

**О. А. Журило, О. В. Чернов, А. І. Барбова, Р. Л. Любевич, П. С. Трофімова,
М. С. Яременко, С. В. Миронченко, Л. М. Сладкова**
**ВЕРИФІКАЦІЯ МЕТОДУ ЦІЛЬОВОГО СЕКВЕНУВАННЯ НАСТУПНОГО ПОКОЛІННЯ
З ВИКОРИСТАННЯМ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ DEEPLX MYC-TB (GENOSCREEN, ЛІЛЛЬ,
ФРАНЦІЯ), ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЛІКАРСЬКОЇ СТІЙКОСТІ МІСОБАКТЕРІУМ
TUBERCULOSIS У ЗРАЗКАХ МОКРОТИННЯ**

ДУ «Національний науковий центр фтизіатрії, пульмонології та алергології імені Ф. Г. Яновського НАМН України»

Референс-лабораторія з мікробіологічної діагностики туберкульозу НАМН України

Міжнародна організація PATH (USAID), проект з надання допомоги у подоланні МР/PP ТБ в Україні

**ВЕРИФІКАЦІЯ МЕТОДУ ЦІЛЬОВОГО СЕКВЕНУВАННЯ
НАСТУПНОГО ПОКОЛІННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ НАБОРУ
РЕАГЕНТІВ DEEPLX MYC-TB (GENOSCREEN, ЛІЛЛЬ, ФРАНЦІЯ),
ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЛІКАРСЬКОЇ СТІЙКОСТІ МІСОБАКТЕРІУМ
TUBERCULOSIS У ЗРАЗКАХ МОКРОТИННЯ**

**О. А. Журило, О. В. Чернов, А. І. Барбова, Р. Л. Любевич,
П. С. Трофімова, М. С. Яременко, С. В. Миронченко, Л. М. Сладкова**

Резюме

Мета роботи — проведення верифікації цільового секвенування нового покоління (цСНП) з використанням набору реагентів Deeplex Myc-TB для подальшого впровадження в рутинну практику для прискорення отримання результатів тесту медикаментозної чутливості, у тому числі до розширеного переліку протитуберкульозних препаратів для ефективного лікування туберкульозу.

Матеріали та методи. Для проведення верифікації нового методу цСНП з використанням набору реагентів Deeplex Myc-TB були відібрані зразки мокротиння, які в подальшому могли би бути включені в дослідження з цільового секвенування. Для цього були проведені рутинні фено- та генотипічні дослідження мокротиння від хворих.

Дослідження з цСНП проводилось з використанням наборів Deeplex Myc-TB для виявлення ДНК *M. tuberculosis* та визначення мутацій, асоційованих зі стійкістю до ізоніазиду, рифампіцину, етіонаміду, піразинаміду, етамбутолу, стрептоміцину, канаміцину, амікацину, капреоміцину, левофлоксацину, моксифлоксацину, лінезоліду, клофазиміну та бедаквіліну. Цільове СНП здійснювалося згідно стандартних операційних процедур. Аналіз файлів даних секвенування у форматі FASTQ виконано за допомогою додатку Deeplex Web Application. В дослідженні використані методи статистичної обробки результатів.

Результати. Кількість виділеної бактеріальної ДНК *M. tuberculosis* напрума залежить від бактеріального навантаження зразку. Чим більше КСБ міститься у зразку, тим більше виділяється бактеріальної ДНК *M. tuberculosis*. Аналітична чутливість методу цСНП за допомогою набору Deeplex Myc TB залежить від рівня бактеріального навантаження у зразках нативного мокротиння. При високому навантаженні (3+) чутливість складала 100 % (10/10), при середньому навантаженні (2+) — 90,0 % (9/10), а при низькому навантаженні (1+) — 70,0 % (7/10). Ці дані вказують на ефективність методу для зразків з КСБ (3+) та КСБ (2+), проте зі зниженням бактеріального навантаження відзначається певне зниження чутливості методу цСНП за допомогою набору Deeplex Myc TB.

Оцінена точність, чутливість та специфічність методу цСНП у виявленні резистентності *M. tuberculosis* до основних ПТП. Результати тестування демонструють високу ефективність методу цСНП для визначення медикаментозної чутливості до ПТП.

Кількість виділеної ДНК *M. tuberculosis* для постановки цільового секвенування залежить від бактеріального навантаження мазка: при КСБ3+ (високе навантаження) чутливість становила 100 %, при КСБ2+ (середнє) — 90,0 %, а при КСБ1+ (низьке) — 70,0 %. Отримані результати демонструють ефективність методу для рутинної діагностики зразків, де бактеріальне навантаження оцінюється як КСБ2+ або КСБ3+.

Визначено ефективність нового тесту Deeplex Myc-TB. Мінімальні показники у порівнянні з фТМЧ склали: 90,0 % чутливість, 91,7 % специфічність, загальна точність не нижче 96,9 %.

Висновки. Отримані в дослідженні показники точності та ефективності, дозволяють рекомендувати цСНП, як метод визначення ЛС

**VERIFICATION OF THE NEXT-GENERATION TARGETED
SEQUENCING METHOD USING THE DEEPLX MYC-TB
REAGENT KIT (GENOSCREEN, LILLE, FRANCE) FOR DETERMINING
DRUG RESISTANCE OF MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS
IN SPUTUM SAMPLES**

**O. A. Zhurilo, O. V. Chernov, A. I. Barbova, R. L. Lubevich,
P. S. Trofimova, M. S. Yaremenko, S. V. Mironchenko, L. M. Sladkova**

Abstract

The aim of the study is to verify next-generation targeted sequencing (tNGS) using the Deeplex Myc-TB reagent kit for further implementation into routine practice to accelerate the delivery of drug susceptibility test results, including to an expanded list of anti-TB drugs for effective treatment of tuberculosis.

Material and methods. To verify the new tNGS method using the Deeplex Myc-TB reagent kit, sputum samples were selected that could be further included in targeted sequencing examination. For this purpose, routine phenotypic and genotypic tests of sputum from patients were performed.

tNGS test was conducted using Deeplex Myc-TB kits to detect *M. tuberculosis* DNA and identify mutations associated with resistance to isoniazid, rifampicin, ethionamide, pyrazinamide, ethambutol, streptomycin, kanamycin, amikacin, capreomycin, levofloxacin, moxifloxacin, linezolid, clofazimine, and bedaquiline. Targeted NGS was performed according to standard operating procedures. Analysis of sequencing data files in FASTQ format was performed using the Deeplex Web Application. Statistical analysis methods were used in the study.

Results. The amount of isolated *M. tuberculosis* bacterial DNA directly depends on the bacterial load of the sample. The more acid-fast bacteria (AFB) are present in the sample, the more *M. tuberculosis* bacterial DNA is isolated. The analytical sensitivity of the tNGS method using the Deeplex Myc TB kit depends on the level of bacterial load in native sputum samples. At high load (3+), the sensitivity was 100 % (10/10), at medium load (2+) — 90,0 % (9/10), and at low load (1+) — 70,0 % (7/10). These data indicate the effectiveness of the method for samples with CBC (3+) and CBC (2+), however, with a decrease in the bacterial load, a certain decrease in the sensitivity of the tNGS method using the Deeplex Myc TB kit is noted.

The accuracy, sensitivity and specificity of the tNGS method in detecting resistance of *M. tuberculosis* to the main anti-tuberculosis drugs were assessed. The test results demonstrate the high efficiency of the tNGS method for determining drug susceptibility to anti-tuberculosis drugs.

The amount of isolated *M. tuberculosis* DNA for targeted sequencing depends on the bacterial load of the smear: at AFB3+ (high load) the sensitivity was 100%, at AFB2+ (medium) — 90.0%, and at AFB1+ (low) — 70.0%. The results obtained demonstrate the effectiveness of the method for routine diagnostics of samples where the bacterial load is estimated as AFB2+ or AFB3+.

The effectiveness of the new Deeplex Myc-TB test was determined. The minimum indicators compared to fTMS were: 90.0% sensitivity, 91.7% specificity, overall accuracy not lower than 96.9%.

Conclusions. The accuracy and efficiency indicators obtained in the study allow us to recommend tNGS as a method for determining drug resistance *M. tuberculosis* to 1-st and 2-nd line anti-tuberculosis drugs. The method has been verified for use on sputum samples.

For new and repurposed drugs, the evidence base for mutations remains quite limited, which limits the potential of tNGS as an indepen-

M. tuberculosis до ПТП 1-го та 2-го ряду. Метод верифіковано для засто- сування на зразках мокротиння.

Для нових і перепрофільованих препаратів доказова база мутацій залишається досить обмеженою, що стримує можливості цСНП як незалежного діагностичного методу. Через це країни залишаються залежними від фТМЧ для цих препаратів.

Для швидкої діагностики та ефективного лікування в умовах високого тягаря ЛС-ТБ та керуючись новими рекомендаціями ВООЗ, слід розглянути можливість імплементації цСНП в існуючі діагностичні алгоритми.

Ключові слова: цільове секвенування наступного покоління, M. tuberculosis, верифікація методу.

Укр. пульмонол. журнал. 2025;33(1):23–30.

Журило Олександр Анатолійович
ДУ «Національний науковий центр фтизіатрії, пульмонології та алергології імені Ф. Г. Яновського
Національної академії медичних наук України»
Керівник лабораторії мікробіології і біохімії
Д. мед. наук, професор
10, вул. М. Амосова, Київ, 03038, Україна
Тел/факс: 38044 275-54-30, microbio@ifp.kiev.ua

dent diagnostic method. As a result, countries remain dependent on fTMS for these drugs.

For rapid diagnosis and effective treatment in high-burden settings, and guided by new WHO recommendations, the possibility of implementing tNGS into existing diagnostic algorithms should be considered.

Key words: targeted next-generation sequencing, M. tuberculosis, method verification.

Ukr. Pulmonol. J. 2025;33(1):23–30.

Oleksandr A. Zhurilo
SI "National scientific center of phthisiology, pulmonology and allergology named after F. G. Yanovsky of National academy of medical sciences of Ukraine"
Head of the Laboratory of Microbiology and Biochemistry
Doctor of medicine, professor
10, M. Amosova str., Kyiv, 03038, Ukraine
Тел/факс: 38044 275-54-30, microbio@ifp.kiev.ua

На сучасному етапі Україна продовжує залишатися у групі країн Європи з високим рівнем захворюваності на туберкульоз (ТБ). За даними Центру громадського здоров'я МОЗ у 2023 р. в Україні зареєстровано 19 851 випадків ТБ, з них 639 (3,2 %) — у дітей до 14 років, що свідчить про небезпечну епідеміологічну ситуацію з ТБ в країні. Ці показники на 7,3 % перевищують аналогічні дані 2022 р. ВООЗ наголосила, що після стійкого зниження показників смертності від ТБ на протязі останніх 20 років, з 2023 р. кількість смертей від ТБ в Європі знову почала зростати. За даними ВООЗ, серед найбільш постраждалих від ТБ країн Європейського регіону, зазначена Україна, де померло від ТБ близько 3600 осіб. За статистичними даними, майже половина смертельних випадків від інфекційних хвороб пов'язані з ТБ.

Вочевидь, що вирішення проблеми ТБ на сьогоднішній день, неможливо без якісної та своєчасної діагностики ТБ, яка є основою для ефективного лікування пацієнтів та епіднадзора за захворюванням. В сучасній мікробіологічній діагностиці ТБ фенотипічне тестування щодо виявлення збудника ТБ та визначення його медикаментозної чутливості (фТМЧ), залишається «золотим стандартом» у виявленні резистентності до протитуберкульозних препаратів (ПТП), але ж потребує значного часу для проведення та отримання результату (від 2-х до 4-х тижнів).

Досягнення молекулярної біології за останні десятиліття суттєво вплинули на діагностику ТБ. Сучасні тести молекулярно-генетичної діагностики дозволяють не тільки виявити ДНК збудника, а і швидко визначити резистентність до ключових ПТП, завдяки проведенню ампліфікації специфічних ділянок ДНК M. tuberculosis. Нажаль, жоден швидкий тест, що рекомендований ВООЗ, на сьогодні ще не може використовуватись для виявлення повного спектру резистентності до всіх сучасних ПТП [1].

Відносно новим та перспективним методом діагностики ТБ та виявлення чутливості його збудника до ПТП є Секвенування Наступного Покоління (СНП). СНП — це потужний сучасний інструмент для виявлення всього

спектра мутацій ДНК M. tuberculosis, а серед них і клінічно значущих, що є основою для своєчасного призначення ефективних схем лікування хворого на ТБ та моніторингу специфічної терапії кожного випадку ТБ. Особливе значення для клініцистів це має у прийнятті рішень щодо найкращих режимів лікування у випадках з МЛС-ТБ, пре-ШЛС-ТБ та ШЛС-ТБ. Крім того, генетичний тест медикаментозної чутливості (гТМЧ) на основі СНП долає багато обмежень, що мають молекулярні тести, які рекомендовані на сьогодні ВООЗ, та можуть пропускати мутації за межами специфічних локусів, асоційованих з медикаментозною резистентністю, і призводити до хибнонегативних результатів, та/або у випадках мовчазних чи нейтральних мутацій, навпаки, надавати хибнопозитивні результати лікарської стійкості (ЛС) M. tuberculosis [2].

У 2018 р. ВООЗ опублікувала технічний посібник, в якому узагальнені характеристики доступних технологій СНП та надані рекомендації щодо вибору, закупівлі та впровадження технологій СНП в клінічних зразках з метою діагностики ЛС ТБ для країн з низьким та середнім рівнем доходу [3]. У 2021 р. ВООЗ опублікувала каталог мутацій, який є стандартом для інтерпретації молекулярно-генетичної інформації для прогнозування ЛС M. tuberculosis [4], оновлена версія його була опублікована в 2023 р. [5].

Розробка швидких цільових геномних панелей для проведення цільового (таргетного) СНП (цСНП, або tNGS) дозволяє отримати комплексний профіль резистентності, до якого входять гени, що асоційовані з резистентністю до лікарських засобів. Такий підхід можна проводити безпосередньо на клінічних зразках (наприклад, мокротиння), що суттєво скорочує час постановки діагнозу ТБ і МР-ТБ та витрати, пов'язані з культивуванням [3].

У відповідності до інформаційного циркуляру ВООЗ 2023 р. з використання технології цСНП для виявлення ЛС ТБ, для використання рекомендуються три комерційні продукти, один з яких Deeplex Мус-ТБ (Genoscreen, Лілль, Франція) [6].

Набір Deeplex Мус-ТВ є одним з рішень для цСНП. Використовуючи простий автоматизований біоінформатичний інструмент, він визначає 18 генних мішеней, асоційованих з резистентністю *M. tuberculosis* до ПТП, та одночасно генні цілі для ідентифікації видів мікобактерій та генотипування штамів *M. tuberculosis* [7].

Метою роботи стало проведення верифікації цСНП з використанням набору реагентів Deeplex Мус-ТВ, виробництва Genoscreen (Лілль, Франція) для подальшого впровадження в рутинну практику для прискорення отримання результатів ТМЧ, у тому числі до розширеного переліку ПТП для ефективного лікування ТБ.

Для цього необхідно було відпрацювати методику виділення ДНК *M. tuberculosis* для мокротиння з різною градацією мазку за результатами бактеріоскопії для визначення прийнятності якості виділеної ДНК для постановки цСНП та провести порівняльний аналіз результатів ТМЧ *M. tuberculosis*, отриманих методом цСНП, з результатами гТМЧ в системі GeneXpert і фТМЧ в рідкому середовищі в системі BACTEC 960 MGIT.

Матеріали та методи дослідження

Для проведення верифікації нового методу цСНП з використанням набору реагентів Deeplex Мус-ТВ, виробництва Genoscreen (Лілль, Франція), необхідно було відібрати зразки, які в подальшому могли би бути включені в дослідження з цільового секвенування. Для цього нами були проведені рутинні фено- та генотипічні дослідження мокротиння від хворих, за результатами яких були відібрані наступні зразки:

- 40 зразків нативного мокротиння від хворих з наступними результатами бактеріоскопії:
 - з вмістом КСБ (3+) — 10 зразків;
 - з вмістом КСБ (2+) — 10 зразків;
 - з вмістом КСБ (1+) — 10 зразків;
 - негативних за результатами бактеріоскопії — 10 зразків.
- 33 зразки нативного мокротиння з наступними результатами тестування в картриджах Xpert MTB/Rif Ultra:
 - Xpert MTB/Rif Ultra — (МБТ+RIF-) — 11 зразків;
 - Xpert MTB/Rif Ultra — (МБТ+RIF+) — 22 зразки.

Дослідження проведені в два етапи. На першому етапі було визначено мінімальну концентрацію *M. tuberculosis* у зразку. Дана інформація використовувалась для визначення придатності зразка для проведення цСНП. Під час другого етапу була проведена передпосівна обробка відібраних зразків нативного мокротиння,

яка включала одночасно деконтамінацію NALC-NaOH, гомогенізацію та концентрування *M. tuberculosis*. Отриманий осад матеріалу був досліджений згідно алгоритму з використанням фено-та генотипічних методів (рис. 1), а саме були проведені:

- посів в рідке середовище Middlebrook 7H9 з подальшою інкубацією в системі BACTEC 960 MGIT;
- ідентифікація виділених культур за допомогою швидкого імунохроматографічного тесту;
- фТМЧ з визначенням чутливості до ПТП 1-го і 2-го ряду в рідкому середовищі із застосуванням системи BACTEC 960 MGIT в рідкому середовищі;
- зі зразків мокротиння була виділена ДНК та досліджена методом цСНП.

Фенотипічні методи, що включали світлову мікроскопію мазків осаду мокротиння, забарвлених за методом Циля–Нільсена, культуральні дослідження в рідкому середовищі із застосуванням системи BACTEC 960 MGIT (передпосівна обробка зразків, посів осаду мокротиння в рідке середовище із застосуванням системи BACTEC 960, виділення мікобактерій, їх ідентифікація та визначення чутливості виділених *M. tuberculosis* до ПТП 1-го та 2-го ряду), а також молекулярно-генетичне тестування з використанням системи GeneXpert та картриджів Xpert MTB/Rif Ultra з одночасним виявленням ДНК МБТ-комплексу та визначенням резистентності до рифампіцину (RIF), здійснювались у відповідності до чинного наказу МОЗ України № 1462 від 27.06.2019 [8].

Генотипічні методи, що включали молекулярно-генетичні тестування з використанням системи GeneXpert та картриджів Xpert MTB/XDR для визначення резистентності до ізоніазиду (INH), фторхінолонів та ін'єкційних препаратів 2-го ряду, проводились у відповідності до інструкцій виробника [9].

Дослідження з цСНП проводилось з використанням наборів Deeplex Мус-ТВ для виявлення ДНК *M. tuberculosis* та визначення мутацій, асоційованих зі стійкістю до INH, RIF, етіонаміду (ETH), піразинаміду (PZA), етамбутолу (EMB), стрептоміцину, канаміцину, амікацину (AMK), капреоміцину (CAP), левофлоксацину (LFX), моксифлоксацину (MFX), лінезоліду (LZD), клофазиміну (CFZ) та бедаквіліну (BDQ). цСНП здійснювалося згідно стандартних операційних процедур [10].

Виділення високомолекулярної ДНК мікобактерій для цСНП відбувалось відповідно до СОП «Виділення високомолекулярної ДНК мікобактерій за допомогою набору реагентів QIAamp® DNA Mini Kit».

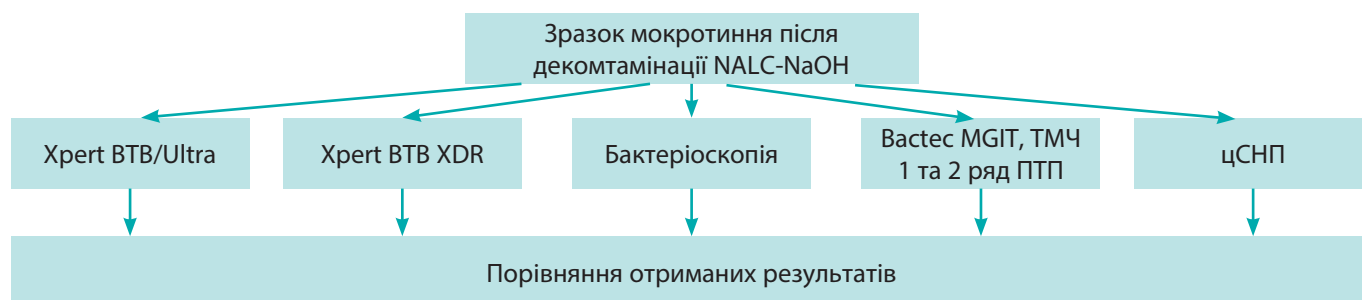


Рис. 1. Схема алгоритму проведення лабораторних досліджень.

Контроль якості та кількості ДНК проводились згідно СОП «Вимірювання концентрації ДНК за допомогою спектрофотометра Denovix та флюориметра Quantus».

Бібліотеки ДНК готувались у відповідності до СОП «Приготування бібліотеки ДНК для цільового секвенування з послідовним використанням наборів Deeplex® Мус-ТВ та Nextera XT».

Секвенування зразків проводилось згідно СОП «Запуск секвенування на платформі Illumina MiSeq».

Обробка і аналіз даних.

Аналіз файлів даних секвенування у форматі FASTQ виконано за допомогою додатку Deeplex Web Application відповідно до СОП «Аналіз файлів даних FASTQ за допомогою додатку Deeplex Web Application».

Для аналізу отриманих даних використані методи статистичної обробки результатів. Чутливість і специфічність методу для прогнозування резистентності до окремих препаратів розраховувалися із зазначенням 95,0 % довірчого інтервалу (ДІ) відносно фТМЧ в системі BACTEC 960 MGIT та гТМЧ в системі GeneXpert. 95,0 % ДІ щодо чутливості та специфічності обчислювалися за допомогою методу Клоппера-Пірсона. Додатково була обчислена точність та для перевірки узгодженості між методами тестування використовувався коефіцієнт Cohen's Kappa.

Результати та їх обговорення

Відбір зразків нативного мокротиння для подальшого проведення цСНП здійснювався в залежності від бактеріального навантаження в зразку — вмісту певної кількості клітин КСБ у 1,0 мл мокротиння. Для цього були проведені бактеріоскопічні дослідження зразків мокротиння, забарвлених за методом Циля-Нільсена. За результатами світлової мікроскопії мазків було відібрано 40 зразків нативного мокротиння від хворих з різною градацією мазків, як відмічено вище.

В подальшому із відібраних зразків, що містили КСБ в різній концентрації було виділено ДНК *M. tuberculosis*. Концентрація бактеріальної ДНК у позитивних зразках в залежності від градації мазків продемонстровано на рис. 2.

З діаграми, представленої на рис. 2, видно, що кількість виділеної бактеріальної ДНК *M. tuberculosis* напряму залежить від бактеріального навантаження зразку. Чим більше КСБ міститься у зразку, тим більше виділяється бактеріальної ДНК *M. tuberculosis*.

Відомо, що прийнятним для цСНП можуть бути проби, які містять лише необхідну кількість ДНК *M. tuberculosis* для цього методу, тому в подальших дослідженнях необхідно було вирішити чи можна досліджувати всі відібрані нами позитивні зразки мокротиння з різною концентрацією *M. tuberculosis*. Було проведено вивчення аналітичної чутливості цСНП в залежності від бактеріального навантаження зразку (рис. 3).

Отримані результати демонструють, що аналітична чутливість методу цСНП за допомогою набору Deeplex Мус ТВ залежить від рівня бактеріального навантаження у зразках нативного мокротиння. При високому навантаженні (3+) чутливість складала 100 % (10/10), при середньому навантаженні (2+) — 90,0 % (9/10), а при низькому навантаженні (1+) — 70,0 % (7/10). Ці дані вказують на

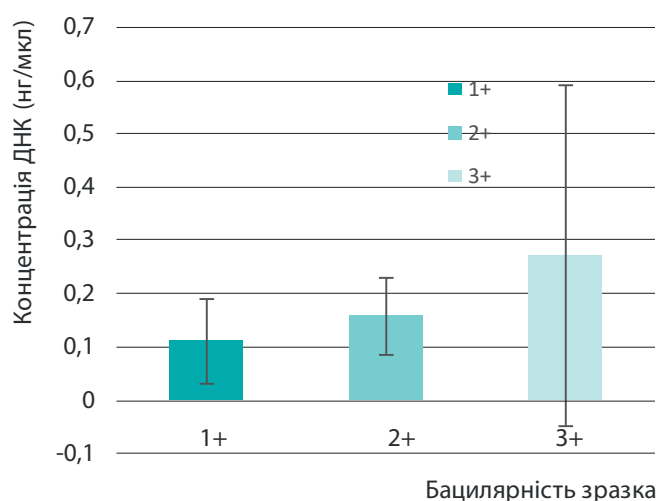


Рис. 2. Концентрація ДНК *M. tuberculosis* у зразках мокротиння із різною градацією мазка (1+, 2+, 3+).

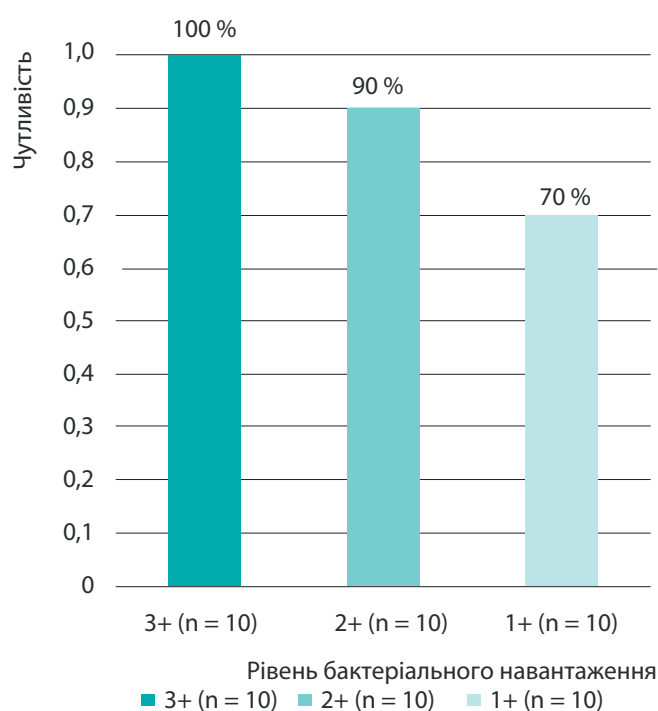


Рис. 3. Аналітична чутливість цСНП.

ефективність методу для зразків з КСБ (3+) та КСБ (2+), проте зі зниженням бактеріального навантаження відзначається певне зниження чутливості методу цСНП за допомогою набору Deeplex Мус ТВ.

У межах верифікаційного дослідження було проведено вивчення профілю ЛС *M. tuberculosis* у 32 зразків до INH, RIF, EMB та PZA, фторхінолонів (FQ), ін'єкційних препаратів (АМК, канаміцин, САР) та інших ПТП 2-го ряду за допомогою методу цСНП. Результати цих досліджень порівнювали з результатами рутинного визначення гТМЧ та фТМЧ, як відмічено вище.

Такий підхід дозволив оцінити точність, чутливість та специфічність методу цСНП у виявленні резистентності *M. tuberculosis* до основних ПТП.

Результати досліджень та порівняльний аналіз результатів ТМЧ, отриманих за допомогою цСНП, із

Таблиця 1

Результати досліджень медикаментозної резистентності *M. tuberculosis* за допомогою цСНП в порівнянні з системою BACTEC 960 та за допомогою картриджів Xpert MTB/Rif та Xpert MTB/XDR

Метод	Кількість зразків мокротиння з результатами ТМЧ до ПТП																							
	INH		RIF		EMB		PZA		MFX		LFX		LZD		CFZ		BDQ		AMK		CAP		ETH	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
цСНП	22	10	22	10	15	17	18	11	9	23	9	23	1	31	0	32	0	32	14	18	13	19	19	13
GeneXpert MTB/Rif+ GeneXpert MTB/XDR	22	10	21	11	-	-	-	-	9	23	9	23	-	-	-	-	-	-	13	19	13	19	18	14
BACTEC 960 MGIT	22	10	21	11	16	16	17	12	9	23	10	22	0	32	0	32	0	32	13	19	-	-	-	-
Всього зразків мокротиння	32		32		32		29		32		32		32		32		32		32		32		32	

R – резистентні до ПТП зразки з *M. tuberculosis*; S — чутливі до ПТП зразки з *M. tuberculosis*.

результатами, одержаними традиційними генотипічними та фенотипічними методами, представлено в табл. 1.

Як видно з табл. 1, метод цСНП точніше характеризує медикаментозну резистентність *M. tuberculosis* майже до всіх ПТП, ніж фТМЧ, за винятком EMB та ETH.

Відомо, що фенотипічне тестування щодо EMB та ETH є ненадійним. Не всі генетичні маркери, що асоційовані з резистентністю до цих препаратів визначені. У даному дослідженні фТМЧ для ETH не проводилося [11, 12].

Для препаратів із добре встановленими мутаціями, що викликають резистентність (RIF, FQ, AMK, CAP), співпадіння результативності різних методів щодо виявлення резистентності становила близько 95,0 %. Серед нових препаратів (BDQ, CFZ, LZD) у тестованій групі резистентних зразків виявлено не було.

Проте, в одному із досліджуваних зразків за допомогою методу цСНП було визначено змішану популяцію *M. tuberculosis*, з яких 13,9 % особин популяції несуть мутацію *c.460T>C* у гені *rplC*. Згідно з каталогом мутацій BOO3 2023 р., цей варіант належить до категорії 1 (мутації, асоційовані з резистентністю до LZD). При тестуванні методом фТМЧ резистентність в цьому штамі не підтверджувалася, що можна пояснити домінуванням у зразку чутливої до препарату популяції (86,1 %). Такий результат цСНП слід враховувати, оскільки використання LZD може створювати селективний тиск, що сприяє зростанню частки резистентної субпопуляції, що, у свою чергу, може призвести до неефективності обраного режиму лікування [13, 14].

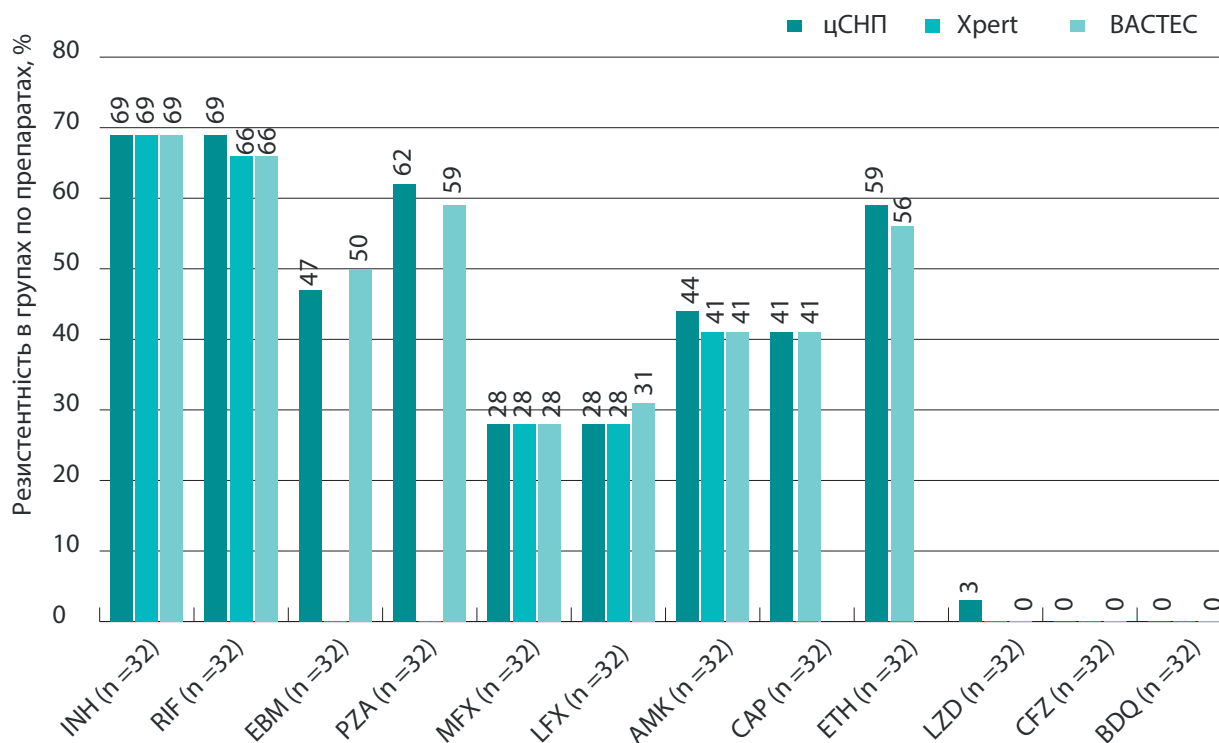


Рис. 4. Порівняння частоти резистентності за методом (n=32), що використовується для оцінки резистентності до ліків (BACTEC, GeneXpert та DeeplexMycTB).

На рис. 4 також графічно продемонстровані дані, що були отримані нами в результаті досліджень ТМЧ різними методами та їх порівняльну частоту між собою.

В результаті проведених досліджень та аналізу отриманих даних були розраховані показники клінічної ефективності нового методу із застосуванням цСНП у порівнянні з генотипічним GeneXpert тестуванням ЛС *M. tuberculosis* та фенотипічним тестуванням в системі BACTEC 960 MGIT, тобто була проведена верифікація нового методу.

Результати досліджень представлені в табл. 2 і 3.

Результати тестування демонструють високу ефективність методу цСНП для визначення ЛС *M. tuberculosis* до ПТП. Про це свідчать отримані значення чутливості та специфічності тесту. Метод показує 100 % чутливість методу для RIF, INH, PZA, MFX та АМК, що означає, що він повністю виявляє всі резистентні зразки до цих препаратів.

Для усіх препаратів специфічність перевищує 90,0 %, що свідчить про високу точність у визначенні чутливих штамів. Показник точності методу перевищує 96,0 % для всіх препаратів, що підтверджує його надійність у визначенні як чутливих, так і резистентних зразків. Для INH метод демонструє точність на рівні 100 %, що особливо важливо для цього препарату через його ключову роль у лікуванні ТБ. Значення Cohen's Kappa >0,93 для всіх

ПТП свідчать про високу або дуже високу узгодженість результатів цСНП із "золотим стандартом", на сьогоднішній день — методом BACTEC 960 MGIT.

Для препаратів нового покоління — BDQ, CFZ та LZD показано нульову резистентність у вибірці. Специфічність залишається високою (> 96,0 %), але результати не є репрезентативними через відсутність випадків резистентності, необхідне подальше дослідження на більших вибірках.

Основні показники клінічної ефективності цСНП у порівнянні з GeneXpert виглядають схожим чином. Загальна точність методу перевищує 93,75 % для всіх препаратів. Значення узгодженості Cohen's Kappa > 0.85. Цей показник є меншим щодо показників чутливості та специфічності для FQ — 88,89 % та 95,65 % відповідно.

В табл. 4 наведені отримані під час верифікації дані, а також результати виробника (компанія Genoscreen).

З табл. 4 видно, що отримані нами результати, є подібними до результатів, що наводить виробник. Для 4-х препаратів — RIF, PZA, LZD та АМК показники специфічності виявилися дещо нижче, ніж показники виробника.

В ході аналізу результатів досліджень нами також були визначені ще 2 показники, а саме, прогностична цінність позитивного результату (PPV) та прогностична цінність негативного результату (NPV) (табл. 5).

Таблиця 2

Основні показники клінічної ефективності у порівнянні з фТМЧ

Протитуберкульозні препарати	TP	TN	FP	FN	Чутливість (%) (95,0 % ДІ)	Специфічність (%) (95,0 % ДІ)	Точність (%) (95,0 % ДІ)	Cohen's Kappa
RIF	21	11	1	0	100.0 (83.9–100)	91.7 (61.5–99.8)	96.9 (84.3–99.9)	0.92
INH	22	10	0	0	100.0 (85.1–100)	100.0 (69.2–100)	100.0 (89.1–100)	1
EMB	15	16	0	1	93.8 (69.8–99.8)	100.0 (79.4–100)	96.9 (83.8–99.9)	0.94
PZA	17	11	1	0	100.0 (80.5–100)	91.7 (61.5–99.8)	96.6 (82.2–99.9)	0.92
MFX	9	23	0	0	100.0 (66.4–100)	100.0 (85.2–100)	100.0 (89.4–100)	1
LFX	9	22	0	1	90.0 (55.5–99.7)	100.0 (85.2–100)	96.9 (83.8–99.9)	0.93
LZD	0	31	1	0	-	96.9 (83.8–99.9)	96.9 (83.8–99.9)	0
CFZ	0	32	0	0	-	100.0 (89.1–100)	100.0 (89.1–100)	1
BDQ	0	32	0	0	-	100.0 (89.1–100)	100.0 (89.1–100)	1
AMK	13	18	1	0	100.0 (75.3–100)	94.7 (74.0–99.9)	96.9 (83.8–99.9)	0.93

TP(TruePositive) — істинно позитивний результат; FP(FalsePositive) — хибнопозитивний результат; TN(TrueNegative) — істинно негативний результат. FN(FalseNegative) — хибнонегативний результат. Значення Cohen's Kappa (рівень згоди) може варіювати від -1 до 1: (< 0: відсутність згоди, гірша, ніж випадковість; 0: згода на рівні випадковості; > 0: згода краща за випадковість, причому значення ближче до 1 свідчать про високу згоду).

Таблиця 3

Основні показники клінічної ефективності у порівнянні з GeneXpert

Протитуберкульозні препарати	TP	TN	FP	FN	Чутливість (%) (95,0 % ДІ)	Специфічність (%) (95,0 % ДІ)	Точність (%) (95,0 % ДІ)	Cohen's Kappa
RIF	21	11	1	0	100.00 (93.98–100.00)	91.67 (79.82–97.73)	96.97 (88.89–100.00)	0.93
INH	22	10	0	0	100.00 (94.50–100.00)	100.00 (91.78–100.00)	100.00 (92.86–100.00)	1
MFX	8	22	1	1	88.89 (72.35–96.97)	95.65 (85.98–99.56)	93.75 (83.33–98.73)	0.85
LFX	8	22	1	1	88.89 (72.35–96.97)	95.65 (85.98–99.56)	93.75 (83.33–98.73)	0.85
AMK	13	18	1	0	100.00 (93.98–100.00)	94.74 (82.91–98.74)	96.88 (87.42–100.00)	0.94
CAP	12	18	1	1	92.31 (76.51–98.64)	94.74 (82.91–98.74)	93.75 (83.33–98.73)	0.87
ETH	18	13	1	0	100.00 (93.98–100.00)	92.86 (80.49–98.52)	96.88 (87.42–100.00)	0.94

TP(TruePositive) — істинно позитивний результат; FP(FalsePositive) — хибнопозитивний результат; TN(TrueNegative) — істинно негативний результат. FN(FalseNegative) — хибнонегативний результат. Значення Cohen's Kappa (рівень згоди) може варіювати від -1 до 1: (< 0: відсутність згоди, гірша, ніж випадковість; 0: згода на рівні випадковості; > 0: згода краща за випадковість, причому значення ближче до 1 свідчать про високу згоду).

Таблиця 4

Основні показники клінічної ефективності у порівнянні з даними виробника тест системи DeeplexМус-TB Genoscreen

Протитуберкульозні препарати	Дані верифікації		Дані виробника	
	Чутливість (%)	Специфічність (%)	Чутливість (%)	Специфічність (%)
RIF	100	91.7	99.4	98.8
INH	100	100	98.3	98.4
EMB	93.75	100	92.2	90.7
PZA	100	91.7	85.7	100
MFX	100	100	91.7	99.2
LFX	90	100	91.7	99.2
LZD	NA	96.9	NA	100
CFZ	NA	100	NA	NA
BDQ	NA	100	NA	NA
AMK	100	94.7	100	100

Таблиця 5

Показники прогностичної цінності результатів досліджень нового методу цСНП в порівнянні з існуючими методами фТМЧ та гТМЧ

При фТМЧ	Препарат	RIF	INH	EMB	PZA	MFX	LFX	LZD	CFZ	BDQ	AMK	CAP	ETH
	PPV (%)		95,5	100	100	94,4	100	100	NA	NA	NA	93	-
NPV (%)		100	100	94,1	100	100	95,7	100	100	100	100	-	-
При гТМЧ	PPV (%)	95,5	100	-	-	88,9	88,9	-	-	-	92,9	92,3	94,7
	NPV (%)	100	100	-	-	95,7	95,7	-	-	-	100	94,7	100

PPV — частка правильних результатів діагностичного тесту з істиною резистентністю до ПТП або групи ПТП, тобто він виявляє наскільки ймовірним є те, що отриманий результат резистентності є істиною резистентним в цієї вибірці.

Формула розрахунку:

$$PPV = TP/TP + FP \times 100.$$

NPV — частка правильних результатів діагностичного тесту з істиною чутливістю до ПТП або групи ПТП, тобто він виявляє наскільки ймовірним є те, що отриманий результат чутливості є істиною чутливим в цієї вибірці.

Формула розрахунку:

$$NPV = TN/TN + FN \times 100.$$

Як видно з табл. 5, метод цСНП продемонстрував точність при порівнянні з фТМЧ, з показниками PPV \geq 94,4 % та NPV \geq 94,1 % для більшості препаратів. Для таких препаратів, як RIF і INH, PPV становить 95,5 % та 100 % відповідно, а NPV — 100 %. Що свідчить про порівняну ефективність цСНП із фТМЧ у визначенні резистентності *M. tuberculosis* до основних ПТП.

Порівняння цСНП із гТМЧ — GeneXpert показало точність для препаратів, PPV від 88,9 % до 100 % та NPV від 94,7 % до 100 %.

Висновки

1. Кількість виділеної ДНК *M. tuberculosis* для постановки цСНП залежить від бактеріального навантаження мазка: при КСБ3+ (високе навантаження) чутливість становила 100 %, при КСБ2+ (середнє) — 90,0 %, а при

КСБ1+ (низьке) — 70,0 %.

2. Ключовим фактором для отримання послідовності з повним охопленням усіх цільових ділянок є якість як зразка мокротиння, так і геномної ДНК *M. tuberculosis* після екстракції. Наявність достатньої кількості бактерій (геномів *M. tuberculosis*) для ампліфікації мішені є необхідною для молекулярного тесту. Низьке охоплення мішеней призводить до отримання обмеженої інформації про резистентність звіту, що ускладнює прийняття рішень щодо використання ПТП. Тому бациллярність зразка, як і у більшості діагностичних методів, є ключовим фактором для отримання точних результатів. Отримані результати демонструють ефективність методу для рутинної діагностики зразків, де бактеріальне навантаження оцінюється як КСБ2+ або КСБ3+.

3. В результаті проведеного порівняльного аналізу профілю ЛС *M. tuberculosis* від пацієнтів з МС-ТБ з відомими мутаціями за результатами GeneXpert MTB/Rif Ultra та XDR та визначеною фенотипічною стійкістю до ПТП 1-го і 2-го ряду в системі BACTEC 960 MGIT та результатами ЛС цих *M. tuberculosis*, отриманих за допомогою нового методу цСНП, визначено ефективність нового тесту Deeplex Мус-TB. Мінімальні показники у порівнянні з «золотим стандартом» фТМЧ склали: 90,0 % чутливість, 91,7 % специфічність, загальна точність не нижче 96,9 %.

4. цСНП можна використовувати для визначення резистентності у порівнянні з фТМЧ для препаратів із встановленими даними щодо мутацій, що викликають резистентність (INH, RIF, PZA, FQ та ін'єкційні препарати). Чутливість та специфічність методу у виявленні резистентності *M. tuberculosis* до ПТП відповідала даним, наведеним в інструкції виробника Deeplex Мус-TB. Показники

PPV \geq 94,4 % та NPV \geq 94,1 % демонструють точність та відповідність методу до стандарту фТМЧ.

5. Отримані в дослідженні показники точності та ефективності, дозволяють рекомендувати цСНП, як метод визначення ЛС *M. tuberculosis* до ПТП 1-го та 2-го ряду. Метод верифіковано для застосування на зразках мокротиння.

6. Для нових і перепрофільованих препаратів доказова база мутацій залишається досить обмеженою, що стримує можливості цСНП як незалежного діагностичного методу. Через це країни залишаються залежними від фТМЧ *M. tuberculosis* для цих препаратів. Водночас знання про мутації, що спричиняють резистентність, та мішені для нових і перепрофільованих препаратів продовжують розвиватися.

7. Для швидкої діагностики та ефективного лікування в умовах високого тягаря ЛС-ТБ та керуючись рекомендаціями ВООЗ [6, 7, 11], слід розглянути можливість імплементації цСНП в існуючі гено-фенотипічні алгоритми діагностики ТБ.

Результати дослідження підтверджують доцільність використання цСНП для тестування осаду мокротиння з метою швидкого отримання результату щодо профілю резистентності збудника ТБ до найбільш поширених

ПТП. Це дасть можливість в подальшому для розробки схем раннього та більш ефективного лікування, що сприяє покращенню результатів терапії у пацієнтів із ЛС-ТБ і запобігає передачі високорезистентних штамів ТБ.

Рекомендації

1. При проведенні тестування з визначення ЛС *M. tuberculosis* за допомогою набору реагентів DeeplexMyc-TB чітко виконувати рекомендації виробника.

2. Для тестування методом цСНП використовувати осад мокротиння з градацією мазку не нижче КСБ2+.

3. Для всіх проб, що досліджуються за допомогою тесту цСНП проводити фТМЧ в системі BACTEC 960 MGIT.

4. Проводити постійний порівняльний аналіз результатів фенотипічних досліджень з результатами цСНП досліджень.

5. Якщо виявлені дискордантні результати між фТМЧ і цСНП проводити дослідження культуральних штамів за допомогою повногеномного секвенування *M. tuberculosis*.

6. Необхідно провести додаткові дослідження ефективності методу цСНП по відношенню до нових та перепрофільованих препаратів (BDQ, CFZ, LZD).

ЛІТЕРАТУРА

- Mansoor H, Hirani N, Chavan V et al. Clinical utility of target-based next-generation sequencing for drug-resistant TB. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2023;27(1):41–48.
- Murphy SG, Smith C, Lapiere P et al. Direct detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using targeted next generation sequencing. *Front. Public Health.* 2023. *Sec. Infectious Diseases: Epidemiology and Prevention.* Vol. 11–202 s. doi: 10.3389/fpubh.2023.1206056.
- World Health Organization (WHO). The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide. 2018: (WHO/CDS/TB/2018.19). Licence: CC BY-NC-SA3.0 IGO. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274443/WHO-CDS-TB-2018.19-eng.pdf>.
- World Health Organization (WHO). Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>.
- World Health Organization (WHO). Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance, second edition. 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- World Health Organization (WHO). Use of targeted next-generation sequencing to detect drug-resistant tuberculosis: rapid communication. 2023. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240076372>.
- Deeplex® Myc-TB user manual RUO (V5 - March 2023).
- Наказ МОЗ України від 27.06.2019 р. № 1462 "Про затвердження Інструкції з мікробіологічної діагностики туберкульозу", Київ, 2019.
- Інструкція із застосування Xpert MTB/XDR тест для виявлення ДНК мікобактерій туберкульозного комплексу (*Mycobacterium tuberculosis* complex) з широкою медикаментозною резистентністю, набір на 10 тестів, Cepheid, 2020.
- Фещенко ЮІ, Журило ОА, Барбова АІ та ін. Стандарти операційні процедури для використання при повногеномному секвенуванні *M. tuberculosis* на платформі Illumina MiSeq: навчальний посіб. Київ. 2024;71 с.
- World Health Organization (WHO). WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: diagnosis — rapid diagnostics for tuberculosis detection, third edition. 2024.
- Association of Public Health Laboratories. Issues in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Drug Susceptibility Testing: Ethambutol. APHL. 2022.
- Sonnenkalb L, Strohe G, Dreyer V, et al. Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* Subpopulations and Heteroresistance in a Patient Receiving 27 Years of Tuberculosis Treatment in Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2021;65(7):1–8. doi:10.1128/aac.02520-20.
- Nimmo C, Shaw LP, Doyle R, et al. Correction to: Whole genome sequencing *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum identifies more genetic diversity than sequencing from culture. *BMC Genomics.* 2019;20(389). doi: 10.1186/s12864-019-5841-8.

REFERENCES

- Mansoor H, Hirani N, Chavan V et al. Clinical utility of target-based next-generation sequencing for drug-resistant TB. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2023;27(1):41–48.
- Murphy SG, Smith C, Lapiere P et al. Direct detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using targeted next generation sequencing. *Front. Public Health.* 2023. *Sec. Infectious Diseases: Epidemiology and Prevention.* Vol. 11–202 s. doi: 10.3389/fpubh.2023.1206056.
- World Health Organization (WHO). The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide. 2018: (WHO/CDS/TB/2018.19). Licence: CC BY-NC-SA3.0 IGO. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274443/WHO-CDS-TB-2018.19-eng.pdf>.
- World Health Organization (WHO). Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>.
- World Health Organization (WHO). Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance, second edition. 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- World Health Organization (WHO). Use of targeted next-generation sequencing to detect drug-resistant tuberculosis: rapid communication. 2023. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240076372>.
- Deeplex® Myc-TB user manual RUO (V5 - March 2023).
- Nakaz MOZ Ukraine vid 27.06.2019 r. № 1462 «Pro zatverdzhennia Instruktii z mikrobiologichnoi diagnostiki tuberkulozu»* (Decree of the Ministry of Health of Ukraine dated 06/27/2019 No. 1462 „On approval of the Instructions for microbiological diagnostics of tuberculosis“). Kyiv. 2019.
- Instrukcia iz zastosuvanna Xpert MTB/XDR test dla viyavlennia DNK mikobakterii tuberkuloznoho kompleksu (Mycobacterium tuberculosis complex) z shirokoyu medikamentoznou rezistentnistu, nabir na 10 testiv, Cepheid*. 2020.
- Feshchenko Yul, Zhurilo OA, Barbova AI, et al. *Standartni operatynni proceduri dla vikoristanna pri povnogenomnomu sekvenuvanni M. tuberculosis na platformi Illumina MiSeq: navchalnyi posib* (Standard operating procedures for use in whole-genome sequencing of *M. tuberculosis* on the Illumina MiSeq platform: training manual). Kyiv. 2024;71 p.
- World Health Organization (WHO). WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: diagnosis — rapid diagnostics for tuberculosis detection, third edition. 2024.
- Association of Public Health Laboratories. Issues in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Drug Susceptibility Testing: Ethambutol. APHL. 2022.
- Sonnenkalb L, Strohe G, Dreyer V, et al. Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* Subpopulations and Heteroresistance in a Patient Receiving 27 Years of Tuberculosis Treatment in Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2021;65(7):1–8. doi:10.1128/aac.02520-20.
- Nimmo C, Shaw LP, Doyle R, et al. Correction to: Whole genome sequencing *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum identifies more genetic diversity than sequencing from culture. *BMC Genomics.* 2019;20(389). doi: 10.1186/s12864-019-5841-8.