

Деякі результати аналізу повногеномного секвенування штамів *M. tuberculosis*, які виділені в різних регіонах України

Журило О.А.¹, Чернов О.В.², Барбова А.І.¹, Трофімова П.С.¹, Миронченко С.В.¹

1. ДУ «Національний науковий центр фтизіатрії, пульмонології та алергології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України», м. Київ, Україна

2. Міжнародна організація PATH в Україні, м. Київ, Україна

Обґрунтування. Дослідження методом секвенування нового покоління (СНП) на основі технології NGS швидко переходять з розряду фундаментальних досліджень до розряду застосування в щоденній практиці діагностичних лабораторій для тесту медикаментозної чутливості (ТМЧ), забезпечуючи при цьому перевагу в аналізі всіх мішеней лікарської стійкості (ЛС) штамів *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ). Результати дослідження ЛС МБТ за допомогою СНП корелюють з результатами фенотипового дослідження ЛС МБТ (фТМЧ) у системі BASTEC 960 MGIT для більшості протитуберкульозних препаратів (ПТП) зі встановленими даними щодо мутацій, асоційованих зі стійкістю збудника туберкульозу (ТБ) до INH, RIF, PZA, FQ й ін'єкційних препаратів. Розбіжність існує для нових препаратів – бедаквіліну, деламаміду, претоманіду та перепрофільованого препарату лінезоліду, що пояснюється досить обмеженою доказовою базою мутацій, асоційованих зі стійкістю МБТ до цих ПТП.

Мета. Отримання достовірної інформації щодо генетичного профілю ЛС клінічних ізолятів МБТ з множинною ЛС (МЛС), преширокою та широкою ЛС в Україні, отриманих від пацієнтів з новими випадками та рецидивами за допомогою сучасного методу СНП.

Матеріали та методи. Було досліджено 75 клінічних ізолятів МБТ з колекції лабораторії мікробіології Національного наукового центру фтизіатрії, пульмонології та алергології. Штами були виділені від пацієнтів до початку лікування, з наявною ЛС за результатами фТМЧ у системі BASTEC 960 MGIT. Геному ДНК виділяли за допомогою набору реагентів QIAamp DNA Mini Kit. Бібліотеки для SNP-аналізу готували зі зразків ДНК за допомогою наборів Nextera XT, DNA Sample Preparation Kit, а довжину фрагментів бібліотек визначали за допомогою Fragment Analyzer 5200. Секвенування проводили на платформі MiSeq (Illumina, США). Отримані послідовності штамів МБТ у форматі FASTQ аналізувалися за допомогою автоматизованого інструмента MTBseq, що охоплював такі процедури, як вирівнювання зчитувань до референсного геному МБТ H37Rv (NC_000962.3), перевірка отриманого вирівнювання, а також детекція однонуклеотидних поліморфізмів (ОНП), інсерцій і делецій, що пов'язані з резистентністю до ПТП. Аналіз було виконано на картованих зчитуваннях МБТ шляхом установлення порогу якості із середнім охопленням принаймні 20 і порогом однозначного базового виклику 70,0 %. Мутацію називали тільки тоді, якщо ОНП та/або варіанти індел було виявлено принаймні у 8 зчитуваннях

(прямих і зворотних) з мінімальною оцінкою якості Phred 20 і з огляду на частоту мутацій 75,0 %.

Вивчали мутації в генах, асоційованих з резистентністю до рифампіцину (*rpoB*), ізоніазиду (*katG*, *fabG1*), етамбутолу (*embB*, *embA*), стрептоміцину (*rpsL*), піразинаміду (*pncA*), етіонаміду (*fabG1*, *ethA*), фторхінолонів (*gyrA*), амікацину (*rrs*), канаміцину (*eis*) та інших генів (*mshA*, *mpmR5*, *ald*, *gid*, *ddn*, *tlyA*, *alr*, *ddn*, *fbiB*, *tlyA*), що були виявлені методом СНП, порівняльний аналіз проводили з результатами фТМЧ до цих ПТП, отриманих у системі BASTEC 960 MGIT.

Для 75 штамів МБТ було проведено порівняльний аналіз, що забезпечувався модулями TBjoin, TBamend і TBgroups, які також входять до інструмента MTBseq.

Результати. У ході фТМЧ було отримано такі дані: 72 штами мали МЛС, з них 60 штамів були стійкими до ЕМВ та 48 – до РЗА, 3 штами були стійкими лише до Н. Серед ПТП другого ряду було виявлено стійкість до Q у 52 штамів МБТ, 4 були стійкі до BDQ і 15 – до LZD.

Дані СНП штамів МБТ показали найбільшу кількість ідентичних мутацій, що визначають резистентність до INH у гені *katG*, – p.Ser315Thr (73/75; 93,0 %). У досліджених штамів МБТ другою за частотою визначено мутацію, пов'язану зі стійкістю до RIF, – варіант p.Ser450Leu (60/75; 80,0 %) у гені *rpoB*. 44 ізоляти МБТ (58,6 %) містили мутацію p.Lys43Arg у гені *rpsL*, асоційовану зі стійкістю до стрептоміцину. Рідше траплялися мутації в локусах p.Ala90Val і p.Asp94Tyr генів *gyrA*, *gyrB* (50,0 %), пов'язаних зі стійкістю до Q.

У ході досліджень ми виявили наявність в одному зі штамів мутації c.416G>A в гені *Rv3547*, що відповідає за перехресну резистентність до DLM і РТО. Щодо останнього каталогу мутацій ТБ (2023) дає визначення ungraded для нових і модифікованих препаратів, що пов'язано з малою кількістю виявлених випадків. Подібна ситуація з іншим штамом МБТ, що отримав делецію в кодоні, – c.288delC у гені *Rv3547*. Для цієї мутації також у каталозі є визначення як «асоційований з резистентністю» для DLM.

При порівнянні профілів резистентності, отриманих у результаті фенотипового та генотипового ТМЧ, було виявлено низку відмінностей у моделях стійкості ізолятів. Для препаратів першого ряду узгодженість між двома методами була в межах 3 % для рифампіцину й етамбутолу, 1,0 % для піразинаміду та повністю збігалася для ізоніазиду. Високий рівень конкордантності відзначався також для фторхінолонів, амікацину та капреоміцину – не більш

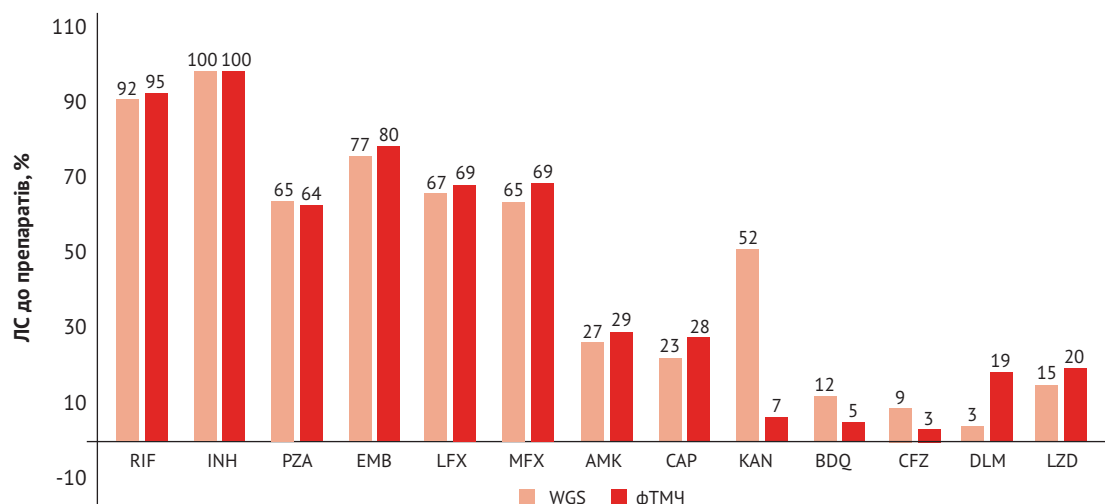


Рис. 1. Порівняння частоти розбіжностей між методами WGS і фТМЧ

як 5,0 %. Протилежна ситуація склалася для канаміцину та нових і перепрофільованих препаратів (BDQ, LZD, DLM і CFZ) з високим рівнем розбіжності результатів тестування двома методами (рис.).

Висновки. Для швидкої діагностики й ефективного лікування в умовах високого тягаря ЛСТБ та з огляду на рекомендації Всесвітньої організації охорони здоров'я дуже перспективною є можливість імплементації СНП

в наявні гено-фенотипові алгоритми діагностики ТБ. Однак на сьогодні для нових і перепрофільованих препаратів доказова база мутацій залишається ще досить обмеженою та стримує можливості СНП як незалежного діагностичного методу. Тому вкрай необхідним є подальше накопичення відповідних даних СНП щодо штамів МБТ з різними варіантами резистентності, що дасть змогу виявити всі мішені ЛС до нових і перепрофільованих ПТП.