

О. А. Журило, О. В. Чернов, А. І. Барбова, М. С. Яременко, Р. Л. Любевич, Л. М. Сладкова ДОСВІД ВПРОВАДЖЕННЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ M. TUBERCULOSIS НА ПЛАТФОРМІ ILLUMINA MiSeq В ЛАБОРАТОРІЇ МІКРОБІОЛОГІЇ І БІОХІМІЇ ННЦ ФПА НАМН УКРАЇНИ

ДУ «Національний науковий 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

ДОСВІД ВПРОВАДЖЕННЯ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ M. TUBERCULOSIS НА ПЛАТФОРМІ ILLUMINA MISEQ В ЛАБОРАТОРІЇ МІКРОБІОЛОГІЇ І БІОХІМІЇ ННЦ ФПА НАМН УКРАЇНИ

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

Резюме

Мета роботи. Отримання достовірної та репрезентативної інформації щодо генетичного профілю лікарської стійкості (ЛС) у клінічних ізолятів МБТ МЛС, преШЛС та ШЛС в Україні, отриманих від пацієнтів з новими випадками та рецидивами за допомогою сучасного методу секвенування нового покоління.

Матеріали і методи. Для дослідження були відібрані зразки з розширеним спектром резистентності за фТМЧ. Відбір штамів відбувався в регіонах поступово і послідовно. Всього було відібрано 75 штамів, серед яких 31 був стійким принаймні до одного з нових препаратів. Повногеномне секвенування було проведено для 3 ІР, 18 МЛС, 38 пре-ШЛС та 16 ШЛС штамів МБТ. Усі штами мають мутації високої достовірності резистентності згідно з каталогом мутацій у *M. tuberculosis* complex (BOO3 (WHO, Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance, 2023)). Аналіз геному проводився за допомогою MTBseq.

Результати та обговорення. Дані фенотипічного дослідження показали високий рівень резистентності МБТ до ПТП І-го і ІІ-го ряду. Для всіх ізолятів МБТ було визначено мутації, пов'язані з резистентністю та порівняно з результатами фТМЧ. Результати повногеномного секвенування 75 ізолятів МБТ показали найбільшу кількість ідентичних мутацій, що визначають резистентність до H у гені *katG* — p.Ser315Thr (73/75; 93,0 %). Другою мутацією, що найбільш часто зустрічалась в досліджених ізолятах МБТ, визначено мутацію пов'язану зі стійкістю до R — варіант p.Ser450Leu (60/75; 80,0 %) у гені *rpoB*. 44 ізоляти МБТ (58,6 %) містили мутацію p. Lys43Arg в гені *rpsL*. Також часто зустрічались варіанти в генах *embA*, *gyrA* *gyrB* та *rrs1*. З мутацій, що асоційовані з ЛС МБТ найбільш часто зустрічалися місенс варіанти, що призводять до амінокислотної заміни в кодованому білку.

При порівнянні профілів резистентності отриманих при фенотипічному та генетичному тестуванні (методом повногеномного секвенування) було виявлено ряд відмінностей в моделях стійкості ізолятів. Для препаратів І-го ряду узгодженість між двома методами була в межах 3-х відсотків для R та E, 1,0 % для Z та повністю співпадала для H. Високий рівень конкордантності відмічався також для Q, Am та Cm — не більше 5,0 %. Протилежна ситуація склалася для Km та нових і перепрофільованих препаратів (Bdq, Lzd, Dlm та Cfz) з високим рівнем розбіжності результатів тестування двома методами.

Серед 75 пацієнтів з ТБ ми виявили, що 69 (92,0 %) були інфіковані штамми МБТ Beijing. 7 ізолятів були класифіковані як такі, що належать до клади Центральноазиатського спалаху (CAO), 33 ізоляти були класифіковані як такі, що належать до Центральноазиатської сублінії (Central Asia), а 28 — як такі, що належать до Europe/Russian W148 Outbreak. Один ізолят з невизначеною сублінією. Решта 6 (8,0 %) пацієнти були інфіковані іншими сублініями МБТ, що належать до генотипу L4 Euro-American: Latin American-Mediterranean (LAM) — 2 ізоляти, ще два ізоляти — Haarlem та один, що належить до сублінії Ural.

Висновки. Дослідження дає інформацію про генотипічну різноманітність сучасних клінічних ізолятів *M. tuberculosis* у хворих на

AN EXPERIENCE IN INTRODUCTION OF M. TUBERCULOSIS WHOLE GENOME SEQUENCING ON ILLUMINA MISEQ PLATFORM IN THE LABORATORY OF MICROBIOLOGY AND BIOCHEMISTRY AT NSC PPA NAMS OF UKRAINE

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

Abstract

The aim: to obtain reliable and representative information on the genetic profile of drug resistance (DR) in clinical isolates of MTB MDR, PRE-WDR and WDR in Ukraine isolated from patients with new cases and relapses using the modern new generation sequencing method.

Materials and methods. Samples with an advanced spectrum of pHMS resistance were selected for the study. The selection of strains took place in the regions gradually and consistently. A total of 75 strains were selected, among which 31 were resistant to at least one of the new drugs. Whole sequencing was performed for 3 IR, 18 MDR, 38 pre-WDR and 16 WDR of MTB strains. All strains have high reliability mutations in accordance with the *M. tuberculosis* Complex (WHO, Catalogue of Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Complex and their association with drug resistance, 2023). The genome analysis was performed using MTBseq.

Results and discussions. The phenotypic examination data showed a high level of resistance MTB to the ATD of the I-st and II-nd line. For all MTB isolates, mutations were related to resistance and pHMS results. The results of whole genome sequencing of 75 MTB isolates showed the largest number of identical mutations that determine the resistance to H in the *katG* - p.Ser315Thr gene (73/75; 93.0 %). The second mutation, which was most commonly found in the MTB studied isolates, was determined by the mutation associated with R - resistant p.Ser450Leu (60/75; 80.0 %) in the *rpoB* gene. 44 MTB isolates (58.6 %) contained a mutation p.Lys43Arg in *rpsL* gene. There were also often options in *embA*, *gyrA* *gyrB* та *rrs1* genes. Of the mutations associated with MTB DR, the most commonly found missense variants that lead to amino acid replacement in coded protein.

When comparing the resistance profiles obtained in phenotypic and genetic testing (whole sequencing method), a number of differences were found in models of insulation stability. For the drugs of the I-line, the consistency between the two methods was within 3 percent for R and E, 1.0 % for Z and completely coincided for H. High level of concordance was also noted for Q, Am and Cm-no more than 5, 0 %. The opposite situation has been for Km and new and re-profiled drugs (Bdq, Lzd, Dlm and Cfz) with a high level of difference in test results in two methods. Among 75 TB patients we found that 69 (92.0 %) were infected with MTB strains Beijing. 7 isolates were classified as belonging to the Central Asian outbreak (CAO), 33 isolates were classified as belonging to the Central Asia Subline (Central Asia), and 28 as those belonging to Europe/Russian W148 Outbreak. One isolate - with an indefinite subline. The remaining 6 (8.0 %) patients were infected with other MTB sublines belonging to the L4 Euro-American genotype: Latin American-Mediterranean (LAM)-2 isolates, two isolates-Haarlem and one belonging to the Ural subline.

Conclusions. The study provides information about the genotypic diversity of modern clinical isolates of *M. tuberculosis* in patients with TB. The prevalence of the Beijing genotype testifies to the stable population structure of the TB pathogen and preserving the trends of high levels of spread of DR forms of infection in Ukraine.

Key words: *M. tuberculosis*, gene-phenotypic diagnostic methods, new generation sequencing.

ТБ. Превалювання генотипу Beijing свідчить про стабільну популяційну структуру збудника ТБ та збереження тенденцій високих рівнів поширення ЛС форм інфекції на території України.

Ключові слова: *M. tuberculosis*, гено-фенотипічні методи діагностики, секвенування нового покоління.

Укр. пульмонолог. журнал. 2025;33(2):25–30.

Журило Олександр Анатолійович
ДУ «Національний науковий центр фтизіатрії, пульмонології та алергології імені Ф. Г. Яновського НАМН 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
<http://orcid.org/0000-0003-3253-6013>

Oleksandr A. Zhurilo
SO "National scientific center of phthisiology, pulmonology and allergology named after F. G. Yanovsky of NAMS 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
<http://orcid.org/0000-0003-3253-6013>

Ukr. Pulmonol. J. 2025;33(2):25–30.

Вступ

Сучасний стан бактеріологічної діагностики туберкульозу (ТБ) характеризується активним впровадженням в практичну діяльність високотехнологічних методів разом з існуючими класичними. Кожен з методів має свою діагностичну нішу, але незрівнянно більший ефект досягається при впровадженні «діагностичного ланцюжка», або алгоритму, що полягає в поєднанні класичних фенотипічних методів з прискореними методами бактеріологічної діагностики та молекулярно-генетичними (МГ) технологіями. Саме такий підхід є раціональним і ефективним та всебічним при бактеріологічній верифікації діагнозу «туберкульоз».

Чи доцільно впроваджувати на сучасному етапі в діагностику ТБ дорогі технології секвенування? Лише кілька років тому метод полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) видавався дорогим і сприймався скептично, поки не була напрацьована достатня доказова база. Поступове здешевлення ПЛР-технологій зробило ПЛР-діагностику ТБ, зокрема з лікарською стійкістю (ЛС), однією з найпоширеніших в Україні.

Також треба віднести і до технології секвенування нового покоління (NGS) і вже сьогодні впроваджувати її у діагностичну практику на базі мікробіологічних лабораторій великих фтизіатричних центрів. І тоді в міру розвитку та вдосконалення технології секвенування NGS у перспективі набудуть широкого поширення. Швидко, протягом кількох днів, отримання в одному тесті повної інформації про збудник сприятиме вдосконаленню діагностики ТБ і, як наслідок, підвищенню ефективності терапії, а також поглибленню знань про біологічні властивості збудника ТБ, що виведе заходи щодо контролю за ТБ на новий рівень.

Дослідження в секвенуванні на основі технології NGS швидко переходять від фундаментальних досліджень до застосування в діагностичних лабораторіях, забезпечуючи перевагу в аналізі всіх мішеней ЛС певного клінічного штаму *M. tuberculosis* [1]. В теперішній час МГ дослідження ЛС *M. tuberculosis* впевнено корелюють з результатами фенотипічного дослідження в системі BACTEC MGIT, де використовується рідке поживне середовище до широкого спектру протитуберкульозних препаратів (ПТП) I-го і II-го ряду, але існує розбіжність для нових препаратів – бедаквіліну (Bdq), деламаніду

(Dlm) та претоманіду (Pa) та перепрофільованого препарату лінезоліду (Lzd), що пояснюється неповним розумінням МГ основи резистентності до цих препаратів. Накопичення даних секвенування штамів *M. tuberculosis* різних варіантів резистентності дозволить виявити всі мішені ЛС [2].

Однією з серйозних проблем світової охорони здоров'я є формування та глобальне поширення туберкульозної інфекції, стійкої до ПТП I-го та II-го ряду, а саме розвиток множинної та широкої ЛС (МЛС та ШЛС). МЛС-ТБ — ТБ з множинною ЛС (раніше використовувався термін МРТБ): стійкість, як мінімум до ізоніазиду (H) та рифампіцину (R). ШЛС-ТБ — ТБ з широкою ЛС (раніше використовувався термін «туберкульоз з розширеною медикаментозною стійкістю» (PP-ТБ): стійкість до будь-якого фторхінолону (Q) та як мінімум до одного з додаткових препаратів групи A (Bdq та/або Lzd) у доповнення до множинної ЛС або рифампіцин-резистентного ТБ.

Первинним механізмом придбання резистентності у *M. tuberculosis* є накопичення одонуклеотидних замін (single nucleotide polymorphism, SNP) у генах, що кодують білки, що є мішенями ПТП, або в ферментах, що утилізують ці антибіотики [4]. Однією з причин розвитку ЛС є селективний відбір носіїв мутації при неадекватному лікуванні ТБ, а також передача штаму збудника ТБ, що мутував, від людини до людини. Математична модель передачі збудника свідчить про те, що передача ЛС штамів від хворих людей здоровим може відігравати ключову роль у процесі глобального виникнення стійких форм ТБ, оскільки такі випадки передачі трапляються в різних країнах, і їх частота коливається від 40,0 до 90,0 %. В Україні високий відсоток МЛС/ШЛС ТБ вказує на важливу роль передачі МЛС/ШЛС штамів від хворих до здорових та насамперед від дорослих до дітей.

МГ вважається найбільш перспективним шляхом до швидкого універсального тестування ЛС збудника ТБ. У 2021 р. під егідою ВООЗ було опубліковано найповніший каталог SNP [5], асоційованих із стійкістю до ПТП, на основі результатів фенотипічного аналізу та повногеномного секвенування 41 137 ізолятів збудника *M. tuberculosis* з 45 країн, у тому числі 1550 штамів (3,8 %), зібраних лабораторією мікробіології та біохімії ННЦ ФПА НАМНУ (м. Київ). Використання цього каталогу надає

доступ до найбільш повної та стандартизованої генотипічної характеристики ЛС, яка і була застосована у цьому дослідженні для унікальної колекції даних повногеномного секвенування штамів *M. tuberculosis* від хворих на вперше діагностований ТБ [6].

Мета роботи — отримання достовірної та репрезентативної інформації щодо генетичного профілю ЛС у клінічних ізолятів *M. tuberculosis* МЛС, преШЛС та ШЛС в Україні, отриманих від пацієнтів з новими випадками та рецидивами за допомогою сучасного методу секвенування нового покоління.

Матеріали та методи

75 клінічних ізолятів *M. tuberculosis* були відібрані з колекцій штамів мікобактерій, що зберігаються в Референс-лабораторії з мікробіологічної діагностики туберкульозу НАМН України. Штами були виділені від пацієнтів до початку лікування, з наявною ЛС за результатами фенотипічного дослідження в системі BACTEC MGIT 960. Зацікавленість визивали штамми зі стійкістю до Bdq, Dlm, Lzd або клофазиміну (Cfm). Усі відібрані штамми були пересіяні на щільне поживне середовище Левенштейна-Єнсена. З культур *M. tuberculosis* з щільного поживного середовища готували завісі відповідно до стандарту McFarland. Зразки з показником каламутності 1.0 McFarland піддавали термічній обробці при температурі 95 °C протягом 30 хв. Геному ДНК виділяли за допомогою набору реагентів QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) відповідно до інструкції виробника. 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 (Agilent). Секвенування проводили в лабораторії мікробіології та біохімії ННЦ ФПА НАМНУ на платформі MiSeq (Illumina, Сан-Дієго, Каліфорнія, США) відповідно до інструкцій виробника. Отримані послідовності штамів *M. tuberculosis* у форматі fastq аналізувались за допомогою автоматизованого інструменту «MTBseq», що включав в себе такі процедури як вирівнювання зчитувань до референсного геному *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3), перевірка отриманого вирівнювання, а також детекцію однонуклеотидних поліморфізмів (ОНП), інсерцій та делецій, що пов'язані з резистентністю до ПТП. Аналіз було виконано на картованих зчитуваннях *M. tuberculosis* шляхом встановлення порогу якості із середнім охопленням принаймні 20 і порогом однозначного базового виклику 70,0 %. Мутацію називали тільки тоді, якщо ОНП та/або варіанти індел були виявлені принаймні у восьми зчитуваннях (прямих і зворотних зчитуваннях) з мінімальною оцінкою якості Phred 20 і враховуючи частоту мутацій 75,0 %.

Гени, асоційовані з резистентністю, аналізували для оцінки фенотипічної резистентності до R (*rpoB*), H (*katG*, *fabG1*), етамбутолу (E) (*embB*, *embA*), стрептоміцину (S) (*rpsL*), піразинаміду (Z) (*pncA*), етіонаміду (Eto) (*fabG1*, *ethA*), Q (*gyrA*), амікацину (Am) (*rrs*), канаміцину (Km) (*eis*), та інші гени (*mshA*, *mmpR5*, *ald*, *gid*, *ddn*, *tlyA*, *alr*, *ddn*, *fbtB*, *tlyA*).

Визначення ліній та субліній *M. tuberculosis* проводилося за допомогою модуля TBstrains, що входить до скла-

ду інструмента MTBseq. Філогенетична класифікація зразків відбувалась відповідно до філогенетично інформативних SNP з літератури. Файл FASTA, створений MTBseq, використовувався як вхідні дані для програми побудови дерева Mega 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, 5).

Для 75 зразків було проведено порівняльний аналіз, що забезпечується модулями TBjoin, TBamend та TBgroups які також входять до інструменту MTBseq.

Результати та обговорення

Штами *M. tuberculosis* виділені від хворих на ТБ легень віком від 18 до 79 років (медіанний вік — 43 р.), з яких 53 хворих (70,7 %) були чоловіки. Відсоток жінок склав 29,3 (табл. 1). Вперше діагностований туберкульоз був діагностований у 61 пацієнта, що склало 81,4 %. Клінічні ізоляти *M. tuberculosis* були представлені різними регіонами України, які наведені в табл. 1. Всі 75 зразків культур *M. tuberculosis* були секвеновані.

Таблиця 1

Базові демографічні дані

Показник	Кількість пацієнтів	
	абс.	%
Медіанний вік хворих, років	43	
Чоловіки	53	70,7
Жінки	22	29,3
Розподіл пацієнтів по регіонах походження:		
м. Київ і Київська область	26	34,7
Кіровоградська область	15	20,0
Харківська область	20	26,6
Миколаївська область	6	8,0
Інші регіони	8	10,7
Розподіл діагнозів за даними фенотипічного тесту медикаментозної чутливості:		
Ізоніазид резистентний туберкульоз	3	4,0
Туберкульоз з множинною лікарською стійкістю (МЛС)	18	24,0
Туберкульоз з пре-широкою лікарською стійкістю (пре-ШЛУ)	38	50,7
Туберкульоз з широкою лікарською стійкістю ШЛУ (%)	16	21,3

Дані фенотипічного дослідження показали високий рівень резистентності *M. tuberculosis* до ПТП I-го і II-го ряду. Всі 75 культур *M. tuberculosis* були стійкими до H, з яких: 71 мала додаткову стійкість до R, 60 стійких до E та 48 до Z. Тобто більшість штамів були резистентними до ПТП I-го ряду.

Серед ПТП II-го ряду була виявлена стійкість до Q у 52 штамів *M. tuberculosis*, 4 були стійкі до Bdq і 15 штамів до Lzd. Крім того, кілька ізолятів були стійкими до Am та капреоміцину (Cm). Було виявлено 3-и тільки H-резистентних штамів *M. tuberculosis*, 18 ізолятів з МЛС-ТБ, 38 зразків мали МЛС та додаткову резистентність до Q – пре-ШЛС та 16 з МЛС стіких до Q плюс резистентними до Bdq або Lzd – ШЛС (табл. 1).

Для всіх ізолятів *M. tuberculosis* було визначено мутації, пов'язані з резистентністю та порівняно з результатами фенотипічного тесту медикаментозної чутливості (фТМЧ). Результати повногеномного секвенування 75

ізолятів *M. tuberculosis* показали найбільшу кількість ідентичних мутацій, що визначають резистентність до H у гені *katG* – p.Ser315Thr (73/75; 93,0 %). Другою мутацією, що найбільш часто зустрічалась в досліджених ізолятах *M. tuberculosis*, визначено мутацію пов'язану зі стійкістю до R – варіант p.Ser450Leu (60/75; 80,0 %) у гені *rpoB*. 44 ізоляти *M. tuberculosis* (58,6 %) містили мутацію p.

Lys43Arg в гені *rpsL*. Також часто зустрічались варіанти в генах *embA*, *gyrA* *gyrB* та *rrs1* (табл. 2).

Слід відмітити наявність в одному зі штамів мутації c.416G>A в гені *Rv3547*, що відповідає за перехресну резистентність до Dlm та Pto. До останнього, каталог мутацій ТБ (2023) дає визначення – ungraded, що пов'язано з малою кількістю виявлених випадків. Подібна

Таблиця 2

Поширення мутацій *M. tuberculosis*, пов'язаних із резистентністю до ліків (WGS, повногеномне секвенування)

Препарат	Ген	Амінокислотна мінливість/Нуклеотидна мінливість (Медикаментозна резистентність – асоціативні мутації)	Тип	Кількість ізолятів
1	2	3	4	5
R	<i>rpoB</i>	p.Ser450Leu (c.1349C>T)	missense variant	60
		p.Asp435Gly (c.1305A>G)	missense variant	1
		p.Asp435Tyr (c.1303G>T)	missense variant	2
		p.His445Leu (c.1334A>T)	missense variant	1
		p.Ser450Trp (c.1349C>G)	missense variant	1
		p.Val170Phe (c.508G>T)	missense variant	1
		p.His445Arg (c.1334A>G)	missense variant	1
		p.Leu430Pro (c.1289T>C)	missense variant	2
		p.Ser441Gln (c.1321_1322delTCinsCA)	missense variant	1
		p.Ser450Ala (c.1348T>G)	missense variant	1
		p.Asn437Asp (c.1309A>G)	missense variant	1
		p.Asp435Val (c.1304A>T)	missense variant	1
		p.His445Asn (c.1333C>A)	missense variant	1
		p.Ser315Thr (c.944G>C)	missense variant	73
H	<i>katG</i> <i>inhA</i>	c.-777C>T	upstream gene	32
		c.-154G>A	upstream gene	2
		c.-770T>C	upstream gene	1
Z	<i>pncA</i>	p.Ala171Glu (c.512C>A)	missense variant	2
		p.Arg154Gly (c.460A>G)	missense variant	1
		p.Asp63Gly (c.188A>G)	missense variant	1
		p.Cys138Tyr (c.413G>A)	missense variant	1
		p.Cys14Arg(c.40T>C)	missense variant	1
		p.Gln10* (c.28C>T)	stop gained	1
		p.Gln141Pro (c.422A>C)	missense variant	1
		p.Gly132Asp (c.395G>A)	missense variant	1
		p.Gly97Val (c.290G>T)	missense variant	1
		p.Leu120Arg (c.359T>G)	missense variant	1
		p.Ile31Ser (c.92T>G)	missense variant	3
		p.Leu159Arg (c.476T>G)	missense variant	2
		p.Leu4Trp (c.11T>G)	missense variant	1
		p.Phe94Ser(c.281T>C)	missense variant	1
		p.Glu173fs (c.517dupG)	frameshift	1
		p.Leu4Ser (c.11T>C)	missense variant	2
		p.Lys96Thr (c.287A>C)	missense variant	1
		p.Thr135Pro (c.403A>C)	missense variant	1
		p.Ser59Pro (c.175T>C)	missense variant	1
		p.Pro62Gln (c.185C>A)	missense variant	1
		p.Ser164Pro (c.490T>C)	missense variant	2
		p.Thr168Pro(c.502A>C)	missense variant	1
		p.Thr142Ala (c.424A>G)	missense variant	2
		p.Val128Gly (c.383T>G)	missense variant	3
		p.Val155Gly (c.464T>G)	missense variant	1
		p.Thr76Pro (c.226A>C)	missense variant	1
		p.Tyr103His (c.307T>C)	missense variant	2
		p.Trp68* (c.203G>A)	stop gained	1
		p.Val125Gly (c.374T>G)	missense variant	1
		p.Thr177Pro (c.529A>C)	missense variant	1
		p.Thr177Pro (c.529A>C)	missense variant	1

1	2	3	4	5
E	<i>embA</i> <i>embB</i>	p.Met306Val (c.916A>G)	missense variant	16
		p.Gly406Asp (c.1217G>A)	missense variant	2
		p.Gly406Ala (c.1217G>C)	missense variant	5
		p.Met306Ile (c.918G>A)	missense variant	5
		p.Tyr319Cys (c.956A>G)	missense variant	3
		p.Tyr319Ser (c.956A>C)	missense variant	1
		p.Tyr319Ser (c.956A>C)	missense variant	1
S	<i>rpsL</i>	p.Lys88Arg (c.263A>G)	missense variant	24
		p.Lys88Met(c.263A>T)	missense variant	1
		p.Lys88Met(c.263A>T)	missense variant	1
Q	<i>gyrA</i> <i>gyrB</i>	p.Ala90Val (c.269C>T)	missense variant	10
		p.Asp94Tyr (c.280G>T)	missense variant	4
		p.Asp94Ala (c.281A>C)	missense variant	3
		p.Glu501Asp (c.1503A>C)	missense variant	1
		p.Ser91Pro (c.271T>C)	missense variant	2
		p.Gly88Cys (c.262G>T)	missense variant	1
		p.Asp94His (c.280G>C)	missense variant	1
		p.Asp94Asn (c.280G>A)	missense variant	4
		c.-10G>A	upstream gene	4
		c.-12C>T	upstream gene	10
Km	Eis	c.-37G>T	upstream gene	4
		c.-14C>T	upstream gene	3
		c.-8delC	upstream gene	1
		c.-8delC	upstream gene	1
		c.-8delC	upstream gene	1
Am	<i>rrs1</i>	a(1401)g	non coding transcript exon	17
		a(1401)g	non coding transcript exon	17
Eto	<i>ethA</i>	p.Arg207Gly (c.619C>G)	missense variant	1
		p.Lys37fs (c.110delA)	frameshift	4
		p.Asn114fs(c.341delA)	frameshift	3
		c.-7T>C	upstream gene	1
		p.Trp256fs (c.768delG)	frameshift	2
		p.Ile337fs (c.1010delT)	frameshift	1
		p.Leu295fs (c.884delT)	frameshift	1
		p.Leu295fs (c.884delT)	frameshift	1
		p.Cys154Arg (c.460T>C)	missense variant	9
Lzd	<i>rplC</i>	p.Cys154Arg (c.460T>C)	missense variant	9

ситуація із ще одним штамом *M. tuberculosis*, що отримав делецію в кодоні — c.288delC в гені *Rv3547*. Для цієї мутації також в каталозі є визначення як «асоційований з резистентністю» для Dlm, тоді як для Pa «несортований».

З мутацій, що асоційовані з ЛС *M. tuberculosis*, найбільш часто зустрічалися місенс варіанти, що призводять до амінокислотної заміни в кодованому білку. Також було виявлено наступні варіанти: upstream gene,

frameshift, stop gained та варіант non coding transcript exon (табл. 2). У табл. 2 наведено 75 ізолятів *M. tuberculosis* з будь-якою ЛС, і кожен ізолят характеризується мутаціями, пов'язаними з ЛС. У табл. 2 перелічено різні препарати та відповідні їм гени з амінокислотними змінами, які пов'язані зі стійкістю до них. Ці препарати включають H, R, E, S, Z, Eto, Q, Am, Km та Lzd. Деякі гени були пов'язані зі стійкістю до більш ніж одного препарату, наприклад, *katG*, *rpoB* та *embB*.

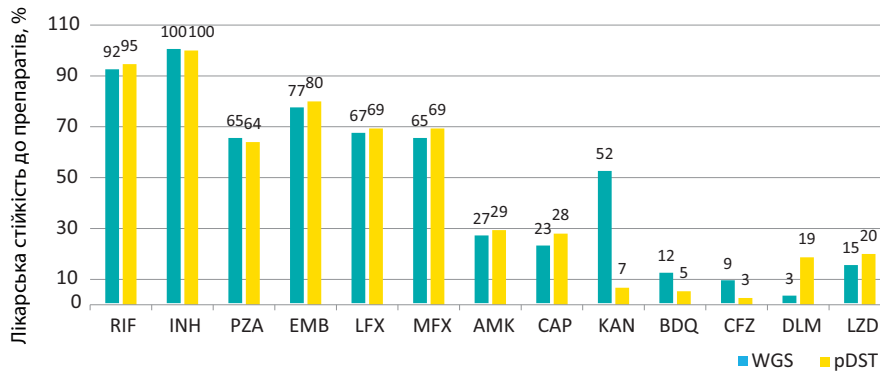


Рис. 1. Порівняння частоти розбіжностей між методами WGS і фТМЧ

Таблиця 3
Розподіл родовидів, отриманий за допомогою інструменту MTBseq

Основна лінія	Сублінії	Кількість ізолятів	
		абс.	%
L2 (Beijing)		69	92,0
	Central Asia	33	
	Europe/Russian W148 Outbreak	28	
	Central Asia outbreak (CAO)	7	
	unkn.	1	
L4 (Euro-American)		6	8,0
	Ural	1	
	Haarlem	2	
	LAM	2	
	unkn	1	

При порівнянні профілів резистентності отриманих при фенотипічному та генетичному тестуванні (методом повногеномного секвенування) було виявлено ряд відмінностей в моделях стійкості ізолятів. Для препаратів I-го ряду узгодженість між двома методами була в межах 3-х відсотків для R та E, 1,0 % для Z та повністю співпадала для H. Високий рівень конкордатності відмічався також для Q, Am та Cm — не більше 5,0 %. Протилежна ситуація склалася для Km та нових і перепрофільованих препаратів (Bdq, Lzd, Dlm та Cfz) з високим рівнем розбіжності результатів тестування двома методами (рис. 1).

Генотипи були ідентифіковані в когорті пацієнтів за допомогою інструменту MTBseq. Отримано перелік фОНП (pSNP) для геномів *M. tuberculosis* (табл. 3). Серед 75 пацієнтів з ТБ ми виявили, що 69 (92,0 %) були інфіковані штамами МБТ Beijing, який відомий своєю високою вірулентністю та асоціацією з ЛС. 7 ізолятів були класифіковані як такі, що належать до клади Центрально-азіатського спалаху (CAO), 33 ізоляти були класифіковані як такі, що належать до Центральноазіатської сублінії (Central Asia), а 28 — як такі, що належать до Europe/Russian W148 Outbreak. Один ізолят з невизначеною

сублінією. Решта 6 (8,0 %) пацієнти були інфіковані іншими сублініями *M. tuberculosis*, що належать до генотипу L4 Euro-American: Latin American-Mediterranean (LAM) — 2 ізоляти, ще два ізоляти — Haarlem та один, що належить до сублінії Ural. Для одного сублінію визначити не вдалося.

При порівнянні профілів резистентності отриманих при фенотипічному та генетичному тестуванні методом повногеномного секвенування було виявлено ряд відмінностей в моделях стійкості ізолятів. Для препаратів I-го ряду узгодженість між двома методами була в межах 3-х процентів для R та E, 1,0 % для Z та повністю співпадала для H. Високий рівень конкордатності відмічався також для Q, Am та Cm не більше 5,0 %. Протилежна ситуація склалася для Km та нових і перепрофільованих препаратів (Bdq, Lzd, Dlm та Clm) з високим рівнем розбіжності результатів тестування двома методами (рис. 1).

Висновки

1. Дослідження дає інформацію про генотипічну різноманітність сучасних клінічних ізолятів *M. tuberculosis* у хворих на ТБ. Превалювання генотипу Beijing свідчить про стабільну популяційну структуру збудника ТБ та збереження тенденцій високих рівнів поширення ЛС форм інфекції на території країни.

2. Об'єднання фенотипічних та молекулярно-генетичних даних дозволило дати більш повну оцінку ЛС ізолятам. Більша частка МЛС була обумовлена мутаціями, які не надають негативного впливу на життєздатність і трансмісивність збудника, що також свідчить про великий епідемічний резервуар штамів *M. tuberculosis* з МЛС/пре-ШЛС, які здатні активно передаватися в популяції.

3. Високо трансмісивні штами Beijing несуть найчастіше поодинокі некомбіновані мутації R і H, пов'язані з високим рівнем резистентності. Накопичення відомих компенсаторних мутацій у МЛС штамів, передбачуваних за таких високих рівнів МЛС-ТБ в Україні, не мали широкого прояву. Це може свідчити про глибокі еволюційні процеси, викликані неадекватною хіміотерапією, які, ймовірно, сформували невідомі компенсаторні механізми в популяції штамів збудника ТБ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Фещенко ЮІ, Журило ОА, Барбова АІ, та ін. Стандартні операційні процедури для використання при повногеномному секвенуванні *M. tuberculosis* на платформі Illumina MiSeq: навчальний посіб. Київ. 2024;71 с.

2. Фещенко ЮІ, Журило ОА, Барбова АІ. Лабораторна діагностика туберкульозної інфекції. К. 2019;304.

3. Фещенко ЮІ, Журило ОА, Барбова АІ, та ін. Стратегічні напрями розвитку лабораторної діагностики туберкульозу в Україні. К. 2017;120.

4. Журило ОА, Барбова АІ. Відомі механізми формування медикаментозної стійкості у *M. tuberculosis* до основних антимікобактеріальних препаратів I-го та II-го ряду. Укр. пульмонолог. журн. 2023;(4):45–55. Режим доступу: <http://www.ifp.kiev.ua/doc/journals/upj/20/pdf20-4/61.pdf>.

5. 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>.

6. 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.

REFERENCES

1. Feshchenko Yul, Zhurilo OA, Barbova AI, et al. *Standartni operatsiyni procedury dlya vykorystannya pry povnogenomnomu sekvenuvanni M. tuberculosis na platformi Illumina MiSeq: navchalniy posib* (Standard Operating Procedures for Use in Whole Genome Sequencing of *M. tuberculosis* on the Illumina MiSeq Platform: A Training Manual). Kyiv. 2024;71p.

2. Feshchenko Yul, Zhurilo OA, Barbova AI. *Laboratorna diagnostyka tuberculoznoyi infektsiyi* (Laboratory diagnostics of tuberculosis infection). K. 2019;304.

3. Feshchenko Yul, Zhurilo OA, Barbova AI, et al. *Strategichni napryamy rozvytku laboratornoyi diagnostyky tuberculozu v Ukraini* (Strategic directions for the development of laboratory diagnostics of tuberculosis in Ukraine). K. 2017;120.

4. Zhurilo OA, Barbova AI. *Vydymy mekhanizmy formuvannya medykamentoznoyi stiykosti u M. tuberculosis do osnovnykh antymikobakterialnykh preparativ I-go ta II-go ryadu* (The mechanisms of drug resistance formation in *M. tuberculosis* to the main antimycobacterial drugs of the first and second lines are known). *Ukr. pulmonol. Journ.* 2023;(4):45–55. Available at: <http://www.ifp.kiev.ua/doc/journals/upj/20/pdf20-4/61.pdf>.

5. 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>.

6. 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.