

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

УКРАЇНСЬКИЙ ЦЕНТР НАУКОВОЇ МЕДИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ ТА ПАТЕНТНО-
ЛІЦЕНЗІЙНОЇ РОБОТИ

**ПОРЯДОК ВИКОРИСТАННЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕТОДІВ У ЛАБОРАТОРІЯХ З ДІАГНОСТИКИ
ТУБЕРКУЛЬОЗУ В УКРАЇНІ**

(методичні рекомендації)

Київ – 2014

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

член-кореспондент НАМН України, професор

“УЗГОДЖЕНО”

Директор

Департаменту реформ та розвитку

медичної допомоги МОЗ України

_____ В. В. Лазоришинець

_____ М. К. Хобзей

“___” _____ 2014 р.

“___” _____ 2014 р.

**ПОРЯДОК ВИКОРИСТАННЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕТОДІВ У ЛАБОРАТОРІЯХ З ДІАГНОСТИКИ
ТУБЕРКУЛЬОЗУ В УКРАЇНІ**

(методичні рекомендації)

Київ – 2014

Заклад-розробник:

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

Укладачі:

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

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

Жеребко Ніна Миколаївна – координатор Програми «Зменшення тягаря туберкульозу в Україні», РАТН, (044) 270 – 35 – 41

Чайка Алевтина Олександрівна – в. о. завідувачої бактеріологічною лабораторією з діагностики туберкульозу КРУ «Протитуберкульозний диспансер № 1» (АР Крим), (044) 275 – 41 – 33

Рецензенти:

Мельник В. М., заступник директора з науково-організаційної та науково-методичної роботи ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України», д-р мед. наук, професор.

Авдеева Л. В., завідувач відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, доктор медичних наук.

Голова профільної проблемної комісії МОЗ та НАМН України – академік НАМН України, доктор медичних наук, професор Ю. І. Фещенко.

Голова експертної комісії – доктор медичних наук, професор В. М. Мельник.

Методичні рекомендації розроблені та надруковані за підтримки американського народу через проект Агентства США з міжнародного розвитку (USAID) “Проект з надання допомоги у подоланні МР/РР ТБ в Україні”. Проект виконується міжнародною організацією РАТН.

Зміст рекомендацій є відповідальністю авторів та необов’язково збігається з точкою зору USAID або уряду США.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція,
ПТП	– протитуберкульозні препарати,
ШББ	– шафа біологічної безпеки,
Н	– ізоніазид,
Р	– рифампіцин.

ЗМІСТ

		С.
	ВСТУП.....	5
1	Організація та здійснення комплексного дослідження матеріалу із застосуванням системи GeneXpert MTB/RIF.....	6
2	Організація та здійснення комплексного дослідження матеріалу з використанням ПЛР з детекцією методом гібридизації на стрипах з типоспецифічними зондами (набори HainLifescience).....	9
3	Формулювання відповіді про результат дослідження при використанні молекулярно-генетичних систем	12
4	Аналіз дискордантних результатів.....	14
5	Заходи безпеки.....	15
	РЕЗЮМЕ.....	16
	РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....	17

ВСТУП

Виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу у клінічних зразках є основним фактором, який свідчить про специфічну природу захворювання та має вирішальне значення для вибору раціональної схеми лікування та оцінки його ефективності. Для здійснення етіологічної діагностики туберкульозу в арсеналі лабораторій на сьогоднішній день існує декілька методів: бактеріоскопічний, бактеріологічний, молекулярно-генетичний.

Під етіологічною діагностикою туберкульозу розуміють виявлення збудника захворювання (деякі методи дозволяють визначити його кількість, що є важливим інформаційним показником, який характеризує ступінь епідемічної небезпеки та тяжкість захворювання), ідентифікацію мікобактерій та визначення профілю резистентності до протитуберкульозних препаратів (ПТП).

Традиційні мікробіологічні методи мають багато переваг, але їм притаманна і низка суттєвих недоліків у порівнянні з молекулярно-генетичними методами: культуральні дослідження досить тривалі, а швидкі бактеріоскопічні методи мають низьку чутливість – для виявлення мікобактерій один мілілітр матеріалу повинен містити не менше 100 тисяч мікробних клітин.

Уніфікованим клінічним протоколом первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Туберкульоз», затвердженим Наказом МОЗ України від 21 грудня 2012 року № 1091 та методичними рекомендаціями, затвердженими МОЗ і НАМН України від 13 травня 2013 року «Алгоритм діагностики хіміорезистентного туберкульозу з комплексним використанням гено- і фенотипових методів в бактеріологічних лабораторіях протитуберкульозних закладів України» визначені групи пацієнтів, яким має призначатися дослідження матеріалу молекулярно-генетичними методами з метою етіологічної діагностики туберкульозу.

Для швидкої та всебічної лабораторної діагностики туберкульозу доцільно використовувати увесь комплекс доступних лабораторних методів. Результатом правильної організації діагностичного процесу є отримання максимальної кількості лабораторної інформації при роботі з єдиною пробю біологічного матеріалу. Для отримання достовірних результатів дослідження необхідно одну пробу біологічного матеріалу досліджувати комплексно, використовуючи увесь арсенал доступних для лабораторії методів – бактеріоскопічний, бактеріологічний, молекулярно-генетичний. Цей підхід має використовуватись незалежно від того, яку ПЛР-методику застосовують у лабораторії.

Теоретично, для дослідження молекулярно-генетичними методами може використовуватись різний матеріал. Разом з тим, слід пам'ятати, що молекулярно-генетичні методи є прямими, отже у якості зразка доцільно використовувати матеріал із вхідних воріт або із епітопів, до яких збудник має тропність. При захворюванні на туберкульоз досить інформативним є правильно зібране мокротиння пацієнта.

При надходженні проби для дослідження необхідно перевірити повноту заповнення супровідних документів та оцінити якість доставленого зразка. Для комплексного дослідження матеріалу потрібно не менше 5,0 мл якісної проби мокротиння.

Матеріал, що надійшов для дослідження у лабораторію, повинен бути зареєстрований у журналі ТБ 04/2 «Лабораторний реєстраційний журнал (бактеріологічні дослідження)». Присвоєний матеріалу лабораторний номер повинен бути єдиним, незалежно від методу дослідження, який використовується. Цей же лабораторний номер використовується і в записах робочих журналів та протоколів досліджень.

Проба, яка досліджується, повинна бути деконтамінованою. Слід зазначити, що для молекулярно-генетичних досліджень для розрідження та деконтамінації мокротиння повинен використовуватися метод обробки NALC-NaOH (Кубіка (Kubica)). Цей же метод деконтамінації рекомендований і при застосуванні системи BACTEC MGIT 960. Хід виконання деконтамінації за допомогою NALC-NaOH викладений в Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозу, затвердженій наказом МОЗ України від 06.02.2002 року № 45.

Для молекулярно-генетичних досліджень біологічного матеріалу на наявність збудників туберкульозу можуть використовуватись різні формати полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР): класична ПЛР, ПЛР у реальному часі, NESTED або інші, якщо на ринку виробів медичного призначення доступні реагенти для їх виконання, зареєстровані та дозволені до використання у закладах охорони здоров'я України відповідно до чинного законодавства.

1 ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ЗДІЙСНЕННЯ КОМПЛЕКСНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ МАТЕРІАЛУ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ СИСТЕМИ GENEXPERT MTB/RIF

Відповідно до Уніфікованого клінічного протоколу первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Туберкульоз», затвердженого Наказом МОЗ України від 21 грудня 2012 року № 1091 лабораторні дослідження біологічного матеріалу повинні проводитися у комплексі: бактеріоскопічні,

бактеріологічні та молекулярно-генетичні. Тому, вимоги для зберігання та транспортування зразків є такими, як для проб, що підлягають бактеріологічному дослідженню, тобто при неможливості доставити матеріал негайно, він може зберігатися до 48 годин при температурі $+4 \pm 2$ °C і доставлятися з дотриманням вказаних температурних умов.

Слід зауважити, оскільки прилад GeneXpert є закритою системою і працює тільки з картриджами Xpert, у яких автоматично відбуваються усі етапи ПЛР-дослідження без втручання персоналу, то немає потреби його розташовувати в окремому приміщенні. Усі маніпуляції з досліджуваним матеріалом від виділення ДНК мікроорганізмів до детекції результатів ампліфікації відбуваються у закритому єдиному для кожного зразка картриджі. Вимога ДСП 9.9.5.153-2008* поширюється на лабораторії, у яких використовуються методики, що передбачають виконання окремих етапів ПЛР-дослідження (виділення ДНК, ампліфікація, детекція) персоналом лабораторії за допомогою «відкритих» ПЛР-систем – і щодо обладнання, і щодо реагентів.

Розробник GeneXpert MTB/RIF гарантує адекватну коректну роботу системи при дослідженні матеріалу від осіб, які не отримували ПТП. Таким чином, метод може бути застосований як скринінговий для виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу та мутацій у гені *groB*, з яким пов'язують резистентність мікобактерій до рифампіцину (R). Така лабораторна інформація дозволить на ранніх етапах діагностики виявити у відповідному матеріалі збудника туберкульозної інфекції та насторожити фтизіатра щодо наявності у *M. tuberculosis* резистентності до ПТП I ряду. Разом з тим, слід пам'ятати, що результати тестування у картриджах Xpert MTB/RIF є попередніми і не можуть замінити подальшого бактеріологічного дослідження відповідно до вимог чинної Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозу.

За інструкцією виробника для дослідження у картриджах Xpert MTB/RIF може досліджуватись мокротиння або його осад. Для інших видів матеріалу методика не валідована.

Для отримання коректного результату дослідження та враховуючи те, що в Україні дослідження з використанням приладів GeneXpert MTB/RIF проводяться в комплексі з посівами на рідке середовище за допомогою системи BACTEC MGIT 960, які встановлені в лабораторіях 3-го рівня, доцільно працювати з осадами мокротиння після проведення їх передпосівної обробки (деконтамінації).

Після оцінки якості доставленого мокротиння (якість проби та заповнення документів) контейнер з матеріалом переносять у шафу біологічної безпеки (ШББ) 2 класу і

проводять її деконтамінацію з використанням NALC-NaOH відповідно до методики, затвердженої Наказом МОЗ України від 06.02.2002 № 45.

Із ресуспендованого осаду із однієї пробірки необхідно зробити наступне:

- посіяти 0,5 мл підготовленого матеріалу у пробірку з рідким середовищем Мідлбрукка 7Н9 для інкубації в аналізаторі ВАСТЕС MGIT 960;
- посіяти 0,2 мл у пробірку з щільним середовищем Левенштейна-Єнсена і помістити у термостат при температурі 37 °С;
- якщо лабораторія за будь-яких причин не може виконати дослідження за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960, необхідно зробити посів на 2 пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена по 0,2 мл. Подальші маніпуляції з посівами слід здійснювати відповідно до вимог чинної Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозу;
- одну краплю матеріалу слід нанести на скельце з метою приготування та фарбування мазка за методом Циля-Нільсена для світлової бактеріоскопії;
- помістити у чисту пробірку з кришкою, що загвинчується, 0,5 мл деконтамінованого осаду для здійснення попередньої підготовки проби для дослідження у картриджі Xpert MTB/RIF. Відповідно до інструкції виробника картриджів до 0,5 мл проби слід додати 1,5 мл реактиву для зразків. Енергійно перемішати і залишити для інкубації у штативі у ШББ при кімнатній температурі впродовж 15 хвилин. За цей проміжок часу необхідно 1 – 2 рази ретельно перемішати вміст пробірки. Після експозиції перенести 2,0 мл суміші у картридж Xpert MTB/RIF, помістити його в аналізатор GeneXpert MTB/RIF і запустити відповідну програму виконання тесту.

Залишки матеріалу необхідно зберігати у холодильнику до завершення тестування в системі GeneXpert MTB/RIF.

Якщо не вдалося отримати результат дослідження з цієї пробою (Error чи NO Result), необхідно повторити дослідження, використавши збережені залишки матеріалу з цієї ж пробірки.

При відсутності залишків проби або при отриманні результату – «недійсний» (invalid), необхідно повторно зібрати матеріал для дослідження і повторити усю низку маніпуляцій, описаних вище.

Після отримання достовірного результату тестування у картриджі Xpert MTB/RIF, його необхідно занести до Журналу ТБ 04/2 та видати відповідь лікарю-фтизіатру, який направив матеріал.

Пробірки з посівами в рідке середовище Мідлбрукка 7H9 та на щільне Левенштейна-Єнсена досліджують відповідно до вимог Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції, затвердженої Наказом МОЗ України від 06.02.2002 № 45 та інструкції по роботі з системою VASTEC MGIT 960.

2 ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ЗДІЙСНЕННЯ КОМПЛЕКСНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ МАТЕРІАЛУ З ВИКОРИСТАННЯМ ПЛР З ДЕТЕКЦІЄЮ МЕТОДОМ ГІБРИДИЗАЦІЇ НА СТРИПАХ З ТИПОСПЕЦИФІЧНИМИ ЗОНДАМИ (НАБОРИ HAINLIFESCIENCE)

Заклади протитуберкульозної служби, які мають відповідно обладнані ПЛР-лабораторії та влаштовані з дотриманням чинного законодавства*, а також мають підготовлений персонал, можуть використовувати ПЛР з детекцією методом гібридизації на стрипах з типоспецифічними зондами для виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу, ідентифікації збудника захворювання та визначення наявності мутацій у генах, з якими пов'язана резистентність до R та ізоніазиду (H), а також до препаратів II ряду.

Реагенти GenoType® MTBDRplus та GenoType® MTBDRsl виробництва компанії HainLifescience дозволені до використання в Україні відповідно до чинного законодавства, можуть давати коректний достовірний результат з біологічним матеріалом та бактеріальними культурами, вирощеними на рідкому або щільному середовищі.

Набір GenoType®MTBDRplus дозволяє виявити у пробі присутність ДНК мікобактерій туберкульозного комплексу, а також наявність генних мутацій, асоційованих з резистентністю до R та H. Якщо за результатами тестування матеріалу з наборами GenoType®MTBDRplus виявлені мутації у генах, з якими пов'язують резистентність до препаратів I ряду, тестування може бути продовжене з набором GenoType®MTBDRsl.

*ДСП 9.9.5.-080-2002 “Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю”; МВ 9.9.5.101-2003 “Застосування полімеразної ланцюгової реакції для виявлення збудників інфекційних захворювань людини”; ДСП 9.9.5.153-2008 "Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами"

Дослідження з реагентами GenoType®MTBDRsl дають можливість виявити наявність генних мутацій, що відповідають за резистентність мікобактерій туберкульозного комплексу до препаратів II ряду – аміноглікозидів, циклічних пептидів, фторхінолонів, а також етамбутолу.

Послідовність комплексного дослідження з використанням реагентів GenoType®MTBDRplus та GenoType®MTBDRsl є такою ж, як описано в попередньому розділі. Однак, при проведенні досліджень слід враховувати особливості використання наборів системи GenoType®.

Перш за все необхідно пам'ятати, що виробник гарантує якість роботи набору GenoType®MTBDRplus при роботі з наступним матеріалом: нативним або індукованим мокротинням (незалежно від результатів бактеріоскопії), бронхо-альвеолярним лаважем, плевральними аспіратами, а також культурами, виділеними в рідкому або на щільному середовищах. Для наборів GenoType®MTBDRsl виробник пропонує у якості матеріалу для дослідження використовувати мокротиння з позитивним результатом бактеріоскопії «КСБ+» або культурами, виділеними в рідкому або на щільному живильному середовищі. Для інших видів матеріалу методика не валідована.

При роботі з біологічним матеріалом після проведення його деконтамінації з використанням реактиву NALC-NaOH, отриманий осад має бути ресуспендований в 1,0 – 1,5 мл фосфатного буферу (більші об'єми фосфатного буфера можуть негативно вплинути на чутливість тесту).

Після обробки та ресуспендування біологічного матеріалу необхідно виконати наступні маніпуляції:

- посіяти 0,5 мл підготовленого матеріалу у пробірку з рідким середовищем Мідлбрукка 7H9 для інкубації в аналізаторі ВАСТЕС MGIT 960;
- посіяти 0,2 мл у пробірку з щільним середовищем Левенштейна-Єнсена і помістити у термостат при температурі 37 °С;
- якщо лабораторія за будь-яких причин не може виконати дослідження за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960, необхідно зробити посів на 2 пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена по 0,2 мл. Подальші маніпуляції з посівами слід здійснювати відповідно до вимог чинної Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозу;
- одну краплю матеріалу слід нанести на скельце з метою приготування та фарбування мазка за методом Циля-Нільсена для світлової бактеріоскопії;

- 0,7 мл деконтамінованого зразка біологічного матеріалу (при використанні автоматичного виділення ДНК на GenoXtract) або 0,5 мл зразка (для виділення ДНК ручним методом) переносять до пробірки об'ємом 2,0 мл з кришечкою, що загвинчується. Цю пробірку з матеріалом передають у приміщення виділення нуклеїнової кислоти для здійснення ПЛР дослідження відповідно до інструкції виробника реагентів.

Важливо пам'ятати, що для отримання адекватного коректного результату необхідно:

а) щоб забраний матеріал був деконтамінований не пізніше 48 годин від моменту забору у пацієнта, при цьому зберігатися він може при температурі $+4 \pm 2$ °C.

б) після деконтамінації методом NALC-NaOH та наступного ресуспендування осаду у фосфатному буфері зразки можуть зберігатися при температурі (-20) °C або (-80) °C впродовж 5 діб (якщо в подальшому матеріал буде досліджуватись з реагентами GenoType® MTBDRplus) або до 3 місяців (для отримання достовірних результатів з реагентами GenoType®MTBDRsl).

Набори реагентів GenoType® MTBDRplus та GenoType®MTBDRsl можуть бути використані для прискорення отримання лабораторної інформації щодо чутливості виділених мікобактерій туберкульозного комплексу до ПТП.

Для виділення ДНК можуть використовуватись «ручна методика» за допомогою реагентів GenoLyse або автоматична – у приладі GenoXtract з набором реагентів GXT DNA/RNA ExtractionKit.

При роботі з культурами, вирощеними в рідкому середовищі, необхідно перенести 1000 мкл культури у чисту мікропробірку об'ємом 1,5 – 2,0 мл з кришкою, що загвинчується, і виділити ДНК відповідно до інструкції виробника до набору реагентів GenoLyse. Для виділення ДНК із цих культур за допомогою GenoXtract та реагентів GXT DNA/RNA ExtractionKit необхідно 10,0 мкл рідкої культури змішати з 700 мкл дейонізованої води для молекулярної біології, помістити в GenoXtract та запустити відповідну програму.

При роботі з культурами, вирощеними на щільному середовищі, необхідно перенести 1 – 2 колонії у 100 мкл лізуючого буфера, який входить до складу набору для ручного виділення ДНК GenoLyse, ретельно ресуспендувати їх і отриману завись мікроорганізмів використовувати для виділення нуклеїнової кислоти відповідно до інструкції виробника. При виділенні ДНК із штамів, вирощених на щільному середовищі, за допомогою GenoXtract та реагентів GXT DNA/RNA ExtractionKit необхідно до 700 мкл дейонізованої води для молекулярної біології внести 1 – 2 колонії мікроорганізмів, ретельно перемішати на вортексі, помістити у GenoXtract та запустити відповідну програму.

Для контролю якості етапу виділення ДНК необхідно обов'язково з кожною партією досліджуваних проб (10 – 12 зразків) ставити позитивний та негативний контроль. У якості негативного контролю може бути використано стерильний ізотонічний розчин (0,9 % NaCl) або дейонізована вода, яку вносять у чисту пробірку і здійснюють з нею усі маніпуляції такі ж як із зразком.

Для приготування позитивного контрольного зразка використовують контрольний штам *M. tuberculosis*. Послідовність приготування позитивного контролю викладена в інструкції виробника реагентів.

Подальші етапи дослідження матеріалу у ПЛР з детекцією методом гібридизації на стрипах з типоспецифічними зондами виконують відповідно до інструкцій виробника.

Усі посіви матеріалу на живильні середовища, що були здійснені паралельно при виконанні комплексу досліджень даної проби, повинні бути інкубовані в оптимальних температурних умовах. Культури, що виділені в рідкому та на щільному середовищах підлягають обов'язковій ідентифікації та визначенню профілю резистентності до ПТП відповідно до вимог «Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції», затвердженої Наказом МОЗ України від 06.02.2002 року № 45. Результати досліджень (бактеріоскопії, ідентифікації, тесту медикаментозної чутливості, молекулярно-генетичних досліджень) заносять до журналу ТБ 04/2 та інформують про них фтизіатра для призначення та/або коригування схеми лікування хворого.

3 ФОРМУЛЮВАННЯ ВІДПОВІДІ ПРО РЕЗУЛЬТАТ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИ ВИКОРИСТАННІ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ СИСТЕМ

Формулювання відповіді про результат дослідження у картриджі Xpert MTB/RIF:

- при отриманні у системі GeneXpert результату «МБТ+/Риф+» у бланку заключення вказують – «Виявлені мікобактерії туберкульозного комплексу та мутації у гені *groV*, з якими пов'язують резистентність до рифампіцину»;
- при отриманні у системі GeneXpert результату «МБТ+/Риф–» у бланку заключення вказують – «Виявлені мікобактерії туберкульозного комплексу, мутації у гені *groV* не виявлено»;
- при отриманні у системі GeneXpert результату «МБТ–» у бланку заключення вказують – «Мікобактерії туберкульозного комплексу не виявлено»;
- при отриманні у системі GeneXpert результату «помилка» або «нема результату» і відсутності достатнього об'єму залишків даної проби, а також при результаті

«недійсний» у бланку заключення слід вказати – «Отриманий результат підлягає перестановці. Необхідно повторно надати матеріал для дослідження не пізніше 3 робочих днів від дати видачі даного заключення».

Формулювання відповіді про результат дослідження при використанні наборів для ПЛР з детекцією методом гібридизації на стрипах з типоспецифічними зондами (набори HainLifescience)

- При дослідженні матеріалу з використанням набору реагентів GenoType® MTBDRplus:

1) отримання позитивного сигналу в усіх пробах дикого типу свідчить про відсутність мутацій, тому у бланку заключення слід вказати – «Виявлено мікобактерії туберкульозного комплексу чутливі до рифампіцину та ізоніазиду»;

2) відсутність сигналу хоча б в одній із проб дикого типу свідчить про стійкість збудника до відповідного антибіотика – R або H. Смужка, яка проявилася в зоні гена *groB* свідчить про стійкість досліджуваного штаму до R, смужка в зоні гену *katG* та *inhA* – про стійкість до H. У лабораторному заключенні потрібно вказати – «Виявлено мікобактерії туберкульозного комплексу, які мають мутації в гені *groB* (та/або *katG* та/або *inhA*), з якими пов'язують стійкість до R (та/або H)».

- При дослідженні матеріалу з використанням набору реагентів GenoType® MTBDRsl

1) отримання позитивного сигналу в усіх пробах дикого типу свідчить про відсутність мутацій, тому у бланку заключення слід вказати – «Виявлено мікобактерії туберкульозного комплексу чутливі до фторхінолонів, амідоглікозидів/циклічних пептидів та етамбутолу»;

2) відсутність сигналу хоча б в одній із проб дикого типу свідчить про стійкість збудника до відповідного антибіотика – фторхінолонів, амідоглікозидів/циклічних пептидів та етамбутолу. Смужка, яка проявилася в зоні гена *gyrA* свідчить про стійкість досліджуваного штаму до фторхінолонів, смужка в зоні гену *rfs* – про стійкість до амідоглікозидів/циклічних пептидів, а в зоні гену *embB* – про стійкість до етамбутолу. У лабораторному заключенні потрібно вказати – «Виявлено мікобактерії туберкульозного комплексу, які мають мутації в гені *gyrA* (та/або *rfs*, та/або *embB*), з якими пов'язують стійкість до фторхінолонів (та/або амідоглікозидів/циклічних пептидів, та/або етамбутолу)».

4 АНАЛІЗ ДИСКОРДАНТНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Під дискордантними результатами слід розуміти результати лабораторних досліджень однієї і тієї ж проби досліджуваного матеріалу, отримані різними методами, які суттєво відрізняються або протирічають один одному.

Для мінімізування кількості випадків отримання дискордантних результатів дослідження важливо ретельно аналізувати кожний такий випадок з урахуванням можливих причин їх отримання.

Наявність дискордантних результатів може бути пов'язана з різними чинниками. Якщо молекулярно-генетичними методами виявлено ДНК збудника туберкульозу, а бактеріоскопічно із тієї ж проби отримано негативний результат, це може бути пояснено більш високою чутливістю методу ПЛР у порівнянні з бактеріоскопією. Випадки відсутності росту мікобактерій при позитивному результаті ПЛР можуть бути пояснені присутністю в пробі нежиттєздатних бактерій, наприклад після антибіотикотерапії. Разом з тим, можуть бути випадки, коли методом ПЛР мікобактерії не виявлені, а культурально отримано ріст мікроорганізмів. Одним із варіантів пояснення може бути присутність у матеріалі нетуберкульозних мікобактерій, які не будуть виявлені молекулярними методами, оскільки праймери підібрані таким чином, що виявляють тільки мікобактерії туберкульозного комплексу.

Можуть бути і дискордантні результати щодо чутливості мікроорганізмів до ПТП. Слід пам'ятати, що, наприклад, з геном *groV* пов'язують біля 95,0 % випадків резистентності до R, до 5,0 % випадків резистентності можуть бути пов'язані з мутаціями в інших локусах геному. Аналогічна ситуація стосується і інших препаратів. Необхідно пам'ятати і той факт, що ПЛР забезпечує скринінг послідовностей нуклеїнових кислот, а не амінокислот. Деякі мутації можуть не призводити до заміни амінокислоти («мутації, що мовчать»), тому результат може не співпадати з результатами фенотипових методів.

Якщо у досліджуваній пробі містяться гетерозиготні штами або суміш мікобактерій туберкульозного комплексу, або туберкульозних та нетуберкульозних бактерій, то результати, отримані в ПЛР, можуть відрізнятися від результатів бактеріологічних досліджень.

Крім того, слід пам'ятати, що такі результати можуть бути отримані при дослідженні різних зразків (наприклад, перша проба тестувалася бактеріологічними методами, а друга – ПЛР), при неправильному відборі хворих (не інформативним є дослідження матеріалу від осіб, що вживали ПТП).

5 ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

Усі заходи безпеки при роботі матеріалом, підозрюваним на вміст біологічних патогенів, викладені у ДСП 9.9.5.-080-2002 «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю»; ДСП 9.9.5.153-2008 «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами» та МВ 9.9.5.101-2003 «Застосування полімеразної ланцюгової реакції для виявлення збудників інфекційних захворювань людини».

Необхідно пам'ятати, що при роботі з одним матеріалом можуть послідовно відкриватися тільки ті пробірки та картридж, які будуть використані саме для цього матеріалу. Відкривати декілька картриджів одночасно – заборонено!

Для попередження кросконтамінації та внутрішньолабораторного інфікування лабораторних фахівців усі маніпуляції з матеріалом, підозрюваним на вміст біологічних патогенних агентів, слід виконувати з використанням засобів індивідуального захисту у ШББ шафі біологічної 2 класу.

РЕЗЮМЕ

Запропоновані методичні рекомендації присвячені актуальній проблемі фтизіатрії – діагностиці туберкульозу з використанням молекулярно-генетичних систем.

Впровадження в практику охорони здоров'я молекулярно-генетичних методів у поєднанні з сучасними фенотиповими дозволить покращити якість і своєчасність діагностики туберкульозу в Україні. Одночасне використання молекулярно-генетичного і культурального методів дослідження сприятиме швидкій постановці діагнозу, ізоляції пацієнта і своєчасному початку лікування, дозволить поліпшити клінічний результат і економічність терапії.

Авторами наведена організація та здійснення комплексного дослідження матеріалу із застосуванням систем: GeneXpert MTB/RIF та використанням ПЛР з детекцією методом гібридизації на стрипах з типоспецифічними зондами (система GenoType).

Пропонується впровадити в практику роботи бактеріологічних лабораторій протитуберкульозних закладів України молекулярно-генетичні методи діагностики туберкульозу. Це дозволить покращити якість і своєчасність діагностики туберкульозу. Методичні рекомендації рекомендовані для лікарів-бактеріологів і лікарів-фтизіатрів протитуберкульозних закладів України.

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 Програми «Зменшення тягаря туберкульозу в Україні» за фінансової підтримки РАТН.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Бочкарёв, Е. Г. Генодиагностика во фтизиатрии [Текст] / Е. Г. Бочкарёв, Т. С. Денисова, Э. В. Генерозов. – М., 2000. – 25 с.
2. Молекулярно-генетические и бактериологические методы диагностики *M. tuberculosis* с множественной устойчивостью [Текст] / Ф. Ф. Агаев [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2009. – № 10. – С. 32–35.
3. Оптимизация лабораторной диагностики туберкулёза с использованием современных бактериологических и молекулярно-генетических методов [Текст] / И. М. Федорин [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 2. – С. 36–43.
4. Туберкулез. Патогенез, защита, контроль : Пер. с англ. / Под. ред. Барри Р. Блума. – М. : Медицина, 2002. – 696 с.
5. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью : Пер. с англ. / Под ред. И. Бастиана, Ф. Порталс. – М. : Медицина и жизнь, 2003. – 368 с.
6. WHO Tuberculosis programme : Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis [Text] / WHO / НТМ / ТВ. – Geneva, 2009. – 83 p.