



Внедрение секвенирования нового поколения для выявления ЛУ-ТБ в Кыргызской Республике. Опыт стран по раннему использованию целевого секвенирования (tNGS)

27-й вебинар по диагностике туберкулеза, организованный ЕВРО-ВОЗ

Гульмира Калмамбетова, к.м.н., заместитель директора НЦФ, Бишкек, Кыргызстан

26/04/2024

ТБ профиль страны

Население - 7 037 590

Кыргызская Республика входит в число 30 ведущих стран мира с высоким бременем МЛУ-ТБ и в число 18 приоритетных стран Европейского региона ВОЗ.

Число случаев МЛУ-ТБ - 805 из 4 674 случаев (2023 г.)

Доля МЛУ-ТБ среди новых случаев составляет 26%, а среди ранее леченных - 55% (2022 г.)

Лабораторная сеть диагностики ТБ:

- 30 GeneXpert и 2 TrueNat
- 6 культуральных лабораторий, 1 НРЛ (включая фТЛЧ, Хайн тест 1- и 2-го ряда и NGS (WGS, tNGS и ONT (валидация))

Функционирует система транспортировки образцов (аутсорсинг), финансируемая из госбюджета



I. Внедрение секвенирования полного генома *M. tuberculosis*

Немного истории...

Проект «Остановить трансмиссию ТБ в больницах», USAID:

- Реализовано 8 рабочих пакетов
- Длительность проекта: 24 месяца (Июль 2017-Июль 2019)





Research Center Borstel
Leibniz-Center for Medicine and Biosciences



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФТИЗИАТРИИ
ПРИ МИНИСТЕРСТВЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ



**BOLD
THINKERS
DRIVING
REAL-WORLD
IMPACT**

Institute of Microbiology and Laboratory Medicine
WHO / GLI - Supranational Reference Laboratory of Tuberculosis



Dpt. IML red GmbH
research, education, development
Dr. med. Harald Hoffmann
Ulrich.Hoffmann@imlred.de
PD Dr. rer. nat. Dipl. Biol.
Sabine Hoffmann-Triest
Sabine.Hoffmann@imlred.de
Dr. rer. nat. Dipl. Biol.
Uladzimir Antonenka
Uladzimir.Antonenka@imlred.de
Evgeniy Sahalchik
Evgeniy.Sahalchik@imlred.de
Robert Koch-Str. 2
D-52131 Gating
Hoffmann@imlred.de
Tel. +49 (0) 5791 5410
Fax +49 (0) 5791 5416



Учреждения-партнёры проекта STOP TTH:

При финансовой поддержке USAID, Washington DC, USA

- **ABT**, Defeat-TB county office, Кыргызстан
- **IMLred**: Институт Микробиологии и лабораторной медицины, Отдел науки, образования и развития (IML red GmbH), СНРЛ ВОЗ, Германия
- **ИЦБ**: Исследовательский Центр им. Лейбница Борстел, Германия
- **KNCV**, Challenge TB
- **Национальный Центр Фтизиатрии**, Кыргызстан
- **НРЛ** (Национальная референс-лаборатория) НЦФ

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

PubMed.gov

> [Sci Rep.](#) 2021 Jul 28;11(1):15333. doi: 10.1038/s41598-021-94297-z.

Implementation of whole genome sequencing for tuberculosis diagnostics in a low-middle income, high MDR-TB burden country

Monica Vogel # 1, Christian Utpatel # 2 3, Caroline Corbett # 1, Thomas A Kohl # 2 3, Altyn Iskakova # 4, Sevim Ahmedov # 5, Uladzimir Antonenka # 1, Viola Dreyer # 2 3, Ainura Ibrahimova # 6, Chynara Kamarli # 7, Dilorom Kosimova # 6, Vanessa Mohr # 2 3, Evgeni Sahalchik # 1, Meerim Sydykova # 4, Nagira Umetalieva # 1, Abdylat Kadyrov # 8, Gulmira Kalmambetova # 4, Stefan Niemann # 2 3, Harald Hoffmann # 9 10

Affiliations + expand
PMID: 34321545 PMCID: PMC8319420 DOI: 10.1038/s41598-021-94297-z
[Free PMC article](#)

Список и стоимость оборудования ССП

Category	Item (model/brand) additional cost	Manufacturer	Distributor	Catalogue Number	Units	Net price per unit (USD)	Net sub-Total (USD)
Large equipment	Next generation sequencer (MiSeq system V2)	Illumina	Alliance Global	SY-410-1003	1	118,800.00	118,800.00
	– Ultimate 2-year Warranty	Illumina	Alliance Global	IL-SV-420-1008	1	26,039.65	26,039.65
	– Installation and initial instruction	Illumina			1	10,190.00	11,900.00
	Fluorometer/Spectrophotometer (DS-11FX + Microvolume)	Denovix	BioLabtech,	9027304040	1	12,165.80	12,165.80
	Fragment analyzing system ^a (Advanced Analytical 5200 FA System)	Agilent	Vizamed	FSv2-CE2F	1	47,880.00	47,880.00
	– Installation and initial instruction	Agilent	Vizamed		1	2933.22	2933.22
	Computer ^b	Locally built-to-order	Locally built-to-order		1	1646.96	1646.96
	Uninterrupted Power Supply APC/BR1500GI UPS Por/AVR/1500 VA/865 W	APC	Ermex		1	700.00	700.00
Sub-total					8	222,065.63	222,065.63
Kit and supplementary supplies	dsDNA High Sensitivity Kit—1000 assay	Denovix	BioLabtech	BioLabtech	2	395.00	790.00
	dsDNA Broad Range Kit—1000 assay	Denovix	BioLabtech	BioLabtech	2	455.48	910.96
	Denovix vials 0.5 mL thin wall (500 pc. Box)	Denovix	BioLabtech	TUBE-PCR-0.5-500	6	63.00	378.00
	Fragment Analyzer qualification kit	Agilent	Vizamed	DNF-FSEW-OQ	1	900.60	900.60
	Capillary conditioner	Agilent		DNF-475-0100	1	74.10	74.10
	12 capillary array cartridge 50 µm	Agilent	Vizamed	A2300-1250-3355	1	853.00	853.00
	HS NGS Fragment Analysis Kit 1–6000 bp	Agilent	Vizamed	DNF-474-0500	1	2117.00	2117.00
	MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycle)	Illumina	Alliance Global	MS-102-200	17	1452.00	24,684.00
	MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle)	Illumina	Alliance Global	MS-102-3003	6	1896.00	11,376.00
	Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (96 Samples)	Illumina	Alliance Global	FC-131-1096	4	3924.00	15,696.00
	Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 Indices, 384 Samples)	Illumina	Alliance Global	FC-131-2001	2	1224.00	2448.00
PhiX Control Kit	Illumina	Alliance Global	FC-110-3001	4	192.00	768.00	
Sub-total					47		60,995.66
Total					55		283,061.29

Стоимость секвенирования ТБ в условиях Кыргызстана

Work-step	Measured costs per sequence ^a	Calculated costs per sequence	
		V2-kits ^b	V3-kits ^c
DNA extraction	\$ 4.05	\$ 4.05	\$ 4.05
Denovix DNA Quant + QC	\$ 2.88	\$ 1.31	\$ 1.31
Library preparation	\$ 91.25	\$ 59.61	\$ 59.61
Fragment analysis/library QC	\$ 14.7	\$ 3.83	\$ 3.83
Sequencing	\$ 156.32	\$ 90.41	\$ 64.53
Shipping	\$ 8.13	\$ 8.13	\$ 8.13
Total	\$ 277.34	\$ 167.33	\$ 141.46

^aMeasured for first 174 sequences.

^bTheoretical costs based on 16 samples/run.

^cTheoretical costs based on 30 samples/run.

II. Seq_MDRTB_Net

Использование целевого ССП для ускорения тестирования пациентов с туберкулезом на устойчивость к ПТП в Кыргызстане

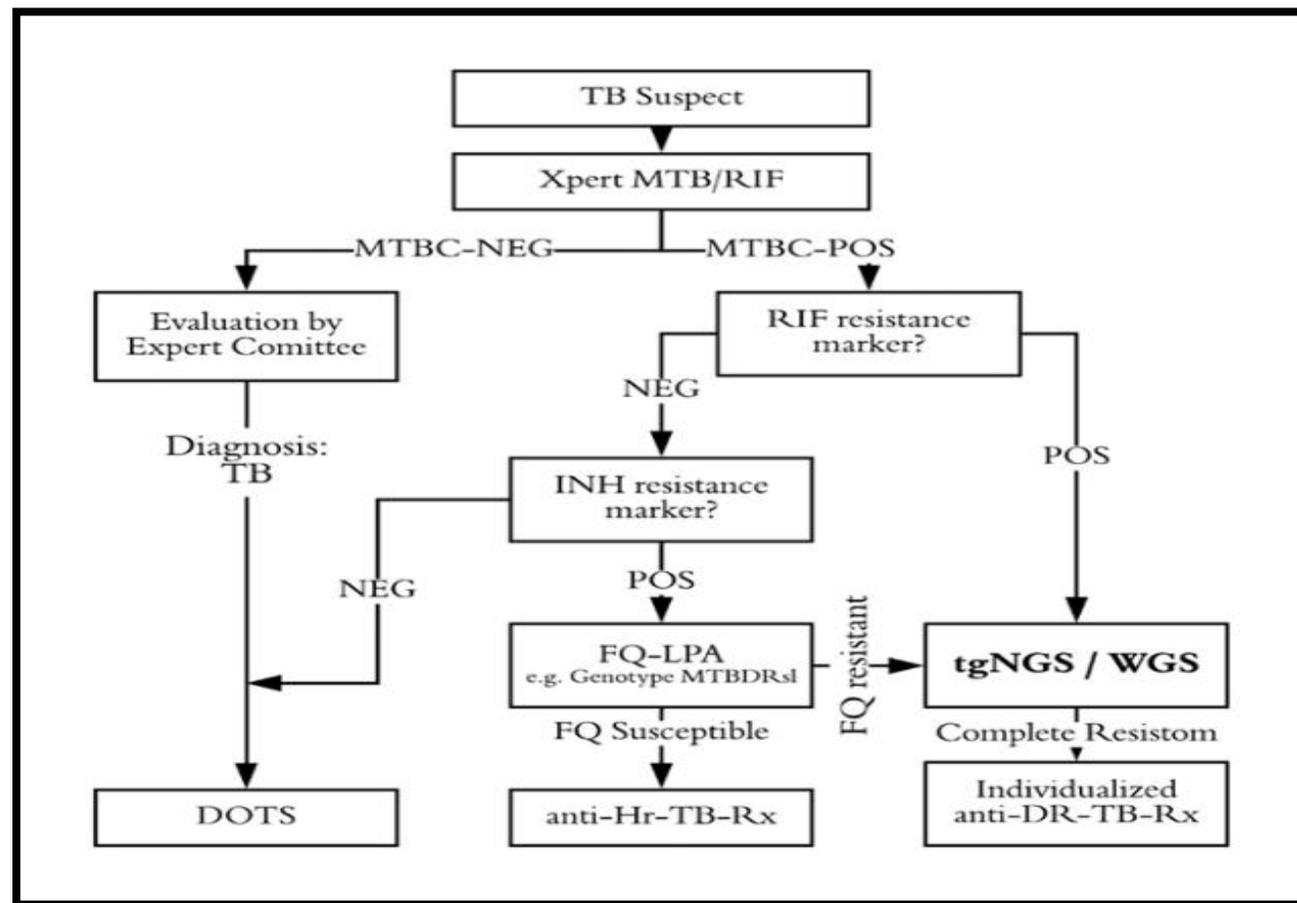
Алгоритм проекта Seq_MDRTB_Net

Seq_MTB_Net, Правительство ФРГ

- Длительность проекта (2019-2022)

Цели исследования

- Внедрение целевого секвенирования в НРЛ
- Взаимодействие с клиницистами в области целевого секвенирования для улучшения результатов лечения



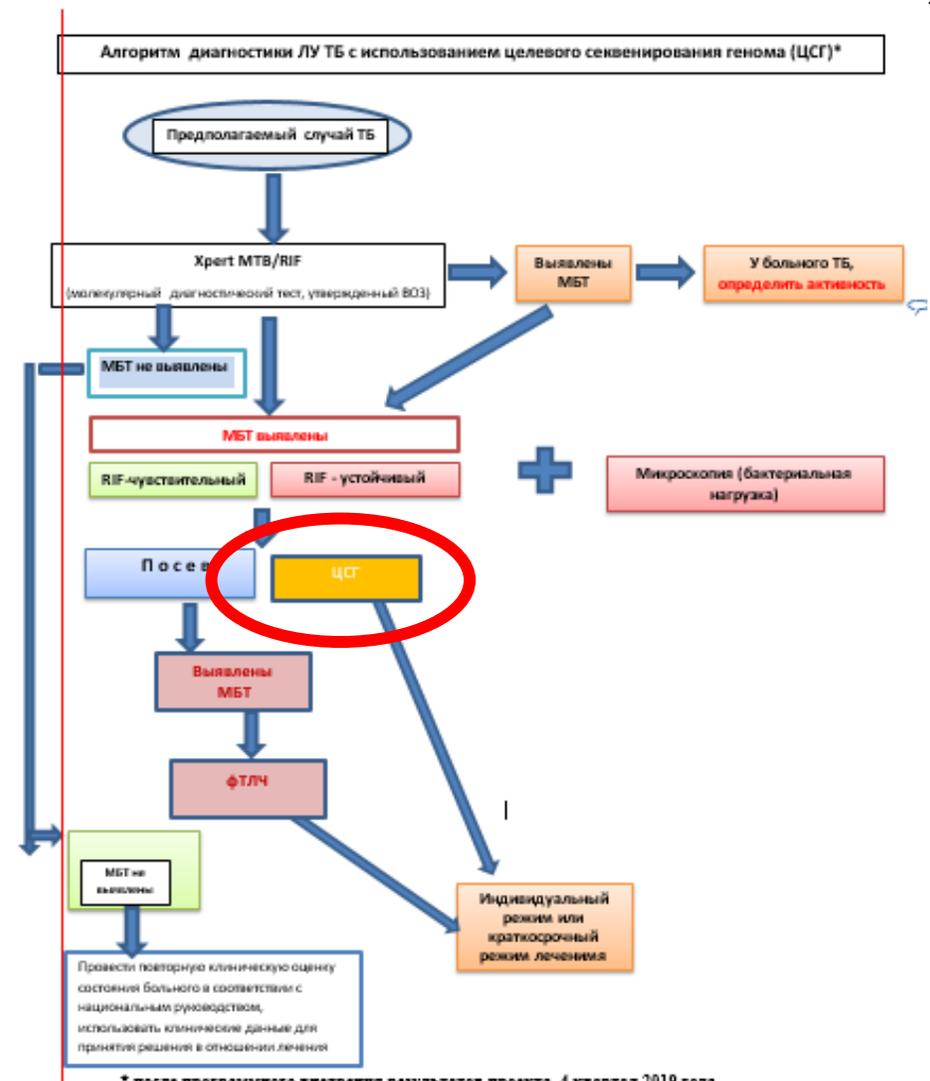
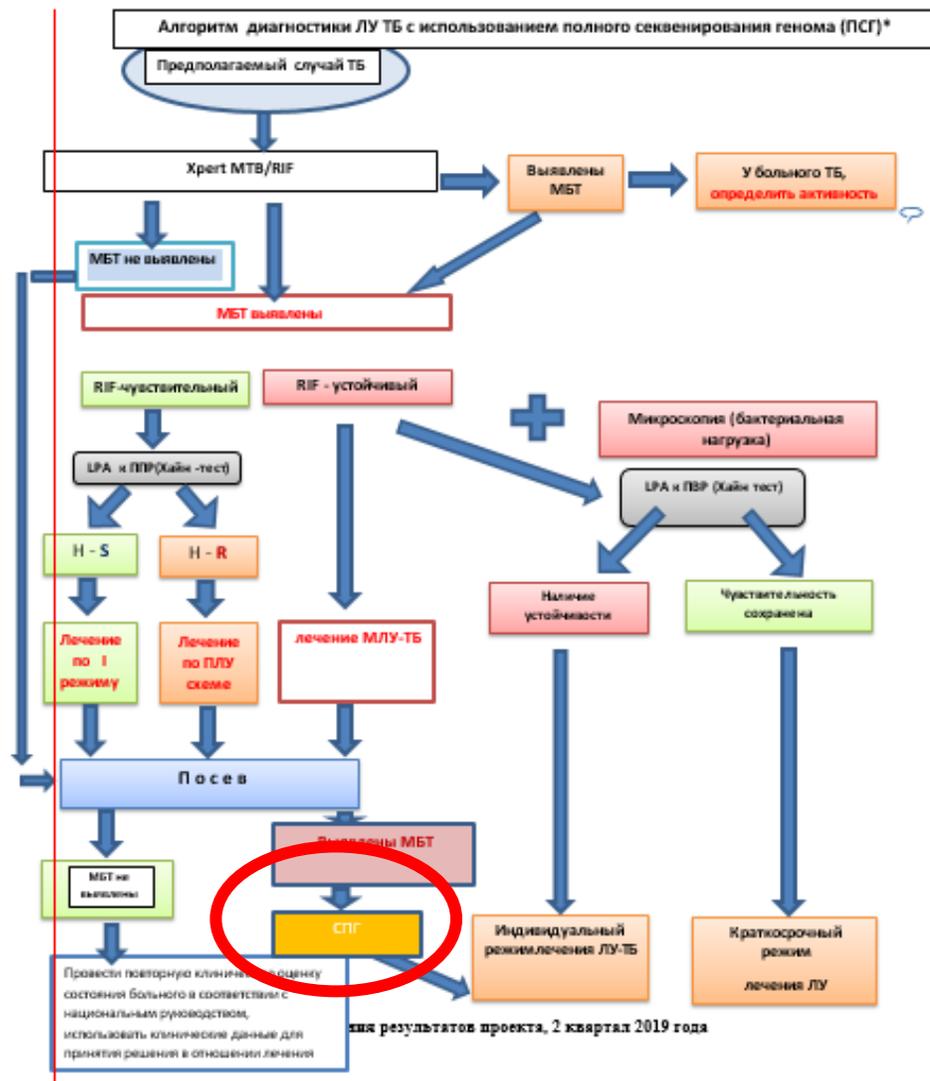
Результаты Seq_MDRTB_Net проекта

- В течение трех лет (2019-2022) в проекте приняли участие 389 пациентов
 - Из 389 зарегистрированных пациентов 237 (60,9%) - мужчины и 152 женщины (39,1%) в возрасте от 18 до 89 лет.
- Из 389 пациентов, которые были включены в исследование
 - 330 образцов дали положительные результаты культивирования.
 - 252 имели достаточное качество подготовки библиотеки для секвенирования
- ДНК из 235 из этих образцов была отправлена в Борстел и параллельно была протестирована WGS, чтобы определить связь между фенотипическими и генетическими результатами устойчивости к ПТП

Вызовы: Seq_MDRTB_Net

- 9-месячный сток-аут реагентов привел к значительным задержкам в реализации проекта с декабря 2020 по август 2021 года
 - Существует множество проблем, которые приводят к перебоям в поставках реагентов:
 - длительные сроки доставки и короткий срок годности реагентов
 - неоптимальная связь и последующая поддержка со стороны регионального дистрибьютора
 - зависимость от поддержки доноров
- неисправность Illumina MySeq в 2022 года из-за повреждения оптической запасной части
- политическая ситуация в Восточной Европе затруднила организацию визита официального представителя Illumina, Альбиогена, базирующегося в России
- необходимо решить вопрос о регулярном техническом обслуживании оборудования, чтобы избежать подобных проблем в будущем

Роль и место tNGS, Национальное Руководство (Одобрено МЗ КР в декабре 2023)



III. Техническая помощь по расширению использования tNGS на программном уровне (USAID)

Техническая поддержка предоставляется для поддержки НРЛ в улучшении процессов использования tNGS в рутинном клиническом лечении туберкулеза и в целях эпиднадзора за туберкулезом.

Цели визита :

- Обзор рабочих процессов NGS, tNGS, каталога мутаций ВОЗ и процесса внедрения
- Обзор лабораторных протоколов NGS, практическая демонстрация использования tNGS, подготовка и выдача клиницистам результатов tNGS
- Оценка текущих результатов NGS в сравнении с фенотипическими результатами DST
- Оценка готовности NTP/NRL к использованию tNGS для диагностики и эпиднадзора за ЛУ-ТБ
- Определение целей и областей вмешательства для разработки Плана действий по использованию tNGS в рутинном клиническом лечении ТБ больных и эпиднадзоре за ЛУ-ТБ



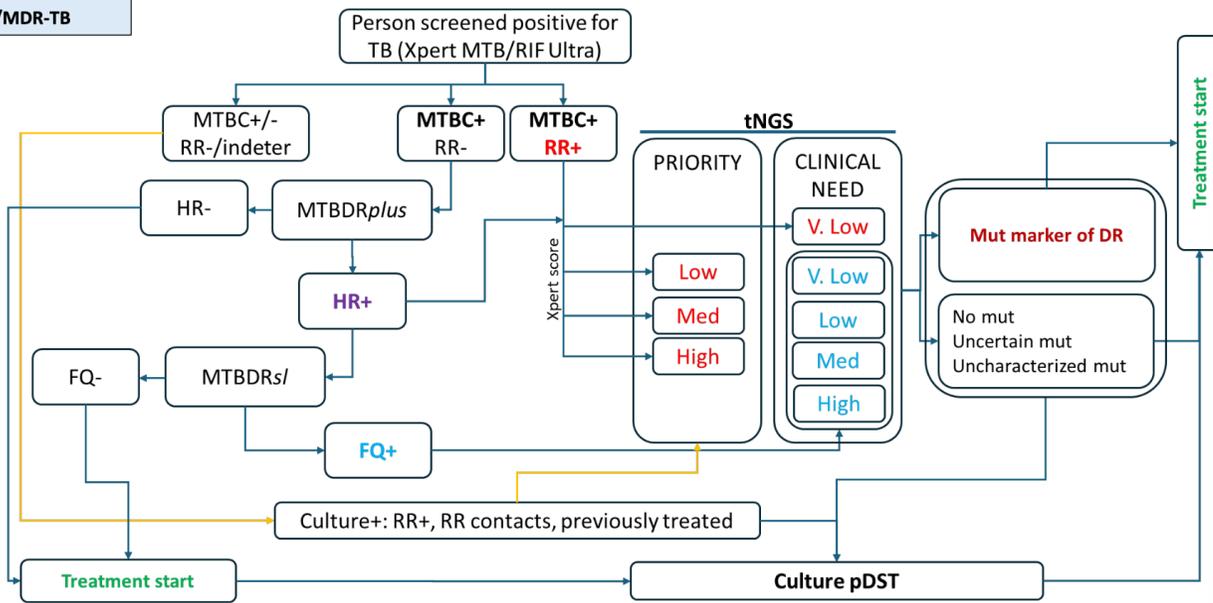
Andrea Cabibbe, Paolo Miotto, TB Supranational Reference Laboratory in Milan, WHO Collaborating Centre in TB Laboratory Strengthening

Алгоритм диагностики ЛУ ТБ с использованием tNGS

(дебрифинг А. Cabibbe and Paolo Miotto, 26.02.2024)

Findings – pilot NGS-based TB diagnostic algorithm

Up to:
500 RR-/MDR-TB

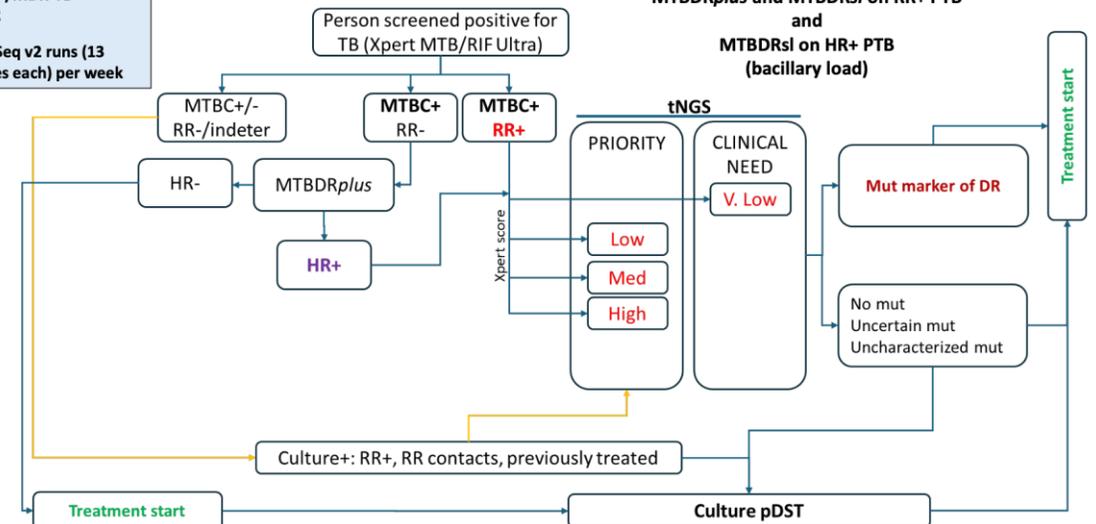


Findings – proposed routine NGS-based TB diagnostic algorithm

Expected up to:
900 RR-/MDR-TB
620 HR

~ 2 MiSeq v2 runs (13 samples each) per week

tNGS to replace
MTBDRplus and MTBDRs/ on RR+ PTB
and
MTBDRs/ on HR+ PTB
(bacillary load)



На настоящий момент...

- План Действий по использованию tNGS в рутинном клиническом лечении и эпиднадзоре за ТБ разрабатывается
- Проводится регулярное обсуждение результатов tNGS и их корреляции с фТЛЧ
 - ✓ Проводится перекрестная проверка заполнения форм выдачи результатов
 - ✓ Проводится перекрестная проверка данных tNGS (например, на наличие неохарактеризованных/неопределенных мутаций, которые могут указывать на резистентность)
 - ✓ Проводится перекрестная проверка качества фТЛЧ
 - ✓ Интерпретация результатов, основанная на устойчивости к ПТП (например, субоптимальная чувствительность NGS-мишеней; субоптимальная надежность результатов фТЛЧ)
 - ✓ Устранение неполадок: необходимость в повторном заборе образца и повторном секвенировании, повторном фТЛЧ (например, при более низком CCs).

The screenshot shows a Microsoft Teams meeting interface. On the left, a portion of a tNGS report is visible, showing a table with columns for Sample ID, Microscopy (sediment), CX, Sequencing result acceptability, Composite target coverage, and Average coverage. The table contains several rows of data, including sample IDs like 5364-02493-101117 and 4192-02498-101122.

Sample ID	Microscopy (sediment)	CX	Sequencing result acceptability	Composite target coverage	Average coverage
5364-02493-101117	1+	detected medium	++	99.9	4252.0
4192-02498-101122	1+	detected high	+++	100.0	3948.0
4202-24_2	2+	detected high	+++	100.0	5602.3
3791-02514-101104	scanty		ND	41.8	1.2
IC-02595-101129			ND	24.7	1.2
5284-02496-101120	3+	detected high	++	100.0	2284.9
4190-24_2	1+	detected high	+++	100.0	2672.7
5528-02494-101119	2+	detected low	+++	100.0	5848.2
3257-02499-101123	scanty		NTM	62.6	4448.3
5781-02497-101121	2+	detected high	++	100.0	3026.2
4040-24_2	1+	detected medium	++	100.0	2332.2

On the right, a detailed tNGS report is displayed, showing drug resistance associated variants and uncharacterized and uncertain significance variants. The report includes columns for Gene, Sequence, Cobas change, % Variant, Deletion, AA change, Drug, Confidence, and Resistance level. It lists various mutations such as 4247722 ggt47pg, 2161168 agt16ac, and 191105 agt10ng, along with their associated resistance levels and confidence scores.

Andrea Cabibbe, Paolo Miotto, TB Supranational Reference Laboratory in Milan, WHO Collaborating Centre in TB Laboratory Strengthening



Спасибо за внимание!

KGZ NRL: Tel.; +996312595561

e-mail: rrlkg@gmail.com;

e-mail: gulmira.kalmambetova@gmail.com