.
41. Pankhurst LJ, Del Ojo Elias C, Votintseva AA, et al. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study. *Lancet Respir. Med*. 2016;4(1):49–58. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00466-X.
42. Dippenaar A, Warren RM. Tuberculosis: Fighting an old disease with next-generation sequencing. *Elife*. 2015;4:e06782. doi: 10.7554/eLife.06782.
43. Lyon E, Cockerill FR, Bale SJ, et al. Next generation sequencing in clinical diagnostics: experiences of early adopters. *Clin. Chem*. 2015;61(1):41–49. doi: 10.1373/clinchem.2014.222687.
44. Walker TM, Kohl TA, Omar SV, et al. Whole-genome sequencing for prediction of Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study // *Lancet Infect. Dis*. 2015;15(10):1193–1202. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00062-6.
45. Schito M, Dolinger DL. A collaborative approach for «ReSeqing» Mycobacterium tuberculosis drug resistance: convergence for drug and diagnostic developers. *EBioMedicine*. 2015;2(10):1262–1265. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.10.008.