

УДК 612.2

# ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА РЕЗИСТЕНТНИХ ФОРМ ТУБЕРКУЛЬОЗУ – ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

*Мотроненко Валентина Василівна*

[motronenko.valentyina@iit.kpi.ua](mailto:motronenko.valentyina@iit.kpi.ua)

*Власюк Тетяна Олександрівна*

[vlasjuk.tania@iit.kpi.ua](mailto:vlasjuk.tania@iit.kpi.ua)

Кафедра трансляційної медичної біоінженерії

Національний технічний університет України

«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

м. Київ, Україна

*Реферат* – Туберкульоз (ТБ) є однією із основних причин захворюваності та смертності у всьому світі. Поява хіміорезистентного туберкульозу, вважається серйозною загрозою для глобальної боротьби з ТБ, тому що поширення лікарсько-стійких форм туберкульозу збільшує навантаження на системи охорони здоров'я та підвищує ступінь небезпеки для громадян, а також сприяє виникненню нових епідемічних воєнищ. Лікарська стійкість до нових та існуючих препаратів загрожує нещодавнім досягненням у лікуванні резистентного туберкульозу, а належне тестування на резистентність до цих препаратів практично недоступне. Тому ретельний аналіз та впровадження передових методів діагностики резистентного туберкульозу відіграють ключову роль у ефективному контролі даного захворювання. На сьогоднішній день для діагностики резистентного ТБ доступна низка лабораторних інструментів, включаючи методи на основі культуральних досліджень, методи з використанням технологій секвенування геному, а також молекулярні методи. Оптимальне та взаємодоповнювальне використання наявних діагностичних інструментів на різних рівнях багаторівневої мережі туберкульозних лабораторій, а також правильна інтерпретація наданих ними результатів діагностики мають вирішальне значення для точної та своєчасної діагностики хіміорезистентного туберкульозу, що забезпечує ефективне лікування та догляд пацієнтів. В роботі описано ключову інформацію з приводу сучасних методів діагностики резистентного туберкульозу, коротко викладені їх переваги та недоліки. В ході аналізу, було визначено основні проблеми існуючих методів, а саме: тривалість проведення досліджень, висока вартість, яка робить їх складнодоступними у регіонах з обмеженими ресурсами, недостатня чутливість до виявлення певних видів резистентності, складність у використанні та необхідність спеціалізованої кваліфікації для їх застосування. Таким чином створення простого у застосуванні, швидкого, точного та доступного методу є перспективним напрямом для подальших досліджень в даній області.

*Ключові слова* – діагностика, *Mycobacterium tuberculosis*, стійкість до ліків, туберкульоз, тестування на місці надання медичної допомоги.

## I. ВСТУП

Туберкульоз – це тяжке інфекційне захворювання, спричинене мікобактеріями (*Mycobacterium tuberculosis*), яке передається від людини до людини повітряно-крапельним шляхом. Туберкульоз зазвичай впливає на легені, але він також може впливати на інші частини тіла, такі як мозок, нирки або хребет. Іноді виникає туберкульоз із резистентністю до лікарських засобів, тобто мікобактерії стають стійкими до препаратів, що застосовуються для лікування туберкульозу. Це ускладнює процес лікування та підвищує

ризик подальшого поширення захворювання серед населення [1].

Незважаючи на зниження смертності від туберкульозу на 20 % з 2015 по 2020 рік, рівень поширеності резистентного туберкульозу зростає, як серед нових, так і серед раніше вилікуваних випадків туберкульозу. Пандемія COVID-19 значною мірою звела нанівець багаторічні досягнення у галузі виявлення, оповіщення та боротьби з туберкульозом [2]. Більш того, близько 40 % з приблизно 10 мільйонів випадків туберкульозу в 2020 році не було діагностовано, головним чином через

глобальне скорочення доступу до діагностичних послуг по туберкульозу [2].

У зв'язку зі зростанням кількості випадків резистентного туберкульозу та його ускладненого лікування, дослідження та розробка ефективних методів діагностики стають критично важливими. Розуміння та аналіз доступних методів діагностики резистентного туберкульозу є необхідним для вдосконалення та оптимізації лікування цієї хвороби. Виявлення швидких, точних та надійних способів діагностики резистентного туберкульозу відіграє важливу роль у стратегіях контролю та подальшого запобігання поширенню цієї небезпечної хвороби [1].

Таким чином, можна стверджувати, що дослідження різноманітних методів діагностики резистентного туберкульозу є актуальною та нагальною темою в сучасній медицині.

## II. МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Мета даної роботи полягає у аналізі існуючих методів діагностики резистентного туберкульозу.

## III. ДІАГНОСТИКА НА МІСЦІ

З 2007 року ВООЗ схвалила кілька нових тестів і діагностичних підходів, у тому числі:

- рідкий посів зі швидким видоутворенням, як еталонний стандарт для бактеріологічного підтвердження;
- аналізи на основі молекулярних зондів для швидкої діагностики мультирезистентного туберкульозу (Hain Lifescience LPA);
- некомерційні методи дослідження культури та чутливості до медичних препаратів;
- світлодіодні флуоресцентні мікроскопи;
- тести ампліфікації нуклеїнової кислоти (ПЛР-тести) для швидкої та одночасної діагностики туберкульозу та резистентності до рифампіцину [3].

У випадках із підозрою на позалегеновий туберкульоз (ПТБ) обов'язковий забір матеріалу з органу-мішені. Тести без мокротиння необхідні, зокрема, для діагностики ПТБ, у людей, які живуть із ВІЛ, та у дітей. Тест на ліпоарабіноманнан (LAM) наступного покоління демонструє кращу ефективність порівняно з оригінальними тестами LAM, але не виявляє резистентності до протитуберкульозних препаратів [19].

Зовсім недавно з'явився Deeplex Muc-TB (Genoscreen) – це безкультуральний аналіз, заснований на цілеспрямованому глибокому секвенуванні, який здатний надати інформацію про резистентність до 15 протитуберкульозних препаратів протягом 48 годин. Deeplex має 3% чутливість для виявлення гетерорезистентності, а також здатний ідентифікувати нетуберкульозні мікобактерії. Незважаючи на цей прогрес, точний і швидкий тест на лікарсько-стійкий туберкульоз, який можна було б використовувати в польових умовах, досі недоступний, що свідчить про те, що потрібні додаткові зусилля для перетворення цих часто складних лабораторних технологій на надійні, точні та економічно ефективні програми швидкої діагностики туберкульозу [4].

## IV. ПОВНОГЕНОМНЕ СЕКВЕНУВАННЯ

В даний час наявні тести на ампліфікацію нуклеїнових кислот, які виявляють конкретні ділянки геному туберкульозу для виявлення ймовірної резистивності до лікарських засобів, але постійно виникають нові мутації.

Секвенування повного генома (WGS) має можливість ідентифікувати всі генетичні мутації у зразку, але використання такої технології потрібно вдосконалити, перш ніж її можна буде застосувати в діагностичних умовах [5]. Тестування WGS необхідно проводити безпосередньо на мокротинні у дешевій, швидкій та доступній формі, але досі не повідомлялося про подібну методику, яку можна було б застосувати на програмному рівні [6]. Додатковим міркуванням є те, що

використання WGS для прийняття клінічних рішень вимагає точної інформації про кореляції генотипу та фенотипу. За відсутності остаточної інформації з цього приводу, швидше за все, знадобиться поєднання генотипових і фенотипічних підходів. Альтернативою WGS є цільове секвенування, в якому також використовуються технології нового покоління для отримання інформації про локуси лікарської стійкості безпосередньо з клінічних зразків. Технології секвенування геному, що ґрунтуються на цільовому секвенуванні наступного покоління, демонструють ранній потенціал для пом'якшення деяких проблем у майбутньому. Незважаючи на те, що ця методика надає простіші дані, ніж WGS, вона має здатність виявляти низькочастотні варіанти [6].

## V. КУЛЬТИВУВАННЯ БАКТЕРІЙ

Основними обмеженнями традиційних методів культивування є повільний час обробки, неоптимальна чутливість та надмірно висока вартість використання автоматизованих систем на основі рідкого поживного середовища в ендемічних країнах. Отже, існує гостра потреба у вдосконаленні методів культурального дослідження для покращення діагностики, особливо в певних уразливих групах населення. Мікробіологічне підтвердження туберкульозу у людей, що живуть з ВІЧ (ЛЖВ) та дітей є складним через олігобацилярний характер перебігу захворювання. Збір зразків, таких як індуковане мокротиння або шлунковий аспірат у цих груп, є складним та інвазивним, часто з поганим діагностичним підтвердженням через обмежене вилучення бактерій. Було оцінено кілька нових підходів для покращення відновлення *M. tuberculosis* із таких зразків [7].

До них відноситься колориметричний аналіз середовища ТК (Salubris), який змінює колір з червоного на жовтий, що вказує на ранній позитивний ріст мікобактерій до появи видимих колоній бактерій, а також має

здатність для тестування на чутливість до ліків [8].

Аналіз чутливості до лікарських засобів під мікроскопом (MODS), в якому для тестування чутливості використовується інвертований світловий мікроскоп і глибинна культура Middlebrook 7H9, що містить протимікробні препарати для тестування на чутливість, здатний виявити ранній ріст мікобактерій у вигляді «ниточок і сплетень» бактеріальних клітин у середовищі за короткий час (в середньому 8 днів) порівняно з культурою Левенштейна-Йенсена. Через обмежену доступність середовищ MODS оцінка двох альтернативних культуральних середовищ (порошкових і ліофілізованих форм) показала еквівалентний ріст бактерій, що свідчить про те, що MODS можна застосовувати в умовах обмежених ресурсів [9].

Були розроблені комерційно доступні набори на основі бактеріофагів для виявлення мікобактерій та визначення стійкості до рифампіцину безпосередньо у зразках мокротиння протягом 2-3 днів. Хоча тести на основі ТК Medium, MODS та бактеріофагів є багатообіцяючими, практичними та недорогими інструментами, їхня користь для діагностики туберкульозу у дітей та ЛЖВ невідома [10].

Ефективність і точність діагностичних тестів на туберкульоз на основі культуральних досліджень базується на припущенні, що всі бактеріальні популяції однаково здатні культивуватись у стандартних діагностичних середовищах. Проте зростає кількість доказів, які вказують на те, що бактеріальні популяції приймають спектр фізіологічних станів, пов'язаних зі зміненою здатністю до культивування. Опис «життєздатних, але некультивованих» (VBNC) клітин *Vibrio cholerae* більше тридцяти років тому, є лише одним прикладом субпопуляції бактеріальних клітин, які не здатні рости на твердому середовищі, але можуть бути виявлені в рідких середовищах [11]. Клітини *M. tuberculosis*, що

демонструють таку ж поведінку, описані в літературі або як диференційно культивовані туберкульозні бактерії (DCTB), або як бактерії, що диференційно виявляються (DD). Відносну частку DCTB у зразку визначають кількісно, шляхом порівняння кількості культивованих бактерій у аналізах рідинно-лімітуючого розведення з кількістю бактерій, придатних для посіву на твердому середовищі [12].

Початкові описи цих клітин у мікобактерій були пов'язані з факторами, що сприяють оживленню (Rpfs), спочатку описаними у *Micrococcus luteus* як здатні сприяти оживленню сплячих бактерій. Існує п'ять генів Rpf у геномі *M. tuberculosis*, і було показано, що асоційовані білки, які присутні у культуральному фільтраті (CF) *M. tuberculosis*, активують ріст некультивованих бактерій [13]. У мокротинні хворих на ТБ були виявлені як залежні від рідких культур, так і популяції бактерій, придатні для посіву, у тому числі популяції DCTB, які можна класифікувати як залежні від CF та незалежні від CF. Крім того, ідентифікація субпопуляції бактерій, здатних рости з муковісцидозом від мутанта *M. tuberculosis* без Rpfs, свідчить про участь інших факторів стимуляції росту. Окремо цАМФ і жирні кислоти, здається, не приносять жодних переваг у вилученні DCTB із зразків мокротиння, на відміну від їх ефективності в моделі *in vitro*. Присутність цих диференційовано культивованих організмів у клінічних зразках передбачає, що підходи до посилення їхнього зростання можуть забезпечити більшу діагностичну точність. Дійсно, використання CF та Rpfs дозволяє виявити життєздатні *M. tuberculosis* у клінічних зразках із негативними результатами за допомогою стандартних тестів. Крім того, включення CF також є корисним для виявлення DCTB у негативних культуральних зразках від ЛЖВ [13].

Нещодавно *M. tuberculosis* було виявлено в субпопуляції негативних культуральних клінічних зразків з використанням середовищ,

багатих ліпідами, замість стандартних середовищ на основі гліцерину. Було показано, що популяції DCTB у мокротинні стійкі до низки протитуберкульозних препаратів. Кількість DCTB у зразках мокротиння збільшилася після перших двох тижнів лікування туберкульозу або через те, що антибіотики збільшили кількість цих бактерій у зразках, або за рахунок стимуляції утворення нових DCTB. Однак у пацієнтів з лікарсько-стійким туберкульозом частка DCTB не змінилася суттєво після двох тижнів лікування, можливо, як наслідок призначених схем лікування, які виключали рифампіцин [14].

Наявність супутніх інфекцій, таких як ВІЛ, необхідно враховувати при діагностиці та лікуванні пацієнтів із клінічними проявами туберкульозу. ЛЖВ та ТБ із кількістю CD4 >200 клітин/мл мають більшу ймовірність виявляти вищі рівні CF-залежного DCTB, ніж люди з кількістю CD4 < 200 клітин/мл, що свідчить про те, що імунна система господаря впливає на виробництво цих диференціально культивованих бактерій. Було показано, що DCTB присутні в мокротинні осіб, які клінічно вилікувалися від туберкульозу. Ці дані підкреслюють, що множинні діагностичні тести, що враховують бактеріальну фенотипову різноманітність у мокротинні, ймовірно, необхідні для забезпечення достовірної оцінки показників бактеріологічного лікування, що є особливо важливим під час обговорення можливих змін тривалості лікування. Припинення прийому протитуберкульозних препаратів, коли здається, що людина вилікувалась, а потім відновлення лікування після рецидиву захворювання створює ідеальні умови для появи стійких до ліків бактеріальних популяцій [15].

## VI. ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМИ ГЕТЕРОРЕЗИСТЕНТНОСТІ

Гетерорезистентність виникає у випадку, коли лише субпопуляція бактерій демонструє

фенотип резистентності або якщо кілька генотипів резистентності зустрічаються разом. Це явище часто є нестабільним, у результаті чого вищі значення мінімальної інгібуючої концентрації препарату (МІК) є тимчасовими, і їх важко оцінити послідовно. Діагностичне тестування таких змішаних інфекцій може ідентифікувати лише один штам, що призведе до лікування невідповідними препаратами, які в підсумку призводять до відбору мультирезистентних штамів [16].

Є спірні дані про те, як гетерорезистентність впливає на результати лікування: деякі дослідження показують погані результати, тоді як інші не виявляють зв'язку. Розробка алгоритмів глибокого секвенування для ідентифікації меншинних генотипів штамів при змішаних інфекціях буде важливою для ранньої діагностики гетерорезистентності. Щоб визначити, чи сприятиме це кращому лікуванню пацієнтів, знадобляться розширені клінічні дослідження, які мають бути пріоритетними, оскільки гетерорезистентність залишається явною та реальною загрозою для ліквідації стійкого до ліків туберкульозу [17].

## VII. МОЛЕКУЛЯРНА ДІАГНОСТИКА

Молекулярна діагностика для виявлення комплексів мікобактерій туберкульозу та прогнозування лікарської стійкості, запроваджена в останнє десятиліття, прискорила діагностику туберкульозу із покращенням виявлення випадків захворювання. Тим не менш, доступ і охоплення тестуванням на стійкість до ліків залишаються недостатніми [18].

ВООЗ рекомендує використовувати швидкі молекулярні тести для діагностики мультирезистентного туберкульозу з 2015 року. Сучасні молекулярні платформи забезпечують скринінг ДНК комплексу *Mycobacterium tuberculosis* та стійкості до рифампіцину в рамках одного аналізу. Xpert MTB/RIF отримав схвалення ВООЗ у 2014 р. Цей аналіз зробив революцію в скринінгу за

часом до отримання результату та підтвердження резистентного до рифампіцину туберкульозу [20]. Наступні кроки в еволюції молекулярних тестів передбачали зниження межі виявлення (Xpert MTB/RIF Ultra) та оцінку додаткових генів, пов'язаних із резистентністю, а також покращення діагностики туберкульозу у дітей. Лінійні зондові аналізи для виявлення резистентності проти туберкульозних препаратів наразі замінюються генними масивами, відповідно, методами на основі секвенування наступного покоління (NGS), такими як Deeplex Мус-туберкульоз [21]. Крім того, існує ширша пропозиція автоматизованих швидких ПЛР-аналізів у реальному часі для прямого виявлення туберкульозу та його резистентності до ліків. ВООЗ і Фонд інноваційної нової діагностики розробили набір профілів цільових продуктів, якими можна керуватися при розробці нових засобів діагностики туберкульозу [20]. Підхід, орієнтований на пацієнта, повинен спонукати до швидкої клінічної оцінки та раннього лабораторного діагностичного тестування. Усі пацієнти з туберкульозом повинні пройти оцінку ризику щодо лікарської резистентності на основі епідеміологічних даних та анамнезу. Діагностичне обстеження включає молекулярне тестування за місцем надання медичної допомоги для скринінгу на туберкульоз та стійкість до рифампіцину. При виявленні стійких до рифампіцину *M. tuberculosis* рекомендується додаткове модульне тестування препаратів першого та другого ряду. Новий Xpert MTB/XDR перевіряє мутації, що призводять до резистентності до ізоніазиду, фторхінолонів, етіонаміду та аміноглікозидів, і може запропонувати першу надійну оцінку профілю сприйнятливості інфекційного агента. У глобальному масштабі підтверджуючі тести з використанням глибинної культури мікобактерій, ідентифікації бактерій і фенотипового тестування на чутливість до лікарських засобів (pDST) можуть

проводиться переважно в національних і наднаціональних референс-лабораторіях. Сучасна рDST використовує метод пропорції критичної концентрації ліків BOO3, який можна виконувати в напівавтоматичних приладах, таких як MGIT 960. Альтернативні методи тестування з використанням мікророзведення культуральної рідини впроваджуються в різних наднаціональних лабораторіях, які створюють кількісні профілі чутливості, особливо для антибіотиків, які нещодавно увійшли в терапевтичний арсенал, такі як бедаквілін, даламанід і претоманід [22].

Еталонний метод EUCAST для визначення мінімальної інгібуючої концентрації для *M. tuberculosis* є методом мікророзведення культуральної рідини в середовищі Middlebrook 7H9–10% OADC (олеїновий альбумін-декстроза-каталаза). МІК, виражена в мг/л, є найменшою концентрацією, що пригнічує видиме зростання. В даний час встановлюються епідеміологічні пороги для терапевтично використовуваних препаратів для отримання даних для клінічних порогів. Окрім рDST, у різних центрах запускається визначення резистентності на основі секвенування. BOO3 нещодавно опублікувала каталог мутацій *M. tuberculosis* та їх зв'язку з фенотиповою стійкістю до ліків [23]. Каталог є довідковим стандартом для інтерпретації мутацій, що надають стійкості до всіх препаратів першого ряду та різних препаратів другого ряду. У звіті узагальнюється аналіз понад 38 000 ізолятів із зіставленими даними повногеномного секвенування та тестування рDST з більш ніж 40 країн для 13 препаратів проти *M. tuberculosis*. У ньому перераховано понад 17 000 мутацій, їх частоту та зв'язок з резистентністю, включаючи використані методи, виявлені мутації та резюме важливих результатів для кожного препарату. Діагностика NGS у поєднанні з біоінформаційними конвеєрами для аналізу генетичних даних може точно передбачити стійкість до ліків від туберкульозу та стане

новим стандартом для виявлення стійкості та терапевтичних рекомендацій [24].

## VIII. ЗНАЧЕННЯ НАСЛІДКІВ ЕВОЛЮЦІЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ

Оскільки багато країн переходять до методів на основі генома, таких як інструменти на основі молекулярної ПЛР (наприклад, Xpert MTB/RIF), і поступово до цільового секвенування та секвенування повного геному (WGS) для діагностики інфекції *M. tuberculosis* та виявлення резистентності до ліків, важливо усвідомлювати наслідки еволюції резистентності. Наразі розуміння мутацій, що викликають резистентність, обмежене, особливо щодо нових ліків, незважаючи на останні великі глобальні дослідження. Найяскравіший приклад цільового молекулярного інструменту, що створює власний селективний тиск, був продемонстрований в Есватині, де неканонічна мутація, що надає стійкості до рифампіцину, *rpoB I491F*, яка виходить за межі визначальної області резистентності до рифампіцину, стала домінуючою [25].

Вперше це було виявлено після дослідження лікарської стійкості, проведеного в Есватині в 2009 р., яке виявило напрочуд високий рівень MDR-ТБ (7,7 % у раніше невиліковних пацієнтів та 33,8 % у раніше вилікованих пацієнтів). Xpert MTB/RIF був запроваджений у 2012 р. для швидкої діагностики MDR-ТБ, але у 2015 р. докладний генетичний та фенотипний аналіз штамів, збережених у ході дослідження 2009 р., показав, що 30 % резистентності до рифампіцину насправді були викликані мутацією *rpoB I491F*, яка не ідентифікована Xpert MTB/RIF, тому такі штами будуть вважатися сприйнятливими до рифампіцину. Таким чином, пацієнти, інфіковані такими штамми, лікувалися за допомогою неефективної стандартної чутливої до ліків схеми, для лікування їх стійкої до

рифампіцину інфекції. На момент проведення наступного дослідження лікарської стійкості у 2017 р. 56 % резистентності до рифампіцину були обумовлені мутацією I491F. З тих пір Національна програма боротьби з туберкульозом Есватині запропонувала передбачувано лікувати весь ізоніазид-резистентний туберкульоз як MDR-ТБ до завершення фенотипового тестування, оскільки більшість мутацій I491F присутні в ізоніазид-резистентних штаммах [25].

Резистентність до нових препаратів, таких як бедаквілін і деламанід, викликається багатьма рідкісними мутаціями, які не забезпечують статистичної достовірності кореляції генотип-фенотип, як це було зроблено для більшості препаратів першого ряду. Наприклад, у гені Rv0678, відповідальному за більшість клінічної резистентності до бедаквіліну, мутації поширені по всьому гену без чіткої точки резистентності. Крім того, не існує чіткого розподілу мінімальних інгібіторних концентрацій бедаквіліну між ізолятами дикого типу і резистентними ізолятами, що, ймовірно, ускладнить спроби класифікувати окремі мутації як сприйнятливі або резистентні, причому багато з них, ймовірно, виявляться поблизу критичної концентрації і будуть уразливими до технічних варіацій. Прагматичний підхід може полягати у використанні молекулярних або генетичних методів для скринінгу генів, пов'язаних зі стійкістю, на наявність варіантів, які рідко зустрічаються серед сприйнятливих ізолятів, з подальшою оцінкою фенотипу ізолятів, що містять мутанти [26].

## IX. ВИСНОВКИ

Незважаючи на сучасний рівень медицини та розвиток лікувальних методів, туберкульоз залишається однією з провідних причин смертності від інфекційних захворювань у всьому світі.

Хоч в даний час у процесі розробки протитуберкульозних препаратів знаходиться

низка перспективних нових ліків-кандидатів, їх вплив залишатиметься невизначеним, а ефективність доступних нині ліків залежить від обмеження поширення резистентності до них, тому найефективнішим способом боротьби з резистентним туберкульозом залишається вдосконалення існуючих та створення нових способів діагностики туберкульозу.

За останнє десятиліття відбулося кілька нових розробок у діагностиці та лікуванні лікарсько-стійкого туберкульозу, і цей прогрес продовжується. Методи швидкої молекулярної діагностики, що дозволяють виявляти як туберкульоз, так і його лікарську стійкість, стали широко доступними, та їхні можливості швидко розширюються. Так, молекулярні технології, такі як NGS, стають дедалі доступнішими та підтримуються схваленим ВООЗ довідковим каталогом та біоінформаційними системами. Проте культуральні методи досі залишаються золотим стандартом серед існуючих способів діагностики туберкульозу, але розробка і пошук більш доступних методів діагностики лікарсько-стійкого туберкульозу, які будуть наближені до золотого стандарту, продовжується.

Незважаючи на останні досягнення в діагностиці резистентного туберкульозу, сучасні методи досі мають ряд недоліків, які необхідно усунути, серед яких можна виділити кілька основних. Найважливішим недоліком є те, що більшість методів діагностики вимагають багато часу для отримання результатів, що може призвести до затримок у початку лікування та поширення інфекції. Також, існуючі методи діагностики залишаються дорогими та складнодоступними у регіонах з обмеженими ресурсами, а це обмежує їх широке застосування. Крім того, деякі методи є менш чутливими до виявлення певних видів резистентності, а це може призвести до помилкових діагнозів або пропуску резистентних форм. Також, багато існуючих діагностичних методів є складними

у використанні та вимагають спеціалізованої кваліфікації для їх застосування.

Подальші дослідження повинні зосередитись на покращенні точності та швидкості діагностики резистентного туберкульозу, а також на розробці більш доступних та простих у застосуванні методів, які будуть доступні для широкого кола пацієнтів у різних регіонах світу. Вкрай необхідно розробити швидкі діагностичні тести на місці надання медичної допомоги (Point-of-care testing, ПОС) для ранньої та швидкої діагностики *M. tuberculosis*. Дослідження у цій галузі можуть призвести до створення інноваційних та ефективних методів діагностики, що, у свою чергу, допоможе у своєчасному початку лікування та підбору відповідних схем лікування, а також контролю поширення резистентного туберкульозу.

**Фінансування.** Дане дослідження не отримувало зовнішнього фінансування.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**ORCID ID** та внесок авторів.

0000-0002-6122-4513 (А, В, С, D, E, F)

Motronenko Valentyna

0009-0004-8233-9186 (А, В, С, D, E)

Vlasiuk Tatiana

А – Концепція роботи та дизайн, В – аналіз даних, С – Відповідальність за статистичний аналіз, D – Написання статті, E – Критичний огляд, F – Остаточне схвалення статті.

## ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Туберкульоз: класифікація, визначення випадків туберкульозу. Електронний ресурс: <http://ftiziatri.org.ua/ftiziatrorgua/docsis/17.pdf>
2. World Health Organisation. Global tuberculosis report 2021; 2021.
3. World Health Organization (2021. b). WHO consolidated guidelines on tuberculosis. module 3: Diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection (Geneva: World Health Organization;).
4. Feuerriegel S., Kohl T. A., Utpatel C., Andres S., Maurer F. P., Heyckendorf J., et al. (2021). Rapid genomic first- and second-line drug resistance prediction from clinical

- Mycobacterium tuberculosis* specimens using deeplex-MycTB. Eur. Respir. J. 57, 2001796. doi: 10.1183/13993003.01796-2020
5. Katala B. Z., Mbelele P. M., Lema N. A., Campino S., Mshana S. E., Rweyemamu M. M., et al. (2020). Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates and clinical outcomes of patients treated for multidrug-resistant tuberculosis in Tanzania. BMC Genomics 21, 174. doi: 10.1186/s12864-020-6577-1
  6. Dookie N., Khan A., Padayatchi N., Naidoo K. (2022). Application of next generation sequencing for diagnosis and clinical management of drug-resistant tuberculosis: Updates on recent developments in the field. Front. Microbiol. 13, 775030. doi: 10.3389/fmicb.2022.775030
  7. Connell T. G., Zar H. J., Nicol M. P. (2011). Advances in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV-infected and HIV-uninfected children. J. Infect. Dis. 204 Suppl 4, S1151–S1158. doi: 10.1093/infdis/jir413
  8. Kocagoz T., Altin S., Turkyilmaz O., Tas I., Karaduman P., Bolaban D., et al. (2012). Efficiency of the TK culture system in the diagnosis of tuberculosis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 72, 350–357. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.12.004
  9. Sheen P., Rodriguez J., Alcantara R., Vargas J., Grandjean L., Moore D. A. J., et al. (2022). Alternative cost-effective media to facilitate MODS culture for diagnostics of tuberculosis. Tuberc. (Edinb) 135, 102225. doi: 10.1016/j.tube.2022.102225
  10. Pai M., Kalantri S., Pascopella L., Riley L. W., Reingold A. L. (2005). Bacteriophage-based assays for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A meta-analysis. J. Infect. 51, 175–187. doi: 10.1016/j.jinf.2005.05.017
  11. Colwell R. R., Brayton P. R., Grimes D. J., Roszak D. B., Huq S. A., Palmer L. M. (1985). Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms. Nat. Biotechnol. 3, 817–820. doi: 10.1038/nbt0985-817
  12. Saito K., Warriar T., Somersan-Karakaya S., Kaminski L., Mi J., Jiang X., et al. (2017). Rifamycin action on RNA polymerase in antibiotic-tolerant *Mycobacterium tuberculosis* results in differentially detectable populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114, E4832–E4840. doi: 10.1073/pnas.1705385114
  13. Mukamolova G. V., Kaprelyants A. S., Young D. I., Young M., Kell D. B. (1998). A bacterial cytokine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 8916–8921. doi: 10.1073/pnas.95.15.8916
  14. Zainabadi K., Walsh K. F., Vilbrun S. C., Mathurin L. D., Lee M. H., Saito K., et al. (2021). Characterization of differentially detectable *Mycobacterium tuberculosis* in the sputum of subjects with drug-sensitive or drug-resistant tuberculosis before and after two months of therapy. Antimicrob. Agents Chemother. 65, e0060821. doi: 10.1128/AAC.00608-21
  15. Chengalroyen M. D., Beukes G. M., Gordhan B. G., Streicher E. M., Churchyard G., Hafner R., et al. (2016). Detection and quantification of differentially culturable tubercle bacteria in sputum from patients with tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 194, 1532–1540. doi: 10.1164/rccm.201604-0769OC
  16. Andersson D. I., Nicoloff H., Hjort K. (2019). Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. Nat. Rev. Microbiol. 17, 479–496. doi: 10.1038/s41579-019-0218-1
  17. Kargarpour Kamakoli M., Sadegh H. R., Farmanfarmaei G., Masoumi M., Fateh A., Javadi G., et al. (2017). Evaluation of the impact of polyclonal infection and heteroresistance on



- treatment of tuberculosis patients. *Sci. Rep.* 7, 41410. doi: 10.1038/srep41410
18. British Medical Research Council. Treatment of pulmonary tuberculosis with streptomycin and para-aminosalicylic acid. A Medical Research Council investigation. *BMJ* 1950; 2:1073–1085.
19. Flores J, Cancino JC, Chavez-Galan L. Lipoarabinomannan as a point-of-care assay for diagnosis of tuberculosis: how far are we to use it? *Front Microbiol* 2021; 12:638047.
20. World Health Organization. WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021.
21. Feuerriegel S, Kohl TA, Utpatel C, et al. Rapid genomic first- and second-line drug resistance prediction from clinical *Mycobacterium tuberculosis* specimens using Deeplex-MycTB. *Eur Respir J* 2021; 57:2001796.
22. Schon T, Werngren J, Machado D, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates - the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination. *Clin Microbiol Infect* 2020; 26:1488–1492.
23. Schon T, Werngren J, Machado D, et al. Multicentre testing of the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination on *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2021; 27:288e1–288e4.
24. Lange C, Aarnoutse R, Chesov D, et al. Perspective for precision medicine for tuberculosis. *Front Immunol* 2020; 11:566608.
25. Sanchez-Padilla, E., Merker, M., Beckert, P., Jochims, F., Dlamini, T., Kahn, P., et al. (2015). Detection of drug-resistant tuberculosis by xpert MTB/RIF in Swaziland. *New Engl. J. Med.* 372, 1181–1182. doi: 10.1056/nejmc1413930
26. Ardizzoni, E., Ariza, E., Mulengwa, D., Mpala, Q., Tour, R., de, L., et al. (2021). Thin-Layer-Agar-Based direct phenotypic drug susceptibility testing on sputum in eswatini rapidly detects mycobacterium tuberculosis growth and rifampicin resistance otherwise missed by WHO-endorsed diagnostic tests. *Antimicrob. Agents Ch* 65, e02263–e02220. doi: 10.1128/aac.02263-20

UDC 612.2

# LABORATORY DIAGNOSTICS OF RESISTANT FORMS OF TUBERCULOSIS - PROBLEMS AND PROSPECTS

*Valentyna Motronenko*

[motronenko.valentyna@lil.kpi.ua](mailto:motronenko.valentyna@lil.kpi.ua)

*Tatiana Vlasiuk*

[vlasyuk.tania@lil.kpi.ua](mailto:vlasyuk.tania@lil.kpi.ua)

Department of translational medical bioengineering  
National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kiev Polytechnic Institute"  
Kyiv, Ukraine

**Abstract** – Tuberculosis (TB) is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. The emergence of chemo-resistant tuberculosis is considered a serious threat to the global fight against TB, because the spread of drug-resistant forms of tuberculosis increases the burden on health care systems and increases the degree of danger for citizens, as well as contributes to the emergence of new epidemic outbreaks. Drug resistance to new and existing drugs threatens recent advances in the treatment of drug-resistant tuberculosis, and adequate resistance testing for these drugs is virtually unavailable. Therefore, careful analysis and implementation of advanced methods of diagnosing resistant tuberculosis play a key role in the effective control of this disease. To date, a number of laboratory tools are available for the diagnosis of drug-resistant TB, including culture-based methods, methods using genome sequencing technologies, and molecular methods. The optimal and complementary use of available diagnostic tools at different levels of the multi-level network of tuberculosis laboratories, as well as the correct interpretation of the diagnostic results provided by them, are of crucial importance for the accurate and timely diagnosis of chemo-resistant tuberculosis, which ensures effective treatment and care for patients. The work describes key information about modern methods of diagnosing drug-resistant tuberculosis, and briefly outlines their advantages and disadvantages. During the analysis, the main problems of the existing methods were identified, namely: the duration of research, high cost and difficult access in regions with limited resources, insufficient sensitivity to detect certain types of resistance, difficulty in use and the availability of specialized qualifications for their application. Thus, the creation of an easy-to-use, fast, accurate and affordable method is a promising direction for further research in this area.

**Key words** – diagnosis, *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, tuberculosis, point-of-care testing.