

# Ю. А. Чередник, О. А. Журило, А. І. Барбова, О. В. Павлова МОЖЛИВОСТІ ТЕХНОЛОГІЇ СЕКВЕНУВАННЯ НОВОГО ПОКОЛІННЯ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СТІЙКОСТІ ШТАМІВ *M. TUBERCULOSIS* ДО АНТИМІКОБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України» Міжнародна організація PATH в Україні

## ВОЗМОЖНОСТИ ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ШТАМОВ *M. TUBERCULOSIS* К АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Ю. А. Чередник, А. А. Журило, А. И. Барбова, О. В. Павлова

Резюме

**Цель работы** — проанализировать возможности и информативность технологии секвенирования нового поколения в варианте таргетного секвенирования панели генов, отвечающих за лекарственную устойчивость к широкому спектру антимикобактериальных препаратов с аналитическим решением пакета Deeplex Myc-TB для использования в клинической практике.

**Материалы и методы.** ДНК *M. tuberculosis* выделяли из 22 культур, полученных на среде Левенштейна-Йенсена с помощью набора QIAamp® DNA Mini Kit. Набор Deeplex Myc-TB использовали для амплификации таргетной панели. Секвенирование производили на платформе Illumina (MiSeq, NextSeq 500, Nextera XT набор для приготовления библиотек). 15 изолятов от украинских больных туберкулезом легких охарактеризованы также с помощью ПЦР-метода ETR-VNTR типирования по локусам ETR (Exact Tandem Repeats) A, B, C, D, E.

**Результаты.** По данным секвенса из 15 украинских изолятов *M. tuberculosis* 9 (60,0 %) обладали множественной медикаментозной устойчивостью, 4 (27 %) — имели профили широкой лекарственной устойчивости. Все MMC- и ШМС-штаммы имели идентичные мутации, определяющие устойчивость к рифампицину (*rpoB* S450L) и изониазиду (*katG* S315T). Три штамма дополнительно имели общие мутации, которые приводят к устойчивости к этионамиду (*fabG* C-15T), этамбутолу (*embB* Y334H) и стрептомицину (*rpsL* K88R). Еще одна группа штаммов имела общие мутации в генах устойчивости к этамбутолу (*embB* M306V) и стрептомицину (*rpsL* K43R). Это может свидетельствовать о существовании кластеров штаммов, которые уже устойчивы к этим 5 или 4 препаратам и широко распространены в популяции. Новые мутации с недостаточной информацией об их влиянии на развитие резистентности были обнаружены в генах и регионах, отвечающих за устойчивость к рифампицину, пирразинамиду, этамбутолу, стрептомицину, фторхинолонам, канамицину, амикацину, капреомицину.

**Выводы.** Аналитическое решение Deeplex Myc-TB позволяет получить большой объем весомой информации из маркеров лекарственной стойкости к антимикобактериальным препаратам и ускорить процесс анализа данных. Для решения эпидемиологических вопросов актуальным будет применение дополнительных методов типирования и поиска новых филогенетических маркеров наиболее распространенных в популяции кластеров штаммов *M. tuberculosis*.

**Ключевые слова:** туберкулез, микобактерии туберкулеза, лекарственная устойчивость, полимеразная цепная реакция, секвенирование.

Укр. пульмонол. журнал. 2022;30(1):57–61.

Журило Олександр Анатолійович

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»

Завідувач лабораторії мікробіології і біохімії

Доктор мед. наук, професор

## POSSIBILITIES OF NEW GENERATION SEQUENCING TECHNOLOGY FOR THE DETERMINATION OF RESISTANCE OF *M. TUBERCULOSIS* STRAINS TO ANTIMYCOBACTERIAL DRUGS

Y. A. Cherednik, O. A. Zhurilo, A. I. Barbova, O. V. Pavlova

Abstract

**The aim of the study** was to analyze the possibilities and informativeness of the new generation sequencing technology in the variant of targeted sequencing of the panel of genes responsible for drug resistance to a wide range of antimycobacterial drugs with Deeplex Myc-TB analytical solution for use in clinical practice.

**Materials and methods.** *M. tuberculosis* DNA was isolated from 22 cultures obtained on Levenstein-Jensen medium using the QIAamp® DNA Mini Kit. The Deeplex Myc-TB kit was used to amplify the target panel. Sequencing was performed on the Illumina platform (MiSeq, NextSeq 500, Nextera XT library kit). 15 Ukrainian isolates from patients with pulmonary tuberculosis were also characterized by ETR-VNTR PCR typing methods by ETR loci (Exact Tandem Repeats) A, B, C, D and E.

**Results.** According to the sequence data, out of 15 Ukrainian isolates (from Kyiv city population) *M. tuberculosis* 9 (60.0%) isolates were multi-drug resistant and 4 (27.0%) isolates were characterized by broad drug resistance. All MDR and BDR strains had identical mutations, determining resistance to rifampicin (*rpoB* S450L) and isoniazid (*katG* S315T). Three strains additionally had common mutations that caused resistance to ethionamide (*fabG* C-15T), ethambutol (*embB* Y334H) and streptomycin (*rpsL* K88R). Another group of strains had common mutations in the genes, responsible for resistance to ethambutol (*embB* M306V) and streptomycin (*rpsL* K43R). This may indicate the existence of clusters of strains that are already resistant to these 5 or 4 drugs and prevalent in the population. New mutations with unknown effect on resistance have been found in genes and regions responsible for resistance to rifampicin, pyrazinamide, ethambutol, streptomycin, fluoroquinolones, kanamycin, amikacin, capreomycin, ethionamide.

**Conclusions.** The Deeplex Myc-TB analytical solution provides a wealth of relevant information on antimycobacterial drug resistance markers and speeds up the data analysis process. To address epidemiological issues, it will be important to use additional typing methods and search for new phylogenetic markers of the most common in the population of clusters of *M. tuberculosis* strains.

**Key words:** tuberculosis, mycobacteria tuberculosis, drug resistance, polymerase chain reaction, sequencing.

Ukr. Pulmonol. J. 2022;30(1):57–61.

Oleksandr A. Zhurilo

SI "National institute of phthisiology and pulmonology named by F.G. Yanovsky NAMS of Ukraine"

Head of 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, yurach@ukr.net

За даними ВООЗ, у 2020 р. від туберкульозу (ТБ) померло 1,5 мільйона людей. На сьогодні, на фоні пандемії COVID-19 у всьому світі ТБ є другим інфекційним вбивцею після SARS-CoV-2. Проте, за оцінками ВООЗ, завдяки діагностиці та лікуванню ТБ у період з 2000 по 2020 рр. було врятовано 66 мільйонів життів [17]. Основними елементами глобальних протитуберкульозних програм на сьогодні залишаються раннє виявлення випадків захворювання ТБ, швидке тестування медикаментозної стійкості (МС) *M. tuberculosis* до антимікобактеріальних препаратів (АМБП), тобто постановка тесту медикаментозної чутливості (ТМЧ) та, відповідне даним профілів МС *M. tuberculosis*, лікування хворих [18, 20]. Ефективна організація цих етапів дозволяє значною мірою контролювати поширення, появу та передачу МС до АМБП штамів *M. tuberculosis*. Крім цих заходів, надзвичайно актуальною є розробка нових АМБП, яка триває як в світі, так і в Україні [7]. Сучасним «золотим» стандартом для визначення МС у клінічних штамів *M. tuberculosis* complex залишається ТМЧ до АМБП на основі культурального (бактеріологічного) методу, що визначає МС *M. tuberculosis* до препаратів за фенотипом (фТМЧ). Недоліком методів тестування на основі культури є їхня тривалість, що зумовлено повільним зростанням збудника і потребує від 8 до 12 тижнів при культивуванні на щільному яєчному середовищі Левенштейна-Єнсена (ЛЄ), або від 5 до 42 днів в рідкому середовищі Middlebrook 7H9 [12]. Крім того, відомо, що фТМЧ дає погано відтворювані результати для деяких препаратів, таких як піразинамід (Z), стрептоміцин (S) та етамбутол (E) [19].

На відміну від фТМЧ, молекулярно-генетичне тестування медикаментозної чутливості (гТМЧ) на основі полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) до АМБП, що базується на оброблених зразках пацієнтів, наприклад, тести на основі ПЛР у реальному часі, тести за принципом гібридизації зонду (Line-probe assay), є швидшими, але дозволяють виявити маркери резистентності для обмеженої кількості ліків, тобто їхня аналітична можливість обмежена форматом тесту, тобто, невеликою кількістю вже відомих досліджених мутацій. Крім того, навіть при високій специфічності залишаються можливими хибнопозитивні результати гТМЧ, наприклад, при виявленні резистентності до рифампіцину (R) за допомогою широко застосовуваного тесту Xpert MTB/RIF [16].

Натомість повногеномне секвенування з використанням технологій секвенування нового покоління (СНП, (Next Generation Sequencing, NGS)), як підхід гТМЧ, дає змогу більш комплексно аналізувати пов'язані з резистентністю геномні варіанти та виявляти нові. Кілька досліджень показали гарні результати для прогнозування генотипічної резистентності за допомогою NGS, особливо для найважливіших препаратів I-го ряду — R і ізоніазиду (H) [11]. Слід додати, що використовуючи NGS для прогнозування резистентності, час для отримання результатів можна скоротити до 5 днів, починаючи з отримання первинної культури [5].

Метою даної роботи був аналіз можливостей та інформативності технології секвенування нового покоління у варіанті таргетного секвенування панелі генів,

що відповідають за виникнення медикаментозної стійкості до широкого спектру антимікобактеріальних препаратів, для використання в клінічній практиці.

### Матеріали та методи дослідження

Для досягнення мети було обрано дві групи штамів *M. tuberculosis* — штамів української популяції, зібраних від хворих на ТБ легень центрального і північного регіонів та контрольні лабораторні штамів.

Культивування штамів *M. tuberculosis* і підготовка проб для досліджень. Штами *M. tuberculosis* вирощували на щільному яєчному середовищі ЛЄ при 37 °C [1]. Бактерії ресуспендували у 500 мкл стерильної дистильованої води. Доводили об'єм суспензії до 1,0 мл і вортексували до утворення розчину однорідного кольору та консистенції (розчин повинен був містити близько  $2,0 \times 10^9$  бактеріальних клітин, що відповідає 6,0 од. за McFarland). 1,0 мл гомогенної суспензії переносили в 1,5 мл пробірку, центрифугували при 5000 rpm протягом 5 хв. Осад бактерій інактивували при 80 °C протягом 30 хв. Клітини ресуспендували у 180 мл лізуючого буфера з 20,0 мг/мл лізоциму. Інкубували 18 годин при 37 °C.

Виділення ДНК *M. tuberculosis* проводили набором QIAamp® DNA Mini Kit згідно інструкції фірми-виробника. Концентрацію ДНК вимірювали на спектрофотометрі Denovixi Quantus.

Ампліфікація таргетної панелі проводилась за допомогою набору Deeplex Muc-TB (Genoscreen, Lille, France). Ампліфікацію проводили згідно інструкції фірми-виробника із залученням негативного, внутрішнього та позитивного контролів. Очищення ампліконів виконували за допомогою магнітних кульок Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Кількісний аналіз очищених продуктів ампліфікації виконували за допомогою флуориметра Qubit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

Підготовка бібліотеки ДНК *M. tuberculosis* для секвенування зразків проводилась за допомогою набору Nextera XT DNA library preparation kit згідно протоколу фірми-виробника (support.illumina.com). Для бібліотеки використовували 5,0 мкл вхідної ДНК з концентрацією 0,2 нг/мкл.

Секвенування нового покоління виконували на обладнанні MiSeq з виконанням протоколу нормалізації та денатурації бібліотеки згідно посібника фірми-виробника (support.illumina.com).

ETR-VNTR-типизування проводили аналогічно Frothingham R. et al. [6]. За стандартною схемою ДНК-зразок характеризували сукупністю чисел кількості копій кожного з 5 тандемних повторів (локуси ETR A, B, C, D, E), що виражається в п'ятизначному номері. ПЛР виконували за допомогою Taq-полімерази (Fermentas) у 20,0 мкл реакційної суміші, що містила буфер для полімерази, 300 мкМ dNTP, по 10,0 pmol прямого й зворотного праймерів для кожного з локусів, 1 од. Taq-полімерази і досліджувану ДНК.

### Результати та обговорення

Для аналізу штамів *M. tuberculosis* за допомогою технології NGS обрали підхід мультилокусного таргетного секвенування з аналітичним рішенням пакету Deeplex

Мус-ТВ. Панель цього пакету включає 20 генних мішеней, що задіяні у виникненні МС бактерій до 13 АМБП, у тому числі лінезоліду (Lzd), клофазиміну (Clm) та нового препарату — бедаквіліну (Bdq) [13].

Визначення належності штаму до *M. tuberculosis complex* відбувається за послідовністю гену *hsp65*. Також панель включає CRISPR-локус, який дозволяє типувати штам за певним споліготипом [22]. Додаткову філогенетичну інформацію дозволяють отримати нейтральні поодинокі нуклеотидні поліморфізми (ПНП), що містяться у генах, які задіяні у виникненні МС до АМБП. Зручне використання пакету Deeplex Мус-ТВ для обробки результатів, що включає аналіз сиквенсів та клінічну інтерпретацію, дозволяє максимально швидко обробити результати секвенування. Загалом процедура секвенування без урахування часу вирощування культури *M. tuberculosis* на щільному середовищі ЛЕ займає 5 днів.

З 22 культур 15 штамів *M. tuberculosis* були представлені українськими ізолятами, що були отримані від хворих на ТБ легень та 6 штамів *M. tuberculosis* були отримані з Супранациональної лабораторії (м. Мюнхен, Німеччина) з визначеною МС [банк колекційних штамів *M. tuberculosis* (Німеччина)] та 1 штам *M. bovis*-BCG.

За даними секвенування гену *hsp65* всі ізоляти підтвердили свою належність до бактерій *M. tuberculosis complex*. ДНК штаму *M. bovis*-BCG була коректно ідентифікована як приналежна до виду *M. bovis*. 5 ПНП-типів та 7 індивідуальних і один невизначений споліготипи були виявлені для всіх ізолятів.

Контрольні зразки колекційних штамів *M. tuberculosis* містили: 1 — тотально-резистентний штам [(тотальна медикаментозна стійкість (ТМС-ТДР)), 1 — повністю чутливий (лабораторний штам *M. tuberculosis H37Rv*), 2 — мультирезистентних штамів (MDR) та 2 штамів з унікальними профілями резистентності, які були підтверджені секвенуванням. За даними аналізу ПНП контрольні штамів виявили належність до лінії L2 (до якої належить сімейство *Beijing*), L3 (сімейство *Delhi/CAS*), “other than *H37Rv*” (обговорення нижче) та 1 ізолят не виявив групоспецифічних ПНП.

За даними сиквенсу, з 15 українських ізолятів *M. tuberculosis* 9 (60,0 %) мали ознаки штамів з множинною медикаментозною стійкістю (ММС-штами), 4 (27,0 %) штамів мали профілі широкої медикаментозної стійкості (ШМС-штами), 1 штам характеризувався МС лише до одного препарату — Н та 1 штам мав унікальний профіль з МС до 4-ох препаратів з унікальними «неохарактеризованими» мутаціями. Усі ММС- та ШМС-штами мали ідентичні мутації, що визначають МС до R (*rpoB1* S450L) та H (*katG* S315T). 3-и штамів додатково мали спільні мутації, що спричиняють МС до етіонаміду (Et) (*fabG* C-15T), E (*embB* Y334H) та S (*rpsL* K88R). Ще один підкласер штамів мав спільні мутації у генах МС до E (*embB* M306V) та S (*rpsL* K43R). Це може свідчити про існування кластерів штамів, що вже є стійкими до цих 5 або 4 препаратів і широко розповсюджені у популяції, та ураження пацієнтів цими вже резистентними штамів. У той же час спектр мутацій до Et у гені *ethA* був досить різноманітним, що може свідчити про виникнення МС вже впродовж періоду лікування. Схожий профіль мутацій був

виявлений у популяції південного регіону України [8]. Автори роблять висновки по те, що виявлений характер профілів мутацій, які визначають резистентність, додає Україну до списку країн, де нещодавно запропонований стандартний швидкий режим лікування ММС ТБ не буде ефективним [9].

Загалом, 9 штамів *M. tuberculosis* (60,0 %) містили неохарактеризовані мутації з недостатньою інформацією щодо їхнього впливу на розвиток резистентності. З них у 3 штамів були мутації до 1-го препарату (монорезистентні штамів), у 4 штамів — до 2-ох, по 1-ому штаму містили нові мутації до 3-ох і до 4-ох препаратів (полірезистентні штамів). Співставлення цих даних з клінічною інформацією пацієнтів надасть вагомої інформації щодо причин виникнення цієї МС. 13 типів нових мутацій було виявлено загалом. В генах, що відповідають за МС до препарату I-го ряду R, було виявлено 3 неохарактеризовані мутації (*rpoB1* I480V, V496A та *rpoB2* R273C), проте вони доповнювали мутацію з сильною асоціацією до МС (*rpoB1* S450L). Вплив цих нових мутацій на підвищення, або зниження ступеню МС до препаратів наразі не відомий. Нові мутації були виявлені у генах та регіонах, що відповідають за МС до Z, Et, S, фторхинолонам (Q), канаміцину (Km), амікацину (Am), капреоміцину (Cm), E. Ці дані є вагомими для уточнення впливу мутацій на розвиток фенотипічної резистентності і поповнення світової бази даних та бази даних українських ізолятів, для чого необхідним є постановка фТМЧ за допомогою панелі мінімальних інгібуючих концентрацій препаратів.

Серед українських ізолятів один штам *M. tuberculosis* (uk#24) з ШМС мав також мутацію, що характеризується високою асоціацією з МС до Lzd. Ще один штам (uk#30) виявив присутність у культурі певної долі (від 40,0 до 60,0 %) штаму з мутаціями у локусах, що відповідають за МС до Clm і новому антибіотику Bdq — явище гетерозиготності. Роль мутацій у генах, пов'язаних із фенотипічною МС до Bdq у штамів *M. tuberculosis complex*, недостатньо охарактеризована. У роботі Battaglia та ін. було показано, що мутації, пов'язані з резистентністю до Bdq і деламаніду (Dlm), різноманітні та розподілені по всій області відповідних генів-мішеней. 61 унікальна мутація була виявлена для Bdq. Важливо, що всі штамів, які мали мутації, що спричиняють резистентність до цих 2-ох препаратів, були виділені від пацієнтів, які, з великою ймовірністю, ніколи не стикалися з цими ліками [4].

Більшість ізолятів української групи (14 з 15, або 93,0 %) за даними SNP-типів показали належність до другої лінії (L2) *M. tuberculosis complex*. Один штам (uk#36) мав SNP-тип, що дозволяє віднести його до великої гетерогенної групи, що виключає тільки підгрупу L4.9, до якої належить контрольний штам *H37Rv* (за термінологією Deeplex Мус-ТВ — “other than *H37Rv*”). Споліготипування конкордантно відносить всі штамів лінії L2 до сімейства *Beijing*, а штам uk#36 — до сімейства T1 (SIT53), яке ймовірно належить до лінії L4. Проте за даними сучасного детального аналізу ізоляти SIT53 були згруповані в різних віддалених сімействах, таких як *Ghana*, *NEW-1* (L4.5), *TUR* (L4.2.2.1) тощо, і багато з них залишалися неклаифікованими в межах L4 [10]. Ці дані ми розглянули у контексті генотипічної структури київ-



Таблиця

**Унікальні заміни двох незалежних штамів *M. tuberculosis* української популяції з однаковим профілем генетичної медикаментозної стійкості**

| Препарат     | Піразинамід                  |                    |                      | Етамбутол                    |                    |                      |
|--------------|------------------------------|--------------------|----------------------|------------------------------|--------------------|----------------------|
| Ген          | <i>rpsA</i>                  |                    |                      | <i>embB</i>                  |                    |                      |
| Штам         | зміна кодону (%)             | зміна амін-кислоти | достовірність з фТМЧ | зміна кодону (%)             | зміна амінокислоти | достовірність з фТМЧ |
| <i>uk#22</i> | ACC177CCC<br>(99.8866213152) | T177P              | н/д                  | TAC334CAC<br>(99.9191218949) | Y334H              | н/д                  |
| <i>uk#31</i> | GGC105GTC<br>(99.5430160938) | G105V              | н/д                  | AAT296CAT<br>(99.8805970149) | N296H              | н/д                  |

Примітка: н/д — неохарактеризовані мутації, або мутації, для яких потрібна додаткова інформація.

ської популяції штамів *M. tuberculosis*, яка була виявлена за даними аналізу вибірки 2006–2011 рр. [2].

За попереднім аналізом генотипів київської популяції штамів *M. tuberculosis* вибірки 2006–2011 рр. 56,7 % становили штами ПГГ-1, 29,2 % — ПГГ-2 і 14,2 % — ПГГ-3 [2]. Принципові генотипові групи були виділені на основі нейтральних поліморфізмів *katG463* та *gyrA95* та застосовувались для швидкого і спрощеного типування штамів [3, 14]. Обидва ці гени представлені у панелі Deeplex Мус-ТВ, проте застосування цих поодиноких нуклеотидних поліморфізмів (ПНП) у якості філогенетичних маркерів вже недостатньо точно відображає поділ *M. tuberculosis complex* на генетичні лінії, які були значною мірою уточнені за допомогою даних повногеномного секвенсу та аналізу великої кількості ПНП [9]. За сучасним поділом *M. tuberculosis complex* на основі ПНП штами ПГГ-1 входять до складу ліній L2 та L3, а дуже розвинена лінія L4 включає ПГГ-3. ETR-VNTR-типування *M. tuberculosis* київської популяції встановило, що найрозповсюдженішими генетичними варіантами, є підсімейства ПГГ-1 *Beijing* (42435) та ПГГ-2 *LAM* (22232) (L4). Таким чином, у нашу невелику нерепрезентативну вибірку 2021 р. потрапили представники двох найбільш представлених сімейств за даними аналізу вибірки 2006–2011 рр, що може свідчити про зберігання загальної структури популяції. У 2006–2011 рр. 92,6 % штамів *M. tuberculosis*, що належали до ПГГ-1, становили штами сімейства *Beijing*, в рамках якого за допомогою 5-и VNTR-локусів можна було виділити 3-и дуже нерівномірні підтипи з абсолютним домінуванням підтипу 42435. Дискримінаційна здатність такого поділу є недостатньою, а групоспецифічне SNP-типування на основі ПНП *katG463* та *gyrA95* загалом лише незначною мірою підвищувало дискримінаційну здатність VNTR-типування на основі 5 ETR локусів.

На основі проведеного вище аналізу можна зробити припущення, що дискримінаційна здатність філогенетичної панелі пакету Deeplex Мус-ТВ на основі споліготикування та обмеженого набору ПНП у генах МС до АМБП може бути недостатньою для встановлення впевнених епідеміологічних зв'язків, що є необхідним при розслідуванні вогнищ розповсюдження *M. tuberculosis* та ланцюгів передачі. Підтвердження цьому припущенню ми отримали при аналізі двох ізолятів, що мали ідентичний профіль резистентності (*uk#22* та *uk#31*) (табл.).

Обидва ізоляти належали до сімейства *Beijing*, лінії L2, ETR-VNTR-типу 42435 та мали ідентичні мутації, що відповідають за МС до R, H, S, Q та Et, а також неохарак-

теризовані мутації у мішенях МС до Z і E, що відображалося при використанні Deeplex ідентичним кольоровим кодом. Більш детальне розглядання неохарактеризованих мутацій показало, що вони зовсім різні і виникли, ймовірно, незалежно.

Виявлена нами в 4-х (27,0 %) українських ізолятах гетерорезистентність (присутність від 3,0 до 60,0 % штамів з мутацією, що спричиняє стійкість) ймовірніше відображає мікроеволюцію збудника в організмі хазяїна під селективним впливом антибіотикотерапії, проте потребує більш детального вивчення цих змін у динаміці [15]. Виявлення туберкульозних мікст-інфекцій та лабораторної крос-контамінації загалом є важливою задачею клінічних бактеріологічних лабораторій [21]. Саме застосування технології геномного секвенування до ізолятів *M. tuberculosis complex*, виділених із клінічних зразків, показало, що інфекція спричиняється скоріше популяцією бактерій *M. tuberculosis complex*, а не окремих гомогенних клонів. Ця гетерогенність може спостерігатись, по-перше, у випадках ураження хворого більш ніж одним штамом, або реактивації попереднього з наступним ураженням іншим штамом і, по-друге, генетична дивергенція може бути результатом випадкових мутаційних процесів вже всередині організму людини з наступним генетичним дрейфом, або селекцією. Проте певна кількість експериментальних помилок, завдяки лабораторній контамінації, не уніфікованому забору зразків, селекції впродовж культивування, а також помилок секвенування можуть вносити вклад у виникнення гетерогенності, але не мати клінічного значення для пацієнта і не відображати складної взаємодії між хазяїном і патогеном [21].

### Висновки

1. Аналітичне рішення Deeplex Мус-ТВ дозволяє отримати великий об'єм вагової інформації з маркерів МС до АМБП та пришвидшити процес аналізу даних завдяки зручному використанню (програмному забезпеченню).

2. У зв'язку із постійним накопиченням нової інформації за допомогою секвенування нового покоління щодо геномних мішеней, задіяних у розвитку МС до АМБП та розробці нових, необхідним є розширення та уточнення панелі цих маркерів.

3. Для вирішення епідеміологічних питань актуальним буде застосування додаткових методів типування та пошук нових філогенетичних маркерів найбільш розповсюджених у популяції кластерів штамів.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Фещенко ЮІ, Журило ОА, Барбова АІ. Лабораторна діагностика туберкульозної інфекції. К.: ВСВ «Медицина». 2019;304 с.
2. Чередник ЮО, Анопрієнко ОВ, Горовенко НГ, та ін. ETR-VNTR та групоспецифічне SNP-типсування штамів *Mycobacterium tuberculosis*, циркулюючих в м. Києві. Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2013;11(2):134–156.
3. Чередник ЮО, Анопрієнко ОВ, Горовенко НГ, та ін. Раннє виявлення та групова ідентифікація штамів *Mycobacterium tuberculosis* за допомогою SNP-аналізу зі шпилькоподібними праймерами. Biopolymers and Cell. 2013;29(5):375–381.
4. Battaglia S, Spitaleri A, Barbova A, et al. Characterization of Genomic Variants Associated with Resistance to Bedaquiline and Delamanid in Naive *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Strains. J. Clin. Microbiol. 2020;58(11):e01304–20. DOI: 10.1128/JCM.01304-20.
5. Dreyer V, Utpatel C, Kohl TA, et al. Detection of low-frequency resistance-mediating SNPs in next-generation sequencing data of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains with binoSNP. Sci. Rep. 2020;10(1):7874. DOI: 10.1038/s41598-020-64708-8.
6. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology. 1998;144:1189–1196. DOI: 10.1099/00221287-144-5-1189.
7. Kovalenko OP, Volynets GP, Rybak MY, et al. Dual-target inhibitors of mycobacterial aminoacyl-tRNA synthetases among *N*-benzylidene-*N'*-thiazol-2-yl-hydrazines. Medchemcomm. 2019;10(12):2161–2169. DOI: 10.1039/c9md00347a.
8. Merker M, Nikolaevskaya E, Kohl TA, et al. Multidrug- and Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Clades, Ukraine, 2015. Emerg. Infect. Dis. 2020;26(3):481–490. DOI: 10.3201/eid2603.190525.
9. Merker M, Kohl TA, Barilar I, et al. Phylogenetically informative mutations in genes implicated in antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex. Genome Med. 2020;12(1):27. DOI: 10.1186/s13073-020-00726-5.
10. Mokrousov I. Ubiquitous and multifaceted: SIT53 spoligotype does not correlate with any particular family of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb). 2021;126(12):102024. DOI: 10.1016/j.tube.2020.102024.
11. Papaventsis D, Casali N, Kontsevaia I, et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of drug resistance: a systematic review. Clin. Microbiol. Infect. 2017;23(2):61–68. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.09.008.
12. Pfyffer GE, Wittwer F. Incubation time of mycobacterial cultures: how long is long enough to issue a final negative report to the clinician? J. Clin. Microbiol. 2012;50(12):4188–4189. DOI: 10.1128/JCM.02283-12.
13. Pym AS, Diacon AH, Tang SJ, et al. Bedaquiline in the treatment of multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis. Eur. Respir. J. 2016;47(2):564–74. DOI: 10.1183/13993003.00724-2015.
14. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997;94:9869–9874. DOI: 10.1073/pnas.94.18.9869.
15. Vargas R, Freschi L, Marin M, et al. In-host population dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* complex during active disease. Elife. 2021;10:e61805. DOI: 10.7554/eLife.61805.
16. Yang S, Wang F, Yang D, et al. Case Report of False Rifampin Resistance with Xpert® MTB/RIF from an HIV Infected Patient. Clin. Lab. 2020;66(11). DOI: 10.7754/Clin.Lab. 2020.200409.
17. World Health Organization. WHO/Tuberculosis/2020 Geneva:WHO; 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>.
18. World Health Organization. WHO/TB/2021 WHO sets up an Advisory Group on TB Diagnostics and Laboratory Strengthening. Geneva:WHO;2021. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-09-2021-who-sets-up-an-advisory-group-on-tb-diagnostics-and-laboratory-strengthening>.
19. World Health Organization. WHO/TB/2015. Implementing tuberculosis diagnostics: policy framework. Geneva:WHO;2015. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/162712>.
20. World Health Organization. WHO/TB/2021. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. Geneva: WHO. 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
21. Wyllie DH, Robinson E, Peto T, et al. Identifying Mixed *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Laboratory Cross-Contamination during Mycobacterial Sequencing Programs. J. Clin. Microbiol. 2018;56(11):e00923–18. DOI: 10.1128/JCM.00923-18.
22. Zhang J, Abadia E, Refregier G, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of “spoligotyping” with new spacers and a microbead-based hybridization assay. J. Med. Microbiol. 2010;59(Pt3):285–294. DOI: 10.1099/jmm.0.016949-0.

## REFERENCES

1. Feschenko Yul, Zhurilo OA, Barbova AI. *Laboratorna diagnostika tuberculoznoi infekcii* (Laboratory diagnosis of tuberculosis infection). — K.: VSV «Medicina». 2019;304 .
2. Cherednik YuO, Anoprienko OV, Gorovenko NG, et al. *ETR-VNTR ta grupospecifichne SNP-tipuvannya shتامiv Mycobacterium tuberculosis, circuлуuich v m. Kyiv* (ETR-VNTR and group-specific SNP typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in Kyiv). *Visnik Ukrainського товариства генетиків і селекціонерів*. 2013 ; 11(2):134–156.
3. Cherednik YuO, Anoprienko OV, Gorovenko NG, et al. *Ranne vyavlennya ta grupova identyfikaciya shتامiv Mycobacterium tuberculosis za dopomogoyu SNP-analizu zi shpilkopodibnimi praimerami* (Early detection and group identification of *Mycobacterium tuberculosis* strains by SNP analysis with hairpin primers). *Biopolymers and Cell*. 2013;29(5):375–381.
4. Battaglia S, Spitaleri A, Barbova A, et al. Characterization of Genomic Variants Associated with Resistance to Bedaquiline and Delamanid in Naive *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Strains. *J. Clin. Microbiol*. 2020;58(11):e01304–20. DOI: 10.1128/JCM.01304-20.
5. Dreyer V, Utpatel C, Kohl TA, Barilar I, et al. Detection of low-frequency resistance-mediating SNPs in next-generation sequencing data of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains with binoSNP. *Sci. Rep*. 2020;10(1):7874. DOI: 10.1038/s41598-020-64708-8.
6. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*. 1998;144:1189–1196. DOI:10.1099/00221287-144-5-1189.
7. Kovalenko OP, Volynets GP, Rybak MY, et al. Dual-target inhibitors of mycobacterial aminoacyl-tRNA synthetases among *N*-benzylidene-*N'*-thiazol-2-yl-hydrazines. *Medchemcomm*. 2019;10(12):2161–2169. DOI: 10.1039/c9md00347a.
8. Merker M, Nikolaevskaya E, Kohl TA, et al. Multidrug- and Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Clades, Ukraine, 2015. *Emerg. Infect. Dis*. 2020;26(3):481–490. DOI: 10.3201/eid2603.190525.
9. Merker M, Kohl TA, Barilar I, et al. Phylogenetically informative mutations in genes implicated in antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Genome Med*. 2020;12(1):27. DOI: 10.1186/s13073-020-00726-5.
10. Mokrousov I. Ubiquitous and multifaceted: SIT53 spoligotype does not correlate with any particular family of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2021;126(12):102024. DOI: 10.1016/j.tube.2020.102024.
11. Papaventsis D, Casali N, Kontsevaia I, et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of drug resistance: a systematic review. *Clin. Microbiol. Infect*. 2017;23(2):61–68. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.09.008.
12. Pfyffer GE, Wittwer F. Incubation time of mycobacterial cultures: how long is long enough to issue a final negative report to the clinician? *J. Clin. Microbiol*. 2012;50(12):4188–4189. DOI: 10.1128/JCM.02283-12.
13. Pym AS, Diacon AH, Tang SJ, et al. Bedaquiline in the treatment of multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis. *Eur. Respir. J*. 2016;47(2):564–74. DOI: 10.1183/13993003.00724-2015.
14. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997;94:9869–9874. DOI: 10.1073/pnas.94.18.9869.
15. Vargas R, Freschi L, Marin M, et al. In-host population dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* complex during active disease. *Elife*. 2021; 10 : e61805. DOI: 10.7554/eLife.61805.
16. Yang S, Wang F, Yang D, Wang L, et al. Case Report of False Rifampin Resistance with Xpert® MTB/RIF from an HIV Infected Patient. *Clin. Lab*. 2020;66(11). DOI: 10.7754/Clin.Lab. 2020.200409.
17. World Health Organization. WHO/Tuberculosis/2020 Geneva:WHO; 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>.
18. World Health Organization. WHO/TB/2021 WHO sets up an Advisory Group on TB Diagnostics and Laboratory Strengthening. Geneva:WHO;2021. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-09-2021-who-sets-up-an-advisory-group-on-tb-diagnostics-and-laboratory-strengthening>.
19. World Health Organization. WHO/TB/2015. Implementing tuberculosis diagnostics: policy framework. Geneva:WHO;2015. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/162712>.
20. World Health Organization. WHO/TB/2021. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. Geneva: WHO. 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
21. Wyllie DH, Robinson E, Peto T, et al. Identifying Mixed *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Laboratory Cross-Contamination during Mycobacterial Sequencing Programs. *J. Clin. Microbiol*. 2018;56(11):e00923–18. DOI: 10.1128/JCM.00923-18.
22. Zhang J, Abadia E, Refregier G, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of “spoligotyping” with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *J. Med. Microbiol*. 2010;59(Pt3):285–294. DOI: 10.1099/jmm.0.016949-0.