

Цільове секвенування: новий підхід у діагностиці туберкульозу

Журило О.А., Барбова А.І., Сладкова Л.М.

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

Обґрунтування. Цільове секвенування (tNGS) – сучасна молекулярно-генетична технологія для виявлення спектра мутацій ДНК клінічно значущих *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), що є основою для своєчасного призначення ефективних схем лікування хворих на туберкульоз (ТБ) та моніторингу специфічної терапії кожного випадку ТБ.

Мета. Використати tNGS для ідентифікації МБТ у клінічних ізолятах і зразках мокротиння. Порівняти його ефективність з такою культурального методу, фенотипового тесту медикаментозної чутливості (фТМЧ), повногеномного секвенування (WGS) та GeneXpert MTB/Rif Ultra.

Матеріали та методи. 75 ізолятів МБТ були відібрані зі штамів, що зберігалися в лабораторії. Крім того, 70 зразків мокротиння, взяті до дослідження, були зібрані від дорослих пацієнтів з підозрою на ТБ. Для культивування використовували системи BACTEC і GeneXpert. Усі ізоляти бактерій були підтверджені як МБТ за допомогою наборів для виявлення антигена MBP 64.

Дослідження з tNGS проводилося з використанням наборів Deeplex Мус-ТБ для виявлення ДНК МБТ та визначення мутацій, асоційованих зі стійкістю до H, R, Eto, Z, E, S, Km, Am, Cap, Lfx, Mfx, Lzd, Cfz та Bdq. tNGS здійснювалося за стандартною операційною процедурою. Аналіз файлів даних секвенування у форматі FASTQ виконано за допомогою застосунку Deeplex Web Application.

Результати. Для 75 клінічних ізолятів МБТ результати чутливості до протитуберкульозних препаратів (ПТП) на підставі фенотипу, WGS та tNGS наведено в таблиці.

Фенотиповий ТМЧ показав, що рівень резистентності клінічних ізолятів МБТ до дев'яти ПТП коливався від 2,7 % (Am) до 46,7 % (H). Згідно з результатами ТМЧ на підставі tNGS рівень резистентності коливався від 5,3 % (Am) до 46,7 % (R, H), а різниця між рівнем резистентності tNGS і фТМЧ у кожному препараті не перевищувала 6,0 %. Для 75 ізолятів МБТ середня відповідність між tNGS і фТМЧ становила 92,3 % для всіх дев'яти препаратів, коливаючись від 66,7 % (Am) до 100 % (H, Mfx, Lfx).

Середня узгодженість між tNGS і WGS у виявленні лікарської стійкості (ЛС) дев'яти препаратів становила 97,02 %. Чутливість і специфічність tNGS у прогнозуванні ЛС МБТ становили, відповідно, 100 та 91,7 % для R, 100 та 100 % для H, 93,8 та 100 %

для E, 96,2 та 100 % для S, 100 та 100 % для Mfx, 100 та 100 % для Lfx, 100 та 94,7 % для Am, 100 та 100 % для Km, 39,1 та 100 % для Eto. Прогностичні значення ЛС, за винятком Am, становили 100 %. Прогностичні значення лікарської чутливості були більшими за 95,0 %, за винятком E й Eto. Більшість ізолятів МБТ, стійких у WGS, але чутливих у tNGS, були зумовлені мутаціями ЛС, виявленими за допомогою WGS, які не були охоплені tNGS.

При комплексному застосуванні різних методів дослідження результативність виявлення МБТ була різною. Зокрема, за допомогою всіх методів дослідження МБТ були виявлені у 27 зразках із 70 проб мокротиння, що становило лише 38,5 % випадків. Подальший аналіз даних показав, що при негативних результатах посіву за допомогою молекулярно-генетичних досліджень у картриджах Xpert MTB/Rif Ultra та методу tNGS одночасно було виявлено додатково ще 15 зразків, які містили МБТ, тобто кількість позитивних результатів збільшилася на 21,4 % порівняно з аналогічними результатами за методом посіву. Лише метод tNGS додатково дав можливість виявити збудник ТБ ще в 14 (20,0 %) зразках мокротиння, що були негативними за результатами рутинних досліджень, які застосовуються в практичних лабораторіях країни для діагностики ТБ. Тобто за допомогою застосованих нами методів дослідження зразків мокротиння на ТБ наявність МБТ було підтверджено у 80,0 % випадків.

Для 75 клінічних ізолятів МБТ tNGS і фТМЧ, а також ТМЧ на підставі WGS показали високу узгодженість із середнім рівнем конкорданції 97,0 %. Утім, усе ж спостерігалися деякі незначні розбіжності, хоча й у невеликій кількості випадків. Основною причиною невиявлення резистентності до ліків за допомогою tNGS, хоча вона була виявлена за допомогою WGS, є те, що деякі рідкісні мутації не включені до мішеней виявлення tNGS. До них належать *rpoB* Leu545Met, *katG* Gly593Asp, *ahpC* -48G>A, *embA* -12C>T, *embB* Asp354Ala тощо. Серед них *rpoB* Leu545Met, *embA* -12C>T й *embB* Asp354Ala спостерігалися в кількох ізолятах *M. tuberculosis*.

Висновки

1. Потенціал tNGS у трансформації рутинної практики в галузі діагностики та лікування ТБ є дуже значимим. Високий рівень відповідності результатів між tNGS та WGS/фТМЧ у поєднанні з його економічною

Таблиця. Чутливість клінічних ізолятів МБТ до ПТП на підставі даних фТМЧ, WGS або tNGS (M±m; n=75)

Препарати	Метод								
	фТМЧ			WGS			tNGS		
	S	R	% стійких	S	R	% стійких	S	R	% стійких
Рифампіцин (R)	44	31	41,3±5,7	39	36	48,0±5,8	40	35	46,7±8,7
Ізоніазид (H)	40	35	46,7±8,7	40	35	46,7±5,7	40	35	46,7±8,7
Етамбутол (E)	58	17	22,7±4,8	51	24	32,0±5,4	57	18	24,0±4,9
Стрептоміцин (S)	49	26	34,7±5,5	47	28	37,3±5,6	48	27	36,0±5,5
Моксифлоксацин (Mfx)	57	18	24,0±4,9	56	19	25,3±5,0	57	18	24,0±4,9
Левовфлоксацин (Lfx)	57	18	24,0±4,9	56	19	25,3±5,0	57	18	24,0±4,9
Амікацин (Am)	73	2	2,7±1,9	72	3	4,0±2,3	71	4	5,3±2,6
Канаміцин (Km)	72	3	4,0±2,3	71	4	5,3±2,6	71	4	5,3±2,6
Етіонамід (Eto)	71	4	5,3±2,6	63	12	16,0±4,2	70	5	6,7±2,9

Примітки: R – МБТ, резистентні до ПТП; S – МБТ, чутливі до ПТП.

ефективністю свідчить про те, що tNGS може бути конкурентоспроможною альтернативою та здатний призвести до зміни основних напрямів діагностики ТБ в майбутньому: замість того, щоб покладатися на послідовне тестування на ЛС МБТ, одностадійна комплексна оцінка може спростити діагностичний процес.

- Одностадійна комплексна оцінка має кілька клінічних переваг: вона сприяє ранньому виявленню ТБ

та його профілів резистентності, забезпечує широке охоплення мішеней резистентності для широко використовуваних клінічних препаратів.

- Рекомендації Всесвітньої організації охорони здоров'я щодо використання tNGS забезпечують ефективний напрям для його впровадження та просування, тим самим прискорюючи клінічне застосування tNGS у діагностиці ТБ і ЛС *M. tuberculosis*.