

**О. А. Журило, А. І. Барбова, Ю. О. Чередник, П. С. Трофімова, С. В. Миронченко,
О. В. Павлова, О. В. Чернов, Л. М. Сладкова**
**ПОРІВНЯННЯ СИСТЕМ GENEXPERT MTB/RIF І GENOTYPE ЗІ СТРИПАМИ MTBDRPLUS
ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МУТАЦІЙ, ПОВ'ЯЗАНИХ З РЕЗИСТЕНТНІСТЮ *M. TUBERCULOSIS*
ДО РИФАМПІЦИНУ ПРИ ТУБЕРКУЛЬОЗІ**

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»
Міжнародна організація РАТН в Україні
Дніпровський державний медичний університет

**ПОРІВНЯННЯ СИСТЕМ GENEXPERT MTB/RIF І GENOTYPE ЗІ
СТРИПАМИ MTBDRPLUS ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МУТАЦІЙ,
ПОВ'ЯЗАНИХ З РЕЗИСТЕНТНІСТЮ *M. TUBERCULOSIS* ДО
РИФАМПІЦИНУ ПРИ ТУБЕРКУЛЬОЗІ**

**О. А. Журило, А. І. Барбова, Ю. О. Чередник, П. С. Трофімова,
С. В. Миронченко, О. В. Павлова, О. В. Чернов, Л. М. Сладкова**

Резюме

Мета роботи — проаналізувати рівень відповідності двох молекулярно-генетичних (МГ) методів GeneXpert MTB/RIF і GenoTypeDRplus при визначенні медикаментозної стійкості (МС) *M. tuberculosis* до рифампіцину (R) при виявленні мутацій в області визначення резистентності до R (RRDR), пов'язаних з МС до цього препарату.

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

Результати та обговорення. Системи GeneXpert MTB/RIF і MTBDRplus націлені на ту саму область визначення резистентності рифампіцину — 81 п.о. (RRDR) субоддиниці бактеріальної РНК-полімерази (rpoB) для виявлення мутацій з використанням ДНК-зондів, тобто існує відповідність зондів один одному і очікувана схожість зв'язування зондів. Нами проведено аналіз усіх зразків мокротиння з використанням методів GeneXpert MTB/RIF та GenoType MTBDRplus та фенотипного BACTEC MGIT. Встановлено рівень відповідності двох молекулярно-генетичних методів виявлення пов'язаних з рифампіцином мутацій в області RRDR. Зона RRDR 81bp гена rpoB неузгоджених випадків була вивчена секвенуванням. GeneXpert MTB/RIF та GenoType DRplus збіглися з фенотипичним методом відповідно у 92,7 % та 89,6 % випадках резистентності *M. tuberculosis*. Повний збіг результатів GeneXpert MTB/RIF та GenoTypeMTBDRplus у 92,7 % випадків. GeneXpert MTB/RIF та GenoType DRplus показали схожу схему збою зв'язування зондів дикого типу (WT-зондів) при скануванні області 81 п.о. (RRDR-

**COMPARISON OF GENEXPERT MTB/RIF AND GENOTYPE SYSTEMS
WITH MTBDRPLUS STRIPS FOR DETECTION OF MUTATIONS,
ASSOCIATED WITH *M. TUBERCULOSIS* RESISTANCE TO RIFAMPICIN
IN TUBERCULOSIS**

**A. A. Zhurilo, A. I. Barbova, Yu. A. Cherednik, P. S. Trofimova,
S. V. Mironchenko, O. V. Pavlova, A. V. Chernov, L. M. Sladkova**

Summary

The aim was to analyze the level of compliance of two molecular genetic methods GeneXpert MTB/RIF and GenoTypeDRplus in determining the drug resistance of *M. tuberculosis* to rifampicin when detecting mutations in the RRDR region associated with drug resistance.

Object and methods. We studied strains of *M. tuberculosis* with resistance to rifampicin, which was detected by any of the studied molecular genetic methods. 96 sputum samples were taken. Sputum smears were examined for the presence of acid-fast bacteria by microscopy after staining with the Ziehl-Neelsen method. The material was inoculated into Middlebrook 7H9 broth and on Lowenstein-Jensen medium. The liquid medium was incubated in the BACTEC MGIT system. An immunochromatographic test was used to identify the strains. The drug susceptibility test of *M. tuberculosis* to rifampicin was performed using the BACTEC MGIT system. The GeneXpert MTB/RIF test was performed according to the manufacturer's instructions. The GenoTypeDRplus assay was performed on decontaminated and concentrated sputum samples. The process was carried out in three stages: DNA extraction from the processed sputum sample; amplification of the RRDR region by PCR; hybridization of the PCR product to specific oligonucleotide probes immobilized on the test strip. For sequencing, *M. tuberculosis* DNA isolation was performed using the QIAamp® DNA Mini Kit. The DNA concentration was measured on a Denovix Quantus spectrophotometer. Targeted panel amplification was performed using the Deeplex Myc-TB kit. Amplicon purification was performed using Agencourt AMPure XP magnetic beads. Quantitative analysis of the purified amplification products was performed using a Qubit fluorometer. The *M. tuberculosis* DNA library was prepared for sample sequencing using the Nextera XT DNA library preparation kit. The library used 5.0 µl of input DNA at a concentration of 0.2 ng/µl. Sequencing was performed on MiSeq equipment with the library normalization and denaturation protocol.

Results and discussion. The GeneXpert MTB/RIF and MTBDRplus systems target the same 81 bp rifampicin resistance domain. (RRDR) subunits of bacterial RNA polymerase (*rpoB*) for mutation detection using DNA probes, i.e. there is a correspondence of probes to each other and an expected similarity of probe binding. We analyzed all sputum samples using GeneXpert MTB/RIF and GenoType MTBDRplus and phenotypic BACTEC MGIT methods. The level of agreement between two molecular genetic methods for the detection of rifampicin-associated mutations in the RRDR region has been established. The RRDR 81bp region of the *rpoB* gene of mismatched cases was studied by sequencing.

GeneXpert MTB/RIF and GenoType DRplus matched the phenotypic method in 92.7% and 89.6% of cases of *M. tuberculosis* resistance, respectively. Complete agreement between the results of GeneXpert MTB/RIF and GenoTypeMTBDRplus was observed in 92.7% of cases. GeneXpert MTB/RIF and GenoType DRplus showed a similar pattern of binding failure of wild type probes (WT-probes) when scanning the 81 bp region (RRDR-domain), which leads to stability diagnostics through probe failure software. Sequencing of the RRDR region of "mismatched" strains showed that

область), що призводить до діагностики стійкості через програмне забезпечення відмови зонда. Секвенування RRDR-області «невідповідних» штамів показало, що зонди GeneXpert виявили сім «невідповідних» випадків правильно, а GenoTypeDRplus був помилковим у всіх випадках. GeneXpert продемонстрував велику точність у виявленні R-стійкості для неузгоджених ізолятів у порівнянні з GenoTypeDRplus. GeneXpert MTB/RIF має низку інших переваг у порівнянні з GenoTypeDRplus. GeneXpert MTB/RIF відносно легше виконувати, вимоги до біологічної безпеки мінімальні, менший час для дослідження, більша автоматизація процесу дослідження, що забезпечує меншу ймовірність людських помилок та більший рівень відтворюваності результатів. З огляду на ці факти та результати GeneXpert MTB/RIF, знайдені у дослідженні, рекомендовано використовувати GeneXpert MTB/RIF для виявлення MPTB.

Висновки. Секвенування 81bp області RRDR неузгоджених штамів *M. tuberculosis* показало, що GeneXpert MTB/RIF виконував більш точно аналіз, ніж GenoTypeDRplus при виявленні мутацій, пов'язаних зі стійкістю до рифампіцину. GeneXpert MTB/RIF відносно легше виконувати, вимоги до біологічної безпеки мінімальні, менший час для дослідження, більша автоматизація процесу дослідження, що забезпечує меншу ймовірність людських помилок та більший рівень відтворюваності результатів, тому доцільно використовувати його для виявлення мультирезистентного туберкульозу. Аналітичне рішення Deeplex Myc-TB дозволяє отримати великий обсяг вагової інформації з маркерів лікарської стійкості до антимікобактеріальних препаратів та прискорити процес аналізу даних завдяки зручному використанню програмного забезпечення.

Ключові слова: туберкульоз, мікобактерії туберкульозу, лікарська стійкість, молекулярно-генетичні системи GeneXpert MTB/RIF та GenoTypeDRplus, фенотипова система BACTEC MGIT, секвенування.

Укр. пульмонол. журнал. 2022;30(4):34–41.

Журило Олександр Анатолійович
ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології
ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»
Завідувач лабораторії мікробіології і біохімії
Д. мед. наук, професор
10, вул. М. Амосова, Київ, 03038, Україна
Тел/факс: 38044 275-54-30, microbio@ifp.kiev.ua

GeneXpert probes detected seven “mismatched” cases correctly, and GenoTypeDRplus was erroneous in all cases. GeneXpert has demonstrated greater accuracy in R-resistance detection for mismatched isolates compared to GenoTypeDRplus. GeneXpert MTB/RIF has a number of other benefits over GenoTypeDRplus. GeneXpert MTB/RIF is relatively easier to implement, biosafety requirements are minimal, study times are shorter, and the study process is more automated, resulting in less human error and more reproducible results. Given these facts and the results of GeneXpert MTB/RIF found in the study, it is recommended that GeneXpert MTB/RIF be used to detect MDR-TB.

Conclusions. Sequencing of the 81bp RRDR region of mismatched *M. tuberculosis* strains showed that GeneXpert MTB/RIF performed more accurately than GenoTypeDRplus in detecting mutations associated with rifampicin resistance.

GeneXpert MTB/RIF is relatively easier to perform, biosafety requirements are minimal, time to study is shorter, and the study process is more automated, resulting in less human error and greater reproducibility of results, so it is reasonable to use it for the detection of multidrug-resistant tuberculosis.

The Deeplex Myc-TB analytical solution delivers a wealth of insightful information from antimycobacterial drug resistance markers and speeds up data analysis with easy-to-use software.

Key words: tuberculosis, Mycobacterium tuberculosis, drug resistance, GeneXpert MTB/RIF and GenoTypeDRplus molecular genetic systems, BACTEC MGIT phenotypic system, sequencing.

Ukr. Pulmonol. J. 2022;30(4):34–41.

Oleksandr A. Zhurilo
SO “National institute of phthisiology and pulmonology
named by F.G. Yanovsky NAMS of Ukraine”
Head of the Laboratory of Microbiology Biohimia
Doctor of medicine, professor
10, M. Amosova str., Kyiv, 03038, Ukraine
Тел/факс: 38044 275-54-30, microbio@ifp.kiev.ua

Туберкульоз (ТБ) залишається серйозною проблемою охорони здоров'я в Україні. Зараження ТБ легень відбувається через повітря, що дозволяє збуднику легко поширюватись. Стрімке збільшення кількості хворих на ТБ з множинною медикаментозною стійкістю (MDR-ТБ) ще більше ускладнює ситуацію та загрожує поставити під загрозу всі попередні досягнення, які були отримані в результаті глобальних програм боротьби з ТБ в останні роки. MDR-ТБ розвивається за умови, якщо зараження людини відбувається *M. tuberculosis*, яка стійка до двох найбільш сильних протитуберкульозних препаратів (ПТП) I-го ряду — рифампіцину (R) та ізоніазиду (H) з резистентністю до будь-якого іншого ПТП I-го ряду. Медикаментозна стійкість (МС) *M. tuberculosis* до R та H зазвичай вказує на необхідність визначення чутливості до всіх препаратів, включаючи препарати II ряду терапії. Впровадження нових та швидких діагностичних систем збільшило виявлення випадків MDR-TB останніми роками. Тим не менш, ще велика кількість випадків MDR-TB не виявляється, що наголошує на необхідності більш широкого впровадження інструментів швидкого виявлення МС до ПТП *M. tuberculosis*. Швидка та точна діагностика ТБ легень є важливим елементом лікування та контролю ТБ [4, 22].

R є ПТП I-го ряду, який широко використовується в різноманітних схемах лікування легеневого ТБ, механізм

дії якого полягає в інгібуванні синтезу рибонуклеїнової кислоти (РНК) *M. tuberculosis*. Переважна більшість випадків (від 95,0 до 98,0 %) резистентності до R відбувається через мутації в 81 парі (bp) основ (кодон 507-533) області визначення резистентності R [Rifampicin Resistance Determining Region (RRDR-область)] в гені, що кодує бета-субодиницю РНК-полімерази (*rpoB*) [8, 10, 19]. Стійкість до R можна використовувати як сурогатний маркер для MDR-ТБ, оскільки більше 90,0 % резистентних до R ізолятів *M. tuberculosis* також стійкі до H [6, 8, 17].

З резистентністю до R пов'язано мутації лише в гені *rpoB*. Ділянка гену довжиною у 81 п.н. (RRDR-область) — кодони 507-533 за нумерацією *E.coli*, що відповідають кодонам 426-452 за нумерацією *M. tuberculosis*, (яка є більш сучасною), є місцем основних змін та основною, і майже єдиною мішенню для молекулярних тестів, на відміну від інших існуючих, і нових препаратів, для яких виявлення резистентності вимагає молекулярного дослідження часто не одного гену, а загалом понад 90 генів у повному геномі *M. tuberculosis*, який має понад 4 мільйони пар основ [20].

У цілому ряді робіт було показано, що мутації в *rpoB* пов'язані з досить широким спектром мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК) R і що не всі *rpoB*-мутації надають стійкість до R, що вимірюється стандартним фенотипічним тестом медикаментозної чутливості (фТМЧ) на

основі культивування в рідкому поживному середовищі (BACTEC MGIT 960 [2]).

Загалом виділяють 2 групи мутацій [20]. 24 мутації групи 1, які включають також дві мутації за межами RRDR (V170F та I491F) і шість «пограничних» мутацій R-резистентності (L430P, D435Y, H445L, H445N, H445S та L452P), демонструють чутливість 92,3 % при прогнозуванні фенотипової чутливості до препарату. 117 мутацій групи 2 розташовані також в RRDR-області і мають комбіновану чутливість лише 3,5 %. Більшість цих RRDR-мутацій є занадто рідкісними, щоб відповідати критеріям остаточної класифікації до групи 1 або 2. Проте, вони були класифіковані відповідно до експертного правила, згідно з яким будь-яку RRDR-мутацію, за винятком синонімічних мутацій, слід вважати такою, що забезпечує стійкість до R. Це експертне правило вперше запроваджено BOO3 у 2018 р. та було підтверджено у 2021 р. [20].

Системи GeneXpert MTB/RIF та GenoType MTBDRplus — це два рекомендовані BOO3 молекулярно-генетичні (МГ) діагностичні методи, які були розроблені для швидкого виявлення резистентності *M. tuberculosis* до R шляхом сканування ДНК RRDR-області для пов'язаних мутацій. Ці два методи можуть використовуватися як прямий тест на MC *M. tuberculosis* до ПТП як при позитивних мазках мокротиння, так і негативних [21, 23, 24].

GeneXpert MTB/RIF (Cepheid) забезпечує напівкількісну напівгніздову полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) в реальному часі. Праймери тесту ампліфікують цільові послідовності, які є ділянками гена *rpoB*, котрий містить «центральный регіон» з 81 bp основ. Для детекції однокопійної цільової послідовності використовується п'ять флуоресцентних зондів дикого типу (WT) для сканування області 81 bp. Дослідження показали, що всі 23 найбільш клінічно-значущих одиночних мутацій призводять до збою зв'язування WT-зондів, що забезпечує діагностику стійкості до R за допомогою програмного забезпечення [8, 13]. Перевагами цієї системи є її простота та автоматизація, короткий час для діагностики (110 хв. для отримання негативного/позитивного результату). Надаються мінімальні вимоги до біологічного захисту завдяки модульній картриджній закритій системі. Аналіз кривих плавлення зондів *rpoB* дозволяє відрізнити консервативну послідовність мікобактерії дикого типу від мутацій центрального регіону, пов'язаних зі стійкістю до R [3, 13]. Поріг виявлення 131 КУО/мл. Специфічність та чутливість GeneXpert MTB/RIF для виявлення стійкості до R становлять понад 98,0 % та 99,0 % відповідно [24].

Система GenoTypeDRplus (Hain life Science, Germany) забезпечує мультиплексну ПЛР у поєднанні з методом зворотної гібридизації, у якому використовуються 8 зондів WT та 4 мутаційних специфічних зонда (MUT), які націлені на RRDR-область [11, 16]. Випадіння зондів WT або гібридизація смуг MUT вказує на резистентність до R, але на відміну від системи GeneXpert MTB/RIF, система GenoTypeDRplus може надати конкретну інформацію про чотири найбільш поширені мутації (S531L, H526Y, H526D та D516V). GenoTypeDRplus також має високу чутливість (> 97,0 %) і специфічність (> 99,0 %) при виявленні стійкості до R [23].

Оскільки зонди WT GeneXpert MTB/RIF, так і GenoTypeDRplus є дегенеративними, вони можуть виявити множинні мутації, і в результаті специфічний генотип штаму не може бути визначеним. Напроти, чотири мутанта-зонди GenoTypeDRplus специфічні для однієї мутації, тому генотип цих штамів може бути відомим. Оскільки обидва методи сканують одну і ту ж область ДНК, існує перекриття між зондами GenoTypeDRplus і зондами GeneXpert MTB/RIF. Зонд GeneXpert MTB/RIF «А» гібридується в тій же області, що і зонди GenoTypeDRplus WT1 і WT2. Аналогічним чином, чотири інших зонда GeneXpert MTB/RIF також відповідають одному або кільком зондам GenoTypeDRplus. З цього співставлення двох МГ методів очевидно, що мутація у певному місці буде виявлена із затримкою або без гібридизації зонду GeneXpert MTB/RIF або відсутністю відповідних смуг WT і наявності смуг MUT в GenoTypeDRplus [6, 11].

Метою роботи було проаналізувати рівень відповідності двох МГ методів GeneXpert MTB/RIF і GenoTypeDRplus при визначенні MC *M. tuberculosis* до R при виявленні мутацій в області RRDR, пов'язаних з MC до цього препарату.

Матеріал і методи досліджень

Оскільки мета була в тому, щоб проаналізувати гібридизацію/випадіння молекулярних зондів при виявленні мутацій, у дослідження були включені ізоляти *M. tuberculosis* зі стійкістю до R, які виявлені будь-яким з МГ методів в цьому дослідженні. Були виключені ізоляти, які були чутливі до R в обох методах та/або неповні результати в одному (помилка чи недійсність у GeneXpert, негативна група TUB у GenoType DRplus). Всього відібрано 96 зразків, які відповідали цим критеріям.

Для збору мокротиння використовували 50,0 мл стерильні поліпропіленові контейнери у формі пробірки із кришечками, що герметично загвинчувались.

Мазки мокротиння від всіх пацієнтів з підозрою на ТБ були досліджені на наявність кислотостійких бактерій (КСБ) шляхом прямої мікроскопії після забарвлення за методом Циля-Нільсена. Всі зразки з позитивними результатами досліджувались згідно алгоритму, затвердженому наказом МОЗ України № 1462 від 27 червня 2019 р.

В роботі для посіву були використані рідке поживне середовище бульйон Middlebrook 7H9 і щільне поживне яєчне Левенштейна-Єнсена (Л-Є). Передпосівну обробку клінічного матеріалу здійснювали за допомогою 0,5 % стерильного розчину N-ацетил-L-цистеїну з 1,0 % гідроксиду натрію (BBL Мусорпер NALC-NAOH). Додавали рівний об'єм цієї суміші до зразка мокротиння. Інкубували пробірку із сумішшю при кімнатній температурі протягом 15 хв. Центрифугували пробірки зі зразками при прискоренні 3000–3500 g протягом 20 хв, зливали супернатант із пробірок, потім до осаду додавали 0,8–1,0 мл стерильного фосфатного буферу (BBL Мусорпер Phosphate Buffer). Розводили PANTA (збагачуюча добавка MGIT Growth Supplement) і додавали 0,8 мл отриманого розчину до кожної пробірки MGIT безпосередньо перед посівом матеріалу. Пробірки поміщали в систему BACTEC MGIT 960 та інкубували [1].

Для пригнічення росту супутньої мікрофлори в бульйоні Middlebrook 7H9 використовували суміш антибіотиків PANTA (MGIT Growth Supplement), яка складається з поліміксину В, амфотеріцину В, налідіксової кислоти, триметоприму, азлоциліну.

При наявності позитивного результату візуально визначали наявність росту мікобактерій в пробірці. Як правило, ріст проявлявся появою своєрідної «зернистості» в середовищі. Ріст мікобактерій зосереджувався на дні пробірки. Рідина з «позитивної» пробірки використовувалась для: посіву на кров'яний агар для контролю відсутності контамінації; субкультивування на середовищі Л-Є; приготування мазків.

Для ідентифікації виділених штамів використовували імунохроматографічний тест. ТМЧ *M. tuberculosis* до ПТП виконувався згідно стандартного протоколу [1].

GeneXpert MTB/RIF був виконаний відповідно до інструкції виробника [1]. Xpert Sample Reagent (SR) додавали до необробленого зразка мокротиння у співвідношенні 2:1 у 15,0 мл центрифужну пробірку та витримували при кімнатній температурі протягом 15 хв. Під час інкубаційного періоду зразки перемішували. 2,5 мл зразка переносили в картридж Xpert MTB/RIF і завантажували модуль GeneXpert MTB/RIF. Результат отримували протягом двох годин.

Аналіз GenoTypeDRplus проводили на дезактивованих та концентрованих зразках мокротиння. Процес здійснювався в три етапи: 1) екстракція ДНК з обробленого зразка мокротиння; 2) ампліфікація області RRDR за допомогою ПЛР; та 3) гібридизація продукту ПЛР на специфічні олігонуклеотидні зонди, іммобілізовані на тест-смужці. Всі три етапи виконувались відповідно до інструкцій виробника. Смужка GenoTypeDRplus містить 6 контрольних зондів для перевірки процедур випробувань та додаткових 21 зонд для виявлення мутації, пов'язаної з генами *rpoB*, *katG* та *inhA*. Шість контрольних зондів включають управління кон'югатом (CC), контроль ампліфікації (AC), специфічний для комплексу *M. tuberculosis* контроль (TUB), контроль ампліфікації *rpoB*, контроль ампліфікації *katG* і контроль ампліфікації *inhA*. Щоб отримати достовірний результат, усі шість контрольних зондів мали бути позитивними.

Таргетне секвенування.

Культивування штамів *M. tuberculosis* і підготовка проб для досліджень. Штами *M. tuberculosis* вирощували на щільному яєчному середовищі Л-Є при 37° С. Бактерії ресуспендували у 500 мкл стерильної дистильованої води. Доводили об'єм суспензії до 1,0 мл і вортексували до утворення розчину однорідного кольору та консистенції (розчин повинен був містити близько $2,0 \times 10^9$

бактеріальних клітин, що відповідає 6,0 од. за McFarland). 1,0 мл гомогенної суспензії переносили в 1,5 мл пробірку, центрифугували при 5000 rpm протягом 5 хв. Осад бактерій інактивували при 80° С протягом 30 хв. Клітини ресуспендували у 180 мл лізуючого буфера з 20,0 мг/мл лізоциму. Інкубували 18 годин при 37° С.

Виділення ДНК *M. tuberculosis* проводили набором QIAamp® DNA Mini Kit згідно інструкції фірми-виробника. Концентрацію ДНК вимірювали на спектрофотометрі Denovixi Quantus.

Ампліфікація таргетної панелі проводилась за допомогою набору Deeplex Muc-TB (Genoscreen, Lille, France). Ампліфікацію проводили згідно інструкції фірми-виробника із залученням негативного, внутрішнього та позитивного контролів. Очищення ампліконів виконували за допомогою магнітних кульок Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Кількісний аналіз очищених продуктів ампліфікації виконували за допомогою флуорометра Qubit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

Підготовка бібліотеки ДНК *M. tuberculosis* для секвенування зразків проводилась за допомогою набору Nextera XT DNA library preparation kit згідно протоколу фірми-виробника (support.illumina.com). Для бібліотеки використовували 5,0 мкл вхідної ДНК з концентрацією 0,2 нг/мкл.

Секвенування нового покоління (NSG) виконували на обладнанні MiSeq з виконанням протоколу нормалізації та денатурації бібліотеки згідно посібника фірми-виробника (support.illumina.com).

Результати та обговорення

Три різні типи ТМЧ *M. tuberculosis* були виконані на всіх позитивних на кислотостійкі бактерії (КСБ) зразках мокротиння від хворих на ТБ легень. З 96 позитивних на КСБ зразків 89 були стійкі до R в рідкому поживному середовищі, а 7 були чутливими. GeneXpert MTB/RIF і GenoType DRplus відповідно 95 і 90 зразків були стійкі до R, а інші були чутливими (табл. 1).

В табл. 2 представлені результати МС *M. tuberculosis* до R всіх досліджених ізолятів (n = 96), які отримані МГ методами GeneXpert MTB/RIF та GenoType DRplus у порівнянні з фенотипічним методом BACTEC MGIT. Як очевидно з табл. 2, загальний збіг стійких штамів *M. tuberculosis* до R у порівнянні з фенотипічним методом склало відповідно: 92,7 % та 89,6 %. У рідкому поживному середовищі відповідно 89 і 7 ізолятів *M. tuberculosis* відповідно були стійкими та чутливими до R.

GeneXpert MTB/RIF та GenoTypeDRplus співпали з фенотипічним методом відповідно 92,7 % (89) та 89,6 % (86) у випадках резистентності, тоді як серед чутливих

Таблиця 1

Порівняння молекулярних та фенотипічного методів (BACTEC MGIT 960) визначення медикаментозної чутливості *M. tuberculosis* до рифампіцину, n = 96

Метод визначення медикаментозної чутливості <i>M. tuberculosis</i> до рифампіцину		Кількість штамів <i>M. tuberculosis</i> до рифампіцину:		Відсоток стійких до рифампіцину штамів <i>M. tuberculosis</i>
		чутливих	стійких	
фенотипічний	BACTEC MGIT 960	7	89	92,7
	GenoType DRplus	6	90	93,75
	GeneXpert MTB/RIF	1	95	99,0

Таблиця 2

Визначення медикаментозної чутливості *M. tuberculosis* до рифампіцину (n = 96) за молекулярними та фенотипічним методом (BACTEC MGIT 960)

Молекулярні методи визначення медикаментозної чутливості <i>M. tuberculosis</i> до рифампіцину		Визначення чутливості <i>M. tuberculosis</i> до рифампіцину методом BACTEC MGIT		Відсоток співпадіння з фенотипічним методом
		Ч (n)	С (n)	
GenoType DRplus	Ч (n)	3	3	89,6
	С (n)	4	86	
GeneXpert MTB/RIF	Ч (n)	1	0	92,7
	С (n)	6	89	

Таблиця 3

Порівняння молекулярних методів визначення медикаментозної чутливості *M. tuberculosis* до рифампіцину GeneXpert MTB/RIF і GenoTypeDRplus, n = 96

Визначення чутливості <i>M. tuberculosis</i> до рифампіцину методом GenoType DRplus		Визначення чутливості <i>M. tuberculosis</i> до рифампіцину методом GeneXpert MTB/RIF		Відсоток співпадіння з фенотипічним методом
		Ч (n)	С (n)	
GenoType DRplus	Ч (n)	0	6	92,7
	С (n)	1	89	

збіг становив лише 14,3 % (1) та 42,9 % (3) відповідно. Виявлено 6 ізолятів, які були чутливі у рідкому поживному середовищі (система BACTEC), але резистентні до GeneXpert MTB/RIF.

Таким чином, виявлено 7 «невідповідних» ізолятів *M. tuberculosis*, які були чутливі в рідкому поживному середовищі, але в 6 випадках були стійкі в GeneXpert MTB/RIF і в 1 випадку стійкий у GenoTypeDRplus. Також 7 ізолятів мали «невідповідний» результат між дослідженням у рідкому поживному середовищі та в системі GenoType DRplus, серед яких 4 ізоляти *M. tuberculosis* були чутливі в рідкому поживному середовищі, але чутливі в системі GenoTypeDRplus (табл. 2).

Порівняння результатів визначення чутливості штамів *M. tuberculosis* до R в МГ системах показало наступні результати (табл. 3). Повний збіг результатів дослідження становив 92,7 %. З 96 зразків у 95 виявлено стійкість до R і тільки 1 був чутливим в системі GeneXpert MTB/RIF. Система GenoTypeDRplus виявила 90 стійких штамів *M. tuberculosis* R з 96 зразків, але решта 6 випадків розходилися в результатах між двома методами. GenoTypeDRplus виявив 1 зразок як стійкий R, але він був чутливим в системі GeneXpert MTB/RIF.

GeneXpert MTB/RIF та GenoTypeDRplus показали

схожу схему збою зв'язування зондів дикого типу (WT-зондів) при скануванні області 81 bp, що призводить до діагностики стійкості за допомогою програмного забезпечення відмови зонду. У GeneXpert MTB/RIF було виявлено, що 95 зразків стійкі до R. З них виявлено 2 збіжних зонди А, 14 збіжних зондів В, 3 збіжних зонди С, 13 збіжних зондів D і 63 збіжних зондів Е, що призвело до відмови зв'язування зондів. Не було зразків, які провалювали кілька зондів, тому всі зразки взаємно виключали один одного (табл. 4).

Стійкість до R була виявлена у 90 із 96 зразків при використанні МГ методу GenoTypeDRplus. З 90 стійких до R ізолятів 2 мали мутацію WT2; 11 WT 2/3, 3/4 або MUT1; 1 WT 4/5, 1 WT 5/6; 13 WT7/MUT 2; та 62 у специфічній області зонда WT8/MUT3 (табл. 4).

В цьому дослідженні два МГ методи визначення МС *M. tuberculosis* до R показали добрі зіставні результати між собою. Був показаний високий рівень відповідності з фенотипічним визначенням МС *M. tuberculosis* R при визначенні в рідкому поживному середовищі. Серед зразків, які показали «невідповідні» результати між молекулярно-генетичними методами, GeneXpert MTB/RIF показав вищий збіг з результатами секвенування області ядра RRDR 81 bp, ніж GenoTypeDRplus.

Таблиця 4

Схема гібридизації зондів у двох методах молекулярного тесту медикаментозної чутливості

Збіж зонда GeneXpert MTB/RIF	Кількість випадків відмови зв'язування зондів GeneXpert MTB/RIF	Зонд GenoTypeDRplus відмова WT/прив'язка MUT	Кількість випадків відмови зв'язування зондів GenoTypeDRplus
	Абс.		Абс.
A	2	WT2	2
B	14	WT 2/3, WT 3/4, MUT 1	11
C	3	WT 4/5	1
D	13	WT 5/6	1
E	63	WT 6/7, MUT 2 (A/B)	13
Відсутність збою	1	WT 7/8, MUT3	62
		Відсутність збою	6
Всього	96	Всього	96

GeneXpert MTB/RIF показав збіг результатів з BACTEC MGIT на 92,7 % при виявленні резистентності до R, і цей показник був трохи вищим, ніж у GenoTypeDRplus (89,6 %). Розбіжності між фенотипічним та двома молекулярно-генетичними методами визначення МС *M. tuberculosis* до R, мабуть, обумовлені виявленням більш стійких випадків молекулярно-генетичними методами, які можуть статися з двох причин. По-перше, ці два МГ методи можуть виявляти кілька «мовчазних» мутацій, які не впливають на фенотипічну МС [5, 12]. По-друге, GeneXpert MTB/RIF є напівкількісним методом, який передбачає стійкість, засновану на значенні ΔCt . У зв'язку з цим можна отримати змінний результат, що неможливо при використанні якісного методу, такого як BACTEC MGIT.

Частота відмови зонда GeneXpert MTB/RIF і частота відповідної відсутності зонда WT або наявності зондів MUT GenoTypeDRplus показала ймовірну картину, яка вказує на те, що існує два способи визначення МС до R на молекулярно-генетичному рівні при виявленні різних мутацій. Загалом, ми виявили 92,7 %-ий збіг результатів МС між GeneXpert MTB/RIF і GenoTypeDRplus. Більшість розбіжностей, виявлених під час дослідження, пов'язані з виявленням чутливості GenoTypeDRplus, але резистентністю GeneXpert MTB/RIF. Також були виявлені розбіжності через виявлення мутацій у різних місцях одного і того ж ізоляту двома способами. Мутація кодона 531 найбільш часто зустрічається, яка коливається від 20,0 до 71,0 % [14–16]. Ця область покрита зондом E GeneXpert MTB/RIF і WT8/MUT3 в GenoTypeDRplus. Частота відмови зонда E склала 63 випадки, а WT8 відсутня/присутність MUT — 62. Мутації в кодонах 526 і 516 також є загальними, які варіюються від 0–30,0 % у випадках, стійких до R, як це спостерігається у різних дослідженнях [4, 14, 15]. У нашому дослідженні частота зв'язування зонда/мутантного зонда цих областях коливалася від 12,0 до 15,0 %.

Сім зразків ізолятів *M. tuberculosis* від хворих на ТБ (uk#1, uk#5, uk#28, uk#36, uk#48, uk#57, uk#88), що були охарактеризовані за допомогою фенотипічного тесту на МС до ПТП, виявили чутливість до R, а за даними МГ тестів GeneXpert MTB/RIF та GenoType MTBDRplus показали наявність мутацій в RRDR-області і, відповідно були класифіковані як резистентні. Слід зазначити, що такі випадки можуть спостерігатись, коли «слабка» мутація забезпечує ріст мікобактерії за МІК, що є незначно вищою, ніж «Епідеміологічна точка відсічу» ("ECOFF"), але нижчою, ніж критична концентрація, встановлена для даного препарату [9].

Для уточнення конкретної мутації ці «невідповідні» ізоляти було секвеновано за допомогою технології NSG. Чотири ізоляти (uk#1, uk#5, uk#36, uk#88) виявляли мутацію L452P, яка є рідкісною для української популяції, і у інших групах зустрічається з частотою біля 2,0 %. Виявлення цієї мутації знаходить відповідність у гібридизаційному патерні тесту GenoType MTBDRplus, де ми спостерігаємо відсутність смуг гібридизації як для зонду дикого типу WT8, так і для зонду мажорної мутації S450L — MUT3. Мутація L452P дійсно отримала характеристику «проміжна» за даними багатьох дослід-

жень завдяки розбіжним даним тестів фенотипічної та генетичної стійкості. За цими даними МІК, що були визначені для L452P варіюють від 0,5 мкг/мл R до 4 мкг/мл [2, 9].

Ізоляти uk#28, uk#48 і uk#57 за даними секвенсу показали наявність двох мутацій — мажорну S450L та нову мутацію V496A з невідомим впливом на розвиток стійкості до R. Проте обидві ці мутації були присутні у 34,0 % послідовностей. Тобто ізоляти виявляли ознаки гетерезистентного штаму. Гетерезистентність у цих ізолятах була детектована також для ізоніазиду, етамбутолу, стрептоміцину та етіонаміду, а також для ін'єкційних препаратів II-го ряду (канаміцину, амікацину та капреоміцину), проте з іншою часткою (68,0 %) послідовностей, що містили мутацію. Загалом гетерогенність при аналізі ізолятів *M. tuberculosis* може спостерігатись у випадках ураження хворого більш ніж одним штамом і реактивації попереднього з наступним ураженням іншим штамом. Крім того, генетична дивергенція може бути результатом мутаційних процесів у геномі мікобактерії всередині організму людини з наступним генетичним дрейфом або селекцією під впливом ліків. Проте, такі випадки мають бути чітко відокремлені від експериментальних помилок завдяки лабораторній контамінації, неуніфікованому забору зразків, селекції впродовж культивування, а також помилок секвенування.

Еволюція збудника всередині організму людини досліджується досить детально завдяки технології NSG. Так, у роботі Vargas і ін. було встановлено, що у приблизно 15,0 % пацієнтів зі стійкою клональною інфекцією продовж більше 2 міс розвинулися нові мутації резистентності між забором зразків, причому у 20 з 27 випадків вони виникли у пацієнтів із уже існуючою резистентністю. Було показано, що, якщо у першому ізоляті низькозбагачені варіанти стійкості виявлялися із частотою $\geq 19,0$ %, це передбачало фіксацію цього варіанту в наступному зразку [18].

Секвенування 81bp області RRDR «невідповідних» ізолятів показало, що GeneXpert MTB/RIF виконував більш точно аналіз, ніж GenoTypeDRplus, при виявленні мутацій, пов'язаних зі стійкістю до R. Шість мутацій, ідентифікованих секвенуванням *rpoB* RRDR-області, також розпізнаються GeneXpert MTB/RIF через відмову від цих шести локальних специфічних зондів, але в цих випадках GenoTypeDRplus помилковий. Точний механізм «невідповідності», що спостерігався, не зовсім зрозумілий. Хоча можна припустити, що це викликано змішаною бактеріальною популяцією в мокротинні. Особливо це може бути характерним для випадків повторного лікування ТБ. Рецидиви містять більшу частку бацил змішаного типу, ніж первинні випадки ТБ [7].

Обмеженням дослідження був невеликий розмір вибірки та більш висока частка випадків МС до R. Оскільки нашою основною метою було порівняти ефективність двох МГ методів визначення МС *M. tuberculosis* до R, ми вважаємо, що вибір найбільш стійких до R випадків був логічним. Результати дослідження дають важливе уявлення про продуктивність МГ методів визначення МС *M. tuberculosis* до R.

Повна відповідність визначення МС *M. tuberculosis* до R з рідким живильним середовищем була однаковою для аналізу GeneXpert MTB/RIF і GenoTypeDRplus, але GeneXpert MTB/RIF продемонстрував кращу ефективність, ніж GenoTypeDRplus, у виявленні R-стійкості до «невідповідних» ізолятів *M. tuberculosis*. GeneXpert MTB/RIF має низку інших переваг у порівнянні з GenoTypeDRplus. GeneXpert MTB/RIF відносно легше виконувати, вимоги до біологічної безпеки мінімальні, менший час для проведення дослідження, більша автоматизація процесу дослідження, що забезпечує меншу ймовірність людських помилок та більший рівень відтворюваності результатів. Враховуючи ці факти та найкращі результати GeneXpert MTB/RIF, знайдені у нашому дослідженні, ми рекомендуємо використовувати GeneXpert MTB/RIF для виявлення МРТБ.

Висновки

1. Секвенування 81bp області RRDR «невідповідних» ізолятів показало, що GeneXpert MTB/RIF виконував більш точно аналіз, ніж GenoTypeDRplus, при виявленні мутацій, пов'язаних зі стійкістю до R.

2. GeneXpert MTB/RIF відносно легше виконувати, вимоги до біологічної безпеки мінімальні, менший час для проведення дослідження, більша автоматизація процесу дослідження, що забезпечує меншу ймовірність людських помилок та більший рівень відтворюваності результатів, тому доцільно використовувати його для виявлення МРТБ.

3. Аналітичне рішення Deeplex Мус-ТВ дозволяє отримати великий об'єм вагової інформації з маркерів МС до ПТП та пришвидшити процес аналізу даних завдяки зручному використанню програмного забезпечення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Фещенко ЮІ, Журило ОА, Барбова АІ. Лабораторна діагностика туберкульозної інфекції. К.: ВСБ «Медицина», 2019:304 с.
2. Berrada ZL, Lin SY, Rodwell TC, et al. Rifabutin and rifampin resistance levels and associated rpoB mutations in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis complex. Diagn Microbiol. Infect. Dis. 2016; 85(2):177–181. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.019.
3. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. New England J. of Medicine. 2010;363(11):1005–1015. DOI:10.1056/NEJMoa0907847.
4. Chen L, Gan X, Li N, et al. rpoB gene mutation profile in rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Guizhou, one of the highest incidence rate regions in China. J. of Antimicrob. Chemotherapy. 2010;65(6):1299–1301. DOI:10.1093/jac/dkq102.
5. Drobniński F. ERLN-TB Expert Opinion on the Use of the Rapid Molecular Assays for the Diagnosis of Tuberculosis and Detection of Drug Resistance: European Centre for Disease Prevention and Control 2013;134p. DOI:10.2900/8592
6. El-Hajj HH, Marras SA, Tyagi S, et al. Detection of Rifampin Resistance in Mycobacterium tuberculosis in a Single Tube with Molecular Beacons. J. of Clin. Microbiol. 2001;39(11):4131–4137. DOI:10.1128/JCM.39.11.4131–4137.2001
7. Fang R, Li X, Li J, Wu J, et al. Mixed infections of Mycobacterium tuberculosis in tuberculosis patients in Shanghai, China. Tuberculosis (Edinb). 2008;88(5):469–473. DOI:10.1016/j.tube.2008.02.002.
8. Helb D, Jones M, Story E, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. J. of Clin. Microbiol. 2010;48(1):229–237. DOI:10.1128/JCM.01463-09.
9. Heyckendorf J, Andres S, Köser CU, et al. What Is Resistance? Impact of Phenotypic versus Molecular Drug Resistance Testing on Therapy for Multi- and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 2018; 62(2):e01550-17. DOI: 10.1128/AAC.01550-17.
10. Heysell SK, Houtp ER. The future of molecular diagnostics for drug-resistant tuberculosis. Expert Rev. Mol. Diagn. 2012;12(4):395–405. DOI:10.1586/erm.12.25.
11. Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, et al. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis complex isolates. J. Clin. Microbiol. 2005;43(8):3699–3703. DOI:10.1128/JCM.43.8.3699-3703.2005
12. Ioannidis P, Papaventsis D, Karabela S, et al. Cepheid GeneXpert MTB/RIF assay for Mycobacterium tuberculosis detection and rifampin resistance identification in patients with substantial clinical indications of tuberculosis and smear-negative microscopy results. J. of Clin. Microbiol. 2011;49(8):3068–3070. DOI:10.1128/JCM.00718-11.
13. Lawn SD, Nicol MP. Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. Future microbiology. 2011;6(9):1067–1082. DOI:10.2217/fmb.11.84.
14. Lee AS, Lim IH, Tang LL, et al. High frequency of mutations in the rpoB gene in rifampin-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from Singapore. J. of Clin. Microbiol. 2005;43(4):2026–2027. DOI:10.1128/JCM.43.4.2026-2027.2005.
15. Mani C, Selvakumar N, Narayanan S, et al. Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from India. J. of Clin. Microbiol. 2001;39(8):2987–2990. DOI:10.1128/JCM.39.8.2987-2990.2001.
16. Miotto P, Piana F, Penati V, et al. Use of genotype MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical strains isolated in Italy. J. Clin. Microbiol. 2006;44(7):2485–2491. DOI:10.1128/JCM.00083-06
17. Piatek AS, Tyagi S, Pol AC, et al. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Nature biotechnology. 1998;16(4):359–363. DOI:10.1038/nbt0498-359.
18. Vargas R, Freschi L, Marin M, et al. In-host population dynamics of Mycobacterium tuberculosis complex during active disease. Elife. 2021; 10:e61805. DOI: 10.7554/eLife.61805.
19. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. Lancet. 1993;341(8846):647–650. DOI:10.1016/0140-6736(93)90417-f.

REFERENCES

1. Feschenko Yul, Zhurilo OA, Barbova AI. Laboratorna diagnostika tuberculosnoi infekcyi (Laboratory diagnosis of tuberculosis infection). Kyiv, «Medycyna». 2019;304p.
2. Berrada ZL, Lin SY, Rodwell TC, et al. Rifabutin and rifampin resistance levels and associated rpoB mutations in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis complex. Diagn Microbiol. Infect. Dis. 2016; 85(2):177–181. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.019.
3. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. New England J. of Medicine. 2010;363(11):1005–1015. DOI:10.1056/NEJMoa0907847.
4. Chen L, Gan X, Li N, et al. rpoB gene mutation profile in rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Guizhou, one of the highest incidence rate regions in China. J. of Antimicrob. Chemotherapy. 2010;65(6):1299–1301. DOI:10.1093/jac/dkq102.
5. Drobniński F. ERLN-TB Expert Opinion on the Use of the Rapid Molecular Assays for the Diagnosis of Tuberculosis and Detection of Drug Resistance: European Centre for Disease Prevention and Control 2013;134p. DOI:10.2900/8592
6. El-Hajj HH, Marras SA, Tyagi S, et al. Detection of Rifampin Resistance in Mycobacterium tuberculosis in a Single Tube with Molecular Beacons. J. of Clin. Microbiol. 2001;39(11):4131–4137. DOI:10.1128/JCM.39.11.4131–4137.2001
7. Fang R, Li X, Li J, Wu J, et al. Mixed infections of Mycobacterium tuberculosis in tuberculosis patients in Shanghai, China. Tuberculosis (Edinb). 2008;88(5):469–473. DOI:10.1016/j.tube.2008.02.002.
8. Helb D, Jones M, Story E, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. J. of Clin. Microbiol. 2010;48(1):229–237. DOI:10.1128/JCM.01463-09.
9. Heyckendorf J, Andres S, Köser CU, et al. What Is Resistance? Impact of Phenotypic versus Molecular Drug Resistance Testing on Therapy for Multi- and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 2018; 62(2):e01550-17. DOI: 10.1128/AAC.01550-17.
10. Heysell SK, Houtp ER. The future of molecular diagnostics for drug-resistant tuberculosis. Expert Rev. Mol. Diagn. 2012;12(4):395–405. DOI:10.1586/erm.12.25.
11. Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, et al. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis complex isolates. J. Clin. Microbiol. 2005;43(8):3699–3703. DOI:10.1128/JCM.43.8.3699-3703.2005
12. Ioannidis P, Papaventsis D, Karabela S, et al. Cepheid GeneXpert MTB/RIF assay for Mycobacterium tuberculosis detection and rifampin resistance identification in patients with substantial clinical indications of tuberculosis and smear-negative microscopy results. J. of Clin. Microbiol. 2011;49(8):3068–3070. DOI:10.1128/JCM.00718-11.
13. Lawn SD, Nicol MP. Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. Future microbiology. 2011;6(9):1067–1082. DOI:10.2217/fmb.11.84.
14. Lee AS, Lim IH, Tang LL, et al. High frequency of mutations in the rpoB gene in rifampin-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from Singapore. J. of Clin. Microbiol. 2005;43(4):2026–2027. DOI:10.1128/JCM.43.4.2026-2027.2005.
15. Mani C, Selvakumar N, Narayanan S, et al. Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from India. J. of Clin. Microbiol. 2001;39(8):2987–2990. DOI:10.1128/JCM.39.8.2987-2990.2001.
16. Miotto P, Piana F, Penati V, et al. Use of genotype MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical strains isolated in Italy. J. Clin. Microbiol. 2006;44(7):2485–2491. DOI:10.1128/JCM.00083-06
17. Piatek AS, Tyagi S, Pol AC, et al. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Nature biotechnology. 1998;16(4):359–363. DOI:10.1038/nbt0498-359.
18. Vargas R, Freschi L, Marin M, et al. In-host population dynamics of Mycobacterium tuberculosis complex during active disease. Elife. 2021; 10:e61805. DOI: 10.7554/eLife.61805.
19. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. Lancet. 1993;341(8846):647–650. DOI:10.1016/0140-6736(93)90417-f.

-
20. WHO. Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance. Geneva: WHO. 2021. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>
 21. WHO. The global plan to stop TB 2011–2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis. Geneva: WHO, 2010. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44437>
 22. WHO. Global Tuberculosis Report. Geneva: WHO, 2014. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/137094>
 23. WHO. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Policy statement. Geneva: WHO, 2008. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250586/9789241511261-eng.pdf>
 24. WHO. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MT. Geneva: WHO, 2011. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112472>
-
20. WHO. Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance. Geneva: WHO. 2021. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>
 21. WHO. The global plan to stop TB 2011–2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis. Geneva: WHO, 2010. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44437>
 22. WHO. Global Tuberculosis Report. Geneva: WHO, 2014. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/137094>
 23. WHO. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Policy statement. Geneva: WHO, 2008. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250586/9789241511261-eng.pdf>
 24. WHO. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MT. Geneva: WHO, 2011. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112472>
-