

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

УКРАЇНСЬКИЙ ЦЕНТР НАУКОВОЇ МЕДИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ ТА ПАТЕНТНО-
ЛІЦЕНЗІЙНОЇ РОБОТИ

**ВИКОРИСТАННЯ АЛЬТЕРНАТИВНИХ ЗРАЗКІВ В КАРТРИДЖАХ
GENE XPERT MTB/RIF І GENE XPERT MTB/RIF ULTRA
ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЛЕГЕНЕВОГО І ПОЗАЛЕГЕНЕВОГО ТУБЕРКУЛЬОЗУ ТА
ТУБЕРКУЛЬОЗУ У ДОРОСЛИХ І ДІТЕЙ В УКРАЇНІ**

(методичні рекомендації)

Київ – 2021

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКИЙ ЦЕНТР НАУКОВОЇ МЕДИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ ТА ПАТЕНТНО-
ЛІЦЕНЗІЙНОЇ РОБОТИ

“УЗГОДЖЕНО”

Начальник
лікувально-організаційного
управління НАМН України
доктор медичних наук, професор
І. Д. Шкробанець

“ ___ ” _____ 2021 р.

“УЗГОДЖЕНО”

В. О. Генерального директора
Центру громадського здоров'я МОЗ
України

І. В. Кузин

“ ___ ” _____ 2021 р.

**ВИКОРИСТАННЯ АЛЬТЕРНАТИВНИХ ЗРАЗКІВ В КАРТРИДЖАХ
GENE XPRT MTB/RIF I GENE XPRT MTB/RIF ULTRA
ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЛЕГЕНЕВОГО І ПОЗАЛЕГЕНЕВОГО ТУБЕРКУЛЬОЗУ ТА
ТУБЕРКУЛЬОЗУ У ДОРΟΣЛИХ І ДІТЕЙ В УКРАЇНІ**

(методичні рекомендації)

Заклад-розробник:

Державна установа «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»

Укладачі:

Журило Олександр Анатолійович – зав. лабораторією мікробіології і біохімії ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України», д-р. мед. наук, професор (044)270–35–41;

Барбова Анна Іванівна – керівник Референс-лабораторії з мікробіологічної діагностики туберкульозу МОЗ України, канд. мед. наук, старш. наук. співроб. лабораторії мікробіології і біохімії ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України», (044)270–35–41;

Жеребко Ніна Миколаївна – лабораторний фахівець, РАТН;

Терлесва Яна Сергіївна – завідувач відділу координації програм діагностики та лікування туберкульозу ДУ «Центр громадського здоров'я Міністерства охорони здоров'я України»;

Кампос-Родригес Наталья Луїсівна – лабораторний фахівець ДУ «Центр громадського здоров'я Міністерства охорони здоров'я України»;

Чередник Юрій Олександрович – канд. біол. наук, наук. співроб. лабораторії мікробіології і біохімії ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України», (044)270–35–41.

Рецензенти:

Гріцова Н. А., доцент кафедри фтизіатрії і пульмонології НМАПО імені П. Л. Шупика МОЗ України, канд. мед. наук;

Литвиненко Н. А., завідувач відділу хіміорезистентного туберкульозу ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України», д-р мед. наук.

Голова профільної проблемної комісії МОЗ та НАМН України – академік НАМН України, д-р мед. наук, професор Ю. І. Феценко

Голова експертної комісії – д-р мед. наук, професор В. М. Мельник

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВООЗ	– Всесвітня організація охорони здоров'я,
ВІЛ	– вірус імунодефіциту людини,
г	– грам,
КУО/мл	– колоніє утворюючих одиниць у мілілітрі,
ЛЖВ	– люди, які живуть з ВІЛ;
МБТ	– мікобактерії туберкульозу;
мл	– мілілітр,
мм	– міліметр,
ПЛР	– полімеразно-ланцюгова реакція,
сек	– секунд,
СМП	– спинномозкова рідина,
ТБ	– туберкульоз,
хв	– хвилини,
g	– величина прискорення, характеризує відносну силу центрифугування (ВСЦ),
NALC-NaOH	– N-ацетил-L-цистеїн з 1,0 % гідроксиду натрію,
Sample Reagent	– реагент для деконтамінації та розрідження дослідного матеріалу,
Xpert MTB/RIF	– автоматизована система для виявлення ДНК мікобактерій туберкульозного комплексу з визначенням медикаментозної чутливості до протитуберкульозних препаратів.

ЗМІСТ

	С.
ВСТУП	6
1 ЗАГАЛЬНІ ПІДХОДИ ДО ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ З ВИКОРИСТАННЯМ СУЧАСНОГО ГЕНЕТИЧНОГО МЕТОДУ НА ОБЛАДНАННІ GENEXPERT МТВ/RIF ТА GENE XPERT МТВ/RIF ULTRA	7
2 ОБРОБКА ЗРАЗКІВ ПЕРЕД ТЕСТУВАННЯМ В ОРИГІНАЛЬНИХ КАРТРИДЖАХ XPERT МТВ/RIF ТА XPERT МТВ/RIF ULTRA	11
2.1 Спинномозкова рідина. Дослідження в картриджах Xpert МТВ/RIF або Xpert МТВ/RIF ULTRA	11
2.2 Лімфатичні вузли та інші тканини (відібрані асептично). Дослідження проводяться в картриджах Xpert МТВ/RIF або Xpert МТВ/RIF ULTRA	12
2.3 Зразки з кісток і суглобів. Дослідження проводяться в картриджах Xpert МТВ/RIF	12
2.4 Бронхіальні аспірати або бронхоальвеолярні лаважі, отримані шляхом фібробронхоскопії. Дослідження проводяться в картриджах Xpert МТВ/RIF або Xpert МТВ/RIF ULTRA	13
2.5 Шлункові аспірати, відібрані у дітей. Дослідження проводяться в картриджах Xpert МТВ/RIF або Xpert МТВ/RIF ULTRA	13
2.6 Суглобова рідина. Дослідження проводяться в картриджах Xpert МТВ/RIF або Xpert МТВ/RIF ULTRA	13
2.7 Сеча. Дослідження проводяться виключно в картриджах Xpert МТВ/RIF	14
2.8 Фекалії. Дослідження проводяться дітям до 5 років виключно в картриджах Xpert МТВ/RIF	14
РЕЗЮМЕ	15
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА	16

ВСТУП

Тест Хpert (Cepheid, Каліфорнія, США) був розроблений, оптимізований, оцінений та затверджений спеціально для виявлення ТБ легень шляхом дослідження мокротиння. Однак останнім часом аналіз поширився на різні позалегенові клінічні зразки.

В методичних рекомендаціях вперше в Україні пропонується використовувати для верифікації діагнозу «туберкульоз» інший діагностичний матеріал та наводяться апробовані в Референс-лабораторії з мікробіологічної діагностики туберкульозу МОЗ України методики.

При розробці Методичних рекомендацій використані чинні нормативні документи України та Міжнародні рекомендації щодо організації лабораторних досліджень на туберкульоз. Методичні рекомендації розроблені та надруковані в рамках реалізації Проекту «Підтримка зусиль у протидії туберкульозу в Україні», який реалізується організацією PATH за фінансової підтримки Агентства США з міжнародного розвитку (USAID). Зміст документа є відповідальністю авторів та необов'язково відображає погляди USAID чи уряду Сполучених Штатів Америки.

1 ЗАГАЛЬНІ ПІДХОДИ ДО ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ З ВИКОРИСТАННЯМ СУЧАСНОГО ГЕНЕТИЧНОГО МЕТОДУ НА ОБЛАДНАННІ GENEXPERT MTB/RIF ТА GENE XPERT MTB/RIF ULTRA

Розробка автоматизованого молекулярного тесту Xpert MTB/RIF (Cepheid, Каліфорнія, США) для швидкої діагностики туберкульозу (ТБ) та виявлення резистентності до рифампіцину, маркера MDR-TB, є важливим досягненням в лабораторній діагностиці ТБ.

На відміну від попередньої версії Xpert MTB/RIF для підвищення чутливості тесту картридж Xpert MTB/RIF Ultra, крім гену *groB*, 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 полімеразно-ланцюгова реакція, більш швидке термоциклювання (негативний результат отримуємо за 65хв, позитивний – за 77хв), а також поліпшені розчини та ферменти.

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.

Всесвітня організація охорони здоров'я рекомендує використовувати Xpert MTB/RIF Ultra в якості початкового діагностичного тесту для всіх дорослих і дітей з ознаками та симптомами легеневого ТБ. Інтерпретація результатів Xpert MTB/RIF Ultra для виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу практично є такою ж, як і для Xpert MTB/RIF.

У дорослих і дітей із ознаками та симптомами туберкульозного менінгіту необхідно досліджувати спинномозкову рідину у картриджах GeneXpert як первинний діагностичний тест на туберкульозний менінгіт, а не мікроскопію мазка/культуру. Однак, якщо кількість матеріалу є невеликою або неможливо отримати додаткові зразки, для швидкої постановки діагнозу туберкульозного менінгіту, слід надати перевагу тестуванню зразків СМР у картриджах Xpert MTB/RIF, або Xpert MTB/RIF Ultra замість культурального дослідження. Втім, якщо матеріалу для дослідження достатньо, для підвищення результативності слід використовувати і бактеріологічні методи.

У дорослих і дітей із ознаками та симптомами позалегенового ТБ Xpert MTB/RIF Ultra може застосовуватися для дослідження аспірату/біоптату лімфовузлів, плевральної, перитонеальної, перикардіальної, синовіальної рідин або сечі як первинний діагностичний тест для діагностики відповідної форми позалегенового ТБ замість мікроскопії мазка/культури. Плевральна рідина – це не кращий біологічний матеріал для

підтвердження туберкульозної етіології процесу будь-яким методом. Перевагу слід надавати біоптатам плеври. Чутливість Xpert MTB/RIF при тестуванні зразків плевральної рідини дуже низька, але, якщо отримано позитивний результат, то необхідно лікувати хворого як ТБ плеври. При отриманні негативного результату слід продовжити обстеження іншими методами для встановлення діагнозу.

У ВІЛ-позитивних дорослих та дітей із ознаками та симптомами дисемінованого ТБ Xpert MTB/RIF використовували для дослідження крові як діагностичний тест (дуже низька достовірність доказів точності тесту). До теперішнього часу методика попередньої обробки крові не відпрацьована і потребує додаткового вивчення, тобто методика не валідована.

В інструкції до картриджів Xpert MTB/RIF (Xpert MTB/RIF Ultra) від виробника компанії Cepheid в якості зразків клінічного матеріалу, що досліджуються, *пропонується тільки нативне мокротиння або його осад*.

У 2013 р. ВООЗ опублікувала звіт експертної групи ВООЗ, в якому були надані результати вивчення можливості використання Xpert MTB/RIF для діагностики легеневого ТБ, ТБ у дітей, позалегенового ТБ та одночасного визначення резистентності до рифампіцину. А в 2014 р. з урахуванням доказової бази було опубліковане «Керівництво з впровадження діагностичного тесту Xpert MTB/RIF. Технічні та операційні рекомендації; питання практичного застосування» та оновлені рекомендації ВООЗ «Автоматизована технологія ампліфікації нуклеїнових кислот в режимі реального часу для швидкого, одночасного виявлення туберкульозу і стійкості до рифампіцину: аналіз Xpert MTB/RIF для діагностики легеневого і позалегенового туберкульозу у дорослих і дітей».

Були проведені додаткові дослідження щодо можливості тестування альтернативних видів біологічного матеріалу, які показали, що чутливість аналізу для позалегенового ТБ є дуже неоднорідною, коливається від 15,0 % до 96,0 %, але перевищує 50,0 % майже в усіх видах матеріалу (табл. 1). Однак, повідомляється про нижчу чутливість для зразків спинномозкової, плевральної, перикардіальної, перитонеальної та синовіальної рідини.

В ході проведених досліджень були протестовані у картриджах Xpert MTB/RIF Ultra заморожені респіраторні зразки (включаючи бронхоальвеолярний лаваж) і не респіраторні зразки (лімфатичні вузли, біоптати тканин, перитоніальна рідина, шлунковий аспірат і сеча), які мали негативний результат у тесті Xpert MTB/RIF, але позитивний при культивуванні. Результати такого дослідження показали загальне підвищення чутливості

при використанні Xpert MTB/RIF Ultra в порівнянні з Xpert MTB/RIF на 45,6%, а в не респіраторних зразках – на 40,6%.

Таблиця 1 – Чутливість та специфічність тесту Xpert MTB/RIF для різних типів зразків (за даними відділу науково-медичних зв'язків компанії Cepheid, 2019)

Тип зразка	Коментарі	Чутливість / специфічність
Кісткова або суглобова тканина та синовіальна рідина	Може слугувати матеріалом для тестування на ТБ.	67,0–97,0 % / 83,0–100 %
Бронхоальвеолярна рідина/аспірат <i>Примітка:</i> бронхіальні змиви не є належним видом зразка	Може використовуватися для пацієнтів з недостатньою кількістю мокротиння, з негативним результатом бактеріоскопії.	60,0–93,0 % / 73,0–98,0 %
Біоптати та аспірати лімфатичних вузлів	В дослідженні можуть використовуватись тканина та аспірати із лімфовузлів. Агресивна деконтамінація може призвести до негативних результатів культивування.	84,0–96,0 % / 70,0–99,0 %
Плевральна рідина/біоптат	В дослідженнях використовувались і плевральний випіт, і біоптати тканини. ВООЗ рекомендує використовувати біоптати.	15,0–63,6 % / 97,0–100 %
Спинномозкова рідина	Концентрування зразка СМР покращують ефективність тесту. Для ВІЛ позитивних дорослих рекомендується відбирати не менше 6,0 мл СМР для дослідження в картриджах Ultra.	55,0–88,0 % / 93,0–99,0 % 70,0 % / 95,0 %
Сеча	Може бути використана для виявлення ТБ органів сечостатевої системи та легеневого ТБ у ВІЛ позитивних. При високому рівні CD ₄ знижується чутливість методу.	48,0–95,0 % / 86,0–99,0 %
Шлункові аспірати	Використовуються для діагностики ТБ у дітей. Знижені функціональні характеристики тесту у дітей до 4 років.	22,0–100 % / 70,0–99,0 %
Фекалії	Використовуються для виявлення легеневого ТБ у дітей. Різні методи обробки матеріалу впливають на результативність.	81,0–86,0 % // 94,0–100 %

Особи з підозрою на позалегеновий ТБ та особи, які мали один негативний результат на Xpert MTB/RIF, мають пройти подальші діагностичні тести. Обробка зразків тканин (лімфатичні вузли та інші тканини) від таких хворих для проведення тесту Xpert MTB/RIF має включати етап деконтамінації, щоб в подальшому забезпечити культуральне дослідження цього ж зразка.

Для використання альтернативних зразків у тестуванні щодо ТБ потрібна попередня обробка зразків перед внесенням досліджуваного матеріалу у картридж.

Усі зразки повинні бути оброблені як найшвидше, разом з тим довший час на транспортування зразків не має впливати на використання тесту Xpert MTB. Відібрані зразки повинні транспортуватися і зберігатися при температурі 2–8 °С до обробки (максимальний час зберігання – до 7 днів).

Достовірність результатів тестування різних типів діагностичних зразків за допомогою Xpert MTB/RIF і Xpert MTB/RIF Ultra в якості первинного тесту для діагностики легеневого та позалегенового ТБ у дорослих та дітей (ВООЗ, 2020) наведена в табл. 2.

Таблиця 2 – Достовірність результатів тестування різних типів діагностичних зразків за допомогою Xpert MTB/RIF і Xpert MTB/RIF Ultra в якості первинного тесту для діагностики легеневого та позалегенового туберкульозу у дорослих і дітей (ВООЗ, 2020)

Тип зразку	Тести, що рекомендовані	Сила рекомендації	Достовірність результатів
СМР (при підозрі на туберкульозний менінгіт)	Xpert MTB/RIF Xpert MTB/RIF Ultra	Сильна Сильна	Помірна достовірність доказів точності тестів Низька достовірність доказів точності тестів
Біоптати та аспірати лімфатичних вузлів, плевральна, перикардіальна, перитонеальна, синовіальна рідина, сеча	Xpert MTB/RIF	Умовна	Помірна для плевральної рідини. Xpert MTB/RIF Ultra для аспіратів лімфатичних вузлів, перитонеальної, синовіальної рідини, сечі. Дуже низька для біоптатів лімфатичних вузлів, перикардіальної рідини
Біоптати та аспірати лімфатичних вузлів	Xpert MTB/RIF Ultra	Умовна	Низька достовірність доказів точності тестів
Кров (при дисемінованому ТБ у ЛЖВ)	Xpert MTB/RIF	Умовна	Дуже низька
Назофаренгіальний аспірат та фекалії (при у дітей до 5 років з підозрою на легеневий ТБ)	Xpert MTB/RIF	Сильна	Низька достовірність доказів точності тестування при аспіраті шлунку, аспіраті носоглотки та фекаліях

2 ОБРОБКА ЗРАЗКІВ ПЕРЕД ТЕСТУВАННЯМ В ОРИГІНАЛЬНИХ КАРТРИДЖАХ XPERT MTB/RIF ТА XPERT MTB/RIF ULTRA

Усі маніпуляції з матеріалом, які можуть спричинити утворення аерозолів під час подрібнення та гомогенізації зразків, слід проводити в ШББ другого класу.

Для зразків, які відібрані без дотримання вимог асептики доцільно використовувати деконтамінацію з використанням NaOH, як для мокротиння.

2.1 Спинномозкова рідина. Дослідження в картриджах Xpert MTB/RIF або Xpert MTB/RIF ULTRA

Зразки СМР є олігобацилярними і мають оброблятися відповідно до тих самих заходів безпеки, що використовуються при роботі з мокротинням.

Зразки СМР, що містять кров, або ксантохромні зразки СМР можуть дати хибнонегативні результати в Xpert MTB.

Якщо об'єм доставленого зразка становить **понад 5,0 мл**, доцільно провести центрифугування для концентрації збудника. Потрібно перенести увесь зразок у центрифужну пробірку і центрифугувати його при 3000 g протягом 15хв. Супернатант необхідно обережно злити через воронку у відкидний контейнер з дезінфекційним розчином, або відібрати стерильною одноразовою піпеткою. Отриманий осад слід ресуспендувати у реагенті для зразків Xpert MTB/RIF, додавши його до кінцевого об'єму 2,0 мл. Суміш ретельно перемішати на вортексі і залишити на робочому столі для інкубації при кімнатній температурі впродовж 7–8хв. Потім знову перемішати на вортексі і залишити для інкубації на робочому столі ще на 7–8хв (всього 15хв інкубації). Перенести 2,0 мл підготовленого зразка у картридж, завантажити його у прилад GeneXpert, дотримуючись інструкцій виробника і запустити програму тестування.

Якщо об'єм доставленого зразка СМР становить **1,0–5,0 мл**, необхідно додати таку ж кількість реагенту для зразка (1:1), який входить до набору картриджів, перемішати зразок на вортексі і залишити для інкубації на робочому столі при кімнатній температурі. Через 7–8хв знову перемішати зразок на вортексі і інкубувати ще 7–8хв (загальна тривалість інкубації – 15хв) при кімнатній температурі. Додати 2,0 мл суміші безпосередньо у підготовлений картридж та завантажити його в прилад GeneXpert, дотримуючись інструкцій виробника.

Якщо об'єм доставленого зразка СМР становить **0,1–1,0 мл**, необхідно додати реагент для зразка, який входить до набору картриджів, до кінцевого об'єму 2,0 мл, перемішати суміш на вортексі та залишити для інкубації на робочому столі при кімнатній

температурі. Через 7–8хв знову перемішати зразок на вортексі і інкубувати ще 7–8хв (загальна тривалість інкубації 15хв) при кімнатній температурі. Додати 2,0 мл суміші безпосередньо у підготовлений картридж та завантажити його в прилад GeneXpert, дотримуючись інструкцій виробника.

Зверніть увагу на те, що кількість зразка СМР **менше 0,1 мл** є недостатньою для проведення тесту Xpert MTB/RIF або Xpert MTB/RIF ULTRA.

2.2 Лімфатичні вузли та інші тканини (відібрані асептично). Дослідження проводяться в картриджах Xpert MTB/RIF або Xpert MTB/RIF ULTRA

Отримані зразки тканини необхідно розрізати на невеликі шматочки за допомогою стерильних щипців і ножиць та помістити в стерильну ступку. Додати приблизно 2,0 мл стерильного фосфатного буфера. Провести гомогенізацію тканини у фосфатному буфері за допомогою ступки і товкачика (*або гомогенізатора чи подрібнювача тканини*) до отримання однорідної суспензії. Одноразовою піпеткою перенести 0,7 мл отриманої гомогенізованої тканини у стерильну конічну пробірку із кришкою, що загвинчується, уникаючи переносу часточок тканини, які не були належним чином гомогенізовані. Додати подвійний об'єм реагенту для зразка, що входить до набору картриджів, тобто внести 1,4 мл реагенту для зразка до гомогенізованої тканини. Ретельно перемішати пробірку на вортексі, щонайменше 10сек та залишити для інкубації при кімнатній температурі протягом 10хв. Повторити струшування на вортексі і залишити для інкубації на робочому столі при кімнатній температурі ще 5хв. Перенести 2,0 мл обробленого зразка в підготовлений картридж, завантажити його в прилад GeneXpert, дотримуючись інструкцій виробника.

2.3 Зразки з кісток і суглобів. Дослідження проводяться в картриджах Xpert MTB/RIF

До 1,0 мл гнійного зразку додати 2,0 мл реагенту для зразка, який входить до набору картриджів. Перемішайте зразок на вортексі не менше 10сек, потім залишити його при кімнатній температурі 10хв. Ще раз перемішати на вортексі протягом 10сек, залишити при кімнатній температурі протягом 5хв.

Додати 2,0 мл суміші в картридж Xpert MTB/RIF і завантажити цей картридж в прилад, слідуючи інструкціям виробника.

2.4 Бронхіальні аспірати або бронхоальвеолярні лаважі, отримані шляхом фібробронхоскопії. Дослідження проводяться в картриджах Xpert MTB/RIF або Xpert MTB/RIF ULTRA

Необхідно провести деконтамінацію зразку реактивом NALC-NaOH з подальшим його центрифугуванням при 3000 g протягом 15хв. Видалити надосадову рідину, залишивши приблизно 0,5 мл і ресуспендувати його в 1,0 мл фосфатного буфера. Додати реагент Sample Reagent у співвідношенні 2:1 до ресуспендованого осаду. Ретельно перемішати зразок та Sample Reagent на вортексі щонайменше 10сек та залишити для інкубації при кімнатній температурі протягом 7–8хв. Повторити струшування на вортексі і залишити для інкубації на робочому столі при кімнатній температурі ще 7–8хв (загальний час інкубації становить 15хв). Перенести 2,0 мл обробленого зразка в підготовлений картридж, завантажити його в прилад GeneXpert, дотримуючись інструкцій виробника.

2.5 Шлункові аспірати, відібрані у дітей. Дослідження проводяться в картриджах Xpert MTB/RIF або Xpert MTB/RIF ULTRA

Необхідно провести нейтралізацію 5,0 мл шлункового аспірату рівним об'ємом стерильного 1,0 % бікарбонату натрію. Гомогенізувати його і провести деконтамінацію NALC-NaOH (кінцева концентрація 1,5 %) та перемішати на вортексі протягом 30сек. Впродовж 15хв інкубувати зразок при кімнатній температурі з подальшою нейтралізацією фосфатним буфером, потім центрифугувати при 3000 g протягом 15хв. Видалити супернатант і ресуспендувати осад у 2,0 мл фосфатного буфера.

До 0,5 мл отриманого концентрованого осаду додати 1,5 мл реагенту Sample Reagent і ретельно перемішати на вортексі. Після 7–8хв інкубації при кімнатній температурі перемішати зразок на вортексі вдруге і продовжити інкубацію ще 7–8хв (загальний термін інкубації 15хв).

Додати 2,0 мл зразку, обробленого реагентом Sample Reagent, в картридж Xpert і завантажити картридж в прилад, дотримуючись інструкцій виробника.

2.6 Суглобова рідина. Дослідження проводяться в картриджах Xpert MTB/RIF або Xpert MTB/RIF ULTRA

До 1,0 мл зразка суглобової рідини додати 2,0 мл реагенту Sample Reagent. Перемішати зразок на вортексі щонайменше 10сек та залишити для інкубації при кімнатній температурі протягом 10хв. Повторити струшування на вортексі і залишити для інкубації на робочому столі при кімнатній температурі ще 5хв. Перенести 2,0 мл

обробленого зразка в підготовлений картридж, завантажити його в прилад GeneXpert, дотримуючись інструкцій виробника.

2.7 Сеча. Дослідження проводяться виключно в картриджах Xpert MTB/RIF

Незважаючи на те, що ВООЗ рекомендує виконання досліджень сечі, методика не є валідованою. Процедура виконання досліджень, що пропонується запозичена з наукових публікацій.

Відібрати 2,0 мл необробленої, нерозбавленої сечі. Центрифугувати її при 3000 g протягом 15хв, видалити надосадову рідину і ресуспендувати осад в 0,75 мл фосфатно-сольового буфера. Додати реактив Sample Reagent до осаду сечі в співвідношенні 2:1, перемішати на вортексі. Через 7–8хв інкубації при кімнатній температурі перемішайте зразок на вортексі вдруге. Продовжить інкубацію ще 7–8хв (повний час інкубації становить 15хв) при кімнатній температурі. Додати 2,0 мл обробленого зразка в картридж Xpert MTB/RIF і завантажити картридж в прилад відповідно до інструкції виробника.

При використанні замороженої сечі (об'єм 30,0–40,0 мл) необхідно розморозити зразок і центрифугувати його при 3000 g протягом 15хв. Обережно видалити надосадову рідину, залишивши над осадом ~ 1,0 мл надосадової рідини, ресуспендувати осад в збереженій надосадовій рідині. До ресуспендованої сечі додати реагенту Sample Reagent у відношенні 2:1, перемішати на вортексі. Через 7–8хв інкубації при кімнатній температурі перемішати зразок на вортексі вдруге. Продовжувати інкубацію ще 7–8хв (повний час інкубації становить 15 хв) при кімнатній температурі. Додати 2,0 мл обробленого зразка в картридж Xpert MTB/RIF і завантажити цей картридж в прилад відповідно до інструкцій виробника.

2.8 Фекалії. Дослідження проводяться дітям до 5 років виключно в картриджах Xpert MTB/RIF

Фекалії, як матеріал для дослідження, може бути прийнятий до проведення тестування на наявність *M. tuberculosis* як альтернативний матеріал у дітей до 5 років. Методика не є валідованою. У документах ВООЗ відсутні рекомендації щодо попередньої обробки фекалій перед тестуванням на GeneXpert, разом з тим, у документі ВООЗ «Молекулярні аналізи як початкові тести для діагностики туберкульозу та резистентності до рифампіцину», опублікованому у січні 2020 р., вказана чутливість для тестів Xpert MTB/RIF 61,0 % для фекалій; специфічність 98,0–100 % (цифри наведені за даними

наукових публікацій). В цих же публікаціях описано декілька способів попередньої обробки фекалій.

Спосіб 1. Розвести приблизно 2,0 мм³ фекалій в 10,0 мл стерильної води, щільно закрити пробірку і енергійно перемішати на вортексі, щоб утворилася однорідна суспензія. Інкубувати суспензію при кімнатній температурі протягом 15хв для осадження часточок. Відібрати увесь супернатант у конічну центрифужну пробірку і центрифугувати при 3000 g протягом 15хв. Видалити супернатант і ресуспендувати осад у 1,0–3,0 мл фосфатно-сольового буферного розчину. Змішати 1,0 мл ресуспендованого осаду з 2,0 мл реагенту Sample Reagent, енергійно струсити на вортексі. Через 7,0–8,0хв інкубації при кімнатній температурі перемішати зразок на вортексі вдруге. Продовжити інкубацію ще 7–8хв (загальний термін інкубації 15хв) при кімнатній температурі. Перенести 2,0 мл зразку, обробленого реагентом Sample Reagent, в картридж Xpert MTB/RIF і завантажити картридж в прилад, дотримуючись інструкцій виробника.

Спосіб 2. Приблизно 0,8 г фекалій помістити у 8,0 мл реагенту для зразків, що входить до набору картриджів Xpert MTB/RIF. Закрити пробірку кришкою, що загвинчується, і ретельно перемішати на вортексі. Залишити на 15–20хв на робочому столі для осадження часточок матеріалу. Обережно перенести 2,0 мл надосадової рідини, відібраної з верхньої частини стовпчика рідини, до камери підготовленого картриджа. Завантажити картридж в GeneXpert і запустити протокол дослідження.

Спосіб 3. 2,0–3,0 г зразка фекалій (розмір горошини) помістити у центрифужну пробірку з кришкою, використовуючи стерильну одноразову пластикову петлю. Додати 5,0 мл фосфатно-сольового буферного розчину та струсити на вортексі для гомогенізації суміші. Центрифугувати суміш при 3000 g протягом 15хв. Додати 2,0 мл реагенту Xpert до 1,0 мл осаду і ретельно перемішати для ресуспендування. Використовуючи стерильну піпетку з набору, відібрати підготовлений зразок до рівня вище мінімальної позначки. Додати суміш у картридж Xpert MTB/RIF, вставити картридж у прилад GeneXpert та запустити протокол дослідження.

РЕЗЮМЕ

Запропоновані методичні рекомендації присвячені актуальній проблемі фтизіатрії – прискореній діагностиці туберкульозу, які розроблені у відповідності до Консолідованого керівництва ВООЗ з туберкульозу 2020 р. (модуль 3 «Діагностика») і пропонуються для впровадження в практику роботи лабораторій України 3-го рівня з бактеріологічної діагностики ТБ. Використання сучасного генетичного методу та картриджів Xpert

MTB/RIF та Xpert MTB/RIF ULTRA дозволить налагодити діагностику позалегенового ТБ та почати своєчасне і ефективне його лікування.

Рекомендовано використовувати в картриджах Xpert MTB/RIF та Xpert MTB/RIF ULTRA для верифікації діагнозу «туберкульоз» не тільки мокротиння, а також інший діагностичний матеріал (спинномозкова рідина, лімфатичні вузли та інші тканини, зразки з кісток і суглобів, бронхіальні аспірати або бронхоальвеолярні лаважі, шлункові аспірати, суглобова рідина, сеча, фекалії) та наводяться методики, які апробовані в Референс-лабораторії з мікробіологічної діагностики туберкульозу МОЗ України.

Дотримання викладених методик дозволить більш якісно використовувати дослідний матеріал, що підвищить ефективність діагностики туберкульозу.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Руководство по внедрению диагностического теста Xpert MBT/RIF. Технические и операционные рекомендации; вопросы практического применения / ВОЗ, Geneva : WHO, 2014. 48 с.
2. Manju P., Tehmina M. Laboratory Diagnosis of Extra-pulmonary Tuberculosis (EPTB) in Resource-constrained Setting: State of the Art, Challenges and the Need // J. of Clinical and Diagnostic Research. 2015. Vol. 9. № 4. P. 1–6. DOI: 10.7860/JCDR/2015/12422.5792
3. Husseiny Sh. M., Faten S. B., Ahmed M. A. M. Gene Xpert for Direct Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Stool Specimens from Children with Presumptive Pulmonary Tuberculosis // Annals of Clinical and Laboratory Science. 2016. Vol. 46. № 2. P. 198–203.
4. A Novel Sample Processing Method for Rapid Detection of Tuberculosis in the Stool of Pediatric Patients Using the Xpert MTB/RIF Assay / P. B. Padmapriya et al. // Plos One. 2016. Vol. 11. № 3. P. 22–24. DOI: 10.1371/journal.pone.0151980.
5. WHO meeting Report of a Technical Expert Consultation : Non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF / ВОЗ, Geneva : WHO, 2017. 9 p.
6. Rapid Molecular Detection of Extra pulmonary Tuberculosis by the Automated GeneXpert MTB/RIF System / D. Hillemann et al. // J. of Clinical microbiology. 2011. Vol. 49. № 4. P. 1202–1205. DOI: 10.1128/JCM.02268-10.
8. WHO consolidated guidelines on tuberculosis Module 3 : Diagnosis – Rapid diagnostics for tuberculosis detection / ВОЗ, Geneva : WHO, 2020. 84 p.