

**ПАТОМОРФОЗ ТУБЕРКУЛЬОЗУ В УМОВАХ СЬОГОДЕННЯ: ПРОБЛЕМА
РЕЗИСТЕНТНОСТІ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ
ЧУТЛИВОСТІ ШТАМІВ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ**

¹Костик О. П., ¹Сахелашвілі-Біль О. І., ¹Сахелашвілі М. І., ¹Луцишин Т. В., ¹Галишич Н. М.,
¹Пурська М. Б., ²Фесюк П. П.

¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна

²КНП ЛОР «Львівський регіональний фтизіопульмонологічний клінічний

лікувально-діагностичний центр», м. Львів, Україна

Анотація. З початку 90-х років у всьому світі спостерігається зростання медикаментозної резистентності мікобактерій туберкульозу (МБТ) до найбільш активних протитуберкульозних препаратів (АМБП), що призвело до зниження ефективності лікування та сприяло зростанню основних епідеміологічних показників. Метою дослідження було визначення мутацій МБТ, пов'язаних з резистентністю до АМБП при застосуванні молекулярно-генетичного методу лінійного зонд-аналізу *Hain Lifesciences (Geno-Tур MTBDRplus)*. Проаналізовано штами МБТ, виділені у вперше діагностованих хворих та при рецидивах на предмет виявлення хіміорезистентності штамів у пацієнтів, які впродовж 2017-2021 рр лікувалися у КНП ЛОР «Львівський регіональний фтизіопульмонологічний клінічний лікувально-діагностичний центр». Проведено визначення чутливості штамів МБТ до АМБП I ряду – ізоніазиду та рифампіцину та II ряду – фторхінолонів та ін'єкційних препаратів (канаміцин, капріоміцин та амікацин). Встановлено високий відсоток співпадінь результатів до гену *groV*. Мутації, асоційовані з резистентністю до ізоніазиду, найчастіше зустрічалися в гені *katG*. Вони зберігають повну вірулентність до ізоніазиду і найчастіше являються мультирезистентними штамми. Молекулярно-генетична резистентність штамів МБТ, до фторхінолонів асоційована з геном *gyrA* і *gyrB*, до ін'єкційних препаратів – геном *rrs*, а до канаміцину – з геном *eis*. Необхідність подальших досліджень дозволить визначати мутації МБТ, пов'язані з резистентністю до АМБП та використовувати їх для призначення ефективного та своєчасного лікування, що в подальшому сприятиме покращенню епідеміологічної ситуації щодо хіміорезистентного туберкульозу.

Ключові слова: хіміорезистентний туберкульоз легень, мікобактерія туберкульозу, антимікобактеріальні препарати, молекулярно-генетичний метод, генетичні мутації.

Вступ. У другій половині ХХ сторіччя спостерігалася тенденція до зменшення тягаря туберкульозу (ТБ), що визначалося як позитивний патоморфоз, який закінчився у 1985 р., коли було зареєстровано зростання захворюваності. Результати епідеміологічних досліджень [4, 8] вказують на значний вплив на зростання захворюваності на ТБ цілого комплексу причин,

серед яких погіршення соціально-економічної та екологічної ситуації, епідемія ВІЛ/ТБ, міграція населення з країн, які розвиваються і мають високий тягар ТБ, поява форм ТБ з медикаментозною і множинною медикаментозною стійкістю, економічно-соціальна неспроможність країн, що розвиваються, підтримувати вимоги інфекційного контролю [2, 8, 9]. З початку 90-х років у всьому світі спостерігається зростання медикаментозної резистентності мікобактерій туберкульозу (МБТ) до найбільш активних протитуберкульозних препаратів – ізоніазиду і рифампіцину, що призвело до різкого зниження ефективності лікування, зростання показника смертності від туберкульозної інфекції та сприяло зростанню основних епідеміологічних показників до масштабів епідемії, що вимагає активних дій, направлених на боротьбу з цією проблемою [1, 5]. Згідно даних ВООЗ, стандартна терапія при мультирезистентному туберкульозі (МРТБ) неефективна, а туберкульоз з розширеною резистентністю стійкий практично до всіх відомих препаратів, дає найбільш високий рівень смертності, становить 35 % від усіх хіміорезистентних форм. За частотою діагностики мультирезистентних форм туберкульозу Україна входить у п'ятірку країн світу, де реєструється висока питома вага МРТБ та посідає друге місце в Європі за темпами зростання МРТБ й четверте місце за його поширеністю [3]. Від моменту відкриття збудника туберкульозу і до наших днів спостерігається постійна еволюція морфологічних, біохімічних і генетичних властивостей МБТ. Значні дослідження, оприлюднені впродовж останніх років, вказують на вагомість біологічних факторів ризику як чинників щодо глобального поширення МРТБ [7]. Оцінка стратегії ВООЗ щодо подолання туберкульозу свідчить, що на сьогодні у більшості регіонів ВООЗ країни з високим тягарем ТБ не можуть досягти задекларованих ВООЗ завдань та моніторингових критеріїв [4, 6]. В Україні, хоча і спостерігається тенденція щодо деякого зменшення захворюваності на ТБ, проте виокремилась низка складних та суперечливих позицій щодо швидкого подолання туберкульозної інфекції, які і вимагають прискіпливої уваги та глибокого вивчення. У зв'язку з вищезазначеним, актуальним є застосування молекулярно-генетичних аспектів патоморфозу туберкульозу з визначенням резистентності мікобактерій та їх ранньою діагностикою.

Для отримання репрезентативних даних щодо розповсюдження штамів МБТ з медикаментозною стійкістю та призначення відповідно ефективного та своєчасного лікування, ВООЗ рекомендує використовувати молекулярно-генетичні підходи: ПЛР в режимі реального часу за допомогою картриджів (Xpert MTB/RIF/Ultra, США) та лінійний зонд-аналіз (Hain Lifesciences, Німеччина). Так, в Україні охоплення молекулярно-генетичним методом зареєстрованих випадків (нові випадки ТБ + рецидиви) зросло з 92,5 % у 2017 році до 96,0 % у 2018 році, або на 3,5 %. У 2019 році охоплення встановлено на тому ж рівні (96,0 %) [4].

Мета дослідження. Вивчити результати молекулярно-генетичного методу лінійного зонд-аналізу Hain Lifesciences (Geno-Тур MTBDRplus) при визначенні мутацій *M.tuberculosis*, пов'язаних з резистентністю до антимікобактеріальних препаратів у хворих на туберкульоз легень у Львівській області.

Матеріали та методи досліджень. Проведено дослідження та проаналізовано штами *M.tuberculosis*, виділених у хворих з новими випадками туберкульозу й раніше пролікованих (рецидиви) у пацієнтів, які впродовж 2017-2021 років знаходилися на лікуванні у Львівський регіональний фтизіопульмонологічний клінічний лікувально-діагностичний центр» на предмет виявлення хіміорезистентності штамів МБТ. Визначення медикаментозної чутливості проводили в бактеріологічній лабораторії цього центру згідно "Інструкції з мікробіологічної діагностики туберкульозу" № 462 від 27.06.2019 р. та "Стандартів бактеріологічної діагностики туберкульозу в лабораторіях протитуберкульозних закладів України" (Київ, 2012). Для встановлення діагнозу мультирезистентного туберкульозу застосували один із методів молекулярно-генетичного дослідження - метод лінійного зонд-аналізу Hain Lifesciences, що включає визначення чутливості штамів *M.tuberculosis* до антимікобактеріальних препаратів I ряду – ізоніазиду та рифампіцину за допомогою набору для гібридизації Geno-Тур MTBDRplus та до препаратів II ряду – зокрема, фторхінолонів та ін'єкційних препаратів (канаміцин, капріоміцин та амікацин) за допомогою набору для гібридизації Geno-Тур MTBDRsl.

Проведене нами дослідження складалося з декількох послідовних етапів: збирання реакційної суміші – виділення ДНК *M.tuberculosis* за допомогою наборів для виділення GenoLyse – ампліфікація на апараті GTQ-Cycler 24 – гібридизація в автоматизованій системі GT-Blot 48 для гібридизації на стрипах з типоспецифічними зондами (набори Hain Lifesciences) G та сканування в скануючому модулі Geno Scan (автоматизованій системі для документування та аналізу результатів гібридизації на тест-смужках) – внесення результатів дослідження в електронну систему eTB-mananger Laboratory.

Результати. Впродовж 4-х років було досліджено та проаналізовано штами *M.tuberculosis* у хворих з новими випадками туберкульозу (у 2018 р. – 237, у 2019 р. – 528, у 2020 р. – 420, за три місяці 2021 р. – 87 випадків) та рецидивами (у 2018 р. – 148, у 2019 р. – 142, у 2020 р. – 64, за три місяці 2021 р. – 21 випадок). Тестування провели на апараті GenXpert, де було виявлено МБТ і підтверджена стійкість до рифампіцину. Впродовж семи днів проводили молекулярно-генетичне дослідження лінійним методом зонд-аналізу для встановлення випадків стійкості до ізоніазиду.

При тестуванні штамів *M.tuberculosis* щодо визначення медикаментозної стійкості до рифампіцину молекулярно-генетичним методом виявлено високий відсоток співпадінь

результатів до гену *groB*. Мутації, які асоційовані з резистентністю до ізоніазиду, найчастіше зустрічалися в гені *katG*. Гени з цією мутацією зберігають повну вірулентність до ізоніазиду і найчастіше являються мультирезистентними штамми. Молекулярно-генетична резистентність штамів *M.tuberculosis* до фторхінолонів асоційована з геном *gyrA* і *gyrB*. Молекулярно-генетична резистентність штамів *M.tuberculosis* до інекційних препаратів (канаміцин, амікацин, капріоміцин) асоційована з геном *ggs*, а до канаміцину – асоційована з геном *eis*.

Для нових випадків виявлення штамів, стійких до ізоніазиду (93,6 %) і рифампіцину (88,8 %) одночасно, маємо тенденцію до несприятливого перебігу захворювання, що веде за собою формування медикаментозної стійкості штамів МБТ.

В штаммах МБТ, що мають стійкість до фторхінолонів, основні мутації виявлені частіше в генах *gyrA*, ніж *gyrB*. Хоча це не є вагомим фактором при формуванні резистентності до фторхінолонів. Мутації у двох генах *ggs* і *eis*, що асоційовані з резистентністю до аміноглікозидів, виявлені лише в штаммах МБТ, що мають стійкість до канаміцину.

Висновки та перспективи. Результати проведених досліджень показали високу ефективність тестування медикаментозної чутливості МБТ молекулярно-генетичним методом лінійного зонд-аналізу. Виявлення генетичних мутацій, що асоційовані з медикаментозною резистентністю штамів МБТ гарантують високу діагностичну точність прогнозування резистентності до протестованих антимікобактеріальних препаратів.

Необхідність подальших досліджень дозволить визначати мутації МБТ, пов'язані з резистентністю до АМБП та використовувати їх в режимі реального часу для призначення ефективного та своєчасного лікування, що в подальшому сприятиме покращенню епідеміологічної ситуації щодо хіміорезистентного туберкульозу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Фещенко Ю. І. Патоморфоз туберкульозу – реалії сьогодення, хіміорезистентність як ознака прогресування / Ю. І. Фещенко, Л. Д. Тодоріко, М. М. Кужко, М. І. Гуменюк // *Укр.пульмонол. журн.*- 2018.- № 2.- С. 6 – 10.
2. Мельник В. М. Історія виникнення і розвитку хіміорезистентного туберкульозу / В. М. Мельник, А. М. Приходько, Л. В. Арєф'єва // *Укр.пульмонол. журн.*- 2012.- № 2.- С. 59 – 61.
3. Антоненко П. Б. Генотипування *M.tuberculosis* за шістьма локусами / П. Б. Антоненко, В. Й. Кресюк, Ю. І. Бажора // *Укр.пульмонол. журн.*- 2010.- № 3.- С. 15 - 18.
4. Тодоріко Л. Д. Досягнення та складні питання що до подолання туберкульозу в Україні (консолідований погляд з різних регіонів) / Л. Д. Тодоріко, В. І. Петренко, Ю. М. Валецький та ін. // *Туберкульоз Легеневі хвороби ВІЛ-інфекція.*- 2020.- № 1.- С. 10 – 17.

5. Actor JK, Hunter R, Jagannath C. Immunopathology of tuberculosis. Molecular pathology of lung diseases. New York. Springer New York. 2008;419–428.
6. International statistical classification of diseases and health related problems (The) ICD-10. Geneva: World Health Organization; 2016.
7. Ralph AP, Anstey NM, Kelly PM. Tuberculosis into the 2010-s: Is the glass half full? *CID*. 2009; 49:574–583.
8. World Health Organization. Global Tuberculosis Control re port. WHO report Geneva. Switzerland. 2017;273 p.
9. Suggested citation. Global tuberculosis report. Geneva: World Health Organization. 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

REFERENCES

1. Feshchenko Yu. I. Patomorfoz tuberkulozu – realii sohodennia, khimioezystentnist yak oznaka prohresuvannia / Yu. I. Feshchenko, L. D. Todoriko, M. M. Kuzhko, M. I. Humeniuk // *Ukr.pulmonol. zhurn.*- 2018.- № 2.- S. 6 – 10.
2. Melnyk V. M. Istoriia vynyknennia i rozvytku khimioezystentnoho tuberkulozu / V. M. Melnyk, A. M. Prykhodko, L. V. Arefieva // *Ukr.pulmonol. zhurn.*- 2012.- № 2.- S. 59 – 61.
3. Antonenko P. B. Henotypuvannia M.tuberculosis za shistma lokusamy / P. B. Antonenko, V. Y. Kresiuk, Yu. I. Bazhora // *Ukr.pulmonol. zhurn.*- 2010.- № 3.- S. 15 - 18.
4. Todoriko L. D. Dosiahnennia ta skladni pytannia shcho do podolannia tuberkulozu v Ukraini (konsolidovanyi pohliad z riznykh rehioniv) / L. D. Todoriko, V. I. Petrenko, Yu. M. Valetskyi ta in. // *Tuberkuloz Lehenevi khvoroby VIL-infektsiia.*- 2020.- № 1.- S. 10 – 17.
5. Actor JK, Hunter R, Jagannath C. Immunopathology of tuberculosis. Molecular pathology of lung diseases. New York. Springer New York. 2008;419–428.
6. International statistical classification of diseases and health related problems (The) ICD 10. Geneva: World Health Organization; 2016.
7. Ralph AP, Anstey NM, Kelly PM. Tuberculosis into the 2010-s: Is the glass half full? *CID*. 2009;49:574–583.
8. World Health Organization. Global Tuberculosis Control re port. WHO report Geneva. Switzerland. 2017;273 p.
9. Suggested citation. Global tuberculosis report. Geneva: World Health Organization. 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

PATHOMORPHOSIS OF TUBERCULOSIS IN TODAY'S CONDITIONS: THE PROBLEM OF RESISTANCE AND MOLECULAR-GENETIC METHODS FOR DETERMINATION OF SENSITIVITY OF STABLES MATTERS

Kostyk O. P., Sahelashvili-Bil O. I., Sahelashvili M. I., Lutsyshyn T. V., Galyshych N. M.,
Purska M. B., Fesyuk P. P.

Abstract. Since the early 1990s, there has been an increase in drug resistance of Mycobacterium tuberculosis (MBT) to the most active anti-TB drugs (AMBs) worldwide, which has reduced the effectiveness of treatment and contributed to the growth of key epidemiological indicators. The aim of the study was to identify mutations in M. tuberculosis associated with AMBP resistance using the molecular genetic method of linear probe analysis Nain Lifesciences (Geno-Typ MTBDRplus). The strains of the Office, isolated in newly diagnosed patients and in relapses for the detection of chemoresistance of strains in patients who were treated in 2017-2021 in the ENT "Lviv Regional Phthisiopulmonology Clinical Medical and Diagnostic Center" were analyzed. The sensitivity of MBT strains to AMBP of the first series - isoniazid and rifampicin and the second series - fluoroquinolones and injectable drugs (kanamycin, capriomycin and amikacin) was determined. A high percentage of matches to the rpoB gene was found. Mutations associated with isoniazid resistance were most common in the katG gene. They retain complete virulence to isoniazid and are often multidrug-resistant strains. Molecular genetic resistance of MBT strains to fluoroquinolones is associated with the gyrA and gyrB genes, to injectables (kanamycin, amikacin, capriomycin) is associated with the rrs gene, and to kanamycin is associated with the eis gene. The need for further research will identify MBT mutations associated with AMP resistance and use them in real time for effective and timely treatment, which will further improve the epidemiological situation of chemoresistant tuberculosis.

Key words: chemoresistant pulmonary tuberculosis, Mycobacterium tuberculosis, antimycobacterial drugs, molecular genetic method, genetic mutations.

Костик Ольга Петрівна, ORSID: 0000-0001-5606-7931, +380984516838,
kaf_phthisiology@meduniv.lviv.ua;
Сахелашвілі-Біль О. І.;
Сахелашвілі М. І., ORSID: 0000-0002-2503-5440;
Луцишин Т. В.;
Галишич Н. М.;
Пурська М. Б.;
Фесюк П. П.