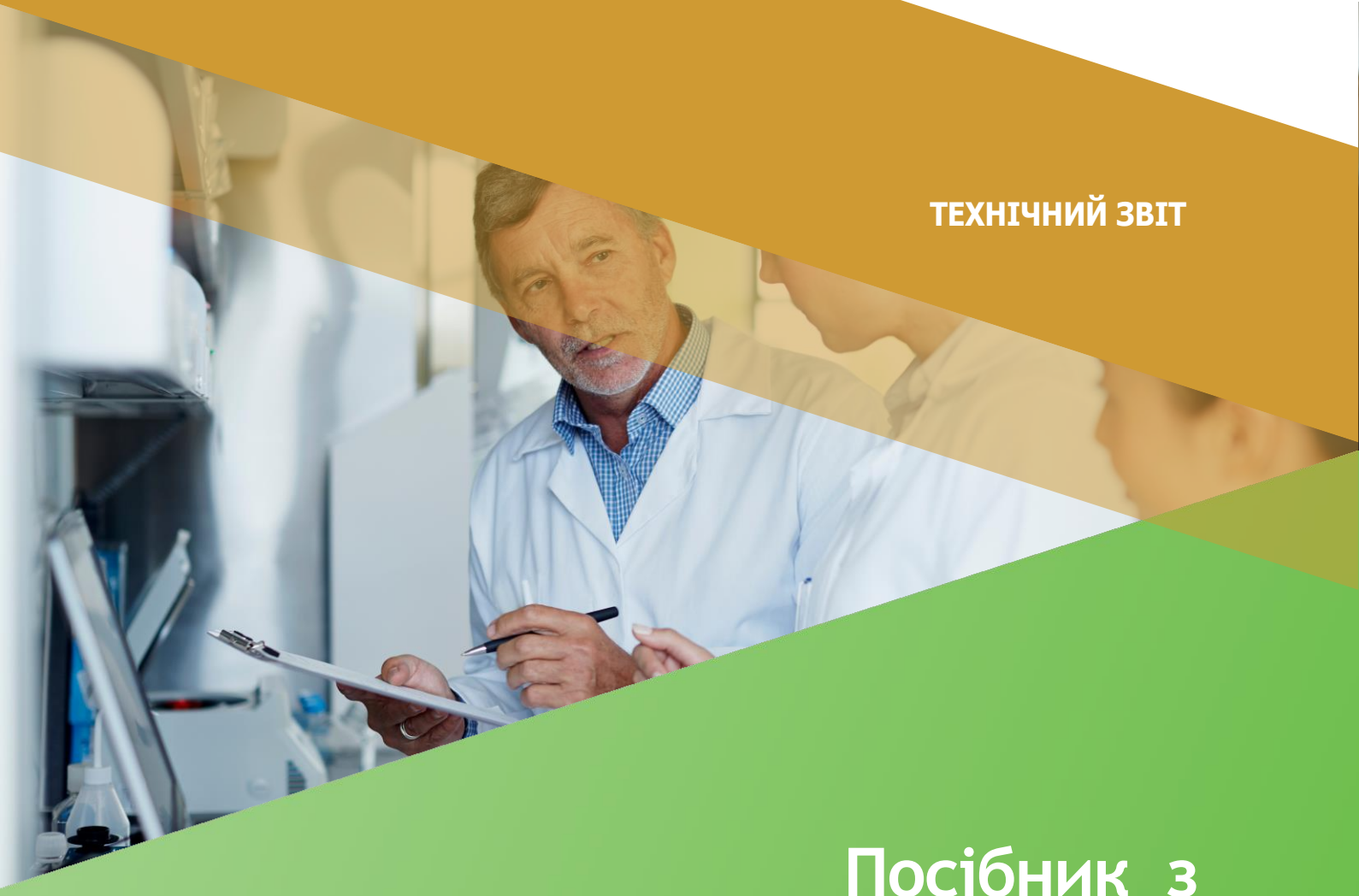
ecdc
EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL



ТЕХНІЧНИЙ ЗВІТ

Посібник з лабораторних методів діагностики туберкульозу в Європейському Союзі

Оновлено у 2022 році

www.ecdc.europa.eu

ТЕХНІЧНИЙ ЗВІТ **ECDC**

Посібник з лабораторних методів діагностики туберкульозу в Європейському Союзі

Оновлено у 2022 році

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL

Підготовку даного звіту Європейського центру профілактики та контролю захворювань (далі - ECDC) координував Csaba Ködmön за підтримки Marieke J. van der Werf, Daniela Maria Cirillo та Elisa Tagliani.

Цей звіт було надіслано для ознайомлення членів мережі референс-лабораторій з діагностики ТБ (далі - мережа ERLTB) (список партнерів див. у Додатку 3).

Першу версію цього технічного звіту ECDC раніше було опубліковано раніше під назвою «Опанування основ боротьби з туберкульозом: Розробка посібника щодо методів діагностики туберкульозу» (Стокгольм, 2011), стосувався розробки посібника. Потім цей звіт було переглянуто та у 2016 році було перейменовано на «Посібник з методів лабораторної діагностики туберкульозу в Європейському Союзі», а згодом у 2018 році - на «Посібник з методів лабораторної діагностики туберкульозу в Європейському Союзі - Оновлене видання 2018 року». У зв'язку з появою нових наукових даних у 2022 році було проведено подальший перегляд і оновлено чотири розділи (глави 6, 7, 8 і 10).

Європейський центр профілактики та контролю захворювань. Посібник з лабораторних методів діагностики туберкульозу в Європейському Союзі – Оновлена версія 2022 р. Стокгольм: ECDC; 2023 рік.

Стокгольм, вересень 2023 року

ISBN 978-92-9498-648-1 doi
10.2900/433652
Номер у каталозі TQ-07-23-359-EN-N

© Європейський центр профілактики та контролю захворювань, 2023 р.

Відтворення дозволено за умови посилання на джерело.

Зміст

Скорочення 8
Історія питання та вступ 10
Як цей посібник пов'язаний з іншими роботами в цій галузі 10
Яку інформацію містить/не містить цей документ 10
Призначення документа та користувачі 11
Історія створення посібника 11
Інформація, представлена в цьому виданні 11
1 Біобезпека в клінічній лабораторії з діагностики ТБ 11
2 Забезпечення якості 11
3 ТБ-інфекція 11
4 Мікроскопія мазків 12
5 Посів культур культури з на виявлення комплексу мікобактерій туберкульозу 12
6 Молекулярні аналізи для швидкого виявлення ТБ та лікарсько-стійкого туберкульозу 12
7 Фенотипічне тестування чутливості до протимікробних препаратів для комплексу мікобактерій туберкульозу 12
8 Молекулярне типування ізолятів комплексу мікобактерій ТБ 12
9 Використання та валідація дезінфікуючих засобів для мікобактерій туберкульозу 12
10 Інформація для лікарів: лабораторна діагностика туберкульозу 12
Відмова від відповідальності 12
1 Біобезпека в лабораторії з діагностики ТБ 13
1.1 Передумови та принципи 13
1.2 Система безпечної ізоляції лабораторії (3-й рівень біобезпеки) 14
1.2.1 Загальні положення 14
1.3 Лабораторне приміщення 15
1.4 Процедури 16
1.5 Засоби індивідуального захисту (ЗІЗ) 16
1.6 Кадровий компонент 17
1.7 Конкретні лабораторні завдання, пов'язані з небезпекою 17
Список літератури 19
Додаток 1 20
2 Забезпечення якості 22
2.1 Передумови та принципи 22
2.2 Вибір методу випробування та його проведення 24
2.3 Валідація 24
2.4 Контроль та моніторинг тенденцій за ключовими індикаторами 24
2.5 Фізичні та екологічні умови 25
2.6 Обладнання 25
2.7 Керівний склад та персонал 25
2.8 Документування та реєстрація 25
2.9 Настанови щодо відбору зразків, розгляду запитів та обслуговування клієнтів 26
2.10 Субпідряди, послуги та постачання 26
2.11 Претензії, помилки та коригувальні дії 26
2.12 Вдосконалення 26
2.13 Підготовка звіту та оприлюднення результатів 26
Список літератури 27
3 Діагностика інфекції ТБ 28
3.1 Передумови та принципи 28
3.1.1 Імунна відповідь на мікобактерії туберкульозу 28
3.2 Туберкулінова шкірна проба (ТШП) 29
3.3 Аналізи вивільнення гамма-інтерферону (IGRA) 30
3.3.1 Вступ 30
3.3.2 Чинні національні настанови та клінічне застосування IGRAs 30
3.3.3 Прогностичне значення IGRA щодо розвитку захворювання до активної форми туберкульозу 32
3.3.4 Ефективність та відтворюваність IGRA 32
3.3.5 Процедура 1: Аналіз QuantiFERON-TB Gold та QuantiFERON-TB Gold PLUS 33
Загальні принципи 33
Вихідні епідеміологічні дані 33
Безпека 33
Матеріали, надані виробником 33
Необхідні матеріали (не надаються) 34
Зберігання 34

Методи ... 34
Інтерпретація результатів ... 35
Контроль якості ... 36
Параметри контролю якості ... 37
Зовнішня оцінка якості ... 37
3.3.6 Процедура 2: Процедура T-SPOT ... 37
Загальні принципи ... 37
Вихідні епідеміологічні дані ... 37
Безпека ... 37
Матеріали ... 38
Підготовка звіту ... 41
Контроль якості ... 41
Зовнішня оцінка якості (ЗОЯ) ... 41
Список літератури ... 42
Додаток 2. Інформаційний листок пацієнта ... 44
4 Мікроскопія мазків ... 45
4.1 Передумови та принципи ... 45
4.2 Процедура 1: Метод Ціля-Нільсена (ZN) ... 45
4.2.1 Приготування реагентів для мікроскопії за методом Ціля-Нільсена (ZN). ... 45
4.2.2 Зберігання реагентів ... 47
4.2.3 Контроль якості свіжоприготованих реагентів для фарбування ... 47
4.3 Процедура 2: Флуорохромне фарбування ... 47
4.3.1 Контроль якості свіжоприготованих реагентів для фарбування ... 47
Відбір зразків ... 48
Поводження зі зразками ... 48
Критерії прийнятності ... 48
4.5 Приготування мазків ... 49
4.6 Процедури фарбування ... 49
4.6.1 Фарбування за методом Ціля-Нільсена ... 49
4.6.2 Метод фарбування флуорохромами ... 50
4.6.3 Автоматичне фарбування ... 50
4.7 Мікроскопія ... 50
4.7.1 Функціональне забезпечення ... 51
4.7.2 Флуоресцентна мікроскопія ... 51
4.7.3 Світлодіодна (LED) мікроскопія ... 51
4.8 Ведення обліку та підготовка звітів ... 51
4.8.1 Дослідження мазків за методом Ціля-Нільсона (ZN) ... 52
4.8.2 Мікроскопічне дослідження мазків, пофарбованих аураміном (флуорохром) ... 52
4.9 Контроль якості ... 53
4.9.1 Параметри контролю якості ... 53
Список літератури ... 54
5 Культуральні дослідження на наявність комплексу мікобактерій туберкульозу ... 55
5.1 Передумови та принципи ... 55
5.2 Біонебезпека та біобезпека в ТБ-лабораторії ... 55
5.2.1 Мінімальні рекомендації ВООЗ для закладів, що проводять дослідження на культури ТБ/ тестування медикаментозної чутливості ... 56
5.3 Збір, зберігання та транспортування зразків ... 57
5.3.1 Відбір зразків ... 57
5.3.2 Зберігання зразків ... 58
5.3.3 Транспортування зразків ... 58
5.4 Гомогенізація та знезараження зразків ... 58
5.4.1 Розчинення та знезараження зразків мокротиння ... 59
5.4.2 Розчинення та знезараження інших зразків, окрім мокротиння ... 61
5.5. Живильні середовища для посіву культур: принципи ... 62
5.6 Тверді живильні середовища ... 62
5.6.1 Живильні середовища на основі яєць ... 62
5.6.2 Живильні середовища на основі агару ... 63
5.6.3 Рідкі живильні середовища ... 63
5.6.4 Контроль якості живильних середовищ ... 63
5.7 Інокуляція в культуральну пробірку ... 64
5.7.1 Тверді живильні середовища ... 64
5.7.2 Рідкі живильні середовища ... 64
5.8 Інкубація культури ... 64
5.9 Культуральне дослідження ... 64

5.10 Хроматографічний імуноферментний аналіз для якісного виявлення комплексу мікобактерій туберкульозу з культур 66
5.10.1 Вступ 66
5.10.2 Матеріали 66
5.10.3 Методи 66
5.10.4 Інтерпретація результатів 66
5.10.5 Біобезпека 66
Список літератури 68
6 Молекулярні методи швидкої діагностики туберкульозу та лікарсько-стійкого туберкульозу 69
6.1 Передумови та принципи 69
6.2 Метод лінійних проб (лінійний зонд-аналіз) 69
6.2.1 Лінійний зонд-аналіз для ідентифікації видів роду *Mycobacterium* 69
6.2.2 Лінійні зонд-аналізи для ідентифікації комплексу *M. tuberculosis* та виявлення медикаментозної резистентності у легеневих клінічних та культуральних зразках 70
6.3 Аналізи на основі ПЛР у реальному часі для ідентифікації комплексу *M. tuberculosis* та виявлення резистентності до лікарських засобів 72
6.3.1 Одноразова система на основі картриджу для обробки зразків з інтегрованим мультиколірним приладом для ПЛР у реальному часі для виявлення комплексу *M. tuberculosis* та визначення резистентності до лікарських препаратів 73
6.3.2 Мікро-ПЛР на основі чипа в режимі реального часу для виявлення комплексу M. tuberculosis та резистентності до рифампіцину 74
6.3.3 Централізоване тестування для виявлення комплексу *M. tuberculosis* та визначення резистентності до рифампіцину та ізоніазиду 75
6.4 Підходи на основі секвенування нового покоління для виявлення лікарсько-стійкого туберкульозу 78
6.4.1 Повногеномне секвенування 79
6.4.2 Цільове секвенування нового покоління 79
Список літератури 81
7 Фенотипічний тест на медикаментозну чутливість комплексу *Mycobacterium tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів 84
7.1 Передумови та принципи 84
7.2 Загальний метод – тестування на чутливість до протимікробних препаратів на культурі 85
7.2.1 Визначення 85
7.2.2 Вступ 85
7.2.2 Матеріали 87
7.2.3 Методи 87
7.2.4 Звіт/інтерпретація 88
7.3 Метод пропорцій на середовищі Левенштейна-Йенсена 88
7.3.1 Вступ 88
7.3.2 Матеріали 88
7.3.3 Методи 88
7.3.4 Інтерпретація результатів звіту 90
7.4 Тестування на медикаментозну чутливість у рідких середовищах (Bactec MGIT 960) 90
7.4.1 Вступ 90
7.4.2 Матеріали 90
7.4.3 Методи 90
7.4.4 Інтерпретація результатів звіту 91
7.5 Визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) відповідно до референтного методу Мережі EUCAST 92
Список літератури 94
8 Молекулярне типування ізолятів комплексу *Mycobacterium tuberculosis* 97
8.1 Передумови та принципи 97
8.2 IS6110 RFLP типування 97
8.3 Споліготипування 98
8.4 MIRU-VNTR типування 98
8.5 Повногеномне секвенування 99
8.6 Цільове СНП 100
8.7 Загальні аспекти щодо методів генотипування 100
8.8 Матеріали 101
8.9 Результати/інтерпретація 102
8.10 Контроль якості 102
Список літератури 103
9 Використання та валідація дезінфекційних засобів для роботи з комплексом *Mycobacterium tuberculosis* 106
9.1 Дезінфекція рідкими засобами 106
9.1.2 Тест з використанням носія: EN 14563:2008 107
9.1.3 Вибір методу 108

9.2 Газова дезінфекція ... 108
9.2.1 Випарований перекис водню та пари перекису водню ... 108
9.2.2 Сухий туман перекису водню ... 109
9.2.3 Плазмовий перекис водню ... 109
9.2.4 використання газової дезінфекції в аварійних ситуаціях ... 109
Список літератури ... 111
10 Інформація для лікарів: лабораторна діагностика туберкульозу ... 112
10.1 Вступ ... 112
10.2 Загальні міркування щодо діагностики ТБ ... 113
10.3 Спеціальні міркування щодо діагностики туберкульозу ... 114
10.3.1 Легеневий матеріал ... 114
10.3.2 Позалегеневий матеріал ... 115
10.3.3 Плевральний матеріал ... 115
10.3.4 Лімфаденітний матеріал ... 115
10.3.5 Перитонеальна рідина ... 116
10.3.6 Сеча ... 116
10.3.7 Кров ... 116
10.4 Потік інформації від мікробіолога до лікаря та інструкції щодо діагностики туберкульозу ... 116
Список літератури ... 119
Додаток 3. Партнерська мережа ... 120

Рисунки

Рисунок 1. Попереджувальний знак біологічної небезпеки на дверях лабораторії ... 14
Рисунок 2. Потенційні наслідки інфікування організму людини M. tuberculosis ... 29
Рисунок 3. Компоненти мікроскопа ... 50
Рисунок 4. Мікроскопія мазків біологічних зразків на КСБ ... 52
Рисунок 5. Мікроскопія мазків на наявність КСБ у культурах *M. tuberculosis* ... 52
Рисунок 6. Мінімальний графік обстеження посіву культур на твердому живильному середовищі ... 65
Рисунок 7. Приклади хроматографічних імуноферментних аналізів для якісного виявлення комплексу *M. tuberculosis* ... 67
Рисунок 8. Інтерпретація результатів аналізу GenoType cMdirect ... 70
Рисунок 9. Конфігурація смужок GenoType MTBDRplus V2 (a) та GenoType MTBDRsl V2 (b) ... 72
Рисунок 10. Система BD MAX в Національному дослідницькому центрі. Борстель, Німеччина ... 77
Рисунок 11. FluoroCycler XT в Національній референс-лабораторії туберкульозу Ospedale San Raffaele, Мілан, Італія ... 78
Рисунок 12. Робочий процес Deeplex-MycTB ... 80
Рисунок 13. Схема мікротитрувального планшета для еталонного протоколу мікророзведення бульйону EUCAST AMST ... 93
Рисунок 14. Зразок форми звітності для тестування на основі СНП (профіль стійкості до ліків і кластерний аналіз) ... 118

Таблиці

Таблиця 1. Приклади засобів індивідуального захисту 17
Таблиця 2. Загальна сфера застосування стандартів ISO 17025 та ISO 15189....23
Таблиця 3. Основні терміни та скорочення у сфері забезпечення якості 23
Таблиця 4. Список національних настанов з діагностики туберкульозної інфекції....31
Таблиця 5. Інтерпретація результатів QuantiFERON-TB Gold....36
Таблиця 6. Інтерпретація результатів QuantiFERON-TB Gold PLUS....36
Таблиця 7. Матеріали надані виробником....38
Таблиця 8. Обладнання, необхідне для приготування та фарбування мазків 49
Таблиця 9. Підготовка звіту про мікроскопію мазків 51
Таблиця 10. Поширені причини помилок при мікроскопії мазка....53
Таблиця 11. Типи та характеристики LPA, що використовуються для виявлення та диференціації мікобактерій 69
Таблиця 12. Гени, кодовані області та нуклеотидні послідовності, на які спрямований тест Xpert MTB/XDR 74
Таблиця 13. Діагностична точність тестів Truenat MTB, MTB Plus та MTB-RIF Dx на відміну від культурального дослідження в умовах центру мікроскопії (за даними оціночного дослідження FIND)[18]....75
Таблиця 14. Критичні концентрації для ізоніазиду та рифампіцину [13] 86
Таблиця 15. Критичні концентрації та клінічні контрольні точки для лікарських засобів, рекомендованих для лікування Риф/МР-ТБ [24] 87
Таблиця 16. Розчинники та розріджувачі....89
Таблиця 17. Розчинники, розріджувачі та концентрації для препаратів другого ряду для проведення AST на MGIT....91
Таблиця 18. Відмінності між двома основним технологіями застосування газоподібного пероксиду водню, Steris та Bioquell 109
Таблиця 19. Ключові відмінності між стратегіями ПГС і цільовим СНП....117

Скорочення

КСБ	Кислотостійкі бактерії
AMP	антимікробна резистентність
AST	тестування на чутливість до антибіотиків
БЦЖ	Бацила Кальметта Герена
BD	Американська медична технологічна компанія "Бектон і Дікінсон" (Becton and Dickinson)
РББ (BSL)	рівень біобезпеки
КУО/CFU	Колонієутворюючі одиниці
CLSI	Інститут клініко-лабораторних стандартів
CMP	Спинномозкова рідина
CRI	Колориметричний окисно-відновний індикатор
РГК	Рентгенівський знімок грудної клітини
ДНК	Дезоксирибонуклеїнові кислоти
ТМЧ	тест на медикаментозну чутливість
ECOFF	Епідеміологічне значення порога відсікання
ЄЕЗ	Європейська Економічна Зона
EMA	Європейська агенція лікарських засобів
ЄПС (ENP)	Європейська політика сусідства
EPTB	позалегенева форма туберкульоз
ERLN-TB	Європейська мережа референс-лабораторій з туберкульозу (2010–2014 рр.) ERLTB-Net Європейська мережа референс-лабораторій з туберкульозу (з 2014 р.) ERLTB-Net2 Європейська мережа референс-лабораторій з туберкульозу (з 2018 р.)
ЗОЯ	Зовнішня оцінка якості
ЄС	Європейський Союз
EUCAST	Європейський комітет з визначення чутливості до антимікробних препаратів GC контроль росту мікробів
Фільтр HEPA	високоефективний повітряний фільтр твердих частинок
HPF	поле зору у великому збільшенні
IATA	Міжнародна асоціація повітряного транспорту
IFN-γ	гамма-інтерферон
INSTAND e.V.	Товариство сприяння забезпеченню якості в медичних лабораторіях
IGRA	аналіз на вивільнення гамма-інтерферону
ВОЯ	Внутрішня оцінка якості
ISO	Міжнародна організація зі стандартизації
LED	світлодіоди
LJ medium	живильне середовище Левенштейна-Йенсена
ЛТБІ	латентна туберкульозна інфекція
MGIT	пробірка з індикатором росту мікобактерій
МІК / MIC	мінімальна інгібуюча концентрація
MIRU	мікобактеріальні одиниці, що повторюються, з вкрапленням
MODS	метод мікроскопічного спостереження за лікарською чутливістю
MTBC	Комплекс мікобактерій туберкульозу
ТАНК (NAAT)	тест ампліфікації нуклеїнових кислот
СНП	секвенування нового покоління
NRA	аналіз нітратредуктази
НРЛ	Національна референс-лабораторія
НТБМ	нетуберкульозні мікобактерії
МКПК (PBMC)	мононуклеарні клітини периферичної крові
ПЛР	Полімеразна ланцюгова реакція
PPD	Очищене похідне білка
ЗІЗ	Засоби індивідуального захисту
PPV	Позитивне прогностичне значення
pWT	Фенотипічно дикий тип
КЯ	Контроль якості
ПДРФ (RFLP)	Поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів
RNI	Реакційні проміжні сполуки азоту

RRDR	область гена, що визначає резистентність до рифампіцину
SDS	додецилсульфат натрію
SNP	однонуклеотидний поліморфізм
СОП	Стандартні операційні процедури
SS+	позитивний мазок мокротиння
SS-	негативний мазок мокротиння
ТБ	туберкульоз
TLA	Тонкошаровий агар
ТШП	Туберкулінова шкірна проба
UKAS	Служба акредитації Сполученого Королівства
UK NEQAS	Акредитований UKAS провайдер кваліфікаційного тестування № 4715
VNTR	тандемний повтор зі змінним числом
ПГС	повногеномне секвенування
ВООЗ	Всесвітня організація охорони здоров'я
WRD	Рекомендована ВООЗ швидка діагностика
ZN	фарбування за методом Ціля-Нільсена

Історія питання та вступ

Туберкульоз (ТБ) є головною причиною захворюваності та смертності в Європі. Якісна лабораторна діагностика туберкульозу є основою як для індивідуального лікування пацієнтів, так і для здійснення епіднагляду за ними.

У 2007 році дослідження існуючих мікобактеріальних лабораторних служб і методів контролю якості в Європейському Союзі (ЄС) підтвердило ключову роль національних референс-лабораторій (НРЛ) з діагностики ТБ та їхніх послуг. Основний висновок дослідження полягав у тому, що мережа референс-лабораторій з туберкульозу може сприяти покращенню роботи мікобактеріальних лабораторій у Європі.

На основі цих результатів у січні 2010 року була створена Європейська мережа референс-лабораторій з туберкульозу (далі - мережа ERLN-TB), мета якої полягала в тому, щоби посилити діагностику туберкульозу в ЄС. ECDC здійснював фінансування та координацію мережі ERLN-TB. До мережі приєдналися одна або дві офіційно призначені референс-лабораторії з кожної країни-члена ЄС, а також лабораторії з країн Європейської економічної зони (ЄЕЗ) та країн-кандидатів на вступ до ЄС.

Після успіху мережі ERLN-TB у 2014, 2018 та 2022 роках ECDC прийняв рішення щодо оновлення мережі (під назвою Європейська мережа референс-лабораторій з туберкульозу, ERLTB-Net, ERLTB-Net-2 та ERLTB-Net-3 відповідно) із залученням тих самих центрів, але в довгостроковій перспективі очікуючи участь установ із країн, які є потенційними кандидатами-членами ЄС.

Нова мережа має три основні цілі: підтримка гармонізації лабораторних методів в межах ЄС/ЄЕЗ; розробка схем зовнішнього забезпечення якості (ЗЗЯ); проведення навчальних заходів в рамках мережі для забезпечення нарощування потенціалу з діагностики ТБ в масштабах ЄС. Одним з основних заходів, проведених мережею, була розробка посібника з ключових методів діагностики туберкульозу, який був вперше опублікований у 2011 році. У 2014 та 2018 роках посібник оновлювався у зв'язку з появою нових наукових даних, і цей документ є останньою версією, яка була оновлена в 2022 році.

Мета цього посібника полягає в тому, щоб надати членам мережі та іншим лабораторіям, залученим до діагностики ТБ, узгоджений список ключових методів діагностики, починаючи від мікробіологічної діагностики активної форми ТБ і закінчуючи діагностикою ТБ-інфекції. Цей посібник пропонує єдине джерело довідкової інформації, оскільки в ньому зібрані всі методи, причому основна увага приділяється стандартним (еталонним) методам і тим, що ґрунтуються на доказових даних.

Посібник також сприятиме покращенню даних нагляду за захворюваннями в Європі: дані, що надсилаються на портал EpiPulse (Європейський портал нагляду за інфекційними захворюваннями) ECDC та до інших систем епіднагляду, повинні бути надійними та підкріплюватися якісною лабораторною діагностикою.

У цьому виданні посібника розглядається мінливий технологічний ландшафт, що спостерігався протягом останнього десятиліття, зокрема, стосовно молекулярних аналізів та секвенування геному. Значна частина цих технологій призвела до істотних змін у діяльності з діагностики туберкульозу з розвитком численних, великих і добре оснащених діагностичних центрів, які за своїми можливостями та навичками не поступаються національним референс-лабораторіям (наприклад, швидкі молекулярні діагностичні тести, секвенування повного геному, секвенування нового покоління). І навпаки, інші розробки в галузі молекулярної діагностики віддалили нас від підходів «великої лабораторії» і наблизили до приладів, що використовуються в місцях надання медичної допомоги. Ці два підходи не виключають один одного, і обидва наближають сучасну діагностику до пацієнта. Посібник розроблений для задоволення потреб як централізованих, так і децентралізованих моделей надання послуг, і в ньому визнається, що роль національних референс-лабораторій суттєво зміниться протягом наступних кількох років.

Як цей посібник пов'язаний з іншими роботами в цій галузі

У цьому посібнику представлено збірку методів, які наразі застосовуються в країнах-членах ЄС/ЄЕЗ, а також описано спільну роботу, виконану і схвалену європейськими лабораторними експертами. Посібник також містить опис методів і процедур, розроблених або вдосконалених партнерами мережі ERLTB.

Яку інформацію містить/не містить цей документ

Цей документ є посібником щодо узгоджених методів у сфері діагностики туберкульозу для лабораторій, що виконують референтні функції в Європі. Він містить комплексну збірку ключових методів діагностики туберкульозу. Відповідним зацікавленим сторонам рекомендується використовувати цю збірку в якості основи для валідації, розвитку, оновлення та поширення інформації.

Цей документ не містить жодних офіційних рекомендацій щодо застосування конкретних методів у країнах-членах ЄС/ЄЕЗ. Рекомендації та протоколи, що містяться в посібнику, не є обов'язковими для лабораторій ЄС/ЄЕЗ.

Призначення документа та користувачі

Цей посібник, який містить базові, а також еталонні методи діагностики туберкульозу, призначений для використання спеціалістами лабораторій. Він також буде цікавим для фахівців системи громадського охорони, які працюють в області глобальної боротьби з туберкульозом, особливо для тих, хто бере участь у європейських ініціативах, спрямованих на сприяння прогресу в елімінації туберкульозу.

Історія створення посібника

Перша щорічна зустріч мережі ERLN-TB відбулася в Стокгольмі в 2010 році. Під час цієї зустрічі партнери мережі дійшли консенсусної згоди щодо актуальних тем, пов'язаних з (референтними) лабораторними методами діагностики ТБ, які мають бути включені до посібника. Підхід полягав у тому, щоб включити кілька стандартизованих і надійних методів, а не зосереджуватися на одному окремому методі. Для складання першого проєкту цих методів було сформовано спеціальний авторський комітет, який використовував формат посібника. Кожна глава містить опис стандартизованих методів діагностики та висвітлює ключові міркування щодо робочих характеристик, біобезпеки та забезпечення якості (ЗЯ).

Перше видання було опубліковано в 2011 році. У 2014-2015 роках після створення нової мережі ERLTB посібник було суттєво перероблено, і згодом, у 2016 р., було опубліковано нову версію під назвою «Посібник з методів лабораторної діагностики туберкульозу в Європейському Союзі». При цьому посібник було переглянуто у 2018 році із внесенням змін до розділів 6.7 та 10.4 у зв'язку з появою нових наукових даних. Нещодавно, на основі обговорення, проведеного під час Щорічної зустрічі Мережі в січні 2021 року, було прийнято рішення про необхідність оновлення посібника для того, щоб відобразити розширюваний ландшафт молекулярної діагностики, рекомендований Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ), а також нові розробки в цій галузі, які ґрунтуються на використанні технології секвенування нового покоління (СНП) в якості точного методу прогнозування лікарської стійкості мікобактерій туберкульозу (ЛС-ТБ) (Глава 6), а також використання методів СНП для типування ЛС-ТБ і аналізу спорідненості (Глава 8). Крім того, після перегляду критичних концентрацій деяких протитуберкульозних препаратів та публікації EUCAST стосовно еталонного методу тестування мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК) EUCAST, було визнано за необхідне оновити Главу 7, присвячену тестуванню фенотипічної чутливості до лікарських препаратів. Нарешті, у світлі цього динамічного сценарію, Главу 10 було оновлено з метою надати приклади найкращих практик щодо того, як максимально збільшити внесок лабораторії в процес діагностики.

Інформація, представлена в цьому виданні

Цей посібник є четвертим виданням публікації про найнадійніші методи діагностики туберкульозу, схвалені членами мережі ERLTB. Ця публікація є збіркою методів лабораторної діагностики туберкульозу та призначена для працівників лабораторії та спеціалістів системи громадського здоров'я. Посібник було складено для сприяння гармонізації методів діагностики туберкульозу в ЄС/ЄЕЗ, країнах-кандидатах на вступ до ЄС та країнах-партнерах Європейської політики сусідства (ЄПС) з метою забезпечити зіставність діагнозів туберкульозу в Європі та надання найкращої медичної допомоги пацієнтам з ТБ на основі діагностики гарантованої якості. Ця публікація також може допомогти лабораторіям у створенні безпечного робочого середовища для персоналу шляхом мінімізації ризиків контакту з мікобактеріями туберкульозу. Третє видання посібника мережі ERLTB складається з 10 глав, кожна з яких містить список відповідних інформаційних джерел. Нижче наведено короткий зміст кожної глави.

1 Біобезпека в клінічній лабораторії з діагностики ТБ

Мікобактерії туберкульозу (*M. Tuberculosis*) можуть викликати внутрішньолікарняні інфекції. Для забезпечення ефективного інфекційного контролю вкрай важливо розробити та дотримуватися комплексної та суворої політики біобезпеки. Така політика включає стандартизовані правила і норми щодо безпечної ізоляції та зберігання інфекційних матеріалів, засобів індивідуального захисту (ЗІЗ), стандартних операційних процедур (СОП) для різних лабораторних завдань, а також прозору структуру регулювання безпечних умов праці в лабораторіях із діагностики ТБ.

2 Забезпечення якості

Лабораторії, які надають надійні та якісні результати, підтримують національні програми боротьби з туберкульозом. У цьому розділі надано вичерпний огляд існуючих стандартів Міжнародної організації зі стандартизації (ISO), що стосуються лабораторної діагностики ТБ, а також описано внутрішні та зовнішні процедури забезпечення якості (ЗЯ).

3 ТБ-інфекція

Наразі для діагностики ТБ-інфекції використовують два типи тестів: туберкулінові шкірні проби (ТШТ) та аналіз вивільнення гамма-інтерферону (IGRA). У цьому розділі детально описано два найпоширеніші аналізи вивільнення гамма-інтерферону для виявлення ТБ-інфекції, а також надано рекомендації щодо інтерпретації та підготовки звіту про результати тестів.

4 Мікроскопія мазків

Для виявлення мікобактерій найчастіше використовують два типи фарбування: фарбування карбол-фуксином (фарбування за Цілем-Нільсеном, Кінюном) та фарбування флуорохромом (аурамін, аурамін-родамін). У розділі описано підготовку необхідних реагентів і зразків мазка мокротиння, а також процедури фарбування та систему представлення результатів.

5 Посів культур на виявлення комплексу мікобактерій туберкульозу (комплекс *Mycobacterium tuberculosis*)

Застосування методу посіву культур підвищує чутливість і специфічність тестів на туберкульоз, особливо на ранніх стадіях захворювання, у випадках позалегеневого ТБ (ЕРТВ) та у разі невдалого лікування. У главі представлено огляд ключових принципів відбору і транспортування клінічних зразків, а також обробки мокротиння та інших зразків перед посівом на твердих та в рідких живильних середовищах, інкубацією та дослідженням культур. У главі розглядають питання зараження, а також заходи, необхідні для запобігання внутрішньолікарняним інфекціям ТБ.

6 Молекулярні аналізи для швидкого виявлення ТБ та лікарсько-стійкого ТБ

Молекулярні аналізи можуть прискорити процес ідентифікації мікобактерій і тестування на чутливість до лікарських препаратів, а отже, призвести до більш швидкого і конкретного лікування. У цій главі представлено огляд найпоширеніших методів молекулярної діагностики для швидкого виявлення ТБ та лікарсько-стійкого ТБ в культуральних і клінічних зразках. Крім того, глава включає опис сучасного застосування секвенування нового покоління для прогнозування медикаментозної чутливості та резистентності, починаючи з клінічних зразків (тобто цільового секвенування нового покоління) і культуральних ізолятів (тобто повногеномного секвенування).

7 Фенотипічне тестування чутливості до протимікробних препаратів для комплексу мікобактерій туберкульозу

Основні цілі фенотипічного тестування чутливості до протимікробних препаратів полягають у тому, щоби покращити індивідуальний підхід до лікування випадків ТБ та нагляд за медикаментозною стійкістю на рівні лікарні, міста, регіону чи країни. У главі описано методи визначення чутливості фенотипу до протимікробних препаратів (ПТП) мікобактерій туберкульозу та інших представників комплексу *M. tuberculosis* (КМТБ), а також еталонний метод EUCAST для визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК).

8 Молекулярне типування ізолятів комплексу мікобактерій туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis*)

Наразі доступні різні методи профілювання ДНК (ДНК-генотипоскопії), які служать різним цілям і мають різні характеристики для конкретних застосувань. У цій главі коротко описано три традиційні методи профілювання ДНК (ДНК-генотипоскопії): споліготипування, типування з допомогою тандемних повторів зі змінною кількістю (VNTR), типування за поліморфізмом довжини рестрикційних фрагментів IS6110 (RFLP), а також надано більш детальний опис новітніх методик типування, що ґрунтуються на технології секвенування нового покоління (СНП).

9 Використання та валідація дезінфікуючих засобів для мікобактерій туберкульозу

У лабораторіях 3-го рівня безпечної ізоляції та зберігання інфекційних матеріалів, де працюють з мікобактеріями туберкульозу, для дезінфекції та знезараження наразі використовують методи обробки рідкими та газоподібними речовинами. Ефективність будь-яких нових дезінфікуючих засобів аналізується за допомогою набору стандартних методів валідації.

10 Інформація для лікарів: лабораторна діагностика ТБ

Процес забору матеріалу для діагностики мікобактерій вимагає великої обережності, оскільки кожен крок може вплинути на діагноз. Ця глава має на меті розглянути, яким чином отриману в лабораторії інформацію необхідно подавати клініцистам, та яким чином максимально збільшити внесок лабораторії в процес діагностики.

Відмова від відповідальності

У деяких протоколах, включених до посібника, перераховано конкретні комерційні продукти та аналізи. Такі випадки не означають схвалення відповідних продуктів Європейським центром контролю та профілактики захворювань (ECDC).

1 Біобезпека в лабораторії з діагностики ТБ

Автори: Maryse Fauville-Dufaux, Vincent Jarlier, Dick van Soolingen, Sven Hoffner

Рецензенти: Dick van Soolingen, Dimitrios Papaventsis, Melles Haile, and Sven Hoffner (2014)

Примітка: Ця глава значною мірою складається з короткого викладу принципів і процедур, раніше опублікованих Всесвітньою організацією охорони здоров'я [1] та зосереджена на аспектах, що мають відношення до інфраструктури європейських лабораторій з діагностики ТБ. Ви можете переглянути публікації, перелічені в кінці цієї глави, для отримання більш повного уявлення.

1.1 Передумови та принципи

Мікобактерія туберкульозу, збудник ТБ, класифікується як агент 3-ї групи ризиків, що вимагає наявності лабораторії 3-го рівня біобезпеки (РББ-3) для культивування, тестування на медикаментозну чутливість та здійснення інших лабораторних досліджень. Доступ до лабораторії відповідного рівня біобезпеки повинен бути обмежений співробітниками та акредитованими відвідувачами [1]. У цій главі описано найважливіші характеристики закладу, процедури та засоби індивідуального захисту, необхідні для гарантування біобезпеки.

Достовірно задокументовано, що *M. tuberculosis* можуть викликати внутрішньолікарняні інфекції, а ризики захворювання на туберкульоз серед медичних працівників є стабільно вищим, ніж у загальній популяції [2]. *M. tuberculosis* навіть входять до десятки найбільш небезпечних агентів для працівників лабораторій, проте джерело ТБ-інфекції вдається простежити лише в незначній кількості випадків під час конкретної непередбачуваної ситуації в лабораторії [3-5]. Аерозольний шлях передачі інфекції в лабораторії є найбільш значущим. Таким чином, зусилля щодо інфекційного контролю повинні бути спрямовані на обмеження утворення аерозолів під час лабораторних робіт, наприклад, шляхом безпечного центрифугування та піпетування. Потенційні ризики інфікування залежать від типу використовуваних методів і способу їх виконання. Наприклад, травмування голками трапляються рідко, оскільки в більшості лабораторій система BD Bactec 460 була замінена на систему µGIT 960, яка не використовує голки для інокуляції тестових флаконів. Крім того, покращення якості в результаті регулярної валідації та належного використання шаф біобезпеки (ШББ) значно підвищило рівень інфекційного контролю.

Для ефективного інфекційного контролю вкрай важливо, щоби персонал лабораторії розробив, прийняв і дотримувався комплексної та суворої політики біобезпеки. Політика повинна включати стандартизовані правила і норми щодо безпечної ізоляції та зберігання; засоби індивідуального захисту (ЗІЗ); набір стандартних операційних процедур (СОП) для виконання всіх різних лабораторних завдань, а також прозорі і чітко визначені рівні відповідальності за організацію та підтримання безпечних умов праці в лабораторії з діагностики ТБ [1,3,6,7]. Крім необхідного навчання, слід забезпечити регулярну взаємодію між відповідальним керівником і персоналом лабораторії щодо інтерпретації правил і потенційних загроз біобезпеки для верифікації цілеспрямованої політики та оптимізації контролю за дотриманням впроваджених процедур.

У редакції посібника ВООЗ з біобезпеки в туберкульозних лабораторіях [8] від 2012 року більше уваги приділено оцінці ризиків. Ризики лабораторних інфекцій, спричинених *M. tuberculosis*, пов'язані з концентрацією бактерій і можливим формуванням аерозолів. Робота з клінічними зразками, такими як мокротиння (наприклад, для дослідження мазка та посів культури), становить меншу біологічну небезпеку, ніж робота з позитивними культурами бактерій (наприклад, для тестування чутливості до лікарських препаратів). Тому в лабораторних приміщеннях 2 рівня біобезпеки можна проводити мікроскопію мазка мокротиння, обробку зразків перед культивуванням і виділення ДНК з клінічних зразків для молекулярних методів (ідентифікація ДНК, виявлення генних мутацій, пов'язаних з лікарською стійкістю, або можливе генотипування). Тим не менш, використання шафи біобезпеки, що належним чином функціонує та регулярно обслуговується, залишається важливим аспектом під час роботи з матеріалом, щодо якого є підозра на наявність *M. tuberculosis*. Методи, що виконуються на культурах мікобактерій, такі як виділення ДНК з позитивних культур і фенотипічне тестування чутливості до лікарських препаратів, вимагають вищого рівня біобезпеки і використання лабораторії з ізоляцією, що відповідає РББ-3. Молекулярні методи, що передбачають використання раніше виділеної ДНК, не вимагають дотримання стандартів рівня біобезпеки [1,3,6].

Перед початком нового тесту, виконанням завдання або методу в лабораторії обов'язково проводять оцінку ризиків. Це дозволить виявити можливі ризики та забезпечити належний інфекційний контроль. У 2008 році Європейський комітет стандартизації (CEN) опублікував стандарт CWA 15793 «Управління біоризиками в лабораторіях», який ґрунтується на системному підході до управління [9]. Як CWA 15793:2008, так і його остання версія CWA 15793:2011 є домовленостями стосовно системи управління біоризиками в лабораторії, що встановлюють вимоги, необхідні для контролю ризиків, пов'язаних з поводженням або зберіганням та утилізацією біологічних агентів і токсинів у лабораторіях та установах [10,11]. Ці стандарти використовують класифікації ризиків, описані в керівництві ВООЗ щодо лабораторної біобезпеки, і лягли в основу розробки мінімальних вимог до лабораторій з діагностики туберкульозу, описаних в керівництві ВООЗ щодо біобезпеки ТБ-лабораторії, опублікованого в 2012 році [8].

Відповідні заходи інфекційного контролю необхідні для того, щоб співробітники лабораторії могли безпечно працювати з потенційно інфекційними мікроорганізмами. Ці заходи базуються на наступних чотирьох основних компонентах:

- адміністрування (управління);
- середовище (інженерія)
- засоби індивідуального захисту (ЗІЗ);
- технічна експертиза та навчання (належна мікробіологічна практика).

При правильному впровадженні кожен з цих компонентів допоможе знизити ризики контакту персоналу лабораторії з патогеном.

Схема навчання з біобезпеки та фіксація рівнів досвіду лабораторного персоналу є корисним інструментом для зниження ризиків лабораторних інфекцій. Нові співробітники та постійні працівники лабораторії повинні періодично проходити медичне обстеження, щоб задокументувати будь-які випадки внутрішньолабораторних інфекцій та запропонувати профілактичну терапію чи лікування в повному обсязі відповідно до національних рекомендацій. Це також дасть змогу вдосконалити процедури, що можуть сприяти виникненню ЛАІ, і гарантуватиме, що керівництво та персонал продовжуватимуть приділяти увагу питанням біобезпеки.

Політика та настанови з біобезпеки повинні ґрунтуватися на національних та міжнародних нормативно-правових актах, а також на конкретній місцевій оцінці ризиків для кожного етапу клініко-діагностичної роботи. Оскільки міжнародні рекомендації можуть змінюватися з часом і часто не є дуже детальними, дуже важливо, щоб нові інструкції з біобезпеки базувалися на найактуальніших джерелах, а також здійснювати регулярне оновлення політики біобезпеки [1,6].

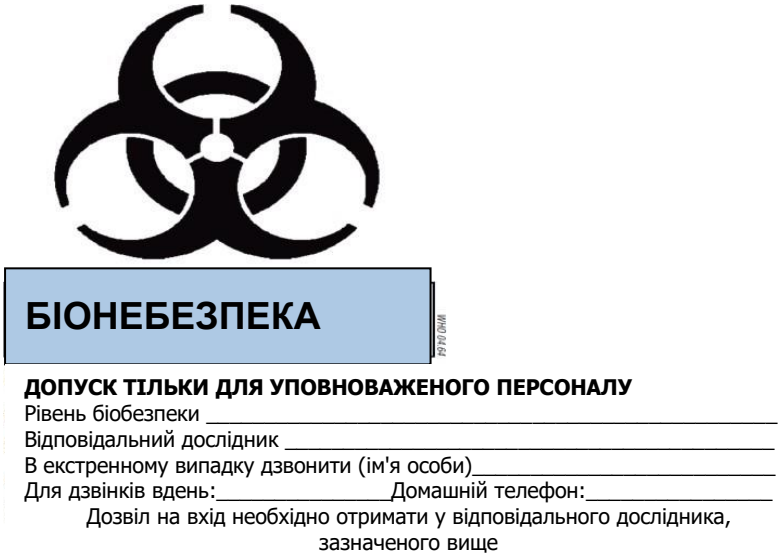
Ця глава ґрунтується на рекомендаціях з біобезпеки, доступних на момент написання цього посібника (вересень 2013 р.), і не слід її розглядати як заміну інших міжнародних рекомендацій. Нещодавно опублікований посібник ВООЗ з біобезпеки ТБ-лабораторій [8] відрізняється за своїм підходом, оскільки в ньому менше уваги приділяється кожній деталі роботи повноцінної лабораторії РББ-3, а також підкреслюється важливість оцінки ризиків стосовно роботи, яку проводять ТБ-лабораторії на різних рівнях. ECDC також працював з експертною групою фахівців з біобезпеки [12] над ризик-орієнтованим підходом до аналізу методів роботи в європейських лабораторіях з діагностики ТБ, і в 2013 році розробив важливі рекомендації для мережі ERLN-TB [12,13]. Ця глава відображає погляди авторів і не означає їхнього схвалення ECDC.

1.2 Система безпечної ізоляції в лабораторії (3-й рівень біобезпеки)

1.2.1 Загальні положення

Міжнародний символ попередження про біологічну небезпеку та інші відповідні знаки, розміщені на дверях лабораторії, повинні ідентифікувати рівень біобезпеки та ім'я керівника лабораторії, який контролює доступ до приміщення (Рис. 1). Знаки також повинні вказувати на умови доступу, наприклад, використання респіраторів та вимоги щодо імунізації. Найкращий спосіб контролювати доступ, а також забезпечити ретроспективну перевірку всіх співробітників, які входили до лабораторії РББ-3 в певний момент часу, - це використання електронної системи перепусток. Будь-який обслуговуючий чи технічний персонал повинен завжди супроводжуватися уповноваженим співробітником і мати доступ лише тоді, коли лабораторія вважається відносно безпечною, та якщо особа використовує засоби індивідуального захисту, відповідний халат і взуття [1].

Рисунок 1. Попереджувальний знак про біологічну небезпеку, який розміщують на дверях лабораторії



Джерело: Всесвітня організація охорони здоров'я. Посібник з лабораторної біобезпеки, 3-е видання. Женева; 2004 р. [1].

У приміщенні лабораторії використовують захисний одяг і взуття відповідно до місцевих правил. Рекомендується використовувати непроникні/водостійкі суцільні спереду медичні халати або із запахом на спині. Там, де це доцільно, слід носити бахіли (ботики) або спеціальне взуття. Стандартні лабораторні халати із ґудзиками спереду не підходять, так само як і халати з рукавами, що не повністю закривають передпліччя. При роботі в шафі біобезпеки манжети халата повинні бути закриті одноразовими рукавичками, щоб уникнути забруднення рукавів.

Лабораторний захисний одяг ніколи не слід носити поза межами лабораторії, а перед пранням його слід знезаразити. Потенційно інфекційний матеріал завжди слід обробляти в шафі біологічної безпеки (відповідно до спеціальних стандартів - наприклад, BS EN 12469:2000 або NSF/ANSI 49-2008). Для деяких лабораторних процедур необхідне використання засобів захисту органів дихання [1].

1.3 Приміщення лабораторії

Існує багато технічних аспектів, які необхідно враховувати перед будівництвом закладу, що відповідає РББ-2 або РББ-3. Планування включає вибір обладнання, системи вентиляції, технічне обслуговування та поводження з відходами, включаючи розміщення автоклава. Усі деталі будівництва необхідно задокументувати і вони мають суворо відповідати актуальним правилам і нормам на національному рівні. Якщо національні правила не встановлені, рекомендується застосовувати міжнародні правила. Вибір між зонами РББ-2 і РББ-3 або комбінацією зон РББ-2 і РББ-3 на одному об'єкті ґрунтується на європейських і національних нормах і залежить від оцінки ризиків, пов'язаних з типом робіт, які будуть виконуватися на об'єкті.

Лабораторію необхідно відокремити від зон з необмеженим доступом до будівлі. Якщо лабораторія не може бути розміщена в окремій будівлі, її можна відокремити, розмістивши в глухому кінці коридору, спорудивши перегородку та встановивши двері, чи дозволити доступ до неї лише через передпокій. Передпокій повинен мати чітко розмежовані зони, приміщення для окремого зберігання чистого та брудного одягу, а також душову кімнату. Двері передпокою повинні автоматично зачинятися та відкриватися/закриватися в правильному напрямку, щоб забезпечити різницю в тиску. Двері також мають бути обладнані системою блокування, щоб одночасно можна було відкрити лише одні двері. В ідеалі, слід передбачити електронну систему затримки, яка дозволить відкрити одні з дверей лише тоді, коли тиск у передпокої відновиться. Залежно від розміру та форми лабораторії, вона повинна мати аварійний або запасний вихід для використання у разі надзвичайних ситуацій [1,3].

Як правило, слід враховувати наступні аспекти [1,3]:

- Навколо обладнання має бути достатньо місця для очищення та обслуговування.
- Стіни, стеля та підлога повинні бути неабсорбуючими, такими, що можна легко мити, непроникними для рідин і стійкими до хімічних речовин і дезінфікуючих засобів, які зазвичай використовуються в лабораторії. Підлога повинна бути неслизькою.
- Отвори в цих поверхнях (наприклад, для комунікаційних труб) повинні бути герметичними, щоб запобігти витоку і полегшити дезінфекцію кімнати/кімнат за допомогою газу.
- Стільниці повинні бути водонепроникними та стійкими до дезінфікуючих засобів, кислот, лугів, органічних розчинників і помірного нагрівання.
- Освітлення має бути достатнім для здійснення всіх активностей. Слід уникати небажаних віддзеркалень і відблисків.
- Лабораторні меблі повинні бути міцними.
- Відкриті простори між і під столами, шафами та обладнанням повинні бути доступними для прибирання.
- Вікна повинні бути герметичними і протиударними.
- Необхідно забезпечити достатній простір для розміщення витратних матеріалів, необхідних для негайного використання і, таким чином, запобігти захаращенню робочих столів і проходів. Слід також передбачити додатковий простір для довгострокового зберігання, який зручно розташований поза межами робочих зон лабораторії, для зберігання зразків, культур, документації та спеціальних лабораторних відходів перед автоклавуванням.
- Біля вихідних дверей повинна бути передбачена станція для миття рук із системою, що не вимагає застосування рук.
- Для запобігання ненавмисному вивільненню аерозолів, система контрольованої вентиляції повинна постійно підтримувати негативний тиск. Пристрій візуального контролю повинен бути розміщений на вході та всередині лабораторії, щоб мати можливість перевіряти тиск.
- Необхідно встановити систему сигналізації, яка попереджає персонал, коли тиск виходить за межі діапазону, не викликаючи паніки або небажаних реакцій.
- Система вентиляції будівлі повинна бути встановлена таким чином, щоби повітря з лабораторії з системою безпечної ізоляції ніколи не могло рециркулювати в інші частини будівлі.
- Повітря з лабораторії, що відповідає РББ-3, слід фільтрувати за допомогою HEPA-фільтрів. Коли витяжне повітря з лабораторії виводиться назовні будівлі, воно повинно розсіюватися подалі від інших будівель і повітрозабірників. Для запобігання надлишкового тиску в лабораторії може бути встановлена система контролю опалення, вентиляції та кондиціонування повітря.
- HEPA-фільтри необхідно встановити таким чином, щоб забезпечити можливість знезараження шляхом обробки газовими речовинами та тестування. Відпрацьоване повітря із ШББ, яке пройшло через HEPA-фільтри, повинно відводитися таким чином, щоб не порушувати повітряний баланс в лабораторії.
- Шафи біологічної безпеки слід розташовувати подалі від зон проходу і перехресних потоків повітря, від дверей і вентиляційних систем.

- Повинна існувати програма для регулярного тестування та валідації шаф біологічної безпеки.
- Лабораторію з системою безпечної ізоляції слід забезпечити автоклавом для знезараження забруднених відходів, в ідеалі - вмонтованим у стіну. Таким чином, контейнери із забрудненими відходами можна завантажувати в лабораторії, що відповідає РББ-3, а після процедури автоклавування безпечно вивозити їх в чисту зону за межами лабораторії. Відповідно до місцевих правил і норм у деяких країнах автоклав може бути під'єднаний до лабораторії, яка розташована в тій самій будівлі. У цьому випадку інфекційні відходи необхідно транспортуватися в опломбованих, стійких до ушкоджень і герметичних контейнерах відповідно до національних або міжнародних норм, залежно від обставин. Бажано, щоб ці контейнери мали вентиляційні отвори, які відкриваються при нагріванні, щоб пара могла виходити з контейнерів.
- Стічні води з умивальників, встановлених у лабораторії РББ-3, необхідно знезаражувати у резервуарах для очищення. В іншому випадку, за відсутності не слід встановлювати раковини.
- Необхідно впровадити системи безпеки для управління ризиками виникнення пожежі та аварійних ситуацій з електрикою. Також слід встановити аварійний душ і систему для промивання очей.
- Поруч з лабораторією РББ-3 повинні бути належним чином обладнані та легкодоступні зони чи кімнати для надання першої медичної допомоги. Персонал лабораторії РББ-3 в ідеалі повинен пройти навчання з надання першої медичної допомоги.
- Система механічної вентиляції повинна забезпечувати приплив повітря без рециркуляції.
- Необхідно забезпечити надійне і адекватне електропостачання та аварійне освітлення для безпечної евакуації. Дуже важливо мати резервну систему (наприклад, резервний генератор і пристрій безперебійного живлення для підтримки систем сигналізації та іншого важливого обладнання, такого як шафи біологічної безпеки, морозильні камери тощо).
- Загальні вимоги до закладу РББ-3 підсумовано в додатку до Глави 1.

1.4 Процедури

На основі місцевих оцінок ризиків слід розробити та впровадити набір детальних стандартних операційних процедур для безпечного виконання всіх завдань, що проводяться в лабораторії. Як правило, слід дотримуватися наступних процедур [1,6,8]:

- Категорично забороняється контакт ротової порожнини під час процедури піпетування.
- Усі технічні процедури слід виконувати таким чином, щоб мінімізувати утворення аерозолів і крапель. Слід уникати використання будь-яких гострих предметів, таких як голки та шприци для підшкірних ін'єкцій.
- Необхідно повідомляти керівника лабораторії про всі випадки розливу, нещасні випадки та явні чи потенційні експозиції до інфекційних матеріалів. Необхідно вести облік таких аварій та інцидентів у письмовій формі (включаючи запобіжні заходи, які будуть вжиті для уникнення подібних випадків у майбутньому).
- Повинна бути розроблена процедура дій у надзвичайних ситуаціях після будь-якого ненавмисного вивільнення бактерій і можливого їхнього впливу на персонал, включаючи програму медичного нагляду.
- Необхідно розробити в письмовій формі процедуру очищення всіх розливів. Усі співробітники повинні регулярно проходити навчання, добре знати всі інструкції з біобезпеки та виконувати їх вимоги на високому рівні.
- Необхідно забезпечити наявність набору для ліквідації розливів з усіма необхідними матеріалами для вжиття негайних заходів у разі розливу.
- Весь персонал завжди повинен мати в халаті відповідну маску, щоб надіти її в разі ненавмисного вивільнення бактерій.
- Потенційно забруднені рідини необхідно знезаразити (обробка в автоклаві) перед тим, як зливати їх до колектору міської каналізаційної системи.

1.5 Засоби індивідуального захисту (ЗІЗ)

Використання ЗІЗ має бути регламентовано місцевими стандартними операційними процедурами та ґрунтуватися на місцевій оцінці ризиків, а також національних і міжнародних нормах. Дуже важливо прийняття узгодженої процедури вибору ЗІЗ, а всі співробітники та відвідувачі дотримувалися та виконували її положення [1,6,8].

У таблиці 1, адаптованій з Посібника ВООЗ щодо лабораторної біобезпеки [1], наведено приклади засобів індивідуального захисту для працівників лабораторій [1,8].

Таблиця 1. Приклади засобів індивідуального захисту

Засіб	Усунення небезпеки	Характеристика засобів захисту
Лабораторні куртки, халати, комбінезони	Захищає одяг від забруднення	Застібка чи зав'язки розташовані на спині. Покриває звичайний одяг
Поліетиленові фартухи	Захищає одяг від забруднення	Водонепроникні
Взуття	Захищає від впливу та розбризкування інфекційних агентів	Закривають носок звичайного взуття
Окуляри закритого типу	Захищає від впливу та розбризкування інфекційних агентів	Ударостійкі лінзи (повинні бути оптично правильними або надягатися поверх коригувальних окулярів). Обладнані бічними щитками
Захисні окуляри	Убезпечує від впливу	Ударостійкі лінзи (повинні бути оптично правильними). Обладнані бічними щитками
Щиток для обличчя	Убезпечує від впливу та розбризкування інфекційних агентів	Захищає все обличчя. Легко знімається в разі нещасного випадку
Респіратори	Захищає від вдихання аерозолів	Пропонується різний дизайн: одноразові, повнолицьові або напівлицьові респіратори для очищення повітря, повнолицьові або респіратори з капюшоном, оснащені електроприводом для очищення повітря (PAPR) та респіратори з подачею повітря.
Рукавички	Для уникнення прямого контакту з мікроорганізмами, порізів	Одноразові, мікробіологічно схвалені латексні, вінілові або нітрилові рукавички; для захисту рук; рукавички із металевої сітки

Дивись Главу 5, щоб дізнатися детальніше про рівні лабораторної безпеки та умови під час роботи з культурами мікобактерій.

1.6 Кадровий компонент

Навіть найсучасніша з технічної точки зору система біобезпеки закладу буде неефективною, якщо персонал лабораторії нехтуватиме правилами біобезпеки. Рекомендується, щоб досвідчений технічний персонал залишався залученим протягом усього процесу планування та реалізації програми біобезпеки та організації лабораторії [1,6].

Належним чином розроблена навчальна програма з біобезпеки, яку щорічно пропонують усім співробітникам, підвищить рівень знань про план лабораторного інфекційного контролю. Нові співробітники, а також студенти та/або запрошені дослідники повинні бути проінформовані про всі відповідні правила і рекомендації до того, як їм буде дозволено працювати в лабораторії. Приступаючи до роботи в лабораторії, вони ніколи не повинні працювати самостійно, а мають перебувати під наглядом досвідчених співробітників. Рекомендується, щоб відповідальна особа (часто це керівник лабораторії) ознайомила їх з усіма правилами і положеннями, що регулюють діяльність лабораторії, і перевірила їхні знання перед початком фактичної роботи з патогеном у лабораторії. Необхідно розробити процедури, що регламентують поводження під час надзвичайних медичних ситуацій та випадкового контакту з інфекційним матеріалом. Необхідно розслідувати і детально обговорювати всі події, про які повідомляють. Це має відбуватися в атмосфері співпраці, щоб уникнути приховування співробітниками деталей або зменшення їхньої схильності повідомляти про інциденти/нещасні випадки в майбутньому. Слід підготувати в письмовій формі пропозицію щодо вдосконалення системи біозахисту, детально описавши превентивні заходи, яких необхідно вжити.

Відповідальність щодо забезпечення та підтримки безпечного робочого середовища є обов'язком усіх співробітників. Усі співробітники повинні знати та дотримуватися належних лабораторних практик з біобезпеки, щоб запобігти нещасним випадкам, а також уникнути заяв співробітників про незнання правил біобезпеки після нещасного випадку. Повинен існувати чіткий консенсус щодо інтерпретації та застосування правил; в іншому випадку їх слід адаптувати таким чином, щоб весь персонал дотримувався місцевих і міжнародних правил і норм.

1.7 Конкретні лабораторні завдання, пов'язані з небезпекою

Як зазначалося вище, ризики виникнення лабораторних інфекцій, спричинених мікобактеріями туберкульозу, пов'язані з концентрацією бактерій і можливим утворенням інфекційних аерозолів.

Заходи біобезпеки завжди повинні ґрунтуватися на оцінюванні ризиків [1,6,8]. Нижче наведено кілька прикладів таких заходів:

- Поводження з контейнерами з клінічними зразками. Навіть якщо утворення аерозолів є малоймовірним, існує можливість впливу туберкульозних бактерій. Зовнішні поверхні контейнерів, які використовуються для збору клінічних зразків, часто забруднені мікобактеріями туберкульозу або іншими патогенами, що передаються повітряно-крапельним шляхом. Тому з контейнерами для зразків слід поводитися обережно і відкривати їх тільки у шафі біологічної безпеки.
- Центрифугування. Рідина може вилитися з пробірок центрифужних, або пробірки можуть тріснути, вивільняючи аерозолі. Слід використовувати тільки закриті біологічно безпечні стакани з відповідними і безпечними пробірками для центрифуги. Тому завантаження/вивантаження стаканів центрифуги слід проводити тільки у шафі біобезпеки

- Піпетування. Піпетки, зокрема піпетки Пастера, можуть утворювати бульбашки, які лопаються і утворюють аерозолі. Тому піпетування завжди слід проводити у шафах біобезпеки та з використанням одноразових піпеток. Категорично забороняється контакт з ротовою порожниною під здійснення процедури піпетування.
- Механічна гомогенізація (перемішування вихровим способом, подрібнення, змішування). Необхідно застосовувати відповідні процедури, щоб уникнути утворення аерозолів. Механічну гомогенізацію слід завжди здійснювати в ШББ, проте, навіть у цьому випадку ця процедура все одно становить ризики для співробітників.
- Ультразвукова обробка, нагрівання або кип'ятіння зразків (наприклад, для екстракції нуклеїнових кислот). Слід застосовувати відповідні процедури, щоб уникнути розбризкування та утворення аерозолів.
- Використання бактеріологічних петель. Петлі, заряджені інфекційним матеріалом, не слід безпосередньо нагрівати над полум'ям пальника Бунзена через ризики розбризкування і утворення аерозолів. Бунзенівські пальники не можна використовувати в ШББ, оскільки це порушує потік повітря. Настійно рекомендується використовувати одноразові пластикові петлі.
- Дослідження на тваринах. Основними ризиками для персоналу є випадкове самозараження матеріалом, призначеним для інфікування тварин, і вплив аерозолів від хворих тварин. Підстилка інфікованих тварин також може бути заражена і, таким чином, стати потенційним джерелом інфекції.
- Транспортування та перевезення штамів *M. tuberculosis*. Існують суворі правила, яких необхідно дотримуватися під час транспортування клінічних зразків, що викликають підозру, зокрема культивованих мікобактерій туберкульозу. Ці правила транспортування залежать від домовленостей в межах країни, між країнами або правил авіаперевезень. Лабораторія, що здійснює перевезення, несе відповідальність за визначення відповідних правил та їх суворе дотримання. Настійно рекомендується користуватися послугами спеціальних кур'єрських служб, які спеціалізуються на перевезенні матеріалу, що відповідають РББ-3, та ознайомлені з усіма правилами. Лабораторія-відправник повинна виконати всі необхідні процедури для забезпечення правильного пакування інфекційного матеріалу.
- Зберігання колекцій ізолятів та еталонних штамів *M. tuberculosis*. Мають існувати місцеві процедури з біобезпеки стосовно зберігання бактерій та клінічних зразків, що містять бактерії. Усі морозильні камери, холодильники та інші шафи для зберігання повинні бути належним чином промарковані, із чітким зазначенням відповідальної особи. Доступ до морозильних камер повинен бути обмежений лише певним персоналом лабораторії. Запаси культур, безпечне зберігання яких здійснюється відповідно до вимог РББ-3, необхідно зареєструвати з метою виявлення будь-якого незаконного вилучення або незрозумілого зникнення.

Список літератури

1. World Health Organization (WHO). Laboratory biosafety manual. 3rd edition. Geneva: WHO; 2004. Available at: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf
2. Baussano I, Williams B, Pivetta E, Bugiani M, Scano F. Tuberculosis among healthcare workers. Emerg Infect Dis 2011, 17:488–494.
3. Fleming DO, Hunt DL. Biological Safety: Principles and Practices, 4th Edition. Washington: ASM Press; 2006.
4. Collins CH, Kennedy DA. Laboratory-acquired Infections: History, Incidence, Causes and Preventions, 4th edition. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1999.
5. Sewell DL. Laboratory-acquired infections: Are microbiologists at risk? Clin Microbiol Newsl. 2006;1:1-6.
6. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 5th ed. Washington: CDC/NIH; 2009. Available at: http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL.pdf
7. Miller JM, Astles R, Baszler T, Chapin K, Carey R, Garcia L, et. al. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories.Recommendations of a CDC-convened, Biosafety Blue Ribbon Panel.MMWR Surveill Summ.2012 Jan 6;61 Suppl:1-102.
8. World Health Organization (WHO). Tuberculosis laboratory biosafety manual. Geneva: WHO; 2012. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77949/1/9789241504638_eng.pdf
9. European Committee for Standardization (CEN). Laboratory Biorisk Management Standard CWA 15793:2008. Brussels; 2011. Available at: ftp://ftp.cenorm.be/PUBLIC/CWAs/wokrshop31/CWA15793.pdf
10. CEN. Laboratory Biorisk Management Standard CWA 15793: 2011.Brussels; 2011. Available at: ftp://ftp.cenorm.be/CEN/Sectors/TCandWorkshops/Workshops/CWA15793_September2011.pdf
11. CEN. Laboratory biorisk management Standard CWA 16393- Guidelines for the implementation of CWA 15793:2008. Brussels; 2012. Available at: ftp://ftp.cen.eu/CEN/Sectors/list/ICT/Workshops/CWA%2016393.pdf
12. ECDC: Biorisk Initiative for Capacity Building and Knowledge Base Development (BRICK): Available at: http://ecdc.europa.eu/en/activities/microbiology/biosafety/Documents/101117_Bioriskproject_Description.p df
13. ECDC. Laboratory networks and biosafety communities. How to make biosafety pan-European? Available at: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1108_MER_Biosafety.pdf

Додаток 1

Наступний контрольний список містить критерії для планування або капітального ремонту лабораторій РББ-3 [1,6,8].

Контрольний список для лабораторій РББ-3	
1.	Лабораторія РББ-3 повинна бути розміщена в надійній будівлі, в ідеалі відокремленій від інших будівель, де здійснюють інші наукові дослідження.
2	Лабораторію РББ-3 необхідно відокремити від інших лабораторій (РББ-2).
3.	До лабораторії РББ-3 можна потрапити тільки через передпокій.
4.	Підлога, стіни, двері та робочі поверхні повинні бути водонепроникними, стійкими до кислот, лугів та дезінфікуючих засобів, легко митися та не мати важкодоступних ділянок. Для забезпечення герметизації, шви, щілини та тріщини необхідно повністю ущільнити/зашпаклювати.
5.	Підлога повинна бути непроникною для рідин (високий бортик, зварні шви).
6.	Двері повинні закриватися автоматично.
7.	Вікна повинні надійно закриватися , щоб їх не можна було відчинити, та бути повітронепроникними.
8.	Вхідні двері повинні бути обладнані вікном для спостереження за лабораторією РББ-3.
Потоки повітря	
9.	У передпокої до лабораторії та в самій лабораторії необхідно підтримувати негативний тиск (мінімальна різниця тиску - 15 Па, наприклад, -15 Па в передпокої та -30 Па в лабораторії).
10.	Негативний тиск слід постійно контролювати і відображати показники зовні лабораторії, переважно поруч із входом до лабораторії.
11.	Якщо негативний тиск виходить за межі допустимого діапазону, в передпокої до лабораторії та в лабораторії має спрацювати аудіо-візуальне сповіщення.
12.	Необхідно передбачити виведення повітря з лабораторії та передпокою через окремий повітропровід, обладнаний HEPA-фільтром. Повітропровід не обов'язково повинен мати HEPA-фільтр, але його слід обладнати одностороннім клапаном для запобігання будь-якому зворотному потоку в разі, якщо негативний тиск не підтримується.
13.	Система вентиляції повинна бути обладнана аварійним вимикачем, щоб унеможливити підвищення надлишкового тиску в лабораторії, якщо витяжна система вийде з ладу.
14.	Вентиляційна система для лабораторії РББ-3 має бути повністю незалежною та відокремленою від інших вентиляційних систем, щоб запобігти перехресному забрудненню.
15.	У лабораторії РББ-3 має відбуватися щонайменше 6-12 повних циклів обміну повітря на годину.
16.	Повітрозабірний канал необхідно відокремити від витяжного каналу, щоб запобігти забрудненню потоку повітря між двома каналами.
Вхід та доступ до приміщення	
17.	Вхід до лабораторії РББ-3 необхідно позначити знаком біонебезпеки; також біля входу до такої лабораторії необхідно розмістити інформацію про рівень системи безпечної ізоляції та зберігання інфекційних матеріалів, дані про відповідальних співробітників та підрозділ з біобезпеки (включаючи номери телефонів).
18.	Доступ до лабораторії РББ-3 повинен бути обмежений уповноваженими співробітниками і контролюватися з використання карток-ключів/електронних перепусток.
19.	Джерело безперебійного живлення повинно забезпечувати аварійне живлення.
20.	Якщо дозволено доступ технічного персоналу до лабораторії, такий персонал повинен використовувати засоби індивідуального захисту і перебувати під наглядом штатного персоналу лабораторії. Роботу слід проводити рано вранці, коли не обробляються життєздатні культури, а лабораторія відносно безпечна після багаторазового провітрювання протягом ночі та обробки ультрафіолетовим випромінюванням. Обладнання, до якого торкався технічний персонал, необхідно дезінфікувати 80% етанолом. Обслуговуючий персонал повинен проходити регулярні медогляди стану здоров'я на робочому місці.
21.	Залежно від площі робочого простору, необхідно передбачити герметичний аварійний вихід.
Приміщення перед входом до лабораторії (передпокій)	
22.	Слід використовувати систему блокування дверей, щоб запобігти одночасному відкриванню дверей та витоку потенційно забрудненого повітря з лабораторії РББ-3 до коридору. Необхідно передбачити можливість блокування цієї системи.

23.	Приміщення-передпокій зазвичай вважається частиною зони РББ-3, оскільки передпокій і лабораторія мають однакову систему вентиляції, проте насправді передпокій є зоною, що відокремлює незабруднену зону від потенційно забрудненої зони. Тому рекомендується розділити передпокій на дві частини: нечисту і чисту зони. Обидві зони повинні бути чітко позначені, наприклад, лабораторною стійкою.
24.	Деякі лабораторії мають лише невелике приміщення для передпокою, площа якого є занадто маленькою, щоб розділити його на дві зони. У такому випадку лабораторні халати слід залишати в лабораторії біобезпеки.
25.	Передпокій повинен мати дозатор миючого засобу, дозатор для спирту, раковину та пристрій для одноразових рушників для рук. Диспенсери, а також змішувач/кран для раковин повинні мати таку конструкцію, щоб уникнути застосування рук.

Контрольний список для лабораторій РББ-3	
26.	Контейнер для відходів і контейнер для використаних лабораторних халатів повинні бути герметичними. Перед пранням халати необхідно обробити в автоклаві. Рушники вважаються відносно такими, що не становлять загрози, не потребують обробки в автоклаві.
27.	Біля раковини слід встановити пристрій для екстреного промивання очей.

Контрольний список для лабораторій РББ-3	
Шафи біологічної безпеки	
28.	Прийнятним є використання шаф біологічної безпеки класів I і II. Для максимальної ізоляції джерела інфекції можна розглянути можливість встановлення шафи біологічної безпеки класу III, хоча це призведе до ергономічних недоліків.
29.	Шафа біологічної безпеки повинна бути розташована в лабораторії таким чином, щоби персонал або відкриті двері на заважали потоку повітря. Це не впливатиме на шафу біологічної безпеки класу III..
30.	Витяжне повітря з шафи біологічної безпеки, може відводитися трьома способами: 1. Повітря може рециркулювати в приміщенні, що не рекомендується через можливу негерметичність фільтра біологічної безпеки, що може призвести до потрапляння забрудненого повітря до лабораторії. Це не просто гіпотетичний ризик, особливо якщо шафи біологічної безпеки не обслуговують належним чином. 2. Шафа біологічної безпеки забезпечена безперервною подачею повітряного потоку з байпасом для очищення повітря. 3. За допомогою «втулки» чи «купольної витяжки» витяжне повітря може рециркулювати в приміщенні або виводитися назовні будівлі через спеціальний повітропровід або через основну витяжну систему. Коли шафу біобезпеки (ШББ) увімкнено, вона також сприяє зниженню тиску в лабораторії. Однак тільки варіанти 2 і 3 гарантують підтримання негативного тиску коли ШББ відключено.
31.	Шафи біологічної безпеки повинні проходити перевірку та сертифікацію щонайменше раз на рік. У проміжках між технічним обслуговуванням шафи біологічної безпеки знезаражують шляхом фумігації формальдегідом.
Оцифрування інформації	
32.	Слід уникати будь-якої комунікації між лабораторією РББ-3 та об'єктами за межами лабораторії, використовуючи обмін інформацією у паперовому вигляді. Замість цього слід використовувати комп'ютерну інформаційну систему управління лабораторією.
Відходи	
33.	Контейнери для відходів лабораторії РББ-3 повинні бути міцними, стійкими до ушкоджень, такими, що закриваються, та які можна обробляти в автоклаві.
34.	Лабораторія РББ-3 повинна бути обладнана автоклавом для дезактивації відходів РББ-3. Автоклав з отворами в напрямку лабораторії та коридору є ідеальним варіантом, оскільки завантаження відходів РББ-3 відбувається безпосередньо із зони безпечного зберігання матеріалів, що відповідають 3-му рівню біобезпеки. Автономний автоклав всередині лабораторії РББ-3 також є прийнятним, за умови вирішення належним чином питання щодо поводження із забрудненою парою/конденсатом. Якщо обидва варіанти неможливі, розміщення автоклаву в безпосередній близькості від лабораторії РББ-3 (в тій же будівлі) є прийнятним, проте контейнери повинні бути герметичними і їх необхідно переміщувати тільки під наглядом співробітника лабораторії РББ-3, без будь-якого проміжного зберігання.
Стічні води	
35.	За відсутності в лабораторії РББ-3 раковини, рідкі відходи необхідно інактивувати в автоклаві.
36.	Якщо лабораторія РББ-3 оснащена раковиною, слід подбати про те, щоб стічні води не скидалися в загальну каналізаційну систему. Замість цього стічні води необхідно збирати в резервуарі для занурення та інактивувати (шляхом нагрівання, з використанням хімічних речовин) перед тим, як скидати їх до загальної каналізаційної системи.
37.	Хоча приміщення-передпокій офіційно вважається частиною лабораторії РББ-3, ризики забруднення мікроорганізмами РББ-3 вважаються настільки низькими, що стічні води не потребують процедури знезараження.

2 Забезпечення якості

Автори: Даніела Гомородян, Дімітріос Папавенціс, Тіїна Куммік, Вібеке Остергаард Томсен.

Рецензент: Даніелою Гомородян (2015 р.)

2.1 Передумови та принципи

Лабораторії повинні підтримувати національні програми боротьби з туберкульозом, забезпечуючи надання надійних та гарантованої якості результатів. Кілька європейських стандартів (ISO 17025, ISO 15189, ISO 9001) присвячені питанням управління якістю дослідницьких процесів [1].

Забезпечення якості охоплює кілька окремих процедур, які допомагають покращити якість процедур дослідження, а отже, і посилити довіру до національних програм боротьби з ТБ. Національна політика щодо якості результатів лабораторних досліджень є важливим компонентом національних програм боротьби з ТБ, а надання стабільних високоякісних послуг є однією з ключових функцій будь-якої НРЛ. Мережею Глобальної лабораторної ініціативи (GLI) було опубліковано Керівництво для національних програм боротьби з ТБ та НРЛ щодо створення стандартизованої системи оцінки мережі лабораторій, орієнтованої на мікроскопію, і запропонувала 11 стандартів для акредитації мережі лабораторій з діагностики ТБ, які займаються дослідженнями за напрямом мікроскопії [2]. Рекомендується, щоб кожна лабораторія розробляла, впроваджувала та суворо дотримувалася процедур забезпечення якості дослідження зразків/ізолятів, отриманих від пацієнтів. Очевидно, що якість може бути однаково високою в лабораторіях із формальною системою забезпечення якості або без неї, проте дотримання стандартів допомагає виявляти проблеми та систематично покращувати якість.

Для лабораторій офіційними стандартами, прийнятими більшістю європейських країн, є європейські стандарти: ISO 17025 (Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій), ISO 15189 (Медичні лабораторії - особливі вимоги до якості та компетентності) та ISO 9001 (Системи управління якістю - Вимоги). У 2012 році вийшла оновлена версія ISO 15189 (Медичні лабораторії - Вимоги до якості та компетентності), яка замінила другу редакцію (ISO 15189:2007) [1]. Акредитація за двома попередніми стандартами стосується системи якості та надає технічну оцінку, на відміну від сертифікації за ISO 9001, яка стосується лише системи якості.

Стандарти ISO 17025 та ISO 15189 дуже схожі за своїми конкретними вимогами. ISO 17025 наголошує на потребах клієнтів, тоді як ISO 15189 - на потребах пацієнтів і лікарів. Акредитовані лабораторії часто впроваджують лише стандарти ISO 17025, оскільки ISO 15189 було опубліковано лише у 2003 році. Рішення стосовно впровадження того чи іншого стандарту може ґрунтуватися на місцевих і національних вимогах, статусі медичної лабораторії (комерційна чи державна), близькості до клінічних відділень (діагностична лабораторія, референс-лабораторія), а також на потребах інших лабораторій установи (у зв’язку з оплатою за акредитацію).

Таблиця 2. Загальна сфера застосування ISO 17025 та ISO 15189

ISO 17025. Загальні вимоги до компетентності лабораторій з проведення випробувань та калібрування	ISO 15189:2012 Медичні лабораторії - Вимоги до якості та компетентності
«ISO/IEC 17025:2005 визначає загальні вимоги до компетентності для проведення випробувань та/або калібрувань, включаючи відбір зразків. Даний стандарт охоплює випробування та калібрування, що виконуються стандартними методами, нестандартними методами та методами, розробленими лабораторією. Стандарт застосовний до всіх організацій, які проводять випробування та/або калібрування. До них належать, наприклад, лабораторії першої, другої та третьої сторін, а також лабораторії, де випробування та/або калібрування є частиною перевірки та сертифікації продукції. ISO/IEC 17025:2005 застосовний до всіх лабораторій незалежно від кількості персоналу або обсягу діяльності з випробувань та/або калібрування. Якщо лабораторія не виконує один або кілька видів діяльності, передбачених ISO/IEC 17025:2005, наприклад, відбір зразків і проєктування/розвиток нових методів, вимоги цих пунктів не застосовуються. ISO/IEC 17025:2005 призначений для використання лабораторіями при розробці їхньої системи управління якістю, адміністративних і технічних операцій. Замовники лабораторій, регуляторні органи та органи з акредитації також можуть використовувати цей стандарт для підтвердження або визнання компетентності лабораторій. ISO/IEC 17025:2005 не призначений для використання в якості підстави для проведення сертифікації лабораторій.» [1]	У цій новій версії деякі розділи було перейменовано, а деякі вимоги було більш деталізовано, як у частині менеджменту, так і в частині технічних вимог. З'явилися нові нормативні розділи (Звітність та оприлюднення результатів), а додатки B і C, які були в колишніх версіях, стали новими розділами (Управління лабораторною інформацією та Етична поведінка, відповідно).

Акредитація/сертифікація лабораторії (національним органом, що забезпечує офіційне визнання якості лабораторії) відповідно до цих стандартів визнає професійну компетентність лабораторії та є офіційним показником високих стандартів роботи. Основні терміни наведено в Таблиці 3, а визначення інших термінів наведено в публікації «Міжнародний словник метрології - основні та загальні поняття та пов'язані з ними терміни» (VIM) [3] та в «Збірнику хімічних технологій IUPAC - золота книга» [4]. У цьому розділі викладено найважливіші вимоги стандартів ISO/IEC 17025 та ISO 15189:2012. Глава враховує особливі вимоги, виконання яких покладають на медичне середовище, а також внесок медичних лабораторій у надання медичної допомоги пацієнтам. У главі визнається, що медичні лабораторії не тільки досліджують зразки пацієнтів, але й пропонують послуги з консультації, інтерпретації та навчання. Повний текст цих стандартів можна придбати онлайн [1].

Таблиця 3. Основні терміни та скорочення стосовно забезпечення якості

Забезпечення якості	Система постійного вдосконалення та моніторингу надійності, ефективності та клінічного застосування лабораторних тестів. Контроль якості, покращення якості та валідація методів є невід'ємними компонентами забезпечення якості
Оцінка якості	Процес регулярних перевірок ефективності для забезпечення того, що метод працює так, як очікується. Внутрішня оцінка якості (ВОЯ) включає елементи контролю, який тестується паралельно із дослідженням зразків/виділенням ізолятів. При цьому оцінюють точність і достовірність результатів тестування, ефективність тестових реагентів і те, наскільки добре працює персонал лабораторії під час проведення дослідження. Зовнішня оцінка якості (ЗОЯ) або кваліфікаційні комісії - це перевірка зразків/ізолятів, отриманих від незалежної організації з метою оцінки роботи лабораторії-учасниці. Міжлабораторне порівняння результатів є альтернативою за відсутності кваліфікаційних комісій та включає обмін зразками/ізолятами з іншими лабораторіями (як правило, щонайменше трьома), які проводять такі ж самі дослідження.
Валідація	Валідація - це «підтвердження шляхом перевірки та надання об'єктивних доказів того, що для конкретного передбачуваного використання було виконано конкретні вимоги» (ISO 17025).
Ключові індикатори	Для кожного тесту слід визначити ключові індикатори та регулярно слідкувати за ними, щоб відстежувати тенденції (раннє виявлення відхилень).

2.2 Вибір методу випробування та його проведення

Лабораторія повинна використовувати методи випробувань, які відповідають потребам замовника і включають процедури відбору зразків, обробки, транспортування, а також зберігання і підготовки зразків/ізолятів. Методи повинні відповідати міжнародним, регіональним або національним стандартам, розробленим авторитетними технічними організаціями, опублікованими в наукових журналах, або зазначеними виробником набору/обладнання для проведення випробувань. Лабораторні методи, розроблені лабораторією, або методи, прийняті в лабораторії, також можуть бути використані, якщо вони є доречними та валідованими. Лабораторія повинна підтвердити, що вона може належним чином виконувати методи, перш ніж реалізувати процедуру тестування [6,7].

2.3 Валідація

Необхідно валідувати нестандартні методи, розроблені лабораторією методи, стандартні методи, що використовуються поза межами їхнього призначення, модифікації стандартних методів, а також зміни усталених методів. Валідація - це «підтвердження шляхом перевірки та надання об'єктивних доказів того, що було виконано конкретні вимоги для передбачуваного використання таких методів» (ISO 17025). Валідація включає: специфікацію письмових вимог; визначення характеристик аналізу; перевірку того, що виконання аналізу відповідає вимогам; та заяву про валідність. Для стандартизованих методів необхідно лише підтвердити, що метод працює локально так, як очікується. Валідація є відносним процесом: чутливість і специфічність діагностики розраховують відносно стандартної верифікованої процедури.

Частково валідацію можуть здійснювати виробники чи інші лабораторії. З моменту введення в дію «Директиви щодо проведення діагностики in vitro» (IVD) 5], у 2003 році виробники були юридично зобов'язані проводити всебічну валідацію. У цьому випадку валідація може бути скороченим варіантом перевірки, проте лабораторія все одно повинна підтвердити, що метод працює локально так, як і очікується. У всіх випадках лабораторія повинна мати доступ до документації, еквівалентної повній валідації, а також оцінювати, чи є валідація релевантною для використання, та чи було виконано вимоги.

Неможливо рекомендувати один метод валідації для всіх тестів. Валідацію можна здійснювати шляхом:

- порівняння результатів, отриманих іншими методами;
- міжлабораторних порівнянь;
- систематичної оцінки факторів, що впливають на результат; та
- оцінювання невизначеності результатів, що ґрунтується на науковому розумінні теоретичних принципів методу та практичному досвіді.
- огляд принципів валідації можна знайти в Westgard (2008 р.) [6] та Westgard (2010 р.) [7]. Крім того, можна провести оцінку таких факторів, як:
  - коефіцієнти варіації;
  - невизначеність результатів;
  - межа виявлення;
  - чутливість;
  - специфічність;
  - лінійність;
  - межа повторюваності та/або відтворюваності; та
  - надійність.

У багатьох випадках діапазон значень був спрощений через брак інформації.

2.4 Контроль та моніторинг тенденцій за ключовими індикаторами

Необхідно вибрати відповідні внутрішні оцінки якості (ВОЯ) і проводити паралельно з оцінюванням зразків/ізолятів для регулярного моніторингу рутинної роботи (наприклад, контрольні предметні скельця для мікроскопії). Еталонні штами можна придбати з різних колекцій штамів [1,2,3,5,6].

Можна використовувати ключові індикатори для моніторингу тенденцій продуктивності в часі та раннього виявлення відхилень (наприклад, частка заражених культур або частка непереконливих результатів аналізу IGRA за певний період часу). НРЛ кожної країни надає настанови щодо ВОЯ відповідно до вимог стандарту ISO, використовуваних методів та місцевих умов (інфраструктура, робоче навантаження, обладнання та персонал). Приклади ВОЯ можна знайти в розділах 3-7.

Програми зовнішньої оцінки якості (ЗОЯ) є невід'ємною частиною забезпечення якості. Програми, актуальні для мікобактеріологічних лабораторій, доступні через INSTAND e.V., Національну службу зовнішньої оцінки якості Великої Британії (UK NEQAS), Центри контролю та профілактики захворювань США (US CDC), LabQuality та наднаціональні референс-лабораторії ВООЗ, з якими мають зв'язок усі національні референс-лабораторії з діагностики ТБ. За відсутності доступу до програм ЗОЯ для тесту, можна організувати обмін з іншими лабораторіями. Участь повинні брати щонайменше три лабораторії; однак програми ЗОЯ не замінюють ВОЯ [2].

2.5 Фізичні та екологічні умови

Базове облаштування лабораторії (енергопостачання, освітлення, умови навколишнього середовища) має бути сприятливим для проведення випробувань. Фізичні та екологічні умови, які можуть негативно вплинути на результати дослідження, необхідно контролювати та документувати. Необхідно відокремити зони, що є несумісними з видами діяльності лабораторії з дослідження інфекційних агентів (наприклад, первинні зразки та ізоляти мікобактерій, зони до і після ампліфікації), а також слід вжити запобіжних заходів, щоб унеможливити перехресне зараження. Доступ до лабораторій та їх використання необхідно контролювати, якщо це може вплинути на якість випробувань. Необхідно також вжити заходів для належного забезпечення порядку та чистоти в лабораторії, що сприятиме підвищенню рівня біобезпеки (Глава 1) [1,2,3,5,6].

2.6 Обладнання

Обладнання та відповідне програмне забезпечення повинні гарантувати необхідний рівень точності та відповідати специфікаціям, що стосуються випробувань. Процедури поводження, зберігання, використання та технічного обслуговування повинні забезпечувати належне функціонування обладнання та запобігати його забрудненню або погіршенню його стану. Обладнання з функцією вимірювання необхідно спочатку відкалібрувати та регулярно здійснювати цю процедуру в подальшому. Повинні бути впроваджені процедури, які гарантують, що обладнання, стосовно якого виникає підозра в його несправності, не будуть використовувати до перевірки такого обладнання.

Для критично важливого обладнання слід вести записи, що включають: назву виробника; ідентифікаційний та серійний номер; дані перевірки відповідності; місцезнаходження; інструкції виробника; результати; звіти; сертифікати всіх калібрувань/коригувань; критерії приймання; дати наступного калібрування; план технічного обслуговування; реєстрацію пошкоджень, несправностей, модифікацій або ремонту. На самому обладнанні повинно бути маркування зі статусом калібрування та датою останнього і наступного калібрування [1,2,3,5,6].

2.7 Керівний склад та персонал

Управлінський та технічний персонал має бути уповноважений проводити випробування відповідно до необхідних стандартів. Вони повинні мати у своєму розпорядженні всі необхідні ресурси. Керівництво та персонал не повинні мати жодних конфліктів інтересів, а ключовий персонал повинен мати призначених заступників. Необхідно призначити одну особу, яка відповідатиме за якість, а персонал лабораторії повинен розуміти, що дотримання якості випробувань - це відповідальність кожного. Керівництво повинно задокументувати компетентність персоналу, щоб забезпечити належне поводження з обладнанням, та фіксувати рівень знань співробітників щодо проведення тестувань, оцінки та затвердження результатів, а також процедури підписання звітних форм. У деяких країнах може існувати вимога щодо надання офіційного дозволу для певних співробітників. Співробітники, які дають вказівки або інтерпретують результати, повинні бути обізнані із застосовною технологією та усвідомлювати значення отриманих результатів. В ідеалі, необхідно винаймати персонал для роботи на постійних посадах або залучати їх через процедуру підписання контракту. Для управлінського, адміністративного та технічного персоналу, залученого до випробувань, необхідно розробити посадові інструкції та забезпечити їхню наявність [7].

2.8 Документування та реєстрація

Лабораторії документують свою політику і процедури тестування та використання обладнання (місцевою мовою) для забезпечення якості результатів. Уповноважений персонал перевіряє та затверджує усі документи перед їх виданням. Відповідні співробітники також повинні прочитати та зрозуміти усі оприлюднені документи, а також слід регулярно здійснювати перегляд таких документів. Необхідно запобігати використанню прострочених/змінених документів. Усі документи повинні бути легкодоступними. Рукописні виправлення та примітки слід невідкладно вносити до офіційної версії документа. Рукописні виправлення мають бути датовані та підписані ініціалами особи, яка їх зробила [1,2,3,5,6].

Процедури реєстрації зразків повинні передбачати ідентифікацію зразків, доступ до них, архівування, обслуговування та утилізацію. Процедури повинні визначати тривалість зберігання реєстраційних форм. Реєстраційні форми необхідно чітко заповнювати (розбірливим почерком), мають бути у доступі, залишатися конфіденційними для сторонніх осіб і зберігатися в умовах, що запобігають їх пошкодженню та втраті. Розрахунки та передача даних повинні підлягати належній і систематичній перевірці. Реєстраційні документи повинні давати можливість відтворити весь процес тестування. При виявленні помилок, правильну інформацію слід внести поруч з помилковою, не накладаючи такий запис на неправильний, а потім такі виправлені записи повинен підписати співробітник/співробітниця, який/яка виправили інформацію, чи проставити на них ініціали, та вказати дату внесення змін.

Електронні дані повинні бути захищені (введення; зберігання, включаючи резервне копіювання, доступ, передачу та обробку) відповідно до національної політики захисту даних. Крім того, комп'ютерне програмне забезпечення, розроблене власними силами, необхідно задокументувати та валідувати.

2.9 Настанови щодо відбору зразків, розгляд запитів та обслуговування клієнтів

Лабораторія надає замовнику стандартизовані операційні процедури (на основі існуючих настанов) для відбору зразків, які є в легкому доступі в місці відбору зразків (наприклад, онлайн). Настанови щодо відбору зразків стосуються всіх факторів, які необхідно контролювати для забезпечення достовірності випробування (наприклад, якість і обсяг зразка, кількість зразків, час транспортування і температура). Якщо зразки є неоптимальними чи неприйнятними для дослідження, це має бути зазначено у звіті про результати та/або про це слід інформувати відповідних співробітників [1,2,3,5,6].

Необхідно впровадити процедури розгляду запитів, тендерів та контрактів на проведення тестування відповідно до національних настанов. Для планової діагностики достатньо рекомендацій від лабораторії та заповненої форми запиту. Лабораторія визначатиме потреби замовника, включаючи рекомендації та аналіз результатів. Замовника слід проінформувати у разі значних відхилень/затримок.

2.10 Субпідряди, послуги та постачання

Лабораторія несе відповідальність за те, щоб уся робота, яку виконують субпідрядники, відповідала необхідним стандартам. Прикладами є калібрування обладнання або тестування мікобактерій туберкульозу на чутливість до протитуберкульозних препаратів другого ряду в іншій лабораторії. Необхідно розробити політики та процедури щодо послуг і матеріалів, які безпосередньо впливають на якість діагностики: процедури охоплюють закупівлю, отримання та зберігання реагентів, а також відповідність поставок стандартам і нормам. Лабораторії рекомендується оцінити провайдерів критично важливих послуг і витратних матеріалів. Реагенти з маркуванням CE виробляються відповідно до директиви ЄС і відповідають національним нормам.

2.11 Претензії, помилки та коригувальні дії

Необхідно розробити та зареєструвати політику та процедури щодо претензій, відхилень та коригувальних дій. При виявленні помилок слід оцінити їхню значущість та вжити коригувальних дій. Замовника необхідно проінформувати, а результати мають бути виправлені або відкликані. Потім слід оцінити, коли можна буде відновити тестування. Якщо оцінка вказує на те, що помилка може повторитися (систематична помилка), необхідно негайно вжити коригувальних заходів і контролювати їхній вплив. Усі коригувальні дії повинні бути попередньо затверджені [1,2,3,5,6].

2.12 Вдосконалення

Вище керівництво має бути відданим розробці, впровадженню та вдосконаленню системи забезпечення якості.. Лабораторія повинна регулярно переглядати систему якості, встановлюючи політику якості та формулюючи цілі забезпечення якості. Методи покращення включають превентивні дії, оцінку претензій та відхилень, коригувальні дії (як зазначено вище), спостереження за результатами внутрішніх аудитів, аналіз даних і оцінку керівництва.

Внутрішні аудити слід проводити щорічно за участі підготовленого, кваліфікованого персоналу, не залученого до діяльності, що підлягає аудиту. Під час проведення керівництвом щорічного аналізу здійснюють оцінку відповідних політик і процедур, звітів персоналу, результатів аудитів, коригувальних і запобіжних дій, зовнішньої оцінки, оцінку результатів зовнішніх професійних груп або міжлабораторних порівнянь, розглядають зміни в робочому навантаженні, запити клієнтів, претензії та інші відповідні чинники [1,2,3,5,6].

2.13 Підготовка звіту та оприлюднення результатів

Важливо, щоб результати кожного випробування були викладені точно, чітко, однозначно та об'єктивно. Кожен звіт включає приналежність закладу, назву та адресу лабораторії, унікальну ідентифікацію звіту про випробування (всіх сторінок), повідомлення про закінчення звіту (або інший індикатор в кінці звіту), назву та адресу замовника, використаний метод, опис зразків/ізолятів (включаючи дату відбору), ідентифікацію пацієнта, тип зразка, дату отримання, результат випробування, дату оприлюднення та ім'я особи (осіб), яка (які) затверджує(ють) звіт [1,2,6,7].

Список літератури

1. International Organization for Standardization. ISO Standards. Geneva: ISO; 2011. Available at: http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=39883 and http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=42641
2. TB Microscopy Network Accreditation – An assessment tool. First English Edition, October 2013. Available at: http://www.stoptb.org/wg/qli
3. International Organization of Legal Metrology (OIML), Joint Committee for Guides in Metrology. International vocabulary of metrology – basic and general concepts and associated terms (VIM). Paris: International Organization of Legal Metrology; 2007. Available at: http://www.oiml.org/en/files/pdf_v/v002-200- e07.pdf/view
4. International Union of Pure and Applied Chemistry. IUPAC Compendium of chemical terminology – the gold book. Research Triangle Park, NC: IUPAC; 2005-2009 [cited 28 July 2015.] Available at: http://goldbook.iupac.org
5. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. Available at: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:31998L0079
6. Westgard, JO. Basic method validation. 3rd edition. Madison, WI: Westgard QC; 2008.
7. Westgard, JO. Tools, technologies and training for healthcare laboratories. Madison, WI: Westgard QC; 2009. Available at: http://www.westgard.com

3 Діагностика інфекції ТБ

Автори: Дімітріос Папавенціс та Владислав Ніколаєвський

Рецензенти: Дімітріос Папавенціс та Владислав Ніколаєвський (2015 р.)

3.1 Передумови та принципи

У більшості людей, які спочатку були інфіковані мікобактерією туберкульозу, не розвивається активна форма ТБ. Такий стан (коли у людини, інфікованої туберкульозною паличкою, не розвинувся активний туберкульоз) називається латентною туберкульозною інфекцією (ЛТБІ) [1]. Такий стан характеризується персистенцією та низькою швидкістю розмноження життєздатних мікобактерій туберкульозу в макрофагах і ознаками імунної відповіді проти бактерії, але без клінічних проявів та рентгенологічних і бактеріологічних ознак активної форми захворювання. За оцінками, третина населення світу (майже два мільярди людей в усьому світі) є латентно інфікованими ТБ, що представляє собою величезний резервуар потенційних випадків захворювання на ТБ [2]. Латентність може зберігатися протягом усього життя інфікованої людини.

Первинне інфікування призводить до активної форми захворювання у 10% інфікованих осіб, переважно протягом двох років після зараження [3]. Коли імунна відповідь хазяїна послаблюється (наприклад, через ВІЛ-інфекцію, недоїдання, використання стероїдів/інших імуносупресивних препаратів або похилий вік), може відбутися реактивація латентної інфекції [4].

Будучи неінфекційними, латентно інфіковані особи не становлять безпосереднього ризику передачі ТБ. Виявлення ЛТБІ, однак, є важливим засобом глобальної боротьби з ТБ і становить основну частину Глобального плану ВООЗ «Зупинити туберкульоз» [5]. Призначення хіміопрофілактики для людей з ЛТБІ значно знижує ризики розвитку активної форми ТБ. Ідеальний тест для діагностики ЛТБІ повинен відповідати наступним критеріям [5], а саме:

- Висока чутливість у всіх групах ризику;
- Висока специфічність незалежно від вакцинації БЦЖ та інфікування мікобактеріями з навколишнього середовища;
- Надійність та стабільність у часі;
- Об'єктивні критерії позитивного результату, доступність та простота застосування;
- Можливість виявлення нещодавно інфікованих осіб з високим ризиком розвитку активної форми ТБ.

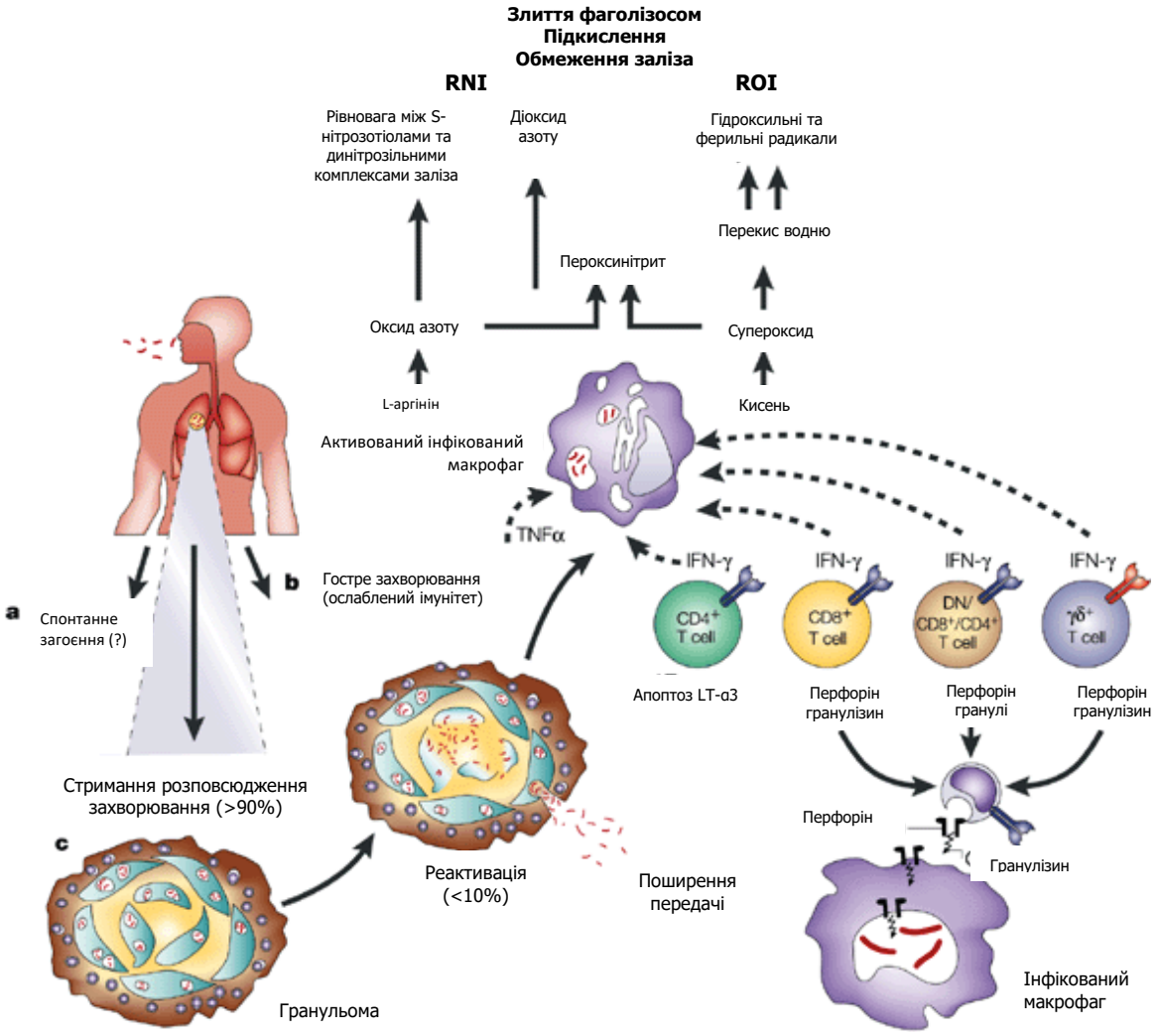
Наразі є дві групи тестів для діагностики ЛТБІ: туберкулінові шкірні проби (ТШП) та аналізи вивільнення гамма-інтерферону (IGRA).

3.1.1 Імунна відповідь на мікобактерії туберкульозу (*M.Tuberculosis)*

Імунна відповідь на *M. tuberculosis* є багатогранною. Імунологічні механізми, що беруть участь у підтримці латентної інфекції, є складними, але, безумовно, необхідними для запобігання реактивації [1]. При інфікуванні людини *M. tuberculosis* можливі три варіанти розвитку подій (рис. 2):

- Спонтанне зцілення.
- Латентність. У більшості випадків мікобактерії спочатку стримуються, а захворювання розвивається пізніше в результаті реактивації. Гранульома, яка утворюється у відповідь на *M. tuberculosis*, складається з макрофагів, які можуть диференціюватися в епітеліоїдні макрофаги чи багатоядерні гігантські клітини, Т-клітини CD4 і CD8 , а також В-клітини. Т-клітини виробляють гамма-інтерферон, який активує макрофаги. Т-клітини CD8 можуть лізувати інфіковані макрофаги або вбивати внутрішньоклітинні бактерії. Фактор некрозу пухлин (ФНП) виробляється макрофагами і Т-клітинами. Також присутні дендритні клітини, а зріла гранульома оточена фібробластами. Мікобактерії туберкульозу присутні всередині макрофагів та позаклітинно.
- Розвиток ТБ безпосередньо після інфікування у людини з ослабленим імунітетом: при виснаженні CD4 Т-клітин (наприклад, під час ВІЛ-інфекції) гранульома не функціонує належним чином, вироблення інтерферону-γ може знижуватися, а макрофаги є менш активними. Як наслідок, *M. tuberculosis* починають розмножуватися і розвивається активна форма ТБ. У разі нейтралізації ФНП клітини всередині гранульоми вже не так щільно згруповані, можливо, через порушення регуляції хемокінів або молекул адгезії. Крім того, макрофаги не настільки активовані. Ці дефекти призводять до дезорганізації гранульоми, яка менш здатна контролювати інфекцію та посилює імунопатологію [1].

Таблиця 2. Потенційні наслідки інфікування організму людини *M. tuberculosis*



RNI - рекомендована норма споживання поживної речовини (нутрієнтів); ROI - область дослідження; TNFα - фактор некрозу пухлини-альфа; INF-γ – гамма-інтерферон; LT-α3 - апоптоз лімфотоксин-альфа3

Передруковано з дозволу видавничої компанії Macmillan (Macmillan Publishers Ltd): Медичний науковий журнал, в якому публікуються оглядові статті з питань імунології (Nature Reviews Immunology), S. Kaufmann, Яким чином імунологія може сприяти боротьбі з туберкульозом? Жовтень 2001 р.; 1 [17].

Хоча відповідь хазяїна має важливе значення для контролю інфекції, *M. tuberculosis* бере участь у встановленні латентності, використовуючи різні стратегії для уникнення елімінації хазяїном [1]. *M. tuberculosis* може порушувати різні антимікобактеріальні функції макрофагів. Після поглинання, *M. tuberculosis* потрапляє у фагосому, дозрівання якої припиняється на ранній стадії [17]. Усередині фагосоми *M. tuberculosis* зазнає впливу антимікобактеріальної дії реактивних проміжних сполук азоту (RNI) [1]. *M. tuberculosis* інгібує фагосомальне закислення і перешкоджає злиттю з лізосомальними компартментами. Бактерії також можуть пригнічувати шлях презентації антигену, опосередкованого МНС класу II .

3.2 Туберкулінова шкірна проба (ТШТ)

Вперше введена в 1890 році, ТШП являє собою внутрішньошкірну ін'єкцію очищеного білкового похідного (PPD). PPD - це необроблена антигенна суміш, спільна для *M. tuberculosis, M. bovis* та інших нетуберкульозних мікобактерій (НТМ) [6].

Тестування *in vivo* (на тваринах) вимірює реакцію гіперчутливості сповільненого типу на основі імунологічного розпізнавання мікобактеріальних антигенів у експонованих людей. Мікобактеріальні антигени вводяться під епідермальний шар, викликаючи інфільтрацію антиген-специфічних лімфоцитів і вироблення запальних цитокінів. У результаті цієї запальної реакції в місці введення ін'єкції утворюється характерне ущільнення.

Донедавна ТШП була єдиним інструментом для виявлення ЛТБІ. Обмеження тесту включають

- висока частка хибнопозитивних і хибнонегативних результатів
- складність відокремлення справжньої інфекції від наслідків вакцинації БЦЖ та інфікування нетуберкульозними мікобактеріями;

- технічні проблеми в застосуванні;
- посилення імунної відповіді після повторної ТШП;
- складна та суб'єктивна інтерпретація; та
- необхідність повторного візиту.

3.3 Аналіз вивільнення гамма-інтерферону (IGRA)

3.3.1 Вступ

QuantiFERON-TB Gold (QFT-G, Qiagen GmbH, Гільден, Німеччина) та T-SPOT (Oxford Immunotec Limited, Абіндон, Сполучене Королівство (Великобританія)) - це два тести ex-vivo, які проводять in-vitro, для вимірювання клітинно-опосередкованих імунних реакцій (CMIR) на пептидні антигени, які імітують білки мікобактерій. Ці антигени, ESAT-6, CFP-10 і TB7.7 (p4) (використовується тільки в QFT-G), відсутні у всіх штамах БЦЖ та в більшості нетуберкульозних мікобактерій, за винятком *M. kansasii, M. szulgai* і *M. marinum* [7-9]. Люди, інфіковані мікроорганізмами комплексу *M. tuberculosis (M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti, M. canetti*), мають у крові мононуклеарні клітини, які розпізнають ці мікобактеріальні антигени. Цей процес розпізнавання in vitro призводить до стимуляції та секреції інтерферону-γ (IFN-γ) із сенсибілізованих Т-клітин. В основі цих тестів лежить виявлення та подальше кількісне визначення ІФН-γ за допомогою імуноферментного аналізу QuantiFERON або імуноферментного аналізу T-SPOT [10]. Обидва тести призначені для використання в поєднанні з оцінкою ризиків, проведенням рентгенографії та інших медичних та діагностичних досліджень. Потенційні переваги IGRA над ТШП включають: більшу чутливість; вищу специфічність (менший вплив вакцинації БЦЖ та інфікування нетуберкульозними мікобактеріями); менший вплив технічних проблем при введенні та інтерпретації; необхідність здійснення лише одного візиту до медичного закладу.

3.3.2 Чинні національні настанови та клінічне застосування IGRAs

Завдяки зростанню доказової бази, багато національних настанов з діагностики ЛТБІ наразі включають тест IGRA, хоча більшість країн продовжують рекомендувати і використовувати ТШП. Нещодавно проведений аналіз [18], який ґрунтується на тридцяти трьох настановах і стратегічних документах з 25 країн і двох міжнародних організацій, продемонстрував значну різноманітність у підходах. Настанови переважно доступні в країнах з високим рівнем доходу, в яких діють програми скринінгу на ЛТБІ. Загалом застосовують чотири підходи:

- двоетапний підхід: спочатку проводять ТШП, а потім аналіз IGRA, або коли отримують негативний результат на ТШП (для підвищення чутливості, переважно у осіб з ослабленим імунітетом), або коли результат ТШП є позитивним (для підвищення специфічності, переважно у вакцинованих БЦЖ осіб);
- або ТШП, або аналіз IGRA, але не обидва;
- аналіз IGRA та ТШП разом (для підвищення чутливості):
- тільки аналіз IGRA замість ТШП.

Існує також тенденція щодо використання тільки аналізів IGRA перед початком терапії анти-ФНП-α. Деякі настанови все ще не пропонують використання IGRA у дітей віком до п'яти років. Більшість чинних настанов не використовують об'єктивні, прозорі методи оцінки доказових даних і рекомендацій, а також рідко розкриваються конфлікти інтересів. Існуючі національні настанови з діагностики ЛТБІ в країнах ЄС/ЄЕЗ наведено в таблиці 4.

Таблиця 4. Список національних настанов щодо діагностики ТБ- інфекції

Країна	Настанова
Австрія	Schmidgruber B. Настанови щодо діагностики латентної форми туберкульозу в кантоні Відень; 2011 рік; Департамент громадського здоров'я Відня, Австрія.
Болгарія	Маркова Р. Настанови щодо діагностики латентної форми туберкульозу в Болгарії; 2011 рік; Відділення імунології та алергології, Національний центр інфекцій та паразитарних хвороб; Софія, Болгарія
Хорватія	Katalinic-Jankovic V. Настанови щодо діагностики латентної форми туберкульозу в Хорватії; особисте спілкування з Вірою Каталініч-Янкович. 2011 рік; Хорватський національний інститут громадського здоров'я; Загреб, Хорватія
Чехія	Чеське торакальне товариство. Рекомендації Чеського торакального товариства щодо тесту QuantiFERON-TB Gold; 2005 рік; Науково-дослідний інститут з туберкульозу та респіраторних захворювань; Прага, Чехія
Данія	Kruse, Hvass, Wejse та інш., Боротьба з туберкульозом в Данії, 2018 р.; Данія
Фінляндія	Рекомендації щодо скринінгу контактних осіб на туберкульоз, 2011 р.; Департамент охорони здоров'я та соціального забезпечення, Фінляндія
Франція	Тест на визначення вироблення інтерферону-у для діагностики туберкульозних інфекцій, 2006 р.; Вище управління охорони здоров'я, Франція
Німеччина	Нові рекомендації щодо відстеження контактів при туберкульозі, Німецький центральний комітет боротьби з туберкульозом. Німеччина
Угорщина	Настанова для медичних працівників - Мікробіологічна діагностика туберкульозу; 2018; Угорщина; Nagy E., Szabó N., Kónya J.
Ірландія	Настанови з профілактики туберкульозу та боротьби з ним в Ірландії, 2014 р.; Центр нагляду за охороною здоров'я, Ірландія
Італія	Оновлення рекомендацій щодо боротьби з туберкульозом: контакт та управління туберкульозом в установах з надання догляду, 2009 р.; Міністерство праці, охорони здоров'я та соціальної політики, Італія
Латвія	Клінічні настанови з туберкульозу; Латвійська асоціація фтизіатрів та лікарів легеневих хвороб, Рига, 2014 р.; Алгоритми діагностики туберкульозу, оновлені у 2019 році, Латвія
Литва	R. Zablockis, E. Danila, S. Miliauskas, K. Malakauskas, E. Davidavičienė, E. Vasiliauskienė, G. Musteikienė, K. Miškinis, R. Matulionytė, A. Vitkauskienė; Керівництво з діагностики та лікування туберкульозу легень, 2018 р.; Литва
Мальта	Dr Analita Pace Axiaq, «Профілактика, контроль та лікування туберкульозу: Національна стратегія для Мальти», 2012 р.; Мальта
Нідерланди	Аналіз вивільнення гамма-інтерферону в діагностиці туберкульозу, 2011 р.; Робоча група IGRA Комітет з практичного контролю за туберкульозом, Нідерланди
Норвегія	Посібник з туберкульозу у вигляді електронної книги, 2011 р.; Норвезький інститут громадського здоров'я, Норвегія
Польща	Рекомендації з профілактики та лікування туберкульозу у пацієнтів, які отримують антагоністи ФНП-α, 2008 р., Польща
Португалія	Латентний туберкульоз: проєкт щодо розширення тесту методом IGRA, 2010 р.; Національна програма боротьби з туберкульозом (НПБТ), Португалія
Румунія	Homorodean D., Moisoiu A., Національне керівництво для мережі лабораторій ТБ, 2022 рік, Румунія
Словаччина	Словацькі настанови щодо тестування на латентний туберкульоз, 2010 р.; Міністерство охорони здоров'я Словацької Республіки, Словаччина
Словенія	P. Svetina, S. Grm Zupan, M. Žolnir-Dovč, M. Košnik. Латентна інфекція мікобактерій туберкульозу; 2015 р., Словенія
Іспанія	Робоча група з розробки Клінічних настанов щодо діагностики, лікування та профілактики туберкульозу. Іберо-американський Кокранівський центр, координатор. Клінічна настанова з діагностики, лікування та профілактики туберкульозу. План якості національної системи охорони здоров'я Міністерства охорони здоров'я, соціальної політики і рівності. Агенція з інформатизації, оцінки та якості охорони здоров'я (AIAQS) Каталонії; 2009 рік. Керівництво з клінічної практики в системі охорони здоров'я: AATRM Nº 2007/26. Іспанія
Швейцарія	Посібник з туберкульозу (чорнова версія), 2011 р.; Центр компетенції з питань туберкульозу, Швейцарія

Інформація, яка міститься в різних національних настановах і рекомендаціях, свідчить про те, що аналізи IGRA все частіше рекомендують, в першу чергу, в умовах низької захворюваності, оскільки вони пропонують вищу специфічність у поєднанні з логістичними перевагами [19]. Все ще надається перевага ТШП в умовах високої захворюваності та за обмежених ресурсів.

Загалом, дані свідчать про те, що скринінг на ЛТБІ (з використанням як ТШП, так і аналізу IGRA) в ідеалі повинен обмежуватися особами з досить високим ризиком розвитку захворювання, які отримають користь від хіміопрофілактики в разі отримання позитивного результату.

Клінічне застосування аналізів IGRA в різних групах населення нещодавно було переглянуто, а міжнародні організації, в тому числі ВООЗ та ECDC, опублікували відповідні документи з питань політики [20-23]. ВООЗ загалом не рекомендує використовувати аналіз IGRA та рекомендує застосовувати ТШП, але тільки за умов низького та середнього рівня доходу, незалежно від ВІЛ-статусу. Підхід ECDC базується на показниках захворюваності на ТБ. Для країн з високим рівнем захворюваності, ECDC не рекомендує використовувати IGRA для діагностики ЛТБІ, оскільки основна увага щодо профілактики та контролю захворювання зосереджена на виявленні та лікуванні активних випадків ТБ. За умов низького рівня захворюваності пропонується застосовувати двоетапний підхід. Для діагностики активного ТБ, ECDC вважає, що аналізи IGRA не повинні замінювати стандартні методи діагностики і, як правило, не мають додаткової цінності в більшості клінічних ситуацій в поєднанні зі стандартними методами діагностики активної форми ТБ. Однак у певних клінічних ситуаціях (наприклад, пацієнти з позалегеневим ТБ, пацієнти з негативним результатом на кислотостійкі бактерії в мокротинні та/або негативним результатом на *M. tuberculosis* після посіву культур, діагностика ТБ у дітей або диференціальна діагностика інфекції з нетуберкульозними мікобактеріями) ECDC припускає, що аналізи IGRA можуть надавати додаткову інформацію в рамках діагностичного процесу та лабораторного менеджменту. Загалом, практика відстеження контактів у дорослих свідчить про чітку тенденцію до більш широкого використання аналізів IGRA, особливо в країнах з низьким рівнем захворюваності, здебільшого в якості двоетапної стратегії [18].

3.3.3 Прогностичне значення аналізу IGRA щодо розвитку захворювання до активної форми туберкульозу

Існуючі дані свідчать про те, що і ТШП, й аналіз на основі технології IGRA є прийнятними, але недосконалими тестами, і жоден з них не може точно диференціювати ЛТБІ та активну форму ТБ, відрізнити реактивацію від реінфекції або точно спрогнозувати розвиток від ЛТБІ до активної форми захворювання [19]. У нещодавньому мета-аналізі [24], який базувався на об'єднаній вибірці розміром 26 680 осіб і даних 15 лонгітюдних досліджень, було зроблено висновок, що ні аналіз на основі технології IGRA, а ні ТШП не можуть точно спрогнозувати ризики розвитку активного ТБ, хоча використання аналізу IGRA в певних групах населення може зменшити кількість людей, щодо яких приймають рішення застосовувати хіміопрофілактику.

Загалом, наявні наразі дані свідчать про те, що прогностичне значення аналізу на основі технології IGRA щодо розвитку хвороби до активної форми ТБ є низькою і лише незначною мірою (несуттєво) вищою, ніж при проведенні ТШП [19]. Існують також обмежені докази того, що конверсія IGRA, виявлена за допомогою багаторазового тестування, може мати більше прогностичне значення, ніж результати одного аналізу IGRA, оскільки може вказувати на нещодавнє інфікування [25]. Що стосується груп високого ризику (наприклад, ВІЛ-інфікованих осіб), то наразі немає даних, які б свідчили про те, що аналіз IGRA краще прогнозує розвиток активної форми ТБ у цій групі, ніж ТШП [19,26].

Отже, наявні доказові дані свідчать про те, що як ТШП, так і аналіз IGRA мають обмежене прогностичне значення, а їхня корисність обмежується виявленням осіб, які потенційно можуть отримати користь від профілактичної терапії. Поточні та майбутні дослідження допоможуть визначити місце і роль аналізів на основі технології IGRA в клініко-лабораторному лікуванні ТБ, а також потенційно виявляти нові високопрогностичні біомаркери.

Існуючі доказові дані свідчать про те, що і ТШП, і IGRA є прийнятними, але недосконалими тестами, і що жоден з них не може точно диференціювати ЛТБІ та активну форму ТБ, відрізнити реактивацію від реінфекції або точно спрогнозувати розвиток від ЛТБІ до активного захворювання [19]. У рамках нещодавнього мета-аналізу [24], проведеного на підставі комбінованої вибірки, яка включала 26 680 осіб, і даних 15 лонгітюдних досліджень, було зроблено висновок, що ні аналіз IGRA, ні ТШП не дають точного прогнозу щодо ризиків розвитку активного ТБ, хоча використання аналізу IGRA в певних групах населення може зменшити кількість людей, щодо яких розглядають питання застосування хіміопрофілактики.

Загалом, наявні доказові дані свідчать про те, що цінність аналізу IGRA для прогнозування розвитку хвороби до активної форми ТБ є низькою і лише незначно (несуттєво) вищою, ніж при ТШП [19]. Існують також обмежені докази того, що конверсія IGRA, виявлена за допомогою багаторазового тестування, може мати більше прогностичне значення, ніж результати одного аналізу IGRA, оскільки вона може вказувати на нещодавнє інфікування [25]. Що стосується груп високого ризику (наприклад, ВІЛ-інфікованих осіб), то наразі немає даних, які б свідчили про те, що аналіз IGRA може краще спрогнозувати розвиток активного ТБ у цій групі, ніж ТШП [19,26].

Отже, наявні наразі докази свідчать про те, що як ТШП, так і метод IGRA мають обмежене прогностичне значення, а їхня корисність обмежується виявленням осіб, які потенційно можуть отримати користь від профілактичної терапії. Поточні та майбутні дослідження допоможуть визначити місце і роль IGRA в клініко-лабораторному лікуванні ТБ і потенційно виявити нові, високопрогностичні біомаркери.

3.3.4 Ефективність і відтворюваність IGRA

Нещодавно було проведено детальний аналіз характеристик (чутливість та специфічність) двох IGRA, доступних на ринку (QFT-G та T-SPOT) [19,27,28]. За відсутності золотого стандарту для оцінки характеристик використовуються сурогатні маркери. Специфічність обох тестів (>95%) не залежить від вакцинації БЦЖ і подібна до специфічності ТШП у невакцинованих людей; у популяціях, в яких проводять вакцинацію БЦЖ, специфічність ТШП є значно нижчою (60%). Існуючі доказові дані свідчать про те, що рівень чутливості T-SPOT є трохи вищим (~90%), ніж QFT-G (~80%), і зазвичай є нижчим у дітей та осіб з ослабленим імунітетом.

Аналізи на основі технології IGRA мають певні проблеми з відтворюваністю, а варіабельність може бути зумовлена природними джерелами (імуномодуляція та функціональність Т-клітин), виробничими проблемами, пре-аналітичними та аналітичними відхиленнями. Це може вимагати перегляду значень відсікання і введення граничних зон (особливо для QFT-G), що може допомогти покращити відтворюваність і діагностичне значення аналізів [19].

Процедура 1: Аналіз QuantiFERON-TB Gold та QuantiFERON-TB Gold PLUS

Тести QuantiFERON-TB Gold (QFT-G) і QuantiFERON-TB Gold PLUS (QFT-GP) виробництва Qiagen GmbH, Гільден, Німеччина[1].

Загальні принципи

Система QuantiFERON-TB Gold IT використовує пробірки для забору крові, які містять антигени, що представляють специфічні білки *M. tuberculosis* або контролі. Після забору крові (нульовий контроль, антиген туберкульозу і пробірка з мітогеном для QFT-G і нульовий контроль, дві пробірки з антигеном і пробірка з мітогеном для QFT-GP) пробірки інкубують при температурі 37°C ± 1°C протягом 16-24 годин. Після завершення інкубації пробірки центрифугують, відбирають плазму і вимірюють кількість виробленого ІФН-γ з допомогою методу ІФА. Результати для досліджуваних зразків наводяться в міжнародних одиницях (МО) відносно стандартної кривої, підготовленої шляхом тестування розведень вторинного стандарту, наданого виробником. Вплив гетерофільних антитіл мінімізується шляхом додавання нормальної мишачої сироватки до зеленого розчинника і з використанням фрагментів моноклональних антитіл F(ab')2 в якості антитіл для захоплення ІФН-γ, нанесених на лунки мікропланшету.

Вихідні епідеміологічні дані

Перед проведенням тесту QuantiFERON-TB Gold IT необхідно записати базові епідеміологічні дані пацієнта: ім'я, повну адресу, контактну інформацію, стать, рід занять, місце народження, час з моменту імміграції (за наявності), історію подорожей, історію вакцинації БЦЖ та ТШП, клінічні дані (прийом ліків, імуносупресія, втрата ваги, нічна пітливість, підвищена температура, кашель, аномалії на рентгенограмі органів грудної клітини (РГК), попереднє лікування/хіміопрофілактика туберкульозу, тощо). Вихідні дані повинні бути внесені до форми даних пацієнта, що додається до зразка (див. Розділ 3, Додаток 2).

Безпека

Слід бути обережними під час роботи з матеріалами людського походження. Усі зразки крові слід розглядати як потенційно інфекційні. Поводження зі зразками крові та компонентами аналізу, їх використання, зберігання та утилізація повинні відповідати процедурам, визначеним відповідними національними, державними або місцевими настановами чи правилами щодо біологічної небезпеки та біобезпеки. Необхідно використовувати захисні окуляри, рукавички та звичайний лабораторний захисний одяг. Слід постійно дотримуватися належних лабораторних процедур.

Матеріали, надані виробником

Набір для забору крові QFT-G включає:

- Нульовий контроль (пробірка з сірим ковпачком та білим кільцем);
- Антиген туберкульозу (пробірка з червоним ковпачком та білим кільцем);
- Контроль мітогену (пробірка з фіолетовим ковпачком та білим кільцем);
- Аналіз QFT-GP;
- Нульовий контроль (пробірка з сірим ковпачком та білим кільцем);
- Антиген ТБ 1 (пробірка з зеленим ковпачком та білим кільцем);
- Антиген туберкульозу 2 (пробірка з жовтим ковпачком та білим кільцем);
- Контроль мітогену (пробірка з фіолетовим ковпачком та білим кільцем);
- Компоненти ІФА;
- Смужки для мікропланшетів, вкриті моноклональними антитілами проти IFN-γ людини;
- Стандарт IFN-γ людини, ліофілізований (8 МО/мл при відновленні; містить рекомбінантний IFN-γ людини, бичачий казеїн, 0,01 % тимеросал з урахуванням співвідношення маса/об'єм);

[1] Опис лабораторних процедур ґрунтується на рекомендаціях виробника (Qiagen) та міжнародних правилах безпеки, контролю якості та управління лабораторією. З листком-вкладишем до упаковки тесту QuantiFERON-TB Gold можна ознайомитись за посиланням: https://www.quantiferon.com/products/quantiferon-tb-gold/package-inserts

- Зелений розчинник (містить бичачий казеїн, нормальну мишачу сироватку, 0,01% мас./об тимерозалу);
- Кон'югат, 100-кратна концентрація, ліофілізований (мишачий анти-людський IFN-γ HRP, містить 0,01% мас./об. тимерозалу);
- Промивний буфер, 20-кратна концентрація (pH 7,2, містить 0,01 % мас./об. тимерозалу);
- Розчин субстрату ферменту (містить H2O2, 3,3',5,5' тетраметилбензидин);
- Розчин для зупинки ферменту (містить 0,5M H2SO4).

Необхідні матеріали (не надаються)

- Інкубатор 37°C ± 1°C (з CO2 або без нього);
- Калібровані піпетки зі змінним об'ємом від 10 мкл до 1 000 мкл з одноразовими наконечниками;
- Калібровані багатоканальні піпетки на 50 мкл і 100 мкл з одноразовими наконечниками;
- Центрифуга, здатна центрифугувати пробірки з кров'ю принаймні до 3 000 RCF [відносне прискорення центрифуги] (Г);
- Шейкер для мікропланшетів зі швидкістю від 500 до 1 000 об/хв;
- Деіонізована або дистильована вода: 2 л;
- Пристрій для миття мікропланшетів (з міркувань безпеки рекомендується використовувати автоматичний пристрій для миття);
- Пристрій для зчитування даних мікропланшета з фільтром 450 нм і еталонним фільтром від 620 нм до 650 нм;
- Вортекс зі змінною швидкістю;
- Таймер;
- Циліндр вимірювальний: на 1 або 2 л;
- Резервуари для реагентів.

Зберігання

- Пробірки для забору крові: зберігайте пробірки для забору крові при температурі від 4°C до 25°C (від 40°F до 77°F).
- Реагенти для ІФА: зберігайте набір при температурі від 2°C до 8°C (36°F до 46°F). Завжди захищайте розчин ферментного субстрату від прямих сонячних променів.
- Відновлені та невикористані реагенти: відновлений стандарт набору можна зберігати до трьох місяців при температурі від 2°C до 8°C. Зверніть увагу на дату, коли було відновлено стандарт набору.
- Відновлений кон'югат (100-кратна концентрація) необхідно повернути на зберігання при температурі від 2°C до 8°C і використати протягом трьох місяців. Зверніть увагу на дату відновлення кон'югату 100-кратної концентрації.
- Кон'югат робочої концентрації необхідно використати протягом шести годин після приготування.
- Робочий буфер для промивання можна зберігати при кімнатній температурі до двох тижнів.

Методи

Відбір та обробка зразків

- Вміст пробірок слід ретельно перемішати з кров'ю. Інкубацію при температурі 37°C ± 1°C слід розпочати якомога швидше, але не пізніше ніж через 16 годин після забору зразка. Для досягнення найкращих результатів слід дотримуватися наступних процедур:
- Для кожної досліджуваної особи, візьміть 1 мл крові шляхом венепункції безпосередньо в кожну з пробірок для збору крові QuantiFERON-TB Gold IT. Якщо рівень крові в будь-якій пробірці не наближається до індикаторної лінії, рекомендується отримати ще один зразок крові. Недостатнє або надмірне заповнення пробірок поза межами діапазону - від 0,8 до 1,2 мл - може призвести до помилкових результатів. На висоті від 1 000 до 2 000 метрів слід використовувати високогірні пробірки (HA). Забір крові можна також здійснювати з допомогою шприца і переносити по 1 мл зразку в кожну з трьох пробірок, дотримуючись відповідних процедур безпеки. Крім того, кров можна збирати в одну загальну пробірку для збору крові, а потім переносити в пробірки QFT. Загальна пробірка для збору крові повинна містити лише літій-гепарин в якості антикоагулянту, інші антикоагулянти, такі як ЕДТК, можуть впливати на результати аналізу.
- Необхідно ретельно перемішати, щоб забезпечити повну інтеграцію вмісту пробірки в кров. Змішати вміст пробірок, енергійно струшуючи їх протягом п'яти секунд (10 разів).
- Промаркувати пробірки відповідним чином.
- До початку інкубації тримайте пробірки при кімнатній температурі (22°C ± 5°C). Не охолоджуйте і не заморожуйте зразки крові.
- Виконуйте конкретні завдання в межах встановленого часу.

Перший етап: Інкубація крові та забір плазми

- Якщо кров не було інкубовано одразу після забору, вміст пробірки потрібно буде повторно перемішати.
- Інкубувати пробірки потрібно у вертикальному положенні при температурі 37°C ± 1°C протягом від 16 до 24 годин. Інкубатор із CO2 або зволожувачем не потрібен.
- Після інкубації пробірки для забору крові можна тримати при температурі від 2°C до 27°C до трьох днів перед центрифугуванням.
- Після інкубації пробірки центрифугують протягом 15 хвилин при 2 000 - 3 000 RCF(г) [відносне прискорення центрифуги]. Якщо клітини не відокремлюються від плазми гелевою пробкою, пробірки слід повторно центрифугувати, на більш високій швидкості.
- Зразки плазми можна завантажувати безпосередньо з пробірок для забору крові в планшети для ІФА.

- Крім того, зразки плазми можна зберігати до проведення ІФА або в пробірках для центрифугування, або в контейнерах для зберігання плазми. Зразки плазми можна зберігати до 28 днів при температурі від 2°C до 8°C або при температурі нижче -20°C (бажано нижче -70°C) протягом тривалого періоду.

Другий етап: ІФА для визначення інтерферону-γ людини

- Перед використанням зразки плазми та реагенти, за винятком 100-кратного концентрату кон'югату, необхідно довести до кімнатної температури (22°C ± 5°C). Залишити щонайменше на 60 хвилин для врівноваження насиченості.
- На планшеті для ІФА слід розмістити щонайменше дві смужки для стандартів і достатню кількість смужок для кількості обстежуваних осіб. Видаліть непотрібні тест-смужки з рамки для ІФА, знову запечатайте в пакет з фольги і поверніть в холодильник для зберігання.
- Відновити стандарт набору для визначення людського інтерферону-γ, використовуючи деіонізовану чи дистильовану воду зазначеного об'єму (див. етикетку; концентрація 8,0 МО/мл). Використовуйте відновлений стандарт набору для отримання серії розведень з чотирма концентраціями ІФН-γ (4,0, 1,0, 0,25, 0 МО/мл). Зелений розчинник слугує нульовим стандартом.
- Відновити сухий 100-кратний концентрат кон'югату з використанням 0,3 мл деіонізованої або дистильованої води. Обережно перемішайте, щоб забезпечити повне розчинення. Кон'югат робочої концентрації готують шляхом розведення необхідної кількості відновленого 100-кратного концентрату кон'югату в зеленому розчиннику, як зазначено в інструкції з використання. Робочий кон'югат слід використати протягом шести годин після приготування.
- Перед проведенням аналізу ретельно перемішайте плазму.
- Додайте 50 мкл свіжоприготованого кон'югату робочої концентрації до кожної лунки ІФА.
- Додайте по 50 мкл зразків досліджуваної плазми у відповідні лунки. Додайте по 50 мкл стандартів 1-4. Стандарти слід аналізувати щонайменше у двох повторах (бажано в трьох).
- Ретельно перемішайте кон'югат і зразки/стандарти плазми за допомогою шейкера для мікропланшетів протягом однієї хвилини зі швидкістю 500-1000 об/хв.
- Накрийте кожну планшетку та інкубуйте при кімнатній температурі (22°C ± 5°C) протягом 120 ± 5 хвилин. Під час інкубації необхідно уникати потрапляння прямих сонячних променів на планшети. Відхилення від зазначеного температурного діапазону може призвести до помилкових результатів.
- Під час інкубації розведіть одну частину 20-кратного концентрату промивного буфера 19 частинами деіонізованої або дистильованої води і ретельно перемішайте. Промийте лунки, використовуючи 400 мкл промивного буфера робочої концентрації. Виконайте етап промивання щонайменше шість разів. З міркувань безпеки при роботі зі зразками плазми рекомендується використовувати автоматичний пристрій для промивання планшетів.
- Ретельне промивання є дуже важливим для виконання аналізу. У разі використання автоматизованого пристрою для промивання планшетів, до резервуару для стоків слід додати стандартний лабораторний дезінфікуючий засіб і дотримуватися встановлених процедур знезараження потенційно інфекційного матеріалу.
- Покладіть планшети лицьовою стороною вниз на абсорбуючий рушник, щоб видалити залишки промивного буфера. Додайте 100 мкл розчину ферментного субстрату в кожну лунку і перемішуйте протягом однієї хвилини зі швидкістю 500-1000 об/хв за допомогою шейкера для мікропланшетів.
- Накрийте кожен планшет кришкою та інкубуйте при кімнатній температурі (22°C ± 5°C) протягом 30 хвилин. Під час інкубації планшети необхідно убезпечити від потрапляння прямих сонячних променів.
- Після 30-хвилинної інкубації додайте 50 мкл розчину, що зупиняє ферменти, в кожну лунку і ретельно перемішайте. Розчин, що зупиняє ферменти, слід додавати в лунки в тому ж порядку і приблизно з тією ж швидкістю, що і субстрат, яке це визначено при реалізації кроку 11.
- Виміряйте оптичну щільність (OD) кожної лунки протягом п'яти хвилин після зупинки реакції за допомогою зчитувача мікропланшета, оснащеного фільтром 450 нм і еталонним фільтром від 620 нм до 650 нм. Значення оптичної щільності використовують для розрахунку результатів.

Інтерпретація результатів

Прогностичне значення результатів тесту QFT-GP залежить від поширеності інфікування *M. tuberculosis* в обстежуваній популяції. Кожен результат тесту QFT-G та його інтерпретацію слід розглядати в комплексі з іншими даними анамнезу, епідеміологічними, фізикальними та діагностичними даними. Величина виміряного рівня ІФН-γ не може корелювати зі стадією чи ступенем інфекції, рівнем імунної відповіді чи ймовірністю розвитку активної форми захворювання. Фактичні дані тесту не слід повідомляти. Результати аналізу QuantiFERON-TB Gold IT інтерпретуються з використанням наступних критеріїв (Таблиці 5 та 6).

Таблиця 5. Інтерпретація результатів тестевої системи QuantiFERON-TB Gold

Антиген ТБ мінус Nil (МО/мл)	Мінімальне значення (МО/мл)	Мітоген мінус Nil (МО/мл)	Результат QuantiFERON- TB Gold IT	Звіт / інтерпретація
<0.35 або ≥0.35 та <25% нульового значення	≤8.0	≥0.5	**Негативний**	Інфікування туберкульозом МАЛОймовірне
≥0.35 та ≥ 25% нульового значення	≤8.0	Будь-яке	**Позитивний**	Імовірність інфікування туберкульозом
<0.35 або ≥0.35 та <25% of нульового значення	≤8.0	<0.5	**Невизначений**	Результати не можна інтерпретувати як результат низької відповіді на мітоген
Будь-яке	>8.0	Будь-яке	**Невизначений**	Результати не можна інтерпретувати як результат високої фонової реакції

Таблиця 6. Інтерпретація результатів тесту QuantiFERON-TB Gold PLUS

Значення Nil (МО/мл)	ТБ1 мінус Nil або ТБ2 мінус нуль (МО/мл)	Контроль мітоген мінус Nil (МО/мл)*	Результат тесту QFT-Plus	Звіт / інтерпретація
≤8.0	≥0.35 та ≥ 25% значення Nil	Будь-яке	**Позитивний**	Ймовірна інфекція *M. tuberculosis*
≤8.0	<0.35	≥0.5	**Негативний**	Інфекція *M. tuberculosis* МАЛОймовірна
≤8.0	≥0.35 та <25% значення Nil	≥0.5	**Негативний**	Інфекція *M. tuberculosis* МАЛОймовірна
≤8.0	<0.35	<0.5	**Невизначений**	Результати щодо чутливості до антигену туберкульозу є невизначеними
≤8.0	≥0.35 та <25% значення Nil	<0.5	**Невизначений**	Результати щодо чутливості до антигену туберкульозу є невизначеними
>8.0	Будь-яке	Будь-яке	**Невизначений**	Результати щодо чутливості до антигену туберкульозу є невизначеними

Обмеження

- Діагноз ЛТБІ означає, що захворювання на туберкульоз має бути виключено шляхом медичного обстеження.
- Негативний результат слід розглядати в поєднанні з медичними даними та даними анамнезу особи, особливо для людей з ослабленою імунною функцією.
- Існують технічні фактори, пов'язані з невизначеними результатами:
  - Пройшло більше 16 годин від забору крові до інкубації при температурі 37°C ± 1°C;
  - Зберігати наповнені пробірки для забору крові за межами рекомендованого температурного діапазону (22°C ± 5°C) до інкубації при 37°C ± 1°C;
  - Недостатнє перемішування вмісту пробірок для забору крові; та
  - Неповне промивання планшета для проведення ІФА.

Якщо є підозра на наявність технічних проблем, пов'язаних із збором або обробкою зразків крові, весь тест QuantiFERON-TB Gold IT слід повторити. Будь ласка, зверніть увагу, що реакція на позитивний контроль мітогену (й іноді на ТБ-антиген) може виходити за межі діапазону зчитування мікропланшета. Це не впливає на результати тесту.

Контроль якості

Внутрішня оцінка якості (ВОЯ)

Точність тесту залежить від побудови точної стандартної кривої. Результати, отримані на основі стандартів, повинні бути досліджені до того, як можна буде інтерпретувати результати дослідження зразків. Кожна лабораторія повинна визначити відповідні типи контрольних матеріалів і частоту тестування згідно з місцевими, регіональними, національними або іншими відповідними акредитаційними організаціями (наприклад, частота позитивних результатів, частота невизначеності результатів).

Параметри контролю якості

- Середнє значення оптичної щільності для стандарту 1 має бути ≥ 0,600;
- Середнє значення оптичної щільності для нульового стандарту (зелений розчинник) має бути≤ 0,150;
- Коефіцієнт варіації (% CV) між повтореннями для стандартів 1 і 2 повинен бути ≤15%;
- Реплікативні значення оптичної щільності для стандартів 3 і 4 не повинні відрізнятися більш ніж на 0,040 одиниць оптичної щільності від їх середнього значення;
- Коефіцієнт кореляції (r), розрахований за середніми значеннями поглинання стандартів, повинен бути ≥ 0,98;
- Якщо вищевказані критерії не виконуються, то цикл вважається недійсним і його необхідно повторити.

Зовнішня оцінка якості (ЗОЯ)

Всебічне управління якістю, в тому числі внутрішня та зовнішня оцінка якості (ЗОЯ), є наріжним каменем лабораторної діагностики ТБ і має важливе значення для акредитації лабораторії. Національна служба зовнішньої оцінки якості Великобританії (UK NEQAS, www.ukneqas.org.uk) нещодавно розробила схему оцінки якості для тестів QuantiFERON-TB Gold, яка також доступна для клієнтів за межами Великобританії. Qiagen пропонує тест-панель QFT-G (кат. № 0594-0805), що складається з трьох наборів контролів гамма-інтерферону, виготовлених із рекомбінантного людського IFN-γ. Кожен набір складається з трьох індивідуальних контролів, що представляють різні рівні концентрації ІФН-γ (рівні 1, 2 і 3) в межах лінійного діапазону аналізів QuantiFERON. Розробляються нові схеми на основі попереднього досвіду [15,16], які необхідно якнайшвидше затвердити.

3.3.5 Процедура 2: процедура T-SPOT[2]

Загальні принципи

Спрощений метод дослідження T-SPOT (компанії Oxford Immunotec, Абінгдтон, Великобританія), на відміну від QuantiFERON-TB Gold, використовує метод імуноферментного аналізу (ELISPOT), заснований на підрахунку активованих специфічних Т-клітин, які реагують на стимуляцію специфічними антигенами (ESAT-6 і CFP10), що призводить до секреції IFN-γ. Стимуляція антигенами ESAT-6 та CFP10 відбувається в окремих лунках планшета мікротитрування.

Під час процедури мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК - PBMC) відокремлюються від зразка цільної крові і підраховуються, щоб в аналізі використовувалася стандартизована кількість клітин. МКПК інкубують з антигенами, щоб забезпечити стимуляцію всіх наявних сенсибілізованих Т-клітин; секретований гамма-інтерферон захоплюється специфічними антитілами на мембрані в основі лунки. Потім додається друге антитіло, кон'юговане з лужною фосфатазою і спрямоване на інший епітоп на молекулі (цитокіну) гамма-інтерферону, і воно зв'язується з цитокіном, захопленим на поверхні мембрани. Нарешті, в кожну лунку додають розчинний субстрат, який розщеплюється зв'язаним ферментом з утворенням плями нерозчинного осаду в місці реакції. Таким чином, кожна пляма являє собою слід окремої цитокін-секретуючої Т-клітини, а оцінка кількості отриманих плям дозволяє виміряти кількість чутливих до *M. tuberculosis* Т-клітин, що дають імунну відповідь у периферичній крові.

Вихідні епідеміологічні дані

Що стосується аналізу QuantiFERON-TB Gold, то для правильної клінічної інтерпретації результатів тесту необхідні вихідні епідеміологічні дані. Дані повинні включати ім'я та прізвище, повну адресу, контактну інформацію, стать, рід занять, місце народження, час з моменту імміграції (за наявності), історію подорожей, історію вакцинації БЦЖ та ТШП, відповідні клінічні дані (прийом ліків, імуносупресія, втрата ваги, нічна пітливість, підвищена температура, кашель, відхилення від норми показників РГК, попереднє лікування/хіміопрофілактика ТБ тощо). Вихідні дані необхідно записати у формі даних пацієнта, яка додається до зразка (див. Розділ 3, Додаток 2).

Безпека

Дана процедура з діагностики передбачає роботу зі зразками крові та плазми людини, які можуть бути заражені інфекціями, що передаються через кров, включаючи ВІЛ, гепатит В та гепатит С. Під час роботи зі зразками крові/плазми слід використовувати засоби захисту (рукавички, лабораторні халати, захисні окуляри або щитки). Процедури поводження зі зразками крові, їх зберігання та утилізації повинні відповідати національним, державним або місцевим настановам або правилам щодо біонебезпеки та безпеки. Перед впровадженням процедур слід провести оцінку ризиків, а також розробити та регулярно оновлювати стандартні операційні процедури.

---

[2] Опис лабораторних процедур ґрунтується на рекомендаціях виробника (компанія "Oxford Immunotec") та міжнародних правилах безпеки, контролю якості та управління лабораторією.

Листок-вкладиш до тестового набору Oxford Immunotec T-SPOT.TB96 можна знайти за посиланням: http://www.oxfordimmunotec.com/north-america/wp- content/uploads/sites/2/TG-TB-US-V5.pdf

Важливі примітки

- Аналіз T-SPOT передбачає культивування людських МКПК. Тому надзвичайно важливо використовувати асептичну техніку, щоб уникнути забруднення реагентів, лунок, клітинних культур і живильних середовищ;
- Для проведення аналізу кров необхідно доставити протягом восьми годин після забору. Цей час можна подовжити, використовуючи реагент T-cell Xtend [реагент представляє собою комплекс антитіл, який додають до зразків крові в лабораторії безпосередньо перед проведенням аналізу] (також доступний в компанії «Oxford Immunotec»). У цьому випадку час зберігання зразка перед аналізом збільшується до 32 годин. Тільки літій-гепаринові пробірки можна використовувати разом з реагентом T-cell Xtend;
- Розрахунки для розведення кон'югату, підрахунку клітин тощо надаються на компакт-диску, який поставляють разом з наборами.

Матеріали

Виробник надає матеріали разом з тестовим набором (таблиця 7).

Таблиця 7. Надані виробником матеріали

	Тестовий набір T-SPOT TB 96	Тестовий набір T-SPOT TB 8
1	Один планшет для мікротитрування: на 96 лунок, покритих мишачим моноклональним антитілом до IFN-γ.	Один мікротитрований планшет: 96 лунок, поставляється у вигляді смужок у рамці розміром 12 x 8 лунок, покритих мишачим моноклональним антитілом до IFN-γ
2	Два флакони (0,7 мл кожен) Панель A: містить антигени ESAT-6	Два флакони (0,8 мл кожен) Панель A: містить антигени ESAT-6
3	Два флакони (0,7 мл кожен) Панель B: містить антигени CFP10	Два флакони (0,8 мл кожен) Панель B: містить антигени CFP10
4	Два флакони (0,7 мл кожен) Позитивний контроль: містить фітогемагглютинін (PHA)	Два флакони (0,8 мл кожен) Позитивний контроль: містить фітогемагглютинін (PHA)
5	Один флакон (50 мкл) 200-кратно концентрованого реагенту кон'югату: мишаче моноклональне антитіло до ІФН-γ, кон'юговане з лужною фосфатазою.	Один флакон (50 мкл) 200-кратно концентрованого реагенту кон'югату: мишаче моноклональне антитіло до ІФН-γ, кон'юговане з лужною фосфатазою
6	Один флакон (25 мл) розчину субстрату: готовий до використання розчин BCIP (5-бромо-4-хлоро-3-індолфосфатаза)/NBT (нітросиній тетразолій)(плюс)	Один флакон (25 мл) розчину субстрату: готовий до використання розчин (5-бромо-4-хлоро-3-індолфосфатаза)/NBT (нітросиній тетразолій)(плюс)

Усі реагенти, окрім кон'югату, постачаються готовими до використання. Кон'югат слід розвести з PBS (мазки периферичної крові) у співвідношенні 1:200 безпосередньо перед використанням (50 мкл розчину робочої концентрації на лунку).

Обладнання та матеріали, які необхідні, але не надаються разом з наборами:

- Мікробіологічна шафа II класу (рекомендується дотримуватися асептичної техніки);
- Центрифуга для підготовки МКПК (здатна працювати принаймні зі швидкістю 1800 x г і підтримувати зразки при кімнатній температурі (18-25°C));
- Гемоцитометр;
- Інвертований мікроскоп (наприклад, Wilovert S, Wetzlar, Німеччина);
- Інкубатор з контролем вологості з температурою 37 ± 1°C і подачею 5% CO2;
- Пристрій для промивання планшетів для мікротитрування або обладнання для ручного миття планшетів (наприклад, багатоканальна піпетка);
- Піпетки та стерильні наконечники для піпеток;
- Прилади для зчитування даних з планшетів: Мікроскоп, або цифровий мікроскоп, або лупа, чи планшетний пристрій для візуалізації даних (наприклад, ELR02, Autoimmun Diagnostika GmbH, Німеччина).

Витратні матеріали:

- Стерильні наконечники для піпеток;
- Пробірки для забору крові з гепарином або цитратом натрію (наприклад, Vacutainer CPT). НЕ рекомендовано використовувати пробірки з ЕДТК.

Реагенти:

- Готове до використання стерильне живильне середовище для високопродуктивної ізоляції лімфоцитів людини з периферичної крові (Ficoll-Paque* PLUS) або альтернативні матеріали для розділення МКПК;
- Барвник трипановий синій (доступний в компанії «Sigma», номер в каталозі - T8154);
- Фосфатно-сольовий буфер або PBS розчин, доступний від Invitrogen як «Фосфатно-сольовий буфер Дульбекко (DPBS) компанії GIBCO (GIBCO Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) (1x)», номер у каталозі -14040-091). Не використовуйте фосфато-сольовий розчин, що містить Tween (неіонну миючу добавку)
- Дистильована або деіонізована вода;
- Стерильне живильне середовище, що не містить сироватки для культивування клітин, наприклад, GIBCO AIM V (Invitrogen; номер у каталозі - 31035-025) (для інкубації);
- Стерильне живильне середовище для культивування клітин RPMI 1640 (Invitrogen; номер у каталозі - 21875-034) (для початкової підготовки клітин та розведення клітинної суспензії).

Відбір зразків

Забір крові слід здійснювати наступним чином:

- Дорослі та діти віком від 10 років: одна на 8 мл або дві на 4 мл пробірки CPT або одна пробірка на 6 мл з літієвим гепарином.
- Діти віком від 2 до 9 років: одна пробірка CPT на 4 мл або пробірка з літієвим гепарином.
- Діти віком до двох років: одна дитяча пробірка, 2 мл.
- Після забору кров слід зберігати при кімнатній температурі (без охолодження або заморожування) та провести аналіз протягом восьми годин. Цей термін можна подовжити до 32 годин, якщо використовувати реагент T-Cell Xtend. Реагент T-Cell Xtend слід додавати перед виділенням МКПК за допомогою стандартних методів розділення. Зразки цільної крові слід зберігати при кімнатній температурі (18-25°C) протягом 23-30 годин після венепункції з використанням реагенту T-Cell Xtend.
- Якщо потрібно використовувати реагент T-Cell Xtend, безпосередньо перед сепарацією клітин - зніміть кришку з пробірки для забору крові і додайте 25 мкл розчину реагенту T-Cell Xtend на мл зразка крові.
- Знову закрийте пробірку кришкою та обережно перевертайте пробірку для забору крові 8-10 разів, щоб перемішати вміст. Інкубуйте протягом 20 ± 5 хвилин при кімнатній температурі (18-25°C), а потім перейдіть до виділення шару МКПК, використовуючи центрифугування за методом Фіколла.

Підготовка зразків

Початкові етапи підготовки зразка залежать від того, чи використовувалися для забору крові пробірки Vacutainer CPT або звичайні пробірки з літій-гепарином або цитратом натрію. Зверніть увагу, що реагент T-Cell Xtend НЕ сумісний з пробірками CPT. Пробірки Leucosep тепер валідовані для використання під час проведення аналізу T-SPOT.TB, а також можуть використовуватися з T-Cell Xtend, спрощуючи підготовку мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC) за методом Фіколла. Пробірка Leucosep усуває трудомісткий і кропіткий процес внесення матеріалу зразка до стерильного живильного середовища для ізоляції МКПК FICOLL-PAQUE PLUS, що займає багато часу. Детальніше ознайомитися з процедурою підготовки зразків з використанням T-Cell Xtend ви можете в Технічному посібнику «T-SPOT TB» за посиланням: http://www.oxfordimmunotec.com/international/wp-content/uploads/sites/3/TG-TB-UK-V4.pdf.

Пробірки CPT (з гелевою пробкою)

- Центрифугуйте пробірки CPT об'ємом 8 мл при 1600 x г протягом 28 хвилин або пробірки CPT об'ємом 4 мл при 1800 x г протягом 30 хвилин при температурі 18°C, якщо є центрифуга з охолодженням. Якщо використовується центрифуга без охолодження, переконайтеся, що температура не перевищує 25°C;
- Зберіть білу каламутну смугу МКПК за допомогою піпетки і перенесіть її в конічну пробірку для центрифуги об'ємом 15 мл. Доведіть об'єм до 10 мл, використавши середовище для культивування клітин AIM V або RPMI 1640.

Пробірки з гепарином літію/цитратом натрію

- Розведіть кров рівним об'ємом середовища RPMI 1640. Обережно нанесіть розведену кров (2-3 об'єми) на Ficoll-Paque PLUS (1 об'єм) і центрифугуйте при швидкості 1 000 x г протягом 22 хвилин, підтримуючи температуру від 18 до 25°C.
- Зберіть білу каламутну смугу МКПК за допомогою піпетки і перенесіть у конічну центрифужну пробірку об'ємом 15 мл. Доведіть об'єм до 10 мл, використавши середовище для культивування клітин AIM V або RPMI 1640.
- Центрифугуйте при 600 x г протягом семи хвилин. Злийте надосадову рідину та повторно суспендуйте осад в 1 мл середовища AIM V або RPMI.
- Доведіть об'єм до 10 мл, використавши свіже середовище AIM V або RPMI, та центрифугуйте за відносної сили центрифугування в 350 г протягом семи хвилин.
- Злийте надосадову рідину та ресуспендуйте осад в 0,7 мл живильного середовища AIM V.

Підрахунок клітин і розведення

- Для аналізу T-SPOT.TB потрібно 2,5 x 105 життєздатних МКПК на лунку. Для кожного зразка пацієнта загалом потрібно чотири лунки. До кожної лунки слід додати правильну кількість клітин. Невиконання цієї вимоги може призвести до неправильної інтерпретації результату. Необхідно переконатися, що клітинну суспензію було ретельно перемішано безпосередньо перед відбором аліквот для розведення чи здійснення підрахунку.
- Для ручного методу підрахунку на гемоцитометрі Neubauer додайте 10 мкл кінцевої суспензії клітин до 40 мкл 0,4% (маса/об'єм) розчину трипанового синього. Помістіть відповідну аліквоту на гемоцитометр і підрахуйте клітини в сітці. Для інших типів гемоцитометрів та автоматизованих приладів дотримуйтесь інструкцій виробника.
- Розрахуйте концентрацію життєздатних клітин, присутніх у вихідній клітинній суспензії. Калькулятор розведення клітин T-SPOT додається до кожного набору на компакт-диску, що полегшить цей розрахунок.
- Приготуйте 500 мкл кінцевої клітинної суспензії з концентрацією 2,5 x 105 клітин/100 мкл. Переконайтеся, що клітини ретельно перемішані, перш ніж відбирати аліквоту для розведення.

Встановлення планшетів та інкубація

Для аналізу T-SPOT.TB потрібно використовувати чотири лунки для кожного зразка пацієнта. Нульовий контроль та позитивний контроль функціональності клітин мають бути проведені з кожним окремим зразком. Рекомендується розташовувати зразки на планшеті вертикально, як показано нижче:

◯ Нульова контрольна лунка

◯ Панель A

◯ Панель B

◯ Позитивна контрольна лунка

- Вийміть попередньо покритий мікротитрований планшет з упаковки і дайте йому стабілізуватися до кімнатної температури. Мікропланшет забезпечений захисною пластиковою основою. Її не слід знімати на жодному етапі процедури.
- Для кожного зразка пацієнта необхідно використовувати чотири окремі лунки, як показано нижче. (Не допускайте, щоб кінчик піпетки торкався мембрани. Поглиблення в мембрані, спричинені наконечниками піпеток, можуть призвести до появи артефактів у лунках).
  - Додайте 50 мкл живильного середовища AIM V для вирощування культур в кожну нульову контрольну лунку.
  - Додайте 50 мкл розчину в кожну необхідну лунку Панелі A.
  - Додайте 50 мкл розчину в кожну необхідну лунку Панелі B.
  - Додайте 50 мкл розчину позитивного контролю в кожну лунку позитивного контролю.
- У кожну з чотирьох лунок, які будуть використовуватися для зразка пацієнта, додайте по 100 мкл остаточної клітинної суспензії пацієнта (що містить 250 000 життєздатних клітин).
- Інкубуйте планшет в інкубаторі з контролем вологості при температурі 37°C з 5% CO_2 протягом 16-20 годин..

Формування плям та підрахунок

- Вийміть планшет з інкубатора і видаліть середовище для вирощування культури клітин. Вийміть розчин субстрату з набору і дайте йому стабілізуватися до кімнатної температури.
- Додайте 200 мкл розчину PBS до кожної лунки.
- Видаліть розчин PBS. Повторіть процедуру промивання лунок ще три рази зі свіжим розчином PBS для кожного промивання. Видаліть весь розчин PBS з останнього етапу промивання, перевернувши планшет і поклавши його на абсорбуючий папір перед тим, як продовжити.
- Розведіть концентрований кон'югатний реагент у розчині PBS у співвідношенні 1:200, щоб отримати розчин робочої концентрації.
- Додайте 50 мкл розчину кон'югату робочої концентрації в кожну лунку і інкубуйте при температурі 2-8°C протягом однієї години.
- Видаліть кон'югат і виконайте чотири промивання у розчині PBS, як описано в кроках 2 і 3 вище.
- Додайте 50 мкл розчину субстрату до кожної лунки та інкубуйте при кімнатній температурі протягом семи хвилин.
- Ретельно промийте планшет дистильованою або деіонізованою водою, щоб зупинити реакцію виявлення. Дайте планшету висохнути, помістивши його в добре провітрюваному приміщенні чи в сушильну шафу при температурі до 37°C (плями стають більш помітними в міру висихання). Залиште на чотири години при температурі 37°C або на ніч при кімнатній температурі.
- Підрахуйте і запишіть кількість чітких темно-синіх плям на мембрані кожної лунки. Використовуйте лупу, відповідний мікроскоп або пристрій для зчитування планшетів ELISPOT.
- Застосуйте критерії інтерпретації результатів та аналізу (див. нижче), щоб визначити, чи є зразок пацієнта «позитивним» або «негативним» до ТБ-антигенів.

Зчитування та інтерпретація результатів

Результати T-SPOT.TB інтерпретуються шляхом віднімання кількості плям у нульовій контрольній лунці від кількості плям на кожній з панелей відповідно до наступного алгоритму:

- Результат тесту є «позитивним», якщо (панель A мінус нульовий контроль) та/або (панель B мінус нульовий контроль) є ≥ 6 плям, ТА кількість нульового контролю становить <10 плям;
- Результат тесту є «негативним», якщо і (панель A мінус нульовий контроль), і (панель B мінус нульовий контроль) налічується ≤ 5 плям (сюди входять значення, менші за нуль), ТА нульовий контроль налічує <10 плям, ТА позитивний контроль налічує >20 плям (або показує насиченість);
- Результат тесту є «невизначеним», якщо:
  - нульовий контроль налічує >10 плям, незалежно від кількості плям на панелі A та панелі Б; або
  - позитивний контролю налічує <20 плям, якщо і (панель A мінус нульовий контроль), і (панель B мінус нульовий контроль)
  - ≤ 5 плям.

Через потенційні біологічні та систематичні варіації, коли найбільша кількість плям на панелі A мінус нульовий контроль та панелі B мінус нульовий контроль становить п'ять, шість або сім плям, результат може розглядатися як пограничний (неоднозначний). Пограничні (неоднозначні) результати, хоча і є достовірними, але є менш надійними, ніж результати, де кількість плям знаходиться далі від порогового значення. Тому рекомендується провести повторне тестування пацієнта з використанням нового зразка. Якщо при повторному тестуванні результат все ще має граничне значення (неоднозначний результат), слід використовувати інші діагностичні тести та/або епідеміологічну інформацію для визначення статусу інфікування ТБ у пацієнта.

Підготовка звіту

Виробник рекомендує використовувати наступні формулювання під час підготовки лабораторних звітів:

- «Позитивний» результат вказує на те, що зразок містить ефекторні Т-клітини, які реагують на *M. tuberculosis*.
- «Негативний» результат вказує на те, що зразок, ймовірно, не містить ефекторних Т-клітин, що реагують на *M. tuberculosis*.

Контроль якості

Внутрішня оцінка якості (ВОЯ)

Кожна лабораторія повинна визначити, розробити та впровадити відповідні засоби внутрішнього забезпечення та контролю якості згідно з місцевими та державними нормами. Це може включати:

- регулярне сліпе повторне тестування зразків;
- ведення записів про дати, коли були відкриті та повністю використані набори, номери партій наборів;
- листи показників температури холодильника та морозильної камери.

Зовнішня оцінка якості (ЗОЯ)

Наразі не існує офіційних схем зовнішньої оцінки якості для тестів T-SPOT на ТБ. Вони повинні бути розроблені та впроваджені якнайшвидше, виходячи з попереднього досвіду.

Список літератури

1. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. Lancet Infect Dis. 2003 Sep;3(9):578-90.
2. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA. 1999 Aug 18;282(7):677-86.
3. Styblo K. The relationship between the risk of tuberculosis infection and the risk of developing infectious tuberculosis. Bull Int Union Tuber. 1985;60:117-9.
4. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol. 2001;19(1):93-129.
5. World Health Organization (WHO). The Stop TB Strategy: Building on and enhancing DOTS to meet the TB- related Millennium Development Goals. Geneva: WHO; 2006. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69241/WHO_HTM_STB_2006.368_eng.pdf
6. Lee E, Holzman RS. Evolution and current use of the tuberculin test. Clin Infect Dis. 2002 Feb 1;34(3):365-70.
7. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG. Infect Immun. 1996 Jan;64(1):16-22.
8. Behr MA. Comparative genomics of BCG vaccines. Tuberculosis (Edinb). 2001;81(1-2):165-8.
9. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet. 2000 Sep 23;356(9235):1099-104.
10. Andersen P, Doherty TM, Pai M, Weldingh K. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? Trends Mol Med. 2007 May;13(5):175-82.
11. Pai M. Guidelines on IGRAs: Concordant or discordant? 2nd Global Symposium on IGRAs, May 30–June 1, 2009. Dubrovnik, Croatia.
12. Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. New diagnostic methods for tuberculosis. Curr Opin Infect Dis. 2009 Apr;22(2):174-82.
13. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A. Guidelines for using the QuantiFERON- TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. MMWR Recomm Rep. 2005 Dec 16;54(RR-15):49-55. Erratum in: MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2005 Dec 23;54(50):1288.
14. National Collaborating Centre for Clinical Conditions. Royal College of Physicians. Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. London: Royal College of Physicians; 2006. Available at: https://www.nice.org.uk/guidance/cg117/documents/tuberculosis- interferon-gamma-tests-update-partial- update2
15. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. Clin Chem. 1981 Mar;27(3):493-501.
16. Hang NT, Ishizuka N, Keicho N, Hong LT, Tam DB, Thu VT, et al. Quality assessment of an interferon-gamma release assay for tuberculosis infection in a resource-limited setting. BMC Infect Dis. 2009 May 18;9:66.
17. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? Nat Rev Immunol. 2001 Oct;1(1):20-30.
18. Denkinger CM, Dheda K, Pai M. Guidelines on interferon-γ release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or confusion? Clin Microbiol Infect. 2011 Jun;17(6):806-14.
19. Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka MX, Zwerling A, Oxlade O, et al. Gamma interferon release assays for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. Clin Microbiol Rev. 2014 Jan;27(1):3-20.
20. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Use of interferon-gamma release assays in support of TB diagnosis. Stockholm: ECDC; 2011. Available at: https://ecdc.europa.eu/publications- data/public- health-guidance-use-interferon-gamma-release-assays-support-tb-diagnosis
21. World Health Organization (WHO). Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings. Geneva: WHO; 2011. Available at: http://www.who.int/hiv/pub/tb/9789241500708
22. World Health Organization (WHO). Use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRAs) in low-and middle-income countries: policy statement. Geneva: WHO; 2011. Available at: http://www.who.int/tb/publications/tb-igras-statement
23. World Health Organization (WHO). Guidelines on the management of latent tuberculosis infection. Geneva: WHO; 2015. Available at: http://www.who.int/tb/publications/latent-tuberculosis-infection
24. Rangaka MX, Wilkinson KA, Glynn JR, Ling D, Menzies D, Mwansa-Kambafwile J.. Predictive value of interferon-gamma release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect. Dis. 2012;12:45–55.
25. Machingaidze S, Verver S, Mulenga H, Abrahams DA, Hatherill M, Hanekom W, et al. Predictive value of recent QuantiFERON conversion for tuberculosis disease in adolescents. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2012;186:1051–1056.

26. Kim YJ, Kim SI, Kim YR, Wie SH, Park YJ, Kang MW.. Predictive value of interferon-gamma ELISPOT assayin HIV 1-infected patients in an intermediate tuberculosis-endemic area. AIDS Res. Hum. Retroviruses 2012; 28:1038–1043.
27. Cattamanchi A, Smith R, Steingart KR, Metcalfe JZ, Date A, Coleman C, Marston BJ, Huang L, Hopewell PC, Pai M. Interferongamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected individuals—a systematic review and meta-analysis. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 2011;56:230–238.
28. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Predictive value of interferon-gamma release assays and tuberculin skin testing for progression from latent TB infection to disease state: a meta-analysis. Chest 2012;142:63–75.

Annex 2. Інформаційний листок пацієнта

Контактні дані відправника імя, лабораторія/лікаря, поштова адреса, номер телефону, факс

Для лабораторного використання

Номер пацієнта

Дата отримання

Час отримання

Дата тесту

Прохання обвести кружком/підкреслити/проставити галочку, позначивши таким чином відповідну(і) відповідь(і). Будь ласка, не залишайте жодного поля порожнім. Якщо відповідь потребує додаткової інформації, прохання зазначити її.
Будь ласка, пам'ятайте, що повні відповіді є важливими для правильної інтерпретації результатів тесту.

Вихідні епідеміологічні дані

Ім'я пацієнта

Прізвище пацієнта

Дата народження

Чол._____Жін._____

Поштовий індекс

Рід занять

Чи народився пацієнт за кордоном? Так _____ Ні _____ Народився: _____
Якщо ні, то коли пацієнт прибув до _____(країни)? _____(рік)

Чи проживав пацієнт, або перебував більше двох місяців, подорожуючи в іншій країні?
Так _____Ні_____ Не знаю_____

Історія вакцинації БЦЖ та шкірних проб на туберкульоз

Чи отримував пацієнт коли-небудь щеплення БЦЖ? Так_____Ні_____Не знаю_____

Якщо так, вкажіть в якому віці:
БЦЖ рубець: Так _____Ні _____

Проведено шкірний тест на туберкульоз (ТШП)? Так_____Ні_____Не знаю____Показник _____мм

Клінічні дані

Чи приймає пацієнт якісь із наведених нижче препаратів?

____Пероральні стероїди
____Цитотоксичні препарати
____Інші імуносупресивні препарати (будь ласка, вкажіть)
____Нічого з перерахованого вище

Чи має пацієнт ослаблений імунітет? Так_____Ні_____Не знаю _____

Чи є пацієнт ВІЛ-позитивним? Так _____Ні _____Не знаю _____

Чи є у пацієнта захворювання на цукровий діабет? Так___Ні_____Не знаю _____

Чи є у пацієнта щось із наведеного нижче:
____Висока температура
____Нічна пітливість
____Втрата ваги
____Кашель

Чи є відхилення від норми на РГК пацієнта? Так_____Ні_____.

Якщо так, будь ласка, вкажіть локалізацію такого відхилення від норми:

	R	L
Верхня частина		
Середня частина		
Нижня частина		

Порожнини? Так_____Ні_____Невідомо _____

Консолідація? Так_____Ні_____Невідомо_____. Односторонній/двосторонній?

Інші важливі клінічні дані:

4 Мікроскопія мазків

Автори: Susana David, Vera Katalinić-Janković, Daniela Cirillo

Рецензенти: Emanuele Borroni та Enrico Tortoli (2015 р.)

4.1 Передумови та принципи

Рання лабораторна діагностика ТБ все ще базується на дослідженні методом фарбування мазків. Для універсального застосування в країнах з обмеженими ресурсами мікроскопія пофарбованих мазків мокротиння є найкращим вибором серед методів діагностики 7, 12]. Цей метод базується на тому, що клітинна стінка мікобактерій роду *Mycobacterium* багата на складні ліпіди, які перешкоджають доступу звичайних анілінових барвників, але при фарбуванні карбол-фуксином або флуорохромами в спеціальних умовах фарбування, їх нелегко знебарвити навіть з допомогою спиртово-кислотних розчинів. Через таку характеристику всі представники роду *Mycobacterium*, а не лише мікобактерії туберкульозу, називаються кислотостійкими бактеріями (КСБ).

Наразі для виявлення мікобактерій у клінічних зразках використовують два типи кислотостійкого фарбування:

- фарбування карбол-фуксином (метод Ціля-Нільсена [ЦН] та його модифікація, яке виконується без нагрівання барвника [холодне фарбування Кінюна]); та
- фарбування флуорохромом (аурамін або аурамін-родамін).

Фарбування методом Кінюна (Kinyoun) - це модифікація класичного фарбування за Цілем-Нільсеном (ЦН), яка виключає етап нагрівання під час процедури фарбування та використовує вищу концентрацію карбол-фуксину. Мікобактерії, профарбовані за Цілем-Нільсеном і методом Кінюна, мають вигляд червоних паличок. Фарбування за методом Кінюна не є настільки ефективним, як метод ЦН, тому ця процедура не рекомендується [6].

Методи із застосуванням флуорохрому використовуються для фарбування кислотостійких бактерій протягом багатьох років. За допомогою цього методу мікобактерії проявляються у вигляді яскравих флуоресцентних паличок на темному фоні. Флуорохромне фарбування має підвищену чутливість і потребує менше часу для перегляду предметних скелець порівняно з фарбуванням за Кінюном або за ЦН, оскільки предметні скельця можна переглядати при меншому збільшенні [6].

Мікроскопія мазка є простим, недорогим та ефективним методом виявлення тих випадків легеневого ТБ, які є найбільш заразними. Оскільки результат дослідження значною мірою залежить від його виконання, якість мікроскопії мазка має вирішальне значення в боротьбі з ТБ в умовах обмежених ресурсів [6,7].

Основним обмеженням мікроскопії мазка є його низька чутливість (25-75% порівняно з посівом культури) і велика кількість бактерій, необхідної для отримання позитивного результату (в межах 5 x 103-104 бактерій на мл). На чутливість і позитивне прогностичне значення (ППЗ) мікроскопії мазка впливають численні фактори [7,12,13], такі як поширеність і тяжкість захворювання, тип і якість зразка, кількість мікобактерій у зразку та якість підготовки мазка, фарбування і процес зчитування. Мікроскопія мазка не дозволяє ідентифікувати вид мікобактерій, а також не дає уявлення про життєздатність мікобактерій у зразку. Пацієнти з ко-інфекцією ВІЛ/ТБ можуть мати дисеміновану малобактеріальну форму туберкульозу з меншою кількістю КСБ. Мікроскопія мазка часто дає негативний результат або може вимагати проведення ретельнішого скринінгу для виявлення меншої кількості КСБ.

4.2 Процедура 1: Метод Ціля-Нільсена (ЦН)

Кожну партію приготованого реагенту необхідно зареєструвати в робочому журналі приготування реагенту, який включає: підпис лаборанта, який його приготував, дату приготування та результати тестування контролю якості [2,6].

4.2.1 Приготування реагентів для мікроскопії за методом Ціля-Нільсена (ЦН)

Для виявлення КСБ необхідні якісні реагенти для фарбування, виготовлені з використанням високоякісного барвника карбол-фуксину [6]. Слід запобігати забрудненню реагентів мікобактеріями з навколишнього середовища шляхом використання свіжої дистильованої води.

Стандартні реагенти:

- Основний порошок фуксину
- Кристали фенолу (кристали повинні бути майже безбарвними)
- Спирт (денатурований 95% етанол)
- Вода (дистильована або очищена).

Розчин для знебарвлення:

- Концентрована сірчана кислота (≥95%)
- Вода (дистильована або очищена) або
- Соляна кислота (37%)
- Спирт (денатурований 95% етанол).

Розчин для контрастного забарвлення:

- Порошок метиленового синього
- Вода (дистильована або очищена).

A. Карбол-фуксиновий (КФ) реагент

Якість основного фуксину різниться між виробниками, залежно від його чистоти та розчинності. Вміст основного фуксину повинен становити 85-88% від ваги. Якщо відома чистота карбол-фуксину, її слід використовувати для розрахунку кінцевої концентрації барвника 0,3%. Щоб розрахувати необхідну кількість основного фуксину, розділіть фактичну кількість на вміст барвника. Наприклад, якщо вміст барвника становить 75%, ви повинні розділити кількість на 0,75. Таким чином, для 0,3% плями буде зважено 3 г/0,75 = 4 грами. Якщо використовується порошок із вмістом барвника >85%, не потрібно розраховувати коефіцієнт поправки. Якщо чистота барвника невідома, або якщо основний фуксин погано розчиняється, чи осад залишається видимим після фільтрації, тоді під час приготування реагенту для фарбування доцільно використовувати вищу концентрацію (1%).

0,3% Карбол-фуксин	
Основний фуксин	3.0 г
95% етанол	100 мл
Кристали фенолу	50 г
Дистильована вода	900 мл

- Окремо зважте 3,0 г основного порошку фуксину та 50 г кристалів фенолу.
- До конічної колби об'ємом 1 л додайте 100 мл спирту (денатурованого етанолу).
- Додайте 50 г фенолу і та перемішайте вміст колби обертовими рухами (вниз та вгору) до повного розчинення вмісту.
- Додайте 3,0 г основного порошку фуксину і продовжуйте добре перемішувати до повного розчинення порошку фуксину.

Перевірте, чи не залишилося на дні порошку або кристалів. Якщо вони є, продовжуйте перемішувати при слабкому нагріванні. Тільки після того, як фуксин повністю розчиниться, додайте 850 мл води і перемішайте вміст обертовими рухами.

Якщо видно осад, карбол-фуксин слід відфільтрувати. Під час процесу фарбування карбол-фуксин слід відфільтрувати ще раз, використовуючи лійку з фільтрувальним папером (або поклавши шматочок фільтрувального паперу безпосередньо на предметне скло). Інші реагенти для фарбування фільтрувати не потрібно. Якщо в розчині карбол-фуксину виявлено будь-які частинки, розчин необхідно повторно відфільтрувати.

B. Знебарвлюючий розчин

25% сірчана кислота	
Концентрована сірчана кислота	250 мл
Дистильована вода	750 мл

- У конічну колбу об'ємом 2 л додайте 750 мл дистильованої води.
- Відміряйте 250 мл концентрованої сульфатної кислоти в циліндр.
- Повільно вливайте її в колбу з водою, обережно спрямовуючи потік кислоти вздовж внутрішньої сторони колби. **Завжди повільно додавайте кислоту до води, а не навпаки**.
- Добре перемішайте вміст колби з допомогою обертових рухів (вниз та вгору).

3% етанол HCl	
Концентрована соляна кислота	30 мл
95% етанол	970 мл

- У конічну колбу об'ємом 2 л додайте 970 мл 95 % етанолу.
- Відміряйте 30 мл концентрованої соляної кислоти в циліндр.
- Повільно влийте її в колбу зі спиртом, спрямовуючи потік кислоти обережно вздовж внутрішньої сторони колби з постійним перемішуванням. **Завжди повільно додавайте кислоту до спирту, а не навпаки**.
- Добре перемішайте обертовими рухами.

C. Контрастне фарбування

Метиленовий синій розчин/ Хлорид метиленового синього	**3.0 g**
Дистильована вода	1 000 мл

- Зважити 3 г порошку метиленового синього.
- Додайте порошок до 0,5 л чистої води в конічній колбі.
- Змішайте вміст колби обертовими рухами, щоб барвник розчинився.
- Додайте 0,5 л води і знову перемішайте.

4.2.2 Зберігання реагентів

Колби зі свіжоприготовленими реагентами слід закривати до виконання процедур контролю якості та оцінки результатів [7]. Розчини слід зберігати в чистих пляшках коричневого кольору та чітко маркувати. На етикетці необхідно зазначити назву реагенту, концентрацію та дату приготування. Реагенти, що зберігаються в щільно закритих пляшках, можна використовувати до одного року. Пляшки слід тримати подалі від прямих сонячних променів. Якщо використовуються прозорі пляшки, запаси реагентів слід зберігати в закритій шафі.

4.2.3 Контроль якості свіжоприготованих реагентів для фарбування

Після приготування реагентів для фарбування слід проводити контроль якості кожної партії [7,14]. Контроль якості має важливе значення для забезпечення ефективності реагентів для фарбування та повної відсутності забруднення КСБ.

Результати контролю якості слід реєструвати в журналі, при цьому на етикетках флаконів слід вказати кожну партію, чітко зазначивши назву реагенту та дату приготування. Проводьте контроль якості, використовуючи один або декілька свіжоприготованих реагентів для фарбування, виконуючи звичайну процедуру фарбування, як описано для позитивних контролів. Перевіряйте ефективність карбол-фуксину, пофарбувавши і дослідивши два мізерні або 1+ мазки, пофарбовані один раз, і два негативні мазки, пофарбовані тричі [2].

4.3 Процедура 2: Метод фарбування флуорохромами

4.3.1 Контроль якості свіжоприготованих реагентів для фарбування

A. Флуорохромні реагенти

Аурамін О (розчин 1)	
Аурамін	0.1 г
95% етанол	10 мл

Фенол (розчин 2)	
Кристали фенолу	3.0 г
Дистильована вода	87 мл

Розчиніть кристали фенолу у воді.

Змішайте розчини 1 і 2 та зберігайте в щільно закритій пляшці темного кольору, подалі від тепла і світла. Наклеїти на пляшку етикетку, зазначивши на ній назву реагенту, дату приготування та термін придатності. Зберігати при кімнатній температурі протягом трьох місяців. Під час тривалого зберігання може утворитися помутніння, але це не впливає на реакцію фарбування.

B. Знебарвлюючий розчин

0,5% кислотно-спиртовий розчин	
Концентрована соляна кислота	0.5 мл
70% етанол	100 мл

Обережно додайте концентровану соляну кислоту до етанолу. Завжди повільно додавайте кислоту до спирту, а не навпаки. Зберігати в пляшці темного кольору. Наклеїти на пляшки етикетку, зазначивши на ній назву реагенту, дату приготування та термін придатності. Зберігати при кімнатній температурі протягом трьох місяців. На кожен об'єм плями потрібно два-три об'єми знебарвлюючого розчину.

C. C. Контрастні плями

У якості контрастних плям можна використовувати перманганат калію або акридиновий помаранчевий.

Перманганат калію	
Перманганат калію ($KmnO4$)	0.5 г
Дистильована вода	100 мл

Розчиніть перманганат калію дистильованою водою в пляшці темного кольору, щільно закритій пробкою. Наклеїти на пляшки етикетку, зазначивши на ній назву реагенту, дату приготування та термін придатності. Зберігати при кімнатній температурі до трьох місяців.

Акридиновий помаранчевий	
Безводний двохосновний фосфат натрію ($Na2HPO4$)	0.01 г
Дистильована вода	100 мл
Акридиновий помаранчевий	0.01 г

Розчиніть фосфат натрію в дистильованій воді. Додайте акридиновий помаранчевий і перемішайте до повного розчинення. Зберігати в щільно закритій пляшці темного кольору, подалі від тепла та світла. Наклеїти на пляшки етикетку, зазначивши назву реагенту, дату приготування та термін придатності. Зберігати при кімнатній температурі протягом трьох місяців.

Заходи безпеки

Ніколи не додавайте воду до кислоти. Щоб зменшити вплив токсичних фенольних парів, реагенти та розчини для фарбування, що містять фенол, слід готувати в добре провітрюваному приміщенні або використовуючи хімічну витяжну шафу. Завжди надягайте захисні лабораторні халати, рукавички та захисні окуляри під час роботи з сильною кислотою. У разі нещасного випадку під час роботи з кислотою негайно промийте уражену частину тіла великою кількістю води.

Відбір зразків

Мікроскопія мазка для виявлення *Mycobacterium* spp. може бути використана для широкого спектру біологічних зразків. Для діагностики туберкульозу органів дихання найчастіше використовується зразок мокротиння. Щоб забезпечити оптимальне виділення мікобактерій туберкульозу з мокротиння, необхідно зібрати та обробити щонайменше два зразки для мікроскопії та посіву мікобактерій [7,15].

Настанови країни нададуть інформацію про кількість рекомендованих зразків. Зразки, взяті рано вранці, мають найвищий вихід КСБ, проте зараз доведено, що хороші діагностичні зразки можна зібрати в будь-який час. Не рекомендується проводити мікроскопію мазка крові або зразків з великою кількістю кривавих прожилків через низьку чутливість процедури. Також не рекомендується регулярно проводити мікроскопію мазка зі зразків сечі через часте виявлення сапрофітних мікобактерій, що колонізують сечостатеві шляхи.

Зразки слід збирати в чисті, герметичні контейнери з широкою горловиною [2,6]. Краще використовувати одноразові пластикові контейнери (ємністю 50 мл), щоб уникнути переливання зразків з одного контейнера в інший. В якості альтернативного варіанту можна використовувати одноразові стерильні конічні пробірки ємністю 50 мл.

Пацієнти повинні отримати чіткі письмові інструкції щодо правильного збору зразку мокротиння для діагностики ТБ. У пацієнтів, які перебувають на лікуванні, зразки слід збирати з інтервалами, визначеними відповідно до національних настанов [7]. Збір мокротиння в жодному разі не слід проводити в лабораторії. Під час цієї процедури генеруються інфекційні аерозолі, а тому її слід здійснювати лише на відстані від інших людей, бажано на відкритому просторі, за можливості, або в приміщеннях з негативним тиском і достатнім повітрообміном [7,14].

Хороший зразок повинен мати об'єм приблизно 3–5 мл [5]. Зразки мокротиння повинні виглядати густими та слизистими (мукоїдними) чи прозорими, але з гнійними зернами [7]. Колір варіюється від непрозорого білого до зеленого. Кров'янисті зразки виглядають червонуватими чи коричневими. Примітка: прозора слина або виділення з носа не підходять в якості зразка для дослідження на туберкульоз [2,15].

Поводження зі зразками

Для оптимального лікування пацієнта необхідно якомога швидше обробити зразок (тобто протягом 24 годин). Для мікроскопічного дослідження інтервал між забором і фарбуванням не є критичним. Прийнятні результати можна отримати навіть у разі затримки доставки зразка.

Критерії прийнятності

Після доставки до лабораторії необхідно здійснити оцінку якості зразків мокротиння та зазначити про це в бланку направлення [7]. Позитивне на ТБ мокротиння може відрізнятися за кольором та консистенцією. Якщо зразок рідкий, прозорий, схожий на воду, без частинок або прожилок слизового матеріалу, обробіть зразок, але переконайтеся, що у формі результатів дослідження було зазначено низьку якість зразка. Якщо можливо, переконайте пацієнта/лікаря здати новий зразок; однак, навіть слина може дати позитивний результат. Усі зразки необхідно обробити, за винятком тих, що містилися в розбитих контейнерах, або в тих, що протікали, які слід утилізувати та запросити надати новий зразок.

Приймайте дуже невелику кількість, якщо у пацієнта виникають труднощі з виділенням мокротиння. Підходить мокротиння з прожилками крові, але чисту кров не варто досліджувати [1,2].

4.5 Приготування мазків

Хоча підготовка мазків для виявлення КСБ [7] є відносно безпечною процедурою з точки зору утворення інфікованих аерозолів, рекомендується готувати мазки в шафі біологічної безпеки класу I або IIB [14,15], за наявності. Якщо мазок готують після процедури центрифугування зразка (концентрований мазок), тримач пробірок для центрифуги слід відкривати в шафі біологічної безпеки.

- Мазки слід готувати на нових, чистих, знежирених і не подряпаних предметних скельцях. На матовому кінці предметного скла олівцем запишіть порядковий номер реєстрації в лабораторному журналі та номер замовлення на дослідження зразка. Якщо використовуються звичайні незаморожені предметні скельця, нанесіть на них маркування алмазним олівцем.
- Якщо мазок готують безпосередньо зі свіжого зразка (без попереднього центрифугування), використовуйте паличку-аплікатор або дротяну/одноразову петлю, щоб відібрати та захопити жовтуваті гнійні частинки мокротиння. Для повторно суспендованих гранул (після центрифугування) рекомендується використовувати одноразову петлю.
- Підготуйте мазок у формі овалу в центрі предметного скла. Розмір мазка повинен бути 2-3 см в довжину і 1-2 см в ширину, що дозволить підрахувати 100-150 полів на одному відрізку
- Для належного розподілу мокротиння щільно притисніть паличку перпендикулярно до предметного скла і рухайтеся невеликими концентричними колами або спіралеподібним способом.
- Помістіть використану паличку в контейнер для утилізації.
- Для кожного зразка використовуйте окрему паличку.
- Дуже важливо ретельно розподілити зразок, особливо у випадку густого чи гнійного матеріалу; шар матеріалу не предметному скельці не повинен бути ні занадто товстим, ні занадто тонким. Перед фарбуванням потримайте мазок на відстані приблизно 4-5 см над аркушем паперу. Якщо не можна прочитати літери, тоді зразок нанесено занадто товстим шаром.
- Для концентрованих зразків (після центрифугування при 3 000 x г протягом 20 хвилин, див. - підготовка зразків для посіву культури на ТБ) одну або дві краплі осаду слід нанести на предметне скло.
- Дайте мазку повністю висохнути на повітрі при кімнатній температурі в шафі біологічної безпеки.
- Не слід висушувати мазки під прямими сонячними променями або над полум'ям.
- Проведіть предметне скло над полум'ям 2-3 рази, тримаючи по 2-3 секунди кожного разу. Не нагрівайте предметне скло занадто довго та не тримайте його нерухомо над полум'ям, інакше предметне скло обгорить.
- Крім того, предметні скельця можна зафіксувати на дві години, використовуючи нагрівальні пластини (65-75°C), у шафі біобезпеки. У таблиці 8 наведено обладнання, необхідне для прямої (неконцентрованої) мікроскопії мазків.

Таблиця 8. Обладнання, необхідне для приготування та фарбування мазка

Обладнання, необхідне для приготування та фарбування мазка
Контейнер для зберігання зразка
Дротяна петля з внутрішнім діаметром 3 мм для розподілу мокротиння на предметному склі
Предметне скло для мікроскопа (знежирене та без подряпин)
Маркувальна ручка для нанесення ідентифікаційного номера на предметне скло
Пінцет для утримання предметного скла
Пальник Бунзена для фіксації предметного скла та обробки полум'ям мазка під час фарбування
Штатив для утримання предметного скла
Штатив, в який поміщають пофарбований мазок для висушування на повітрі

4.6 Процедури фарбування

4.6.1 Фарбування за методом Ціля-Нільсена

- Покрити всю поверхню кожного термофіксованого предметного скла карбол-фуксином.
- За допомогою пальника Бунзена обережно нагріти предметні скельця, поки не підніметься пара. Не допускайте їх закипання.
- Залишити пляму на предметному склі на десять хвилин. Цей час необхідний для того, щоб карбол-фуксин проник в клітину і добре зафарбував її.
- Обережно змити пляму з кожного предметного скла струменем холодної води, доки не змиється вся вільна пляма.
- Покрити кожне предметне скло кислото-спиртовим розчином; зачекати три хвилини.
- Знову ретельно промити предметні скельця водою та нахилити кожне з них, щоб видалити надлишки води.
- Залити предметне скло контрастним барвником метиленового синього на одну хвилину.
- Знову ретельно промити предметні скельця водою, злити воду та висушити на повітрі.

4.6.2 Метод флуорохромного фарбування

- Підготувати та термофіксувати мазки.
- Помістити пронумеровані мазки на штатив для фарбування партіями (максимум 12).
- Помістити на мазки барвник аурамін О і залишити їх фарбуватися на 15 хвилин.
- Слідкуйте за тим що барвник залишався на мазку. Не нагрівайте і не використовуйте паперові смужки.
- Промити предметне скло водою. Спрямовувати потік води на край предметного скла та повільно зчистити пляму з предметного скла.
- Залити предметні скельця 0,5% кислотним спиртом і залишити їх знебарвлюватися на три хвилини.
- Переконайтеся, що предметні скельця повністю залиті кислотним спиртом.
- Змити 0,5%-ний кислотний спирт водою, злити надлишок води з предметного скельця.
- Залити кожне предметне скельце перманганатом калію та залишити на дві хвилини.
- Примітка: Дуже важливо, щоб перманганат калію залишався на предметних скельцях не довше двох хвилин, оскільки це може призвести до надмірного гасіння флуоресценції.
- Змити перманганат калію. Злити надлишок води з предметного скельця.
- Дати мазкам висохнути на повітрі. Не промокувати. Зчитати дані якомога швидше після фарбування.

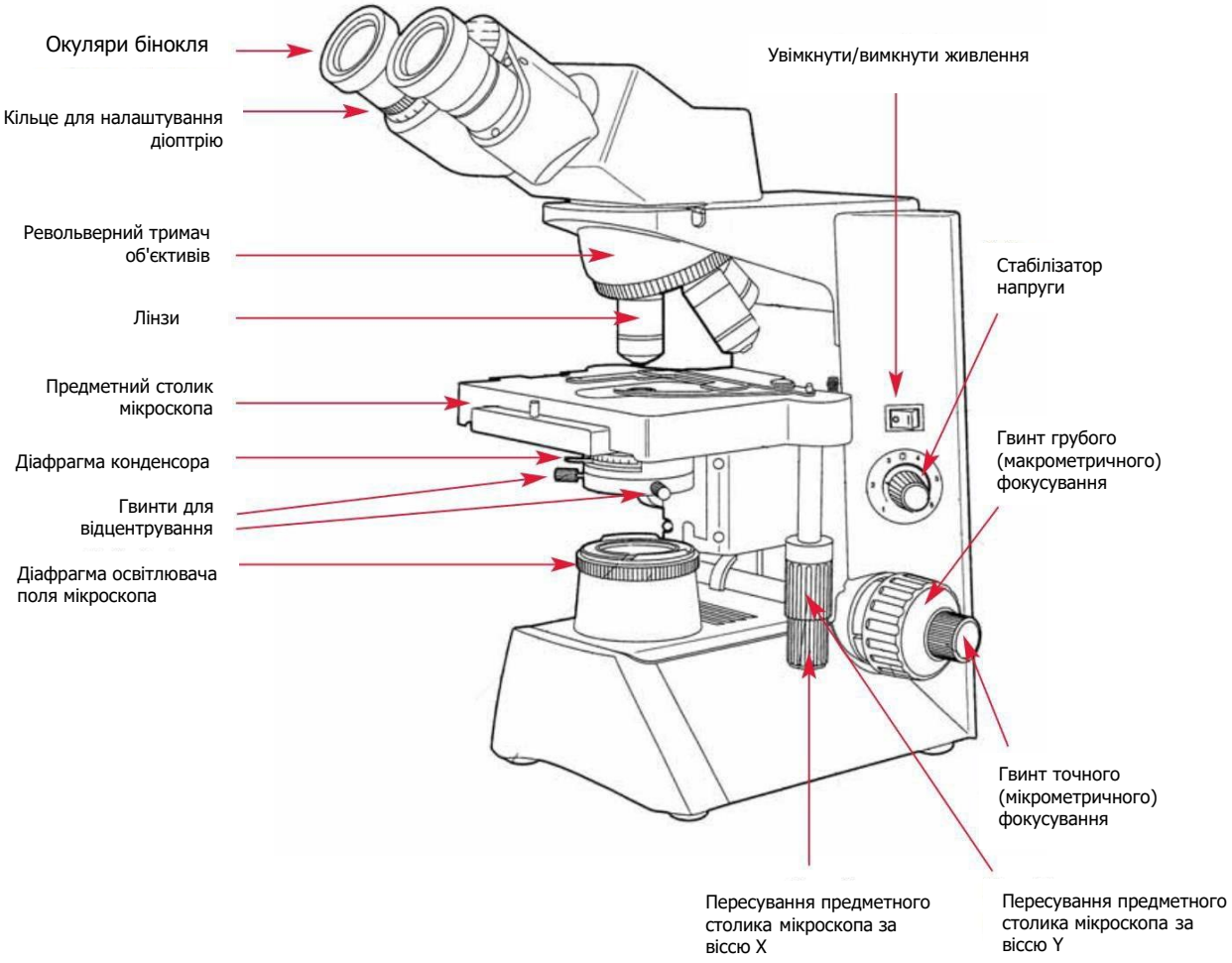
4.6.3 Автоматичне фарбування

У доступі є автоматичні пристрої для фарбування, які можуть обробляти велику кількість зразків. Вони потребують спеціальних реагентів і здатні виконувати як фарбування за методом ЦН, так і фарбування флуорохромом. Для підтримання стабільного та якісного фарбування після кожного сеансу фарбування необхідне точне і належне обслуговування.

4.7 Мікроскопія

На малюнку 3 показано вимоги до мікроскопа для дослідження мазка.

Рисунок 3. Компоненти мікроскопа



Джерело: Lumb R, Bastian I. Лабораторна діагностика туберкульозу за допомогою мікроскопії мокротиння: Інститут медичних і ветеринарних наук; 2005 р. стор. 38. [17]

4.7.1 Функціональне забезпечення

Мікроскоп слід встановлювати на жорсткій, рівній, твердій поверхні, подалі від прямих сонячних променів, пилу, вібрації (наприклад, від центрифуг), води (раковина, струмінь води з-під крана), хімічних реагентів або джерела вологості.

Сучасний світловий мікроскоп не потребує особливого щоденного обслуговування, але вимагає значної обережності під час його використання. Будь ласка, ознайомтесь з інструкцією щодо експлуатації мікроскопа для отримання інформації про догляд та технічне обслуговування.

4.7.2 Флуоресцентна мікроскопія

Ідентифікація мікобактерій за допомогою флуоресцентного барвника аурамін О заснована на спорідненості флуорохрому до міколевих кислот клітинної стінки. Аурамін О подає синал синім світлом і випромінює в діапазоні від ~500 нм до ~650 нм.

Флуоресцентна мікроскопія має ряд суттєвих переваг:

- Високо контрастні флуоресцентні зображення дозволяють легше виявляти КСБ.
- Використання об'єктивів малої і середньої потужності (зазвичай 10-кратних, 20-кратних і 40-кратних) дозволяє отримати більше поле зору, ніж під час звичайної мікроскопії, де зазвичай використовується 100-кратний об'єктив.
- Метод фарбування флуорохромом є більш простим, ніж метод ЦН.

Для дослідження мазків, пофарбованих аураміном, використовують бінокулярний мікроскоп, оснащений джерелом флуоресцентного світла і відповідним набором фільтрів. Лампа розжарювання (наприклад, ртутна або ксенонова) забезпечує флуоресцентне світло. Ртутна лампа дає найсильніше світло, проте вона має обмежений термін використання від 100 до 200 годин, який необхідно контролювати з допомогою таймера. Крім того, ці лампи є дуже дорогими та крихкими.

4.7.3 Світлодіодна (LED) мікроскопія

Існує переконлива доказова база на користь використання ультра-яскравої світлодіодної мікроскопії як для заміни традиційної флуоресцентної мікроскопії, так і прямої мікроскопії методом ЦН [11]. Світлодіодна мікроскопія полегшує ідентифікацію кислотостійких бактерій порівняно з методом ЦН, може використовуватися при фарбуванні аураміном, є економічно вигідною (термін служби лампи понад 10 000 годин), має низькі потреби щодо енергоспоживання та її можна легко запровадити в центрах мікроскопічних досліджень, включаючи периферійне обладнання. Крім того, інтенсивність світла можна легко регулювати.

Оскільки мікроскопія на основі світлодіодів була визнана значним досягнення в області прямої флуоресцентної мікроскопії, ВООЗ рекомендувала замінити традиційну флуоресцентну мікроскопію і поступово впроваджувати її в якості альтернативи традиційній ЦН-мікроскопії як у лабораторіях з великими, так і малими обсягами робіт. Під час впровадження світлодіодної мікроскопії важливими є такі питання: вимоги до навчання, валідація на вступному етапі, моніторинг тенденцій у виявленні випадків та результатів лікування. Може знадобитися впровадження адаптованих систем для внутрішнього контролю якості, а також зовнішнього контролю якості.

4.8 Ведення обліку та підготовка звіту

Ведення обліку та представлення звіту про результати [2,6,7] наведено в таблиці 9.

Таблиця 9. Підготовка звіту щодо мікроскопії мазків

Шкала IUATLD/ВООЗ (1000 x поле = HPF)	Система мікроскопії		
	Світле поле (1000-кратне збільшення: 1 довжина = 2 см = 100 HPF)	**Флуоресценція (200-250-кратне збільшення: 1 довжина = 30 полів = 300 HPF)**	**Флуоресценція (400-кратне збільшення: зростання = 40 полів = 200 HPF)**
Результат			
Негативний	Нульова довжина КСБ/1	Нульова довжина КСБ/1	Нульова довжина КСБ/1
Мізерний зразок	Довжина 1–9 КСБ/1 або 100 HPF	Довжина 1–29 КСБ/1	Довжина 1–19 КСБ/1
1+	Довжина 9 КСБ/1 або 100 HPF	Довжина 30–299 КСБ/1	Довжина 20–199 КСБ/1
2+	HPF КСБ/1 принаймні в 50 полях	В середньому 10–100 КСБ/1 поле	В середньому 5–50 КСБ/1 поле
3+	HPF В/1 принаймні в 20 полях	В середньому >100 КСБ/1 поле	В середньому >50 КСБ/1 поле

HPF - поле зору з великим збільшенням

4.8.1 Дослідження мазків за методом Ціля-Нільсена (ЦН)

Дослідити одну довжину мазка (2 см) або 100 полів за допомогою світлового мікроскопа, використовуючи 1 000-кратне збільшення. Якщо на 100 полях виявлено менше 10 КСБ, слід підрахувати кількість КСБ. Для високо позитивних результатів достатньо дослідити лише 20-30 полів.

4.8.2 Мікроскопічне дослідження мазків, пофарбованих аураміном (флуорохромом)

Дослідити одну довжину предметного скла з аураміном за допомогою люмінесцентного мікроскопа з 200-250-кратним збільшенням, щоб охопити 30 полів на одній довжині, що еквівалентно 300 полям при 1 000-кратному збільшенні. Як варіант, можна використовувати 400-кратне збільшення, що дозволяє охопити 40 полів при такому збільшенні.

Негативний результат: Негативний на кислотостійкі бактерії, коли на 100 полях не виявлено жодних організмів. Позитивний результат: Позитивний на кислотостійкі бактерії; надайте кількісне визначення КСБ

Результати необхідно зареєструвати в реєстраційному журналі ТБ-лабораторії, внести до бланку запиту на дослідження зразка, а також надіслати особі, яка подавала запит на дослідження зразка [10].

На рисунках 4–5 наведено приклади мікроскопії мазка, використовуючи метод фарбування аураміном і фарбування за ЦН.

Рисунок 4. Мікроскопія мазків біологічних зразків на КСБ

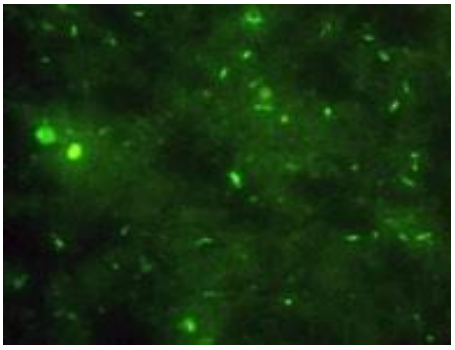
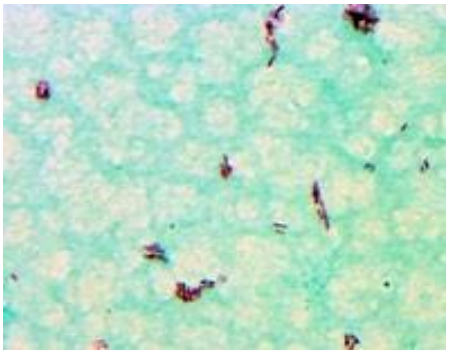
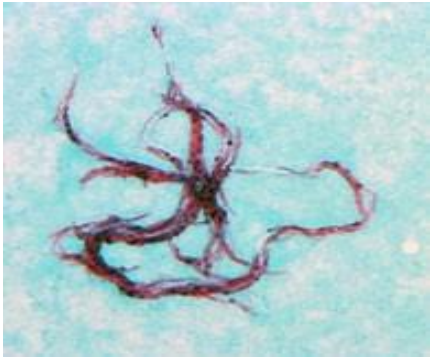
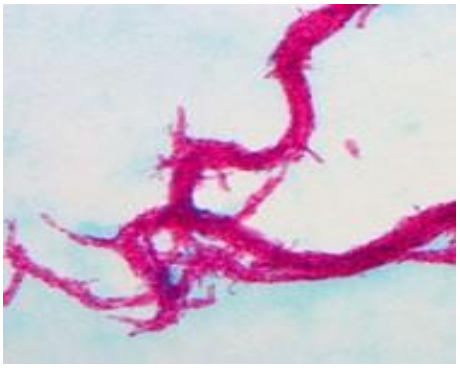
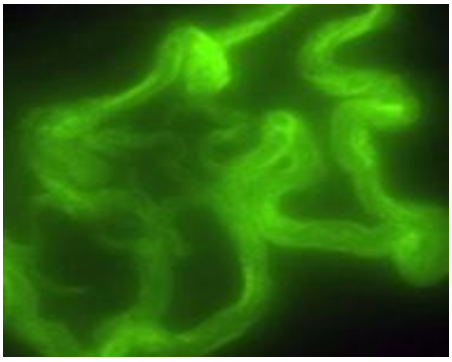
A  B 

Рисунок 5. Мікроскопія мазка культури *M. tuberculosis* на **КСБ**

C  D 

E. 

Зображення A та E: фарбування аураміном; зображення B-D: фарбування за Цілем-Нільсеном (ЦН)
На зображеннях показані нитки. Фотографії люб'язно надані професором Зофією Звольською, завідувачкою відділу мікробіології Національної референс-лабораторії туберкульозу, Національного науково-дослідного інституту туберкульозу та легеневих захворювань, Варшава, Польща.

4.9 Контроль якості

4.9.1 Параметри контролю якості

Контроль якості в мікроскопії - це процес внутрішнього моніторингу виконання стендових робіт у лабораторії. Він складається з ефективного і систематичного процесу, який гарантує точність, надійність та відтворюваність лабораторної роботи. Це досягається шляхом оцінки якості зразків; моніторингу виконання процедур мікроскопії; реагентів та обладнання; аналізу результатів мікроскопії та документуванням валідності методів мікроскопії.

Позитивний і негативний контрольні предметні скельця повинні бути включені в кожну серію фарбування, щоб перевірити правильність виконання процедури, а також інтенсивність фарбування кислотостійких організмів [14,15].

У таблиці 10 наведено найпоширеніші причини помилок під час проведення мікроскопії мазків. Контрольні предметні скельця слід оцінювати перед зчитуванням мазків пацієнта, щоб підтвердити правильність фарбування. Якщо якість контрольних предметних скелець є прийнятною, можна зчитувати мазки пацієнта і складати звіт. Якщо контрольне предметне скельце (предметні скельця) неприйнятні, слід переглянути процедури та підготовку реагентів. Після виявлення та усунення недоліків слід повторити дослідження всіх предметних скелець пацієнта з новим набором контролів. Результати контролю якості реагентів заносять до журналу підготовки реагентів.

Таблиця 10. Поширені причини помилок під час мікроскопії мазка

Помилки	Причина	Заходи, які необхідно вжити
Хибно-негативний результат	Занадто товстий мазок, що відшаровується під час фарбування	Покращити гомогенізацію, зменшити кількість матеріалу, що осідає.
	Мазок занадто тонкий	Збільшити кількість або зробити мазок тільки на ділянці площею 1 x 2 см.
	Неякісне фарбування	Перевірити якість контролю реагентів, підготувати нові реагенти, перевірити розведення.
Хибно-позитивний результат	Перехресне забруднення	Уникайте контакту між предметними скельцями під час процедури фарбування, не використовуйте посудини для фарбування. Очищати об'єктив мікроскопа після зчитування кожного предметного скельця. Перевірити воду/розчини на предмет забруднення навколишнього середовища.
	Випадає червоний осад	Приготувати новий розчин. Перед використанням відфільтрувати.

Список літератури

1. United States Department of Health and Human Services. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta, CDC; 1985.
2. World Health Organization (WHO). Laboratory services in tuberculosis control. Part II: Microscopy. Geneva: WHO; 1998. Available at: http://www.who.int/iris/handle/10665/65942
3. World Health Organization (WHO). Maintenance and repair of laboratory, diagnostic imaging and hospital equipment. Geneva: WHO; 1994. Available at: http://www.who.int/iris/handle/10665/40508
4. World Health Organization (WHO). Maintenance manual for laboratory equipment, 2nd Edition. Geneva: WHO; 2008. Available at: http://www.who.int/iris/handle/10665/43835
5. World Health Organization (WHO). Manual of basic techniques for a health laboratory, 2nd ed. Geneva: WHO; 2003. Available at: http://www.who.int/iris/handle/10665/42295
6. Rieder HL, Van Deun A, Kam KM, Kim SJ, Chonde TM, Trébucq A, et al. Priorities for tuberculosis bacteriology services in low-income countries. 2nd ed. Paris: International Union against Tuberculosis and Lung Disease; 2007.
7. United States' Centers for Disease Control (CDC). Acid-Fast Direct Smear Microscopy – A Laboratory Training Program. Atlanta, CDC; 2000. Available at: http://stacks.cdc.gov/view/cdc/31282
8. Health Protection Agency, Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory. Investigation of specimens for Mycobacterium species. London: Health Protection Agency; 2006. Available at: https://www.gov.uk/government/publications/smi-b-40-investigation-of-specimens-for-mycobacterium- species
9. Collins C, Grange J, Yates M. Organization and practice in tuberculosis bacteriology. London: Butterworths; 1985.
10. World Health Organization (WHO). Revised TB recording and reporting forms and registers – version 2006. Geneva: WHO; 2006. Available at: http://www.who.int/iris/handle/10665/69608
11. World Health Organization (WHO). Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis policy – Policy statement. Geneva: WHO; 2010. Available at: http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/WHO%20Policy%20Statement%20on%20LED%20Microscopy%20FINAL%20March%202010.pdf
12. World Health Organization (WHO). A Roadmap for Ensuring Quality Tuberculosis Diagnostics Services within National Laboratory Strategic Plans. Prepared by The Global Laboratory Initiative Advancing TB Diagnosis. Geneva: WHO; 2010. Available at: http://www.who.int/tb/laboratory/gli_roadmap.pdf
13. World Health Organization (WHO). New Laboratory Diagnostic Tools for TB Control. Geneva: WHO; 2008. Available at: http://www.who.int/tdr/publications/non-tdr-publications/diagnostic-tool-tb/en
14. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. Washington: ASM Press; 1992.
15. Cirillo D, Piana F, Vincent V, Angra P, Barrera L, Boulahbal F, et al. Training package on culture of acid-fast bacilli and drug-susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. In: Tuberculosis Control Assistance Program. TB CAP Toolbox – TB CAP Laboratory Tools [CD ROM]. n.p.; 2009.
16. Vincent V, van Deun A, Feldmann K, Barrera L, Paramasivan CN, Weyer K, et al. Guidance for countries on the preparation and implementation of TB laboratory standard operating procedures (WHO SOPs). In: Tuberculosis Control Assistance Program. TB CAP Toolbox – TB CAP Laboratory Tools 2009 [CD ROM].
17. Lumb R, Bastian I. Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy. Adelaide: Institute of Medical and Veterinary Science; 2005. p. 38.

5 Культуральні дослідження на наявність комплексу мікобактерій туберкульозу

Автори: Susana David, Vera Katalinić-Janković, Lanfranco Fattorini та Daniela Cirillo

Рецензенти: Емануелем Борроні, Енріко Тортолі та Владиславом Ніколаєвським (2015 р.)

5.1 Передумови та принципи

Посів культур мікроорганізмів може забезпечити остаточний діагноз туберкульозу. Основною перевагою культурального дослідження над мікроскопією мокротиння є його вища чутливість, що дозволяє виявити дуже низьку кількість бактерій (приблизно 10 бактерій/мл мокротиння порівняно з щонайменше 5 000 бактерій/мл мокротиння при мікроскопії). Використання методу посіву культур підвищує потенціал діагностики туберкульозу на ранніх стадіях захворювання. Культуральне дослідження також використовується для виявлення невдалого лікування та для діагностики позалегеневого туберкульозу. Використання культурального дослідження збільшує кількість виявлених випадків туберкульозу на 30-50%. Крім того, посів мікроорганізмів використовують для ідентифікації виду бактерій та тестування на медикаментозну чутливість (ТМЧ) [1,2].

Оскільки в ЄС було прийнято визначати випадок туберкульозу на основі культурального дослідження, основна відмінність у випадках туберкульозу полягає в розмежуванні між позитивним і негативним результатом дослідження, а не в статусі мазка мокротиння. Перший розділ Європейських стандартів лікування туберкульозу (ESTC) 2012 року [1], присвячений стандартам діагностики (ESTC 1 - ESTC 6), визначає мінімальні вимоги для отримання достовірного діагнозу ТБ у різних установах або при різних типах підозри, як мікробіологічних, так і клінічних [1,2]. Якщо це неможливо, культуральне дослідження слід проводити принаймні для:

- діагностики випадків з клінічними та рентгенологічними ознаками ТБ легень, коли результати дослідження мазків неодноразово були негативними;
- діагностики позалегеневого ТБ;
- діагностики дитячого ТБ;
- діагностики ТБ серед ВІЛ-позитивних дорослих та дітей; та
- діагностики та моніторингу ЛС-ТБ та РМР-ТБ.

Туберкульоз, хоч і є переважно легеневим захворюванням, може вражати будь-який орган тіла. Виділення етіологічного збудника для ефективної мікробіологічної діагностики залежить від:

- вибору правильного типу зразка;
- якості зразка; та
- належного застосування процедур зберігання та транспортування.

Обробка невідповідних клінічних зразків для виділення культур мікобактерій є марною тратою як фінансових, так і людських ресурсів [6]. Клінічний персонал повинен бути належним чином навчений і приймати тільки відповідні зразки для дослідження.

Оскільки мікобактерії зазвичай повільно ростуть і потребують тривалого часу інкубації, культури зразків, отримані з нестерильних сайтів, можуть обростати різноманітними іншими мікроорганізмами. Належна попередня обробка та безпосередня обробка зразків, а також використання селективних живильних середовищ є критично важливими для усунення забруднюючих речовин, не впливаючи серйозно при цьому на життєздатність мікобактерій [10].

5.2 Біонебезпеки та біобезпека в ТБ-лабораторії

Належні мікробіологічні методи (GMT) - це методи роботи, спрямовані на усунення або мінімізацію контакту з патогенами, наприклад, через аерозолі, бризки або випадкову інокуляцію - мають важливе значення для мінімізації біонебезпеки [13]. Нозокоміальна передача *M. tuberculosis* через зразки є основною проблемою для працівників лабораторій. З усіма зразками, щодо яких є підозра на наявність *M. tuberculosis*, слід завжди поводитися з належною обережністю і відкривати їх тільки у відповідній шафі біобезпеки. Інфекційні аерозолі утворюються в ТБ-лабораторії при роботі з рідкими суспензіями, що містять туберкульозні палички. Заходи біобезпеки в лабораторії мають важливе значення для захисту працівників від впливу інфекційних аерозолів. Детальнішу інформацію щодо процедур та практики безпеки в лабораторії наведено в Главі 1.

Завдяки своїй в'язкості мокротиння є мінімальним джерелом інфекційних аерозолів. На відміну від цього, аерозолі, що утворюються під час обробки (особливо під час центрифугування) гомогенізованої мокроти та під час роботи з культурою, необхідно звести до мінімуму, а отже, обробку зразків та їх утримання слід здійснювати в шафі біологічної безпеки.

Класифікація лабораторних методів, які використовуються для діагностики *M. tuberculosis*, повинна ґрунтуватися на оцінці ризиків (кількість і тип тестів, поширеність туберкульозу та МР-ТБ). Обробку зразків для посіву культури мікобактерій слід здійснювати в шафі біологічної безпеки в лабораторії, яка відповідає щонайменше 2-му рівню біобезпеки (РББ-2), тоді як процедури, пов'язані з маніпуляціями з культурами *M. tuberculosis* (ідентифікація, субкультивування та ТМЧ), необхідно проводити в шафі біологічної безпеки в лабораторіях, що відповідають стандартам РББ-3. Усі процедури, що призводять до утворення аерозолів, слід виконувати в шафі біологічної безпеки класу I або II [9-11].

Роботодавець повинен регулярно контролювати стан здоров'я працівників лабораторії. Їх необхідно проінформувати про симптоми туберкульозу, і в разі виникнення симптомів працівникам має бути надано доступну безкоштовну медичну допомогу відповідно до національних норм.

5.2.1 Мінімальні рекомендації ВООЗ для закладів, що проводять дослідження на культури ТБ/тестування медикаментозної чутливості

ВООЗ рекомендує, щоб усі процедури обробки зразків проводилися в лабораторії, побудованій та обладнаній за стандартом РББ-2. Мінімальні вимоги до ТБ-лабораторії РББ-2: обмежений доступ до лабораторії; наявність повністю функціональної шафи біологічної безпеки та підтримання її в належному стані, а також наявність автоклаву чи інших засобів знезараження, доступних у тій самій будівлі, в якій розташовується лабораторія. Більше інформації про біобезпеку наведено у Главі 1 [9-14].

Ідентифікацію, пересів культур та тестування на медикаментозну чутливість слід проводити в ізольованому приміщенні РББ-3, обладнане приміщенням-передпокоєм, з подачею спрямованого потоку повітря від функціонально чистих до брудних зон з частотою повітрообміну не менше 6-12 разів на годину. Ізольоване приміщення може бути розміщено в глухому кінці коридору або створити шляхом встановлення перегородки та дверей таким чином, щоб доступ до лабораторії здійснювався через передпокій (наприклад, вхід через подвійні двері) або через основну лабораторію РББ-2. Автоклав необхідно розташувати в безпосередній близькості до лабораторії, щоб звести до мінімуму переміщення забруднених матеріалів. Шафи біологічної безпеки повинні бути виведені назовні по повітроводу або вентилюватися через кожух. Рециркуляція повітря із ШББ в приміщення лабораторії та рециркуляція в інші зони будівлі не дозволяється. Більш детальну інформацію про рівні та умови лабораторної безпеки наведено в Главі 1 [14].

Рішення про використання додаткових ЗІЗ має ґрунтуватися на оцінці ризиків. Оцінки ризиків слід регулярно переглядати, а також у разі необхідності [7].

Маски та респіратори

Однією з найпоширеніших помилок є те, що стандартна хірургічна маска може забезпечити захист від інфекційних аерозолів мікобактерій туберкульозу. Хірургічні маски, виготовлені з пористого матеріалу, що погано прилягає, залишають великі зазори між обличчям і маскою, а тому допомагають запобігти поширенню мікроорганізмів від користувача до інших людей, лише затримуючи великі вологі частинки присутні в повітрі, що видихається.

Хоча шафи біологічної безпеки та потік повітря в лабораторії є основними засобами захисту від впливу забруднених аерозолів, що утворюються під час роботи з культурами та тестування на медикаментозну чутливість, за певних умов, наприклад, при поширеності ЛС-ТБ та/або ВІЛ, необхідно враховувати необхідність додаткового індивідуального захисту. Персонал може бути ВІЛ-інфікованим і дуже сприйнятливим до забруднених аерозолів [14].

Захист від вдихання інфекційних аерозолів можна забезпечити за допомогою респіраторів - пристрої, які здатні фільтрувати частинки діаметром 0,3-0,4 мкм і щільно прилягають до обличчя, щоб запобігти витоку по краях. Респіратор N95 (FFP2) - це легкий одноразовий респіратор для захисту носової та ротової порожнини, який ефективно фільтрує понад 95% частинок діаметром 0,3 мкм і більше. Респіратор типу FFP3 видаляє понад 98% таких частинок. Кожного користувача необхідно проінструктувати щодо правильного використання респіратора та проінформувати про його обмеження. Респіратори слід правильно припасувати до обличчя, щоб запобігти витоку з-під лицьового ущільнювача. Для цього маску слід надягати на ніс і рот таким чином, щоб верхня еластична стрічка була на маківці голови, а нижня - на потилиці. Металева смужка, що закриває ніс, повинна щільно прилягати до області перенісся. Волосся на обличчі між шкірою користувача та ущільнювальними поверхнями респіратора перешкоджатиме належній герметизації. Респіратори також слід використовувати під час екстреного очищення розливів, які супроводжуються вивільненням життєздатних мікроорганізмів у робочу зону. Респіратори слід зберігати в зручному, чистому та санітарно безпечному місці і викидати після восьми годин (сукупного) використання та не зберігати більше одного тижня. [7].

Рукавички

Відповідно до міжнародних універсальних процедур/настанов, під час усіх процедур, що передбачають роботу з біологічними рідинами, слід використовувати відповідні захисні рукавички. Рукавички необхідно надягати в разі травми руки/шкірних захворювань або коли існує високий ризик контакту з патогенами, що передаються через кров; отже, зразки, отримані в результаті інвазивних клінічних досліджень, необхідно обробляти в рукавичках [12,14].

Рукавички необхідно міняти після кожного виду роботи, що вимагає їхнього використання, а також після кожної перерви в роботі. Ніколи не використовуйте рукавички за межами лабораторії. Кожного разу, коли руки виймають із шафи біологічної безпеки, рукавички необхідно зняти та утилізувати до контейнера для відходів у ШББ [7,12,14].

Можна використовувати одноразові латексні, безлатексні вінілові (прозорі) або нітрилові рукавички, причому необхідно забезпечити наявність рукавичок різного розміру (маленькі, середні або великі) для використання всіма співробітниками лабораторії. Гіпоалергенні рукавички слід використовувати у разі алергії на білки латексу та/або на кукурудзяний крохмаль, що використовується для виготовлення порошку. Повторне використання одноразових рукавичок не рекомендується. Використані рукавички слід утилізувати як забруднений матеріал. Після безпечного зняття рукавичок слід негайно вимити руки водою з рідким милом. Належне миття рук з милом і належне дотримання обережності при поводженні із забрудненими матеріалами є критично важливими елементами безпечної лабораторної практики [14].

Лабораторні халати

Завжди використовуйте медичний халат у приміщенні лабораторії (ніколи на вулиці) та міняйте його щонайменше щотижня. Медичні халати з довгими рукавами, які мають застібку або зав'язки на спині, чи комбінезони з вузькими манжетами забезпечують кращий захист, ніж лабораторні халати, і надають перевагу в мікробіологічних лабораторіях. При використанні, лабораторні халати слід повністю застібнути. У лабораторії має бути виділено місце для зберігання використаного і нового лабораторного одягу. Лабораторні халати необхідно зберігати окремо від власного одягу персоналу. Слід забезпечити послуги з прання в межах/поруч із закладом. Повинен бути в наявності додатковий захисний одяг для відвідувачів, обслуговуючого персоналу та персоналу з реагування на надзвичайні ситуації [7,12,14].

Завжди знімайте засоби індивідуального захисту в наступному порядку:

- одноразові рукавички;
- халат/куртку/костюм/комбінезон; та
- респіратор/маску.

5.3 Збір, зберігання та транспортування зразків

5.3.1 Відбір зразків

Належні процедури збору зразків та контейнери для зразків, достатній об'єм зразків та належні умови транспортування можуть вплинути на результати посіву культур на виявлення ТБ. Правильне маркування зразків має вкрай важливе значення. Це включає ідентифікацію пацієнта та зразка, тип зразка та дату забору.

Як правило, бажано здійснювати забір зразків до початку конкретного лікування. Зразки завжди слід збирати з обережністю, щоб уникнути зараження мікроорганізмами хазяїна чи навколишнього середовища, та подавати їх у стерильних, герметичних, одноразових, належним чином промаркованих, затверджених лабораторією контейнерах, без використання будь-яких фіксаторів.

Якщо застосовують процедуру центрифугування для культурального дослідження, слід розглянути можливість використання контейнерів для збору зразків, придатних для центрифугування. Знезараження і центрифугування в контейнері для збору дозволяє уникнути необхідності переносити зразки в інший контейнер [1-8].

Зразки мокротиння

Більшість зразків, що надходять до лабораторії, - це зразки мокротиння. Пацієнтів необхідно чітко проінструктувати щодо того, як збирати зразок мокротиння; слід надати письмові інструкції.

Систематичний аналіз 37 досліджень, що відповідають вимогам [6], чітко показав, що більшість випадків ТБ (в середньому 85,8%) були виявлені з допомогою дослідження першого зразка мокротиння. При використанні другого зразка мокротиння середня додаткова ефективність становила 11,9%; при дослідженні третього зразка (коли результати дослідження перших двох були негативними) додаткова ефективність становила 3,1%. Очікується, що лабораторний аналіз двох зразків мазка мокротиння покращить виявлення випадків захворювання, скоротить час встановлення діагнозу, прискорить початок лікування та зменшить кількість пацієнтів, втрачених під час процесу діагностики. На основі цих доказів ВООЗ рекомендувала використовувати два зразки мокротиння за один день для діагностики легеневої форми ТБ у закладах, в яких належним чином функціонує система ЗОЯ, з великим робочим навантаженням та обмеженими людськими ресурсами.

Хорошої якості зразок мокротиння має становити приблизно 3-5 мл нещодавно виділеного матеріалу з бронхіального дерева. Зазвичай воно має густу та слизоподібну (мукоїдну) консистенцію. Воно може бути рідким і містити шматочки гнійного матеріалу. Колір може варіюватися від непрозорого білого до зеленого. Зразки з прожилками крові виглядають червонуватими або коричневими. Прозора слина або виділення з носової порожнини не підходять в якості зразка для дослідження на ТБ, хоча слину не слід автоматично відкидати: індуковане та подальше виділення мокротиння схоже на слину. Щоб уникнути забруднення або розведення якісного зразка, не слід об'єднувати зразки.

Інші зразки

Біологічні рідини (спинномозкова, плевральна, перикардіальна, синовіальна, асцитична, кров, гній і кістковий мозок) необхідно збирати асептично в стерильні контейнери за допомогою аспіраційних методів або хірургічних процедур. Випіт із плевральної порожнини є субоптимальним зразком: туберкульозні палички знаходяться переважно в плевральній стінці, а не в рідині. Мінімальний об'єм плеврального випоту становить 20-50 мл. Ідеальним є зразок плевральної біопсії.

Для рідин, які можуть згорнутися, в якості антикоагулянту до культури слід додати стерильний оксалат калію (0,01-0,02 мл 10% нейтрального оксалату на мл рідини), гепарин (0,2 мг/мл) або цитрат натрію (дві краплі 20% цитрату натрію на кожні 10 мл рідини).

Асептично зібрані тканини слід помістити в стерильні контейнери без застосування фіксаторів або консервантів і швидко транспортувати в лабораторію. При тривалому транспортуванні слід запобігати зневодненню, додаючи стерильний фізіологічний розчин, та підтримуючись режим температури 4-15°C.

Очікується, що сеча може бути забруднена. Щоб мінімізувати надмірне забруднення зразків сечі, зовнішні статеві органи слід вимити перед забором зразка. Після надходження в лабораторію зразок сечі необхідно або негайно обробити, або центрифугувати, а осад помістити в холодильник. Оскільки виділення туберкульозних паличок відбувається з перервами, необхідно зібрати три послідовні зразки сечі рано вранці в середині циклу сечовипускання.

Іншими респіраторними зразками, які можна надіслати в лабораторію для посіву мікобактерій, можуть слугувати бронхіальний секрет (мінімальний об'єм 2-5 мл) та зразки лаважу бронхіальних альвеол (мінімальний об'єм 20-50 мл). Трансбронхіальні та інші зразки біопсії, взяті в стерильних умовах, слід зберігати у вологому стані під час транспортування, додаючи 0,5-1 мл стерильного 0,9% фізіологічного розчину.

У дітей, які виділяють мало мокротиння або взагалі не виділяють його, для діагностики туберкульозу можна використовувати аспірацію ранкового шлункового соку. Аспірат шлункового соку слід негайно доставити в лабораторію та нейтралізувати, додавши 100 мг бікарбонату натрію.

5.3.2 Зберігання зразків

Зразки слід правильно відібрати та доставити до лабораторії якомога швидше. Необхідно докласти всіх зусиль, щоб організувати та прискорити транспортування та обробку зразків. Хоча бактерії туберкульозу можуть виживати в мокротинні протягом одного тижня за відсутності консервантів, ймовірність успішного проведення бактеріального дослідження зменшується з часом, що особливо важливо для зразків з низьким вмістом бактерій. Якщо зразки неможливо доставити в лабораторію протягом однієї години, рекомендується зберігати їх при температурі 4°C. Це не стосується зразків цільної крові, які не підлягають охолодженню. Після доставки в лабораторію зразки слід знову охолодити до часу їх обробки. Проміжок часу між забором та інокуляцією не повинен перевищувати семи днів.

5.3.3 Транспортування зразків

Пакування інфікованих зразків, які надсилають наземною або авіапоштою, слід здійснювати відповідно до національних настанов щодо біобезпеки та біозахисту або міжнародних правил. З питань міжнародного перевезення інфекційних речовин слід звертатися до Міжнародної асоціації повітряного транспорту (IATA) [7].

Зразки та культури необхідно пакувати в трикомпонентну упаковку, що складається з

- герметичної первинної ємності (ємностей)
- герметичної вторинної упаковки; та
- зовнішньої упаковки, що має достатню міцність для розміщення вторинної упаковки, придатна для відповідної маси та цільового використання.

Для цілей транспортування, інфекційні речовини визначаються як речовини, які, як відомо чи обґрунтовано очікується, що вони містять патогени [7,8]. Категорія A (UN2814) відповідає інфекційній речовині, яка транспортується в такій формі, що при контакті з нею здатна викликати постійну втрату працездатності та/або небезпечну для життя або смертельну хворобу у здорових людей чи тварин. Усі інші інфекційні речовини, а також біологічні зразки людини належать до категорії B (UN3373).

Культури *M. tuberculosis* належать до категорії A. Однак для наземного транспортування, коли культури *M. tuberculosis* призначені для діагностичних або клінічних цілей, вони можуть бути віднесені до категорії B. Для наземного транспортування немає максимальної кількості на упаковку.

Для авіаперевезень:

- жодна первинна ємність не повинна перевищувати 1 л (для рідин) або граничну масу зовнішньої упаковки (для твердих речовин); та
- об'єм/маса, що відвантажується в одній упаковці, не повинен перевищувати 4 л або 4 кг.

Зазначені показники ваги не включають лід, сухий лід або рідкий азот, які використовуються для збереження зразків у холодному стані.

5.4 Гомогенізація та знезараження зразків

Більшість (але не всі) зразків вважаються зараженими. Пульмональні зразки, включаючи мокротиння, бронхіальний секрет, бронхоальвеолярний лаваж, бронхіальні аспірати та мазки, зазвичай заражені нормальною мікробіотою хазяїна. Позалегеневі зразки можна розділити на дві основні групи залежно від ступеня забруднення:

- Асептично зібрані зразки, зазвичай вільні від інших мікроорганізмів (стерильні);
- Зразки, забруднені нормальною флорою, чи зразки, зібрані неасептичним способом (не стерильні).

Зазвичай інфікованими позалегеневими зразками є промивні рідини шлунка, аспірати з гортані, сеча, шкіра, матеріали розтину та слизова оболонка матки. Стерильні зразки включають гній з холодного абсцесу, спинномозкову рідину, синовіальну рідину або інші біологічні рідини з порожнини організму, а також хірургічні біоптати.

Необхідно суворо дотримуватися процедур знезараження інфікованих зразків, що передбачають розрідження органічних залишків та знищують небажану нормальну флору. Нормальна мікрофлора швидко проростатиме на всій поверхні живильного середовища і споживатиме його ще до того, як туберкульозні палички почнуть рости. Зразки необхідно гомогенізувати, щоб звільнити бактерії від слизу, клітин або тканин, в яких вони можуть міститися.

Агенти розчинення/знезараження є певною мірою токсичними для туберкульозних паличок, тому, щоб звести до мінімуму кількість загиблих мікобактерій, необхідно чітко дотримуватися процедури розчинення/знезараження. Частина культур буде забруднена іншими мікроорганізмами: рівень забруднення у 3-5% є прийнятним на твердих живильних середовищах.

Посів культур в рідких живильних середовищах можуть демонструвати вищий рівень забруднення (5-10%). Крім того, якщо зразки (особливо мокротиння) доставляють до лабораторії протягом кількох днів, рівень забруднення може бути вищим. Наразі доступні нові комерційні набори, що містять середовища для транспортування, доповнені розчинами для знезараження для більш тривалих перевезень між країнами або містами. Це може допомогти зменшити частку контамінованих культур через тривалі перевезення і збільшити частку позитивних культур серед тих зразків, які не були посіяні на сайті їх збору. Рівень контамінації, який наближається до 0, вказує на те, що процедура знезараження була занадто суворою.

5.4.1 Розчинення та знезараження зразків мокротиння

Розчинення та знезараження модифікованим методом Петрова з використанням гідроксиду натрію

Гідроксид натрію є токсичним як для забруднювачів, так і для туберкульозних паличок, тому дуже важливо суворо дотримуватися зазначених часових рамок. Цю процедуру знезараження можна використовувати лише для зразків, посів культур яких потім будуть здійснювати на твердому живильному середовищі.

Реагенти:

- розчин гідроксиду натрію (NaOH), 4%;
- Фосфатний буфер 0,067 моль/л, pH 6,8.

Розчин гідроксиду натрію (NaOH), 4%:

- Гранули гідроксиду натрію (аналітичний клас): 4 г;
- Дистильована вода: 100 мл.

Розчинити NaOH у дистильованій воді. Відібрати 2 мл аліквоти. Стерилізувати шляхом автоклавування при температурі 121ºC протягом 20 хвилин. Фосфатний буфер, 0,067 моль/л, pH 6,8:

- Основний розчин А: динатрій фосфат, 0,067 моль/л.

Розчиніть 9,47 г безводного Na2HPO4 в 1 л дистильованої води.

- Основний розчин Б: монокалійфосфат, 0,067 моль/л. Розчинити 9,07 г KH2PO4 в 1 л дистильованої води.

Змішайте 50 мл розчину А і 50 мл розчину Б. Використовуйте pH-метр, щоб переконатися, що досягнуто правильного рівня pH для буферної суміші. За необхідності відкоригуйте його, використовуючи 10% фосфорну кислоту або 10% гідроксид натрію.

Аліквотувати в об'ємах, необхідних для внесення в одну пробірку центрифуги (наприклад, 50 мл, якщо використовуються пробірки для центрифуги на 50 мл), відкинувши зайвий об'єм. Процедуру стерилізації здійснюють шляхом автоклавування при температурі 121ºC протягом 20 хвилин. Обсяги буфера, що залишилися, можна об'єднати і знову простерилізувати для подальшого використання.

Процедура:

- Якщо мокротиння ще не було зібрано в пробірки для центрифуги, виберіть стерильні пластикові пробірки для центрифуги з гвинтовою кришкою (по одній для кожного зразка).
- Незмивним маркером напишіть номер зразка на стінці пробірки (не на кришці).
- Напишіть номер кожного зразка та дату посіву на двох пробірках з живильними середовищами.
- Відмітьте об'єм мокротиння на пробірці для центрифуги (не менше 2 мл, не більше 5 мл). Додайте рівний об'єм 4% NaOH і закрутіть кришку.
- Перемішати, використовуючи вортекс.
- Дати постояти 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Заповнити пробірку до позначки 2 см від верху пробірки (наприклад, до позначки 50 мл на пробірці) фосфатним буфером.
- Центрифугувати при 3000 г протягом 15 хвилин.
- Обережно злити надосадову рідину через лійку в контейнер для відходів, що містить 5% фенолу або інший мікобактеріальний дезінфікуючий засіб.
- Знову суспендуйте осад у приблизно 0,3 мл фосфатного буфера.
- Здійсніть посів осаду на двох скошених поверхнях яєчного середовища, позначених ідентифікаційним номером. За допомогою піпетки внесіть по 3-4 краплі (приблизно 0,1-0,15 мл) на кожну скошену поверхню живильного середовища.
- Нанесіть одну краплю на предметне скло, позначене ідентифікаційним номером, для мікроскопічного дослідження.

Розчинення та знезараження за допомогою методу із застосуванням N-ацетил-L-цистеїн-гідроксиду натрію (NALC-NaOH)

Найпоширенішим методом розчинення та знезараження забруднених зразків є метод із застосуванням N-ацетил-L-цистеїн-гідроксиду натрію (NALC-NaOH).

Знезараження за допомогою NALC-NaOH базується на муколітичних властивостях N-ацетил-L-цистеїну (NALC), які дозволяють ефективно використовувати знезаражуючий агент, гідроксид натрію, за низької кінцевої концентрації.

Отже, метод із застосуванням NALC дає більше позитивних культур, ніж інші методи, оскільки він вбиває лише близько 30% туберкульозних паличок у клінічних зразках; нижча концентрація NaOH означає, що рівень забруднення може бути вищим, ніж при використанні інших методів знезараження. Час, необхідний для обробки одного зразка, становить приблизно 40 хвилин, тоді як для обробки 20 зразків знадобиться приблизно 60 хвилин.

Цей метод підходить для посіву культур як на твердих, так і в рідких живильних середовищах. Однак недоліком методу є те, що розчин NALC втрачає активність, і тому його потрібно готувати щодня. Готові розчини доступні, але коштують дорого.

Після впливу агента для знезараження і подальшого центрифугування осад необхідно знову суспендувати в буферному розчині (або воді) у співвідношенні 1:10, щоб зменшити концентрацію будь-яких токсичних компонентів, які можуть пригнічувати ріст бактерій туберкульозу.

В якості запобіжного заходу аліквоту осаду слід зберігати протягом одного тижня в холодильнику і повторно знезаразити, якщо інокульовані культури проявляють ознаки забруднення. За бажанням осад можна заморозити (- 20°C) у стерильному 1,5-2 мл флаконі з гвинтовою кришкою, який має бути належним чином промарковано. Реагенти для методу з використанням N-ацетил-L-цистеїн-гідроксид натрію (NALC-NaOH):

Розчин натрію гідроксиду-цитрату

Розчин A: Гідроксид натрію , 4%	
Гранули гідроксиду натрію (реагент для аналітичних цілей)	40 г
Дистильована вода	1 000 мл

Розчинити NaOH у дистильованій воді

Розчин B: Тринатрій цитрат 3H2O 2,94%	
Тринатрій цитрат 3H2O	29.4 г
Дистильована вода	1 000 мл

Розчинити тринатрій цитрат 3H2O у дистильованій воді.

Змішати розчини A і B, аліквотувати по 100 мл і стерилізувати в автоклаві при температурі 121°C протягом 15 хвилин. Зберігати при температурі 4°C в холодильнику.

N-ацетил-L-цистеїн (NALC)

Розчин NALC-NaOH має бути свіжоприготовленим та призначений лише для щоденного використання.

Приготувати шляхом додавання 0,5 г NALC до 100 мл розчину натрію гідроксиду-цитрату безпосередньо перед використанням: аліквотувати в кількості по 4 мл.

Фосфатний буфер, 0,067 моль/л, pH 6,8

Як приготувати, дивіться вище.

Обробка мокротиння

Зразки мокротиння не можна об'єднувати через ризики перехресного забруднення. Завжди обробляйте/дезінфікуйте весь зразок - не намагайтеся відбирати частини зразка, як це робиться для прямої мікроскопії. Обережно зцідіть з контейнера для зразка в пробірку центрифужну. Якщо зразок занадто в'язкий для переливання, до мокротиння в контейнері для зразків можна додати рівний об'єм розріджувача/дезінфікуючого засобу, перш ніж суміш обережно перелити у відповідну пробірку центрифужну з гвинтовою кришкою.

Мокротиння не слід обробляти партіями більше 6-8 штук, оскільки метод чітко залежить від часу. Процедура:

- Якщо мокротиння ще не було зібрано в пробірки для центрифуги, виберіть стерильні пластикові пробірки центрифужні з гвинтовою кришкою (по одній для кожного зразка).
- Незмивним маркером напишіть номер зразка на стінці пробірки (не на кришці).
- Напишіть номер кожного зразка і дату посіву на двох пробірках з живильними середовищами.

- Перенесіть мокротиння (не менше 2 мл, але не більше 5 мл) у пробірку для центрифуги. Додайте рівний об'єм розчину NALC-NaOH.
- Закрутіть кришку пробірки та струсіть або збовтайте. Перемішувати не більше 20 секунд.
- Тримайте при температурі 20-25°C протягом 15 хвилин для знезараження.
- Наповніть пробірку до позначки в 2 см від верху (наприклад, до позначки 50 мл на пробірці) фосфатним буфером 0,067 моль/л (pH 6,8) або дистильованою водою. Перемішати з допомогою вортексу.
- Центрифугувати при 3 000г протягом 15 хвилин.
- Обережно злийте надосадову рідину в пляшку для відходів, що містить відповідний дезінфікуючий засіб.
- Знову суспендуйте осад та інокулюйте на дві скошені поверхні живильного середовища Левенштейна-Йенсена (і одну скошену поверхню середовища Левенштейна-Йенсена з піруватом, якщо потрібно) або в рідке живильне середовище. За допомогою піпетки (не петлі) нанесіть по 3-4 краплі (0,2-0,4 мл) на кожну скошену поверхню живильного середовища. Нанесіть одну краплю на предметне скло (позначене ідентифікаційним номером) для мікроскопічного дослідження.

5.4.2 Розчинення та знезараження інших зразків, окрім мокротиння

Мазки з гортані

Дослідження мазків з гортані не проводяться. Мазки дають мало матеріалу: необхідно зібрати якомога більше матеріалу і не витрачати його даремно.

- Здійснювати посів мазків необхідно в день їхнього отримання з дотриманням стерильності.
- Стерильним пінцетом перенесіть мазок у стерильну пробірку для центрифуги.
- Додати 2 мл стерильної дистильованої води.
- Знезаразити за методом NaOH-NALC (див. вище, Розділ 5.4.1).
- Перед додаванням фосфатного буферного розчину слід видалити тампон з пробірки стерильним пінцетом.
- Наповнити пробірку до позначки в 2 см від верху пробірки (наприклад, до позначки 50 мл на пробірці) фосфатним буфером, 0,067 моль/л, pH 6,8 і перемішати вміст, перевертаючи пробірку.
- Центрифугувати при 3 000г протягом 15 хвилин.
- Обережно злити надосадову рідину в пляшку для відходів, що містить відповідний дезінфікуючий засіб.
- Здійснити посів осаду на двох скошених поверхнях живильного середовища Левенштейна-Йенсена (і на одній скошений поверхні живильного середовища Левенштейна-Йенсена з піруватом, якщо потрібно) або в рідке живильне середовище. За допомогою піпетки (не петлі) інокулювати по 3-4 краплі на кожну скошену поверхню середовища.

Шлункові змиви

Зразки змивів шлунка слід обробити якомога швидше після збору; кислотність може вбити мікобактерії в зразку, тому зразки шлункових змивів необхідно обробляти протягом чотирьох годин. Шлунковий аспірат слід зібрати в пробірку, що містить 100 мг бікарбонату натрію для нейтралізації, і негайно доставити в лабораторію. Дійте, як і у випадку зі зразками мокротиння.

Якщо зразок водянистий, центрифугуйте при 3 000 г протягом 15 хвилин, злийте надосадову рідину, ресуспендуйте осад у 5 мл стерильної дистильованої води і дійте, як і при дослідженні мокротиння.

Слизисто-гнійні матеріали

Поводитися таким самим чином, як і зі зразком мокротиння, якщо об'єм становить 10 мл.

Обробляти так само, як і зразки шлункових змивів. Якщо об'єм матеріалу становить більше 10 мл, обробляйте так само, як й у випадку зі зразками шлункових змивів.

Матеріали біологічних рідин

Якщо зразок був зібраний асептично, центрифугуйте та інокулюйте осад безпосередньо на/в живильне середовище, бажано рідке.

Матеріали, які не підлягають знезараженню:

- спинномозкова, синовіальна або інші біологічні рідини порожнини тіла;
- кістковий мозок;
- гній з холодних абсцесів;
- хірургічно резектовані зразки (за винятком аутопсійного матеріалу); та
- матеріал, отриманий з плевральної порожнини, печінки та лімфатичних вузлів, а також біопсії (за відсутності фістул).

Щоб максимально збільшити швидкість відновлення, весь об'єм СМР (або інший невеликий об'єм асептично зібраної рідини) слід культивувати, бажано в рідкому живильному середовищі.

Якщо зразок не був зібраний асептично:

- Якщо об'єм становить 10 мл або менше - поводьтеся так само, як й у випадку з мокротинням;
- Якщо об'єм перевищує 10 мл, поводьтеся так само, як і зі зразками шлункових змивів.

Тканини

Якщо біоптат вимагає обробки для отримання мазка та здійснення посіву, біоптат необхідно гомогенізувати в стерильній порцеляновій ступці або, краще, в невеликому одноразовому подрібнювачі тканин з 2-5 мл стерильного фізіологічного розчину.

Чашки, ступки з товкачем та подрібнювачі тканин необхідно ретельно очистити та стерилізувати, щоб запобігти отриманню хибнопозитивних результатів або забрудненню мікроорганізмами, що залишилися від попередніх зразків. Лімфатичні вузли, біоптати та інші хірургічно видалені тканини слід розрізати на невеликі шматочки стерильним скальпелем або ножицями. Гомогенізувати зразок у стерильній порцеляновій ступці з допомогою товкача або в подрібнювачі для тканин, використовуючи 5 мл стерильного фізіологічного розчину і невелику кількість стерилізованого піску. Здійсніть посів суспензії на/в живильне середовище.

5.5. Живильні середовища для посіву культур: принципи

Оскільки *M. tuberculosis* ростуть повільно, з періодом розмноження 18-24 години (інші бактерії розмножуються протягом декількох хвилин), звичайні бактеріологічні методи не застосовуються до культур мікобактерій. Більше того, вимоги до росту такі, що *M. tuberculosis* не буде рости в первинній ізоляції на простих, хімічно визначених середовищах. Єдиними живильними середовищами, які забезпечують інтенсивний ріст, є середовища, збагачені яйцями, що містять гліцерин і аспарагін, а також агар або рідкі живильні середовища, доповнені сироваткою або бичачим альбуміном. Для росту *M. tuberculosis* було розроблено багато різних живильних середовищ, які зазвичай поділяють на дві основні групи: тверді живильні середовища (на основі яєць та агару) та рідкі живильні середовища.

Для того, щоб запобігти росту неспецифічної флори до живильних середовищ можна додавати антибіотики.

Для виділення *M. tuberculosis* із біологічних зразків рекомендується використовувати як тверді, так і рідкі живильні середовища. Перевага твердих живильних середовищ над рідкими полягає в тому, що можна спостерігати колонії змішаних культур і забруднюючі домішки, тоді як рідкі живильні середовища сприяють швидшому росту мікобактерій.

Вибір живильного середовища залежить насамперед від типу зразка. Неселективні середовища рекомендується використовувати для зразків із зазвичай стерильних місць (кістковий мозок, зразки біопсії тканин, спинномозкова рідина та інші біологічні рідини тощо), тоді як селективні середовища, що містять антимікробні засоби для запобігання росту контамінуючих бактерій і грибків, рекомендується використовувати для забруднених (або потенційно забруднених) зразків (мокротиння, вміст абсцесів, бронхіальні змиви, шлункові змиви, сеча тощо) [1,2].

Найчастіше використовуються такі неселективні живильні середовища, як

- середовища на основі яєць: середовище Левенштейна-Йенсена (LJ) та середовище Огави
- середовища на основі агару: середовища Міддлбрука 7H10 та Міддлбрука 7H11; та
- рідкі живильні середовища: бульйон Міддлбрука 7H9.

Інші селективні живильні середовища, які широко використовуються, доступні в деяких країнах:

- Живильні середовища на основі яєць: середовище Левенштейна-Йенсена - модифікація Груфта (містить малахітовий зелений, пеніцилін та налідиксову кислоту в якості селективних агентів) та живильне середовище Левенштейна-Йенсена Мікобактозель (містить малахітовий зелений, циклогексимід, лінкоміцин та налідиксову кислоту в якості селективних агентів);
- Живильні середовища на основі агару: селективне середовище 7H11 (середовище Мітчісона), що містить карбеніцилін, амфотерицин B, поліміксин B і триметоприм в якості селективних агентів; та
- Рідкі живильні середовища: як правило, вони містять модифікований бульйон Міддлбрука 7H9 плюс суміш антимікробних препаратів. Для швидкого виявлення мікобактерій в рідких живильних середовищах комерційно розроблено кілька автоматизованих систем:
  - Система BACTEC µGIT 960 (Діагностичні системи BD [Бектон, Дікінсон і компанія]);
  - Система ESP Culture System II (Діагностичні системи Trek [Trek Diagnostic Systems[);
  - Система MB/BacT (bioMérieux).

5.6 Тверді живильні середовища

5.6.1 Живильні середовища на основі яєць

Живильне середовище Левенштейна-Йенсена (LJ), яке містить малахітовий зелений в якості інгібітора немікобактеріальних організмів, є найбільш часто використовуваним середовищем на основі яєць, особливо для культивування мокротиння. Живильне середовище LJ готується користувачем або випускають в пробірках з нахилом. Живильне середовище LJ, що містить гліцерин, сприяє росту *M. tuberculosis*, тоді як живильне середовище LJ без гліцерину, але з піруватом натрію, посилює ріст *M. bovis*. Обидва живильні середовища слід використовувати в географічних регіонах, де пацієнти можуть бути інфіковані обома мікроорганізмами [3]. Живильне середовище Огави - це живильне середовище LJ без аспарагіну. Неселективні живильні середовища на основі яєць можна зберігати в холодильнику протягом декількох місяців за умови, що кришки пробірок щільно закриті для мінімізації випаровування.

Недоліком живильних середовищ на основі яєць є те, що коли все ж таки відбувається забруднення, воно може охоплювати всю скошену поверхню, тому культура, як правило, втрачається. Якщо зразки містять мало бактерій, може пройти від трьох до восьми тижнів, перш ніж культура стане позитивною.

5.6.2 Живильні середовища на основі агару

Ці живильні середовища готують у похилих пробірках або планшетах, і ймовірність їх забруднення є меншою, ніж середовища на основі яєць. Середовища Міддлбрука 7H10 і 7H11 зазвичай готують в лабораторії з використанням наявних на ринку агарових порошкоподібних основ із додаванням збагачуваної добавки олеїнової кислоти-альбумін-декстрозо-каталази (OADC) Міддлбрука. Завдяки прозорості пластин 7H10 та 7H11, мікроколонії *M. tuberculosis* з типовим утворенням мікроскопічної структури, що нагадує нитки, можна виявити та підрахувати за допомогою мікроскопа вже через тиждень після інкубації. Крім того, морфологію колоній на планшетах з агаром видно краще, ніж на скошених середовищах на основі яєць, що полегшує ідентифікацію мікобактерій. Середовище Міддлбрука 7H11 є кращим за 7H10, оскільки містить 0,1% гідролізату казеїну - речовини, що сприяє відновленню стійких до ізоніазиду мікобактерій. Крім того, середовище 7H11 також краще підходить для вирощування штамів з множинною лікарською стійкістю (МЛС), оскільки вони можуть взагалі не рости на агарі 7H10.

Недоліком середовища Міддлбрука є те, що поверхня висихає швидше, ніж у живильному середовищі на основі яєць. Важливо знати, що денне світло, нагрівання та зберігання при температурі 4°C більше чотирьох тижнів може спричинити виділення формальдегіду в концентрації, достатній для пригнічення росту мікобактерій\.

5.6.3 Рідкі живильні середовища

Рідкі живильні середовища мають значну перевагу в часі порівняно з твердими живильними середовищами: 7-14 днів на рідкому середовищі Міддлбрука 7H9 порівняно з 18-28 днями на агарі Міддлбрука 7H11 або 21-42 днями на середовищі Левенштейна-Йенсена [5].

Однією з найпоширеніших автоматизованих систем для швидкого виявлення мікобактерій у рідких живильних середовищах є система BACTEC µGIT 960 [2]. Культуральні пробірки системи включають модифікований бульйон Міддлбрука 7H9, добавки для росту та суміші антимікробних препаратів. Подібний принцип використовується в системі ESP Culture System II та системі MB/BacT. У системі BACTEC 960 та ESP Culture System II ріст *M. tuberculosis* виявляють за швидкістю споживання кисню у вільному просторі культур; в системі MB/BacT колориметричний датчик визначає вироблення CO_2, розчиненого в культуральному середовищі.

5.6.4 Контроль якості середовища

Контроль якості живильних середовищ необхідний для того, щоб переконатися, що штам, виділений зі зразка, належить пацієнту, а не є забруднювачем, присутнім в інгредієнтах живильного середовища. Наведений нижче опис в основному стосується контролю якості твердих живильних середовищ, оскільки саме на таких середовищах колонії видно неозброєним оком, а тому є можливість ідентифікувати вид.

Комерційно виготовлені живильні середовища не потребують контролю якості на стерильність, ріст і селективність, за умови отримання документації щодо процедур контролю якості виробника [12]. Інформація повинна включати дату приготування, номер партії, термін придатності, використані тест-організми, дату тестування та результат. У всіх інших випадках (середовища, приготовані користувачем, і коли не надається документація щодо стерильності, росту та селективності), середовища необхідно перевірити на:

- параметри живильного середовища: колір, зневоднення, забруднення, бульбашки;
- стерильність: інкубація 1-3% кожної партії при температурі 35-37°C у 5-10% CO2 протягом 21 дня;
- ефективність: тестування росту позитивних і негативних контрольних штамів.

В якості позитивних контролів використовують *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177), M. kansasii ATCC 12478, M. scrofulaceum ATCC 19981, M. intracellulare ATCC 13950 та M. fortuitum ATCC 2841. Escherichia coli ATCC 25922 використовують для демонстрації часткового інгібування неселективними середовищами та повного інгібування селективними середовищами.

Процедура [1,2]:

- Приготуйте суспензію організмів за Мак-Фарландом зі стандартом мутності 0,5 у бульйоні 7H9.
- Інокулюйте 10 мкл контрольної суспензії до середовища з допомогою піпетки або каліброваної петлі. Для перевірки селективних властивостей живильних середовищ інокулюйте їх 10 мкл суспензії у співвідношенні 1:10 у стерильному 0,85% NaCl. Інкубувати всі середовища при температурі 35-37°C в 5-10% CO2 протягом 21 дня.
- Очікувані результати є наступними:

Позитивні контролі	Результат
M. tuberculosis ATCC 25177	Ріст мікроорганізмів на всіх живильних середовищах
M. kansasii ATCC 12478	Ріст мікроорганізмів на всіх живильних середовищах
M. scrofulaceum ATCC 19981	Ріст мікроорганізмів на всіх живильних середовищах
M. fortuitum ATCC 2841	Ріст мікроорганізмів на всіх живильних середовищах
M. intracellulare ATCC 13950	Ріст мікроорганізмів на всіх живильних середовищах (не враховується при тестуванні селективних середовищ, що містять пеніцилін або карбеніцилін)
Негативний контроль	**Результат**
Escherichia coli ATCC 25922	Часткове інгібування в неселективних живильних середовищах, повне інгібування в селективних живильних середовищах

5.7 Інокуляція в культуральну пробірку

5.7.1 Тверді живильні середовища

У живильних середовищах, придбаних у готовому до використання вигляді, часто спостерігається конденсована волога на культурі на скошеному агарі, тому бажано видалити її перед використанням. На кожну скошену поверхню слід інокулювати 0,2-0,4 мл (2-4 краплі або чотири петлі для посіву) відцентрифугованого осаду. Настійно рекомендується використовувати стерильні одноразові піпетки Пастера. Посівний матеріал повинен бути розподілений по всій скошеній поверхні зразка.

Слід інокулювати принаймні дві скошені поверхні середовища LJ на зразок, використовуючи 0,2 мл кожного осаду. На ділянках, де виділено M. bovis, рекомендується використовувати додаткову скошену поверхню, що містить піруват. Використання готового комерційного живильного середовища на основі яєць, доповненого сумішшю антибіотиків, може допомогти знизити рівень контамінації. Занадто мала кількість посівного матеріалу є поширеною причиною отримання хибнонегативних результатів. У верхній частині скошеної поверхні живильне середовище тонке і легко зневоднюється; якщо мікобактерії посіяти тільки на цю верхню частину, вони можуть не вирости, що знову ж таки призведе до хибнонегативного результату.

5.7.2 Рідкі живильні середовища

Внесення посівного матеріалу в рідкі живильні середовища слід проводити з суворим дотриманням умов суворої стерильності, щоб уникнути ризиків забруднення. Рідкі живильні середовища більш схильні до забруднення, ніж тверді, і тому їх необхідно доповнювати сумішшю специфічних антибіотиків для знищення забруднювачів. Ці суміші антибіотиків можна придбати в комерційних компаніях, що продають живильні середовища для автоматизованих систем виділення культур.

У кожну належним чином промарковану пробірку з рідкою культурою необхідно внести 0,5 мл осаду, та розмістити осад під поверхнею середовища, тримаючи пробірку з нахилом під кутом 45°. Потім пробірку повертають у вертикальне положення, залишаючи посівний матеріал під поверхнею рідини.

5.8 Інкубація культури

Всі культури слід інкубувати при температурі 35-37°C. Завжди перевіряйте температурний індикатор перед вирощуванням культур. Культури слід інкубувати до тих пір, поки не буде спостерігатися ріст мікроорганізмів, або видалити як негативні через 8-12 тижнів (шість тижнів, якщо використовується рідке живильне середовище).

Інокульовані тверді культури слід інкубувати з ослабленими кришками в нахиленому положенні протягом щонайменше одного тижня, щоб забезпечити рівномірний розподіл інокуляту. Потім кришки слід затягнути, щоб запобігти висиханню живильного середовища, і, якщо в інкубаторі потрібно більше місця, пробірки можна поставити вертикально. Кришки повинні бути щільно закриті, щоб мінімізувати випаровування, яке може призвести до висихання живильного середовища.

5.9 Культуральне дослідження

Для цього всі культури слід дослідити через 48 годин після посіву:

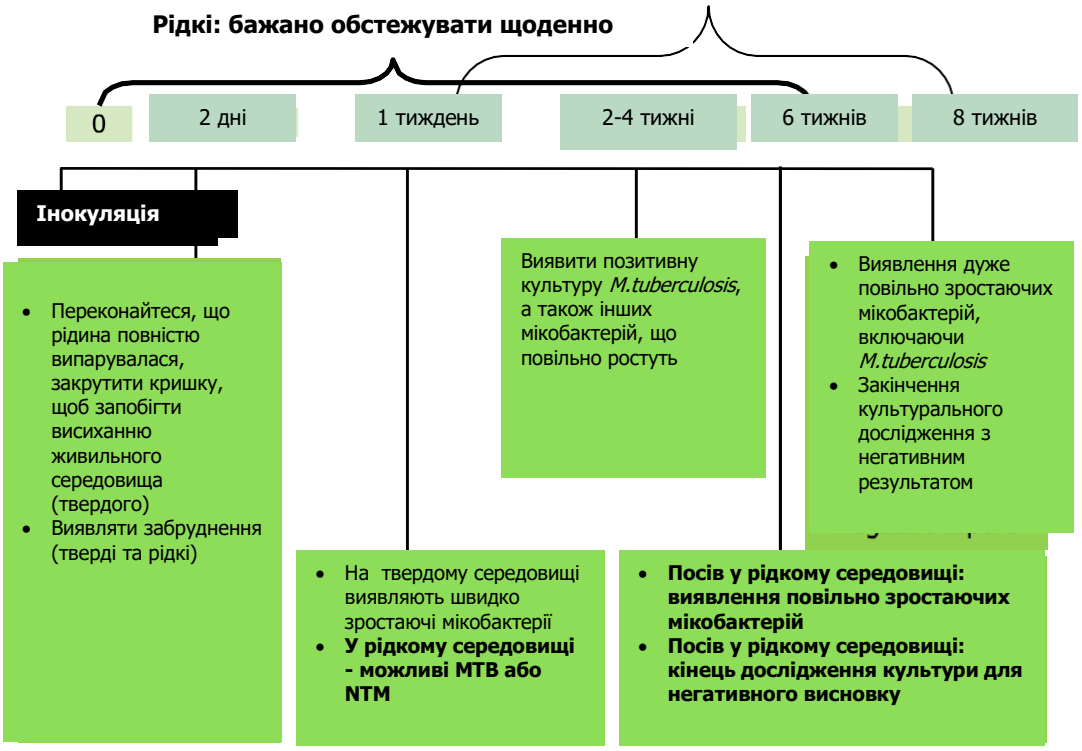
- перевірити всмоктування інокульованої рідини;
- закрутити кришки, щоб запобігти висиханню живильних середовищ; та
- раннє виявлення забруднення.

Культури слід досліджувати щотижня або, якщо це неможливо, принаймні тричі протягом восьми-тижневого інкубаційного періоду (рис. 6).

- Перевірка протягом семи днів: для виявлення мікобактерій, що швидко ростуть.
- Перевірка через три-чотири тижні для виявлення позитивних культур *M. tuberculosis*, а також інших повільно зростаючих мікобактерій.
- Завершення перевірка культури (через вісім тижнів) для виявлення дуже повільно зростаючих мікобактерій, у тому числі *M. tuberculosis*, перед тим, як відбракувати культуру і повідомити про культуру як негативну.

Рисунок 6. Мінімальний графік обстеження твердих культур

(тверді культури: бажано обстежувати щотижня)



Джерело: культура, ТМЧ і пакет забезпечення якості, ВООЗ [14]

Слід враховувати різні типи забруднюючих речовин: нетуберкульозні мікобактерії, гриби, бактерії та дріжджі.

Після фарбування методом ZN, культуру необхідно обробляти відповідно до результатів:

- Присутність в осаді тільки КСБ без присутності не-КСБ вказує на чистий ріст мікобактерій - осад слід обробити для ідентифікації та тестування на чутливість до препаратів (посів на планшеті з неселективним агаром, наприклад, кров'яним агаром, може бути використаний для перевірки на чистоту).
- Присутність в осаді КСБ з не-КСБ вказує на забруднення і можливий ріст мікобактерій - осад слід обробити для знезараження і посіяти на тверді живильні середовища.
- Відсутність КСБ і наявність лише не-КСБ в осаді вказує на ріст забруднюючих речовин - осад слід утилізувати.
- Будь-яку наявність забруднюючих речовин необхідно зареєструвати в лабораторному реєстрі, і якщо культуру утилізують, тоді її слід позначити як «забруднену культуру».
- Оцінку рівня забруднення слід проводити кожні три-шість місяців з метою забезпечення якості. Рівень забруднення 3-5% вважається хорошим балансом між необхідністю утилізувати забруднюючі бактерії і необхідністю збереження більшості туберкульозних мікобактерій, присутніх у зразку. Рівень забруднення 0-1% може свідчити про занадто сильний процес знезараження. Рівень забруднення повинен стосуватися кількості забруднених пробірок, а не кількості зареєстрованих зразків.

Нижче наведено докладну інформацію про поширені забруднюючі речовини [4]:

Нетуберкульозні мікобактерії:
- Швидко- або повільно-зростаючі бактерії;
- Кислотостійкі палички;
- Зазвичай не розташовуються у формі, що нагадує нитки.

Гриби:
- Зазвичай ростуть повільно;
- Не є кислотостійкими;
- Гіфи (трубчаста нитка грибів) є товщими ніж у мікобактерій.

Бактерії:
- Зазвичай не є кислотостійкими, за винятком деяких близькоспоріднених родів (Gordonia, Tsukamurella, Nocardia, Rhodococcus, Dietzia) та Legionella micdadei.

Дріжджі:
- Зазвичай некислотостійкі.

Ооцистис:
- Зазвичай некислотостійкі, за винятком Cryptosporidium, Isospora, Cyclospora.

5.10 Хроматографічний імуноферментний аналіз для якісного виявлення комплексу мікобактерій туберкульозу з культур

Використані аналізи: Capilia TB-neo, TAUNS Laboratories Co, Shizuoka, Японія, BD µGIT TBc Identification Test, BD (Бектон, Дікінсон і компанія) Diagnostic Systems, Sparks, MD, США, і SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid test, Abbott, Чикаго, Іллінойс, США.

5.10.1 Вступ

Точний ТБ-діагноз можна поставити шляхом ідентифікації мікроорганізмів комплексу *M. tuberculosis* з клінічного зразка після вирощування на твердих або в рідких живильних середовищах. Оскільки штами комплексу *M. tuberculosis* (за винятком деяких субштамів M. bovis BCG), але не нетуберкульозні мікобактерії, специфічно і переважно виділяють білок MPB64 (фракція мікобактеріального білка з БЦЖ з Rm 0,64), це може бути використано для того, щоб можна встановити відмінності між комплексом M. tuberculosis та нетуберкульозними мікобактеріями. Розроблено та оцінено імунохроматографічні аналізи на основі реакції моноклональних антитіл проти MPB64 [15-17].

5.10.2 Матеріали

Для проведення тесту не потрібно спеціального обладнання, достатньо використовувати тест, наданий виробником, піпетку на 100 мкл та таймер. Тест складається із зони розміщення зразка, зони тестування, що містить антитіла до MPB64, та контрольної зони, де фіксуються антитіла до видових імуноглобулінів.

5.10.3 Методи

Метод тестування базується на принципах імунохроматографії, в якому антитіла, мічені колоїдними частинками (наприклад, колоїдним золотом), реагують з антигенами клітки-мішені, утворюючи мігруючий комплекс антиген-антитіло, що захоплюється другим фіксованим антитілом. У місці фіксації мічених частинок відбувається реакція зміни кольору.

Тести можна використовувати з пробірками з позитивними рідкими середовищами або видимими колоніями, вирощеними на твердих живильних середовищах. У випадку з культурами в рідкому середовищі, на тестовий пристрій наносять об'єм 100 мкл. Для культур на твердому середовищі, повторно здійснюють суспендування у відповідному буфері 1 мкл бактерій (=1 мм петля) або 1 колонію КСБ+ (не менше 1 мм), потім перемішують на вортексі та використовують 100 мкл об'єму цих суспензій. Результати слід зчитувати через 15 хвилин, але не пізніше 60 хвилин після контакту.

5.10.4 Інтерпретація результатів

При специфічній реакції антиген-антитіло MPB64 червоно-фіолетова смуга стає видимою протягом 15 хвилин. Посів культури інтерпретується як позитивний на комплекс *M. tuberculosis*, якщо кольорова реакція відбувається в досліджуваній і контрольній зонах. Інтенсивність смуг може бути різною. Зразок інтерпретується як негативний, якщо кольорова реакція відбувається тільки в контрольній зоні. Тест вважається недійсним, якщо в контрольній зоні не видно жодної смуги або якщо колір фону перешкоджає інтерпретації тесту. На рисунку 7 наведено приклади хроматографічних імунологічних аналізів.

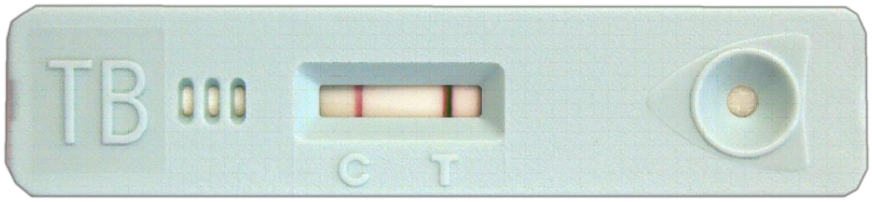
Хоча більшість штамів комплексу *M. tuberculosis* можна правильно ідентифікувати за допомогою тестів з високою чутливістю (92,4-99,2%) та специфічністю (100%), були виділені деякі тест-негативні штами [16,17]. У деяких випадках тест не виявляє M. tuberculosis (хибнонегативний результат) через мутації в гені mpb64 і, як наслідок, відсутності секреції білка MPB64 в культуральному середовищі [17].

5.10.5 Біобезпека

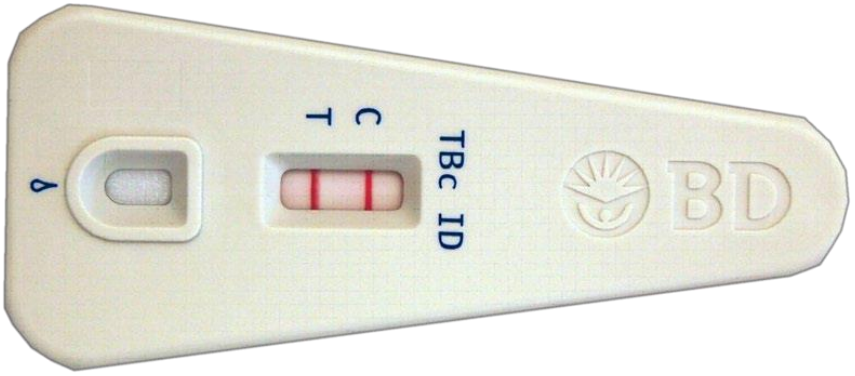
При роботі з мікобактеріями необхідно дотримуватися відповідних заходів біобезпеки. Процедура посіву, інкубацію та зчитування результатів тесту необхідно здійснювати у відповідній шафі біологічної безпеки в лабораторії РББ-3. Оскільки використані тест-пристрої можуть містити життєздатні мікобактерії, їх слід безпечно утилізувати відповідно до інституційних інструкцій щодо поводження з матеріалом, що відповідають 3-му рівню біобезпеки (див. Розділ 1).

Рисунок 7. **Приклади хроматографічних імуноферментних аналізів для якісного виявлення комплексу M. tuberculosis**

Аналіз Capilia™ TB-Neo для швидкого виявлення комплексу мікобактерій ТБ і нетуберкульозних мікобактерій



Імунохроматографічний аналіз BD MGIT™ для ідентифікації комплексу мікобактерій ТБ (TBc ID)



Розроблено з використанням 100 мкл КСБ+ рідка культура з позитивним мазком після 15 хвилин інкубації.

Список літератури

1. Migliori GB, Zellweger JP, Abubakar I, Ibraim E, Caminero JA, De Vries G, et al. European Union standards for tuberculosis care. Eur Respir J. 2012 Apr;39(4):807-19
2. De Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval PY, et al. Laboratory services in tuberculosis control. WHO Global Tuberculosis Programme. WHO/TB/98.258. Geneva: WHO; 1998
3. Leão SC, Martin A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo J, Telles MAS, et al. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Antwerp: Institute of Tropical Medicine Antwerp; 2004.
4. Iseman MD. A Clinician's Guide to Tuberculosis. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
5. Mase SR, Ramsay A, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Cunningham J, et al. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. Int J Tuberc Lung Dis. 2007 May;11(5):485-95.
6. Cirillo D, Piana F, Vincent V, Angra P, Barrera L, Boulahbal F, et al. Training package on culture of acid-fast bacilli and drug-susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. In: Tuberculosis Control Assistance Program. TB CAP Toolbox – TB CAP Laboratory Tools [CD ROM]. n.p.; 2009.
7. World Health Organization (WHO). Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013- 2014. Applicable as from 1 January 2013. Geneva: WHO; 2012 Available at: http://www.who.int/ihr/publications/who_hse_ihr_2012.12
8. Vincent V, van Deun A, Feldmann K, Barrera L, Paramasivan CN, Weyer K, et al. Guidance for countries on the preparation and implementation of TB laboratory standard operating procedures (WHO SOPs). In: Tuberculosis Control Assistance Program. TB CAP Toolbox – TB CAP Laboratory Tools 2009 [CD ROM].
9. Health Protection Agency (HPA), Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory. Investigation of specimens for Mycobacterium species. London: HPA; 2006. Available at: https://www.gov.uk/government/publications/smi-b-40-investigation-of-specimens-for-mycobacterium- species
10. Richmond JY, McKinney RW. Primary Containment for Biohazards: Selection, Installation and Use of Biological Safety Cabinets. 2nd Edition. Washington: U.S. Department of Health and Human Services; 2000. Available at: http://www.who.int/ihr/training/laboratory_quality/3_cd_rom_bsc_selection_use_cdc_manual.pdf
11. Drobniewski FA, Hoffner S, Rusch-Gerdes S, Skenders G, Thomsen V; WHO European Laboratory Strengthening Task Force. Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe. Eur Respir J. 2006 Nov;28(5):903-9.
12. World Health Organization (WHO). Laboratory biosafety manual – third edition. Geneva: WHO; 2004. Available at: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11
13. Tuberculosis Control Assistance Program. TB CAP Toolbox – TB CAP Laboratory Tools 2009 [CD ROM].
14. World Health Organization (WHO). Tuberculosis laboratory biosafety manual. Geneva: WHO; 2012. Available at: http://www.who.int/tb/publications/2012/tb_biosafety
15. Abe C, Hirano K, Tomiyama T. Simple and Rapid Identification of the Mycobacterium tuberculosis Complex by Immunochromatographic Assay using Anti-MPB64 Monoclonal Antibodies. J Clin Microbiol. 1999 Nov;37(11):3693-7.
16. Hillemann D, Rüsch-Gerdes S, Richter E. Application of the Capilia TB assay for culture confirmation of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. Int J Tuberc Lung Dis. 2005 Dec;9(12):1409-11.
17. Hirano K, Aono A, Takahashi M, Abe C. Mutations Including IS6110 Insertion in the Gene Encoding the MPB64 Protein of Capilia TB-Negative Mycobacterium tuberculosis Isolates. J Clin Microbiol. 2004 Jan;42(1):390-2.

6 Молекулярні методи швидкої діагностики туберкульозу та лікарсько-стійкого туберкульозу

Автори: Doris Hillemann, Sarah Mitchell, Francis Drobniewski

Рецензенти: Elisa Tagliani та Doris Hillemann (2022)

6.1 Передумови та принципи

За останнє десятиліття молекулярна біологія набула центральної ролі в діагностиці туберкульозу завдяки розробці нових молекулярних тестів, які часто називають тестами ампліфікації нуклеїнових кислот (ТАНК). Ці тести ґрунтуються на принципі ампліфікації цільових генів комплексу *M. tuberculosis*, що дозволяє швидше виявляти туберкульоз і лікарсько-стійкий туберкульоз, ніж при застосуванні традиційних методів, заснованих на культуральних дослідженнях. Крім того, деякі з цих тестів придатні для проведення на більш децентралізованих рівнях системи охорони здоров'я, що сприяє підвищенню доступності та якості лікування ТБ.

У цьому розділі представлено огляд найбільш поширених методів молекулярної діагностики для швидкого виявлення туберкульозу та лікарсько-стійкого туберкульозу в культуральних та клінічних зразках. Крім того, він включає опис застосування технології секвенування нового покоління (СНП) в сучасних умовах для прогнозування лікарської чутливості та резистентності, починаючи з клінічних зразків (тобто цільове СНП) і культурних ізолятів (тобто повногеномне секвенування).

6.2 Метод лінійних проб (лінійний зонд-аналіз)

Лінійні зонд-аналізи (LPA) належать до групи тестів, що ґрунтуються на технології DNA•STRIP (зворотна гібридизація). Процедура складається з трьох етапів: (i) виділення ДНК із знезаражених зразків легень або культивованого матеріалу (тверді або рідкі середовища); (ii) мультиплексна ампліфікація з біотинільованими праймерами; та (iii) зворотна гібридизація.

Смужки аналітичної мембрани покриті специфічними зондами, комплементарними ампліфікованим нуклеїновим кислотам. Після хімічної денатурації одноланцюгові амплікони зв'язуються з зондами (гібридизація). Високоспецифічне зв'язування комплементарних ланцюгів ДНК забезпечується суворими умовами, що дозволяє зондам надійно розрізняти кілька варіацій послідовності в досліджуваних ділянках генів. Кон'югована зі стрептавідином лужна фосфатаза зв'язується з біотином ампліконів через стрептавідинову групу. Потім лужна фосфатаза перетворює доданий субстрат на барвник, який стає видимим на мембранних смужках у вигляді кольорового осаду.

6.2.1 Лінійні зонд-аналізи для ідентифікація видів роду *Mycobacterium*

Для виявлення та диференціації мікобактерій безпосередньо з клінічних зразків (наприклад, GenoType cMdirect) та культивованих зразків (наприклад, GenoType Mycobacterium CM / AS, GenoType NTM-DR) наразі існує декілька варіантів тестів (Таблиця 11).

Таблиця 11. Типи та характеристики LPA, що використовуються для виявлення та диференціації мікобактерій

Диференціація	
GenoType MTBC	Виявлення комплексу *M. Tuberculosis* в культурах
GenoType cMdirect	Виявлення *M. tuberculosis* та 20 клінічно релевантних НТМБ у зразках, отриманих від пацієнтів
GenoType Mycobacterium CM	Виявлення комплексу *M. tuberculosis* та більше 20 клінічно релевантних НТМБ в культурах
GenoType Mycobacterium AS	Виявлення додаткових 19 НТМБ в культурах
Диференціація та ТМЧ	
GenoType NTM-DR	Виявлення НТМБ та їх резистентності до аміноглікозидів і макролідів в культурах
GenoType MTBDRplus V2	Виявлення комплексу *M. Tuberculosis* та його резистентності до рифампіцину та ізоніазиду
GenoType MTBDRsl V2	Виявлення комплексу *M. Tuberculosis* та його резистентності до фторхінолонів та аміноглікозидів/циклічних пептидів
LPA Genoscholar PZA-TB II	Виявлення резистентності до піразинаміду в ізолятах, отриманих від пацієнтів з бактеріально підтвердженою легеневою формою ТБ
Проказа	
GenoType LepraeDR	Виявлення *M. leprae* та резистентності до рифампіцину, офлоксацину та дапсону в зразках, отриманих від пацієнтів

У всіх наборах серії GenoType однаковий склад, включаючи мембранні смужки, вкриті специфічними зондами, і різні розчини для денатурації, гібридизації, промивання та колориметричної реакції. Крім того, набір включає ампліфікаційні суміші AM-A (містить буфер, нуклеотиди і Taq-полімеразу) і AM-B (містить солі, специфічні праймери і барвник).

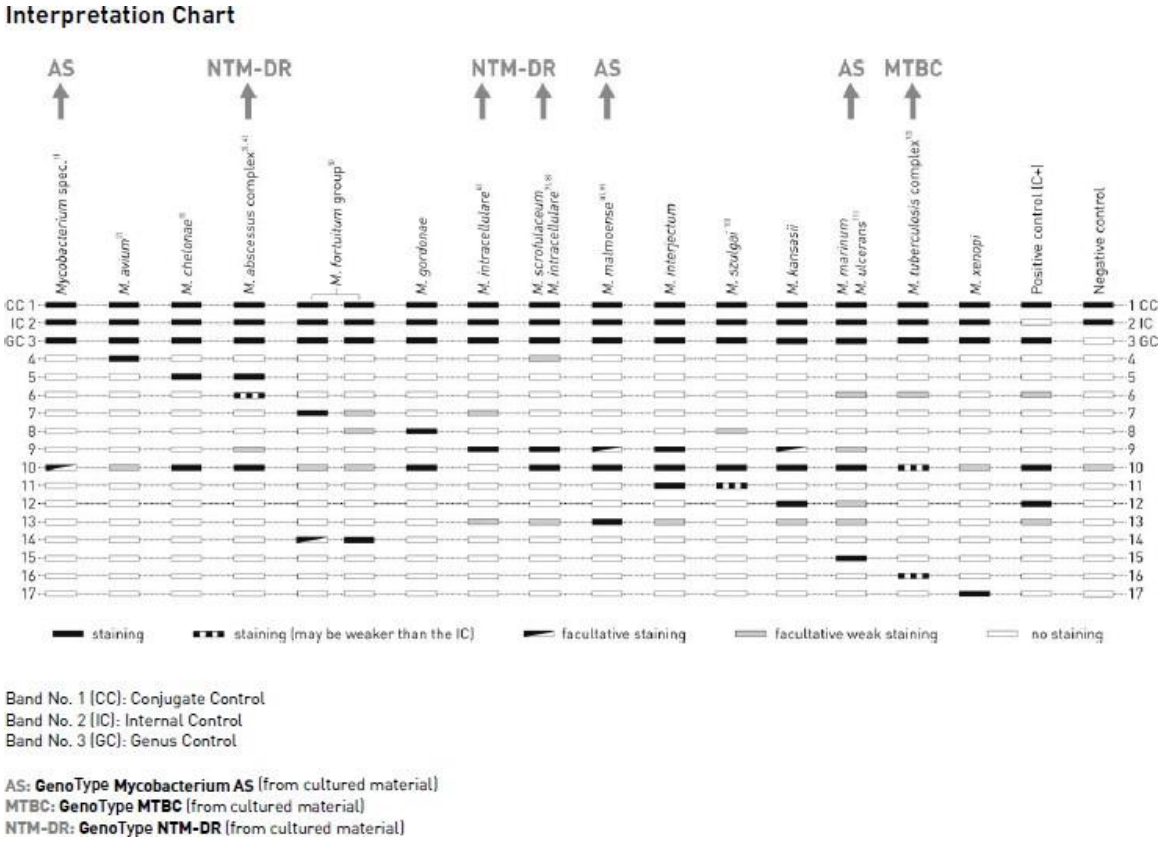
Перед виділенням ДНК необхідно провести знезараження зразка (наприклад, за допомогою гідроксиду натрію та N-ацетилцистеїну) та концентрування зразка шляхом центрифугування. Ця процедура повинна проводитися з дотриманням відповідних вимог біобезпеки. Виділення ДНК можна виконати за допомогою набору (наприклад, GenoLyse) того ж самого виробника.

Важливо, щоб підготовка реакції ампліфікації проводилася в спеціально призначеній для цього лабораторній зоні (чиста зона), щоб зменшити ризик перехресного забруднення або перенесення контамінації.

Реакція ампліфікації базується на стандартному протоколі, де кількість циклів залежить від того, чи проводиться тест безпосередньо на клінічному зразку, чи на культивованому.

Реакцію гібридизації ампліфікованих продуктів можна проводити вручну, використовуючи водяну баню і TwinCubator, або автоматично, наприклад, за допомогою приладу GT-Blot 48. Для інтерпретації результатів тесту зверніться до таблиці інтерпретації, що міститься в кожному наборі (приклад наведено нижче, рис. 8). Для отримання більш детальної інформації про процедуру аналізу зверніться до спеціальної інструкції з використання, доступної в наборі та на веб-сайті виробника.

Рисунок 8. Інтерпретація результатів аналізу GenoType cMdirect



Оригінал	Переклад
Interpretation chart	Таблиця інтерпретації результатів
staining	забарвлення
staining (may be weaker than the IC)	забарвлення (може бути слабкішим за ВК)
facultative staining	факультативне забарвлення
facultative weak staining	слабке факультативне забарвлення
no staining	забарвлення відсутнє
band	смужка
Conjugate control (CC)	Кон'югований контроль (КК)
Internal control (IC)	Внутрішній контроль (ВК)
Genus control (GC)	Родовий контроль (РК)
from cultured material	з культивованого матеріалу

6.2.2 Лінійні зонд-аналізи для ідентифікації комплексу *M. tuberculosis* та виявлення медикаментозної резистентності у легеневих клінічних та культуральних зразках

Двома найбільш широко використовуваними в Європейській мережі референс-лабораторій з туберкульозу тестами LPA для виявлення комплексу *M. tuberculosis* та медикаментозної резистентності є GenoType MTBDRplus V2 та GenoType MTBDRsl V2 (Bruker-Hain Lifescience, Нерен, Німеччина). В обох випадках резистентність до препаратів виявляється завдяки зв'язуванню ампліконів із зондами, націленими на найпоширеніші мутації щодо препаратів першого та другого ряду, або відсутності зв'язування із зондами дикого типу.

Вони можуть використовуватися для тестування зразків мокротиння з позитивним мазком (наприклад, GenoType MTBDRplus) або зразків мокротиння незалежно від статусу мазка (наприклад, GenoType MTBDRsl V2), а також для виявлення культурних ізолятів (непряме тестування) [1].

З огляду на складність аналізу, необхідність використання декількох одиниць обладнання та вимоги до лабораторної інфраструктури, LPA зазвичай впроваджуються в закладах охорони здоров'я середнього та вищого рівнів. Використання LPA дозволяє отримати результати тестування на медикаментозну чутливість (ТМЧ) за 24-48 годин.

GenoType MTBDRplus V2 дозволяє одночасно виявляти комплекс *M. tuberculosis* та резистентність до рифампіцину та ізоніазиду шляхом таргетування мутацій у промоторі inhA (від -15 до -8 нуклеотидів вище по ходу транскрипції) та katG (кодон 315), а також у зоні, що визначає резистентність до рифампіцину (RRDR) гена rpoB (від кодону 424 до 452, номенклатура *M. tuberculosis* H37Rv) [2].

GenoType MTBDRsl V2 дозволяє одночасно виявляти комплекс *M. tuberculosis* та резистентність до фторхінолонів (наприклад, левофлоксацину та моксифлоксацину) та аміноглікозидів/циклічних пептидів (наприклад, амікацину, канаміцину та капреоміцину). Аналіз включає ділянки, що визначають резистентність до хінолонів (QRDR) генів gyrA (від кодону 85 до 96) і gyrB (від кодону 536 до 541) для виявлення резистентності до фторхінолонів, а також rrs (позиції нуклеїнових кислот 1401, 1402 і 1484) і промоторні ділянки eis (від -37 до -2 нуклеотидів вище по ходу транскрипції) для виявлення резистентності до ін'єкційних препаратів другого ряду [3].

Загальна чутливість та специфічність LPA до різних препаратів детально описана в консолідованому керівництві ВООЗ з туберкульозу, Модуль 3 [1].

У 2021 році ВООЗ рекомендувала використовувати LPA Genoscholar PZA-TB II (Nipro) для виявлення резистентності до піразинаміду в ізолятах від пацієнтів з бактеріологічно підтвердженою легеневою формою туберкульозу [1]. Аналіз спрямований на фрагмент з 700 пар основ, що охоплює всю область кодування pncA та 18 нуклеотидів вище по ходу транскрипції. Аналіз складається з 48 зондів, включаючи три зонди, які дозволяють виявляти «тихі» мутації, не пов'язані з резистентністю до піразинаміду. Резистентність визначається завдяки відсутності зв'язування з зондами дикого типу. Практичні рекомендації щодо застосування тесту Nipro Genoscholar PZA-TB II наведені в Інформаційному листі (Додаток 2.6) до Оперативного керівництва ВООЗ з туберкульозу. Модуль 3: діагностика [4].

Що стосується LPA, які використовуються для ідентифікації мікобактерій та виявлення резистентності до лікарських засобів, то процедура тестування цього класу LPA включає три етапи: виділення ДНК, мультиплексна ампліфікація з використанням біотинільованих праймерів та зворотна гібридизація на нітроцелюлозних смужках.

При роботі з мікобактеріями необхідно дотримуватися відповідних заходів біобезпеки. Перенесення бактерій у пробірки та термічна інактивація під час підготовки ДНК повинні здійснюватися у відповідній ШББ в лабораторії РББ-3. Після інактивації мікроорганізмів процес може бути продовжений за межами РББ-3.

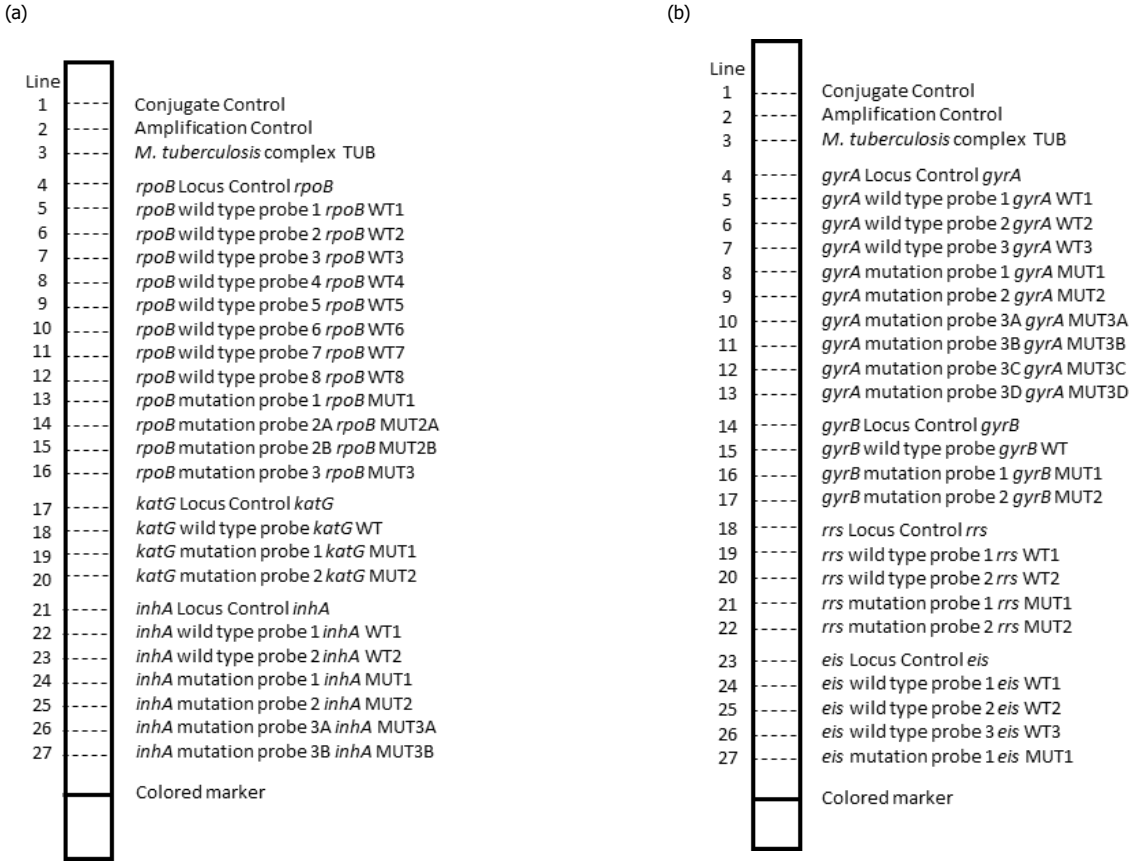
Підготовка реакції ампліфікації та протокол ампліфікації суміші ідентичні тим, що описані в розділі 6.2.1. Більш детальна інформація про процедури аналізу наведена в інструкції з використання набору [2, 3].

Конфігурація смужок GenoType MTBDRplus V2 та GenoType MTBDRsl V2 проілюстрована на рисунку 9.

Практичні рекомендації щодо інтерпретації аналізів GenoType MTBDR, включаючи інформацію про зв'язок конкретних мутацій з фенотипічною резистентністю, випадки, коли конкретні мутації, що спричиняють резистентність, не ідентифіковані і резистентність можна лише припустити, дії, які необхідно виконати при виявленні певних мутацій, а також клінічні наслідки конкретних мутацій LPA для вибору відповідного лікування туберкульозу, наведені в документі Глобальної Лабораторної Ініціативи/ВООЗ «Лінійні зонд-аналізи для виявлення лікарсько-стійкого туберкульозу: Посібник з інтерпретації та складання звітів для працівників лабораторій та клініцистів» [5].

Оригінал	Переклад
Line	Рядок
Conjugate control	Кон’югований контроль
Amplification control	Ампліфікований контроль
M .tuberculosis complex TUB	*M .tuberculosis* комплекс TUB
Locus control	Локус-контроль
wild type probe	зонд дикого типу
mutation probe	зонд мутації
Colored marker	забарвлений маркер

Рисунок 9. Конфігурація смужок GenoType MTBDRplus V2 (a) та GenoType MTBDRsl V2 (b)



6.3 Аналізи на основі ПЛР у реальному часі для ідентифікації комплексу *M. tuberculosis* та виявлення резистентності до лікарських засобів

За останні роки досить швидко розробляються нові тести на основі ПЛР у реальному часі для діагностики туберкульозу з визначенням або без визначення медикаментозної резистентності. ВООЗ рекомендує та підтримує розробку та застосування нових швидких і точних методів діагностики, спрямованих на одночасне виявлення комплексу *M. tuberculosis* та наявності медикаментозної резистентності, як найкращу стратегію для вдосконалення лабораторної діагностики туберкульозу. Кілька рекомендованих ВООЗ швидких методів діагностики (WRD) наразі пропонують варіанти для різних умов, але для забезпечення відповідності обраного молекулярного методу діагностики конкретній клінічній ситуації необхідно враховувати міркування щодо можливостей тестування, діагностичної ефективності та доцільності проведення тесту в лабораторних умовах [6].

Оскільки все більша кількість WRD слугує подібним цілям, ВООЗ згрупувала їх у класи, визначені за типом технології (наприклад, автоматизована або зворотна гібридизація, тести ампліфікації нуклеїнових кислот [ТАНК]), складність виконання тесту (наприклад, низька, помірна або висока - з урахуванням вимог до інфраструктури, обладнання та технічних навичок персоналу лабораторії) та цільові умови (наприклад, діагностика туберкульозу та виявлення резистентності до препаратів першого або другого ряду) [4].

У цьому розділі ми надаємо опис тестів на основі ПЛР у реальному часі, які найчастіше використовуються в Європейській мережі референс-лабораторій з туберкульозу, включаючи міркування щодо їх ключових операційних аспектів та аспектів впровадження. Також надаються посилання на керівні документи, посібники з впровадження та навчальні пакети.

Цей розділ не має на меті надати детальний опис процедури тестування, натомість тут надаються посилання на спеціальні інструкції з використання та посібники з експлуатації, випущені виробниками аналізаторів.

6.3.1 Одноразова система на основі картриджу для обробки зразків з інтегрованим мультиколірним приладом для ПЛР у реальному часі для виявлення комплексу *M. tuberculosis* та визначення резистентності до лікарських препаратів

Xpert MTB/ RIF та Xpert MTB/ RIF Ultra

Xpert MTB/RIF та Xpert MTB/RIF Ultra (Ultra) (Cepheid, Саннівейл, США) - це ПЛР-аналізатори на основі картриджу для одночасного виявлення комплексу *M. tuberculosis* та стійкості до рифампіцину в клінічних зразках. Це повністю автоматизовані тести, оскільки картридж містить всі реагенти, необхідні для лізису бактерій, екстракції нуклеїнових кислот, ампліфікації та виявлення ампліконів. Єдине, що робиться вручну, - це додавання бактерицидного буферу для лізису до зразка, що значною мірою усуває занепокоєння з приводу біобезпеки під час процедури тестування. Загалом, від обробки зразка до автоматичної інтерпретації та видачі результатів минає близько 2 годин.

Xpert MTB/RIF та Xpert Ultra працюють на тій самій платформі GeneXpert (тобто на шестиколірному оптичному приладі), а також на нещодавно випущеному 10-колірному оптичному приладі GeneXpert [7].

Тест Xpert Ultra, випущений у 2017 році як тест нового покоління, має підвищену чутливість для виявлення комплексу *M. tuberculosis* порівняно з Xpert MTB/RIF, оскільки він спрямований на два мультикопійні гени (IS6110 та IS1081) замість одного (rpoB), має більшу реакційну камеру для ДНК, а також покращені рідини та ензими [8]. Xpert Ultra використовує ті ж напівкількісні категорії для виявлення комплексу *M. tuberculosis*, що і Xpert MTB/RIF (тобто високий, середній, низький і дуже низький), з додатковою категорією «слід» для ідентифікації зразків мікобактерій, позитивних до мішеней IS6110/IS1081, але негативних до rpoB. У цьому випадку результат щодо чутливості або резистентності до рифампіцину не надається.

Одночасне виявлення резистентності до рифампіцину досягається шляхом націлювання на ділянку RRDR гена rpoB. В аналізі Xpert MTB/RIF резистентність виявляється в разі відсутності або затримки зв'язування одного або більше з п'яти зондів з ділянкою RRDR, в той час як в Xpert Ultra є чотири нестійких молекулярних маяка, призначених для виявлення мутацій за вимірюваними зміщеннями піків температур плавлення зондів. Це підвищує здатність Xpert Ultra виявляти мутації в певних кодонах (наприклад, 452), правильно ідентифікувати мутації в змішаних і олігобацилярних зразках, а також диференціювати синонімічні мутації від мутацій, пов'язаних з резистентністю [8].

Нещодавно були опубліковані об'єднані показники чутливості та специфічності Xpert Ultra та Xpert MTB/RIF щодо виявлення туберкульозу та медикаментозної резистентності в легеневих та позалегеневих зразках у дорослих та дітей [9-12]. Якщо коротко, то для легеневої форми ТБ зведена чутливість і специфічність Xpert Ultra на відміну від культури становила 90,9% (86,2-94,7) і 95,6% (93,0-97,4), тоді як зведена чутливість і специфічність Xpert MTB/RIF становила 84,7% (78,6-89,9) і 98,4% (97,0-99,3). Для виявлення резистентності до рифампіцину об'єднана чутливість та специфічність склала 94,9% (88,9-97,9) та 99,1% (97,7-99,8) для Xpert Ultra порівняно з 95,3% (90,0-98,1) та 98,8% (97,2-99,6) для Xpert MTB/RIF. Більша кількість невизначених результатів щодо резистентності до рифампіцину була виявлена при застосуванні Xpert Ultra, об'єднана частка 7,6% (від 2,4 до 21,0) порівняно з об'єднаною часткою Xpert MTB/RIF 0,8% (від 0,2 до 2,4), з оціночною різницею в об'єднаній частці невизначених результатів для Xpert Ultra порівняно з Xpert MTB/RIF 6,7% (від 1,4 до 20,1) [1].

У 2020 році ВООЗ оновила рекомендації щодо використання Xpert MTB/RIF та Xpert Ultra як первинних діагностичних тестів для дорослих та дітей з ознаками та симптомами легеневого та позалегеневого ТБ [1]. Також були надані оновлені рекомендації щодо інтерпретації результату «слід» Xpert Ultra у ВІЛ-негативних людей, згідно з якими слід вважати первинний «слід» істинно позитивним результатом у пацієнтів без попереднього епізоду туберкульозу або без нещодавнього лікування ТБ. Таким пацієнтам більше не рекомендується повторювати тест Xpert Ultra у разі отримання позитивного результату «слід». Та навпаки, інтерпретація результату «слід» у пацієнтів, які раніше хворіли на ТБ, може потребувати подальшого клінічного обстеження та додаткових інструментів для виключення хибно позитивного результату. У разі невизначеного результату на рифампіцин через низьке бактеріальне навантаження в зразку (тобто виявлення «дуже низького» рівня або «слідів» МБТ) слід провести додаткові дослідження, щоб підтвердити або виключити резистентність до препарату.

Xpert MTB/ XDR

Тест Xpert MTB/XDR (Cepheid, Саннівейл, США) виявляє ДНК комплексу *M. tuberculosis* та геномні мутації, пов'язані зі стійкістю до ізоніазиду, фторхінолонів, етіонаміду та ін'єкційних препаратів другого ряду (амікацин, канаміцин та капреоміцин) в одному картриджі, приблизно за 90 хвилин [13]. Процедура обробки зразків і поводження з картриджами такі ж, як і для Xpert MTB/RIF і Xpert Ultra, однак Xpert MTB/XDR працює з 10-колірною оптикою GeneXpert замість шестиколірної, яка традиційно використовується для тестів Xpert MTB/RIF і Xpert Ultra. Xpert MTB/XDR націлений на гени, кодонові області та нуклеотидні послідовності, наведені в Таблиці 12.

Таблиця 12. Гени, кодонові області та нуклеотидні послідовності, на які спрямований тест Xpert MTB/XDR

Препарат	Ген-мішень	Кодонові області	Нуклеотиди
Ізоніазид	inhA промотор	Не застосовується	–1 до –32 міжгенної ділянки
	katG	311–319	939–957
	fabG1	199–210	597–630
	oxyR-ahpC міжгенна ділянка	Не застосовується	–5 до –50 міжгенної ділянки (або –47 до –92)[a]
Етіонамід	inhA промотор	Не застосовується	–1 до –32 міжгенної ділянки
Фторхінолони	gyrA	87–95	261–285
	gyrB	531–544 (або 493–505)[a]	1596–1632
Амікацин, канаміцин, капреоміцин	rrs	Не застосовується	1396–1417
Амікацин, канаміцин	eis промотор	Не застосовується	–6 до –42 міжгенної ділянки

[a] Система нумерації кодонів за Camus et al. (2002), згідно з Cepheid, Клінічною оцінкою тесту Xpert MTBXDR, Звітом R244C2 Xpert MTB/XDR Вер. 1.0.

Тести Xpert MTB/XDR призначені для використання в якості рефлекторного тесту (повторний тест, який автоматично ініціюється клінічною/мікробіологічною лабораторією, коли первинний результат тесту відповідає заздалегідь визначеним критеріям, наприклад, позитивний або виходить за межі норми) для дослідження зразків мокротиння, як необробленого, так і концентрованого, з позитивним результатом на наявність комплексу *M. tuberculosis*. Межа виявлення комплексу *M. tuberculosis* за допомогою Xpert MTB/XDR (136 КУО/мл у необробленому мокротинні) подібна до такої у Xpert MTB/RIF (112,6 КУО/мл), але вища, ніж у Xpert Ultra (15,6 КУО/мл). В інструкції до набору зазначено, що зразки з результатом «слід» на Xpert Ultra, як очікується, будуть нижчими за межу виявлення Xpert MTB/XDR і тому не рекомендуються для тестування цим набором [14].

Мутації, пов'язані з резистентністю до ізоніазиду, фторхінолонів, етіонаміду та ін'єкційних препаратів другого ряду, виявляються за допомогою вимірюваних зсувів піків температури плавлення зондів (тобто нестійких молекулярних маяків). Детальний опис дизайну, розробки та аналітичних характеристик тесту був опублікований [15], а дані про діагностичну точність виявлення резистентності до ізоніазиду, фторхінолонів, етіонаміду та амікацину у людей з ТБ, виявленої за допомогою Xpert MTB/XDR, отримані в результаті двох багатоцентрових досліджень, були нещодавно переглянуті [16].

Якщо коротко, незалежно від резистентності до рифампіцину, зведена чутливість і специфічність до ізоніазиду становила 94,2% (87,5-97,4) і 98,5% (92,6-99,7) на відміну від фенотипічного ТМЧ, тоді як зведена чутливість і специфічність до фторхінолонів становила 93,2% (88,1-96,2) і 98,0% (90,8-99,6).

У людей з відомою резистентністю до рифампіцину сумарна чутливість і специфічність визначення резистентності до етіонаміду становила 98,0% (від 74,2 до 99,9) і 99,7% (від 83,5 до 100,0) на відміну від генотипового ТМЧ, тоді як сумарна чутливість і специфічність визначення резистентності до амікацину становила 86,1% (від 75,0 до 92,7) і 98,9% (від 93,0 до 99,8) на відміну від фенотипічного ТМЧ [16].

Рекомендації ВООЗ щодо використання Xpert MTB/XDR для людей з бактеріологічно підтвердженим легеневим туберкульозом, з резистентністю до рифампіцину або без неї, наведені в консолідованому керівництві ВООЗ, модуль 3: діагностика, а додаткові міркування щодо операційних особливостей Xpert MTB/XDR та аспектів впровадження доступні в інформаційному листі (Додаток 2.5) Оперативного керівництва ВООЗ з туберкульозу. Модуль 3: діагностика [4].

6.3.2 Мікро-ПЛР на основі чипа в режимі реального часу для виявлення комплексу *M. tuberculosis* та резистентності до рифампіцину

Тести Truenat MTB, MTB Plus та MTB-RIF Dx

Тести Truenat MTB, MTB Plus та MTB-RIF Dx (Molbio Diagnostics, Гоа, Індія) використовують мікро-ПЛР на основі чипа в режимі реального часу для напівкількісного виявлення комплексу *M. tuberculosis* (аналізи MTB та MTB Plus) та резистентності до рифампіцину (аналіз MTB-RIF Dx) безпосередньо у зразках мокротиння (незалежно від статусу мазка) і можуть видавати результати менш ніж за годину.

У тест-системі Truenat використовуються два портативних пристрої, що працюють від батарейок: універсальний пристрій для підготовки зразків Trueprep AUTO v2 на основі картриджів для автоматизованої екстракції та очищення ДНК і аналізатор Truelab Real Time micro-PCR для проведення ПЛР у реальному часі. Система використовує стабільні при кімнатній температурі реагенти (Trueprep™ AUTO Sample Pre-treatment and Prep kits) і мікро ПЛР-чіпи Truenat. Аналізатор Truelab доступний з 1 (Uno), а також з 2 (Duo) або 4 (Quattro) портами для чипів, що дозволяє проводити незалежне тестування декількох зразків одночасно.

Всі реагенти та витратні матеріали, необхідні для проведення тестових процедур, надаються виробником, за винятком засобів індивідуального захисту (той же рівень захисту, що і для мікроскопії або Xpert MTB/RIF), таймера та дезінфікуючого засобу на основі гіпохлориту [17]. Система призначена для роботи в периферійних лабораторіях з мінімальними вимогами до інфраструктури і може функціонувати при температурі навколишнього середовища до 40°C і відносній вологості до 80% [1].

Виявлення комплексу *M. tuberculosis* за допомогою Truenat MTB досягається шляхом визначення однієї копії гена (nrdB). Truenat MTB Plus має вищу чутливість, ніж Truenat MTB, оскільки він націлений на декілька генів (nrdZ та IS6110). Це призводить до того, що межа виявлення становить 30 КУО/мл для Truenat MTB Plus порівняно зі 100 КУО/мл для Truenat MTB [17]. Якщо отримано позитивний результат за допомогою тесту MTB або MTB Plus, аліквоту виділеної ДНК тестують за допомогою Truenat MTB-RIF Dx для виявлення мутацій, пов'язаних з резистентністю до рифампіцину. Мутації резистентності виявляються за допомогою аналізу розплавлення зонда в продуктах ПЛР в реальному часі, що займає приблизно додаткову годину.

Детальні стандартні операційні процедури для підготовки зразків мокротиння, виділення ДНК та ПЛР-ампліфікації описані в Практичному посібнику Партнерства «Зупинимо туберкульоз» із застосування тестів Truenat [17]. Якщо коротко, то ДНК виділяється з попередньо оброблених зразків мокротиння за допомогою картриджа, специфічного для набору, та приладу Trueprep AUTO v2. Цей процес займає приблизно 20 хвилин. Автоматизована ПЛР-ампліфікація та виявлення виділеної ДНК за допомогою флуоресцентного зонду на аналізаторі Truelab займає 35 хвилин. Результати Truenat MTB Plus є напівкількісними (тобто рівень вмісту мікобактерій ТБ визначається як високий, середній, низький або дуже низький).

ВООЗ рекомендує використовувати Truenat MTB та MTB Plus для дорослих та дітей з ознаками та симптомами легеневої форми туберкульозу в якості початкового діагностичного тесту на туберкульоз замість мікроскопії мазка або культурального дослідження. Натомість Truenat MTB-RIF Dx рекомендується використовувати для людей з ознаками та симптомами легеневої форми ТБ і позитивним результатом Truenat MTB або MTB Plus в якості початкового тесту на виявлення резистентності до рифампіцину, замість культурального та фенотипічного дослідження [1]. Докази, розглянуті ВООЗ щодо використання тестів Truenat для виявлення комплексу *M. tuberculosis* та резистентності до рифампіцину, були отримані в ході багатоцентрового проспективного клінічного дослідження, яке проводилося в передбачуваних умовах використання (тобто в центрах мікроскопії). Порівняно з культуральним методом, ключові характеристики ефективності цих тестів серед людей з ознаками та симптомами легеневої форми туберкульозу підсумовані в Таблиці 13.

Таблиця 13. Діагностична точність тестів Truenat MTB, MTB Plus та MTB-RIF Dx на відміну від культурального дослідження в умовах центру мікроскопії (за даними оціночного дослідження FIND)[18]

Тест	Чутливість (усі пацієнти)	Чутливість (пацієнти з позитивним зразком мокротиння)	Чутливість (пацієнти з негативним зразком мокротиння)	Специфічність (усі пацієнти)
Truenat MTB	0,73	0,91	0,37	0,98
Truenat MTB Plus	0,80	0,96	0,46	0,97
Truenat MTB-RIF Dx	0,84	0,88	0,67	0,95

Цікаво, що результати цього багатоцентрового дослідження точності також показали, що частота невизначених результатів щодо резистентності до рифампіцину варіювала залежно від бактеріального навантаження зразка, що свідчить про те, що чутливість Truenat MTB Plus для виявлення МБТ, ймовірно, вища, ніж у чипа Truenat MTB-RIF Dx для виявлення резистентності до рифампіцину [18].

6.3.3 Централізоване тестування для виявлення комплексу *M. tuberculosis* та визначення резистентності до рифампіцину та ізоніазиду

Нещодавно на ринку з'явився новий клас технологій, які дозволяють проводити тестування за допомогою специфічних для кожного захворювання тестів на одній платформі. Кілька виробників розробили автоматизовані тести ампліфікації нуклеїнових кислот (ТАНК) середньої складності для виявлення комплексу *M. tuberculosis* та резистентності до рифампіцину та ізоніазиду на цих високопродуктивних приладах. Ці тести виконуються швидше і менш складно, ніж фенотипічні ТМЧ і LPA на основі культури, оскільки вони здебільшого автоматизовані. Однак вони можуть вимагати початкової ручної обробки зразків перед перенесенням досліджуваного матеріалу в пробірку для обробки зразків. Крім того, повинні бути вжиті належні заходи біобезпеки, бути наявним обладнання для конкретного тесту, добре навчений і кваліфікований лабораторний персонал для налаштування тестів і проведення необхідного технічного обслуговування обладнання [1]. З міркувань вартості та економії на масштабах, ці тести, як правило, проводяться централізовано.

У 2019 році ВООЗ оцінила точність чотирьох різних централізованих тестів щодо виявлення комплексу *M. tuberculosis* та резистентності до рифампіцину та ізоніазиду [19, 20], а у 2020 році видала рекомендації щодо їх використання для зразків з респіраторних шляхів в якості початкових тестів замість культурального та фенотипічного ТМЧ для виявлення комплексу *M. tuberculosis* та резистентності як до рифампіцину, так і до ізоніазиду в осіб з ознаками та симптомами легеневої форми туберкульозу [1].

Чотири технології та тести, які наразі включені ВООЗ до класу автоматизованих ТАНК помірної складності: i) тести Abbott RealTime MTB та MTB RIF/INH; ii) тести Roche cobas MTB та MTB-RIF/INH; iii) тест Hain FluoroType MTBDR; та iv) тест BD MAX MDR-TB.

За даними систематичного огляду, проведеного на замовлення ВООЗ, загальна об'єднана чутливість для виявлення комплексу *M. tuberculosis* на відміну від культурального дослідження становила 93,0% (90,9-94,7%), а специфічність - 97,7% (95,6-98,8%). Загальна об'єднана чутливість для виявлення резистентності до рифампіцину порівняно з фенотипічним ТМЧ становила 96,7% (93,1-98,4%), а специфічність - 98,9% (97,5-99,5%), тоді як загальна об'єднана чутливість для виявлення резистентності до ізоніазиду порівняно з фенотипічним ТМЧ становила 86,4% (82,8-89,3%), а специфічність - 99,2% (98,1-99,7%) [1, 21].

Тести Abbott RealTime MTB та MTB RIF/ INH

Компанія Abbott Molecular (Чикаго, Іллінойс, США) має один ТАНК для виявлення комплексу *M. tuberculosis* (тест RealTime MTB) та один для одночасного виявлення резистентності до рифампіцину та ізоніазиду (тест RealTime MTB RIF/INH), які можна виконувати в автономному режимі (починаючи зі зразка) або в рефлекторному режимі (як доповнення до тесту RealTime MTB). Тест RealTime MTB націлений на мультикопійний ген IS6110 і ген pab, в той час як в RealTime MTB RIF/INH вісім зондів, що охоплюють ділянку RRDR гена rpoB, виявляють мутації, пов'язані з резистентністю до рифампіцину, а чотири зонди виявляють мутації в гені katG і промоторній ділянці inhA, пов'язані з резистентністю до ізоніазиду. Повідомляється, що межа виявлення для комплексу *M. tuberculosis* становить 17 КУО/мл, а для виявлення лікарської стійкості - 60 КУО/мл [1].

Тести виконуються на системі Abbot m2000 RealTime, що включає два прилади: m2000sp і m2000rt. Автоматизована екстракція ДНК і підготовка ПЛР-планшетів, починаючи з інактивованих сирих або оброблених зразків мокротиння, виконується на m2000sp. Крім того, ДНК можна виділити вручну за допомогою набору Abbott mSample Preparation System DNA, в якому клітини лізуються, а ДНК захоплюється магнітними мікрочастинками. Потім ПЛР-планшет вручну запечатують і переносять в Abbott m2000rt для проведення ПЛР в режимі реального часу. Система Abbot m2000 RealTime дозволяє проводити високопродуктивне виявлення комплексу *M. tuberculosis* (96 зразків, включаючи два контролі), а позитивні зразки рефлексують на тест MTB RIF/INH (24 зразки, включаючи два контролі) для повної діагностики МР-ТБ протягом 10,5 годин.

Детальна інформація про процедуру та аналітичні характеристики тестів міститься в інструкціях із застосування тестів та керівництвах до приладів, що надаються виробником, а також є у відкритому доступі [22]. Точність та клінічна ефективність Abbott-RT та Abbott-RIF/INH для виявлення ТБ та МР-ТБ були оцінені в систематичних оглядах та проспективних клінічних дослідженнях [23-25]. Додаткові міркування щодо операційної спроможності та аспектів впровадження тесту доступні в Інформаційному листі (Додаток 2.1) Оперативного керівництва ВООЗ з туберкульозу. Модуль 3: діагностика [4].

Тест Becton Dickinson MAX MDR-TB

Компанія Becton Dickinson (BD, Sparks, MD, США) пропонує мультиплексний ПЛР-аналіз в реальному часі (BD MAX MDR-TB) для одночасного виявлення комплексу *M. tuberculosis* та резистентності до рифампіцину та ізоніазиду, яку можна проводити на системі BD MAX (рис. 10). Тест націлений на мультикопійні геномні елементи IS6110 та IS1081, а також на однокопійну геномну мішень (dev) для виявлення комплексу *M. tuberculosis*, та на ділянку RRDR гена rpoB (426 - 452) для виявлення резистентності до рифампіцину та промоторну область inhA і 315 кодон гена katG для виявлення резистентності до ізоніазиду. Зареєстрована межа виявлення становить 0,5 КУО/мл для виявлення комплексу *M. tuberculosis* та 6 КУО/мл для виявлення резистентності до лікарських засобів [1].

Тест виконується на платформі BD MAX, в якій ДНК автоматично виділяється з попередньо обробленого N-ацетилцистеїном/NaOH знезараженого мокротиння (рекомендований варіант) або сирого мокротиння, після чого проводиться ПЛР в реальному часі. Лізис бактеріальних клітин відбувається хімічно і за допомогою тепла, а вивільнена ДНК потім захоплюється магнітними афінними кульками. За один цикл можна протестувати до 24 зразків на комп'ютеризованій настільній системі з автоматичною видачею результатів протягом 4 годин. До складу набору входять еталонні суміші, реагентні смужки, екстракційні пробірки, пробірки для зразків, піпетки для перенесення і перегородчасті ковпачки, а реагент для попередньої обробки зразків (BD MAX STR) і ПЛР-картриджі надаються окремо.

Детальна інформація про процедуру тестування та роботу системи BD MAX наведена в інструкції з використання та посібнику користувача. Точність та клінічна ефективність тесту BD MAX MDR-TB були оцінені в декількох проспективних клінічних дослідженнях [26-29]. Додаткові міркування щодо операційної спроможності та аспектів впровадження тесту доступні в Інформаційному листі (Додаток 2.2) Оперативного керівництва ВООЗ з туберкульозу. Модуль 3: діагностика [4].

Рисунок 10. Система BD MAX в Національному дослідницькому центрі, Борстель, Німеччина

Тести Roche cobas MTB та cobas MTB-RIF/ INH

Компанія Roche Molecular Systems, Inc. (RMS, Roche, Базель, Швейцарія) має два ТАНК, cobas MTB та cobas MTB-RIF/INH, для виявлення комплексу *M. tuberculosis* та резистентності до рифампіцину та ізоніазиду відповідно. Тест MTB використовує ПЛР у реальному часі для виявлення комплексу *M. tuberculosis* шляхом визначення 16S рРНК та п'яти генів esx (esxJ, esxK, esxM, esxP, esxW), починаючи з інактивованих зразків з дихальних шляхів людини, включаючи сире мокротиння та рідину для бронхоальвеолярного лаважу, оброблену N-ацетилцистеїном-NaOH. Він може генерувати результати для 96 тестів (включаючи контрольні зразки) за 3,5 години роботи. Аналіз MTB-RIF/INH націлений на ділянку RRDR гена rpoB для визначення резистентності до рифампіцину та промоторну ділянку гена inhA і гена katG для виявлення резистентності до ізоніазиду. Цей тест може бути використаний як рефлекторний тест позитивних зразків cobas MTB, що дозволяє отримати профіль резистентності до рифампіцину та ізоніазиду для 96 зразків (включаючи контрольні зразки) за додаткові 3,5 години. Межа виявлення, заявлена компанією для цього тесту, становить 7,6 КУО/мл для знезараженого осаду та 8,8 КУО/мл для необробленого мокротиння [1].

Тести проводяться на системах cobas 6800/8800, які автоматично екстрагують ДНК для якісної ПЛР в режимі реального часу. Перед проведенням тестів cobas MTB або cobas MTB-RIF/INH на системах cobas 6800/8800 зразки повинні бути інактивовані за допомогою спеціального розчину виробника з подальшою обробкою ультразвуком і центрифугуванням, для яких потрібне додаткове обладнання. Таким чином, лізис бактеріальних клітин відбувається хімічним (реагент для лізису), ферментативним (протеїназа) і фізичним (ультразвукова обробка) способами. Згодом вивільнена бактеріальна ДНК захоплюється магнітними скляними частинками і піддається ампліфікації. Флуоресцентно-мічені зонди дозволяють специфічно виявляти мішені MTB та RIF/INH.

Детальна інформація про процедуру тестування та роботу з системами cobas 6800/8800 наведена в інструкціях із застосування та посібниках користувача. Точність та клінічна ефективність тестів cobas MTB та cobas MTB-RIF/INH були оцінені в декількох проспективних клінічних дослідженнях [30-32]. Додаткові міркування щодо операційної спроможності та аспектів впровадження цих тестів можна знайти в Інформаційному листі (Додаток 2.3) Оперативного керівництва ВООЗ з туберкульозу. Модуль 3: діагностика [4].

Аналізи Bruker-Hain Lifesciences FluoroType MTB та FluoroType MTBDR

Bruker-Hain Diagnostics пропонує два тести для ампліфікації нуклеїнових кислот у реальному часі, FluoroType MTB та FluoroType MTBDR для виявлення комплексу *M. tuberculosis* та резистентності до рифампіцину та ізоніазиду відповідно. Аналізи використовують ампліфікацію LATE-ПЛР та хімічну реакцію «світло увімкнено/світло вимкнено» і націлені на елемент вставки ДНК IS6110 для виявлення комплексу *M. tuberculosis* (FluoroType MTB), а також ген rpoB, промотор inhA та ген katG для виявлення комплексу *M. tuberculosis* та пов'язаної з ним резистентності до рифампіцину та ізоніазиду, відповідно (FluoroType MTBDR) [1].

Аналізи проводяться на системі FluoroCycler. Наразі доступні дві платформи з різною пропускною здатністю: FluoroCycler 12 для ампліфікації та виявлення до 12 зразків та FluoroCycler XT, який дозволяє тестувати до 96 зразків (включаючи контрольні зразки) і надає результати протягом 4 годин (рис. 11). Межа виявлення комплексу *M. tuberculosis* за допомогою FluoroType MTB (версія 2) становить 2,6 КУО/мл і 9 КУО/мл за допомогою FluoroType MTBDR, а для виявлення резистентності до рифампіцину та ізоніазиду - 14 КУО/мл, згідно з заявою компанії [1].

Виділення бактеріальних нуклеїнових кислот із знезаражених зразків мокротиння (FluoroType MTB) або знезаражених зразків мокротиння та культурних ізолятів (FluoroType MTBDR) можна проводити вручну за допомогою спеціального набору, що надається виробником (FlurorLyse), або повністю автоматизувати за допомогою приладу GenoXtract. Це дозволяє обробляти до 96 зразків, а також готувати ПЛР-планшет, який потім переноситься на прилад FluoroCycler XT. Екстракція ДНК за допомогою GenoXtract ґрунтується на захопленні неушкоджених клітин на магнітні кульки, звідки клітини відмиваються і потім лізуються. В обох аналізах використовується аналіз кривої плавлення з високою роздільною здатністю для виявлення та автоматичного звітування про флуоресцентне виявлення, пов'язане з зондами, специфічними для комплексу *M. tuberculosis* та мішеней лікарської резистентності. Аналіз розрізняє резистентність до ізоніазиду високого та низького рівня, а програмне забезпечення FluoroSoftware автоматично повідомляє про специфічні мутації, виявлені для кожної генної мішені, включаючи мутації, які є рідкісними або пов'язані з невідомими профілями резистентності.

Детальна інформація про процедуру та роботу системи FluoroCycler надається в інструкції з використання тесту та посібниках користувача, які можна отримати, звернувшись до виробника. Точність та клінічна ефективність тестів FluoroType MTB та FluoroType MDRTB були оцінені в проспективних клінічних дослідженнях [33, 34]. Додаткові міркування щодо операційної спроможності та аспектів впровадження цих тестів можна знайти в Інформаційному листі (Додаток 2.4) Оперативного керівництва ВООЗ з туберкульозу. Модуль 3: діагностика [4].

Рисунок 11. FluoroCycler XT в Наднаціональній референс-лабораторії туберкульозу Ospedale San Raffaele, Мілан, Італія

6.4 Підходи на основі секвенування нового покоління для виявлення лікарсько-стійкого туберкульозу

Секвенування нового покоління (СНП) стало потужним інструментом для покращення лікування та контролю туберкульозу завдяки швидкому, точному та всебічному виявленню клінічно значущих мутацій. Це має вирішальне значення для клініцистів для прийняття швидких рішень щодо найкращих варіантів лікування, особливо для пацієнтів з мультирезистентним туберкульозом та туберкульозом з розширеною резистентністю до лікарських засобів. Крім того, ТМЧ на основі СНП долає багато обмежень наявних на сьогодні молекулярних аналізів, які націлені лише на обмежену кількість ділянок геному для тестування обмеженої кількості препаратів, часто не надають інформації про конкретну виявлену мутацію і мають обмежену здатність виявляти субпопуляції резистентних організмів, включаючи гетерорезистентність.

Швидкі, надійні та все більш доступні технології СНП тепер можуть використовуватись у всіх компонентах боротьби з туберкульозом - від міжнародного епіднагляду за поширеністю та лікарсько-стійким туберкульозом до визначення виду або підвиду ізолятів комплексу *M. tuberculosis* та їх профілю резистентності на основі ідентифікації однонуклеотидних поліморфізмів (ОНП), а також для виявлення кластерів передачі та дослідження спалахів у різних умовах (див. розділ 8 про молекулярне типування).

Нещодавно було опубліковано кілька комплексних оглядів, що описують сучасні умови застосування СНП та останні розробки СНП як інструменту для діагностики та клінічного лікування туберкульозу [35, 36].

У 2018 році ВООЗ опублікувала технічний посібник, який узагальнює характеристики доступних технологій СНП та надає рекомендації щодо вибору, закупівлі та впровадження технологій СНП референс-лабораторіями з ТБ у країнах з низьким та середнім рівнем доходу для діагностики лікарсько-стійкого туберкульозу в клінічних зразках [37]. У 2021 році ВООЗ опублікувала каталог мутацій, який слугуватиме глобальним стандартом для інтерпретації молекулярної інформації для прогнозування лікарської стійкості [38], оновлена версія якого очікується на початку 2023 року.

У цьому розділі ми зосередимося на двох найпоширеніших робочих процесах СНП для прогнозування комплексної лікарської стійкості *M. tuberculosis*: повногеномне секвенування (ПГС) та цільове СНП (цСНП).

6.4.1 Повногеномне секвенування

Для застосування повногеномного секвенування (ПГС) використовуються платформи СНП для реконструкції повної послідовності ДНК бактеріального геному, що дозволяє ідентифікувати ОНП та інсерції/делеції (інделі) в регіонах, пов'язаних з резистентністю до протитуберкульозних препаратів. Отримані дані не лише дозволяють прогнозувати лікарсько-стійкий або чутливий фенотип, що може бути використано для прийняття рішень щодо лікування, але й сприяють нашому розумінню нових механізмів резистентності як до існуючих, так і до нових препаратів, а також ідентифікації компенсаторних мутацій.

Наразі ПГС зазвичай проводять, починаючи зі штамів бактерій, вирощених в культурі, через потребу у відносно великій кількості високоякісної високомолекулярної ДНК. Незалежно від платформи та/або хімічних реагентів, що використовуються для секвенування, робочий процес ПГС поділяється на чотири основні етапи: 1) виділення та кількісне визначення високомолекулярної ДНК; 2) підготовка бібліотеки (включаючи фрагментацію ДНК, приєднання адаптерів та ПЛР-ампліфікацію); 3) автоматизоване одно- або парне СНП, що призводить до генерації мільйонів зчитувань; 4) аналіз даних. Перші три етапи часто називають «мокрою» лабораторною частиною процесу, а біоінформатичну частину – «сухою» лабораторною частиною. Детальну інформацію про кожен з цих етапів можна знайти в технічному керівництві ВООЗ з СНП для комплексу *M. tuberculosis* [37].

Існує багато рішень для аналізу даних про послідовності, які значно відрізняються за сферою застосування, процесами та форматами вихідних даних, причому стандартизація між ними є незначною [35]. Як правило, аналіз секвенування для комплексу *M. tuberculosis* включає валідацію вхідних даних і контроль якості, після чого проводиться картування на референтний геном (наприклад, *M. tuberculosis* H37Rv) і виявлення геномних варіантів, включаючи ОНП та індекси. Це можна зробити за допомогою різноманітних безкоштовних онлайн-інструментів (наприклад, TB profiler, PhyReSE, Mykrobe predictor TB тощо) [39], або ж за допомогою комерційного програмного забезпечення чи процесів власної розробки, деякі з яких доступні в публічних репозиторіях, таких як GitHub. Для більш детального опису власних процесів зверніться до доступних публікацій [40,41,35,42].

Загалом, оскільки клінічні рішення, такі як вибір найбільш підходящої схеми лікування, ґрунтуються на біоінформатичному аналізі даних секвенування, вкрай важливо використовувати надійні та валідовані процеси для прогнозування медикаментозної резистентності. Профілювання резистентності досягається шляхом порівняння виявлених мутацій комплексу *M. tuberculosis* з опублікованими кураторськими сучасними базами даних, такими як каталог мутацій комплексу *M. tuberculosis* ВООЗ [38]. Це найбільший наразі каталог мутацій туберкульозу, що включає 17 000 мутацій, понад 38 000 ізолятів *M. tuberculosis*, а також результати фТМЧ і дані ПГС, надані з 41 країни [43]. Триває робота з розширення поточного каталогу за рахунок генних ділянок і мутацій, причетних до резистентності до нових лікарських препаратів.

Наразі доступно кілька публікацій про приклади інтеграції систем на основі ПГС у рутинні алгоритми діагностики туберкульозу в окремих країнах з високим рівнем доходу в Європі та Північній Америці, в тому числі про переваги та клінічний вплив ПГС на прийняття рішень щодо лікування [44-47].

6.4.2 Цільове секвенування нового покоління

Альтернативним підходом для отримання комплексного профілю резистентності є розробка швидких цільових геномних панелей, які включають лише гени, що, як відомо, причетні до формування резистентності до лікарських засобів. Такий підхід дозволяє обійти необхідність комплексного культивування *M. tuberculosis*, оскільки його можна проводити безпосередньо на первинних зразках, що є безцінним для референс-лабораторій, оскільки скорочує час постановки діагнозу ТБ і МР-ТБ та витрати, пов'язані з культивуванням [37].

Цільове СНП вимагає попереднього знання мішеней (тобто відомих маркерів резистентності), але його перевага полягає в тому, що воно може бути налаштованим і масштабованим для включення додаткових мішеней, що представляють інтерес. Крім того, воно дозволяє досліджувати певні ділянки бактеріального геному з більшою глибиною покриття (тобто глибоке/надглибоке секвенування), що забезпечує високу достовірність виявлення мутацій, а також дозволяє виявляти змішані популяції і гетерорезистентність у зразку. Додатковою перевагою є те, що порівняно з ПГС, цСНП є набагато менш інтенсивним за обсягом даних і вимагає значно меншого обсягу пам'яті для зберігання даних [36].

Кілька комплексних рішень для діагностики ЛС-ТБ на основі цСНП, що працюють на платформах Illumina та Oxford Nanopore, наразі оцінюються в рамках проєкту Seq&Treat, що фінансується Unitaid та координується FIND (https://www.genomeweb.com/Reprint-GW22009FIND). Важливо, що докази, отримані в рамках цього проєкту, сприятимуть формуванню політики ВООЗ щодо використання цСНП для діагностики ЛС-ТБ.

Однією з таких технологій є тест Deeplex Myc-TB (Genoscreen, Лілль, Франція) (CE-IVD) - суміш з 24 ампліконів, що дозволяє проводити скринінг мутацій у 18 генах, які, як відомо, асоціюються з резистентністю комплексу *M. tuberculosis* до 15 протитуберкульозних препаратів, включаючи нові та перепрофільовані препарати бедаквілін, клофазимін та лінезолід, що дозволяє проводити одночасну ідентифікацію видів мікобактерій та генотипування. Зразки можуть бути об'єднані і проаналізовані за один прогін на платформі СНП (наприклад, до 48 зразків, включаючи контролі на Illumina MiSeq). Робочий процес цСНП складається з п'яти етапів: 1) виділення ДНК із знезараженого та термічно інактивованого зразка; 2) мультиплексна ампліфікація, включаючи очищення сумішей ампліконів та кількісне визначення; 3) підготовка бібліотеки, включаючи тегування, ампліфікацію, очищення та кількісне визначення; 4) секвенування; 5) аналіз даних [37]. Набір приєднаний до захищеного хмарного додатку для швидкого і простого аналізу та інтерпретації даних секвенування. Більш детальну інформацію про процедуру можна знайти в посібнику користувача набору.

Рисунок 12. Робочий процес Deeplex-MycTB

Список літератури

1. World Health Organization (WHO WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis – rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789240029415
2. Hain Lifescience. GenoType MTBDRplus VER 2.0 Molecular Genetic Assay for Identification of the M. tuberculosis Complex and its Resistance to Rifampicin and Isoniazid from Clinical Specimens and Cultivated samples Instructions for use (April 2019).
3. Hain Lifescience. GenoType MTBDRsl VER 2.0. Molecular Genetic Assay for Identification of the M. tuberculosis Complex and its Resistance to Fluoroquinolones and Aminoglycosides/Cyclic Peptides from Sputum Specimens or Cultivated Samples. Instruction for use (December 2017).
4. World Health Organization (WHO). WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detention, 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789240030589
5. World Health Organization (WHO). Global Laboratory Initiative. Line probe assays for detection of drug- resistant tuberculosis: interpretation and reporting manual for laboratory staff and clinicians. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789240046665
6. World Health Organization (WHO). Global Laboratory Initiative. Manual for selection of molecular WHO- recommended rapid diagnostic tests for detection of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789240042575
7. World Health Organization (WHO). Use of Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra on GeneXpert 10-colour instruments: WHO policy statement. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
8. Chakravorty S, Simmons AM, Rowneki M, Parmar H, Cao Y, Ryan J, et al. The new Xpert MTB/RIF Ultra: improving detection of Mycobacterium tuberculosis and resistance to rifampin in an assay suitable for point- of-care testing. MBio. 2017 08;8(4).
9. Kohli M, Schiller I, Dendukuri N, Yao M, Dheda K, Denkinger CM, et al. Xpert MTB/RIF Ultra and Xpert MTB/RIF assays for extrapulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. Cochrane Database Syst Rev. 2021 01 15;1:CD012768.
10. Shapiro AE, Ross JM, Yao M, Schiller I, Kohli M, Dendukuri N, et al. Xpert MTB/RIF and Xpert Ultra assays for screening for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults, irrespective of signs or symptoms. Cochrane Database Syst Rev. 2021 03 23;3:CD013694.
11. Zifodya JS, Kreniske JS, Schiller I, Kohli M, Dendukuri N, Schumacher SG, et al. Xpert Ultra versus Xpert MTB/RIF for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults with presumptive pulmonary tuberculosis. Cochrane Database Syst Rev. 2021 02 22;2:CD009593.
12. Kay AW, Ness T, Verkuijl SE, Viney K, Brands A, Masini T, et al. Xpert MTB/RIF Ultra assay for tuberculosis disease and rifampicin resistance in children. Cochrane Database Syst Rev. 2022 09 06;9:CD013359.
13. Chakravorty S, Roh SS, Glass J, Smith LE, Simmons AM, Lund K, et al. Detection of Isoniazid-, Fluoroquinolone-, Amikacin-, and Kanamycin-Resistant Tuberculosis in an Automated, Multiplexed 10-Color Assay Suitable for Point-of-Care Use. J Clin Microbiol. 2017 01;55(1):183-98.
14. Cepheid. Xpert MTB/XDR Instruction for use (302-3514, Rev. B July 2020).
15. Cao Y, Parmar H, Gaur RL, Lieu D, Raghunath S, Via N, et al. Xpert MTB/XDR: a 10-Color Reflex Assay Suitable for Point-of-Care Settings To Detect Isoniazid, Fluoroquinolone, and Second-Line-Injectable-Drug Resistance Directly from Mycobacterium tuberculosis-Positive Sputum. J Clin Microbiol. 2021 02;59(3).
16. Pillay S, Steingart KR, Davies GR, Chaplin M, De Vos M, Schumacher SG, et al. Xpert MTB/XDR for detection of pulmonary tuberculosis and resistance to isoniazid, fluoroquinolones, ethionamide, and amikacin. Cochrane Database Syst Rev. 2022 05 18;5:CD014841.
17. Stop TB Partenrship. Practical Guide to Implementation of Truenat™ Tests for the Detection of TB and Rifampicin Resistance (version 2, March 2021). Available at: https://stoptb.org/assets/documents/resources/publications/sd/Truenat_Implementation_Guide.pdf
18. Penn-Nicholson A, Gomathi SN, Ugarte-Gil C, Meaza A, Lavu E, Patel P, et al. A prospective multicentre diagnostic accuracy study for the Truenat tuberculosis assays. Eur Respir J. 2021 10;58(5).
19. World Health Organization (WHO). WHO Meeting Report of a Technical Expert Consultation: Accuracy of centralized assays for TB detection and detection of resistance to rifampicin and isoniazid. WHO/CDS/TB/2019.14. Licence: CC BY-NCSA 3.0 IGO.
20. Vos M, Scott L, David A, Trollip A, Hoffmann H, Georghiou S, et al. Comparative Analytical Evaluation of Four Centralized Platforms for the Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex and Resistance to Rifampicin and Isoniazid. J Clin Microbiol. 2021 02 18;59(3).
21. Kohli M, MacLean E, Pai M, Schumacher SG, Denkinger CM. Diagnostic accuracy of centralised assays for TB detection and detection of resistance to rifampicin and isoniazid: a systematic review and meta-analysis. Eur Respir J. 2021 02;57(2).

22. Kostera J, Leckie G, Tang N, Lampinen J, Szostak M, Abravaya K, et al. Analytical and clinical performance characteristics of the Abbott RealTime MTB RIF/INH Resistance, an assay for the detection of rifampicin and isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis in pulmonary specimens. Tuberculosis (Edinb). 2016 12;101:137-43.
23. Scott L, David A, Noble L, Nduna M, Da Silva P, Black A, et al. Performance of the Abbott RealTime MTB and MTB RIF/INH Assays in a Setting of High Tuberculosis and HIV Coinfection in South Africa. J Clin Microbiol. 2017 08;55(8):2491-501.
24. Wang MG, Xue M, Wu SQ, Zhang MM, Wang Y, Liu Q, et al. Abbott RealTime MTB and MTB RIF/INH assays for the diagnosis of tuberculosis and rifampicin/isoniazid resistance. Infect Genet Evol. 2019 07;71:54-59.
25. Araya BT, Ali KE, Geleta DA, Tekele SG, Tulu KD. Performance of the Abbott RealTime MTB and RIF/INH resistance assays for the detection of Mycobacterium tuberculosis and resistance markers in sputum specimens. PLoS One. 2021;16(5):e0251602.
26. Ciesielczuk H, Kouvas N, North N, Buchanan R, Tiberi S. Evaluation of the BD MAX™ MDR-TB assay in a real-world setting for the diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary TB. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020 Jul;39(7):1321-27.
27. Hofmann-Thiel S, Plesnik S, Mihalic M, Heiß-Neumann M, Avsar K, Beutler M, et al. Clinical Evaluation of BD MAX MDR-TB Assay for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex and Resistance Markers. J Mol Diagn. 2020 10;22(10):1280-86.
28. Shah M, Paradis S, Betz J, Beylis N, Bharadwaj R, Caceres T, et al. Multicenter Study of the Accuracy of the BD MAX Multidrug-resistant Tuberculosis Assay for Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex and Mutations Associated With Resistance to Rifampin and Isoniazid. Clin Infect Dis. 2020 08 22;71(5):1161-67.
29. Sağıroğlu P, Atalay MA. E valuation of the performance of the BD MAX MDR-TB test in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis complex in extrapulmonary and pulmonary samples. Expert Rev Mol Diagn. 2021 Dec;21(12):1361-67.
30. Scott L, David A, Govender L, Furrer J, Rakgokong M, Waja Z, et al. Performance of the Roche cobas MTB Assay for the Molecular Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in a High HIV Burden Setting. J Mol Diagn. 2020 10;22(10):1225-37.
31. Nadarajan D, Hillemann D, Kamara R, Foray L, Conteh OS, Merker M, et al. Evaluation of the Roche cobas MTB and MTB-RIF/INH Assays in Samples from Germany and Sierra Leone. J Clin Microbiol. 2021 04 20;59(5).
32. Aono A, Murase Y, Minegishi M, Ohtawa S, Yano M, Chikamatsu K, et al. Clinical evaluation of the cobas® MTB-RIF/INH reagent and the cobas® 6800 for the detection of isoniazid and rifampicin resistance. Tuberculosis (Edinb). 2022 05;134:102199.
33. Vos M, Derendinger B, Dolby T, Simpson J, van Helden PD, Rice JE, et al. Diagnostic Accuracy and Utility of FluoroType MTBDR, a New Molecular Assay for Multidrug-Resistant Tuberculosis. J Clin Microbiol. 2018 09;56(9).
34. Dippenaar A, Derendinger B, Dolby T, Beylis N, van Helden PD, Theron G, et al. Diagnostic accuracy of the FluoroType MTB and MTBDR VER 2.0 assays for the centralized high-throughput detection of Mycobacterium tuberculosis complex DNA and isoniazid and rifampicin resistance. Clin Microbiol Infect. 2021 Sep;27(9):1351.e1-51.e4.
35. Meehan CJ, Goig GA, Kohl TA, Verboven L, Dippenaar A, Ezewudo M, et al. Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis: current standards and open issues. Nat Rev Microbiol. 2019 09;17(9):533-45.
36. Dookie N, Khan A, Padayatchi N, Naidoo K. Application of Next Generation Sequencing for Diagnosis and Clinical Management of Drug-Resistant Tuberculosis: Updates on Recent Developments in the Field. Front Microbiol. 2022;13:775030.
37. World Health Organization (WHO). The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in Mycobacterium tuberculosis complex: technical guide. 2018 (WHO/CDS/TB/2018.19). Licence: CC BY-NCSA3.0 IGO. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274443/WHO-CDS-TB-2018.19-eng.pdf
38. World Health Organization (WHO). Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173
39. Schleusener V, Köser CU, Beckert P, Niemann S, Feuerriegel S. Mycobacterium tuberculosis resistance prediction and lineage classification from genome sequencing: comparison of automated analysis tools. Sci Rep. 2017 Apr;7:46327.
40. Kohl TA, Utpatel C, Schleusener V, De Filippo MR, Beckert P, Cirillo DM, et al. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of. PeerJ. 2018;6:e5895.
41. Jajou R, Kohl TA, Walker T, Norman A, Cirillo DM, Tagliani E, et al. Towards standardisation: comparison of five whole genome sequencing (WGS) analysis pipelines for detection of epidemiologically linked tuberculosis cases. Euro Surveill. 2019 Dec;24(50).

42. Bogaerts B, Delcourt T, Soetaert K, Boarbi S, Ceyssens PJ, Winand R, et al. A Bioinformatics Whole-Genome Sequencing Workflow for Clinical Mycobacterium tuberculosis Complex Isolate Analysis, Validated Using a Reference Collection Extensively Characterized with Conventional Methods and. J Clin Microbiol. 2021 05 19;59(6).

43. Walker TM, Miotto P, Köser CU, Fowler PW, Knaggs J, Iqbal Z, et al. The 2021 WHO catalogue of Mycobacterium tuberculosis complex mutations associated with drug resistance: A genotypic analysis. Lancet Microbe. 2022 04;3(4):e265-e73.

44. Shea J, Halse TA, Lapierre P, Shudt M, Kohlerschmidt D, Van Roey P, et al. Comprehensive Whole-Genome Sequencing and Reporting of Drug Resistance Profiles on Clinical Cases of Mycobacterium tuberculosis in New York State. J Clin Microbiol. 2017 06;55(6):1871-82.

45. Cabibbe AM, Trovato A, De Filippo MR, Ghodousi A, Rindi L, Garzelli C, et al. Countrywide implementation of whole genome sequencing: an opportunity to improve tuberculosis management, surveillance and contact tracing in low incidence countries. Eur Respir J. 2018 06;51(6).

46. Park M, Lalvani A, Satta G, Kon OM. Evaluating the clinical impact of routine whole genome sequencing in tuberculosis treatment decisions and the issue of isoniazid mono-resistance. BMC Infect Dis. 2022 Apr 07;22(1):349.

47. Soetaert K, Ceyssens PJ, Boarbi S, Bogaerts B, Delcourt T, Vanneste K, et al. R etrospective evaluation of routine whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis at the Belgian National Reference Center, 2019. Acta Clin Belg. 2022 Oct;77(5):853-60.

7 Фенотипічний тест на медикаментозну чутливість комплексу *Mycobacterium tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів

Автори: Emmanuelle Cambau, Sabine Rüsch-Gerdes

Рецензенти: Emmanuelle Cambau, Jim Werngren, Margaret Fitzgibbon та Daniela Maria Cirillo (2022)

7.1 Передумови та принципи

У цьому розділі описано фенотипічне тестування на чутливість мікобактерій туберкульозу та інших представників комплексу *M. tuberculosis* до протимікробних препаратів [1, 2].

Основними завданнями тестування на чутливість до протимікробних препаратів (AST) відносно комплексу *M. tuberculosis* є (i) забезпечення ефективного індивідуального лікування та ведення випадку ТБ; (ii) епіднагляд за резистентністю до протитуберкульозних препаратів на рівні лікарні, міста, регіону або країни; (iii) визначення потреби в ізоляції пацієнтів; та (iv) визначення обсягу необхідних інституційних та громадських розслідувань спалахів ТБ [1, 2]. Реалізація Стратегії ВООЗ з ліквідації туберкульозу вимагає надання даних про чутливість для всіх пацієнтів з ознаками та симптомами туберкульозу [3].

У зв'язку з розвитком антимікробної резистентності (АМР) до протитуберкульозних препаратів у всьому світі, необхідне швидке і надійне тестування на чутливість до протитуберкульозних препаратів. Зразки для культурального дослідження та визначення чутливості до протитуберкульозних препаратів повинні бути отримані на початку лікування або до нього, а тестування повинно проводитися швидко, принаймні, щодо рифампіцину та ізоніазиду. Пацієнтам, які прибули з країн з високою поширеністю резистентності до фторхінолонів з вперше діагностованим ТБ, настійно рекомендується проводити базове тестування на чутливість до фторхінолонів [4]. AST можна повторити, якщо пацієнт все ще має позитивний результат після двох місяців лікування [5].

Частота АМР до протитуберкульозних препаратів є вищою у випадках повторного лікування (набута резистентність або вторинна резистентність), ніж у нових випадках (первинна резистентність), причому ця різниця залежить від країни або епідеміологічної ситуації [6]. АМР, що спостерігається під час лікування і визначається як «набута» або «вторинна резистентність», є результатом селекції та розмноження резистентних мутантних субпопуляцій, що існували в ізоляті туберкульозної палички до початку лікування. АМР, що спостерігається до початку лікування і позначається як «первинна резистентність», є наслідком контакту з лікарсько-стійким джерелом інфекції [7].

Ідентифікація культури мікобактерій або кислотостійких паличок комплексу *M. tuberculosis* необхідна перед проведенням AST, щоб уникнути хибно позитивних результатів через присутність нетуберкульозних мікобактерій (НТМБ), які можуть мати схожий характер росту, але володіти внутрішньою резистентністю. Знання точного виду представника комплексу *M. tuberculosis*, а в деяких випадках і лінії, є важливим при інтерпретації результатів AST, оскільки деякі штами демонструють внутрішню резистентність до препарату (наприклад, *M. bovis* і *M. canettii* є резистентними до піразинаміду [8, 9]) або підвищені значення МІК до певного препарату (наприклад, штами лінії 1 мають підвищені значення МІК до претоманіду) [10]).

Лабораторії повинні використовувати тільки надійні методи AST відносно комплексу *M. tuberculosis* з використанням рекомендованих ВООЗ критичних концентрацій препаратів [11-13]. Лабораторія повинна мати значний досвід у застосуванні обраного методу, і його повинні виконувати кваліфіковані фахівці. Також надзвичайно важливо періодично проводити внутрішній та зовнішній контроль якості (КЯ) щодо проведення AST. Відповідно до ISO 15189 (стандарти 5.3.2), всі нові реагенти (партія або поставка) повинні бути перевірені на продуктивність перед використанням, тому всі партії середовищ (LJ і MGIT), а також інші реагенти, що використовуються для AST, повинні бути протестовані. Якщо партія/поставка не проходить контроль якості, слід ретельно переглянути всі результати, отримані в межах цієї партії, а також щодо нової партії реагентів, і, можливо, повторити випробування. Усі лабораторії, що проводять AST, повинні брати участь у зовнішній програмі контролю якості [1, 14].

AST зазвичай проводять на культурах комплексу *M. tuberculosis* (непряме тестування), але його також можна проводити на зразках, що містять КСБ, які, як відомо, належать до комплексу *M. tuberculosis* (пряме тестування) [15], за умови дотримання спеціальних умов, описаних у розділі 7.3.3. Результати прямого тестування отримують швидше, але ймовірність успіху є нижчою через можливе забруднення або неправильну оцінку посівного матеріалу.

Враховуючи високий ризик утворення інфекційних аерозолів із зразків і високу концентрацію інфекційних частинок, всі процедури, описані в цьому розділі, слід виконувати в лабораторії з високим рівнем ризику (РББ-3 з ризиком ТБ) [16].

7.2 Загальний метод – Тестування на чутливість до протимікробних препаратів на культурі

7.2.1 Визначення

Критична концентрація: найнижча концентрація протитуберкульозного засобу, яка пригнічуватиме ріст *in vitro* 99% фенотипово диких ізолятів комплексу *M. tuberculosis*.

Критична пропорція: частка резистентних організмів у конкретному культивованому ізоляті, яка використовується для визначення резистентності до певного лікарського засобу. Будь-яка культура, яка показує менше 1% росту на середовищі, що містить критичну концентрацію досліджуваного агента, порівняно з ростом на контролі без агента, вважається чутливою; культура, яка має 1% або більше росту на середовищі, що містить критичну концентрацію агента, вважається резистентною.

Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК): найнижча концентрація антимікробного агента, яка запобігає візуальному росту ізоляту в твердому середовищі або тесті на чутливість до розведення бульйоном, за певних умов тестування (див. еталонний протокол EUCAST нижче).

Клінічна контрольна точка: концентрація/концентрації антимікробного засобу, що дорівнює або перевищує критичну концентрацію, яка відокремлює ізоляти, що, ймовірно, будуть реагувати на лікування (категорія S), від тих, що, ймовірно, не будуть реагувати на лікування (категорія R). Ця концентрація визначається шляхом кореляції з наявними даними про клінічні результати, розподілом МІК, генетичними маркерами та фармакокінетичними/фармакодинамічними даними, включаючи дозу препарату. Підвищення дози може застосовуватися в деяких визначених випадках (категорія I). Клінічна контрольна точка використовується для прийняття індивідуальних клінічних рішень при лікуванні пацієнта.

Епідеміологічне значення порога відсікання (ECOFF): верхня межа гауссівського розподілу МІК виду, коли тестуються лише фенотипічно дикі (pWT) ізоляти. ECOFF зазвичай охоплює 99% pWT ізолятів [17].

Контроль росту: Кількість колоній, отриманих при посіві розведень суспензії мікобактерій у живильне середовище, яке не містить протитуберкульозних препаратів.

Резистентність визначається як зниження чутливості, достатнє для того, щоб бути впевненим у тому, що відповідний штам відрізняється від чутливих до препарату референтних штамів дикого типу. У цьому випадку бажаний клінічний ефект препарату є малоймовірним.

Чутливість визначається рівнем чутливості, який суттєво не відрізняється від чутливості штамів дикого типу, які ніколи не контактували з препаратом. У цьому випадку очікувана клінічна відповідь на застосування препарату є ймовірною [18, 19].

7.2.2 Вступ

Методи, представлені в цьому розділі, спрямовані не лише на виявлення резистентності, але й на оцінку чутливості [19, 1, 2]. Застосування цих методів має забезпечити високу чутливість для виявлення резистентності (тобто низька частота хибних результатів на чутливість) і високу специфічність (тобто низька частота хибних результатів на резистентність). Крім того, ці методи також повинні бути високочутливими для оцінки чутливості (тобто низька частота хибних результатів на резистентності) і високоспецифічними (тобто низька частота хибних результатів на чутливість). Посилання на дослідження ефективності різних методів наведені в кожному розділі методу.

Фенотипічні методи ТМЧ ґрунтуються на використанні критичних концентрацій протитуберкульозних препаратів. Визначення та корисність критичних концентрацій, а також інших граничних значень (клінічних контрольних точок, МІК та епідеміологічних значень порога відсікання) у фенотипічному ТМЧ значно змінилися за останнє десятиліття і детально розглядаються в наступних публікаціях [20, 21, 2].

У 2021 році ВООЗ опублікувала технічний звіт з переглянутими критичними концентраціями для культурального фенотипового AST до протитуберкульозних препаратів першого ряду, ізоніазиду та рифампіцину [13]. Критичні концентрації для рифампіцину були знижені, тоді як для ізоніазиду були збережені на існуючому рівні. Це оновлення допомагає усунути розбіжності між фенотипічними та молекулярними методами виявлення резистентності до рифампіцину і підвищує точність AST [13]. Оновлені концентрації наведені в Таблиці 14. Всі концентрації вказані в мг/л і застосовуються до методу пропорцій з 1% в якості критичної пропорції. Дещо інші критичні концентрації надані Інститутом клінічних та лабораторних стандартів (CLSI) [22].

Таблиця 14. Критичні концентрації для ізоніазиду та рифампіцину [13]

Препарат	LJ	7H10	7H11	MGIT
Ізоніазид	0,2	0,2	0,2	0,1
Рифампіцин	40,0	0,5	1,0	0,5
Рифабутин	-	-	-	-
Рифапентин	-	-	-	-

LJ = живильне середовище Левенштейна-Йенсена; 7H10 = живильне середовище Middlebrook 7H10; 7H11 = живильне середовище Middlebrook 7H11; MGIT= пробірка з індикатором росту мікобактерій

У 2021 році ВООЗ рекомендувала використовувати чотиримісячну схему лікування лікарсько-чутливого туберкульозу, що складається з рифапентину, ізоніазиду, піразинаміду та моксифлоксацину [23]. Враховуючи відсутність даних про мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) для рифапентину, за даними ВООЗ, слід припускати повну перехресну резистентність з рифампіцином до тих пір, поки не з'являться достатні дані про протилежне (тобто результати генотипічного AST і фенотипічного AST для рифампіцину повинні використовуватися як сурогат для рифапентину) [13].

Препарати для лікування рифампіцин-резистентного (Риф)/мультирезистентного (МР-ТБ) туберкульозу згруповані ВООЗ на основі їхньої відносної користі та шкоди наступним чином [24]:

7.2.2.1 **Група А**: фторхінолони (левофлоксацин і моксифлоксацин), бедаквілін і лінезолід (вважаються високоефективними і настійно рекомендуються для включення в усі схеми, якщо немає протипоказань);

7.2.2.2 **Група В**: клофазимін та циклосерин або теризидон (умовно рекомендовані як препарати другого вибору);

7.2.2.3 **Група С**: всі інші препарати, які можна використовувати, коли схему лікування не може складатися з препаратів груп А і В. Препарати групи С (етамбутол, деламанід, піразинамід, іміпенем-циластатин/меропенем, амікацин, етіонамід/протіонамід, Р-аміносаліцилова кислота) ранжуються за відносним співвідношенням користі та шкоди, що зазвичай очікується від кожного з них.

У травні 2022 року ВООЗ випустила експрес-повідомлення, в якому зазначено, що шестимісячна схема перорального лікування бедаквіліном, претоманідом, лінезолідом та моксифлоксацином (BPaLM) може застосовуватися програмно для пацієнтів (віком ≥15 років) з рифампіцин-резистентним туберкульозом, які ще не отримували лікування бедаквіліном, претоманідом (не класифікованим) та лінезолідом. Ця схема може застосовуватися без моксифлоксацину (BPaL) у разі задокументованої резистентності до фторхінолонів (у пацієнтів з пре-ШЛС-ТБ) [25]. З огляду на цю нову рекомендацію, розбудова потенціалу для проведення AST до бедаквіліну та лінезоліду стала нагальним пріоритетом.

Для багатьох препаратів, рекомендованих для використання в більш тривалих схемах лікування Риф/МР-ТБ, ще не існує валідованих протоколів AST, а набута резистентність під час лікування недостатньо добре охарактеризована.

Критичні концентрації та клінічні контрольні точки для лікарських засобів, рекомендованих для лікування рифампіцин-резистентного та мультирезистентного туберкульозу за даними ВООЗ, наведені в Таблиці 15. Всі концентрації вказані в мг/л і застосовуються до методу пропорцій з 1% в якості критичної пропорції.

Таблиця 15. Критичні концентрації та клінічні контрольні точки для лікарських засобів, рекомендованих для лікування Риф/МР-ТБ [24]

Групи та етапи	Препарат	LJ	7H10	7H11	MGIT
Група A: Включає всі три препарати	Левофлоксацин	2,0	1,0	-	1,0
	Моксифлоксацин (CC)	1,0	0,5	0,5	0,25
	Моксифлоксацин (CB)	-	2.,0	-	1,0
	Бедаквілін	-	-	0,25	1.0
	Лінезолід	-	1.,0	1,0	1,0
Група B: Додається один або обидва препарати	Клофазамін	-	-	-	1.0
	Циклосерин / теризидон	-	-	-	-
Група C: Додається для завершення схеми лікування та у випадках, коли не можна застосовувати препарати груп A і B	Етамбутол	2,0	5,0	7,5	5,0
	Деламанід	-	-	0,016	0,06
	Піразинамід	-	-	-	100,0
	Іміпенем–циластатин	-	-	-	-
	Меропенем	-	-	-	-
	Амікацин	30,0	2,0	-	1,0
	Етіонамід	40,0	5,0	10,0	5,0
	Протіонамід	40,0	-	-	2,5
	P-аміносаліцилова кислота	-	-	-	-

LJ = живильне середовище Левенштейна-Йенсена; 7H10 = живильне середовище Middlebrook 7H10; 7H11 = живильне середовище Middlebrook 7H11; MGIT= пробірка з індикатором росту мікобактерій

Для претоманіду Європейське агентство з лікарських засобів (EMA) запропонувало умовну контрольну точку на рівні 1 мг/л з використанням системи MGIT [26], тоді як EUCAST запропонував 2 мг/л як тимчасове скринінгове значення для AST у MGIT (EUCAST, вересень 2022 р.) до отримання достатньої кількості даних про МІК з використанням референтного методу EUCAST (http://www.eucast.org). ВООЗ ще не затвердила критичну концентрацію для цього препарату.

7.2.2 Матеріали

Для прямого тестування: слід використовувати позитивні зразки мазка після класичного знезараження (див. розділ 5.6) [15].

Для непрямого тестування: слід використовувати клінічні ізоляти комплексу *M. tuberculosis* у вигляді позитивної рідкої культури або колоній на твердому середовищі після перевірки на чистоту [1, 27].

7.2.3 Методи

У цьому розділі ми зосередимося на методах AST, які переважно використовуються в Європейській мережі референс-лабораторій з туберкульозу, а саме на методі пропорцій як на твердих середовищах (наприклад, Левенштейна-Йенсена) [28], так і на рідких середовищах Middlebrook (7H9) з використанням автоматизованої системи виявлення мікобактерій BD BACTEC MGIT [29-32]. Крім того, ми опишемо референтний метод EUCAST для визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК), який використовується для визначення епідеміологічних значень порога відсікання (ECOFF) та клінічних контрольних точок (ККТ) [33, 34].

Інші методи дослідження твердих культур (наприклад, метод співвідношення резистентності та метод абсолютної концентрації) все ще використовуються, хоча й рідко, в деяких лабораторіях, оскільки вони відносно недорогі. Однак ці методи були стандартизовані для тестування лише препаратів першого ряду (рифампіцин, ізоніазид, етамбутол та піразинамід) [35].

Деякі додаткові фенотипічні аналізи, такі як аналіз нітратредуктази (НРА), мікророзведення мікропланшета з використанням резазурину (колориметричний редокс-індикаторний аналіз, CRI) або комерційного планшета (планшет Sensititre MYCOTB MIC), прямий мікроскопічний тест на чутливість (MODS) і метод тонкошарового агару (TLA) є менш відтворюваними, ніж методи пропорцій. ВООЗ схвалила використання NRA і MODS для прямого AST, а також NRA, MODS і CRI для непрямого AST у референс-лабораторіях за чітко визначених умов роботи з дотриманням суворих лабораторних протоколів [36]. Ці методи були описані та нещодавно переглянуті в інших джерелах [37-43].

7.2.4 Звіт/інтерпретація

Звіт про результати чутливості легко зробити для кожного протестованого препарату, якщо метод виконувався відповідно до стандартного протоколу. Неочікувані результати щодо резистентності слід перевіряти за допомогою молекулярного підтвердження, як описано в розділі 6, або шляхом повторного тестування. Це можна зробити, щойно буде виявлено закономірність резистентності. Якщо виявлено мутацію, яка, як відомо, спричиняє резистентність, це підтверджує резистентність. І навпаки, якщо не виявлено жодної мутації в генах, відомих як такі, що зумовлюють резистентність, це означає, що штам необхідно повторно протестувати за допомогою референтного методу. Якщо штам залишається резистентним, але мутації не виявлено, колонії, що ростуть у присутності певного антибіотика, слід протестувати повторно [8].

Екстрене та пріоритетне звітування повинно здійснюватися про випадки легеневої форми ТБ з позитивним мазком та про всі виявлені випадки Риф/МР-ТБ. Про ці результати слід повідомляти відповідно до протоколу закладу, бажано лікувальній бригаді. Рутинна звітність повинна містити дату початку тестування та дату подання звіту.

Для антибіотиків, для яких можна протестувати кілька концентрацій, можна визначити рівень резистентності і повідомити про нього [44]. Зазвичай повідомлення про низький рівень резистентності не означає, що препарат не буде призначатися; і навпаки, повідомлення про високий рівень резистентності означає, що препарат не має клінічного застосування. Однак слід провести більше клінічних досліджень, які б співвідносили результати лікування пацієнтів з рівнем резистентності.

7.3 Метод пропорцій на середовищі Левенштейна-Йенсена

7.3.1 Вступ

Метод пропорцій на середовищі Левенштейна-Йенсена (LJ) був одним з перших методів, розроблених для тестування чутливості комплексу *M. tuberculosis*, і досі вважається еталонним методом. Згодом він був адаптований для використання з іншими середовищами, такими як агар Middlebrook (7H10 або 7H11), як описано в технічному посібнику ВООЗ з тестування на медикаментозну чутливість [11]. Слід підкреслити, що критичні концентрації протитуберкульозних препаратів можуть відрізнятися в різних середовищах (див. Таблиці 14 і 15) [13, 45].

Метод пропорцій розраховує частку резистентних бактерій, присутніх у клінічному ізоляті [35]. У цьому методі ріст (тобто кількість колоній) у контрольній пробірці з середовищем LJ, яка не містить протитуберкульозного препарату (тобто контроль росту), порівнюється з ростом у пробірках з середовищем LJ, що містять критичну концентрацію протитуберкульозного препарату, який тестується. Як правило, щонайменше два розведення суспензії культури тестують як на контролі росту, так і в пробірці з препаратом. Розраховується співвідношення кількості колоній на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, до кількості колоній на середовищі без протитуберкульозного препарату, і ця пропорція виражається у відсотках. Якщо критична частка становить менше 1%, штам класифікується як чутливий; якщо більше - як резистентний (див. розділ 7.2.1). Критичне співвідношення було визначено в дослідженні когорти пацієнтів у 1960-х роках, які не змогли вилікуватися від туберкульозу [18], і є особливо корисним для пацієнтів, у яких підозрюється гетерорезистентність. Метод пропорцій на LJ середовищах добре зарекомендував себе для препаратів першого ряду (рифампіцин, ізоніазид, етамбутол) та деяких препаратів другого ряду (левофлоксацин, моксифлоксацин, амікацин, етіонамід/протіонамід).

7.3.2 Матеріали

Для прямого тестування зразки з позитивним мазком знезаражують за звичайною процедурою (див. розділ 5.4.1.), а осад використовують або в чистому, або в розведеному вигляді.

Для непрямого тестування необхідна чиста, добре охарактеризована культура бактерій комплексу *M. tuberculosis* в активній фазі росту.

Пробірки з середовищем LJ (бажано з гвинтовими кришками) з протитуберкульозним препаратом, що тестується, та пробірки середовищем LJ без протитуберкульозного препарату. Завжди слід використовувати чисту рецептуру (не таблетки для пацієнтів) протитуберкульозних препаратів, що тестуються. Інші матеріали включають стерильні піпетки та стандарт каламутності за Макфарландом № 1.

7.3.3 Методи

Підготовка середовища

Детальний опис процедури, що використовується для приготування LJ середовищ для AST, можна знайти в технічному посібнику ВООЗ з тестування на медикаментозну чутливість лікарських засобів, що застосовуються при лікуванні туберкульозу [11]. Для приготування середовища, що містить препарат, який підлягає тестуванню, препарати вносять у рідку суміш відповідно до їх специфічних критичних концентрацій до того, як середовище розливають у пробірки та проводять загущення. Середовище LJ з додаванням та без додавання препаратів можна зберігати при температурі 4-8 °C протягом одного місяця.

Препарати

Препарати для тестування слід зберігати відповідно до інструкцій виробника. Речовини, розчинники та розріджувачі наведені в Таблиці 16 разом із критичними концентраціями для тестування на середовищах LJ.

Таблиця 16. Розчинники та розріджувачі

Препарат	Речовина	Критична концентрація в середовищі LJ (мг/л)	Розчинники	Розріджувачі
Ізоніазид	Ізоніазид	0.2	ДВ	ДВ
Рифампіцин	Рифампіцин	40	ДМСО	ДВ
Етамбутол	Етамбутолу дигідрохлорид	2	ДВ	ДВ
Амікацин	Амікацину сульфат	40	ДВ	ДВ
Левофлоксацин	L-офлоксацин	2	0.1N NaOH	ДВ
Моксифлоксацин	Моксифлоксацин	1	0.1N NaOH	ДВ
ДВ = Стерильна дистильована вода; ДМСО = диметилсульфоксид; NaOH = Натрію гідроксид.				

Бактеріальна суспензія та інокуляція

Непрямий ТМЧ

Проводиться на первинному ізоляті або субкультурі на середовищі LJ. Репрезентативну частину ізоляту отримують шляхом відбору якомога більшої кількості колоній протягом одного-двох тижнів після появи росту.

Колонії переносять у скляну пробірку або колбу Ерлена без залишків живильного середовища. Гомогенізувати суспензію можна за допомогою скляних кульок (діаметром 3,0 мм) або скляної палички з розплавленим заокругленим кінчиком, розтираючи бактерії по стінці пробірки. Потім суспензію готують шляхом додавання 0,9% хлориду натрію або дистильованої води. Після ретельного перемішування і гомогенізації суспензії пробірки повинні відпочити протягом десяти хвилин, після чого надосадову рідину піпетують в іншу пробірку.

Каламутність суспензії слід візуально відрегулювати до 1 мг вологої бактеріальної маси/мл (приблизно одна повна петля з внутрішнім діаметром 3 мм) або до еталонної суспензії за стандартом Макфарланда 1.0 (9,9 мл сірчаної кислоти [1% об'ємної концентрації] з 0,1 мл розчину хлориду барію [1% масової концентрації]). Останній приблизно в 10 разів менш концентрований, ніж перший.

Серійні розведення від 10^{-1} до 10^{-5} стандартної суспензії готують шляхом послідовного розведення 1,0 мл стандартної суспензії в пробірках, що містять 9 мл стерильного дистильованого 0,9% розчину натрію хлориду.

Зазвичай в контрольні пробірки з середовищем LJ (без препарату) вносять два розведення посівного матеріалу, причому другий посівний матеріал розводять в 1:100 разів більше, ніж перший посівний матеріал: 10^{-1} і 10^{-3} суспензії 1 мг/мл або 10^{-2} і 10^{4} суспензії за Макфарландом 1.0.

Потім пробірки з середовищем LJ засівають двома розведеннями. Об'єм посівного матеріалу в контрольній пробірці та пробірці з препаратом становить 0,1 мл.

Пряме тестування з використанням первинних зразків

Знезаражені зразки з позитивним мазком висівають безпосередньо на чашки з середовищем LJ, використовуючи два розведення, як і при непрямому тестуванні, причому другий посівний матеріал розводять у співвідношенні 1:100 до першого. Розведення роблять відповідно до кількості кислотостійких бактерій на одне мікроскопічне поле (збільшення x1 000):

- Без розведення (посівний матеріал 1) та 10^{-2} (посівний матеріал 2) якщо менше 1 кислотостійких бактерій на одне мікроскопічне поле;
- 10^{-1} та 10^{-3} якщо від 1 до 10 кислотостійких бактерій на одне мікроскопічне поле;
- 10^{-2} та 10^{-4} якщо більше 10 кислотостійких бактерій на одне мікроскопічне поле.

Пробірки з LJ середовищами засівають обома розведеннями, якщо це можливо, або, принаймні, розведенням 1 для препаратів першого ряду (критична пропорція 1%) і розведенням 2 для препаратів другого ряду - амікацину і моксифлоксацину. Об'єм посівного матеріалу становить 0,1 мл у пробірці.

Інкубація

Після посіву пробірки інкубують при температурі 36±1°C в нахиленому положенні, злегка послабивши гвинтові кришки, щоб забезпечити випаровування посівного матеріалу. Однак це залежить від типу гвинтових кришок; краще використовувати ті, які можна закрити відразу після посіву. Через 2-4 дні гвинтові кришки закручують, і пробірки продовжують інкубацію.

7.3.4 Інтерпретація результатів звіту

Результати зчитуються наступним чином у три етапи:

7.3.4.1 Підрахунок колоній, що виросли на пробірках для контролю росту. Для розведення 1 (наприклад, 10^{-2}) часто спостерігається суцільний ріст, оскільки було посіяно близько 104 колонієутворюючих одиниць (КУО); для розведення 2 (наприклад, 10^{4}) нараховують приблизно 20-100 колоній. Ця кількість може відрізнятися залежно від штаму, оскільки деякі з них є дисгонічними (тобто важко ростуть на живильному середовищі);

7.3.4.2 Підрахунок колоній, що виросли на пробірках з середовищем LJ та досліджуваним протитуберкульозним препаратом. Зазвичай для підрахунку використовують перше розведення (тобто розведення 10^{-2}).

7.3.4.3 Розрахунок частки резистентних бактерій шляхом порівняння кількості бактерій у контрольному розведенні 2 (тобто розведенні 10^{-4}) з кількістю бактерій у пробірках з протитуберкульозним препаратом (зазвичай у розведенні 1). Якщо співвідношення дорівнює або перевищує 1 %, штам вважається резистентним; якщо співвідношення нижче 1 %, штам вважається чутливим.

Зчитування результатів проводять через 28 днів (раннє зчитування) і 42 дні (остаточне зчитування) після інокуляції. Якщо після чотирьох тижнів інкубації частка резистентних колоній перевищує критичну частку, штам можна вважати резистентним. Крім того, якщо на 28-й день зчитування показує відсутність колоній на поживних середовищах, що містять препарат, а колонії в контрольних пробірках є зрілими, штам можна вважати чутливим. За винятком цих двох випадків, всі інші результати слід повідомляти після зчитування на 42-й день.

Якщо кількість колоній у контрольних пробірках, засіяних посівним матеріалом 1, менша за 100, тест слід повторити з менш розведеним посівним матеріалом.

7.4 Тестування на медикаментозну чутливість у рідких середовищах (Bactec MGIT 960)

7.4.1 Вступ

Перші рідкі поживні середовища були введені в комерційний обіг у 1990-х роках, і кілька оцінок продемонстрували хорошу кореляцію з методом пропорції на твердих середовищах і значну економію часу. Одним з перших недоліків цієї системи було використання радіоактивно міченого субстрату. Через суворі правила поводження з радіоактивними матеріалами та утилізації відходів, а також аспекти біобезпеки при використанні шприців для бактеріальної інокуляції, виникла необхідність розробити нерадіометричну методику на основі бульйону.

Наразі комерційно доступні дві системи рідких культур для AST: система BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Спаркс, штат Массачусетс, США) і система автоматизованого виявлення мікробів VersaTREK™ (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс, США). Система BACTEC MGIT 960 використовує рідке середовище 7H9, яке містить кисневий флуорохром, інкорпорований в силікон на дні пробірки для культивування. Під час росту бактерій вільний кисень в середовищі утилізується і заміщується вуглекислим газом. Коли вільний кисень вичерпується, флуорохром більше не інгібується, що призводить до флуоресценції та ідентифікації росту бактерій (вимірюється в одиницях росту, OP), який може бути виявлений вручну або автоматично [30, 32, 46-47].

7.4.2 Матеріали

Для приготування посівного матеріалу необхідна чиста, добре охарактеризована культура бактерій комплексу *M. tuberculosis* в активній фазі росту. Інші необхідні матеріали включають пробірки для культивування BACTEC MGIT, ростові добавки та лікарські препарати. Препарати постачаються постачальниками в ліофілізованій формі або у вигляді чистих порошків і повинні бути відновлені відповідно до інструкцій виробника, щоб кінцеві тестові концентрації були такими ж, як рекомендовані ВООЗ.

7.4.3 Методи

Підготовка середовища

У кожну 7 мл пробірку з середовищем 7H9 додають 0,1 мл відновленого розчину препарату та 0,8 мл ростової добавки (наприклад, OADC, що складається з олеїнової кислоти, альбуміну, декстрози та каталази) (доступної у продажу).

Препарати

Готові до використання набори AST для препаратів першого ряду та піразинаміду є комерційно доступними (наприклад, набори BACTEC MGIT 960 SIRE та IRE і набір BACTEC MGIT 960 PZA). Нещодавно компанія Becton Dickinson випустила ліофілізовані препарати для препаратів другого ряду, таких як амікацин і моксифлоксацин, для використання в MGIT 960, а також на інших середовищах.

Інші препарати другого ряду (наприклад, лінезолід та клофазимін) постачаються конкретними виробниками (наприклад, Sigma-Aldrich, Caymen Chemical). Нові препарати, такі як бедаквілін та деламанід, можна закуповувати лише через офіційних постачальників (наприклад, через Програму реагентів NIH AIDS Reagent Program[3] та ресурси BEI[4], відповідно). Препарати повинні бути належним чином відновлені для забезпечення критичних концентрацій, рекомендованих ВООЗ (Таблиці 14 і 15). Детальна інформація про те, як підготувати запас препаратів та робочі розчини, доступна в технічному посібнику ВООЗ з тестування на медикаментозну чутливість [11].

Таблиця 17. Розчинники, розріджувачі та концентрації для препаратів другого ряду для проведення AST на MGIT

Препарат	Концентрація вихідного розчину (мг/л)	Розчинник	Розріджувач	Концентрація робочого розчину (мг/л)	Остаточна концентрація на MGIT (мг/л)
Левофлоксацин	10 000	0.1N NaOH[1]	ДВ	84.0	1.0
Моксифлоксацин (СС)	10 000	0.1N NaOH[1]	ДВ	21.0	0.25
Моксифлоксацин (СВ)	10 000	0.1N NaOH[1]	ДВ	84.0	1.0
Етіонамід	10 000	ДМСО	ДМСО	420.0	5.0
Амікацин	10 000	ДВ	ДВ	84.0	1.0
Лінезолід	1 000	ДВ	ДВ	84.0	1.0
Бедаквілін	1 000	ДМСО	ДМСО	84.0	1.0
Деламанід	10 000	ДМСО	ДМСО	5.04	0.06
Клофазимін	10 000	ДМСО	ДМСО	84.0[2]	1.0

ДВ = Стерильна дистильована вода; ДМСО = диметилсульфоксид; NaOH = Натрію гідроксид.
[1] NaOH додають по краплях до повного розчинення сполуки, після чого до загального об'єму додають ДВ.
[2] Робочий розчин клофазиміну необхідно готувати заново перед застосуванням, починаючи з вихідного розчину (10 000 мг/л), оскільки цей препарат нестабільний у низьких концентраціях.

Концентрований розчин у відповідному розчиннику можна зберігати при температурі -20°C до 6 місяців. Стабільність концентрованого розчину відрізняється для різних препаратів. Робочі розчини зазвичай нестабільні і їх слід готувати свіжими перед застосуванням.

Інокуляція

Посівний матеріал для непрямого тестування на медикаментозну чутливість в Bactec MGIT можна приготувати з рідких або твердих поживних середовищ, відповідно до рекомендацій виробника [48]. Тестування з використанням посівного матеріалу з рідких середовищ включає наступні етапи:

- В якості посівного матеріалу використовується пробірка з позитивним MGIT. Пробірку перевертають один-два рази, а потім залишають у спокої приблизно на п'ять-десять хвилин, щоб великі грудочки осіли на дно;
- Посівний матеріал (супернатант) з позитивної пробірки MGIT використовують у нерозведеному вигляді протягом 1-3 днів після того, як прилад Bactec MGIT зафіксував позитивний результат, або в розведенні 1:5, якщо інкубацію проводять через 4-5 днів. 0,5 мл суспензії асептично додають в кожну пробірку з препаратом;
- Для кожного набору AST контрольна пробірка буде являти собою 1:100 розведення вихідного посівного матеріалу (1% контроль): посівний матеріал розводять 1:100 шляхом додавання 0,1 мл суспензії до 10 мл стерильного фізіологічного розчину. Пробірку необхідно добре перемішати перед додаванням 0,5 мл в пробірку з контролем росту. Для тестування піразинаміду, що проводиться в культуральному середовищі MGIT зі зниженим pH, яке надається виробником Becton Dickinson, використовується розведений 1:10 контроль росту.

Інкубація

Після інокуляції пробірки інкубують при 37°C в приладі Bactec MGIT, де флуоресценція виявляється автоматично. У ручному режимі пробірки інкубують при 37°C і зчитують дані під УФ-світлом щодня.

7.4.4 Інтерпретація результатів звіту

Прилад BACTEC MGIT 960 постійно контролює всі пробірки на наявність підвищеної флуоресценції. Флуоресценція в пробірках з препаратом порівнюється з флуоресценцією в пробірці з контролем росту (КР) для визначення результатів чутливості. Коли одиниця росту (ОР) в пробірці контролю росту (тобто 1% інокуляту і 10% для піразинаміду) досягає заданого порогу (тобто 400 ОР) протягом 4-13 днів (стрептоміцин, ізоніазид, рифампін та етамбутол) або 4-21 дня (піразинамід), оцінюються значення КР у пробірках з препаратом.

[3] Програма реагентів NIH AIDS Reagent Program: www.hivreagentprogram.org/Catalog/HRPAntimicrobialCompoundsandOtherChemicals/ARP-12702.aspx

[4] Ресурси BEI: www.beiresources.org/Catalog/BEIAntimicrobialCompoundsandOtherChemicals/NR-51636.aspx

Результати є якісними: якщо пробірки з препарату містять менше 100 ОР, штам вважається чутливим. І навпаки, якщо пробірки з препаратом містять більше 100 ОР, штам вважається резистентним. Якщо через 14 днів КР залишається негативним, тест слід повторити, звернувши увагу на процедуру підготовки посівного матеріалу та враховуючи здатність штаму до росту (дисгонію).

Система MGIT 960 у поєднанні з модулем TB eXiST (розширене тестування на індивідуальну чутливість), що працює на окремому комп'ютері з програмним забезпеченням EpiCenter, може бути використана для проведення AST для панелі препаратів другого ряду, для яких встановлені критичні концентрації для цього методу [49]. Модуль також дозволяє збільшити тривалість протоколу понад 13 днів, щоб врахувати повільно зростаючі резистентні ізоляти комплексу *M. tuberculosis*.

Всі позитивні пробірки слід перевірити на контамінацію, приготувавши мазок за Грамом та/або додавши одну краплю на планшет з кров'ю, а також на ріст мікобактерій, приготувавши мазок, пофарбований за Цілем-Нільсеном.

7.5 Визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) відповідно до референтного методу Мережі EUCAST

Хоча було описано кілька методів визначення мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК) протитуберкульозних препаратів відносно ізолятів комплексу *M. tuberculosis*, до 2019 року не існувало стандартизованих методів, які б дозволяли вимірювати епідеміологічне значення порога відсікання (ECOFF) та клінічні контрольні точки відповідно до стратегій EUCAST. У 2016 році було створено підкомітет EUCAST з тестування на чутливість до протимікробних препаратів (AMST), основна мета якого полягала у визначенні референтного методу для визначення МІК комплексу *M. tuberculosis*. Цей референтний метод був оприлюднений на веб-сайті EUCAST у липні 2019 року (https://www.eucast.org/mycobacteria/methods_in_mycobacteria), а протокол був опублікований у 2020 році [34] разом із попередніми результатами [50]. Основними критеріями узгодження протоколу було отримання результатів МІК з хорошою відтворюваністю.

Коротко, протокол являє собою метод мікророзведення бульйону в середовищі Міддлбрука 7H9-10% OADC. Кінцевий посівний матеріал являє собою суспензію зі 105 КУО/мл, отриману з 10^{-2} розведення 0,5 суспензії за Макфарландом, приготованої після вортексування бактеріальних колоній скляними кульками перед приготуванням суспензії в стерильній воді. Культуру підтримують в U-подібному 96-лунковому полістирольному планшеті для мікротитрування з кришкою, інкубують при температурі 36 ± 1 °C (приклад конфігурації планшета показаний на рисунку 13). Зчитування здійснюється за допомогою перевернутого дзеркала. МІК, виражена в мг/л, є найнижчою концентрацією, яка пригнічує візуальний ріст, щойно контроль, розведений 1:100 (тобто суспензія 103 КУО/мл), показує візуальний ріст.

При тестуванні на чутливість до протимікробних препаратів мережі EUCAST у якості референтного штаму використовувався *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, цільові значення МІК якого варіювали в межах 0.03-0.12 для ізоніазиду, 0.12-0.5 для левофлоксацину та 0.25-1 мг/л для амікацину [50].

Усі розчини лікарських засобів слід готувати відповідно до вимог Належної виробничої практики (НВП), а порошки слід отримувати безпосередньо від виробника лікарського засобу або з надійних комерційних джерел разом з відповідною документацією щодо забезпечення якості. Як правило, лікарські засоби слід розчиняти, як описано в настановах ISO-20776-1 або, якщо в них не зазначається цього, відповідно до рекомендацій виробника.

Оскільки багато протитуберкульозних препаратів не розчиняються у воді, розчинник слід використовувати з обережністю з огляду на його потенційну інгібуючу дію на комплекс *M. tuberculosis*. Отже, для розчинників, відмінних від води, таких як ДМСО, слід використовувати контролі росту, що містять таку саму частку розчинника (наприклад, у випадку ДМСО), що й середовище, яке містить препарат, а концентрація розчинника повинна бути однаковою для всіх концентрацій. Наприклад, бедаквілін, деламанід, претоманід, клофазимін розчиняються в ДМСО, і кінцева концентрація в кожній лунці може становити 1% або 0,5% ДМСО, відповідно до рекомендацій виробника. Через обмежену розчинність цих препаратів, серійне розведення препарату слід проводити спочатку 100% ДМСО перед додаванням (1/100) в кожну лунку.

Рисунок 13. Схема мікротитрувального планшета для еталонного протоколу мікророзведення бульйону EUCAST AMST

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul
	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20
B	negative	GC	AA1 (10-2)	AA1 (10-2)	AA1 (10-2)	AA1 (10-2)	AA1 (10-2)	AA1 (10-2)	AA1 (10-2)	AA1 (10-2)	GC	200ul
	control	100%	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	1%	dH20
C	negative	GC	AA1 (10-2)	AA1 (10-2)	AA1 (10-2)	AA1 (10-2)	AA1 (10-2)	AA1 (10-2)	AA1 (10-2)	AA1 (10-2)	GC	200ul
	control	100%	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	1%	dH20
D	negative	GC	AA2 (10-2)	AA2 (10-2)	AA2 (10-2)	AA2 (10-2)	AA2 (10-2)	AA2 (10-2)	AA2 (10-2)	AA2 (10-2)	GC	200ul
	control	100%	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	1%	dH20
E	negative	GC	AA2 (10-2)	AA2 (10-2)	AA2 (10-2)	AA2 (10-2)	AA2 (10-2)	AA2 (10-2)	AA2 (10-2)	AA2 (10-2)	GC	200ul
	control	1%	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	100%	dH20
F	negative	GC	AA3 (10-2)	AA3 (10-2)	AA3 (10-2)	AA3(10-2)	AA3 (10-2)	AA3 (10-2)	AA3 (10-2)	AA3 (10-2)	GC	200ul
	control	1%	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	100%	dH20
G	negative	GC	AA3 (10-2)	AA3 (10-2)	AA3 (10-2)	AA3(10-2)	AA3 (10-2)	AA3 (10-2)	AA3 (10-2)	AA3 (10-2)	GC	200ul
	control	1%	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	100%	dH20
H	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul
	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20	dH20

AA1 – AA3 протитуберкульозний препарат 1-3; GC, контроль росту; GC 100% відповідає тому ж посівному матеріалу, що й в лунках, які містять препарат; GC 1% відповідає стократному розведенню посівного матеріалу; негативний контролем є 200 µл 7H9-OADC; dH20, стерильна дистильована вода.

Список літератури

1. Drobniewski F, Rüsch-Gerdes S, Hoffner S; Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis (EUCAST document E.DEF 8.1)--report of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Clin Microbiol Infect. 2007 Dec;13(12):1144-56. doi: 10.1111/j.1469- 0691.2007.01813.x. Epub 2007 Aug 29. PMID: 17727670.
2. Schön T, Miotto P, Köser CU, Viveiros M, Böttger E, Cambau E. Mycobacterium tuberculosis drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. Clin Microbiol Infect. 2017 Mar;23(3):154-60.
3. World Health Organization (WHO). Implementing the end TB strategy: the essentials. WHO/HTM/TB/2015.31.
4. World Health Organization (WHO). WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-susceptible tuberculosis treatment. Geneva: WHO; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
5. World Health Organization (WHO). WHO operational handbook on tuberculosis Module 4: Treatment – drug- susceptible tuberculosis treatment. Geneva: WHO; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
6. Zignol M, Dean AS, Falzon D, van Gemert W, Wright A, van Deun A, et al. Twenty Years of Global Surveillance of Antituberculosis-Drug Resistance. N Engl J Med. 2016 Sep 15;375(11):1081-9.
7. Mitchison DA. The diagnosis and therapy of tuberculosis during the past 100 years. Am J Respir Crit Care Med. 2005 Apr 01;171(7):699-706.
8. Böttger EC. The ins and outs of Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility testing. Clin Microbiol Infect. 2011 Aug;17(8):1128-34.
9. Zhang S, Chen J, Shi W, Liu W, Zhang W, Zhang Y. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. Emerg Microbes Infect. 2013 Jun;2(6):e34.
10. Bateson A, Ortiz Canseco J, McHugh TD, Witney AA, Feuerriegel S, Merker M, et al. Ancient and recent differences in the intrinsic susceptibility of Mycobacterium tuberculosis complex to pretomanid. J Antimicrob Chemother. 2022 05 29;77(6):1685-93.
11. World Health Organization (WHO). Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. WHO. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: https://apps.who.int/iris/handle/10665/275469
12. World Health Organization (WHO). Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. WHO. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: https://apps.who.int/iris/handle/10665/260470
13. World Health Organization (WHO). Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). WHO; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
14. Hillemann D, Hoffner S, Cirillo D, Drobniewski F, Richter E, Rüsch-Gerdes S, et al. First evaluation after implementation of a quality control system for the second line drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis joint efforts in low and high incidence countries. PLoS One. 2013;8(10):e76765.
15. Bwanga F, Hoffner S, Haile M, Joloba ML. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: a meta-analysis. BMC Infect Dis. 2009 May 20;9:67.
16. World Health Organization (WHO). 2012. Tuberculosis laboratory biosafety manual. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77949/1/9789241504638_eng.pdf?ua=1
17. EUCAST. MIC distributions and the setting of epidemiological cutoff (ECOFF) values. 2019. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_SOPs/EUCAST_SOP_10.1_MIC_distributions_and_epidemiological_cut-off_value__ECOFF__setting_20191130.pdf
18. Canetti G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. Am Rev Respir Dis. 1965 Nov;92(5):687- 703.
19. Mitchison DA. Drug resistance in tuberculosis. Eur Respir J. 2005 Feb;25(2):376-9.
20. Werngren J, Sturegård E, Juréen P, Ängeby K, Hoffner S, Schön T. Reevaluation of the critical concentration for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against pyrazinamide using wild-type MIC distributions and pncA gene sequencing. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Mar;56(3):1253-7.
21. Ängeby K, Juréen P, Kahlmeter G, Hoffner SE, Schön T. Challenging a dogma: antimicrobial susceptibility testing breakpoints for Mycobacterium tuberculosis. Bull World Health Organ. 2012 Sep 01;90(9):693-8.

22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Laboratory detection and identification of mycobacteria; approved guideline. 2008. CLSI, M48-A. Wayne, PA.

23. World Health Organization (WHO). Treatment of drug-susceptible tuberculosis: rapid communication. June 2021.

24. World Health Organization (WHO). WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-resistant tuberculosis treatment. Online annexes. 2020.

25. World Health Organization (WHO). Rapid communication: key changes to the treatment of drug-resistant tuberculosis. Geneva: 2022 (WHO/UCN/TB/2022.2). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

26. Dovprela. Summary of product characteristics (last update July 2022). Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/dovprela-epar-product-information_en.pdf

27. Heifets L. Qualitative and quantitative drug-susceptibility tests in mycobacteriology. Am Rev Respir Dis. 1988 May;137(5):1217-22.

28. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull World Health Organ. 1969;41(1):21-43.

29. Bergmann JS, Woods GL. Mycobacterial growth indicator tube for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid and rifampin. Diagn Microbiol Infect Dis. 1997 Jul;28(3):153-6.

30. Rüsch-Gerdes S, Domehl C, Nardi G, Gismondo MR, Welscher HM, Pfyffer GE. Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to first-line drugs. J Clin Microbiol. 1999 Jan;37(1):45-8.

31. Bemer P, Palicova F, Rüsch-Gerdes S, Drugeon HB, Pfyffer GE. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 2002 Jan;40(1):150-4.

32. Kruuner A, Yates MD, Drobniewski FA. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial testing and determination of critical concentrations of first- and second-line antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 2006 Mar;44(3):811-8.

33. Schön T, Köser CU, Werngren J, Viveiros M, Georghiou S, Kahlmeter G, et al. What is the role of the EUCAST reference method for MIC testing of the Mycobacterium tuberculosis complex? Clin Microbiol Infect. 2020 Nov;26(11):1453-55.

34. Schön T, Werngren J, Machado D, Borroni E, Wijkander M, Lina G, et al. Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex isolates - the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination. Clin Microbiol Infect. 2020 Nov;26(11):1488-92.

35. Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroyy P, Langerova M, Mahler HT, et al. Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensitivity and Resistance. Bull World Health Organ. 1963;29:565-78.

36. World Health Organization. Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis: policy statement. WHO/HTM/TB/2011.9. WHO, Geneva 2011.

37. Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, et al. Microscopic-observation drug- susceptibility assay for the diagnosis of TB. N Engl J Med. 2006 Oct 12;355(15):1539-50.

38. Toit K, Mitchell S, Balabanova Y, Evans CA, Kummik T, Nikolayevskyy V, et al. The Colour Test for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis strains. Int J Tuberc Lung Dis. 2012 Aug;16(8):1113-8.

39. Fitzwater SP, Sechler GA, Jave O, Coronel J, Mendoza A, Gilman RH, et al. Second-line anti-tuberculosis drug concentrations for susceptibility testing in the MODS assay. Eur Respir J. 2013 May;41(5):1163-71.

40. Coban AY, Deveci A, Sunter AT, Martin A. Nitrate reductase assay for rapid detection of isoniazid, rifampin, ethambutol, and streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review and meta- analysis. J Clin Microbiol. 2014 Jan;52(1):15-9.

41. Coban AY, Deveci A, Sunter AT, Palomino JC, Martin A. Resazurin microtiter assay for isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin resistance detection in Mycobacterium tuberculosis: Updated meta-analysis. Int J Mycobacteriol. 2014 Dec;3(4):230-41.

42. Lee J, Armstrong DT, Ssengooba W, Park JA, Yu Y, Mumbowa F, et al. Sensititre MYCOTB MIC plate for testing Mycobacterium tuberculosis susceptibility to first- and second-line drugs. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(1):11-8.

43. Kontsevaya I, Werngren J, Holicka Y, Klaos K, Tran A, Nikolayevskyy V. Non-commercial phenotypic assays for the detection of Mycobacterium tuberculosis drug resistance: a systematic review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020 Mar;39(3):415-26.

44. Cambau E, Viveiros M, Machado D, Raskine L, Ritter C, Tortoli E, et al. Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European multicentre study. J Antimicrob Chemother. 2015 Mar;70(3):686-96.

45. World Health Organization (WHO). WHO operational handbook on tuberculosis. Module 4: treatment - drug- resistant tuberculosis treatment. 2020.

46. Pfyffer GE, Bonato DA, Ebrahimzadeh A, Gross W, Hotaling J, Kornblum J, et al. Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the proportion method with solid media. J Clin Microbiol. 1999 Oct;37(10):3179-86.

47. Pfyffer GE, Palicova F, Rüsch-Gerdes S. Testing of susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide with the nonradiometric BACTEC MGIT 960 system. J Clin Microbiol. 2002 May;40(5):1670-4.

48. Global Laboratory Initiative. Mycobacteriology Laboratory Manual. 2014.

49. Springer B, Lucke K, Calligaris-Maibach R, Ritter C, Böttger EC. Quantitative drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by use of MGIT 960 and EpiCenter instrumentation. J Clin Microbiol. 2009 Jun;47(6):1773-80.

50. Schön T, Werngren J, Machado D, Borroni E, Wijkander M, Lina G, et al. Multicentre testing of the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination on Mycobacterium tuberculosis. Clin Microbiol Infect. 2021 Feb;27(2):288.e1-88.e4.

8 Молекулярне типування ізолятів комплексу *Mycobacterium tuberculosis*

Автори: Girts Skenders, Dick van Soolingen

Рецензенти: Stefan Niemann та Vladyslav Nikolayevskyy (2015)

Рецензенти: Thomas A. Kohl, Andrea M. Cabibbe (2022)

8.1 Передумови та принципи

За останні два десятиліття з'явилося багато методів молекулярного типування ізолятів комплексу *Mycobacterium tuberculosis* з різними рівнями відтворюваності, розрізняючої здатності та вимогами до технічної експертизи.

Якщо раніше фагове типування, профілювання чутливості до протитуберкульозних препаратів та інші біохімічні ознаки дозволяли диференціювати лише дуже обмежену кількість штамів, то сьогодні методи типування на основі ДНК можуть потенційно розрізняти навіть окремі випадки передачі. Наразі ДНК-дактилоскопія підтримує рутинне відстеження контактів у багатьох країнах, а також дослідження передачі інфекції від людини до людини, ранню ідентифікацію спалахів захворювання, груп високого ризику передачі, лабораторне перехресне забруднення [1, 2] і розрізнення реінфекції та реактивації [3, 4]. Зокрема, ДНК-дактилоскопія комплексу *M. tuberculosis* значно покращила розуміння передачі туберкульозу, що особливо важливо для резистентних до лікарських препаратів штамів. Крім того, розпізнавання сімейств генотипів полегшило дослідження популяційної структури комплексу *M. tuberculosis* та динаміки його передачі.

Різноманітні методи ДНК-дактилоскопії слугують різним цілям і мають різні характеристики, які дозволяють використовувати їх у конкретних сферах застосування. Традиційні підходи до типування досліджують визначені і дуже варіабельні мішені в геномі і включають такі методи, як споліготипування, MIRU-VNTR (Мікобактеріальні переміжні повторювані одиниці - варіабельна кількість тандемних повторів) та IS6110 RFLP (поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ)). Поява повногеномного секвенування (ПГС) на основі технології секвенування нового покоління (СНП) дозволяє проводити типування на основі геному, пропонуючи найвищу можливу дискримінацію та роздільну здатність для молекулярної епідеміології комплексу *M. tuberculosis*. І навпаки, цільовий підхід СНП досліджує невеликі ділянки геному, але, тим не менш, може забезпечити філогенетичну класифікацію, дані про споліготипи і прогнозування профілю резистентності на основі первинних зразків пацієнтів. Цей розділ має на меті описати характеристики цих методів та їх найважливіші застосування.

Хоча застосування ДНК-дактилоскопії покращило наші знання про природну історію розвитку туберкульозу та динаміку захворювання, все ще залишаються відкриті питання. Всі методи ДНК-дактилоскопії працюють відповідно до різних молекулярних годинників[5], а стабільність ДНК-профілів хоча і була детально вивчена, але не до кінця зрозуміла [5]. В ідеалі, з точки зору молекулярного типування, кожна передача призводить до незначних змін у ДНК-відбитку, в той час як штами залишаються впізнаваними, що дозволяє відрізнити первинні джерела в ланцюгу передачі від вторинних і третинних, що дає змогу набагато детальніше проаналізувати передачу на певній території. На жаль, мутації в геномі комплексу *M. tuberculosis* відбуваються за стохастичним процесом, і тому ДНК-дактилоскопія ніколи не буде досконалим інструментом у дослідженнях передачі інфекції. Однак застосування, наприклад, ПГС ізолятів *M. tuberculosis* для візуалізації ланцюгів передачі інфекції продемонструвало дискримінаційну силу цього підходу. Крім того, геномні дані успішно використовуються для прогнозування еволюційної динаміки, особливо в напрямку резистентності, і навіть можуть допомогти розкрити епідеміологічні зв'язки в часі та просторі.

Нижче наведено опис трьох традиційних методів ДНК-дактилоскопії: споліготипування, MIRU-VNTR типування та RFLP типування, а також опис ПГС та цільового СНП.

8.2 IS6110 RFLP типування

Метод поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (RFLP/ПДРФ) для типізації бактеріальних штамів був першим методом ДНК-типування штамів, який виявився придатним для вивчення передачі інфекції [6]. Він базується на тому, що кількість мобільних інсерційних послідовностей IS6110 розміром 1,35kb, присутніх у геномі штамів, варіює від 0 до приблизно 30. Самі ці геномні сайти інсерції також дуже варіабельні у штамів комплексу *M. tuberculosis*, що призводить до високої варіабельності патернів смугастості.

Генерація RFLP -патернів є технічно складним і трудомістким процесом, який вимагає великої кількості (наприклад, 2 мкг) очищеної геномної ДНК в якості вихідного матеріалу. Процес включає розщеплення ДНК ферментом рестрикції, розділення фрагментів за допомогою електрофорезу, перенесення фрагментів на ДНК-мембрану та гібридизацію з ДНК-зондом, комплементарним до послідовності транспозону IS6110, і остаточну візуалізацію результатів на світлочутливій плівці. Кожен окремий етап процесу має вирішальне значення для кінцевого результату, що також дає уявлення про труднощі, пов'язані з міжлабораторною порівнянністю.

[5] Вимірювання еволюційних змін з плином часу на молекулярному рівні, що базується на теорії, що певні послідовності ДНК спонтанно мутують з постійною швидкістю. Цей показник в основному використовується для оцінки того, як давно два споріднені організми відхилилися від спільного предка.

Крім того, аналіз патернів IS6110 RFLP за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення, такого як BioNumerics, є складним і вимагає досвідчених користувачів. Однак труднощі, пов'язані з RFLP типуванням, не змінили того факту, що RFLP типування докорінно змінило наші уявлення про передачу ТБ. Більше того, для штамів певних генотипових сімейств, таких як Пекінська філогенетична клада, рівень дискримінації RFLP типування все ще перевершує рівень дискримінації нещодавно впровадженого 24-локусного MIRU-VNTR-типування [7-9].

8.3 Споліготипування

Споліготипування базується на поліморфізмі в локусі прямих повторів (ПП) мікобактеріальної хромосоми [10, 11]. Добре збережені прямі повтори розміром 36 bp перемежовуються унікальними спейсерними послідовностями розміром від 35 до 41 bp. Порядок розташування спейсерів виявився досить консервативним [12]. Наразі ідентифіковано 94 різні спейсерні послідовності, 43 з яких використовуються у споліготипуванні першого покоління для штамів комплексу *M. tuberculosis* [13]. Після ампліфікації денатуровані продукти ПЛР наносять у зворотному порядку на мембрану з ковалентно зв'язаними кількома синтетичними спейсерами, виведеними з послідовностей області ПП двох контрольних штамів (*M. tuberculosis* H37Rv і *M. bovis* BCG P3).

Клінічні ізоляти комплексу *M. tuberculosis* можна відрізнити за наявністю або відсутністю одного або декількох спейсерів. Майже всі штами виявляють кілька таких спейсерів. Отримані патерни - 43 наявні чи відсутні спейсери - зазвичай є характерними для певного сімейства генотипів [14]. Таким чином, споліготипування є простим, дешевим, швидким і відтворюваним [15] інструментом для вивчення філогенезу штамів комплексу *M. tuberculosis* або для встановлення зв'язку фенотипових особливостей ізолятів з генотиповою родиною, яку вони представляють [11]. Рівень дискримінативності споліготипування, як правило, низький, і необхідно бути обережним при використанні цього методу для вивчення передачі туберкульозу на рівні штамів [16, 8]. Однак можна використовувати споліготипування як скринінговий метод при типуванні для виключення передачі, якщо отримані різні профілі споліготипування. З іншого боку, якщо профілі споліготипів ідентичні, то не можна зробити висновок про епідеміологічний зв'язок між відповідними пацієнтами. База даних SpolDB4 є однією з найбільших загальнодоступних баз даних по комплекс *M. tuberculosis* і містить зразки споліготипів приблизно 40 000 клінічних ізолятів з 122 країн.

8.4 MIRU-VNTR типування

Оцінка мікобактеріальних переміжних повторюваних одиниць зі змінною кількістю тандемних повторів (MIRU-VNTRs) бактеріальних штамів виявилася придатним методом для виявлення генетичних поліморфізмів у межах видів бактерій [17]. Відмінності в кількості тандемних повторів у 24 ділянках геному штамів комплексу *M. tuberculosis* є основою для цього визнаного на міжнародному рівні методу типування. У мультиплексній ПЛР ампліфікують до 24 локусів з використанням праймерів, специфічних для флангових ділянок кожного повтору, після чого за розміром ампліфікованих ділянок тандемних повторів визначають кількість наявних тандемних повторів. Кількість тандемних повторів, виявлених у різних локусах, перетворюється на цифровий код, який слугує ДНК-відбитком відповідних бактерій туберкульозу і дозволяє користувачам легко обмінюватися результатами типування MIRU-VNTR та проводити міжлабораторні порівняння.

Визначення продуктів ПЛР при типуванні MIRU-VNTR можна проводити вручну, виконуючи всі однолокусні ПЛР, а потім інтерпретувати довжину продукту за допомогою електрофорезу. Однак, в даний час у продажу є набори для MIRU-VNTR типування, що містять всі реагенти, необхідні для проведення MIRU-типування за 24 VNTR локусами відповідно до міжнародного стандарту (наприклад, GenoScreen, Лілль, Франція), а також широко доступні автоматизовані і високопродуктивні методи, які дозволяють визначати розмір ПЛР-продуктів шляхом секвенування з використанням мічених барвником праймерів, що дозволяє заощадити час і підвищити точність.

24-локусне типування MIRU-VNTR дозволяє розрізняти неспоріднені штами та забезпечує клональну стабільність для надійної ідентифікації ізолятів з одного ланцюга передачі [18].

Відкриті бази даних, до яких користувачі можуть додавати патерни MIRU-VNTR для онлайн-аналізу клональної ідентифікації ізолятів комплексу *M. tuberculosis*, є широкодоступними (наприклад, база даних MIRU-VNTRplus) [19]. Кластерний аналіз також можна проводити локально за допомогою програмного забезпечення BioNumerics (Applied Maths, Гент, Бельгія). Національні бази даних молекулярної епідеміології з вбудованими інструментами кластерного аналізу існують в декількох країнах ЄС. Інструменти кластерного аналізу також доступні в міжнародних базах даних та інструментах звітності з епідеміології, наприклад, TESSY.

Детальні протоколи багатолокусного типування MIRU-VNTR доступні за посиланням: https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/files/MIRU-VNTRtypingmanualv6.pdf

8.5 Повногеномне секвенування

Хоча класичні методи генотипування націлені на високо мінливі генетичні елементи, вони досліджують лише невелику частину геному. Тому вони не можуть вловити мікроеволюцію, яка потенційно може відбуватися в інших ділянках геному. На відміну від них, ПГС на основі СНП дає доступ до майже повних послідовностей геному. Широке використання такого підходу для досліджень та епідеміологічного контролю стало можливим завдяки швидкому вдосконаленню та зростанню доступності технологій СНП. Так звані «настільні» системи СНП, що генерують дані секвенування в діапазоні 10-20 Гб, можуть бути інтегровані в рутинний робочий процес з пропускною здатністю, адаптованою до звичайної мікробіологічної лабораторії [20, 21]. Крім того, комерційно доступні прості у використанні набори для підготовки бібліотеки ДНК і мультиплексування зразків вимагають лише невеликої кількості геномної ДНК, що скорочує час, необхідний для отримання достатньої кількості матеріалу для екстракції ДНК з культури повільнозростаючих мікобактерій.
Загальний робочий процес для ПГС починається з отримання очищеної геномної ДНК, виділеної з бактеріальної культури. Її перетворюють на набір (бібліотеку) фрагментів певного розміру зі специфічними адаптерними послідовностями на обох кінцях фрагмента. Бібліотеки завантажуються в прилади СНП, що дозволяють отримати мільйони зчитувань коротких послідовностей на зразок. За допомогою спеціального біоінформаційного конвейєру ці дані можна використовувати для виявлення геномних мутацій у порівнянні з референтним геномом (зазвичай це геном *M. tuberculosis* H37Rv). Для генотипування та аналізу подібності/спорідненості часто використовують відповідний набір варіантів однонуклеотидного поліморфізму (ОНП). Цікавою альтернативою даним ПГС є підхід, заснований на типізації багатолокусних послідовностей основного геному (cgMLST), який пропонує притаманну йому стандартизацію та легке включення нових наборів даних у порівняння, що дозволяє здійснювати постійне спостереження в режимі реального часу [22]. Реалізація відповідного конвеєра аналізу повинна відповідати прийнятим стандартам і включати оцінку в порівнянні з еталонними наборами даних відомих аналітичних рішень [23, 24].

Цікаво, що завдяки характеру технології СНП та її обмеження можна виділити споліготипові патерни з даних секвенування всього геному, тоді як типи дактилоскопії MIRU-VNTR та IS6110 не можуть бути достовірно визначені на основі даних СНП.

Кілька досліджень продемонстрували, що підходи, засновані на аналізі повного геному, забезпечують більшу роздільну здатність, ніж класичне генотипування (наприклад, 24-локусне MIRU-VNTR-типування та дактилоскопіювання IS6110)[25-28, 21]. Зокрема, аналіз послідовності всього геному дозволяє більш точно диференціювати ізоляти, що належать до певного недавнього ланцюга передачі, від інших, тісно, але не безпосередньо пов'язаних ізолятів, що особливо корисно при вирішенні складних ситуацій під час спалаху [27, 28, 21]. У таких ситуаціях філогенетичні дерева, побудовані на основі отриманих геномних ОНП або cgMLST даних ізолятів, набагато краще корелюють з наявними епідеміологічними даними та просторово-часовими закономірностями розподілу відповідних випадків ТБ, ніж дерева, побудовані на основі даних класичного типування [28, 21, 29-31]. На додаток до кращої залежності сигналу від часу, вища роздільна здатність, яку пропонує аналіз на основі всього геному, також надає іншу цінну інформацію. Наприклад, наявність особливо заразного випадку (тобто супер-розповсюджувача), що призводить до численних вторинних випадків, можна визначити, спостерігаючи зіркоподібну топологію філогенетичного дерева, де клональні варіанти, що відрізняються лише кількома ОНП або алелями і відповідають вторинним випадкам, відгалужуються безпосередньо від центрального вузла, що представляє той самий єдиний вихідний випадок.

Крім того, виявлення вакантних вузлів у топології дерева вказує на недіагностовані випадки в популяції. Односпрямоване накопичення ОНП дозволяє більш чітко пов'язати нові випадки з попередніми в рамках поздовжнього спалаху, що може дозволити проводити більш цілеспрямовані дослідження з відстеження контактів [28, 21]. Це може бути корисним для точного визначення випадків-джерел для ізолятів пацієнтів, що мають особливе значення, таких як ізоляти мультирезистентних організмів.

Для ідентифікації та окреслення нещодавніх ланцюгів передачі на основі послідовностей цілого геному ключовим параметром для калібрування є рівень варіабельності геному, що виникає у штамів *M. tuberculosis* як у межах інфікованих осіб, так і між ними з плином часу. У різних дослідженнях рівень розбіжностей між такими лонгітюдними ізолятами, отриманими від хронічно інфікованих пацієнтів або від епідеміологічно пов'язаних випадків, рідко перевищував три-п'ять ОНП, визначаючи таким чином діапазон відсікання для прогнозування нещодавньої передачі [26, 28, 21]. Розрахована середня швидкість зміни послідовності ДНК становила приблизно 0,5 ОНП на геном на рік, що дає кількісну оцінку швидкості короткострокової еволюції *M. tuberculosis* в популяції людини-хазяїна [28, 21]. Цікаво, що ця швидкість збігається зі швидкістю мутацій, оціненою для *M. tuberculosis* в моделі інфікування макак [32]. За наявності достатньої кількості даних спеціальний аналітичний конвеєр може розгадати динаміку спалаху та оцінити часовий і просторовий розподіл та еволюційну історію філогенетичного кладу [33-37].

Порівняно з класичним генотипуванням, ще однією важливою перевагою повногономного секвенування є те, що воно одночасно надає пряму і цінну інформацію для прогнозування медикаментозної резистентності, а також генотипування з найвищою роздільною здатністю [38, 20]. Таке поєднання діагностичної та епідеміологічної інформації в одному аналізі є великою перевагою, особливо у випадку з *M. tuberculosis*, для якого важливим є раннє виявлення медикаментозної резистентності. Аналіз на основі секвенування цілого геному виходить далеко за межі звичайних молекулярних тестів, зосереджуючись на відомих відібраних мутаціях у «гарячих точках» генів, залучених до резистентності до протитуберкульозних препаратів першого та другого ряду, таким чином, можливо, пропускаючи нові мутації, асоційовані з резистентністю [39]. В принципі, ПГС охоплює більшість, якщо не всі послідовності генів, що визначають так званий резистом *M. tuberculosis*, що дозволяє дослідити всі відомі мутації, пов'язані з медикаментозною резистентністю [20]. Більше того, секвенування цілого геному з високим покриттям може виявити появу та співіснування різних мутацій, що зумовлюють резистентність до ліків, ще до відбору та фіксації остаточного мутанта, у можливому поєднанні з компенсаторними мутаціями [40, 41]. Таке виявлення має клінічне значення, оскільки співіснування субпопуляцій дикого типу і мутантів, що призводить до гетерорезистентності, може ввести в оману сучасні фенотипічні та молекулярні тести на резистентність [40, 41], а також висновки про передачу або вторинне набуття резистентності до лікарських засобів. Загалом, виведення профілю резистентності на основі даних цілого геному залежить від добре контрольованих баз даних, які фіксують мутації, пов'язані з резистентністю, а в ідеалі - також варіанти, не пов'язані з резистентністю. Інтерпретація молекулярних варіантів, що призводять до резистентності до бедаквіліну і деламаніду, є більш складною і вимагає оцінки великої кількості резистентних штамів для досягнення такої ж впевненості, яку ми маємо для рифампіцину. Нещодавні ініціативи під керівництвом консорціуму ReSeqTB і CRyPTIC спільно з ВООЗ призвели до впровадження кураторських і сучасних ресурсів для генетичних маркерів, пов'язаних з резистентністю [42-45].

8.6 Цільове СНП

На додаток до характеристики цілого геному, секвенування нового покоління може також використовуватися разом зі спеціальним протоколом збагачення або ампліфікації, що дозволяє використовувати складні первинні зразки пацієнтів в якості вхідних даних і значно підвищити чутливість. Можливість працювати безпосередньо зі зразками пацієнта скорочує час виконання завдання і при цьому досягає аналогічного рівня чутливості порівняно з класичними методами генотипування і виявлення молекулярної резистентності [46, 47]. Звичайно, обмеження певним набором геномних ділянок не дозволить досягти такого ж рівня роздільної здатності, як у ПГС. Тим не менш, загальна класифікація, така як ідентифікація видів мікобактерій, визначення лінії та споліготипування, можлива за умови, що відповідні геномні ділянки є мішенню (наприклад, Deeplex MycTB, Genoscreen). Такий підхід дозволяє принаймні виключити ланцюги передачі, коли серед штамів виявляються різні споліготипи та філогенетичні ОНП, і може свідчити про певну спорідненість, коли однакові філогенетичні ОНП/споліготипи (та патерни ПП) виявляються серед зразків, епідеміологічно пов'язаних між собою, або для клональних штамів, що циркулюють в обмежених умовах. Хоча комерційно доступні таргетовані розчини СНП можуть бути використані безпосередньо на ДНК, виділеній із зразків пацієнтів, поріг чутливості наразі все ще недостатньо чітко визначений, але мікроскопічно позитивні зразки, як правило, можуть бути успішно проаналізовані.

8.7 Загальні аспекти щодо методів генотипування

Описані тут п'ять методів генотипування ДНК можуть бути використані для різних цілей. Споліготипування зазвичай використовується в дослідженнях для виявлення родини генотипів відповідних бактерій; тоді як цей метод менш придатний для типування штамів. Як RFLP, так і 24-локусне MIRU-VNTR типування мають вищий рівень дискримінації та відтворюваності і можуть бути використані для типування штамів. Час виконання MIRU-VNTR типування значно коротший, ніж RFLP типування, і воно також технічно набагато менш складне. Крім того, MIRU-VNTR може бути використане для відстеження контактів і пошуку джерела і може надійно виключити передачу.

ПГС стала доступним з появою СНП, і відповідна технологія продовжує швидко розвиватися. Зокрема, ПГС пропонує найвищу можливу роздільну здатність для аналізу спалахів і відстеження ланцюгів передачі. Збір великих обсягів даних про геномні варіанти, асоційовані з резистентністю, також дає можливість зробити висновок про всебічний профіль резистентності як на основі всього геному, так і на основі даних цСНП.

Хоча молекулярне відстеження комплексу *M. tuberculosis* на основі СНП має величезний потенціал, його широке використання все ще обмежується деякими проблемами. Попри стрімке зниження вартості, аналіз СНП все ще залишається занадто дорогим для багатьох ТБ-лабораторій, особливо з огляду на те, що впровадження аналізу СНП вимагає високих початкових інвестиційних витрат. Для більшості підходів СНП на вартість також безпосередньо впливає розмір партії та мультиплексування, оскільки виконання неповних циклів секвенування значно збільшує вартість одного зразка. Інший важливий фактор пов'язаний з інтеграцією СНП в існуючі лабораторні робочі процеси. Було показано, що при включенні аналізу резистентності, ПГС може бути конкурентоспроможним за вартістю зі стандартними підходами і цікавим варіантом також для лабораторій з низьким і середнім рівнем доходу [48, 49].

Окрім технічної підготовки та спеціальних навичок, необхідних для виконання «мокрого» компоненту робочого процесу СНП, слід також враховувати потребу в експертному керівництві щодо аналізу та інтерпретації даних секвенування. Крім того, «сухий» компонент робочого процесу СНП вимагає спеціальної IT-інфраструктури для управління даними та їх зберігання. На відміну від класичного генотипування, технічні та аналітичні модальності (наприклад, точне розмежування послідовності геному, яка береться до уваги в аналізі; мінімальне покриття послідовності тощо) ще не стандартизовані [24]. Як наслідок, набори даних, сформовані різними лабораторіями, поки що не піддаються прямому порівнянню, а універсальні бази даних (наприклад, для багатоцентрових лонгітюдних епідеміологічних досліджень та епіднагляду) поки що не створені. Хоча ВООЗ нещодавно опублікувала повний каталог мутацій, пов'язаних із резистентністю, спільно з консорціумом CRyPTIC [45], функціональність біоінформатики для виявлення варіантів, що спричиняють резистентність, все ще не стандартизована [24].

Важливим моментом є те, що надійний вихідний матеріал, необхідний для аналізу зразків ТБ методом ПГС, можна отримати лише з культур. Навіть сучасні робочі процеси вимагають щонайменше 1 нг чистої ДНК, і процес є відносно чутливим до забруднень, оскільки не існує специфічної ампліфікації геномних мішеней. Цю проблему частково вирішує цСНП, яке включає специфічну ампліфікацію цільових ділянок геному. Однак цільове СНП не дозволяє проводити генотипування з високою роздільною здатністю.

Відстеження контактів, доповнене генотипуванням, вважається важливим для розуміння передачі інфекції від людини до людини. Однак менш зрозуміло, наскільки генотипування саме по собі є економічно ефективним і чи має воно якусь додаткову цінність, окрім відстеження контактів, з точки зору безпосереднього впливу на громадське здоров'я [50].

Результати ДНК-дактилоскопії також використовуються для прогнозування розміру майбутніх кластерів після виявлення перших двох випадків нового кластера. Час між випадками, вік та місцезнаходження є змінними, які стають відомими незабаром після виявлення нового кластеру ТБ. Поєднуючи молекулярні дані та реєстраційні дані пацієнта, можна спрогнозувати нові кластерні епізоди, використовуючи фактори ризику. Ця інформація може сприяти створенню систем раннього попередження для національних служб охорони здоров'я [51].

ДНК-дактилоскопія може виявити можливе перехресне забруднення, що сталося в лабораторії. Якщо лабораторія виявляє два ізоляти з ідентичними ДНК-профілями протягом одного тижня, це зазвичай вказує на помилку при відборі зразків або в лабораторії [1]. У такому випадку лікаря слід попросити переглянути клінічну картину пацієнта, а мікробіолога - перевірити частоту позитивних результатів і те, чи не були культури з ідентичними ДНК-відбитками контаміновані на певному етапі. Для виявлення цієї поширеної проблеми рекомендується регулярно перевіряти позитивні культури; в Нідерландах близько 3% всіх позитивних культур є результатом перехресного забруднення [52].

Широке застосування ДНК-дактилоскопії дозволило отримати суттєві відомості про передачу ТБ, особливо при поєднанні традиційного епідеміологічного дослідження та молекулярного типування [53]. Методи молекулярної дактилоскопії продемонстрували сильний зв'язок передачі ТБ зі статтю та молодшим віком джерела інфекції в умовах низького рівня поширеності захворювання [54]. Крім того, дослідження передачі інфекції в домогосподарствах і поза ними в Південній Африці [29, 31] дали важливу інформацію про походження ТБ в умовах високого рівня поширеності [55, 56]. Існує також підвищений ризик того, що раніше ліковані та вилікувані пацієнти з туберкульозом знову захворіють на туберкульоз при повторному інфікуванні [57].

Нещодавня робота продемонструвала можливості ПГС з високою роздільною здатністю, особливо для спалахів МР-ТБ, і дозволила розкрити еволюцію філогенетичних ліній у напрямку передачі та набуття резистентності [58, 33, 59, 36].

8.8 Матеріали

Очищена ДНК бактерій комплексу *M. tuberculosis* зазвичай є найкращим матеріалом для молекулярного типування. Для методів, заснованих на ампліфікації ДНК, таких як споліго- і MIRU-VNTR-типування, потрібна лише невелика кількість вихідного матеріалу. Навіть очищена ДНК з достатньої кількості бактерій у клінічному матеріалі дасть змогу отримати типовий зразок. Однак, короткочасна інкубація цих бактерій в рідкому живильному середовищі зазвичай дає більш надійні та відтворювані результати, що доцільно з огляду на витрати і час на виконання методів типування. Для RFLP-типування, заснованого на специфічних обмеженнях ізольованої неампліфікованої ДНК, необхідна повністю вирощена культура, оскільки потрібно 2 мкг високоочищеної геномної ДНК. В умовах діагностики для досягнення такої кількості росту після виявлення ТБ знадобиться кілька тижнів.

Для проведення ПГС за допомогою сучасних наборів для підготовки бібліотек, вимагається лише 1 нг ДНК, якщо використовувати, наприклад, платформи секвенування Illumina, але ця кількість може бути значно більшою, якщо використовувати, наприклад, секвенатор MinION від Oxford Nanopore Technologies. Геномну ДНК, придатну для ПГС, можна надійно виділити з ранніх позитивних рідинних культур (MGIT) [48]. Проте, субкультура позитивного первинного зразка є розумним кроком для мінімізації забруднення ДНК бактеріальною фауною та людським матеріалом. Цільове СНП може бути безпосередньо застосованим до ДНК, виділеної із зразків пацієнта.

Мембрани, реагенти та ДНК позитивного контролю для споліготипування можна придбати. Ефективність споліготипування є кращою, особливо в лабораторіях з молекулярним досвідом, а результати є більш порівнянними між різними лабораторіями [60].

Для 24-локусного типування MIRU-VNTR набір, що містить всі реагенти для проведення восьми реакцій мультиплексної ампліфікації, можна придбати на комерційній основі. Крім того, фрагменти ПЛР-продуктів аналізують на автоматичному секвенаторі ДНК. За відсутності дорогого аналізатора, 24-локусний MIRU-VNTR можна використовувати для проведення одно- або мультиплексних реакцій ампліфікації та детектування продукту, як автоматизовано, так і вручну (див. стандартну робочу процедуру на сайті MIRU-VNTRplus за адресою http://www.miru-vntrplus.org). Якість типування MIRU-VNTR у світі та міжлабораторна відтворюваність значно покращилися за останні роки [61].

Як ПГС, так і цСНП представляють собою складні багатоетапні протоколи, що вимагають специфічних олігомерів, ферментів і реагентів для перетворення вихідного зразка ДНК в бібліотеку СНП, і, звичайно ж, самого приладу для секвенування, а також різноманітного допоміжного обладнання. Існує безліч комерційних рішень, які дозволяють підготувати бібліотеку СНП зі зразків бактеріальної ДНК. Крім того, існують різні прилади для СНП, зокрема кілька настільних секвенаторів з меншою пропускною здатністю і відносно вищою вартістю секвенування, але з меншими фізичними розмірами і меншими інвестиційними витратами [38].

8.9 Результати/інтерпретація

Аналіз патернів IS6110 RFLP за допомогою програмного забезпечення BioNumerics є технічно складним [13]. Найважливішим аспектом є включення внутрішніх (суміш двох молекулярних маркерів) і зовнішніх стандартів (ДНК контрольного штаму з відповідним діапазоном смуг) для нормалізації і точного зчитування розмірів смуг. RFLP-типування складається з тривалої, багатоетапної лабораторної процедури, яка схильна до помилок. Погана якість типування RFLP може бути пов'язана з лабораторною технікою, але дуже часто спричинена неправильною інтерпретацією результатів за допомогою програмного забезпечення для аналізу патернів.

Шаблони споліготипів - це коди з 43 можливих цифр, які можна сортувати за допомогою стандартного програмного забезпечення, такого як Excel. Однак більшість установ використовують програмне забезпечення BioNumerics (Applied Maths, Кортрейк, Бельгія), яке дозволяє порівнювати результати будь-якого методу типування. Існує міжнародна база даних зразків споліготипів [13, 62], яка містить десятки тисяч зразків споліготипів, що можуть бути використані для порівняння результатів типування, отриманих на місці, з зразками, які були знайдені в інших місцях і вже позначені позначенням генотипової родини.

Результатом типування MIRU-VNTR є цифровий код, що зазвичай складається з 12, 15 або 24 чисел, який можна відносно легко проаналізувати, як описано вище в розділі про споліготипування. В епідеміологічних дослідженнях локальні порівняння найкраще проводити за допомогою програмного забезпечення BioNumerics, для якого доступні спеціальні плагіни. Існує кілька міжнародних баз даних з результатами типування MIRU-VNTR, в яких можна порівняти локальні результати з міжнародними колекціями (наприклад, http://www.miru-vntrplus.org або http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE).

Зважаючи на характер вихідних даних, що продукуються інструментами СНП, будь-який аналіз вимагає біоінформаційного рішення. Це включає в себе як спеціалізовані програмні інструменти, так і відповідне IT-обладнання для обчислень і зберігання даних. Для генотипування на основі даних повного геному цікавим варіантом є підхід cgMLST, який передбачає використання як відкритого, так і комерційного програмного забезпечення (наприклад, Ridom SeqSphere+ Software, Ridom GmbH, Мюнстер, Німеччина), доступного для аналізу даних.

8.10 Контроль якості

Контроль якості ДНК-дактилоскопії є надзвичайно важливим. У всіх випадках контролі першої лінії повинні включати штами з відомим ДНК-відбитком. У випадку споліготипування ДНК H37Rv і P3 повинна бути включена в кожен тест для оцінки ефективності кожного з 43 спейсерних олігонуклеотидних зондів, присутніх на блоті. Для типування MIRU-VNTR слід використовувати штам з відомим профілем типування. При RFLP-типуванні в кожному тесті слід використовувати конкретний штам з широким діапазоном смуг, щоб перевірити нормалізацію [60].

Рекомендується також процедура контролю другої лінії, яка повинна включати сліпий обмін набором зразків ДНК з іншою лабораторією двічі на рік для перевірки відтворюваності. В якості третьої лінії контролю слід аналізувати «сліпий» набір зразків ДНК, наданий міжнародною організацією кільком інститутам, щоб перевірити рівень володіння даною процедурою [60].

В ідеалі, для СНП всі етапи робочого процесу, від виділення ДНК до секвенування, аналізу даних і звітності, повинні бути стандартизовані і добре задокументовані, а також повинна існувати програма зовнішньої оцінки якості, щоб гарантувати, що отримані дані відповідають міжнародним стандартам [24]. З 2017 року в рамках мережі ERLTB впроваджено схему ЗОЯ для ПГС комплексу *M. tuberculosis*, яка дозволяє порівнювати показники та результати роботи різних лабораторій, надавати об'єктивні докази якості тестування, а також визначати сфери для вдосконалення та потреби в навчанні [63].

Список літератури

1. Martínez M, García de Viedma D, Alonso M, Andrés S, Bouza E, Cabezas T, et al. Impact of laboratory cross- contamination on molecular epidemiology studies of tuberculosis. J Clin Microbiol. 2006 Aug;44(8):2967-9.
2. Martín A, Herranz M, Lirola MM, Fernández RF, Bouza E, García de Viedma D, et al. Optimized molecular resolution of cross-contamination alerts in clinical mycobacteriology laboratories. BMC Microbiol. 2008 Feb 14;8:30.
3. Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. N Engl J Med. 2003 Sep 18;349(12):1149-56.
4. Bryant JM, Harris SR, Parkhill J, Dawson R, Diacon AH, van Helden P, et al. Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with Mycobacterium tuberculosis: a retrospective observational study. Lancet Respir Med. 2013 Dec;1(10):786-92.
5. Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PE, Nagelkerke NJ, van Embden JD, van Soolingen D. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of Mycobacterium tuberculosis based on serial patient isolates. J Infect Dis. 1999 Oct;180(4):1238-44.
6. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J Intern Med. 2001 Jan;249(1):1-26.
7. Gori A, Esposti AD, Bandera A, Mezzetti M, Sola C, Marchetti G, et al. Comparison between spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphisms in molecular genotyping analysis of Mycobacterium tuberculosis strains. Mol Cell Probes. 2005 Aug;19(4):236-44.
8. Kremer K, Arnold C, Cataldi A, Gutiérrez MC, Haas WH, Panaiotov S, et al. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for Mycobacterium tuberculosis complex strains. J Clin Microbiol. 2005 Nov;43(11):5628-38.
9. Kremer K, Au BK, Yip PC, Skuce R, Supply P, Kam KM, et al. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate Mycobacterium tuberculosis Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. J Clin Microbiol. 2005 Jan;43(1):314-20.
10. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 1997 Apr;35(4):907-14.
11. Jong BC, Antonio M, Awine T, Ogungbemi K, de Jong YP, Gagneux S, et al. Use of spoligotyping and large sequence polymorphisms to study the population structure of the Mycobacterium tuberculosis complex in a cohort study of consecutive smear-positive tuberculosis cases in The Gambia. J Clin Microbiol. 2009 Apr;47(4):994-1001.
12. Embden JD, van Gorkom T, Kremer K, Jansen R, van Der Zeijst BA, Schouls LM. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. J Bacteriol. 2000 May;182(9):2393-401.
13. Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993 Feb;31(2):406-9.
14. Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia. J Clin Microbiol. 1995 Dec;33(12):3234-8.
15. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martín C, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol. 1999 Aug;37(8):2607-18.
16. Der Zanden AG, Kremer K, Schouls LM, Caimi K, Cataldi A, Hulleman A, et al. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for Mycobacterium tuberculosis complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. J Clin Microbiol. 2002 Dec;40(12):4628-39.
17. Lindstedt BA. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. Electrophoresis. 2005 Jun;26(13):2567-82.
18. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 2006 Dec;44(12):4498-510.
19. Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU- VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. J Clin Microbiol. 2008 Aug;46(8):2692-9.
20. Köser CU, Bryant JM, Becq J, Török ME, Ellington MJ, Marti-Renom MA, et al. Whole-genome sequencing for rapid susceptibility testing of M. tuberculosis. N Engl J Med. 2013 Jul 18;369(3):290-2.

21. Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, et al. Whole-genome sequencing to delineate Mycobacterium tuberculosis outbreaks: a retrospective observational study. Lancet Infect Dis. 2013 Feb;13(2):137-46.
22. Kohl TA, Harmsen D, Rothgänger J, Walker T, Diel R, Niemann S. Harmonized Genome Wide Typing of Tubercle Bacilli Using a Web-Based Gene-By-Gene Nomenclature System. EBioMedicine. 2018 Aug;34:131- 38.
23. Jajou R, Kohl TA, Walker T, Norman A, Cirillo DM, Tagliani E, et al. Towards standardisation: comparison of five whole genome sequencing (WGS) analysis pipelines for detection of epidemiologically linked tuberculosis cases. Euro Surveill. 2019 Dec;24(50).
24. Meehan CJ, Goig GA, Kohl TA, Verboven L, Dippenaar A, Ezewudo M, et al. Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis: current standards and open issues. Nat Rev Microbiol. 2019 09;17(9):533-45.
25. Niemann S, Köser CU, Gagneux S, Plinke C, Homolka S, Bignell H, et al. Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis with identical DNA fingerprints. PLoS One. 2009 Oct 12;4(10):e7407.
26. Schürch AC, Kremer K, Daviena O, Kiers A, Boeree MJ, Siezen RJ, et al. High-resolution typing by integration of genome sequencing data in a large tuberculosis cluster. J Clin Microbiol. 2010 Sep;48(9):3403-6.
27. Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, Cook VJ, Shah L, Brodkin E, et al. Whole-genome sequencing and social- network analysis of a tuberculosis outbreak. N Engl J Med. 2011 Feb 24;364(8):730-9.
28. Roetzer A, Diel R, Kohl TA, Rückert C, Nübel U, Blom J, et al. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a Mycobacterium tuberculosis outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. PLoS Med. 2013;10(2):e1001387.
29. Bjorn-Mortensen K, Soborg B, Koch A, Ladefoged K, Merker M, Lillebaek T, et al. Tracing Mycobacterium tuberculosis transmission by whole genome sequencing in a high incidence setting: a retrospective population-based study in East Greenland. Sci Rep. 2016 09 12;6:33180.
30. Bjorn-Mortensen K, Lillebaek T, Koch A, Soborg B, Ladefoged K, Sørensen HC, et al. Extent of transmission captured by contact tracing in a tuberculosis high endemic setting. Eur Respir J. 2017 03;49(3).
31. Diel R, Kohl TA, Maurer FP, Merker M, Meywald Walter K, Hannemann J, et al. Accuracy of whole-genome sequencing to determine recent tuberculosis transmission: an 11-year population-based study in Hamburg, Germany. Eur Respir J. 2019 11;54(5).
32. Ford CB, Lin PL, Chase MR, Shah RR, Iartchouk O, Galagan J, et al. Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of Mycobacterium tuberculosis during latent infection. Nat Genet. 2011 May;43(5):482-6.
33. Fiebig L, Kohl TA, Popovici O, Mühlenfeld M, Indra A, Homorodean D, et al. A joint cross-border investigation of a cluster of multidrug-resistant tuberculosis in Austria, Romania and Germany in 2014 using classic, genotyping and whole genome sequencing methods: lessons learnt. Euro Surveill. 2017 Jan 12;22(2).
34. Meehan CJ, Moris P, Kohl TA, Pečerska J, Akter S, Merker M, et al. The relationship between transmission time and clustering methods in Mycobacterium tuberculosis epidemiology. EBioMedicine. 2018 Nov;37:410- 16.
35. Merker M, Barbier M, Cox H, Rasigade JP, Feuerriegel S, Kohl TA, et al. Compensatory evolution drives multidrug-resistant tuberculosis in Central Asia. Elife. 2018 10 30;7.
36. Tagliani E, Anthony R, Kohl TA, de Neeling A, Nikolayevskyy V, Ködmön C, et al. Use of a whole genome sequencing-based approach for Mycobacterium tuberculosis surveillance in Europe in 2017-2019: an ECDC pilot study. Eur Respir J. 2021 01;57(1).
37. Walker TM, Choisy M, Dedicoat M, Drennan PG, Wyllie D, Yang-Turner F, et al. transmission in Birmingham, UK, 2009-19: An observational study. Lancet Reg Health Eur. 2022 Jun;17:100361.
38. World Health Organization (WHO). The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in Mycobacterium tuberculosis complex: technical guide. 2018 (WHO/CDS/TB/2018.19). Licence: CC BY-NCSA3.0 IGO.
39. Beckert P, Sanchez-Padilla E, Merker M, Dreyer V, Kohl TA, Utpatel C, et al. MDR M. tuberculosis outbreak clone in Eswatini missed by Xpert has elevated bedaquiline resistance dated to the pre-treatment era. Genome Med. 2020 11 25;12(1):104.
40. Sun G, Luo T, Yang C, Dong X, Li J, Zhu Y, et al. Dynamic population changes in Mycobacterium tuberculosis during acquisition and fixation of drug resistance in patients. J Infect Dis. 2012 Dec 01;206(11):1724-33.
41. Merker M, Kohl TA, Roetzer A, Truebe L, Richter E, Rüsch-Gerdes S, et al. Whole genome sequencing reveals complex evolution patterns of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis Beijing strains in patients. PLoS One. 2013;8(12):e82551.
42. Ezewudo M, Borens A, Chiner-Oms Á, Miotto P, Chindelevitch L, Starks AM, et al. Integrating standardized whole genome sequence analysis with a global Mycobacterium tuberculosis antibiotic resistance knowledgebase. Sci Rep. 2018 10 18;8(1):15382.

43. The Cryptic Consortium. A data compendium associating the genomes of 12,289 Mycobacterium tuberculosis isolates with quantitative resistance phenotypes to 13 antibiotics. PLoS Biol. 2022 08;20(8):e3001721.
44. The Cryptic Consortium. Genome-wide association studies of global Mycobacterium tuberculosis resistance to 13 antimicrobials in 10,228 genomes identify new resistance mechanisms. PLoS Biol. 2022 08;20(8):e3001755.
45. Walker TM, Miotto P, Köser CU, Fowler PW, Knaggs J, Iqbal Z, et al. The 2021 WHO catalogue of Mycobacterium tuberculosis complex mutations associated with drug resistance: A genotypic analysis. Lancet Microbe. 2022 04;3(4):e265-e73.
46. Feuerriegel S, Kohl TA, Utpatel C, Andres S, Maurer FP, Heyckendorf J, et al. Rapid genomic first- and second-line drug resistance prediction from clinical. Eur Respir J. 2021 01;57(1).
47. Jouet A, Gaudin C, Badalato N, Allix-Béguec C, Duthoy S, Ferré A, et al. Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. Eur Respir J. 2021 03;57(3).
48. Pankhurst LJ, Del Ojo Elias C, Votintseva AA, Walker TM, Cole K, Davies J, et al. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study. Lancet Respir Med. 2016 Jan;4(1):49-58.
49. Vogel M, Utpatel C, Corbett C, Kohl TA, Iskakova A, Ahmedov S, et al. Implementation of whole genome sequencing for tuberculosis diagnostics in a low-middle income, high MDR-TB burden country. Sci Rep. 2021 07 28;11(1):15333.
50. Mears J, Vynnycky E, Lord J, Borgdorff MW, Cohen T, Crisp D, et al. The prospective evaluation of the TB strain typing service in England: a mixed methods study. Thorax. 2016 08;71(8):734-41.
51. Kik SV, Verver S, van Soolingen D, de Haas PE, Cobelens FG, Kremer K, et al. Tuberculosis outbreaks predicted by characteristics of first patients in a DNA fingerprint cluster. Am J Respir Crit Care Med. 2008 Jul 01;178(1):96-104.
52. Lambregts-van Weezenbeek CS, Sebek MM, van Gerven PJ, de Vries G, Verver S, Kalisvaart NA, et al. Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprint surveillance in The Netherlands: 6 years' experience with nation-wide cluster feedback and cluster monitoring. Int J Tuberc Lung Dis. 2003 Dec;7(12 Suppl 3):S463-70.
53. Vries G, van Hest RA, Burdo CC, van Soolingen D, Richardus JH. A Mycobacterium tuberculosis cluster demonstrating the use of genotyping in urban tuberculosis control. BMC Infect Dis. 2009 Sep 08;9:151.
54. Borgdorff MW, Nagelkerke NJ, de Haas PE, van Soolingen D. Transmission of Mycobacterium tuberculosis depending on the age and sex of source cases. Am J Epidemiol. 2001 Nov 15;154(10):934-43.
55. Verver S, Warren RM, Munch Z, Richardson M, van der Spuy GD, Borgdorff MW, et al. Proportion of tuberculosis transmission that takes place in households in a high-incidence area. Lancet. 2004 Jan 17;363(9404):212-4.
56. Verver S, Warren RM, Munch Z, Vynnycky E, van Helden PD, Richardson M, et al. Transmission of tuberculosis in a high incidence urban community in South Africa. Int J Epidemiol. 2004 Apr;33(2):351-7.
57. Verver S, Warren RM, Beyers N, Richardson M, van der Spuy GD, Borgdorff MW, et al. Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2005 Jun 15;171(12):1430-5.
58. Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Frebourg N, Lecher S, Willery E, et al. Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage. Nat Genet. 2015 Mar;47(3):242-9.
59. Walker TM, Merker M, Knoblauch AM, Helbling P, Schoch OD, van der Werf MJ, et al. A cluster of multidrug- resistant Mycobacterium tuberculosis among patients arriving in Europe from the Horn of Africa: a molecular epidemiological study. Lancet Infect Dis. 2018 04;18(4):431-40.
60. Braden CR, Crawford JT, Schable BA. Quality assessment of Mycobacterium tuberculosis genotyping in a large laboratory network. Emerg Infect Dis. 2002 Nov;8(11):1210-5.
61. de Beer JL, Ködmön C, van Ingen J, Supply P, van Soolingen D, 2010 GNfMSoT. Second worldwide proficiency study on variable number of tandem repeats typing of Mycobacterium tuberculosis complex. Int J Tuberc Lung Dis. 2014 May;18(5):594-600.
62. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol. 2006 Mar 06;6:23.
63. Anthony RM, Tagliani E, Nikolayevskyy V, de Zwaan R, Mulder A, Kamst M, Ködmön C, van der Werf MJ, Cirillo D, van Soolingen D; ERLTB-Net members. Experiences from 4 Years of Organization of an External Quality Assessment for Mycobacterium tuberculosis Whole-Genome Sequencing in the European Union/European Economic Area. Microbiol Spectr. 2023 Feb 14;11(1):e0224422. doi: 10.1128/spectrum.02244-22. Epub 2022 Dec 8. PMID: 36475728; PMCID: PMC9927412.

9 Використання та валідація дезінфекційних засобів для роботи з комплексом *Mycobacterium tuberculosis*

Автори: Thomas Pottage та Allan Bennett

Рецензенти: Thomas Pottage та Allan Bennett (2015)

9.1 Дезінфекція рідкими засобами

Існує два стандартні методи аналізу дезінфікуючих засобів від мікобактеріальних організмів, включаючи комплекс *Mycobacterium tuberculosis*; це кількісний тест з використанням суспензії та кількісний тест з використанням носія. Ці методи були задокументовані як галузеві стандарти: тест з використанням суспензії EN 14348:2005 і тест з використанням носія EN 14563:2008. Принцип тесту з використанням суспензії полягає у визначенні ефективності хімічного дезінфікуючого засобу проти суспендованих мікобактеріальних організмів при заданій температурі та протягом установленого періоду часу. Тест з використанням носія використовується для визначення ефективності дезінфікуючого засобу проти висушеного розчину *Mycobacterium* на предметному склі протягом встановленого періоду часу та при заданій температурі. Штамами *Mycobacterium*, зазначеними в обох стандартах, є *Mycobacterium avium* (ATCC 15769) і *Mycobacterium terrae* (ATCC 15755), причому *M. terrae* визначено як сурогат *M. tuberculosis*. Ці мікроорганізми специфіковані через їх відсутність патогенності, і, здається, немає причин, чому стандарти не можна було б адаптувати до використання зі штамами туберкульозу, просто замінивши сурогатний організм бажаним штамом туберкульозу. Однак заміна штамів означала б, що тест не відповідав би стандартному методу і не міг би бути визначений як такий. Стандартні методи з використанням протитуберкульозних сурогатів узагальнено в наступних розділах. Повну інформацію про стандарти можна отримати у відповідному національному органі зі стандартизації.

Не можна стверджувати, що тести відповідають стандарту, але можна застосувати метод, який ґрунтується на стандарті, що дасть більш точні результати дезінфекції проти мікобактерій туберкульозу, оскільки дезінфікуючий засіб буде перевірено на штамі туберкульозу, який використовуватиметься *in vitro*.

9.1.1 Тест з використанням суспензії: EN 14348:2005

Необхідно підготувати досліджувану суспензію мікобактеріального агента(ів) для отримання концентрації суспензії від 1,5 x 10^9 КУО/мл до 5,0 x 10^9 КУО/мл. Цю суспензію слід використовувати в день її приготування. Для підрахунку основної суспензії слід приготувати розведення 10^{-7} і 10^{-8} і 1 мл розведень розподілити по 0,5 мл на 2 чашки з агаром MCO (середовище Middlebrook і Cohn 7H10 із збагаченням 10% ростовою добавкою OADC). Цю процедуру слід виконувати з дублюванням. Потім чашки слід інкубувати при 37 ± 1°C протягом 21 дня.

Тестові розчини дезінфікуючого засобу слід готувати з концентрацією, що в 1,25 рази перевищує необхідну тестову концентрацію. Це пов'язано з тим, що під час тестування з додаванням валідаційної суспензії (1 мл) і інтерферуючої речовини (1 мл) до 8 мл дезінфікуючого засобу концентрація буде розведена до 100% досліджуваної концентрації. Ще дві концентрації продукту також слід підготувати для тестування, принаймні одна з цих концентрацій повинна бути нижчою за концентрацію активного діапазону. Суспензії досліджуваного продукту слід довести до необхідної концентрації у жорсткій воді.

Випробовувані продукти, які постачаються готовими для застосування (наприклад, попередньо змочені серветки), можуть бути використані, але слід зазначити в звіті випробування, що концентрація під час випробування дорівнювала 80% і що це найвища концентрація, яку можна досягти. Подальші розведення цих готових до використання продуктів слід проводити дистильованою водою замість жорсткої.

Розчини для тестування продукту слід готувати для кожного тесту та використовувати протягом двох годин після приготування.

Випробування слід проводити за двох різних умов, пов'язаних із завантаженням органічного матеріалу. Цей чистий розчин готують шляхом додавання 0,3 г бичачого альбуміну фракції V до 100 мл розчинника (розчин триптону натрію хлориду, 1 г триптону, 8,5 г натрію хлориду в 1000 мл води). Чисті умови вимагають додавання 1 мл розчину 3 г/л фракції V бичачого альбуміну до 9 мл досліджуваного розчину та досліджуваного продукту. Це дасть кінцеву концентрацію розчину 0,3 г/л у 10 мл досліджуваного розчину.

Брудні умови досягаються шляхом поєднання розчину бичачого альбуміну фракції V і високої концентрації еритроцитів барана. Розчин отримують шляхом розчинення 3 г бичачого альбуміну фракції V у 97 мл розчинника з отриманням розчину 30 г/л. Його розбавляють 1 до 10 під час тесту, щоб отримати кінцевий розчин 3 г/л. Принаймні 8 мл свіжої дефібринованої овечої крові слід центрифугувати при 800 g протягом 10 хвилин. Супернатант слід видалити, а еритроцити повторно суспендувати в розчиннику. Цей крок слід повторити щонайменше тричі, доки супернатант не втратить колір. Після цього еритроцити можна ресуспендувати і додати 3 мл до 97 мл розчину бичачого альбуміну. Розчин можна зберігати протягом семи днів при температурі від 2°C до 8°C.

Тест з використанням суспензії виконується шляхом піпетування 1 мл чистого або брудного інтерферуючого розчину в стерильну пробірку, а потім 1 мл досліджуваної суспензії. Потім цю пробірку слід поставити на дві хвилини на водяну баню при встановленій температурі 20°C. Через дві хвилини в пробірку потрібно додати 8 мл досліджуваного продукту та почати відлік часу. Пробірку слід перемішати на початку 60-хвилинного тестового періоду та безпосередньо наприкінці періоду.

Після 60-хвилинного періоду тестування 1 мл зразка досліджуваного розчину слід вилучити з пробірки та перенести піпеткою в нову стерильну пробірку, що містить 1 мл води та 8 мл перевіреного нейтралізатора. Необхідно було провести попередні перевірочні випробування, щоб переконатися, що нейтралізатор здатний нейтралізувати досліджуваний продукт і не пригнічує ріст тестового(их) організму(ів). Пробірку необхідно поставити на водяну баню при 20°C на п'ять хвилин.

Після етапу нейтралізації 1 мл зразка нейтралізованої досліджуваної суспензії слід піпетувати та рівномірно розподілити між двома пластинами МСО та продублювати. Потім необхідно взяти ще 500 мкл нейтралізованої досліджуваної суспензії та додати її в пробірку, що містить 4,5 мл нейтралізатора. Це дасть 10^{-1} розчин досліджуваної суспензії, який слід додатково розбавити до 10^{-3} за допомогою нейтралізатора. Зразок об'ємом 1 мл слід взяти з кожної з пробірок для розведення та розділити на дві пластини МСО. Це слід зробити в двох примірниках, щоб отримати чотири чашки з 500 мкл розведеної тестової суспензії на них. Планшети слід інкубувати протягом 21 дня при 37±1°C.

Процедури для інших концентрацій досліджуваного продукту слід виконувати одночасно.

9.1.2 Тест з використанням носія: EN 14563:2008

Тест з використанням носія повинен виконуватися або з *M. avium* (ATCC 15769) або з *M. terrae* (ATCC 15755) або лише з *M. terrae*.

Необхідно підготувати досліджувану суспензію мікобактеріального агента(ів) для отримання концентрації суспензії від 1,5 x 10^9 КУО/мл до 5,0 x 10^9 КУО/мл. Цю суспензію слід використовувати в день її приготування. Для підрахунку основної суспензії слід приготувати розведення 10^{-7} і 10^{-8} і 1 мл розведень розподілити по 0,5 мл на 2 чашки з агаром МСО (середовище Middlebrook і Cohn 7H10 із збагаченням 10% ростовою добавкою OADC). Цю процедуру слід виконувати з дублюванням. Потім чашки слід інкубувати при 37 ± 1°C протягом 21 дня.

Тестові розчини для дезінфекції слід готувати з використанням жорсткої води. Потрібно підготувати три препарати, один в діапазоні активних концентрацій і принаймні один нижче діапазону активних концентрацій.

Тестові продукти, які постачаються готовими до нанесення (наприклад, попередньо змочені серветки), можна використовувати безпосередньо для тестування. Будь-які подальші розведення цих продуктів повинні використовувати воду замість жорсткої води.

Розчини для тестування продукту слід готувати для кожного тесту та використовувати протягом двох годин після приготування.

Дезінфікуючий засіб слід тестувати за двох різних умов, з чистим і брудним розчинами. Процедура виготовлення цих розчинів згадувалася раніше в методі тестування з використанням суспензії (Тест з використанням суспензії: EN 14348:2005).

Носій для тесту повинен знаходитися на предметному скельці, матованому з одного боку (розміри 15 x 60 x 1 мм). Носія слід очистити 70% етанолом, а потім квадрат 10 мм, нанесений на матову сторону. На завершення слід простерилізувати в сухожаровій шафі.

Для інокуляції носія 9 мл досліджуваної суспензії необхідно додати до 1 мл інтерферуючої речовини в чистій пробірці. Пробірку слід перемішати та внести 50 мкл у квадрат інокуляції на носії та рівномірно розподілити навколо квадрата за допомогою наконечника піпетки. Потім носія слід помістити в інкубатор при 36±1°C максимум на 60 хвилин або поки він не стане видимим сухим. Час висихання необхідно записати в протокол.

Перевірка носія виконується піпетуванням 10 мл розчину досліджуваного продукту в пробірку з гвинтовою кришкою (достатньо широкої, щоб вмістити предметне скло з носієм). Потім пробірку слід поставити на водяну баню з температурою 20°C. Носія слід помістити в пробірки відразу після завершення процесу сушіння, переконавшись, що квадрат інокуляції покритий розчином досліджуваного продукту. Таймер слід запустити одразу після занурення, а пробірку залишити на 60 хвилин контакту.

Після 60-хвилинного періоду експозиції носія слід перемістити в пробірку з кришкою, що загвинчується, наповнену 10 мл нейтралізатора та 1 мл скляних кульок (діаметром від 0,25 мм до 0,5 мм). Помістіть на водяну баню при 20°C, потім перемішуйте протягом 15 секунд. Потім пробірку слід залишити ще на чотири хвилини 45 секунд, що дасть загальний час нейтралізації п'ять хвилин. Необхідно було провести попередні перевірочні випробування, щоб переконатися, що нейтралізатор здатний нейтралізувати досліджуваний продукт і не пригнічує ріст досліджуваного(их) організму(ів). Пробірку необхідно поставити на водяну баню при 20°C на п'ять хвилин.

Після періоду нейтралізації 1 мл нейтралізованого розчину, що містить ресуспендовані досліджувані організми, необхідно видалити з носія та розподілити порівну між двома пластинами з агаром МСО. Цю процедуру слід продублювати. Відберіть ще 500 мкл і перенесіть у пробірку, що містить 4,5 мл нейтралізатора. Це дасть розчин досліджуваної суспензії 10^{-1}, який слід додатково розбавити до 10^{-3} за допомогою нейтралізатора.

Візьміть 1 мл зразка з кожної з пробірок для розведення та розподіліть його між двома пластинами з агаром МСО та продублюйте, щоб отримати чотири чашки з 500 мкл розведеної тестової суспензії на них. Планшети слід інкубувати протягом 21 дня при 37±1°C.

Процедури для інших концентрацій досліджуваного продукту слід виконувати одночасно.

9.1.3 Вибір методу

Стандарт, який слід використовувати, залежить від застосування, для якого використовується дезінфікуючий продукт. Наприклад, засіб для дезінфекції поверхонь бажано перевіряти за допомогою тестів з використанням носія, оскільки вони найбільше відповідають цьому застосуванню. Проте тести з використанням носія часто вважаються більш трудомісткими, навіть попри те, що з етапом нейтралізації виникає менше ускладнень. Рекомендація щодо використання предметних скелець у тесті з використанням носія може викликати занепокоєння щодо можливого випадкового тертя в лабораторії, тому можуть бути розглянуті інші матеріали. Зазначений 60-хвилинний час контакту не завжди відображатиме використання продукту, і може бути більш реалістичним скоротити його до коротшого періоду, особливо для тесту з використанням носія.

9.2 Газова дезінфекція

Знезараження за допомогою газу використовується в мікробіологічних лабораторіях для знезараження шаф біологічної безпеки, обладнання та самої лабораторії між експериментами та перед обслуговуванням [1-3]. Таке знезараження часто рекомендують у разі надзвичайних ситуацій, таких як неконтрольовані викиди рідкої культури в лабораторіях. Для знезараження за допомогою газу використовується випарований хімікат для контакту, а в багатьох випадках і конденсації на відкритих поверхнях усередині корпусу. Традиційно газова лабораторна дезінфекція проводилося з використанням формальдегіду [4], коли кристали параформальдегіду нагрівали до сублімації або кип'ятили рідкий розчин формаліну, що вивільняло пари формальдегіду в камеру. Потім ця пара конденсується на відкритих поверхнях і демонструє свої дезінфікуючі властивості шляхом алкілування білкових молекул, коли вона зв'язується з первинними амідними та аміногрупами [2,5].

Хоча формальдегід є ефективним як фумігант проти *M. tuberculosis*, навіть у мокроті [6] і проти *M. bovis* [7], він є потенційним канцерогеном [4], вимагає тривалого періоду аерації (для видалення пари з корпусу, якщо його не можна нейтралізувати або немає зовнішньої вентиляції), а залишки параформальдегіду, що залишилися на поверхнях, може бути важко видалити [5,8]. Ці недоліки формальдегіду призвели до дослідження використання альтернативних газоподібних технологій знезараження для фумігації.

З кандидатів на заміну фуміганту замість формальдегіду найкраще вивчений, можливо, перекис водню. Системи газоподібного пероксиду водню спочатку продавалися для використання у фармацевтичних чистих приміщеннях, але їхнє використання розширилося і на мікробіологічні лабораторії [4], тваринницькі приміщення [9], установки для складання космічних апаратів [10] і лікарні [11]. Дезактивація перекисом водню як процес має численні переваги порівняно з фумігацією формальдегідом. Він не залишає залишків, забезпечує кращу безпеку оператора та менш шкідливий для навколишнього середовища. Перекиси водню працюють як окислювачі, які виробляють гідроксильні радикали та супероксидні аніони [4], які можуть атакувати клітинну ДНК та ліпіди, але будучи високоактивними, гідроксильні радикали також реагуватимуть з іншими неорганічними речовинами та матеріалами [2].

Перекис водню продається для фумігації трьома способами: випарований перекис водню (VHP), пара перекису водню (HPV) і аерозольний перекис водню (aHP). Плазмова стерилізація перекисом водню, яка вводить пароподібний перекис водню в невелику вакуумну камеру, де розміщується забруднене обладнання, виявилася ефективною для дезактивації забруднених інструментів, таких як бронхоскопи [12].

9.2.1 Випарований перекис водню та пари перекису водню

Газоподібний пероксид водню отримують шляхом нагрівання та випаровування рідкого пероксиду водню. Рідкі розчини перекису водню вже показали ефективність дезінфекції проти мікобактерій туберкульозу [13,14]. Дві найбільш відомі компанії мають різні підходи до використання пароподібного перекису водню: генератори Steris використовують випарований перекис водню, а Bioquell - пару перекису водню.

Головним відмінним фактором між двома системами є наявність мікроконденсату на поверхнях корпусу, що фумігується. За допомогою технології Steris з використанням випарованого перекису водню. Спочатку осушується повітря всередині корпусу перед введенням випарованого перекису водню, що знижує точку роси в корпусі та дозволяє вводити випарований перекис водню без утворення конденсату на поверхнях, тобто, попри введення випарованого перекису водню, система позначається як «суха». Технологія з використанням пари перекису водню, розроблена компанією Bioquell, працює подібно до фумігації формальдегідом, коли пару перекису водню вводять у камеру вище точки роси, щоб забезпечити утворення мікроконденсату на поверхнях. Мікроконденсат являє собою мікроскопічний шар перекису водню товщиною приблизно 2-6 мкм. У таблиці 18 нижче описано більше відмінностей між двома технологіями.

Таблиця 18. Відмінності між двома основними технологіями застосування газоподібного пероксиду водню, Steris та Bioquell

Параметр	Steris	Bioquell
Опис	Випарований перекис водню	Пара перекису водню
Утворення конденсату?	Ні	Так
Необхідність осушення корпусу?	Так	Ні
Період введення перекису водню	Безперервно на етапі експозиції	Одне введення перед етапом дезактивації
Необхідний обсяг перекису водню	Великий	Невеликий
Генератор розташований всередині або ззовні по відношенню до корпусу	Ззовні	Всередині або ззовні (залежить від обраного генератора)
Віддалена активація та моніторинг	Так (потрібен ноутбук)	Так (контрольний прилад постачається окремо)

Обидві технології продемонстрували свою ефективність проти широкого спектру бактерій, вірусів і пріонів [2,9,11,15-19], часто під час випробувань, спонсорованих компаніями. Також доведено, що газоподібний перекис водню є ефективним при знищенні мікобактерій туберкульозу в біологічних шафах і лабораторіях високого рівня ізоляції [4,20]. Концентрація мікобактерій туберкульозу, використана Холлом для кожного індикатора, становила приблизно 103 клітини, це мало порівняно зі 106 спорами *G. stearothermophilus* для кожного з інших біологічних індикаторів. Стверджувалося, що менша кількість клітин, швидше за все, прирівнюється до того, що залишиться в лабораторному розливі після початкових процедур очищення [20]. Дослідження Канерта виявило, що навіть якщо більш високу концентрацію клітин туберкульозу висушити на біологічних індикаторах (від 8,0x104 до 2,3x106 КУО), жоден організм не відновиться після впливу випарованого перекису водню [4].

9.2.2 Сухий туман перекису водню

Ще одним способом розпилення перекису водню всередині камери для фумігації є використання аерозольного генератора перекису водню. Наприклад, генератора Glosair 400, що виробляється Advanced Sterilization Products. Доведено, що метод фумігації аерозольним перекисом водню є ефективним проти метицилінрезистентних *Staphylococcus aureus, Acinetobacter baumannii, Clostridium difficile* та мікобактерій туберкульозу [21-24]. Порівняння між застосуванням аерозольного перекису водню і 0,5% розчину гіпохлориту натрію було зроблено Барбутом, який виявив, що перший більш ефективний у знищенні спор *C. difficile* [22]. Технологія із застосуванням аерозольного перекису водню також продемонструвала свою успішність проти мікобактерій туберкульозу, шляхом висушування на носіях з нержавіючої сталі (з різними концентраціями від $5x10^5$ до $5x10^6$ КУО/мл) і розміщення навколо лабораторії рівня біобезпеки 3 [25]. У дослідженні Грейра використовувався 5% перекис водню з 60-хвилинним періодом експозиції для знищення мікобактерій туберкульозу, тоді як дослідження, проведене Андерсеном у подібних умовах, продемонструвало, що мікобактерії туберкульозу не вбивалися після впливу аерозольного перекису водню [26]. Було висунуто гіпотезу, що різниця в результатах може бути спричинена підготовкою індикаторів ТБ. У дослідженні Андерсена туберкульоз висушували з сольового розчину, тоді як в експериментах Грейра мікобактерії туберкульозу висушували з розчину дистильованої води, який міг послабити клітинну мембрану, зробивши її більш сприйнятливою до дезактивації аерозольним перекисом водню [25,26].

9.2.3 Плазмовий перекис водню

Технологія, яка може бути використана для дезактивації невеликих інструментів, а не цілих приміщень чи лабораторій, це плазмова стерилізація перекисом водню. У процесі знезараження використовується невелика вакуумна камера, заповнена пароподібним перекисом водню. Після того, як пара розповсюдиться в камері, вводиться електромагнітне випромінювання, щоб розщепити молекули перекису водню, індукуючи плазмовий стан і утворюючи гідроксильні реактивні речовини. Ця технологія виявилася ефективною для стерилізації бронхоскопів, які були заражені мікобактеріями туберкульозом і спочатку деконтаміновані в мийно-дезінфікуючій машині, порівняно з бронхоскопами, які очищалися лише за допомогою стандартного циклу мийно-дезінфікуючої машини [12].

9.2.4 Використання газової дезінфекції в аварійних ситуаціях

Розливання патогенних мікроорганізмів у лабораторії за межі обладнання для первинної ізоляції має бути надзвичайно рідкісним явищем, якому слід запобігати шляхом застосування відповідних процедур і практик. Не слід заохочувати використання скла, а зразки повинні зберігатися після вилучення з первинної оболонки за допомогою транспортних контейнерів або розчинів для упаковки. Однак можуть бути випадки, коли ці запобіжні заходи є недоцільними [25].

Реакція на розлив мікобактерій туберкульозу в лабораторії залежатиме від багатьох факторів, у тому числі типу зразка (діагностичний зразок/позитивний, МР-ТБ, титр, якщо відомий, персонал, який зазнав контакту, місце розташування тощо), тому будь-які рекомендації базуються на місцевих оцінка ризику. Порядок дій має бути наступним:

9.2.4.1 Утворюється аерозоль, який поступово видаляється шляхом осадження або розведення.

9.2.4.2 На підлозі лабораторії буде невтримувана рідина, локалізована в басейні, куди приземляється контейнер, у формі бризок і відкладених аерозолів, які будуть широко розсіяні на підлозі лабораторії та, можливо, на інших поверхнях.

9.2.4.3 Співробітники лабораторії, які зазнали впливу розливу, повинні залишити місце розташування, зняти забруднений одяг і негайно вимити будь-які відкриті ділянки шкіри. Не можна заходити в лабораторію, доки не буде видалено аерозоль. Дозволений час має базуватися на інформації про об'єм зразка, титр і швидкість вентиляції приміщення.

9.2.4.4 Існує три способи знезараження розливу.

9.2.4.5 Негайна газова дезінфекція, бажано з використанням дистанційної системи (формальдегід або перекис водню). Перевага цієї системи полягає в тому, що жоден оператор не піддається впливу при повторному вході в зону. Однак недоліком є те, що газоподібний дезінфікуючий засіб може не проникнути в матеріал з найвищою концентрацією розливу. Цю зону слід піддати остаточній стадії дезінфекції поверхні досвідченим лаборантом, одягненим у відповідні ЗІЗ, перш ніж лабораторія буде знову відкрита.

9.2.4.6 Після відповідного періоду часу досвідчений лаборант у відповідних ЗІЗ заходить до лабораторії та знезаражує місце розливу перед початком газового знезараження. У лабораторію можна потрапити безпосередньо після газової дезінфекції. Недоліком такого підходу є вплив на працівника, який входить до лабораторії.

9.2.4.7 Лише дезінфекція поверхонь може проводитися працівником у ЗІЗ, включаючи ЗІЗ. Недоліки цього підходу полягають у тому, що не всі забруднені поверхні можна обробляти, і працівник буде піддаватися впливу.

Знову ж таки, прийнятий підхід має ґрунтуватися на оцінці ризику, проведеній досвідченими співробітниками лабораторії, які мають досвід з питань біобезпеки. Бажано мати структуру оцінки ризику на такий випадок.

Список літератури

1. Lach VH. A study of conventional formaldehyde fumigation methods. Journal of Applied Bacteriology 1990; 68:471-477.
2. Block S. Disinfection, Sterilization and Preservation. Fifth edition: Lippincott Williams & Wilkins 2001.
3. Luftman H, Regitis M. B. atrophaeus and G. stearothermophilus Biological Indicators for Chlorine Dioxide Gas Decontamination. Applied Biosafety 2008;13:143-157.
4. Kahnert A, Seiler P, Stein M, et al. Decontamination with vaporized hydrogen peroxide is effective against Mycobacterium tuberculosis. Letters in Applied Microbiology 2005;40:448-452.
5. Cheney JE, Collins CH. Formaldehyde disinfection in laboratories: limitations and hazards. British Journal of Biochemical Science 1995;52:195-201.
6. Bensted HJ, Beveridge WIB, Downie AW, et al. eds. Disinfection of Fabrics with Gaseous Formaldehyde, compiled by The Committee On Formaldehyde Disinfection 1958.
7. Munro K, Lanser J, Flower R. A comparative method to validate formaldehyde decontamination of biological safety cabinets. Applied and Environmental Microbiology 1999;65:873-876.
8. Ackland NR, Hinton MR, Denmeade KR. Controlled formaldehyde fumigation system. Appliedand Environmental Microbiology 1980;39:480-487.
9. Krause J, McDonnell G, Riedesel H. Biodecontamination of animal rooms and heat-sensitive equipment with vaporized hydrogen peroxide. Contemporary topics 2001;40:18-21.
10. Chung S, Kern R, Koukol R, Barengoltz J, Cash H. Vapor hydrogen peroxide as alternative to dry heat microbial reduction. Advances in Space Research 2008;42:1150-1160.
11. Ray A, Perez F, Beltramini AM, et al. Use of vaporized hydrogen peroxide decontamination during an outbreak of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infection at a long-term acute care hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2010; 31: 1236-1241.
12. Bar W, Marquez de Bar G, Naumann A, Rusch-Gerdes S. Contamination of bronchoscopes with Mycobacterium tuberculosis and successful sterilization by low-temperature hydrogen peroxide plasma sterilization. Am J Infect Control 2001; 29: 306-311.
13. Sattar SA, Taylor YE, Paquette M, Rubino J. In-hospital evaluation of 7.5% hydrogen peroxide as a disinfectant for flexible endoscopes. Can J Infect Control 1996;11:51-54.
14. Dussurget O, Stewart G, Neyrolles O, et al. Role of Mycobacterium tuberculosis copper-zinc superoxide dismutase. Infect Immun 2001;69:529-533.
15. Heckert RA, Best M, Jordan LT, et al. Efficacy of vaporized hydrogen peroxide against exotic animal viruses. Applied and Environmental Microbiology 1997; 63: 3916-3918.
16. Rogers JV, Richter WR, Shaw MQ, Choi YW. Vapour-phase hydrogen peroxide inactivates Yersinia pestis dried on polymers, steel and glass surfaces. Lett Appl Microbiol 2008;47:279-285.
17. Klapes NA, Vesley D. Vapour-phase hydrogen peroxide as a surface decontaminant and sterilant. Applied and Environmental Microbiology 1990;56:503-506.
18. Kokubo M, Inoue T, Akers J. Resistance of common environmental spores of the genus Bacillus to vapor hydrogen peroxide. PDA J Pharm Sci Technol 1998;52:228-231.
19. Fichet G, Antloga K, Comoy E, Deslys JP, McDonnell G. Prion inactivation using a new gaseous hydrogen peroxide sterilisation process. J Hosp Infect 2007;67:278-286.
20. Hall L, Otter JA, Chewins J, Wengenack NL. Use of hydrogen peroxide vapor for deactivation of Mycobacterium tuberculosis in a biological safety cabinet and a room. J Clin Microbiol 2007;45:810-815.
21. Piskin N, Celebi G, Kulah C, Mengeloglu Z, Yumusak M. Activity of a dry mist-generated hydrogen peroxide disinfection system against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Acinetobacter baumannii. Am J Infect Control 2011.
22. Barbut F, Menuet D, Verachten M, Girou E. Comparison of the efficacy of a hydrogen peroxide dry-mist disinfection system and sodium hypochlorite solution for eradication of Clostridium difficile spores. Infect Control Hosp Epidemiol 2009;30:507-514.
23. Shapey S, Machin K, Levi K, Boswell TC. Activity of a dry mist hydrogen peroxide system against environmental Clostridium difficile contamination in elderly care wards. J Hosp Infect 2008;70:136-141.
24. Bartels MD, Kristoffersen K, Slotsbjerg T, et al. Environmental meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) disinfection using dry-mist-generated hydrogen peroxide. J Hosp Infect 2008;70:35-41.
25. Grare M, Dailloux M, Simon L, Dimajo P, Laurain C. Efficacy of dry mist of hydrogen peroxide (DMHP) against Mycobacterium tuberculosis and use of DMHP for routine decontamination of biosafety level 3 laboratories. J Clin Microbiol 2008;46:2955-2958.
26. Andersen BM, Syversen G, Thoresen H, et al. Failure of dry mist of hydrogen peroxide 5% tokill Mycobacterium tuberculosis. J Hosp Infect 2010;76:80-83.

10 Інформація для лікарів: лабораторна діагностика туберкульозу

Автори: Dick van Soolingen, Vincent Jarlier, Francis Drobniewski

Рецензенти: Francis Drobniewski, за допомогою Dick van Soolingen та Vincent Jarlier (2015)

Рецензент: Daniela Maria Cirillo (2022)

10.1 Вступ

ТБ лабораторія надає важливу інформацію для діагностики та лікування людей, уражених туберкульозом.

Мікробіологічні дані, засновані на культуральних або геномних дослідженнях, надають докази для підтвердження клінічних, радіологічних, епідеміологічних і патологічних підозр.

Відповідно до рекомендацій ВООЗ щодо діагностики туберкульозу, у всіх випадках легеневої форми туберкульозу слід пройти бактеріологічне підтвердження за допомогою рекомендованої ВООЗ швидкої діагностики (WRD) [1]. Ті самі діагностичні тести можна використовувати для забезпечення бактеріологічного підтвердження у випадках позалегеневої форми туберкульозу, якщо можливо відібрати відповідний зразок.

Тому оптимальне спілкування та порозуміння між різними клінічними та лабораторними спеціалістами є надзвичайно важливими. Комунікація повинна містити специфікацію відповідності різних тестів у діагностичних алгоритмах, їх негативні та позитивні прогностичні значення та те, як перевести результати в ефективне клінічне лікування.

Весь процес збору клінічних зразків для мікробіологічної діагностики є важливим, і кожен етап може вплинути на результат. Тому життєво важливо, забезпечити оптимальний збір і транспортування діагностичного матеріалу. Клінічний матеріал для лабораторного аналізу завжди повинен супроводжуватися достатньою та вірною інформацією про пацієнта. У разі ймовірної легеневої форми туберкульозу пацієнту слід надати відповідні ємності для мокротиння та докладні інструкції щодо отримання найбільш придатного мокротиння для діагностики туберкульозу. Лише відповідні підходи до отримання та транспортування клінічних зразків призведуть до успішного підтвердження захворювання, що також є важливим для нагляду та епідеміологічних цілей. Такий самий суворий процес збору та транспортування застосовується до зразків позалегеневої форми туберкульозу, які часто збираються інвазивними та неповторними методами. Матеріал слід зберігати при чітко визначених температурних умовах і транспортувати до лабораторії протягом визначеного часу.

За останні 10 років стандартом діагностики туберкульозу стали кілька комерційних молекулярних методів виявлення *M. tuberculosis* та ідентифікації лікарсько-стійких варіантів [1, 2]. Тести можна застосувати до великої кількості діагностичних зразків і отримати результати за кілька годин. Завдяки впровадженню технології секвенування нового покоління (СНП) у поєднанні з цільовою ампліфікацією можна ідентифікувати маркери резистентності до великої кількості антимікробних препаратів, які використовуються в терапевтичних схемах, безпосередньо з клінічних зразків. Доступно небагато комерційних тестів (див. Розділ 6), і їх застосування залежить від бактеріального навантаження, присутнього в клінічному зразку. Інформація про лікарську стійкість до основних протитуберкульозних препаратів стає доступною через кілька днів після збору зразків. Основні обмеження цих тестів пов'язані з бацилярним навантаженням у зразку, недостатньою здатністю відрізнити живі бацили від мертвих та включенням субоптимальних цілей у тести.

Повногеномне секвенування (ПГС) штамів *M. tuberculosis*, вирощених у культурі, стало стандартом епідеміологічних досліджень (див. Розділ 8). Час виконання робіт довший у порівнянні з цільовими підходами, оскільки це пов'язано з наявністю позитивної культури. Аналіз даних не повністю автоматизований, але зараз багато мікробіологічних лабораторій розглядають можливість залучити в штат спеціаліста з біоінформатики. Аналіз даних секвенування має виконуватися стандартизованими конвеєрами, а клінічній групі слід надавати зручний звіт для оптимізації лікування ТБ (рис. 14). Звіт має включати чіткі пояснення щодо детермінантів лікарської стійкості до різних препаратів і способів усунення випадків розбіжностей у фенотипічному тестуванні на медикаментозну чутливість (ТМЧ).

M. tuberculosis є збудником, з яким слід працювати на РББ-3, і в кожній країні діють спеціальні правила щодо безпечного транспортування цих бактерій до лабораторій. Повідомлення про те, коли і як культуру слід надсилати периферійній лабораторії, може допомогти зменшити проблеми з транспортуванням цього збудника. Позитивний посів на *M. tuberculosis* зазвичай, але не завжди, може бути надійним підтвердженням діагнозу туберкульозу. Коли лабораторія повідомляє про позитивний результат посіву на туберкульоз із зразка, відібраного в особи з дуже низькою підозрою на туберкульоз, дуже важливо зв'язатися з лабораторією, щоб виключити технічні помилки або лабораторне перехресне зараження. Повідомлялося про перехресне зараження (тобто хибно позитивні результати) до 3–5% позитивних культур. Якщо є підозра на неправильний діагноз, зв'язок між лабораторією та лікарем є обов'язковим, щоб уникнути непотрібного лікування. Часто передбачуваний діагноз туберкульозу може бути повторно розглянутий лікарем у випадку хибно позитивного посіву. Помітка та обговорення перехресного зараження та інших проблем у діагностиці туберкульозу допомагає покращити якість цієї процедури.

У цьому розділі цілеспрямовано обговорюється, як інформація, отримана в лабораторії, має передаватися клініцистам і як максимізувати внесок лабораторії в процес діагностики.

Уся інформація, що міститься в цьому розділі, ґрунтується на існуючих наразі тестах. Сфера діагностики туберкульозу стрімко розвивається після багатьох років стагнації. Ми очікуємо, що через кілька років з'являться різні зразки та інструменти для діагностики легеневої форми туберкульозу.

10.2 Загальні міркування щодо діагностики ТБ

Загальні міркування базуються на рекомендаціях і настановах ВООЗ [1, 2] і публікаціях, перелічених у кінці поточної глави.

Діагностику туберкульозу та лікарсько-стійкого туберкульозу (ЛС-ТБ) слід проводити лише в акредитованих лабораторіях із відповідним робочим навантаженням, щоб підтримувати рівень кваліфікації для всіх пропонованих тестів. ВООЗ рекомендує проводити молекулярний тест (рекомендована ВООЗ швидка діагностика) на зразках з дихальних шляхів як перший тест для діагностики легеневої форми туберкульозу дорослих, здатних виділяти мокротиння [2]. На тому самому зразку слід проводити посів рідини за допомогою автоматизованих машин. Перед початком лікування слід зібрати клінічний матеріал (наприклад, мокротиння) для культуральної діагностики туберкульозу та первинного тестування на медикаментозну чутливість.

Для дітей і людей, які не можуть виділяти мокротиння, можна спробувати шлунковий аспірат або молекулярне виявлення в калі [3, 4].

Для позалегеневої форми туберкульозу слід спробувати провести високочутливі молекулярні тести [1]. Рідка культура на MGIT залишається найбільш чутливою методикою.

Мікробіолог повинен повідомити свого клінічного партнера, що діагностична точність тесту може відрізнятися залежно від зразка, тому для позалегеневої форми туберкульозу важливо, за наявності початкового негативного молекулярного тесту, покладатися на клінічне судження для початку лікування, поки очікуються результати культури. Рідкі культури вважаються негативними, якщо через 6 тижнів не спостерігається ріст. Туберкульозний менінгіт потребує особливої уваги через низький об'єм спинномозкової рідини (ліквору), який часто подається в лабораторію, тому слід віддати перевагу швидким молекулярним тестам, таким як Xpert Ultra, у поєднанні з рідким посівом, тоді як мікроскопія зазвичай дає негативний результат навіть при використанні цитоспіну.

Посів крові на мікобактерії проводиться не у всіх лабораторіях. Важливо повідомити клінічного партнера, що результат може залежати від належного збору та транспортування зразка. Спеціальні флакони для посіву крові або ізоляційні трубки слід надати заздалегідь. Для лабораторної діагностики необхідні багаторазові посіви крові.

За можливості слід запропонувати швидкий молекулярний тест для визначення резистентності до рифампіцину та ізоніазиду. Якщо з причин, пов'язаних з витратами, неможливо протестувати всі ймовірні випадки туберкульозу, слід віддати перевагу таким групам: рецидиви, повторне лікування, контакти з хворими на МР-ТБ або випадки резистентності до ізоніазиду, а також випадки з країн із високим рівнем поширеності ЛС-ТБ. Якщо виявлено мутації, що викликають резистентність до рифампіцину та/або ізоніазиду, перед початком терапії слід провести молекулярний тест для оцінки резистентності принаймні до фторхінолонів. У позитивних зразках мазка цільове СНП у випадках резистентності до рифампіцину може забезпечити швидкий і більш повний профіль стійкості до ліків. Випадки резистентності до ізоніазиду також повинні бути перевірені на резистентність до фторхінолонів перед початком лікування, рекомендованого ВООЗ, що містить левофлоксацин. Скрізь, де застосовується короткий 4-місячний режим лікування чутливого до лікарських засобів ТБ [5, 6], лабораторія повинна надати інформацію про молекулярну чутливість до рифампіцину (рифампіцин залишається еталонним для рифапентину), фторхінолонів та ізоніазиду.

Якщо є культура, можна провести фенотипічні тести. Якщо штам є стійким до рифампіцину або ізоніазиду, то фенотипічний тест на фторхінолони слід провести разом із препаратами першого ряду. За можливості, у випадках резистентності до рифампіцину слід перевіряти препарати другого ряду та надавати пріоритет препаратам, які використовуються для лікування.

Нижче наведено додаткові поради, які допоможуть збільшити ефективність діагностики:

- Молекулярні тести можна використовувати для діагностики туберкульозу та резистентності до ліків також після кількох днів лікування, але вони не підходять для подальшого лікування (за винятком випадків, коли є підозра на розвиток резистентності, і в цьому випадку молекулярний тест може визначити появу детермінантів резистентності до ліків, не визначених на початковому етапі).
- Після збору мокротиння у відповідний контейнер слід безпосередньо перевірити якість мокротиння з точки зору якості та кількості. Значну частину мокротиння має складати справжнє мокротиння, а не слина.
- Клінічний матеріал слід збирати в асептичних умовах у стерильні контейнери потрібного розміру та форми, щоб уникнути зараження нетуберкульозними мікобактеріями та іншими мікроорганізмами. Слід зазначити, що водопровідна вода містить кілька мікобактерій різних видів, тому її не можна використовувати в цій процедурі.
- Увесь матеріал від пацієнта слід збирати, зберігати та транспортувати відповідно до національних інструкцій або стандартів і в достатній кількості. Досі існують прогалини в знаннях щодо виживання мікобактерій *ex vivo* в клінічному матеріалі. В одному дослідженні мокротиння, позитивного за Цілем-Нільсеном (ZN), яке зберігалося при 4°C, 60% мікобактерій у мокротинні виявилися життєздатними через чотири тижні, тоді як за кімнатної температури вижило лише 38% [7]. Тому рекомендується відправляти легеневий клінічний матеріал безпосередньо в лабораторію. Якщо це неможливо, його слід зберігати лише в холодильнику протягом мінімальної кількості днів. СМР слід негайно обробити.

- Короткий час транспортування, від моменту взяття зразка до часу прибуття в лабораторію, може сприяти діагностиці. Деякі позалегеневі рідини можуть навіть отримати користь від інокуляції біля ліжка в рідку культуру крові, щоб збільшити ймовірність позитивного діагнозу *M. tuberculosis*. Однак, якщо інокуляція проводиться біля ліжка, слід зібрати додатковий зразок для мікроскопії та бути дуже обережним, щоб уникнути зараження сапрофітною флорою.
- Кількість позитивних результатів збільшиться для деяких зразків, якщо буде надано більшу кількість матеріалу (у випадку зі СМР) або досліджено кілька зразків. Загалом, і особливо для рідин з ймовірно низькою концентрацією бактерій, таких як спинномозкова рідина, асцитична та плевральна рідина, слід зібрати якомога більший об'єм і відправити до лабораторії.
- Увесь клінічний матеріал для діагностики туберкульозу, що надсилається в лабораторію, повинен супроводжуватися лабораторною формою, яка містить всю необхідну інформацію. Слід використовувати спеціалізовані форми, в яких надається така інформація, як ім'я пацієнта, дата народження, стать, номер файлу пацієнта, ймовірність резистентності до протитуберкульозних препаратів (тобто попередня історія туберкульозу, попереднє або поточне протитуберкульозне лікування та країна народження), ВІЛ-статус, якщо це можливо, необхідні діагностичні тести, дата забору зразка, чи був зразок взятий до або під час лікування, а також детальна інформація про лікаря, який надає зразок, включаючи номер телефону.
- Відправник несе відповідальність за належне упакування клінічних зразків. У більшості країн упаковка надається лабораторіями і, як правило, складається з кількох шарів непроникного матеріалу. На упаковці повинно бути зазначено, що матеріал слід відкривати лише у лабораторії відповідного рівня. Культури *M. tuberculosis* є мікроорганізмами, робота з якими проводиться на РББ-3, тому застосовуються спеціальні правила. У принципі, правила біобезпеки директиви 2000/54/ЕС [8] можуть бути застосовані, але національні органи влади також випустили окремі правила для транспортування мікроорганізмів РББ-3 (див. Розділ 1). Рекомендується, щоб відправник повідомляв лабораторію, коли культура буде надіслана. Лабораторії, що приймають, повинні підтверджувати отримання, щоб можна було відстежити відсутні посилки.
- Якщо посів M. *tuberculosis* регулярно виконується в регіональних або периферійних лабораторіях, тоді як додаткові лабораторні процедури, такі як ідентифікація, тестування на медикаментозну чутливість і генотипування, виконуються у великих лабораторіях та/або в національних референс-лабораторіях (НРЛ), надзвичайно важливо, щоб позитивні культури невідкладно відправляються в централізований заклад.
- Якщо умови транспортування поставили під загрозу стерильність і життєздатність *M. tuberculosis*, молекулярну діагностику все ще можна застосувати. Якщо зразки відправляються лише для молекулярних тестів, можна розглянути можливість інактивації перед відправленням. У цьому випадку зразки можуть бути відправлені як «неінфекційні», що зменшує витрати на доставку.
- Культурні ізоляти також можна або інактивувати, або ДНК можна виділити перед відправленням, щоб зменшити вартість транспортування. У цьому випадку приймаюча лабораторія повинна надати бажаний протокол для інактивації або екстракції ДНК.

10.3 Спеціальні міркування щодо діагностики туберкульозу

10.3.1 Легеневий матеріал

Мокротиння (відхаркуване)

Якщо є підозра на легеневу форму туберкульозу, >3 мл ранкового мокротиння слід зібрати у відповідну ємність для мокротиння з широким отвором і надійною кришкою. Це слід робити принаймні два дні поспіль. Як альтернатива, другий зразок може бути зібраний на місці, якщо це можливо. Мокротиння повинно бути свіжо відхаркуваним з легенів (а не слина), і пацієнта слід проінструктувати, як отримати цей матеріал. Об'єднувати мокротиння, зібране протягом 24 годин не слід, оскільки тривалий час збору збільшує ймовірність зараження нетуберкульозними мікобактеріями та іншими бактеріальними мікроорганізмами.

Мокротиння (індуковане)

Якщо пацієнт не в змозі виділяти мокротиння, його можна викликати, вводячи аерозоль гіпертонічного сольового розчину (5-10% NaCl), створеного за допомогою небулайзера. Такі зразки можуть виглядати рідкими та водянистими, і їх слід позначати як «індуковане мокротиння», щоб вони не були утилізовані лабораторією як невідповідні зразки. Цю процедуру повинен проводити досвідчений персонал з використанням відповідного захисту органів дихання в ізоляторі або в зоні з відповідним контролем навколишнього середовища.

Бронхіальний лаваж

Бронхіальний лаваж (БЛ) передбачає закапування стерильного фізіологічного розчину в субсегмент легені через бронхоскоп для промивання дихальних шляхів з подальшим відсмоктуванням і збором зразка рідини. Попри те, що бронхоскопія є звичайною процедурою, слід підкреслити, що проведення бронхоскопії у пацієнта з підозрою на туберкульоз може становити ризик для особи, яка виконує процедуру, і вимагає ретельної дезінфекції бронхоскопа (тобто процедура повинна виконуватися з дотриманням відповідних стандартів безпеки). БЛ слід центрифугувати, а осад знезаразити в лабораторії перед посівом.

Шлунковий лаваж

Дослідження шлункової рідини рекомендується при діагностиці легеневої форми туберкульозу, коли дослідження мокротиння або БЛ неможливо, наприклад, у маленьких дітей. Шлункову рідину натще слід зібрати після введення 20-30 мл фізіологічного розчину в 5-10 мл карбонату натрію (Na2CO3). Матеріал необхідно транспортувати в лабораторію протягом чотирьох годин або знешкодити відразу на місці збору. Дослідження шлункової рідини також може бути корисним у випадку пацієнтів з ослабленим імунітетом, які не можуть виділити мокротиння.

Назофарингеальний аспірат

Назофарингеальна аспірація (НФА) є ще одним поширеним методом отримання клінічних зразків у дітей. Попри те, що НФА є менш інвазивним методом, ніж шлунковий лаваж, НФА все одно вважається процедурою, що генерує аерозоль[6], і тому досвідчений персонал повинен дотримуватися методів біобезпеки та профілактики інфекцій і контролю. Процедура виконується шляхом розміщення гнучкого пластикового катетера, підключеного до аспіраційної помпи, через ніздрю в задню частину носоглотки та обережного відсмоктування. Зразок збирають у контейнер для мокротиння, і необхідно зібрати не менше 2–5 мл виділень.

Кал

Діти, хворі на туберкульоз, ковтають мокротиння, що містить бацили туберкульозу, що походять із легенів, які потім проходять через травний тракт, де їх можна виявити у зразках калу. Тому кал розглядається як респіраторний зразок для діагностики туберкульозу.

Зразок калу є нещодавно рекомендованим ВООЗ для діагностики легеневої форми туберкульозу у дітей за допомогою Xpert MTB/RIF або Ultra [4]. Його можна використовувати як альтернативний зразок, особливо в ситуаціях, коли складно отримати адекватні респіраторні зразки для діагностики легеневої форми туберкульозу, наприклад у дітей молодшого віку. Дослідження калу може бути більш прийнятним і здійсненним у певних умовах, оскільки воно є менш інвазивним, ніж шлункова або назофарингеальна аспірація.

Тестування зразка калу за допомогою Xpert MTB/RIF або Ultra вимагає етапу попередньої обробки. Ресурси про методи обробки є широко доступними [9].

10.3.2 Позалегеневий матеріал

Захворювання на туберкульоз може виникнути майже в будь-якому анатомічному місці; таким чином, різні клінічні зразки, крім мокротиння (наприклад, сеча, спинномозкова рідина, плевральна рідина, гній або зразки біопсії), можуть бути подані на дослідження при підозрі на позалегеневу форму туберкульозу. Перед тим, як фахівець виконає інвазивну процедуру для отримання зразка, мають бути встановлені або забезпечені процедури швидкого та рекомендованого поводження зі зразком. Особливо важливе швидке транспортування в лабораторію відповідно до інструкцій лабораторії. Важливо зазначити, що частина зразка, поміщена у формалін для гістологічного дослідження, не може бути використана для культури.

10.3.3 Плевральний матеріал

Якщо отримано плевральну рідину, ймовірність позитивного посіву можна підвищити шляхом збільшення об'єму, який потім можна сконцентрувати. Необхідно взяти і надіслати якомога більший обсяг. Проте останні дослідження показали, що транспортне середовище, місце інокуляції та тип інокуляційного середовища впливають на вихід мікобактерій. Інокуляція біля ліжка в поєднанні з рідким середовищем видів *Mycobacterium* виявилося найкращим вибором, але з високим ризиком зараження. Крім того, слід використовувати контейнери з гепарином, щоб уникнути згортання та захоплення мікобактерій [10]. Аспірація плевральної рідини та плевральна біопсія можуть підвищити ефективність діагностики. Біопсія плеври є рекомендованим матеріалом для виявлення туберкульозу плеври.

10.3.4 Лімфаденітний матеріал

Для діагностики туберкульозного лімфаденіту біопсія лімфатичних вузлів (в ідеалі) і тонкоголкова пункція є методами першого вибору діагностики як у країнах із низькою захворюваністю, так і в ендемічних країнах [11, 12]. У разі негативного результату тонкоголкової пункції слід розглянути можливість проведення ексцизійної біопсії, яка часто призводить до більшої ймовірності позитивного результату мікроскопії на мікобактерії. Для виявлення туберкульозу рекомендується використання молекулярної рекомендованої ВООЗ швидкої діагностики. Тонкоголковий аспірат слід брати за допомогою голки 19 або 21 калібру; зразок необхідно транспортувати безпосередньо до мікробіологічної/патологічної лабораторії, щоб запобігти випаровуванню. Важливо заздалегідь повідомити як патологоанатома, так і мікробіолога, що з делікатним клінічним матеріалом потрібно починати працювати негайно.

[6] Jackson T, Deibert D, Wyatt G, et al. Classification of aerosol-generating procedures: a rapid systematic review. BMJ Open Resp Res 2020;7:e000730. doi:10.1136/ bmjresp-2020-000730

За жодних обставин не можна поміщати матеріал для мікробіологічного дослідження у формалін (використовується для гістопатологічного зразка), оскільки він вб'є будь-які бактерії туберкульозу, присутні в зразку.

10.3.5 Перитонеальна рідина

При підозрі на туберкульозний перитоніт можна зібрати принаймні 5–10 мл асцитичної рідини та відправити її в лабораторію або інокулювати біля ліжка в рідке культуральне середовище для мікобактерій. Однак в огляді понад тисячі пацієнтів перитонеальна біопсія виявилася більш чутливим методом [13, 14]. Загалом ідеальним є надсилання максимально можливого об'єму для центрифугування в лабораторію.

10.3.6 Сеча

Рано вранці слід зібрати зразок і відправити весь зразок до лабораторії. Зразок слід зберігати в холодильнику до транспортування. Для отримання позитивного зразка може знадобитися кілька зразків протягом кількох днів. Через забруднення та псування зразки 24-годинної сечі неприйнятні. Мікроскопічне дослідження осаду сечі не рекомендується через високий ризик хибно позитивного результату через наявність сапрофітних мікобактерій сечостатевого тракту.

10.3.7 Кров

Посів крові на мікобактерії слід проводити за допомогою спеціальних флаконів для посіву крові, наданих лабораторією. Якщо лабораторія не має автоматизованого інкубатора, зразки слід збирати в пробірки-ізолятори. Пробірки слід зберігати при кімнатній температурі і транспортувати в лабораторію в день збору. Щоб підвищити результативність діагностики, слід спробувати використовувати кілька культур.

10.4 Потік інформації від мікробіолога до лікаря та інструкції щодо діагностики туберкульозу

Лікарі повинні надати основну інформацію про пацієнта та зразки лабораторії, якій потрібна ця інформація, щоб керувати своєю роботою, інтерпретувати результати та брати участь у дослідженнях на туберкульоз на місцевому, регіональному, національному та міжнародному рівнях. Коли результати лабораторних досліджень повідомляються лікареві, завжди слід надавати базову інформацію, щоб уникнути помилок і плутанини, включаючи дату отримання зразка в лабораторії, дату аналізу, ідентифікатори пацієнтів, результати та вказівки щодо того, як перевести результати в клінічне лікування. Лікарі повинні шукати однозначного уточнення результатів, якщо це необхідно. У разі мікроскопічного дослідження слід надати вказівку напівкількісного результату за шкалою ВООЗ. Якщо периферійна або регіональна лабораторія вже проводила діагностичні тести, буде дуже корисно, якщо ці результати разом із культурою буде надіслано до централізованої лабораторії, щоб уникнути дублювання або забезпечити підтвердження.

Для культур корисними є кількісні результати в термінах часу до позитивного результату (у днях) для рідкого середовища (зокрема, якщо зразки були надіслані, щоб вказати прогрес лікування), і, можливо, кількість колоній на твердому середовищі можна визначити за допомогою інтерпретації ймовірного клінічного значення цього. Низька кількість колоній на первинній культурі, незвичайний час для позитивних культур (наприклад, вищий, ніж зазвичай, рівень позитивності, пов'язаний із інокуляцією в той самий день або приблизно в той же день, або дуже короткий час до позитивного результату в позалегеневому зразку з негативним результатом мазка) може викликати серйозне занепокоєння щодо перехресного забруднення, і лабораторія повинна знати про це. У разі підозри позитивні культури, виявлені протягом послідовних днів, можна піддати молекулярному типуванню за допомогою ПГС (див. Розділ 8), і якщо отримано той самий профіль секвенування, перехресне зараження є дуже ймовірним.

Крім того, результати тестів ампліфікації нуклеїнових кислот (ТАНК) повинні бути надані лікарю з використанням відповідних формулювань і контексту, а напівкількісні результати повинні повідомлятися завжди. Загалом достовірність результатів залежить від використання контролів інгібування/ампліфікації, негативного та позитивного контролів, а також позитивного та негативного прогностичного значення. Наприклад, коли ТАНК є позитивним із низьким напівкількісним значенням, тоді як мікроскопія мазка є негативною, слід пояснити, що позитивна прогностична цінність цього результату сильно залежить від поширеності туберкульозу у відповідній категорії пацієнтів. Чутливість нових платформ значно підвищилася завдяки наступному поколінню молекулярних тестів, які наразі доступні на ринку (див. Розділ 6). Підвищення чутливості негативних зразків пауцібацилярного мазка відбувається за рахунок зниження специфічності. Зразки, які позначаються як «сліди» на Xpert Ultra, слід інтерпретувати на основі клінічної та епідеміологічної ситуації. Людям з високим ризиком серйозних наслідків туберкульозу через супутні захворювання, вік, імунологічний статус або відомі контакти з інфекційними хворими на туберкульоз слід починати лікування до отримання результатів посіву. Якщо інформація про молекулярну резистентність до ліків відсутня, лікування слід починати на основі епідеміологічної інформації.

Було досягнуто значного прогресу в розробці швидких діагностичних тестів як на туберкульоз, так і на лікарську стійкість (див. Розділ 6). Ці тести зменшують затримки в діагностиці та початку лікування туберкульозу [15], а також можуть бути використані для спрямування терапії та вибору протитуберкульозних препаратів. ВООЗ та інші міжнародні консорціуми надають інформацію про те, як інтерпретувати різні мутації в генах, пов'язаних із стійкістю до ліків [16]. Здатність інтерпретувати геномні варіанти з високою впевненістю є високою для таких препаратів, як рифампіцин, ізоніазид, піразинамід, фторхінолони, ін'єкційні препарати та лінезолід. Однак завжди можна зіткнутися з розбіжностями між результатами фенотипічних і генотипічних тестів, і цілком зрозуміло, якщо це породжує плутанину. Роль клінічного мікробіолога полягає в тому, щоб скерувати правильну інтерпретацію результатів і чітко пояснити, чому виникають ці розбіжності.
Основними причинами генотипових/фенотипових розбіжностей є: i) технічні труднощі та помилки в проведенні ТМЧ; ii) наявність невідомого механізму, що викликає стійкість до ліків; iii) мутація забезпечує низький рівень резистентності, а критична концентрація встановлюється занадто високою; iv) мутація знаходиться за межами області, на яку спрямовано молекулярний аналіз; v) наявність гетерорезистентності, не виявленої молекулярними методами; vi) молекулярний аналіз виявляє мовчазні мутації; та vii) помилки через взаємодію/зв'язування зонда в LPA або інших молекулярних аналізах.

Секвенування наступного покоління тепер стає діагностичним інструментом на рівні НРЛ ЄС. Його можна виконувати як ПГС на позитивній культурі або як цільове СНП з діагностичних зразків (що містять щонайменше 5 000–10 000 геномів на мл зразка) [17]. Різниця між двома стратегіями на основі СНП показана в таблиці 19.

Таблиця 19. Ключові відмінності між стратегіями ПГС і цільовим СНП

Повногеномне секвенування	Цільове секвенування нового покоління
На основі культури	Тестування на обрані цілі на прямих клінічних зразках
Виявлення загальних геномних змін (втрата ролі функції мутацій)	Високе охоплення зразком, підвищена чутливість для виявлення мутацій, змішаних інфекцій
Великий обсяг даних	Виявлення гетерорезистентності на низьких частотах
Складні збірка та аналіз	Велика кількість зразків за цикл, нижча вартість зразка порівняно зі стандартним секвенуванням за Сенгером
Дорого для більшого охоплення даних	
Відсутність стандартизованого комплекту	
Доступність ЗОЯ	

Обидва методи дозволяють оцінити велику кількість детермінант і є дуже цінними для підтримки лікування випадків мультирезистентного туберкульозу (МР-ТБ), пре-ШЛР-ТБ або ШЛР-ТБ.

Загалом, до наявність мутацій або великих делецій чи вставок у генах, залучених у шляхи активації ліків, слід ставитися з підозрою, особливо коли мутації розвиваються під час терапії, пов'язані з позитивним результатом мазка та культури або з відсутністю радіологічного покращення. У цьому випадку слід запросити проведення та негайно повідомити результати тестування мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) на мікророзведенні бульйону та фенотипічного ТМЧ із застосуванням рекомендованих критичних концентрацій препарату.

Нарешті, важливо встановити чітку комунікацію з клінічним партнером: клініцисти повинні розуміти переваги та обмеження всіх тестів, які пропонує лабораторія, і керуватися цим при інтерпретації результатів.

Рисунок 14. Зразок форми звітності для тестування на основі СНП (профіль стійкості до ліків і кластерний аналіз)

Institute Logo	**Laboratory Medicine Service** **Hospital** **Director:** Unit: Head of the laboratory:

Annex 1: Analysis of the mutations associated with drug resistance§ *(M. tuberculosis)*

Patient ID : 40254-18 Date of Birth:

Protocol: Annex to Report:

Lineage: 4.9 (H37Rv-like)

Coverage: 73.86 Cluster: Isolate **NOT** in cluster*

*The reference database includes all isolates which underwent Whole Genome Sequencing (WGS) at the Emerging Bacterial Pathogens Unit- IRCCS San Raffaele – Milan, Italy.

Pag. 1 / 2

Drug	Region	Gene	Mutation [aminoac.]	Interpretation	Additional Information**
Rifampicin	Rv0667	*rpoB*	**Ser450Leu**	**Resistant**	
Isoniazid	Rv1483	*inhA*	**c-15t**	**Resistant**	
	Rv1908c	*katG*	**Ser315Thr**		
Ethambutol	Rv3795	*embB*	Asn296His	**Resistant**	
	Rv3794	*embA*	**c-16g**		
Pyrazinamid	Rv2043c	*pncA*	**Asp8Glu**	**Resistant**	
Fluoroquinolones (MXF; LFX; OFX)	Rv0006	*gyrA*	Glu21Gln Ser95Thr Gly247Ser Gly668Asp	Indeterminate	Lineage associated mutations
	Rv0005	*gyrB*	**Arg446His**		Mutation observed in both susceptible and resistant strains: not sufficient evidence that this mutation is associated with resistance; phenotypic testing is recommended to confirm.
Amikacin	Rvnr01	*rrs*	/	Susceptible	
	Rv2416c	*eis*	/		
Kanamycin	Rvnr01	*rrs*	/	Susceptible	
	Rv2416c	*eis*	/		
Capreomycin	Rvnr01	*rrs*	/	Susceptible	Silent mutation;
	Rv1694	*tlyA*	Leu11Leu		
Ethionamide	Rv3854	*ethA*	/	**Resistant**	
	Rv3855	*ethR*	/		
	Rv1483	*inhA*	**c-15t**		
Bedaquiline	Rv1305	*atpE*	/		
	Rv0678		/		
Delamanid	Rv3261	*fbiA*	/	Sensibile	

Mod. xxx xxx 001

Institute Logo	**Laboratory Medicine Service** **Hospital** **Director:** Unit: Head of the laboratory:

Annex 1: Analysis of the mutations associated with drug resistance§ *(M. tuberculosis)*

Patient ID : 40254-18 Date of Birth:

Protocol: Annex to Report:

Lineage: 4.9 (H37Rv-like)

Coverage: 73.86 Cluster: Isolate **NOT** in cluster*

*The reference database includes all isolates which underwent Whole Genome Sequencing (WGS) at the Emerging Bacterial Pathogens Unit- IRCCS San Raffaele – Milan, Italy.

Pag. 2 / 2

	Rv3262	*fbiB*	/	Silent mutation;
	Rv1173	*fbiC*	/	
	Rv0407	*fgd1*	Phe320Phe	
	Rv3547	*ddn*	/	
Linezolid	Rv0701	*rplC*	/	Susceptible
	Rvnr02	*rrl*	/	
Clofazimine	Rv0678		/	Susceptible
	Rv1979c		/	

"/" Mutations not detected; wild-type

§ WGS Analysis Pipeline : MTBseq. Kohl TA, Utpatel C, Schleusener V, De Filippo MR, Beckert P, Cirillo DM, Niemann S. 2018. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis complex* isolates. PeerJ 6:e5895 DOI 10.7717/peerj.5895

** Any variation of the standard parameters applied in the MTBSeq pipeline analysis are reported in this section.

* The absence of mutations in a specific genomic region (Rv) does not exclude the possibility of resistance for the specific drug.

Date

Head of the laboratory: *Signature*

Mod. xxx xxx 001

Institute Logo	**Laboratory Medicine Service** **Hospital** **Director:** Unit: Head of the laboratory:

Annex 2: Relatedness Analysis (Molecular Epidemiology)

Patient ID: 40254-18 / 50283-18 / 40978-18 Date of birth:

Protocol: Annex to Report: NA

Lineage: 4.9 (H37Rv-like) (Lineage H37Rv-like)

Coverage: 73.86 / 90.12 / 63.55 Cluster: Isolates **NOT** in cluster*

*The reference database includes all isolates which underwent Whole Genome Sequencing (WGS) at the Emerging Bacterial Pathogens Unit- IRCCS San Raffaele – Milan, Italy. Pg 1 / 1

The genomic analysis (WGS) has been performed using the Illumina MiniSeq platform.

The epidemiologic analysis, performed by "R-studio package POPPR*" for the phylogenetic tree construction and the **MTBseq**** pipeline for the Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) analysis, has shown that the isolates **40241-18 / 40243-18 / 40059** are not part of a recent transmission chain having between them a SNPs distance> 6 as reported in the distant matrix below.

	40254-18	50283-18	40978-18
40254-18	**0**		
50283-18	**29**	**0**	
40978-18	**26**	**9**	**0**

*Genetic Analysis of Populations with Mixed Reproduction Ver 2.8.1

**Kohl TA, Utpatel C, Schleusener V, De Filippo MR, Beckert P, Cirillo DM, Niemann S. 2018. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. PeerJ 6:e5895 DOI 10.7717/peerj.5895

Date

Head of the laboratory: *Signature*

Оригінал	Переклад
Institute logo	Логотип закладу
Laboratory Medicine Service Hospital Director Unit Head of the laboratory	Служба лабораторної медицини Лікарня Директор Підрозділ Завідувач лабораторії
Annex 1: Analysis of the mutations associated with drug resistance (*M.tuberculosis*)	Додаток 1: Аналіз мутацій, пов'язаних зі стійкістю до ліків (*M.tuberculosis)*
Patient ID	Ідентифікатор пацієнта
Protocol	Протокол
Lineage	Лінія
Coverage	Охоплення
Date of birth	Дана народження
Annex to report	Додаток до звіту
Cluster: Isolate NOT in cluster	Кластер: ізолят НЕ належить до кластера
The reference database includes all isolates which underwent WGS at the Emerging Bacterial Pathogens unit – San Raffaele – Milan, Italy	Довідкова база даних включає всі ізоляти, які пройшли ПГС у підрозділі нових бактеріальних патогенів – лабораторія Сан-Рафаеле – Мілан, Італія
Drug	Препарат
Region	Ділянка
Gene	Ген
Mutation (aminoacid)	Мутація (амінокислота)
Interpretation	Інтерпретація
Additional information	Додаткова інформація
Resistant	Резистентний
Intermediate	Проміжний
Susceptible	Сприйнятливий
Sensible	Чутливий
Silent mutation	Тиха мутація
Lineage associated mutations	Мутації, пов'язані з лінією
Mutation observes in both susceptible and resistant strains: not sufficient evidence that this mutation is associated with resistance; phenotypic testing is recommended to confirm.	Мутація спостерігається як у сприйнятливих, так і в стійких штамах: недостатньо доказів того, що ця мутація пов'язана з резистентністю; рекомендується фенотипічне тестування для підтвердження
Оригінал	Переклад
Institute logo	Логотип закладу
Laboratory Medicine Service Hospital Director Unit Head of the laboratory	Служба лабораторної медицини Лікарня Директор Підрозділ Завідувач лабораторії
Annex 1: Analysis of the mutations associated with drug resistance (*M.tuberculosis*)	Додаток 1: Аналіз мутацій, пов'язаних зі стійкістю до ліків (*M.tuberculosis)*
Patient ID	Ідентифікатор пацієнта
Protocol	Протокол
Lineage	Лінія
Coverage	Охоплення
Date of birth	Дана народження
Annex to report	Додаток до звіту
Cluster: Isolate NOT in cluster	Кластер: ізолят НЕ належить до кластера
The reference database includes all isolates which underwent WGS at the Emerging Bacterial Pathogens unit – San Raffaele – Milan, Italy	Довідкова база даних включає всі ізоляти, які пройшли ПГС у підрозділі нових бактеріальних патогенів – лабораторія Сан-Рафаеле – Мілан, Італія
Susceptible	Сприйнятливий
Silent mutation	Тиха мутація
Mutations not detected: wild-type	Мутацій не виявлено: дикий тип
Any variation of the standard parameters applied in the MTBseq pipeline analysis are reported in this section	У цьому розділі зазначаються будь-які варіації стандартних параметрів, що застосовуються в конвеєрному аналізі MTBseq
The absence of mutations in a specific genomic region does not exclude the possibility of resistance for the specific drug.	Відсутність мутацій у певній ділянці генома не виключає можливості резистентності до конкретного препарату
WGS analysis pipeline: MTBseq: a comprehensive pipeline for WGS analysis of *M. tuberculosis* complex isolates.	Конвеєр проведення ПГС: MTBseq: комплексний конвеєр для аналізу ПГС ізолятів комплексу *M. tuberculosis*
Date	Дата
Head of laboratory: signature	Завідувач лабораторії: підпис
Оригінал	Переклад
Institute logo	Логотип закладу
Laboratory Medicine Service Hospital Director Unit	Служба лабораторної медицини Лікарня Директор Підрозділ

Head of the laboratory	Завідувач лабораторії
Annex 2: Relatedness analysis (molecular epidemiology)	Додаток 2: Аналіз спорідненості (молекулярна епідеміологія)
Patient ID	Ідентифікатор пацієнта
Protocol	Протокол
Lineage	Лінія
Coverage	Охоплення
Date of birth	Дана народження
Annex to report	Додаток до звіту
Cluster: Isolate NOT in cluster	Кластер: ізолят НЕ належить до кластера
The reference database includes all isolates which underwent WGS at the Emerging Bacterial Pathogens unit – San Raffaele – Milan, Italy	Довідкова база даних включає всі ізоляти, які пройшли ПГС у підрозділі нових бактеріальних патогенів – лабораторія Сан-Рафаеле – Мілан, Італія
The genomic analysis (WGS) has been performed using the Illumina MiniSeq Platform	Геномний аналіз (ПГС) проводився за допомогою платформи Illumina MiniSeq
The epidemiological analysis performed by "R-studio package POPPR" for the phylogenetic tree construction and the MTBseq pipeline for the Single Nucleotide Polymorphism (SNP) analysis, has shown that the isolates 40241-18/40243-18/40059 are not part of the recent transmission chain having between them an SNP distance > 6 as reported in the distant matrix below.	Епідеміологічний аналіз, проведений за допомогою пакету R-studio POPPR для побудови філогенетичного дерева та конвеєра MTBseq для аналізу однонуклеотидного поліморфізму (ОНП), показав, що ізоляти 40241-18/40243-18/40059 не є частиною нещодавнього ланцюга передачі, між якими відстань ОНП > 6, як зазначено в матриці нижче
Genetic Analysis of Populations with Mixed Reproduction version 2.8.1	Генетичний аналіз популяцій зі змішаним розмноженням, версія 2.8.1
MTBseq: a comprehensive pipeline for WGS analysis of *M. tuberculosis* complex isolates.	MTBseq: комплексний конвеєр для аналізу ПГС ізолятів комплексу *M. tuberculosis*
Date	Дата
Head of laboratory: signature	Завідувач лабораторії: підпис

Список літератури

1. World Health Organization (WHO). WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. ; 2021.
2. World Health Organization (WHO). WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detention, 2021 update. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. World Health Organization (WHO). WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 5: management of tuberculosis in children and adolescents. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
4. World Health Organization (WHO). WHO operational handbook on tuberculosis. Module 5: management of tuberculosis in children and adolescents. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
5. World Health Organization (WHO). Treatment of drug-susceptible tuberculosis: rapid communication. June 2021.
6. World Health Organization (WHO). WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-susceptible tuberculosis treatment. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
7. Banda HT, Harries AD, Boeree MJ, Nyirenda TE, Banerjee A, Salaniponi FM. Viability of stored sputum specimens for smear microscopy and culture. Int J Tuberc Lung Dis. 2000 Mar;4(3):272-4.
8. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Available at: https://eur- lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32000L0054
9. Global Laboratory InitiativeWorld Health Organization (WHO). Practical manual of processing stool samples for diagnosis of childhood TB. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: https://www.who.int/ publications/i/item/9789240042650
10. Cheng AF, Tai VH, Li MS, Chan CH, Wong CF, Yew WW, et al. Improved recovery of Mycobacterium tuberculosis from pleural aspirates: bedside inoculation, heparinized containers and liquid culture media. Scand J Infect Dis. 1999;31(5):485-7.
11. Bekedam HJ, Boeree M, Kamenya A, Liomba G, Ngwira B, Subramanyam VR, et al. Tuberculous lymphadenitis, a diagnostic problem in areas of high prevalence of HIV and tuberculosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1997;91(3):294-7.
12. Prasoon D. Acid-fast bacilli in fine needle aspiration smears from tuberculous lymph nodes. Where to look for them. Acta Cytol. 2000;44(3):297-300.
13. Chow KM, Chow VC, Szeto CC. Indication for peritoneal biopsy in tuberculous peritonitis. Am J Surg. 2003 Jun;185(6):567-73.
14. Wu DC, Averbukh LD, Wu GY. Diagnostic and Therapeutic Strategies for Peritoneal Tuberculosis: A Review. J Clin Transl Hepatol. 2019 Jun 28;7(2):140-48.
15. Lee JH, Garg T, Lee J, McGrath S, Rosman L, Schumacher SG, et al. Impact of molecular diagnostic tests on diagnostic and treatment delays in tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. BMC Infectious Diseases. 2022 2022/12/14;22(1):940.
16. World Health Organization (WHO). Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
17. Jouet A, Gaudin C, Badalato N, Allix-Béguec C, Duthoy S, Ferré A, et al. Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. Eur Respir J. 2021 03;57(3).

Додаток 3. Партнерська мережа

До цього списку, який був переглянутий Єн Голіцька у 2022 році, увійшли як колишні, так і теперішні дописувачі проєкту.

Name of participant	Institution/country
Alexander Indra	AGES – Austrian Agency for Health and Food Safety (Central office), Vienna, Austria
Vanessa Mathys Predecessor: Maryse Fauville-Dufaux	Sciensano, Brussels, Belgium
Elizabeta Bachiiska	National Reference Laboratory of TB, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia, Bulgaria
Ljiljiana Žmak; Mihaela Obrovac Predecessor: Vera Katalinić-Janković	Croatian National Mycobacterium Reference Laboratory, Croatian National Institute of Public Health (CNIPH), Zagreb, Croatia
Despo Pieridou	Microbiology Department (MPHS), Nicosia General Hospital, Nicosia, Cyprus
Věra Dvořáková Predecessors: Marta Havelková; Ilona Zemanova	National Reference Laboratory for Mycobacteria, National Institute of Public Health, Prague, Czechia
Troels Lillebæk; Erik Michael Rasmussen Predecessor: Vibeke Østergaard Thomsen	International Reference Laboratory of Mycobacteriology, Statens Serum Institut (SSI), Copenhagen, Denmark
Tiina Kummik; Kadri Klaos	University Hospital (TUH), Tartu, Estonia
Silja Mentula Hanna Soini Marjo Haanper Heikkinen Predecessor Merja Marjamäki	National Institute for Health and Welfare (THL), Finland
Jerome Robert Predecessor: Vincent Jarlier	NRC for Mycobacteria and Resistance to Anti-Tuberculous Mycobacteria, Bacteriology-Hygiene, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France
Emmanuelle Cambau	Service de Mycobactériologie spécialisée et de référence Tour Bichat /Rez de chaussée, Hôpital Bichat, DMU Biogem Laboratoire associé au CNR des Mycobactéries et Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR-MyRMA), France
Stefan Niemann Predecessors: Florian Maurer; Sabine Rüsch-Gerdes	National Reference Laboratory for Mycobacteria, Forschungszentrum Borstel, Borstel, Germany
Dimitrios Papaventsis	National Reference Laboratory for Mycobacteria (NRLM), Sotiria Chest Diseases Hospital, Athens, Greece
Ágnes Bakos; Lilla Katalin Lőrinczi Predecessors: Nóra Szabó; Anikó Guba	Korányi National Institute for Pulmonology, Budapest, Hungary
Hauksdottir Gudrun Svanborg Predecessors: Guðrún Sigmundsdóttir; Ingibjörg Hilmarsdóttir	Department of Microbiology, Landspítali University Hospital, Reykjavik, Iceland
Margaret Fitzgibbons Predecessor: Noel Gibbons	Irish Mycobacteria Reference Laboratory (IMRL), Microbiology Department, Central Pathology Laboratory, St. James's Hospital, Dublin, Ireland
Sarah Jackson Thomas Rogers	Health Protection Surveillance Centre, Ireland St James Hospital, Ireland

Name of participant	Institution/country
Federico Giannoni Predecessor: Lanfranco Fattorini	Istituto Superiore di Sanità (ISS), Rome, Italy
Daniela Maria Cirillo	San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy
Esther Walser-Domjan Predecessor: Sabine Erne	Liechtenstein
Laima Vasiliauskaite Birutė Nakčerienė Predecessor: Edita Pimkina	Vilnius University Hospital Santaros Klinikos, Vilnius, Lithuania
Monique Perrin Predecessor: Paul Reichert	Laboratoire National de Santé (LNS), Luxembourg
Anabel Darmanin Predecessors: Julie Haider; Karl Galea	Mater Dei Hospital, Malta
Dick van Soolingen	National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands
Anne Torun Mengshoel Vegard Eldholm Predecessor: Turid Mannsåker	National Reference Laboratory for Mycobacteria, Norwegian Institute of Public Health (NIPH), Division of Infectious Disease Control, Department of Bacteriology and Immunology, Oslo, Norway
Ewa Augustynowicz-Kopeć Predecessor: Zofia Zwolska	Microbiology Department in National Tuberculosis and Lung Diseases Research Institute. National Reference TB Laboratory, Warsaw, Poland
Isabel Carvalho Predecessors: Anabela Santos Silva; Anabela Medo Miranda	Direcção-Geral da Saúde, Portugal
Rita Macedo; Jorge Machado Predecessors: Maria João Simões; Susana David	Instituto Nacional de Saúde 'Dr. Ricardo Jorge', Departamento de Doenças Infecciosas, Laboratório Nacional de Referência das Infecções, Respiratórias para Micobactérias, Lisbon, Portugal
Roxana Coriu Predecessors: Daniela Homorodean; Ionela Mutean	Marius Nasta Institute of Pulmonology, Romania
Igor Porvaznik Predecessor: Juraj Trenkler, Monika Poľanová	National Institute for Tuberculosis, Lung Diseases and Thorax Surgery, National Register for Tuberculosis, Vyšné Hágy, Slovakia
Manca Žolnir-Dovc	National Reference Laboratory for Mycobacteria, University Clinic of Respiratory and Allergic Diseases, Golnik, Slovenia
Laura Herrera-Leon Predecessor: María Soledad Jiménez Pajares	Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
Sofia Samper	University of Zaragoza, Zaragoza, Spain
Ramona Groenheit Predecessor: Sven Hoffner	Public Health Agency of Sweden, Solna, Sweden
Marieke van der Werf Predecessor: Davide Manissero	ECDC, STI, Blood Borne Viruses and TB section, Stockholm, Sweden
Csaba Ködmön Predecessors: Alexandra Clarici; Amanda Ozin	ECDC, STI, Blood Borne Viruses and TB section, Stockholm, Sweden

Європейський центр профілактики та контролю захворювань (ЄЦПКЗ)

Адреса: Gustav III:s Boulevard
40 16973 Solna, Sweden
(Швеція)

Тел.: +46 858601000
ECDC.info@ecdc.europa.eu

www.ecdc.europa.eu

ЄЦКПЗ в соціальних мережах
Twitter: @ECDC_EU
Facebook: www.facebook.com/ECDC.EU
Linkedin: www.linkedin.com/company/ecdc/

Publications Office
of the European Union