

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені М. І. ПИРОГОВА**

АЛІЄВА НАТАЛЯ МИКОЛАЇВНА

УДК: 616.24–002.5-07:615.015.8:575.191.001.5.

**ВИЯВЛЕННЯ M. TUBERCULOSIS І ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ
МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ СТІЙКОСТІ В УМОВАХ ВИКОРИСТАННЯ НОВИХ
ФЕНО-ГЕНОТИПІЧНИХ МЕТОДІВ**

03.00.07 – мікробіологія

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук**

Вінниця – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Державній установі «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України».

Науковий керівник: доктор медичних наук, доцент
Журило Олександр Анатолійович,
ДУ «Національний інститут фтизіатрії і
пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»,
керівник лабораторії мікробіології туберкульозу і
неспецифічних захворювань легень.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Власенко Ірина Георгіївна, Вінницький
торговельно-економічний інститут Київського
національного торговельно-економічного
університету МОН України, завідувач кафедри
товарознавства, експертизи та торговельного
підприємництва;

кандидат медичних наук
Трет'яков Максим Сергійович, Вінницький
обласний клінічний шкірно-венерологічний
диспансер МОЗ України, головний лікар.

Захист дисертації відбудеться 11 жовтня 2017 р. о 10-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К. 05.600.05 Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова МОЗ України за адресою: 21018, Україна, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова МОЗ України за адресою: 21018, Україна, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.

Автореферат розісланий « _____ » _____ 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат медичних наук

О. А. Назарчук

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Туберкульоз викликають бактерії роду *Mycobacterium* родини *Mycobacteriaceae*, типовим видом якої є *Mycobacterium tuberculosis* (Блум Б.Р., Карачунский М.А., 2002; Фещенко Ю.І. та ін., 2016).

Наразі у всьому світі відбулося зростання частоти хіміорезистентності мікобактерій туберкульозу (МБТ) до основних протитуберкульозних препаратів (ПТП) (ізоніазид, рифампіцин), що призвело до значного зниження ефективності антимікобактеріальної терапії (Бастиан І., Порталс Ф., 2003; Александріна Т.А., 2014; Бегимбетова В.Н., 2014; Борисова Л.І., Зайков С.В., 2014). Сучасна бактеріологія вивчає питання біології резистентного збудника туберкульозу, розробляє швидкі тести отримання результатів резистентності збудника, вивчає спектр МС МБТ (Овчинникова Ю.Э. и др., 2013; Кричевская Н.А., 2014; Rusch-Gerdes; S., 2006; Huang T-S. et al., 2008).

Одним із чинників, що вимагає значної корекції стратегії боротьби з туберкульозом у світовому масштабі, є медикаментозна стійкість (МС) збудника. МС МБТ і поширення її загрозливими темпами в багатьох країнах світу, в тому числі в Україні, є результатом впливу біологічних, медичних, соціальних і економічних факторів. МС МБТ позбавляє охорону здоров'я ефективного засобу боротьби з туберкульозом – хіміотерапії, яка базується на використанні низки ПТП (Мельник В.М. та ін., 2013; Фещенко Ю.І. та ін., 2016; Jenkins H.E. et al., 2014).

Несприятлива епідемічна ситуація з туберкульозу в Україні потребує постійного удосконалення методів виявлення мікобактерій та діагностики захворювань на туберкульоз серед населення з метою зниження інфікованості, захворюваності та обмеження і зменшення резервуару туберкульозної інфекції (Скотникова О.И. и др., 2000; Фещенко Ю.І. та ін., 2016; Zetola N.M. et al., 2014). Етіологічне підтвердження діагнозу туберкульозу за допомогою досліджень гарантованої якості, сучасне облаштування бактеріологічних лабораторій ПТЗ України, епідагляд за МС є основою сучасної клінічної фтизіатрії (Фещенко Ю.І. та ін., 2013; Гранкіна Н.В., Марченко Н.Є. 2016; Rodwell T.C. et al., 2014).

В Україні одним із пріоритетних напрямків у системі протитуберкульозних заходів є підвищення рівня своєчасної ефективною діагностики хвороби. На бактеріологічні лабораторії покладається особлива функція у питаннях діагностики заразних випадків захворювання на туберкульоз та моніторингу ефективності процесу лікування. Важливим напрямком оптимізації роботи лабораторій протитуберкульозних закладів (ПТЗ) України є обов'язкова стандартизація основних бактеріологічних і молекулярно-генетичних методів дослідження. Впровадження їх в роботу дозволяють отримувати результати, які можуть бути порівняні з результатами досліджень інших лабораторій, що дає можливість своєчасно виявляти та реагувати на помилки діагностики, проводити оптимальне специфічне лікування хворих, оптимізувати та полегшити навчання фахівців, оцінювати якість роботи лабораторій, окремих фахівців та проводити уніфікований контроль ефективності лабораторних досліджень (Gonzalo X. et al., 2014).

Традиційні мікробіологічні методи виявлення збудника за своєю ефективністю вже давно не задовольняють клініцистів. Зараз впроваджують низку нових методів, які дозволяють отримати результати шляхом використання різних

технологій щодо виявлення ранніх ознак росту мікобактерій (Фещенко Ю.І. та ін., 2013; Бегимбетова В.Н., 2014; Попов С.А. та ін., 2016; Kruuner A. et al., 2006). З'явилося кілька систем на рідких середовищах (ВАСТЕС[®], ВАСТЕС MGIT) для дослідження МБТ (Барбова А.І. та ін., 2007; Червоная А.М. и др., 2014; Rusch-Gerdes S. et al., 2006). Нині пропонують автоматичні аналізатори бактеріологічних культур "МВ/Васт", "ВАСТЕС MGIT 960", в яких використовують рідкі живильні середовища (Барбова А.І. та ін., 2007; Kruuner A. et al., 2006).

Останні досягнення в галузі молекулярної біології і доробки у вивченні молекулярних основ МС *M. tuberculosis* надали нам нові методи швидкого виявлення МБТ в дослідному матеріалі (Pan S. et al., 2013; Choi H.W. et al., 2014; Sheka S. et al., 2014; Imperiale B.R. et al., 2014).

З метою підвищення ефективності діагностики туберкульозу все частіше використовують наступний підхід: поєднання молекулярно-генетичної діагностики з наступним культуральним дослідженням (Попов С.А., Сабгайда Т.П., 2012; Imperiale B.R. et al., 2014; Ng K.P. et al. 2014).

Впровадження в практику роботи лабораторій різноманітних схем гено-фенотипічної діагностики туберкульозу сприяє максимальному скороченню термінів індикації та ідентифікації мікобактерій. Комбіноване використання цих методів дозволяє отримати більш повну інформацію щодо збудника туберкульозу та здійснити його виділення з організму людини у випадках захворювання на олігобацилярний туберкульоз (Бастиан І., Порталс Ф., 2003; Фещенко Ю.І. та ін., 2013; Williams-Bouyer N., 2000).

Отже, використання сучасних гено-фенотипічних методів у вивченні біології мікобактерій, застосування в практиці охорони здоров'я молекулярно-генетичних методів у сполученні з рутинними і найновішими експрес-фенотипічними методами, дозволяє покращити діагностику збудника в бактеріологічних лабораторіях ПТЗ України.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках НДР лабораторії мікробіології НІФП НАМНУ А.13.08 «Розробити алгоритм гено-фенотипічної діагностики туберкульозу з раннім визначенням резистентності мікобактерій до антимікобактеріальних препаратів» (№ державної реєстрації 0113U000267, 2015 – 2017 рр.).

Мета – підвищення ефективності діагностики туберкульозу, стандартизація виділення мікобактерій та визначення їх медикаментозної стійкості у хворих на туберкульоз легень в рідкому живильному середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 з обґрунтуванням комбінованого використання її з новими молекулярно-генетичними системами для швидкої діагностики туберкульозної інфекції.

Завдання дослідження:

1. Провести порівняльні дослідження щодо виділення мікобактерій традиційним способом та з використанням рідкого живильного середовища і модифікованого щільного живильного середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960.

2. Обґрунтувати застосування системи ВАСТЕС MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень залежно від клінічної категорії туберкульозного процесу.

3. Дослідити критерії резистентності *M. tuberculosis* до препаратів 2-го і

резервного ряду в рідкому живильному середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 та розробити стандартну технологію для визначення медикаментозної стійкості до цих препаратів в системі ВАСТЕС MGIT 960.

4. Обґрунтувати оптимальну схему комплексного використання рідкого живильного середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960 і молекулярно-генетичних систем GeneXpert і GenoType для швидкої діагностики туберкульозної інфекції, розробити діагностичний алгоритм їх комплексного використання щодо виявлення мікобактерій туберкульозу.

Об'єкт дослідження - біологічні властивості штамів *M. tuberculosis*, виділених від хворих на туберкульоз легень.

Предмет дослідження – методи виділення штамів *M. tuberculosis*, визначення їх чутливості до протимікробних засобів, молекулярно-генетична ідентифікація.

Методи дослідження: мікробіологічні (мікроскопія, виділення чистих культур клінічних штамів мікобактерій, дослідження їх біологічних властивостей, визначення чутливості до антимікробних препаратів; застосування системи ВАСТЕС MGIT 960 – для одержання первинної культури *M. tuberculosis*, і визначення медикаментозної стійкості), імунохроматографічний метод (ідентифікація виділених штамів мікобактерій), молекулярно-генетичні (ідентифікація мікобактерій, визначали їх резистентності до лікарських засобів), статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Підвищена ефективність виділення *M. tuberculosis* з мокротиння хворих на туберкульоз легень в рідкому живильному середовищі за рахунок використання модифікованого щільного живильного середовища для субкультивування позитивних зразків після вирощування в системі ВАСТЕС MGIT 960, що дозволяє у 1,8 разів скоротити виділення чистої культури *M. tuberculosis* на щільному середовищі, тобто на 7,4 доби; середня тривалість виділення мікобактерій із застосуванням рідкого середовища та модифікованого щільного середовища для субкультивування склала 18,9 днів, що в 1,3 рази менше тривалості виділення мікобактерій із застосуванням рідкого середовища та середовища Левенштейна-Єнсена.

Встановлено, що культивування зразків мокротиння від хворих з різними категоріями захворювання на туберкульоз за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960 дозволяє виявити додатково в середньому 18,2% хворих у порівнянні з класичним культуральним методом діагностики.

Рідке живильне середовище доцільно використовувати, в першу чергу, для пацієнтів I-ої клінічної категорії (додатково виявлено 22,5% випадків), визначена доцільність використання рідкого середовища для виявлення бактеріовиділювачів з діагнозом вперше діагностований туберкульоз легень (ВДТБ) (додатково виявлено 22,1% випадків), а також для діагностики рецидивів туберкульозу (РТБ) (додатково виявлено 19,4% випадків) і при обстеженні пацієнтів, що знаходилися в контакт з хворими на мультирезистентний збудник туберкульозу (МРТБ) (додатково виявлено 28,8% випадків).

Доведено, що доцільно використання рідкого середовища для діагностики туберкульозу у дітей. Культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960 дало можливість виявити *M. tuberculosis* у 13,6% дітей з клінічним діагнозом «туберкульоз», що майже у 2,7 разів більше, ніж діагностика бактеріовиділення у

дітей на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена.

Вперше визначено “критичні” концентрації препаратів 2-го ряду – етіонаміду (5,0 мкг/мл), капреоміцину (2,5 мкг/мл), офлоксацину (2,0 мкг/мл), амікацину (1,0 мкг/мл), моксифлоксацину (0,25 мкг/мл), левофлоксацину (2,0 мкг/мл), протіонаміду (2,5 мкг/мл) і резервного ряду – лінезоліду (1,0 мкг/мл) при використанні їх для тесту медикаментозної чутливості (ТМЧ) в рідкому живильному середовищі Middlebrook 7H9 (далі – рідке середовище) із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960. Розроблена стандартна методика визначення *M. tuberculosis* з використанням рідкого середовища до препаратів 2-го ряду і резервного препарату лінезоліду.

Доведено, що молекулярно-генетичну систему GeneXpert можна використовувати для швидкої діагностики, насамперед, випадків МРТБ (відсоток діагностованих випадків МРТБ за допомогою системи GeneXpert і фенотипічного методу діагностики в системі ВАСТЕС MGIT 960 складає 93,7). Діагностична цінність дослідження негативних за результатами бактеріоскопії зразків мокротиння в системі GeneXpert складає 59,4%.

Обґрунтовано застосування систем GenoType і GeneXpert для досліджень мокротиння пацієнтів з підозрою на туберкульоз та хворих з встановленим клінічним діагнозом залежно від клінічної категорії захворювання. Використання цих систем дозволяє виявити додатково 11,2% та 11,6% бактеріовиділювачів серед хворих I-ої та II-ої категорії відповідно.

Обґрунтовано комбіноване застосування систем GeneXpert, GenoType і ВАСТЕС MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень і запропонований діагностичний алгоритм їх комплексного використання при виявленні *M. tuberculosis*, суть якого полягає в тому, що в лабораторіях 3-го рівня України, по-перше, в процесі індикації і ідентифікації *M. tuberculosis* комплекс досліджень з використанням гено-фенотипічних систем потрібно здійснювати з однієї проби отриманого мокротиння після передпосівної обробки з утвореного осаду; по-друге, обґрунтований і запропонований об'єм лабораторних досліджень необхідно проводити залежно від клінічної категорії процесу та випадку захворювання на туберкульоз легень.

Практичне значення одержаних результатів дослідження. Найбільш вагому практичну значущість мають результати із визначення чутливості та специфічності різних методів виділення, ідентифікації та визначення МС збудника туберкульозу.

Обґрунтовано застосування молекулярно-генетичних методів діагностики туберкульозу в мережі лабораторій ПТЗ України. Доцільним є комплексне використання фено-генотипічних методів дослідження в лабораторіях 3 рівня, тобто на рівні обласних ПТЗ України. Розроблена стандартизована методика визначення МС до етіонаміду, капреоміцину, офлоксацину, амікацину, моксифлоксацину, левофлоксацину, протіонаміду і лінезоліду в рідкому середовищі із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960.

Впровадження в діагностичні дослідження на туберкульоз системи гібридизації з типоспецифічними зондами GenoType дозволило швидко проводити ідентифікацію виділених мікобактерій та диференціацію нетуберкульозних

мікобактерій (НТМБ) (*M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii* та ін.).

Розроблений алгоритм використання систем GeneXpert і GenoType (технологія ДНК-стрипів) з сучасними бактеріологічними методами, який впроваджено в практику роботи бактеріологічних лабораторій ПТЗ України. Алгоритм гено-фенотипічної діагностики туберкульозу регламентований Наказом МОЗ України № 620 від 04.09.2014 р.

Особистий внесок здобувача. Робота виконана автором особисто на базі лабораторії мікробіології Державної установи (ДУ) «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України» (НІФП НАМНУ) і клініко-діагностичної лабораторії Полтавського обласного протитуберкульозного диспансеру (ОПТД). Автором проаналізовано наукову літературу з проблеми дисертаційного дослідження, виконувала бактеріологічні і генетичні дослідження. Особисто провела експериментальні дослідження з підвищення ефективності виділення мікобактерій з клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень в системі ВАСТЕС MGIT 960 і порівняльні дослідження щодо виділення мікобактерій традиційним способом і з використанням рідкого середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960. Обґрунтувала застосування системи ВАСТЕС MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень залежно від клінічної категорії туберкульозного процесу і комбіноване застосування систем GeneXpert, GenoType і ВАСТЕС MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень; запропонувала алгоритм досліджень щодо виділення *M. tuberculosis*. У плануванні основних напрямків досліджень брав участь науковий керівник д-р мед. наук О.А. Журило.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на XIII конгресі Світової Федерації українських лікарських товариств (Львів, 2010); V з'їзді фтизіатрів і пульмонологів України (Київ, 2013); на науково-практичному семінарі «Мікробіологічні методи дослідження на туберкульоз та організація системи контролю якості при їх виконанні» (Київ, 2013); на науково-практичному семінарі «Контроль якості культуральних методів діагностики туберкульозу» (Київ, 2014); на Республіканському науково-практичному семінарі для бактеріологів протитуберкульозних закладів України «Прискорена мікробіологічна діагностика туберкульозу» (Київ, 2014); V міжнародному медичному конгресі «Впровадження сучасних досягнень у практику охорони здоров'я України» (Київ, 2016); на науково-практичній конференції «Актуальні питання ведення хворих на хіміорезистентний туберкульоз на стаціонарному і амбулаторному етапах» (Київ, 2017).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 11 наукових праць, із них 1 посібник, 1 стаття в закордонному науковому виданні, 5 статей у медичних фахових виданнях, рекомендованих МОН України (із них 5 – у журналах, зареєстрованих у міжнародних наукометричних системах Index Copernicus, Science Index, Google Scholar), 4 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференціях, з'їздах і конгресах. За результатами дисертаційного дослідження отримано 1 патент України на корисну модель та видано 3 інформаційні листи. Результати досліджень повністю наведено у надрукованих роботах.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду

літератури, розділу матеріалів і методів дослідження, 8 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку літературних джерел, який складається з 263 найменувань (109 кирилицею і 154 латиною), додатків. Основний текст дисертації викладено на 147 сторінках комп'ютерного друку і проілюстровано 32 таблицями і 3 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом досліджень слугували штами *M. tuberculosis*, які виділяли з клінічних зразків мокротиння від хворих на туберкульоз легень, що мали стаціонарне лікування на базі НІФП НАМНУ.

При культуральному дослідженні були використані: щільне живильне середовище Левенштейна-Єнсена і рідке – бульйон Міддлбрука 7Н9. Передпосівну обробку клінічного матеріалу здійснювали за допомогою реактивів: 12,0% стерильного розчину Na_3PO_4 , 0,5% стерильного розчину N-ацетил-L-цистеїну з 1,0 % гідроксиду натрію (BBL Mucosrep NALC-OH).

Мікроскопічне дослідження здійснювали за допомогою мікроскопів OLYMPUS CX-21 і BX-51. Для ідентифікації виділених штамів мікобактерій використовували імунохроматографічний тест ID MTB MGIT. Одержання первинної культури МБТ і визначення МС проводили за допомогою системи VASTEC MGIT 960. У роботі використано дві молекулярно-генетичні системи, за допомогою яких здійснювали ідентифікацію мікобактерій і швидко визначали їх МС: GeneXpert MTB/RIF і GenoType. Система GeneXpert є інтегрованим діагностичним обладнанням, яке виконує обробку зразків і ПЛР у реальному часі для діагностики *in vitro*, яке застосовується з метою виявлення: ДНК *M. tuberculosis complex* у зразках мокротиння і мутації гена *proB*, пов'язаних зі стійкістю до R у зразках.

Процедуру проведення тестування в системі GenoType підрозділяли на три етапи: виділення ДНК із матеріалу, що культивується, мультиплексна ампліфікація з біотинілірованими праймерами і реверс гібридизація. Після хімічної денатурації, одноланцюгові амплікони зв'язуються із зондами (гібридизація). Високо специфічне зв'язування комплементарних ланцюгів ДНК обумовлено жорсткими умовами, які створюються в результаті оптимальної комбінації складу буфера і температури. Таким чином, зонди можуть вірогідно розпізнавати кілька варіантів послідовностей у області гена, який тестується. Кон'югована стрептавідином лужна фосфатаза зв'язується з біотином ампліконів за допомогою фрагментів стрептавідина. У підсумку, лужна фосфатаза перетворює доданий субстрат у пофарбовану форму, яка стає видимою на мембрані стрипів, як кольоровий преципітат. Оцінка проводиться комп'ютерною програмою автоматично.

Дослідження проведені з врахуванням заходів щодо безпеки здоров'я пацієнта, дотримання його прав, людської гідності, морально-етичних норм відповідно до принципів Гельсінської декларації прийнятої Генеральною Асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації; Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та відповідних законів, наказів Міністерства охорони здоров'я України (висновок комітету з медичної етики НІФП НАМНУ).

Статистичні методи. Отримані результати статистично оброблено за

загальноприйнятими методами варіаційної і кореляційної статистики.

Результати власних досліджень та їх обговорення. В процесі проведення досліджень з підвищення ефективності виділення МБТ з мокротиння хворих на туберкульоз легень в системі ВАСТЕС MGIT 960 було вивчено 281 культуру, що були «позитивними» в системі. «Позитивний» результат виявлено за інтенсивністю світіння в системі при опроміненні ультрафіолетовим світлом. Інтенсивність світіння прямо пропорційна рівню витрати кисню і реєструється в одиницях росту (GU – growth units), але які не являються колонієутворюючими одиницями мікобактерій, а лише свідчать про інтенсивність поглинання кисню. Тоді як виявлення корд-фактору є безперечним доказом наявності мікобактерій у пробірці MGIT, а відсутність росту на кров'яному агарі свідчить про те, що в «позитивній» пробірці на рідкому середовищі відсутні супутні мікроорганізми. Таких культур було виявлено 239 (85,1%).

У 14,9% (42 культури) випадків в системі ВАСТЕС MGIT 960 були виявлені «позитивні» проби, в яких не виявлено корд-фактору і була відсутність росту на кров'яному агарі. Тобто в даних пробірках MGIT з рідким середовищем немає супутньої мікрофлори, але культури поки не можуть вважатися «позитивними». Ці пробірки MGIT можуть містити мікобактерії в дуже малих кількостях з підвищеним обміном речовин, що і було зареєстровано системою ВАСТЕС MGIT 960 в GU.

«Позитивну» пробірку MGIT неможливо повторно завантажити в систему, тому для продовження подальших досліджень ці пробірки розташовували в термостаті й інкубували 3 доби при 37 °С. Тобто підрошували культури. За 4-и доби в 45,2% (19 пробірок MGIT з 42) випадків спостерігали появу корд-фактору. При цьому саме на 4-ту добу більше «позитивних» культур набувала корд-фактор – 21,4%. Поява корд-фактору з 5-ої доби інкубації не цікавила, тому що за стандартною методикою, «позитивна» пробірка, яка була вилучена з системи понад 5-ти діб, стає непридатною для проведення ТМЧ.

Після інкубації протягом 4 діб залишилось 23 культури, які були визначені системою ВАСТЕС MGIT 960 як «позитивні», які не мали корд-фактору. Ці пробірки в подальшому використовували для субкультивування на середовищі Левенштейна-Єнсена, переглядали ці посіви протягом 10 тижнів і лише після цього у випадку відсутності росту, видавали негативну відповідь. Нами запропоновано щільне середовище, яке можна використовувати для отримання росту культур мікобактерій при субкультивуванні «позитивних» пробірок MGIT після системи ВАСТЕС MGIT 960, які не містять корд-фактору і являються негативними за результатами посіву на кров'яний агар.

Дослідження показали, що 0,25% малахітового зеленого в 20,0 мл дистильованої стерильної води є найменшою концентрацією даного реагенту в середовищі Левенштейна-Єнсена, при якій зберігається його інгібуюча дія щодо росту неспецифічної мікрофлори при субкультивуванні проб з «позитивним» результатом на рідкому середовищі після культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960, але які не містять корд-фактору і є негативними за результатами посіву на кров'яний агар. Також експериментальні дані довели, що доцільним є додавання в щільне середовище L-аспарагінової кислоти в концентрації 3,6 г для подальшого субкультивування «позитивних» проб MGIT після системи ВАСТЕС MGIT 960.

Нами було проведено 698 досліджень зразків дослідного матеріалу в рідкому середовищі Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 та паралельно на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена (табл.1).

Із 698 зразків мокротиння 547 проб (78,4%) були позитивними на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена. Серед зразків, що були негативними за результатами посіву на щільне середовище Левенштейна-Єнсена, методом культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960 в рідкому середовищі Middlebrook 7H9 було виявлено 96 позитивних проб (13,7%). Метод виділення культур в системі з використанням рідкого середовища майже в 1,2 рази достовірно перевищує діагностичну ефективність методу посіву на щільному середовищі.

Таблиця 1

Результати культурального дослідження на туберкульоз зразків мокротиння з використанням рідкого та щільного живильних середовищ

Культуральні дослідження з використанням різних живильних середовищ	Результативність методів	
	абс.	М ± m, %
Рідке середовище в системі ВАСТЕС «+» Щільне середовище Левенштейна-Єнсена «+»	547	78,4 ± 1,6
Рідке середовище в системі ВАСТЕС «+» Щільне середовище Левенштейна-Єнсена «-»	96	13,7 ± 1,3
Рідке середовище в системі ВАСТЕС «-» Щільне середовище Левенштейна-Єнсена «+»	0	0
Рідке середовище в системі ВАСТЕС «-» Щільне середовище Левенштейна-Єнсена «-»	55	7,9 ± 1,0
Всього позитивних результатів в системі ВАСТЕС	643	92,1 ± 1,0*
Позитивних посівів на щільному середовищі	547	78,4 ± 1,6
Всього досліджень	698	100

Примітки:

1. «+» – позитивний результат, «-» – негативний результат;

2. * – $p < 0,001$ при порівнянні культуральних досліджень в системі ВАСТЕС MGIT 960 і на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена.

Середня тривалість росту культур в рідкому середовищі склала 11,5 діб, на щільному середовищі – 33,2 дня, тобто терміни виділення збудника туберкульозу за допомогою рідкого середовища скорочуються на 20,1 діб, або в 3,1 рази в порівнянні з культивуванням *M. tuberculosis* на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена ($p < 0,001$). Середня тривалість субкультивування культур на середовищі Левенштейна-Єнсена в середньому складала 13,4 доби, на модифікованому середовищі – 7,4 доби, тобто терміни субкультивування за допомогою модифікованого середовища на 6 днів, або в 1,8 разів менше ($p < 0,001$). Середня тривалість виділення мікобактерій із застосуванням рідкого середовища та модифікованого середовища Левенштейна-Єнсена для субкультивування склала 18,9 днів, що на 6 днів, або в 1,3 рази менше тривалості виділення мікобактерій з застосуванням рідкого середовища та середовища Левенштейна-Єнсена для субкультивування ($p < 0,001$).

Проведені дослідження щодо обґрунтування застосування системи ВАСТЕС MGIT 960 для досліджень зразків клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень залежно від клінічної категорії туберкульозного процесу показали наступне. Для всіх клінічних категорій прослідковувалась однакова закономірність – культивування зразків мокротиння лише в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 додатково виявляли у середньому 18,2% бактеріовиділювачів у порівнянні з методом бактеріологічної діагностики з використанням щільного середовища Левенштейна-Єнсена ($p < 0,001$). Найбільший відсоток додаткових позитивних результатів культуральних досліджень, який був отриманий лише за рахунок використання рідкого середовища зафіксований при посіві зразків мокротиння хворих I-ої клінічної категорії (22,5% бактеріовиділювачів).

Проведені дослідження дозволили встановити також відсоток позитивних результатів культурального дослідження в системі ВАСТЕС MGIT 960 при посіві зразків мокротиння від хворих на туберкульоз II-ої категорії. Додатково було діагностовано 20,4% бактеріовиділювачів.

Найменш інформативними, щодо використання лише рідкого середовища для виявлення бактеріовиділювачів, були показники бактеріологічної діагностики клінічних зразків від хворих IV-ої клінічної категорії (було виявлено 2,1% бактеріовиділювачів додатково до результатів культуральних досліджень з використанням традиційного середовища Левенштейна-Єнсена).

В ході досліджень було проаналізовано дані про виявлення бактеріовиділювачів із 695 хворих із різними випадками туберкульозу. Всі випадки були підтверджені методом посіву в рідке живильне середовище в системі ВАСТЕС MGIT 960 (табл. 2).

Таблиця 2

**Виявлення бактеріовиділювачів *M. tuberculosis* в різних групах діагнозу
(по випадках захворювання)**

Випадок	Всього	Результати культуральної діагностики					
		рідке середовище (+) / щільне середовище (+)		рідке середовище (-) / щільне середовище (-)		рідке середовище (-) / щільне середовище (-)	
		абс.	$M \pm m, \%$	абс.	$M \pm m, \%$	абс.	$M \pm m, \%$
ВДТБ	452	315	$69,7 \pm 2,2^*$	100	$22,1 \pm 1,9$	37	$8,3 \pm 1,3$
РТБ	72	46	$63,9 \pm 5,6^*$	14	$19,4 \pm 4,6$	12	$16,7 \pm 0,5$
МРТБ	81	72	$88,9 \pm 3,5^*$	1	$1,2 \pm 1,2$	8	$9,9 \pm 0,3$
РМРТБ	59	36	$61,0 \pm 6,3^*$	17	$28,8 \pm 5,8$	6	$10,2 \pm 3,9$
ХТБ	31	31	100	0	0	0	0
Всього	695	500	$71,9 \pm 1,7^*$	132	$18,9 \pm 1,5$	63	$9,2 \pm 1,1$

Примітки:

1. * – $p < 0,001$ (при порівнянні показників ефективності діагностики за допомогою рідкого та щільного і лише рідкого середовища);

2. (+) – наявність росту мікобактерій, (-) – відсутність росту мікобактерій.

З 695 випадків туберкульозу з бактеріовиділенням 500 (71,9%) були виявлені за двома методами культуральної діагностики, при цьому 132 (18,9%) випадків додатково були діагностовані лише за допомогою рідкого середовища. Метод культуральної діагностики в системі ВАСТЕС MGIT 960 є інформативнішим для визначення бактеріовиділювачів з діагнозом ВДТБ (виявлено 22,1% бактеріовиділювачів лише за допомогою рідкого живильного середовища). За допомогою лише рідкого середовища було виявлено 19,4% бактеріовиділювачів з РТБ. Найбільш ефективним є використання системи ВАСТЕС MGIT 960 для виявлення бактеріовиділювачів з ризиком розвитку мультирезистентного туберкульозу (РМРТБ). Дослідження зразків від контактних осіб показали, що бактеріовиділення було виявлено в 28,8% за допомогою лише рідкого середовища.

Доцільним і перспективним є використання рідкого середовища Middledrook 7H9 для встановлення бактеріовиділення при обстеженні клінічного матеріалу дітей. Змиви з ротоглотки дітей досліджували методом посіву. Метод культивування зразків клінічного матеріалу в рідкому середовищі виявив 13,6% бактеріовиділювачів, що майже у 2,7 разів більше, ніж діагностика бактеріовиділення у дітей на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена, яка склала 5,5% ($p < 0,001$).

Система ВАСТЕС MGIT 960 призначена для визначення МС мікобактерій до ПТП 1-го ряду. Наші дослідження показали, що результати можливо одержувати також при вивченні МС мікобактерій до препаратів 2-го ряду: етіонаміду, капреоміцину, протіонаміду, офлоксацину, моксифлоксацину, левофлоксацину, амікацину і резервного ряду – лінезоліду. Основою досліджень було визначення критерію МС, яким є “критична” концентрація препаратів. “Критична” концентрація – один з критеріїв резистентності. Це строго визначена кількість кожного препарату, яку повинно містити середовище для постановки ТМЧ. У якості контролю в роботі була використана міжнародна панель, що була отримана з Супранациональної лабораторії ВООЗ (м. Рига, Латвія) та включала 40 штамів *M. tuberculosis* з відомими результатами МС до препаратів 2-го і резервного ряду, які були визначені на щільному середовищі методом пропорцій (20 штамів МБТ з чутливістю і 20 штамів МБТ з МС до препаратів 2-го і резервного ряду).

Використання методу пропорції на щільному середовищі при визначенні МС штамів *M. tuberculosis* до препаратів 2-го і резервного ряду було обумовлено тим, що основою визначення МС на рідких середовищах в системі ВАСТЕС MGIT 960 також є метод пропорцій. Принцип методу пропорцій полягає у визначенні співвідношення (пропорції) між чутливими і стійкими до препаратів в “критичних” концентраціях особинами в популяції штаму *M. tuberculosis*, який виділено від хворого на туберкульоз. За допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960 нами були знайдені такі «критичні» концентрації препаратів 2-го і резервного ряду в рідких середовищах, які після інокуляції контрольними штамми *M. tuberculosis* підтвердили еквівалентність результатів МС *M. tuberculosis*, що були отримані на щільному та рідкому середовищі.

Була відпрацьована методика базового тесту та був визначений діапазон антибактеріальних тестових концентрацій для препаратів 2-го і резервного ряду. Досліджували по декілька концентрацій кожного з препаратів. Враховано

«критичні» концентрації препаратів 2-го і резервного ряду, які використовують для тестування на щільних середовищах, оскільки вони залежали від мінімальної інгібуючої концентрації кожного з препаратів.

Пробірки з препаратами разом з контролями розміщували в транспортувальних контейнерах зі штрих-кодом і вставляли в гнізда системи ВАСТЕС MGIT 960 як “невідомі ліки” з урахуванням особливостей вводу даних для визначення МС. При інкубації посівів система ВАСТЕС MGIT 960 сигналізувала про “повну” ємність коли показник росту в контролі досягав 400 GU. У цій точці показників GU, за якими здійснювали оцінку росту мікобактерій в пробірках з різним вмістом препаратів, система проводила вибірку результатів. Дані роздруковували та інтерпретували.

Якщо показник GU в пробірках з препаратами був вищим ніж 100 одиниць при інтенсивності росту в контролі 400, штами визначали як резистентні до даних концентрацій препаратів, а якщо показник GU в пробірках з препаратами був нижчим ніж 100 одиниць при інтенсивності росту в контролі 400, штами визначали як чутливі до даних концентрацій препаратів. Експериментальним шляхом встановлено концентрації для кожного із вищезазначених препаратів, при яких росли стійкі штами МБТ контрольної панелі з інтенсивністю росту 100 GU та не давати ріст штами МБТ контрольної панелі, які є чутливими. Ця концентрація і вважалася “критичною” при дослідженні в рідкому середовищі. Проведені дослідження, дали можливість визначити “критичні” концентрації препаратів 2-го ряду і резервного препарату – лінезоліду при використанні їх для ТМЧ в рідкому середовищі із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960.

Отримані результати є принципово важливими, тому що вперше в Україні вони дозволили розробити стандартну методику визначення МС *M. tuberculosis* з використанням рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 до препаратів 2-го ряду і резервного препарату – лінезоліду із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960, яка впроваджена в роботу лабораторій 3 рівня ПТЗ України.

Використання сучасних гено-фенотипічних методів для діагностики туберкульозу необхідно для того, щоб максимально скоротити терміни індикації і ідентифікації мікобактерій та визначення їх МС до ПТП. Для проведення досліджень у системі GeneXpert були відібрані 1614 зразків мокротиння від хворих на туберкульоз, з них 846 ($52,4 \pm 1,2$)% зразків мали КСБ та різний ступень градації позитивного результату мазку, а 768 ($47,6 \pm 1,2$)% зразків були негативними за методом прямої мікроскопії за Циль-Нільсеном на наявність КСБ. Досліджували всі зразки мокротиння незалежно від результатів бактеріоскопії, але, результативність роботи системи GeneXpert була оцінена окремо для проб мокротиння, що були позитивними або негативними за мазком.

Із 1614 зразків мокротиння 978 зразків містили *M.tuberculosis*, що склало 60,6%. При цьому 618 проб з КСБ(+) та 360 проб мокротиння з КСБ(–) при дослідженні в системі GeneXpert були позитивними, тобто містили ДНК *M. tuberculosis*, показник позитивності результату склав 73,0% та 46,9% відповідно. При використанні системи GeneXpert кількість позитивних результатів, що були отримані з проб мокротиння з КСБ(+) в 1,56 разів перевищують аналогічний показник дослідження проб мокротиння, що були негативними за мазком.

Додатковий аналіз отриманих даних показав, що діагностична ефективність в системі GeneXpert щодо дослідження зразків мокротиння залежить, в першу чергу, від в'язкості мокротиння. При дослідженні зразків мокротиння після проведення передпосівної обробки, коли здійснювали гомогенізацію мокротиння, показник позитивності результатів досліджень зростав.

В системі GeneXpert були досліджені на наявність ДНК МБТ зразки концентрованого мокротиння з КСБ(+) та КСБ(-) після проведення передпосівної обробки. Після проведення передпосівної обробки зразків мокротиння з КСБ(+) та КСБ(-) результативність досліджень на туберкульоз, що були виявлені в системі GeneXpert, збільшилась майже в 1,23 рази. Для позитивних на КСБ зразків мокротиння відсоток молекулярно-генетичного підтвердження результатів на туберкульоз складав 88,7, для негативних за мазком зразків мокротиння – 59,4 ($p < 0,01$). Таким чином, доведена доцільність використання концентрованих зразків мокротиння при проведенні дослідження на туберкульоз в системі GeneXpert. Також підтверджена діагностична цінність дослідження негативних за результатами бактеріоскопії зразків мокротиння в системі GeneXpert.

Слід відмітити, що при індикації система реєструє позитивний результат лише у випадку наявності у пробі *M.tuberculosis-complex*. Якщо в пробі містяться мікобактерії нетуберкульозного комплексу, то дана система не видає «позитивний» сигнал. Негативний результат тесту при позитивній бактеріоскопії, особливо, коли в пробі спостерігають поодинокі КСБ, також може бути пов'язаний з тим, що кількість бактерій у таких зразках є нижчою за рівень виявлення (динамічний діапазон) щодо молекулярно-генетичного тесту.

Нами були проведені порівняльні дослідження щодо діагностичної ефективності використання системи GeneXpert та методу посіву раніше відібраних позитивних та негативних за результатами бактеріоскопії зразків концентрованого мокротиння в системі ВАСТЕС MGIT 960. Із 846 зразків мокротиння, що були позитивним на туберкульоз за результатами бактеріоскопічного та культурального досліджень, система GeneXpert виявила 732 ($86,6 \pm 1,2$)% позитивні проби. В той же час у 18 випадках ($2,1 \pm 0,5$)% молекулярно-генетичним методом були виявлені ДНК *M. tuberculosis* при негативних результатах посіву ($p < 0,01$). Детальний аналіз цих випадків показав, що в зазначених пробах мокротиння життєздатність мікобактерій була знижена, оскільки хворі, що їх виділяли були раніше лікованими, тому молекулярно-генетичний метод і бактеріоскопічні дослідження констатували наявність мікобактерій в пробах, а метод посіву виявився неінформативним.

Метод посіву на ($11,3 \pm 1,1$)% ($p < 0,01$) [ВАСТЕС MGIT(+)/GeneXpert(-) – 96 випадків] є більш інформативним, ніж молекулярно-генетичний метод в системі GeneXpert. Він дає можливість виділяти мікобактерії нетуберкульозного комплексу, на відміну від зазначеного методу в системі GeneXpert.

Рівень виявлення *M. tuberculosis* в зразках мокротиння з негативними результатами мікроскопії та бактеріологічним підтвердженням складав $456 (59,4 \pm 1,8)$ % для системи GeneXpert. З $312 (40,6 \pm 1,7)$ % зразків мокротиння, що дали негативний результат дослідження в системі GeneXpert, були отримані культури *M. tuberculosis* методом посіву в рідкому середовищі. Культуральний метод

дослідження мав більшу діагностичну цінність на 40,6%, ніж метод діагностики в системі GeneXpert ($p < 0,01$).

Таким чином, при застосуванні системи GeneXpert і методу мікроскопії для досліджень на туберкульоз, необхідним є паралельне здійснення посіву дослідного матеріалу на рідке середовище для виявлення життєздатності МБТ. Система GeneXpert може визначати тільки наявність або відсутність МС до рифампіцину, що вважається так званим «маркером» мультирезистентності. Тому важливо було провести порівняльний аналіз результатів стійкості до рифампіцину за результатами досліджень в системі GeneXpert та результатів ТМЧ в рідкому живильному середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960, яке дає можливість визначати монорезистентність до рифампіцину та мультирезистентність (рифампіцин + ізоніазид) штамів *M.tuberculosis*.

Із 762 позитивних зразків мокротиння, що мали стійкість до рифампіцину в системі GeneXpert, 714 ($93,7 \pm 0,9$)% виявилися мультирезистентними при визначенні стійкості в рідкому живильному середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960. Відсоток монорезистентних до R штамів склав ($3,9 \pm 0,7$) (30 штамів МБТ), а 18 ($2,4 \pm 0,5$)% штамів *M. tuberculosis* за результатами фенотипічного визначення стійкості до рифампіцину були чутливими ($p < 0,01$). Це може бути пов'язаним з тим, що точкові мутації відбулися лише в 2-х ділянках гену *rpoB* з 5-ти, тому фенотипічна стійкість може не бути визначена. Таким чином, відсоток діагностованих випадків МРТБ за допомогою системи GeneXpert і фенотипічного методу діагностики в системі ВАСТЕС MGIT 960 склав 93,7, що свідчить про те, що молекулярно-генетична система може використовуватися для швидкої діагностики, насамперед, МРТБ.

При роботі з системою GenoType використовували набори реагентів, які призначені для дослідження зразків мокротиння позитивних за мазком. Для дослідження було відібрано 684 зразки мокротиння. Були отримані наступні результати молекулярної ідентифікації мікобактерій: в 642 (93,9%) зразках було підтверджено наявність комплексу *M.tuberculosis*, а в 42 (6,2%) зразках було виявлено НТМБ. В 24 (3,5%) випадках – *M.avium-intracellulare*, в 12 (1,8%) випадках – *M.fortuitum*, а в 6 (0,9%) випадках – *M.kansasii*.

Порівняльні дослідження щодо діагностичної ефективності молекулярно-генетичного методу в системі GenoType і культурального методу діагностики за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960 показали наступне. Досліджено 846 зразків мокротиння. Всі зразки мокротиння, що давали ріст при дослідженні методом посіву в системі ВАСТЕС MGIT 960, мали позитивний результат в системі GenoType, щодо наявності ДНК *M.tuberculosis-complex*, тобто діагностична цінність двох методів діагностики складала 100%.

За допомогою системи GenoType були проведені дослідження з ідентифікації 792 клінічних ізолятів мікобактерій, які були отримані в рідкому середовищі Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 із мокротиння пацієнтів із новими випадками. При посіві клінічних ізолятів мікобактерій на 5,0% кров'яний агар росту неспецифічної мікрофлори не спостерігали, що свідчило про виділення чистої культури мікобактерій. При мікроскопії вмісту позитивних пробірок MGIT

була підтверджена кислотостійкість виділених бактерій, корд-фактор був визначений у 756 (95,5%) випадках, у 36 (4,5%) позитивних пробірках MGIT при мікроскопії були виявлені окремі КСБ, які не утворювали корд-фактору. Це дало нам підставу припустити, що дані культури мікобактерій не належать до комплексу *M.tuberculosis* і потребують подальшої ретельної ідентифікації.

За допомогою імунохроматографічного тесту ID MTB MGIT виявили, що 756 (95,5%) культур, які мали корд-фактор були ідентифіковані, як *M.tuberculosis-complex*. При проведенні досліджень в системі GenoType вони також були ідентифіковані як *M.tuberculosis-complex*.

36 (4,5%) проб з позитивних пробірок MGIT, які мали негативний результат при використанні імунохроматографічного тесту ID MTB MGIT, не утворювали корд-фактору, були досліджені в системі GenoType з наборами GenoType Mycobacteria Direct і GenoType Mycobacteria CM, які дають можливість ідентифікувати клінічно-значимі ізоляти мікобактерій за межами туберкульозного комплексу. Встановлено, що з 36 культур мікобактерій 18 (2,3%) належали до *M.avium-intracellulare*, 12 (1,5%) культур мікобактерій були віднесені до *M.kansasii*, 6 (0,7%) культур було ідентифіковано, як *M.fortuitum*.

Нами були розпочаті дослідження щодо обґрунтування використання системи GenoType для швидкого визначення МС мікобактерій. Дослідження були спрямовані на визначення МС *M.tuberculosis-complex* в системі GenoType з наборами реагентів GenoType MTBDRplus та GenoType MTBDRsl для визначення МС до ізоніазиду і рифампіцину, фторхінолонам, аміноглікозидів/циклічних пептидів та етамбутолу відповідно. За результатами фенотипічного тестування на МС *M.tuberculosis* в рідкому середовищі були відібрані 936 мультирезистентних штамів *M. tuberculosis*, що циркулювали серед хворих на туберкульоз з різними категоріями та випадками захворювання. Результати молекулярно-генетичного дослідження МС мікобактерій щодо профілю резистентності штамів МРТБ, тобто стійких до ізоніазиду і рифампіцину одночасно співпали в 95,5 % (894 штами) з результатами фенотипічного тестування методом пропорцій в системі ВАСТЕС MGIT 960. Результати визначення монорезистентності до рифампіцину або в комбінації з іншими ПТП, крім ізоніазиду за допомогою двох методів не відрізнялись між собою і повністю співпадали.

За допомогою набору GenoType MTBDRplus нами було досліджено 348 штамів МБТ з резистентністю до ізоніазиду і співставленні з результатами ТМЧ в системі ВАСТЕС MGIT 960. Виявлено, що при наявності мутацій, що асоційовані з резистентністю до ізоніазиду, лише в 93,1% випадках спостерігалась МС *M. tuberculosis* до ізоніазиду при проведенні ТМЧ в рідкому середовищі. Нами були виконані дослідження щодо порівняння показників резистентності до ПТП 2-го ряду, виявлених за допомогою молекулярно-генетичного і фенотипічного методів. Для цього було відібрано 318 штамів *M.tuberculosis*, які за результатами вивчення МС в системі GenoType із застосуванням набору GenoType MTBDRsl, мали резистентність до групи фторхінолонів, аміноглікозидів/циклічних пептидів та етамбутолу. Для визначення МС фенотипічним методом до офлоксацину, амікацину, капреоміцину та етамбутолу було застосовано рідке середовище в системі ВАСТЕС MGIT 960.

При наявності мутацій в генах, що відповідають за наявність стійкості до фторхінолонів, в рідкому середовищі лише 288 (90,6%) штамів *M.tuberculosis* мали МС до офлоксацину. Штами мікобактерій, в ДНК яких були виявлені мутації в генах, асоційованих з МС до аміноглікозидів/циклічних пептидів, в 299 (94,0%) випадках були стійкими до амікацину та в 302 (94,9%) випадках були стійкими до капреоміцину за результатами ТМЧ в системі ВАСТЕС MGIT 960. При визначенні МС для етамбутолу були виявлені найбільші розбіжності між результативністю молекулярно-генетичного і фенотипічного методів дослідження – лише 206 (64,2%) штамів *M.tuberculosis* були стійкими за результатами аналізу в системі ВАСТЕС MGIT 960. Таким чином, використання ДНК-стрипової технології для визначення мутацій в генах мікобактерій, що відповідають за МС до ПТП, обов'язково потребує паралельної постановки ТМЧ в рідкому середовищі для повної характеристики МС мікобактеріальної популяції.

Для здійснення діагностики випадків туберкульозу необхідними умовами є організація збору якісного інформативного матеріалу в достатній кількості, забезпечення відповідних умов зберігання та транспортування зразків до лабораторії 3-го рівня. Було розроблено лабораторний діагностичний алгоритм комплексного використання при виявленні *M.tuberculosis* і визначенні їх МС сучасних гено-фенотипічних систем (GeneXpert MTB/RIF, GenoType і ВАСТЕС MGIT 960), суть якого полягає в тому, що в лабораторіях 3-го рівня України, по-перше, в процесі індикації і ідентифікації *M.tuberculosis* комплекс досліджень з використанням гено-фенотипічних систем потрібно здійснювати з однієї проби отриманого мокротиння після передпосівної обробки з утвореного осаду; по-друге обґрунтований і запропонований об'єм лабораторних досліджень необхідно проводити залежно від клінічної категорії процесу та випадку захворювання на туберкульоз легень.

Дослідження щодо обґрунтування застосування систем GeneXpert і GenoType для досліджень зразків клінічного матеріалу пацієнтів із підозрою на туберкульоз та з встановленим клінічним діагнозом з різними клінічними категоріями показали наступне (табл. 3).

За допомогою двох молекулярних методів діагностики було підтверджено наявність ДНК *M. tuberculosis-complex* у 88,8% хворих з ВДТБ I-ої і у 81,4% хворих на РТБ II-ої категорій із позитивним мазком. В усіх випадках було також підтверджено життєздатність виділених мікобактерій за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960. У хворих II-ої категорії за допомогою лише генетичних систем було додатково виявлено наявність ДНК *M. tuberculosis* в 7,0% випадках, однак при цьому не спостерігалось росту мікобактерій в рідкому середовищі. Система GenoType дозволила виявити додатково 11,2% та 11,6% бактеріовиділювачів серед хворих I-ої та II-ої категорії відповідно. Життєздатність цих мікобактерій була підтверджена в рідкому середовищі. Однак у зв'язку з тим, що система GeneXpert не виявила позитивного результату при проведенні досліджень цих зразків, можна зробити припущення, що виявлені мікобактерії не належать до туберкульозного комплексу.

Виявлення наявності мікобактерій у зразках мокротиння з КСБ у хворих із різними клінічними категоріями захворювання на туберкульоз

Клінічні категорії захворювання	Результати діагностики						Всього го
	GeneXpert (+) GenoType(+) ВАСТЕС MGIT(+)		GeneXpert (+) GenoType(+) ВАСТЕС MGIT(-)		GeneXpert (-) GenoType(+) ВАСТЕС MGIT(+)		
	абс	М ± m	абс	М ± m	абс	М ± m	абс
I	522	88,8 ± 1,3*	0	0	66	11,2 ± 1,3*	588
II	210	81,4 ± 2,4**	18	7,0 ± 1,5**	30	11,6 ± 2,0**	258
Всього	732	86,5 ± 1,2	18	2,1 ± 0,5	96	1,4 ± 1,1	846

Примітки:

1. * – $p < 0,001$ при порівнянні показників діагностичної ефективності молекулярно-генетичних і фенотипічних методів у хворих I-ої категорії;
2. ** – $p < 0,001$ при порівнянні показників діагностичної ефективності молекулярно-генетичних і фенотипічних методів у хворих II-ої категорії;
3. (+) – наявність мікобактерій, (-) – відсутність мікобактерій.

За допомогою системи GeneXpert було підтверджено наявність ДНК *M. tuberculosis-complex* у 59,4% хворих з ВДТБ I-ої, II-ої та III-ої категорії з негативним мазком, при цьому в усіх випадках було також підтверджено життєздатність виділених мікобактерій за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960. Найбільша ефективність застосування системи GeneXpert виявилась у хворих II-ої категорії – 80,0%. Дуже важливим є факт підтвердження бактеріовиділення в 31,3% випадків у хворих III-ої категорії, які мають завжди негативний результат бактеріоскопії, що унеможливорює швидке виявлення бактеріовиділювачів серед хворих даної клінічної категорії.

Таким чином, застосування систем GeneXpert і GenoType показали високу ефективність виявлення бактеріовиділювачів серед хворих як з позитивними, так і з негативними результатами мазку мокротиння на КСБ. На підставі отриманих даних обґрунтовано застосування систем GenoType і GeneXpert для досліджень клінічного матеріалу пацієнтів з підозрою на туберкульоз та хворих з встановленим клінічним діагнозом залежно від клінічної категорії захворювання.

ВИСНОВКИ

В роботі вирішено актуальне наукове завдання сучасної мікробіології – підвищено ефективність лабораторної діагностики туберкульозу, стандартизовано виділення мікобактерій з визначенням їх медикаментозної стійкості у хворих на туберкульоз легень в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960, обґрунтовано її використання в комбінації з новими молекулярно-генетичними системами для швидкої діагностики туберкульозної інфекції GeneXpert MTB/RIF і GenoType, розроблено алгоритм лабораторної діагностики і визначення чутливості до протитуберкульозних препаратів *M. tuberculosis*.

1. Використання модифікованого щільного середовища для

субкультивування позитивних зразків після вирощування в системі ВАСТЕС MGIT 960 дозволяє скоротити середню тривалість субкультивування позитивних культур у 1,8 рази, тобто на 7,4 доби; середню тривалість виділення мікобактерій в 1,3 рази. Діагностична ефективність виділення культур мікобактерій в системі ВАСТЕС MGIT 960 складає 92,1%, що достовірно перевищує діагностичну ефективність методу посіву на щільне середовище Левенштейна-Єнсена: середня тривалість росту культур в рідкому середовищі складає 11,5 діб, що в 3,1 рази менше за терміни культивування збудника туберкульозу на класичному щільному середовищі.

2. Культивування зразків клінічного матеріалу від хворих з різними клінічними категоріями захворювання на туберкульоз за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960 дозволяє виявити додатково в середньому 18,2% бактеріовиділювачів у порівнянні з класичним культуральним методом діагностики. Використання рідкого середовища доцільно в першу чергу для пацієнтів I-ої клінічної категорії, у яких бактеріовиділення додатково виявляють в 22,5% випадків. Використання рідкого середовища доцільно для визначення бактеріовиділювачів з діагнозом вперше діагностований туберкульоз легень, у яких додатково виявляється в середньому 22,1% випадків; для діагностики рецидивів туберкульозу, при цьому в середньому виявляється додатково 19,4% бактеріовиділювачів та при обстеженні пацієнтів, що знаходяться в контакті з хворими на мультирезистентний туберкульоз, додатково виявляється 28,8% бактеріовиділювачів. Доцільним є використання рідкого середовища для діагностики туберкульозу у дітей, тому що культивування в системі ВАСТЕС MGIT 960 дає можливість виявити *M. tuberculosis* у 13,6 % дітей з клінічним діагнозом «туберкульоз», що майже у 2,7 разів більше, ніж діагностика бактеріовиділення у дітей на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена, яка була ефективною лише у 5,5% випадків.

3. Визначення “критичних” концентрацій препаратів 2-го ряду – етіонаміду (5,0 мкг/мл), капрпеоміцину (2,5 мкг/мл), офлоксацину (2,0 мкг/мл), амікацину (1,0 мкг/мл), моксифлоксацину (0,5 мкг/мл), левофлоксацину (2,0 мкг/мл), піразинаміду (2,5 мкг/мл) і резервного ряду – лінезоліду (1,0 мкг/мл) при використанні їх для тесту медикаментозної чутливості в рідкому середовищі із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960 дозволяє вперше в Україні розробити стандартну методику визначення медикаментозної стійкості *M. tuberculosis* в системі ВАСТЕС MGIT 960 до препаратів 2-го ряду і резервного препарату – лінезоліду.

4. Застосування систем GeneXpert MTB/RIF, GenoType і ВАСТЕС MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень за діагностичною цінністю переважає класичний бактеріологічний метод дослідження хворих на туберкульоз легень і пацієнтів з підозрою на туберкульоз. Ефективність комбінованого застосування систем GeneXpert MTB/RIF і ВАСТЕС MGIT 960 при діагностиці випадків МРТБ складає 93,7%, що дає підстави використовувати дані системи для швидкої діагностики, насамперед, випадків мультирезистентного туберкульозу. Обґрунтовано застосування молекулярно-генетичних систем GenoType і GeneXpert MTB/RIF для досліджень клінічного матеріалу пацієнтів з підозрою на туберкульоз та хворих з встановленим клінічним діагнозом залежно

від клінічної категорії захворювання на підставі того, що вони дозволяють додатково виявити 11,2% та 11,6% бактеріовиділювачів серед хворих I-ої та II-ої категорій відповідно.

5. Розроблено лабораторний діагностичний алгоритм комплексного використання при виявленні *M. tuberculosis* і визначенні їх медикаментозної стійкості сучасних гено-фенотипічних систем (GeneXpert MTB/RIF, GenoType і ВАСТЕС MGIT 960), суть якого полягає в тому, що в лабораторіях 3-го рівня України, по-перше, в процесі індикації і ідентифікації *M. tuberculosis* комплекс досліджень з використанням гено-фенотипічних систем потрібно здійснювати з однієї проби отриманого мокротиння після передпосівної обробки з утвореного осаду; по-друге, обґрунтований і запропонований об'єм лабораторних досліджень необхідно проводити залежно від клінічної категорії процесу та випадку захворювання на туберкульоз легень.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Необхідним є впровадження запропонованих та стандартизованих нами мікробіологічних методик, оскільки вони дозволяють підвищити рівень виділення мікобактерій та визначення їх медикаментозної стійкості до протитуберкульозних препаратів. Застосування модифікованих методик дозволяє забезпечити стандартизацію постановки ТМЧ в рідкому середовищі із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960 в Україні.

2. Обґрунтованим є застосування молекулярно-генетичних методів діагностики туберкульозу в мережі лабораторій ПТЗ України. Доцільним є комплексне використання фено-генотипічних методів дослідження в лабораторіях 3 рівня, тобто на рівні обласних ПТЗ України.

3. Створений алгоритм використання систем GeneXpert і GenoType з сучасним бактеріологічним методом з використанням рідкого середовища в системі ВАСТЕС MGIT 960, слід широко використовувати в практиці роботи бактеріологічних лабораторій ПТЗ України. Алгоритм гено-фенотипічної діагностики туберкульозу регламентований Наказом МОЗ України № 620 від 04.09.2014 р. Встановлені основні підходи до створення і функціонування системи управління якістю досліджень в лабораторіях, що здійснюють мікробіологічну діагностику туберкульозу (Регламентовано Наказом МОЗ України № 786 від 28.07.2016 р.).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Порівняльна характеристика якості життя та стану здоров'я хворих інфільтративним туберкульозом легень в динаміці на різних етапах медичної реабілітації / Ю.П. Цапенко, М.Г. Бойко, О.О. Краєвська, Н.М. Алієва, Ю.О. Красношарпа // Світ медицини та біології. – 2012. – № 3. – С. 112–115. (Здобувачем проведено дослідження клінічного матеріалу).

2. Барбова А.І. Використання нової молекулярно-генетичної системи GeneXpert і рідкого живильного середовища в системі ВАСТЕС MGIT для швидкої діагностики туберкульозу / А.І. Барбова, О.А. Журило, Н.М. Алієва // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика. – 2015. – С. 423–430.

(Здобувачем проведено дослідження клінічного матеріалу на наявність мікобактерій туберкульозу, аналіз та узагальнення результатів).

3. Експериментальні дослідження по підвищенню ефективності виділення мікобактерій з клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень з використанням рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 / А.І. Барбова, О.А., Журило, Н.М. Алієва, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко // Український пульмонологічний журнал. – 2015. – № 3. – С. 56–60. *(Здобувачем проведено дослідження клінічного матеріалу на наявність мікобактерій туберкульозу, аналіз та узагальнення результатів).*

4. Використання нової молекулярно-генетичної системи GenoType і рідкого живильного середовища для швидкої діагностики туберкульозу / А.І. Барбова, Л.В. Гайова, О.А. Журило, П.С. Трофімова, Н.М. Алієва // Scientific J. «ScienceRise». – 2015. – № 10/3 (15). – С. 29–37. *(Здобувачем проведено дослідження клінічного матеріалу, аналіз та узагальнення результатів).*

5. Варіанти моно- і полірезистентності МБТ до протитуберкульозних препаратів 1 ряду у хворих з новими і повторними випадками туберкульозу / А.І. Барбова, С.О. Черенько, Г.В. Старичек, О.В. Аврамчук, М.В. Погребна, Н.М. Алієва // Туберкульоз. Легеневі хвороби. ВІЛ-інфекція. – 2016. – № 1. – С. 23–26. *(Підібрала літературу за проблемою публікації, опрацювала результати).*

6. Визначення критеріїв резистентності M.tuberculosis до препаратів 2-го і резервного ряду за допомогою рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі ВАСТЕС MGIT 960 / А.І. Барбова, О.А. Журило, Н.М. Алієва, Л.М. Сладкова // Український пульмонологічний журнал – 2017. – № 1. – С. 47–52. *(Здобувачем проведено дослідження на визначення критеріїв резистентності МБТ).*

7. Пат. 99799 Україна, МПК⁹ С 12 N 1/02, С 12 Q 1/02. Спосіб визначення чутливості M.tuberculosis до протитуберкульозних препаратів в дослідному матеріалі хворих на туберкульоз легень / Журило О.А., Барбова А.І., Алієва Н.М., Трофімова П.С., Миронченко С.В.; заявник і патентовласник ДУ «Націонал. ін.-т фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМНУ». – № u 201414019; заявл. 29.12.14; опубл. 25.06.15, Бюл. № 12. – 1 с. *(Здовувач самостійно провела експериментальні дослідження).*

8. Спосіб визначення чутливості M.tuberculosis до протитуберкульозних препаратів в дослідному матеріалі хворих на туберкульоз легень: інформаційний лист / О.А. Журило, А.І. Барбова, Н.М. Алієва, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко; НІФП ДУ НАМН України. – К.: НІФП, 2015. – 4 с. *(Здовувач самостійно провела експериментальні дослідження).*

9. Алгоритм бактеріологічного обстеження на туберкульоз внутрішньо переміщених осіб з регіонів із високою захворюваністю туберкульозом та біженців з тимчасово окупованих територій України: інформаційний лист / А.І. Барбова, О.А. Журило, Н.М. Алієва, Н.А. Рохманова; НІФП НАМН України. – К.: НІФП, 2015. – 4 с. *(Здобувач приймала участь в розробці алгоритму бактеріологічного обстеження хворих на туберкульоз).*

10. Критерій резистентності мікобактерій туберкульозу до канаміцину в рідкому живильному середовищі Міддлбрук 7H9 в системі ВАСТЕС 960:

інформаційний лист / О.А. Журило, А.І. Барбова, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко, Н.М. Алієва; НІФП НАМН України. – К.: НІФП, 2015. – 4 с. *(Здобувачем проведено дослідження на визначення критерію резистентності МБТ до канаміцину).*

11. Стратегічні напрями розвитку лабораторної діагностики туберкульозу в Україні / Ю.І. Феценко, О.А. Журило, А.І. Барбова, О.Э. Хейло, О.Р. Сметаніна, М.М. Карнаухова, Н.А. Гріцова, Н.М. Алієва. – К.: ВСВ «Медицина», 2017. – 120 с. *(Здобувачем створено підґрунтя для використання в Україні сучасних генотипічних підходів до діагностики туберкульозу).*

12. Частота первинної медикаментозної резистентності мікобактерій туберкульозу у хворих на вперше діагностований деструктивний туберкульоз легень в Полтавській області / А.Г. Ярешко, А.К. Вородюхіна, Н.М. Алієва, Ю.В. Визір // XIII Конгрес Світової Федерації українських лікарських товариств: тез. доп. – Львів, 2010. – С. 269. *(Здобувач особисто проаналізувала розповсюдженість МС штамів МБТ, провела статистичну обробку та аналіз одержаних результатів).*

13. Динаміка частоти та профілю медикаментозної резистентності мікобактерій туберкульозу у хворих на вперше діагностований туберкульоз легень в Полтавській області / А.Г. Ярешко, М.Г. Бойко, М.В. Куліш, А.К. Вородюхіна, Н.М. Алієва // Матеріали V з'їзду фтизіатрів і пульмонологів України. – Київ, 2013. – С. 250. *(Здобувач самостійно здійснила огляд літератури за проблемою публікації та підготувала матеріали до публікації).*

14. Ефективність комплексного застосування генотипових та фенотипових методів бактеріологічної діагностики туберкульозу / О.А. Журило, А.І. Барбова, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко, Н.М. Алієва, І.В. Дідик // V міжнародний медичний конгрес «Впровадження сучасних досягнень у практику охорони здоров'я України»: Тез. доп. – Київ, 2016. – С.19. *(Здобувач самостійно опрацювала результати досліджень).*

15. Епідеміологічний нагляд за медикаментозною стійкістю збудника туберкульозу в Україні / А.І. Барбова, О.А. Журило, П.С. Трофімова, С.В. Миронченко, Н.М. Алієва // V міжнародний медичний конгрес «Впровадження сучасних досягнень у практику охорони здоров'я України»: Тез. доп. – Київ, 2016. – С.10–11. *(Здобувач самостійно опрацювала результати досліджень).*

АНОТАЦІЯ

Алієва Н.М. Виявлення *M.tuberculosis* і визначення їх медикаментозної стійкості в умовах використання нових фенотипічних методів. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2017.

Дисертація присвячена практичному обґрунтуванню та новому вирішенню однієї з актуальних задач сучасної мікробіології – підвищенню ефективності діагностики туберкульозу, стандартизації виділення мікобактерій і визначення їх медикаментозної стійкості у хворих на туберкульоз легень в рідкому живильному

середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960 та обґрунтуванню комбінованого використання її з новими молекулярно-генетичними системами для швидкої діагностики туберкульозної інфекції.

Підвищена ефективність виділення мікобактерій з клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень в рідкому живильному середовищі за рахунок використання модифікованого щільного живильного середовища для субкультивування позитивних зразків після вирощування в системі ВАСТЕС MGIT 960.

Визначено “критичні” концентрації препаратів 2-го ряду і резервного препарату лінезоліду при використанні їх для тесту медикаментозної чутливості в рідкому середовищі із застосуванням системи ВАСТЕС MGIT 960, що дозволило розробити стандартну методику визначення медикаментозної стійкості *M. tuberculosis* з використанням рідкого живильного середовища до цих препаратів, яка впроваджена в роботу бактеріологічних лабораторій 3 рівня мережі протитуберкульозних закладів України.

Доведено, що перспективним є впровадження в лабораторну практику молекулярно-генетичних систем GeneXpert і GenoType. Обґрунтовано комбіноване застосування систем GeneXpert, GenoType і ВАСТЕС MGIT 960 для досліджень клінічного матеріалу хворих на туберкульоз легень і запропонований діагностичний алгоритм їх комплексного використання при виявленні мікобактерій туберкульозу.

Ключові слова: туберкульоз, *M.tuberculosis*, мультирезистентність, генотипічна діагностика туберкульозу, прискорена діагностика туберкульозу.

АННОТАЦІЯ

Алиева Н.Н. Выявление *M.tuberculosis* и определение их лекарственной устойчивости в условиях использования новых фено-генотипических методов. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.07 – микробиология. – Винницкий национальный медицинский университет имени М. И. Пирогова МЗ Украины, Винница, 2017.

Диссертация посвящена обоснованию и новому решению одной из актуальных задач современной микробиологии – повышению эффективности лабораторной диагностики туберкулеза путем стандартизации выделения микобактерий и определения их лекарственной устойчивости в жидкой питательной среде в системе ВАСТЕС MGIT 960 и обоснования комбинированного использования её с новыми молекулярно-генетическими системами для быстрой диагностики туберкулезной инфекции.

Повышена эффективность выделения микобактерий из клинического материала больных туберкулезом легких в жидкой питательной среде за счет использования модифицированной плотной питательной среды для субкультивирования положительных образцов после культивирования в системе ВАСТЕС MGIT 960.

Определены «критические» концентрации препаратов 2-го ряда и резервного препарата линезолида при использовании их для теста лекарственной

чувствительности в жидкой среде в системе BACTEC MGIT 960, что позволило разработать стандартную методику для определения лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* с использованием жидкой питательной среды к этим препаратам, которая внедрена в работу бактериологических лабораториях 3 уровня сети противотуберкулезных учреждений Украины.

Доказана перспективность внедрения в лабораторную практику молекулярно-генетических систем GeneXpert и GenoType. Обосновано комбинированное использование систем GeneXpert, GenoType и BACTEC MGIT 960 для исследования клинического материала больных туберкулезом легких и предложен диагностический алгоритм их комплексного использования для выявления микобактерий.

Ключевые слова: туберкулез, *M.tuberculosis*, мультирезистентность, гено-фенотипическая диагностика туберкулеза, ускоренная диагностика туберкулеза.

SUMMARY

Aliieva N. M. Identification of *M.tuberculosis* and determination of drug resistance under the conditions of use of the new phenotype- genotypic methods. – Manuscript.

Dissertation for the scientific degree of the candidate of medical sciences, speciality 03.00.07 – microbiology. – – National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsya, 2017.

Dissertation is devoted to the justification and the new decision of one of the urgent tasks of modern microbiology – to increasing of the effectiveness of laboratory diagnosis of tuberculosis by standardizing of the isolation of mycobacteria and determining their drug resistance in a liquid medium in the BACTEC MGIT 960 system and justification of the combined use of it with a new molecular genetic systems for rapid diagnosis TB infection.

The efficiency of isolation of mycobacteria from clinical specimens of patients with pulmonary tuberculosis in a liquid medium was raised through the use of the modified dense nutrient medium for subculturing of positive samples after their culture in BACTEC MGIT 960 system.

A "critical" concentrations of second row remedies and reserved drug –linezolid were established when used for DST in a liquid medium in BACTEC MGIT 960 system that allowed to develop a standard methodology for determining the DR of *M. tuberculosis* using liquid medium to these drugs, which was introduced in the work of the bacteriological laboratory of level 3 in the network TB institutions of Ukraine.

Benefits of the introduction into laboratory practice of molecular genetic systems GeneXpert and GenoType was proved. The combined using of GeneXpert systems, GenoType and BACTEC MGIT 960 was shown for study of clinical material from patients with pulmonary tuberculosis and proposed diagnostic algorithm of their complex using for the detection of mycobacteria.

Key words: tuberculosis, *M.tuberculosis*, multidrug resistance, geno-phenotypic diagnostics of tuberculosis, rapid diagnosis of tuberculosis.

Підписано до друку 16.08.2017 р. Замовл. № 318
Формат 60x90 1/16. Ум. друк. арк. 0,9. Друк офсетний.
Наклад 100 примірників.

Вінниця. Друкарня ВНМУ ім. М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56.

