

О. А. Журило¹, А. І. Барбова^{1,2}, Н. І. Барбова³, Л. М. Сладкова⁴

МЕТОД ЦІЛЬОВОГО (ТАРГЕТНОГО) СЕКВЕНУВАННЯ НАСТУПНОГО ПОКОЛІННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ DEEPLX MYC-TB — ПЕРСПЕКТИВНИЙ ПІДХІД У ДІАГНОСТИЦІ *M. TUBERCULOSIS* ТА ВИЗНАЧЕННІ ЇХ ЛІКАРСЬКОЇ СТІЙКОСТІ

¹ДУ «Національний науковий центр фтизіатрії, пульмонології та алергології імені Ф. Г. Яновського Національної академії медичних наук України»²Референс-лабораторія з мікробіологічної діагностики туберкульозу НАМН України,³ДМСУ «Інститут матері та дитинства МОЗ Республіки Молдова»⁴Дніпровський державний медичний університет

МЕТОД ЦІЛЬОВОГО (ТАРГЕТНОГО) СЕКВЕНУВАННЯ НАСТУПНОГО ПОКОЛІННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ DEEPLX MYC-TB — ПЕРСПЕКТИВНИЙ ПІДХІД У ДІАГНОСТИЦІ *M. TUBERCULOSIS* ТА ВИЗНАЧЕННІ ЇХ ЛІКАРСЬКОЇ СТІЙКОСТІ

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

Резюме

Мета роботи — використати tNGS для ідентифікації МБТ у клінічних ізолятах та зразках мокротиння. Цей метод порівняти з ефективністю культурального методу і фТМЧ, повногеномним секвенуванням (WGS) та GeneXpert MTB/Rif Ultra. Провести оцінку ефективності tNGS у діагностиці ТБ та виявленні генних мутацій, стійких до ліків.

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

Фенотиповий метод і молекулярно-генетичне тестування з використанням системи GeneXpert та картриджів Xpert MTB/Rif Ultra з одночасним виявленням ДНК МБТ-комплексу та визначенням резистентності до R, здійснювались у відповідності до наказу МОЗ України № 1462 від 27.06.2019 р.

Дослідження з tNGS проводилось з використанням наборів Deeplex Myc-TB 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 здійснювали згідно СОПів. Аналіз файлів даних секвенування у форматі FASTQ виконано за допомогою додатку Deeplex Web Application.

Результати. фТМЧ показав, що рівень резистентності *M. tuberculosis* до 9 препаратів коливався від 2,7 % у Am до 46,7 % у H. Згідно з результатами ТМЧ на основі tNGS, рівень резистентності коливався від 5,3 % у Am до 46,7 % у R і H, а різниця між рівнем резистентності tNGS та фТМЧ у кожному препараті не перевищувала 6,0 %. Для 75 ізолятів МБТ середня відповідність між tNGS та фТМЧ становила 92,3 % для всіх дев'яти препаратів, коливаючись від 66,7 % у Am до 100 % у H, Mfx і Lfx.

Середня узгодженість між tNGS та WGS у виявленні ЛС МБТ до дев'яти препаратів становила 97,02 %. Чутливість та 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 та Eto. Більшість ізолятів МБТ, стійких у WGS, але чутливих у tNGS, були зумовлені мутаціями ЛС, виявленими за допомогою WGS, які не були охоплені tNGS.

За допомогою всіх методів досліджень *M. tuberculosis* була виявлена в 27 зразках з 70-ти проб мокротиння, що склало лише 38,5 % випадків. Подальший аналіз даних показав, що при негативних результатах посіву за допомогою МГ досліджень в картриджах Xpert MTB/Rif Ultra та методу tNGS одночасно було виявлено додатково ще 15 зразків, що містили *M. tuberculosis*, тобто кількість позитивних результатів збільшилася на 21,4 % у порівнянні 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 *M. tuberculosis* була виявлена в 80,0 % випадків. У порівнянні з іншими застосованими методами tNGS в 1,3 раза було більш результативним за МГ метод в картриджах Xpert MTB/Rif Ultra в системі Gene Xpert та в 1,3 раза перевищувало рівень позитивних результатів, що були отримані методом посіву.

THE METHOD OF TARGETED NEXT GENERATION SEQUENCE USING THE DEEPLX MYC-TB REAGENT SET — A PROSPECTIVE APPROACH IN DIAGNOSING *M. TUBERCULOSIS* AND DETERMINING ITS DRUG RESISTANCE

О. А. Zhurylo, A. I. Barbova, N. I. Barbova, L. M. Sladkova

Abstract

The aim of the study is to use tNGS to identify MBT in clinical isolates and sputum samples. This method will be compared with the effectiveness of the culture method and fTMS, whole-genome sequencing (WGS) and GeneXpert MTB/Rif Ultra. To evaluate the effectiveness of tNGS in the diagnosis of TB and detection of drug-resistant gene mutations.

Materials and methods. 75 MBT isolates were selected from strains stored in the laboratory.

In addition, 70 sputum samples taken for the study were collected from adult patients with suspected tuberculosis. BACTEC and GeneXpert systems were used for cultivation. All bacterial isolates were confirmed as MBT using MBP 64 antigen detection kits.

The phenotypic method and molecular genetic testing using the GeneXpert system and Xpert MTB/Rif Ultra cartridges with simultaneous detection of MBT-complex DNA and determination of resistance to R were carried out in accordance with the order of the Ministry of Health of Ukraine No. 1462 dated 06.27.2019.

The tNGS study was performed using Deeplex Myc-TB kits to detect MBT DNA and identify mutations associated with resistance to H, R, Eto, Z, E, S, Km, Am, Cap, Lfx, Mfx, Lzd, Cfz and Bdq. tNGS was performed according to SOPs. Analysis of sequencing data files in FASTQ format was performed using the Deeplex Web Application.

Results. fTMS showed that the resistance rate of 9 drugs ranged from 2.7% in Am to 46.7% in H. According to the results of tNGS-based TMS, the resistance level ranged from 5.3% in Am to 46.7% in R and H, and the difference between the resistance rate of tNGS and fTMS in each drug did not exceed 6.0%. For 75 MBT isolates, the average concordance between tNGS and fTMS was 92.3% for all nine drugs, ranging from 66.7% in Am to 100% in H, Mfx, and Lfx.

The average agreement between tNGS and WGS in the detection of drugs of nine drugs was 97.02%. The sensitivity and specificity of tNGS in predicting DR MBT were 100% and 91.7% for R, 100% and 100% for H, 93.8% and 100% for E, 96.2% and 100% for S, 100% and 100% for Mfx, 100% and 100% for Lfx, 100% and 100% for Lfx, respectively. 94.7% for Am, 100% and 100% for Km, and 39.1% and 100% for Eto. The prognostic values of LS, with the exception of Am, were 100%. Predictive values of drug sensitivity were greater than 95.0%, except for E and Eto. The majority of MBT isolates resistant by WGS but susceptible by tNGS were due to DR mutations detected by WGS that were not captured by tNGS.

Using all research methods, MBT was detected in 27 samples out of 70 sputum samples, which accounted for only 38.5% of cases. Further analysis of the data showed that with negative results of culture using MG studies in Xpert MTB/Rif Ultra cartridges and the tNGS method, an additional 15 samples containing MBT were simultaneously detected, i.e. the number of positive results increased by 21.4% compared to similar results by the culture method. Only the tNGS method additionally made it possible to detect the TB pathogen in another 14 (20.0%) sputum samples that were negative according to the results of routine tests used in practical laboratories of the country for the diagnosis of TB. That is, with the help of the methods of testing sputum samples for TB, the presence of MBT was detected in 80.0% of cases. Compared to other applied methods, tNGS was 1.3 times more effective than the MG method in Xpert MTB/Rif Ultra cartridges in the Gene Xpert system and 1.3 times higher than the level of positive results obtained by the seeding method.

The effectiveness of both MG-methods in detecting MBT with resistance to R in sputum samples was identical and amounted to 15.5%. 1.8 times more samples containing R-susceptible MBT were detected by the MG

Результативність обох МГ-методів щодо виявлення *M. tuberculosis* з резистентністю до R в зразках мокротиння була ідентичною та складала 15,5 % . Зразків, що містили чутливі до R *M. tuberculosis*, МГ-методом за допомогою картриджів GeneXpert MTB/Rif Ultra було виявлено в 1,8 раза більше, ніж методом tNGS, 41,4 % та 22,9 % відповідно. Ця різниця показників є статистично достовірною. Основною причиною не виявлення резистентності до ліків за допомогою tNGS, є те, що деякі рідкісні мутації не включені до мішеней виявлення tNGS. До них належать rpoB Leu545Met, katG Gly593Asp, ahpC-48G > A, embA -12 C > T, embB Asp354Ala тощо. Серед них rpoB Leu545Met, embA -12 C > T та embB Asp354Ala спостерігалися нами в кількох ізолятах *M. tuberculosis*. Ці варіанти мутацій можуть бути в перспективі розглянуті для включення в майбутні оптимізації методу tNGS.

Висновки. Потенціал tNGS у трансформації рутинної практики в галузі діагностики та лікування ТБ є дуже значний. Високий рівень відповідності результатів між tNGS та WGS/фТМЧ у поєднанні з його економічною ефективністю свідчить про те, що tNGS може бути конкурентоспроможною альтернативою та призводити до зміни основних напрямів діагностики ТБ в майбутньому: замість того, щоб покладатися на послідовне тестування на ЛС *M. tuberculosis*, одностадійна комплексна оцінка може спростити діагностичний процес.

Одностадійна комплексна оцінка має кілька клінічних переваг: вона дозволяє раннє виявлення ТБ та його профілів резистентності, забезпечує широке охоплення мішеней резистентності для широко використовуваних клінічних препаратів. tNGS демонструє надійну та швидку ефективність у виявленні ТБ та пов'язаної з ним ЛС *M. tuberculosis* і може бути безпосередньо застосовано до клінічних зразків, що позиціонують його як перспективний підхід для лабораторного тестування ТБ.

Ключові слова: цільове (таргетне) секвенування наступного покоління, *M. tuberculosis*, впровадження методу.

Укр. пульмонолог. журнал. 2026;34(2):10–17.

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

<http://orcid.org/0000-0003-3253-6013>

method using GeneXpert MTB/Rif Ultra cartridges than by the tNGS method, 41.4% and 22.9%, respectively. This difference in indicators is statistically significant. The main reason drug resistance is not detected by tNGS is that some rare mutations are not included in the detection targets of tNGS. These include rpoB Leu545Met, katG Gly593Asp, ahpC-48G > A, embA -12 C > T, embB Asp354Ala, etc. Among them, rpoB Leu545Met, embA -12 C > T and embB Asp354Ala were observed by us in several isolates of MBT. These mutational variants may be prospectively considered for inclusion in future optimizations of the tNGS method.

Conclusions. The potential of tNGS to transform routine practice in the field of TB diagnosis and treatment is very significant. The high level of concordance between tNGS and WGS/ftMS, combined with its cost-effectiveness, suggests that tNGS may be a competitive alternative and may lead to a change in the main directions of TB diagnosis in the future: instead of relying on sequential MBT drug testing, a one-step comprehensive assessment may simplify the diagnostic process.

One-step comprehensive assessment has several clinical advantages: it allows early detection of TB and its resistance profiles, and provides broad coverage of resistance targets for commonly used clinical drugs.

tNGS demonstrates reliable and rapid performance in the detection of TB and associated MBT and can be directly applied to clinical samples, positioning it as a promising approach for laboratory TB testing.

Key words: targeted sequencing of the next generation, *M. tuberculosis*, implementation of the method.

Ukr. Pulmonol. J. 2026;34(1):10–17.

Oleksandr A. Zhurilo

SO "National scientific center phthisiology, pulmonology and allergology named after F.G. Yanovskyi 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

Вступ

Нині в світі попри значні успіхи у подоланні туберкульозу (ТБ), рівень захворюваності на цю хворобу знизився лише на 8,7 % з 2015 по 2022 р., і мета подальшого зменшення випадків ТБ на 50,0 % до 2030 р., що оголошена ВООЗ, поки ще є важко досяжною [1]. Ключову роль у вирішенні цієї проблеми на сьогодні відіграє якісна та своєчасна діагностика ТБ, яка є основою ефективного лікування пацієнтів та епідагляду за захворюванням та його профілактикою. Швидке та якісне виявлення циркулюючих штамів *M. tuberculosis* від хворих та визначення їх чутливості до препаратів, є важливим для своєчасного призначення терапії та припинення розповсюдження туберкульозної інфекції. В сучасній мікробіологічній діагностиці ТБ фенотипове тестування щодо виявлення збудника ТБ та визначення його медикаментозної чутливості за допомогою фенотипового методу (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) [2]. Повільний темп росту мікобактерій, що викликають ТБ, складні операційні процедури та суворі вимоги біологічної безпеки при роботі з *M. tuberculosis* роблять методи виявлення на основі культури нездатними в повній мірі задо-

вольнити потребу клініцистів у швидкій верифікації діагнозу «туберкульоз».

Досягнення молекулярної біології за останні десятиліття суттєво вплинули на діагностику ТБ. Сучасні тести молекулярно-генетичної (МГ) діагностики дозволяють не тільки виявити ДНК збудника, а і швидко визначити резистентність до ключових ПТП, завдяки проведенню ампліфікації специфічних ділянок ДНК *M. tuberculosis*. На жаль, жоден швидкий метод, що рекомендований ВООЗ, на сьогодні ще не може використовуватись для виявлення повного спектру резистентності до всіх сучасних ПТП [2]. Хоча методи молекулярної діагностики на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) продемонстрували значне покращення чутливості, специфічності та швидкості виявлення порівняно з методами на основі культури, їхня ефективність обмежена діапазоном генів-мішеней лікарської стійкості (ЛС), які вони можуть ідентифікувати. Крім того, існують відмінності в мішенях виявлення та ефективності різних діагностичних технологій [3]. Наприклад, Xpert MTB/RIF Ultra — це метод виявлення, рекомендований ВООЗ у 2017 р., який має значно вищі можливості виявлення, ніж Xpert MTB/RIF, завдяки використанню багатокопійних інсерційних елементів IS1081 та IS6110 як цільових послідовностей *M. tuberculosis*, і обидва вони мають

подібну ефективність у виявленні резистентності до рифампіцину (R) [4].

Відносно новим та перспективним методом діагностики ТБ та виявлення чутливості його збудника до ПТП є секвенування наступного покоління (СНП) — таргетне секвенування або цільове секвенування (tNGS, або цСНП). цСНП — це потужний сучасний інструмент для виявлення всього спектру мутацій ДНК *M. tuberculosis*, а серед них — усіх клінічно значущих, що є основою для своєчасного призначення ефективних схем лікування хворого на ТБ та моніторингу специфічної терапії кожного випадку. Це має особливе значення для клініцистів 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 цСНП 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 ЛС *M. tuberculosis* [5].

Цільове (таргетне) СНП – це перспективний діагностичний метод ТБ, який дозволяє виявити комплексний профіль резистентності. Цей метод поєднує ген-специфічну ампліфікацію із секвенуванням наступного покоління для виявлення резистентності до кількох препаратів в рамках одного аналізу. Він має численні переваги, включаючи, насамперед, безпосереднє застосування клінічних зразків, незалежно від культури, що виділена з них, та можливість виявлення гетерогенних/мовчазних мутацій [6]. Цей метод є важливим досягненням у діагностичних технологіях та надає можливість швидкого і точного генетичного аналізу та виявлення мутацій, пов'язаних із резистентністю, потребує набагато менше часу, необхідного для методів виявлення резистентності на основі культури [7]. Як метод дослідження, tNGS має набагато більше можливостей щодо виявлення генів вірулентності та/або резистентності, тоді як методи на основі ПЛР можуть охоплювати набагато менший спектр генетичних мішеней. Так, для визначення резистентності до ПТП I-го та II-го рядів, метод tNGS дозволяє виявляти мутації в відповідних генах ЛС, а саме, *katG*, *inhA*, *kasA*, *ndh*, *rpoB*, *embB*, *embC*, *embA*, *pncA*, *rpsL*, *rrs*, *gyrA* та *gyrB* та ін.

У 2021 р. ВООЗ опублікувала каталог мутацій, який є стандартом для інтерпретації молекулярно-генетичної інформації, отриманої при проведенні секвенування збудника ТБ, для прогнозування ЛС *M. tuberculosis* [8]. Оновлена версія його була опублікована в 2023 р. [9].

Розробка швидких цільових геномних панелей для проведення 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 [10].

У відповідності до рекомендацій ВООЗ 2023 р. з використання технології tNGS для виявлення ЛС ТБ, про-

понуються три комерційні продукти, один з яких Deeplex Myc-TB (Genoscreen, Лілль, Франція) [11].

Набір Deeplex Myc-TB є одним з рішень для tNGS. Використовуючи простий автоматизований біоінформаційний 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* [12].

Мета дослідження. Провести ідентифікацію *M. tuberculosis* у клінічних ізолятах та зразках мокротиння з використанням tNGS. Порівняти отримані результати методу tNGS з ефективністю інших молекулярно-генетичних методів дослідження, а саме — методом повногеномного секвенування (WGS) і GeneXpert MTB/Rif Ultra та результатами фенотипового культурального методу і фТМЧ. Провести оцінку ефективності tNGS для діагностики ТБ та виявлення генних мутацій, що асоційовані зі стійкістю до ліків.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження було проведено в лабораторії мікробіології і біохімії Національного наукового центру фтизіатрії, пульмонології та алергології імені Ф. Г. Яновського НАМН України (ННЦ ФПА НАМНУ), яка поєднує діагностичні дослідження, навчання та науково-дослідницьку діяльність. Схема дизайну дослідження показана на рис. 1.

75 штамів *M. tuberculosis* були відібрані із колекції лабораторії, що зберігалися при -80°C . За даними фТМЧ та результатами секвенування, 31 клінічний ізолят *M. tuberculosis* мав стійкість до R, 44 клінічних ізоляти *M. tuberculosis* були чутливими до R за даними секвенування геному.

У дослідження були відібрані 70 зразків мокротиння від дорослих пацієнтів з підозрою на туберкульоз. Об'єм зібраного мокротиння складав приблизно 4,0–4,5 мл. Для аналізу клінічних ізолятів *M. tuberculosis* консервована бактеріальна рідина після розморожування безпосередньо переносилась у пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена для культивування мікобактерій. Після утворення колоній бактеріальної популяції їх збирали та ресуспендували в 1,0 мл буферного розчину, що містить 10 mM Tris-HCl та 1 mM етилендіамінтетраоцтової кислоти. Отриману суспензію інактивували нагріванням при 95°C протягом 10 хв для підготовки зразків до подальшого тестування.

Зібране мокротиння комплексно досліджували. З одного боку проводили фенотипове і молекулярно-генетичне дослідження, з іншого — здійснювали tNGS. Для фенотипового дослідження проводили культивування з подальшим фТМЧ з використанням автоматизованої системи BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, США). Усі виділені мікобактерії були ідентифіковані, підтверджені як *M. tuberculosis* за допомогою імунохроматографічного ідентифікаційного тесту наборів для виявлення антигену MBP 64 (Becton Dickinson, США). Молекулярно-генетичне дослідження здійснювали з осаду мокротиння в системі Gene Xpert (Cepheid, США).

Фенотипові методи, що включали світлову мікроскопію мазків осаду мокротиння, забарвлених за методом Циля-Нільсена, культуральні дослідження в рідкому

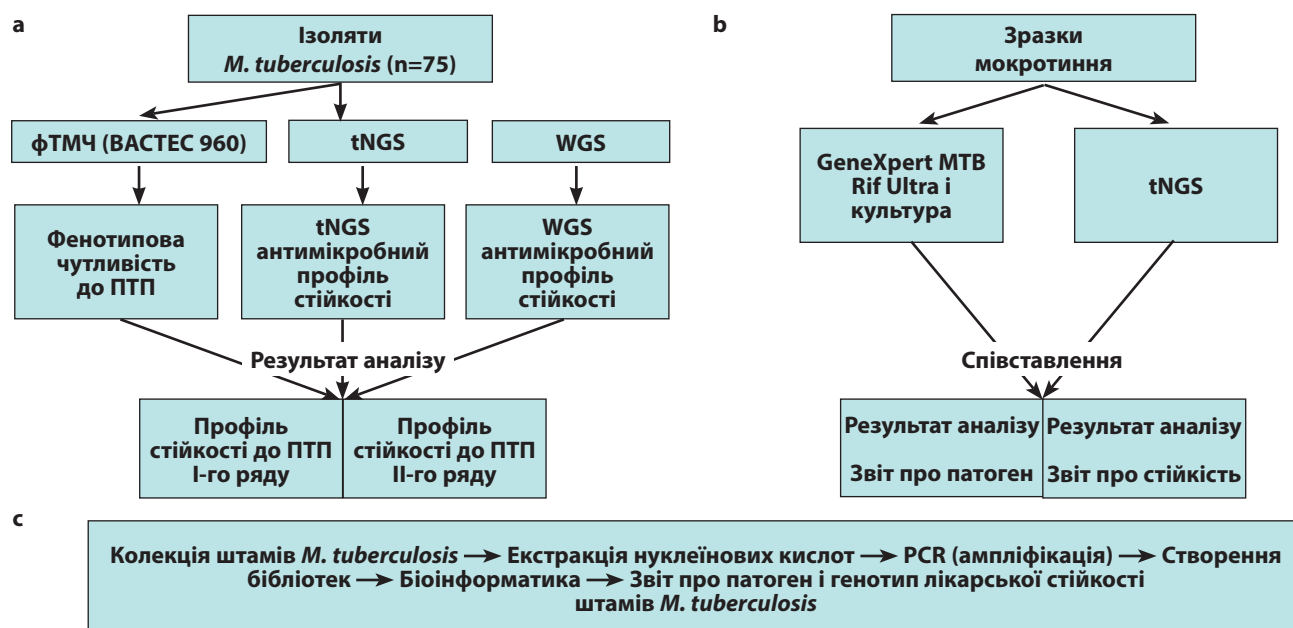


Рис. 1. Порівняльний аналіз та схема робочого процесу діагностики *M. tuberculosis* та виявлення лікарської стійкості.

а — порівняння ефективності tNGS, WGS та фТМЧ у виявленні ЛС на ізолятах *M. tuberculosis*; б — порівняння ефективності між tNGS та Xpert MTB/Rif Ultra щодо ідентифікації генів *M. tuberculosis*, стійких до R, на зразках мокротиння; с — етапи робочого процесу tNGS у рутинній клінічній практиці.

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 I-го та II-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 R, здійснювалися у відповідності до чинного наказу МОЗ України № 1462 від 27.06.2019 р. [13]. Усі 70 зразків мокротиння незалежно від результатів бактеріоскопії були включені до дослідження.

Дослідження з tNGS проводили у відповідності до СОПів, що були розроблені в лабораторії мікробіології і біохімії ННЦ ФПА НАМНУ.

Дослідження з tNGS здійснювали з використанням наборів Deeplex Muc-TB для виявлення ДНК *M. tuberculosis* та визначення мутацій, асоційованих зі стійкістю до ізоніазиду (H), рифамніцину (R), етіонаміду (Eto), піразинаміду (Z), етамбутолу (E), стрептоміцину (S), канаміцину (Km), амікацину (Am), капреоміцину (Cap), левофлоксацину (Lfx), моксифлоксацину (Mfx), лінезоліду (Lzd), клофазиміну (Cfz) та бедаквіліну (Bdq). цСНП проводили за стандартними операційними процедурами [14].

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

Контроль якості та кількості ДНК виконували згідно з СОП «Вимірювання концентрації ДНК за допомогою спектрофотометра Denovix та флюорометра Quantus».

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

Секвенування зразків проводили згідно з 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 розраховували 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 обчислювали за допомогою методу Клоппера-Пірсона. Додатково була обчислена точність та для перевірки узгодженості між методами тестування використовували коефіцієнт Cohen's Kappa.

Робота виконана за кошти держбюджету.

Результати та їх обговорення

Дані чутливості клінічних ізолятів *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів

Для 75 клінічних ізолятів *M. tuberculosis* результати чутливості до ПТП на основі фенотипу, WGS та tNGS наведено в табл. 1.

Фенотиповий ТМЧ показав, що рівень резистентності клінічних ізолятів *M. tuberculosis* до 9 ПТП коливався від 2,7 % у Am до 46,7 % у H. Згідно з результатами ТМЧ на основі tNGS, рівень резистентності коливався від 5,3 % у Am до 46,7 % у R та H, а різниця між рівнем резистентності tNGS та фТМЧ у кожному препараті не перевищувала 6,0 %. Для E та Eto рівень резистентності за даними WGS суттєво відрізнявся від рівня встановленого при фТМЧ та tNGS і дорівнював 32,0 % та 16,0 % відповідно.

Таблиця 1

Чутливість клінічних ізолятів *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів на основі фТМЧ, WGS або tNGS ($M \pm m$; $n=75$)

Препарати	Метод:								
	фенотиповий тест медикаментозної чутливості (фТМЧ)			повногеномне секвенування (WGS)			таргетне/цільове секвенування (tNGS)		
	S	R	% стійких	S	R	% стійких	S	R	% стійких
Рифампіцин	44	31	41,3 $\pm$ 5,7	39	36	48,0 $\pm$ 5,8	40	35	46,7 $\pm$ 8,7
Ізоніазид	40	35	46,7 $\pm$ 8,7	40	35	46,7 $\pm$ 5,7	40	35	46,7 $\pm$ 8,7
Етамбутол	58	17	22,7 $\pm$ 4,8	51	24	32,0 $\pm$ 5,4	57	18	24,0 $\pm$ 4,9
Стрептоміцин	49	26	34,7 $\pm$ 5,5	47	28	37,3 $\pm$ 5,6	48	27	36,0 $\pm$ 5,5
Моксифлоксацин	57	18	24,0 $\pm$ 4,9	56	19	25,3 $\pm$ 5,0	57	18	24,0 $\pm$ 4,9
Левовфлоксацин	57	18	24,0 $\pm$ 4,9	56	19	25,3 $\pm$ 5,0	57	18	24,0 $\pm$ 4,9
Амікацин	73	2	2,7 $\pm$ 1,9	72	3	4,0 $\pm$ 2,3	71	4	5,3 $\pm$ 2,6
Канаміцин	72	3	4,0 $\pm$ 2,3	71	4	5,3 $\pm$ 2,6	71	4	5,3 $\pm$ 2,6
Етіонамід	71	4	5,3 $\pm$ 2,6	63	12	16,0 $\pm$ 4,2	70	5	6,7 $\pm$ 2,9

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

Ефективність tNGS у виявленні лікарської стійкості клінічних ізолятів *M. tuberculosis*

Використовуючи фТМЧ як еталонний стандарт, ми оцінили здатність методів tNGS та WGS виявляти ЛС *M. tuberculosis*. Так, для 75 ізолятів *M. tuberculosis* середня відповідність між результатами tNGS та фТМЧ становила 92,3 % для всіх дев'яти препаратів, коливаючись від 66,7 % у Ам до 100 % у Н, Мфх та Лфх.

Ефективність tNGS у виявленні лікарської стійкості клінічних ізолятів *M. tuberculosis*

Хибнопозитивні результати tNGS, тобто хибна лікарська резистентність *M. tuberculosis*, коливалися від 1 випадку у Н та Км до 5 випадків у Е. Водночас, хибнонегативні результати tNGS, тобто хибна чутливість, коливалися від 0 у Р, Ам та Км до 3 випадків у Н.

Чутливість та специфічність tNGS порівняно з WGS у виявленні ЛС *M. tuberculosis* до дев'яти препаратів наведено в табл. 2. Збіг результатів між tNGS та WGS у виявленні лікарської резистентності *M. tuberculosis* становив біля 97,02 %.

Чутливість та специфічність tNGS у прогнозуванні ЛС *M. tuberculosis* становили відповідно 100 % (83,9–100 %) та 91,7% (61,5–99,8 %) для Р, 100 % (69,2–100 %) та 100 % (89,4–

100 %) для Н, 93,8 % (69,8–99,8 %) та 100 % (79,4–100 %) для Е, 96,2 % (87,0–99,5 %) та 100 % (95,9–100 %) для S, 100 % (80,5–100 %) та 100 % (85,2–100 %) для Мфх, 100 % (80,5–100 %) та 100 % (85,2–100 %) для Лфх, 100 % (75,3–100 %) та 94,7 % (74,0–99,9 %) для Ам, 100 % (59,0–100 %) та 100 % (97,3–100 %) для Км, та 39,1 % (19,7–61,5 %) та 100 % (96,9–100 %) для Ето. Прогностичні значення ЛС, за винятком Ам, становили 100 %. Прогностичні значення лікарської чутливості були більшими за 95,0 % за винятком Е та Ето.

Більшість ізолятів *M. tuberculosis*, стійких за методом WGS, але чутливих за результатами tNGS, були зумовлені мутаціями ЛС, виявленими за допомогою лише WGS. Для Е один ізолят мав мутацію *embB* Met306Leu, виявлену за допомогою WGS. Для фторхінолонів один з ізолятів мав мутацію *gyrA* Asp94Gly, виявлену за допомогою WGS та tNGS і, навпаки, був лише один ізолят, стійкий у tNGS, але чутливий у WGS. Цей ізолят був виявлений за допомогою tNGS як такий, що мав мутацію *rrs* 1402C > T, зареєстровану як стійкість до Ам, але ця мутація не була виявлена за допомогою WGS.

Ефективність tNGS у діагностиці ТБ та виявленні ЛС *M. tuberculosis* на зразках мокротиння

Результативність виявлення *M. tuberculosis* при комплексному застосуванні методів бактеріологічної, молекулярно-генетичної діагностики ТБ та tNGS представлені в табл. 3.

Таблиця 2

Ефективність виявлення лікарської стійкості *M. tuberculosis* методом tNGS у порівнянні з WGS, ($M \pm m$; $n=75$)

Препарат	WGS-чутливі		WGS-стійкі		Співпадіння (%)	Чутливість (%) (95,0 % ДІ)	Специфічність (%) (95,0 % ДІ)	Точність (%) (95,0 % ДІ)
	tNGS-чутливі	tNGS-стійкі	tNGS-чутливі	tNGS-стійкі				
Рифампіцин	39	0	1	35	98,7	100 (83,9–100)	91,7 (61,5–99,8)	96,9 (84,3–99,9)
Ізоніазид	40	0	1	34	98,6	100 (85,1–100)	100 (69,2–100)	100 (89,4–100)
Етамбутол	52	0	5	18	93,3	93,8 (69,8–99,8)	100 (79,4–100)	96,9 (83,8–99,9)
Стрептоміцин	47	0	1	27	98,7	96,2 (87,0–99,5)	100 (95,9–100)	100 (93,0–100)
Моксифлоксацин	55	0	2	18	97,3	100 (80,5–100)	100 (85,2–100)	100 (89,4–100)
Левовфлоксацин	55	0	2	18	97,3	100 (80,5–100)	100 (85,2–100)	100 (89,4–100)
Амікацин	71	1	0	3	98,7	100 (75,3–100)	94,7 (74,0–99,9)	96,9 (83,8–99,9)
Канаміцин	71	0	0	4	100	100 (59,0–100)	100 (97,3–100)	100 (97,3–100)
Етіонамід	63	0	7	5	90,6	39,1 (19,7–61,5)	100 (96,9–100)	89,6 (83,1–94,2)

Таблиця 3

Результативність виявлення *M. tuberculosis* при комплексному застосуванні методів бактеріологічної, молекулярно-генетичної діагностики туберкульозу та tNGS в зразках мокротиння ($M \pm m$; $n=70$)

Методи дослідження	Кількісний результат абс. та ($M \pm m$) %
Посів в системі BACTEC MGIT 960 «+» МГ дослідження в картриджах Xpert MTB/Rif Ultra в системі Gene Xpert «+» tNGS «+»	27 (38,5 $\pm$ 5,8) %
Посів в системі BACTEC MGIT 960 «-» МГ дослідження в картриджах Xpert MTB/Rif Ultra в системі Gene Xpert «+» tNGS «+»	15 (21,4 $\pm$ 4,9) %
Посів в системі BACTEC MGIT 960 «-» МГ дослідження в картриджах Xpert MTB/Rif Ultra в системі Gene Xpert «-» tNGS «+»	14 (20,0 $\pm$ 4,8) %
Посів в системі BACTEC MGIT 960 «-» МГ дослідження в картриджах Xpert MTB/Rif Ultra в системі Gene Xpert «-» tNGS «-»	14 (20,0 $\pm$ 4,8) %

Як видно з табл. 3, при комплексному застосуванні методів дослідження результативність виявлення *M. tuberculosis* була різною. Так, за допомогою всіх методів дослідження *M. tuberculosis* була виявлена в 27 зразках з 70-ти проб мокротиння, що склало лише 38,5 % випадків. Подальший аналіз даних показав, що при негативних результатах посіву за допомогою МГ досліджень у картриджах Xpert MTB/Rif Ultra та методу tNGS одночасно було виявлено додатково ще 15 зразків, що містили *M. tuberculosis*, тобто кількість позитивних результатів збільшилася на 21,4 % у порівнянні з аналогічними результатами за методом посіву. Дані табл. 3 показують, що 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 *M. tuberculosis* була виявлена у 80,0 % випадків.

Проведені дослідження зразків мокротиння від хворих на ТБ із застосуванням комплексу фенотипових, молекулярно-генетичних методів та таргетного секвенування дали можливість нам проаналізувати результативність кожного із використаних методів окремо. Результати аналізу представлені в табл. 4.

З даних табл. 4 очевидно, що результативність застосованих методів дослідження щодо виявлення *M. tuberculosis* у зразках мокротиння була різною і залежала від чутливості кожного з них. Аналіз отриманих даних свідчить про те, що метод tNGS виявився найбільш ефективним — 80,0 % зразків при його застосуванні були позитивними та містили збудник туберкульозу.

У порівнянні з іншими використаними методами tNGS в 1,3 раза був більш результативним за МГ-метод у картриджах Xpert MTB/Rif Ultra в системі Gene Xpert та в 1,3 раза перевищував рівень позитивних результатів, що були отримані методом посіву.

У подальших дослідженнях визначали медикаментозну резистентність *M. tuberculosis*, отриманих з позитивних зразків мокротиння.

Порівняння результатів дослідження медикаментозної стійкості до R МГ-методом із застосуванням картриджів Xpert MTB/Rif Ultra в системі GeneXpert та методом tNGS у 70 зразках мокротиння від хворих на ТБ наведено в табл. 5.

Дані табл. 5 свідчать про те, що результативність обох МГ-методів щодо виявлення *M. tuberculosis* з резистентністю до R в зразках мокротиння була ідентичною та складала 15,5 %. Зразків, що містили чутливі до R *M. tuberculosis*, МГ-методом за допомогою картриджів GeneXpert MTB/Rif Ultra було виявлено в 1,8 раза більше, ніж методом tNGS, 41,4 % та 22,9 % відповідно. Ця різниця показників є статистично достовірною. З результатів табл. 5 видно, що при порівнянні досліджуваних зразків, у яких була виявлена *M. tuberculosis* з невизначеною стійкістю до R, більш результативним виявився МГ-метод дослідження в картриджах Xpert MTB/Rif Ultra, таких зразків було визначено всього 2 (2,9 %), за методом tNGS таких зразків було 29 (41,4 %). Тобто за цим показником у наших дослідженнях метод тестування *M. tuberculosis* в картриджах Xpert MTB/Rif Ultra в більш ніж в 14 разів з високою долею достовірності результатів перевищував можливості tNGS. У цих зразках МГ-методом у картриджах GeneXpert MTB/Rif Ultra нами

Таблиця 4

Показники ефективності методів виявлення *M. tuberculosis* в зразках мокротиння ($M \pm m$; $n=70$)

Методи дослідження	Результат	
	<i>M. tuberculosis</i> «+»	<i>M. tuberculosis</i> «-»
Посів в системі BACTEC MGIT 960	27 (38,5 $\pm$ 5,8) %	43 (61,5 $\pm$ 5,8) %
МГ дослідження в картриджах Xpert MTB/Rif Ultra в системі Gene Xpert	42 (60,0 $\pm$ 5,9) %	28 (40,0 $\pm$ 5,9) %
tNGS	56 (80,0 $\pm$ 4,7) %	14 (20,0 $\pm$ 4,7) %

Таблиця 5

Порівняння результатів дослідження зразків мокротиння МГ-методом в картриджах GeneXpert MTB/Rif Ultra та методом tNGS

Результати тестування зразків мокротиння	Кількість зразків мокротиння, що були досліджені за методами:	
	GeneXpert MTB/Rif Ultra	tNGS
Виявлено <i>M. tuberculosis</i> , резистентність до рифампіцину встановлена	11 (15,7±4,3) %	11 (15,7,1±4,3) %
Виявлено <i>M. tuberculosis</i> , резистентність до рифампіцину не встановлена	29 (41,4±5,9) %	16 (22,9±4,7) %
Виявлено <i>M. tuberculosis</i> , стійкість до рифампіцину не визначена	2 (2,9±2,0) %	29 (41,4±5,9) %
Всього виявлено <i>M. tuberculosis</i>	42 (60,0±8,4) %	56 (80,0±4,7) %
<i>M. tuberculosis</i> не виявлено	28 (40,0±8,4) %	14 (20,0±4,7) %
Всього зразків	70	70

була виявлена занадто низька концентрація збудника ТБ, яка унеможливує визначення резистентності до R методом tNGS.

У проведеному дослідженні використовували клінічні ізоляти *M. tuberculosis* та зразки мокротиння для оцінки цінності застосування tNGS у діагностиці та виявленні ЛС *M. tuberculosis*. Відповідно до останніх рекомендацій ВООЗ «Оперативне керівництво ВООЗ з туберкульозу. Модуль 3: Діагностика — Швидка діагностика для виявлення туберкульозу, третє видання», 2024 р., саме tNGS пропонується використовувати для визначення резистентності до R, H, фторхінолонів, Z та E у пацієнтів з бактеріологічно підтвердженим легеневим туберкульозом, а не фенотиповий ТМЧ на основі культури [16]. Низка досліджень останніх 5 років показала, що tNGS може бути використаний для ідентифікації ТБ та виявлення ЛС *M. tuberculosis* завдяки таким перевагам, як економічна ефективність, точність та гнучкість [17–20]. Незважаючи на це, на сьогодні ще бракує систематичних досліджень, що доводять результативність застосування tNGS у діагностиці ТБ з використанням клінічних ізолятів та зразків мокротиння у порівнянні з культурою, фенотиповим ТМЧ, WGS та Xpert MTB/Rif Ultra.

У нашому дослідженні для 75 клінічних ізолятів *M. tuberculosis* методи tNGS, фТМЧ, а також ТМЧ на основі WGS, показали високу відповідність результатів на рівні 97,0 %. Тим не менш, все ж спостерігалися деякі незначні розбіжності, хоча й у невеликій кількості випадків. Причини невідповідності між tNGS та фТМЧ є такими, що, по-перше, фТМЧ може не виявити низький рівень резистентності до R, H та фторхінолонів; по-друге, фТМЧ до E часто може бути ненадійною; нарешті, tNGS може виявити інші мутації генів, не пов'язані з резистентністю. При цьому, основною причиною не виявлення резистентності до ліків за допомогою tNGS, є те, що деякі рідкісні мутації не включені до мішеней виявлення tNGS. До них належать *rpoB* Leu545Met, *katG* Gly593Asp, *ahpC*-48G > A, *embA* -12 C > T, *embB* Asp354Ala тощо. Серед них *rpoB* Leu545Met, *embA* -12 C > T та *embB* Asp354Ala спостерігалися нами в кількох ізолятах *M. tuberculosis*. Ці варіанти мутацій можуть бути в перспективі розглянуті для включення в майбутні оптимізації методу tNGS.

У відповідності до рекомендацій ВООЗ tNGS використовується частіше за все в клінічних зразках мокро-

тиння для виявлення *M. tuberculosis*. У нашому дослідженні використовувався tNGS для ідентифікації *M. tuberculosis* у 70 зразках мокротиння. Рівень позитивних результатів tNGS (80,0 %) вищий, ніж у Xpert MTB (60,0 %). У світовому масштабі рівень бактеріологічного підтвердження серед людей з діагнозом ТБ у 2022 р. становив лише 63,0 % [21]. Застосування нових технологій діагностики ТБ, включаючи tNGS, може підвищити рівень бактеріологічно підтверджених випадків захворювання. Також важливо зазначити, що ефективність tNGS у виявленні стійкості до R у зразках мокротиння була не такою високою, як в картриджах Xpert MTB/Rif Ultra у нашому дослідженні. У 29 зразках тест на ТБ за допомогою tNGS був позитивним, але результати щодо стійкості до R були «не визначено», і така ситуація спостерігалася у всіх випадках, коли за результатами тесту Xpert MTB/Rif Ultra виявлявся дуже низький рівень ДНК *M. tuberculosis* у відповідних пробах мокротиння. Це пояснюється тим, що tNGS ідентифікує *M. tuberculosis* з використанням багатокопійних генів (IS6110 та IS1081), тоді як резистентність до R виявляється за допомогою однокопійного гена (*rpoB*). Крім того, існує невідповідність у ефективності ампліфікації в різних місцях виявлення. Тому, якщо концентрація *M. tuberculosis* у клінічних зразках низька, це може призвести до неможливості виявлення резистентності до R. Ефективність tNGS тісно пов'язана з платформою секвенування та методами екстракції нуклеїнових кислот. Протокол екстракції нуклеїнових кислот включав як механічне руйнування клітинної стінки, так і подальші методи хімічного лізису для досягнення оптимізованої загальної ефективності та надійності виявлення мутацій ЛС. Також важливо зазначити, що, платформа MiniSeq пропонує низький рівень помилок секвенування, тим самим забезпечуючи точне виявлення мутацій, пов'язаних з ЛС.

Наше дослідження має кілька обмежень.

По-перше, це кількість ПТП, яка обмежувалася 9 лікарськими засобами. У той же час були відсутні бедаквілін, претоманід, лінезолід та інші нові препарати, які включені в лікування MDR-TB. Вони нами не аналізувались, тому, що, на наш погляд, це є передчасним.

По-друге, ретроспективне дослідження проводилося в клінічній лабораторії мікробіології і біохімії ННЦ ФПА НАМНУ, а результати tNGS не передавались ні клініцистам, ні пацієнтам, що не впливало на клінічну діа-

гностику та лікування ТБ і мало лише випробувальне значення.

Нарешті, мішені tNGS у цьому дослідженні не повністю охоплювали комплексні мутації резистентності, зазначені в документі BOOЗ [9]. Майбутні дослідження, які використовуватимуть розширену панель, що охоплює ширший спектр цільових локусів та різноманітні лікувальні втручання, забезпечать більш повне розуміння діагностичної цінності tNGS. Крім того, загальна чутливість виявлення генотипів резистентності нижча, ніж чутливість ідентифікації *M. tuberculosis* (що може бути пов'язано з відсутністю багатокопійних цільових локусів для розробки праймерів та низьким титром *M. tuberculosis* у клінічних зразках мокротиння). Отже, повідомлення як про наявність *M. tuberculosis*, так і про генотипи резистентності може не відбутися одночасно. Щоб усунути це обмеження, необхідні подальші дослідження для розробки методів, що підвищують чутливість виявлення та дозволяють одночасно отримувати відомості як про ТБ, так і про профілі резистентності *M. tuberculosis*. З накопиченням клінічних даних tNGS, оптимізацією мішеней виявлення, розробкою технології секвенування та оптимізацією екстракції нуклеїнових кислот, ефективність tNGS у лабораторному тестуванні ТБ може бути покращена.

ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

- World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report. 2023. <https://iris.who.int/handle/10665/373828>. Ліцензія: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 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 Q. doi:10.5588/ijtld.22.0138.
- Forbes BA, Hall GS, Miller MB et al. Practice guidelines for clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clin Microbiol. Rev.* 2018; 31(2): artnoe00038-17. doi: 10.1128/CMR.00038-17.
- Dorman S, Schumacher S, Alland D et al. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect. Dis.* 2018; 18(1):76–84. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30691-6.
- Murphy SG, Smith C, Lapierre 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 for the surveillance of drug-resistant tuberculosis: an implementation manual. 2023.
- World Health Organization (WHO). Use of targeted next-generation sequencing to detect drug resistant tuberculosis: rapid communication. 2023.
- World Health Organization (WHO). Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance. 2021. License: 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. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 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). License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274443/WHO-CDS-TB-2018.19-eng.pdf>.
- World Health Organization (WHO). Use of targeted next-generation sequencing to detect drug-resistant tuberculosis: rapid communication. 2023. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240076372>.
- Deeplex® МС-ТВ user manual RUO (V5 - March 2023).
- Наказ МОЗ України від 27.06.2019 р. № 1462 «Про затвердження Інструкції з мікробіологічної діагностики туберкульозу», Київ, 2019.
- Фещенко ЮІ, Журило ОА, Барбова АІ та ін. Стандартні операційні процедури для використання при повногеномному секвенуванні *M. tuberculosis* на платформі Illumina MiSeq: навчальний посібник. Київ, 2024. 71 с.
- World Health Organization (WHO). Use of targeted next-generation sequencing to detect drug-resistant tuberculosis: rapid communication. 2023.
- World Health Organization (WHO). WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: Diagnosis - Rapid diagnostics for tuberculosis detection. third edition ed. 2024. 144 p.
- Kambli P, Ajbani K, Kazi M et al. Targeted next generation sequencing directly from sputum for comprehensive genetic information on drug resistant Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2021; 127. doi.org/10.1016/j.tube.2021.102051
- Cabibbe AM, Spitaleri A, Battaglia S et al. Application of targeted next-generation sequencing assay on a portable sequencing platform for culture-free detection of drug-resistant tuberculosis from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2020; 58 (10). doi.org/10.1128/JCM.00632-20.
- Iyer A, Ndlovu Z, Sharma J et al. Operationalising targeted next-generation sequencing for routine diagnosis of drug-resistant TB. *Public Health Action.* 2023; 13(2):43–9. doi.org/10.5588/pha.22.0041.
- Tram TTB, Trieu LPT, Nhat LTH et al. Targeted sequencing from cerebrospinal fluid for rapid identification of drug-resistant tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol.* 2024;62(4): e0128723. doi.org/10.1128/jcm.01287-23.
- World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2023. 2023.

Висновки

1. Потенціал tNGS у трансформації рутинної практики в галузі діагностики та лікування ТБ є дуже значний. Високий рівень відповідності результатів між tNGS та WGS/фТМЧ у поєднанні з його економічною ефективністю свідчить про те, що tNGS може бути конкурентоспроможною альтернативою та, скоріш за все, призведе до зміни основних напрямів діагностики ТБ в майбутньому: замість того, щоб покладатися на послідовне тестування на ЛС *M. tuberculosis*, одностадійна комплексна оцінка може спростити діагностичний процес.

2. Одностадійна комплексна оцінка має кілька клінічних переваг: вона дозволяє раннє виявлення ТБ та його профілів резистентності, забезпечує широке охоплення мішеней резистентності для широко використовуваних клінічних препаратів.

3. Рекомендації BOOЗ щодо використання tNGS забезпечують ефективний напрям для впровадження та застосування tNGS, тим самим прискорюючи його клінічне застосування та просування в діагностиці ТБ та ЛС *M. tuberculosis*.

4. tNGS демонструє надійну та швидку ефективність у виявленні ТБ та пов'язаної з ним ЛС *M. tuberculosis* і може бути безпосередньо застосований до клінічних зразків, що позиціонують його як перспективний підхід для лабораторного тестування ТБ.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.
Джерела фінансування. Робота виконана за рахунок держбюджету.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.
Funding: The work was carried out at the expense of the state budget.

Received / Надійшла до редакції: 28.05.2025 р.

Revised/ Після доопрацювання: 03.06.2026 р.

Accepted/ Прийнято до друку: 25.06.2026 р