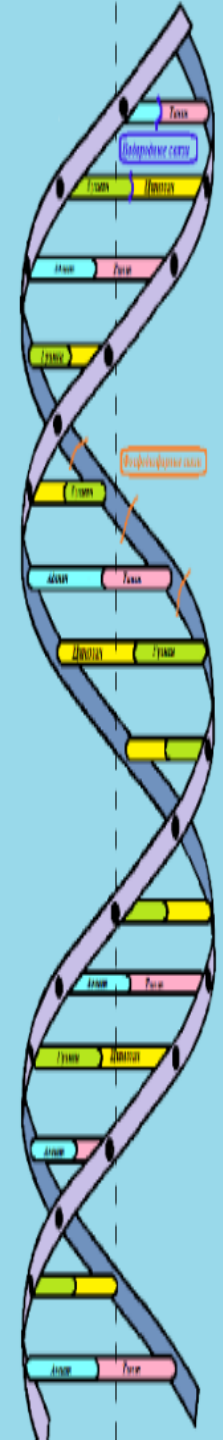


Опыт внедрения целевого секвенирования генома M.tuberculosis в программных условиях в Кыргызской Республике

Сыдыкова М.М., заведующая НРЛ НЦФ

Бишкек , Кыргызстан

29.04.2025



I. Внедрение секвенирования полного генома МБТ и таргетного секвенирования.

Полногеномное секвенирование,

Проект Stop TTH, USAID:

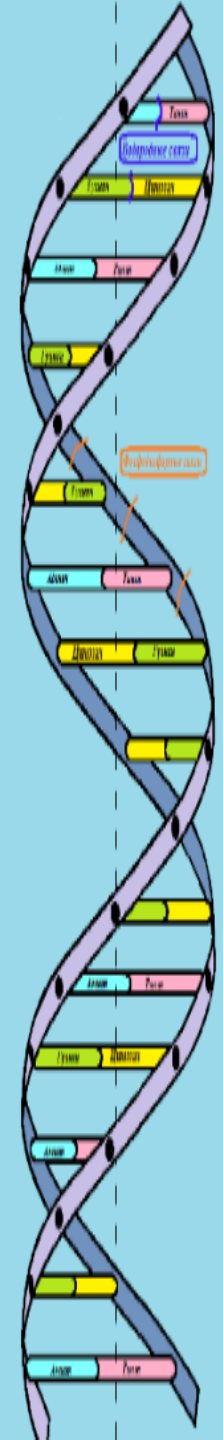
- Реализовано 8 рабочих пакетов
- Длительность проекта: 24 месяца (Июль 2017-Июль 2019)

Таргетное секвенирование,

SeqMTBNet, Германское Правительство

- Длительность проекта (2019-2022)





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-Thiel
Sabine.Hoffmann@imlred.de
Dr. rer. nat. Dipl. Biol.
Uladimir Antonenka
Antonenka@imlred.de
Evgeny Sahalchik
Sahalchik@imlred.de
Robert Koch-Institut
D-53111 Gießen
Hoffmann@imlred.de
Tel. +49 (0) 89 85791 5410
Fax +49 (0) 89 85791 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



The diagram illustrates a DNA double helix with two strands, one colored pink and the other blue. The bases are represented by colored rectangles: Adenine (cyan), Thymine (pink), Guanine (yellow), and Cytosine (green). Base pairs are connected by black dots representing hydrogen bonds. A vertical dashed line runs through the center of the helix.

- Top section:** Shows a segment where the strands are correctly paired. Labels include "Terna" (pointing to a Thymine-Adenine pair) and "Antiparallele цепи" (antiparallel chains).
- Middle section:** Shows a mutation site labeled "Внепарная связь" (non-pairing bond). An orange bracket highlights a mismatch between a yellow Guanine on the pink strand and a cyan Adenine on the blue strand.
- Bottom section:** Shows another segment of the DNA molecule with various base pairs.

Figure 1

Phylogenetic tree of Kyrill virus (KYR) strains. The tree shows relationships between various KYR strains, with branches labeled by bootstrap values. Strains are color-coded by geographic region and outbreak type. The legend indicates:

- 2.2.1 Beijing Central Asia (orange)
- 2.2.1 Beijing Central Asia outbreak (red)
- 2.2.1 Beijing Europe/Russian W148 Outbreak (blue)
- 2.2.1 Beijing (yellow)
- 4.3.3 LAM (green)

Strains shown include: KYR-16, P1046-D0023, P1049-D0029, KYR-22, KYR-32, P1014-D0039, P1010-D0020, KYR-14, P1013-D0040, KYR-33, KYR-5, P1003-D0012, KYR-12, P1002-D0018, KYR-28, P3095-D0035, P1024-D0028, KYR-21, KYR-13, P1015-D0019, KYR-29, P2170-D0036, P1028-D0027, KYR-20, P1031-D0002, KYR-2, P1067-D0007, KYR-9, P1009-D0015, KYR-10, KYR-23, P1008-D0030, KYR-19, P1055-D0026, KYR-25, P1005-D0033, P1112-D0032, KYR-26, P1060-D0024, KYR-17, P1007-D0037, KYR-4, P1020-D0004, KYR-18, P1004-D0025, P1012-D0041, KYR-34, P1056-D0017, KYR-11, P1034-D0003, KYR-3, P1016-D0038, KYR-31, P1019-D0005, KYR-7, P2171-D0034, KYR-27, KYR-15, P1022-D0021, KYR-15, KYR-1, KYR-12, KYR-13, KYR-14, KYR-15, KYR-16, KYR-17, KYR-18, KYR-19, KYR-20, KYR-21, KYR-22, KYR-23, KYR-24, KYR-25, KYR-26, KYR-27, KYR-28, KYR-29, KYR-30, KYR-31, KYR-32, KYR-33, KYR-34, KYR-35, KYR-36, KYR-37, KYR-38, KYR-39, KYR-40, KYR-41, KYR-42, KYR-43, KYR-44, KYR-45, KYR-46, KYR-47, KYR-48, KYR-49, KYR-50, KYR-51, KYR-52, KYR-53, KYR-54, KYR-55, KYR-56, KYR-57, KYR-58, KYR-59, KYR-60, KYR-61, KYR-62, KYR-63, KYR-64, KYR-65, KYR-66, KYR-67, KYR-68, KYR-69, KYR-70, KYR-71, KYR-72, KYR-73, KYR-74, KYR-75, KYR-76, KYR-77, KYR-78, KYR-79, KYR-80, KYR-81, KYR-82, KYR-83, KYR-84, KYR-85, KYR-86, KYR-87, KYR-88, KYR-89, KYR-90, KYR-91, KYR-92, KYR-93, KYR-94, KYR-95, KYR-96, KYR-97, KYR-98, KYR-99, KYR-100.



II. Внедрение секвенирования генома SARS-CoV-2

Оценочная миссия (ноябрь 2020):

- GIZ, SEEG команда (Германская Команда по обеспечению готовности к эпидемии)
- Сотрудничающий Центр ВОЗ, Университетская Клиника, Шарите, Берлин, Германия
- Институт им. Марциновского, Москва, Россия

Тренинг по проведению секвенирования SARS-CoV-2 в Кыргызстане, 11-26 мая 2021

- Обучено 11 человек (ДПЗигСЭН, РЦКиООИ,ТБ)

Проведение секвенирования SARS-CoV-2 на базе НПЛ и ввод данных в базу GISAID



<https://youtu.be/nvuyXQDHSMs>



Dream Fund project “No more pandemics” Нанопоровое секвенирование для раннего выявления инфекционных заболеваний

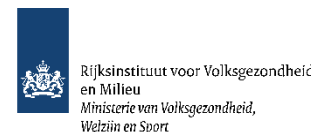
Лидерство: KNCV

Партнеры: RIVM, Labmicta, НТП

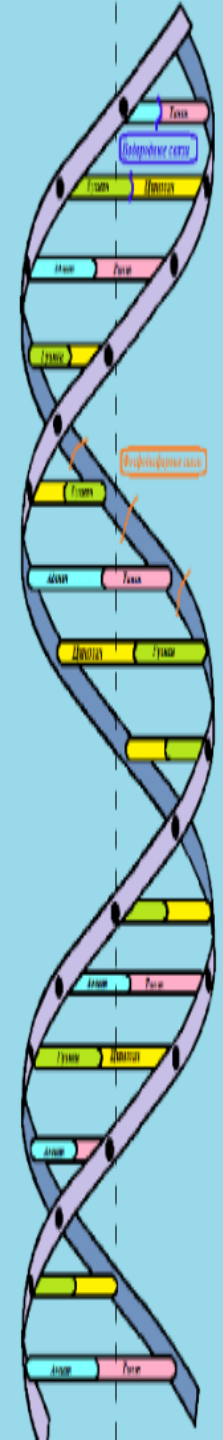
Длительность: 5 лет

Период: 1 апреля 2021- 21 марта 2026

Финансирование: Dutch Postcode Lottery



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФТИЗИАТРИИ
ПРИ МИНИСТЕРСТВЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ



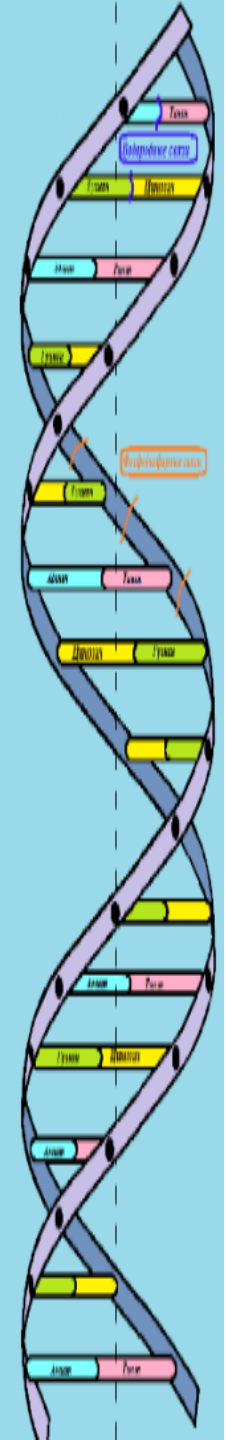
Цель проекта:

Продemonстрировать использование нанопорового секвенирования с использованием платформы MinION для диагностики туберкулеза (TB), COVID-19, других инфекционных заболеваний, а также антибактериальной резистентности (AMR) в странах с низким и средним уровнем дохода.

Общественный фонд «KNCV-Кей Джи» предоставила 2 MinION платформы вместе с необходимыми реагентами в Национальную референс лабораторию.



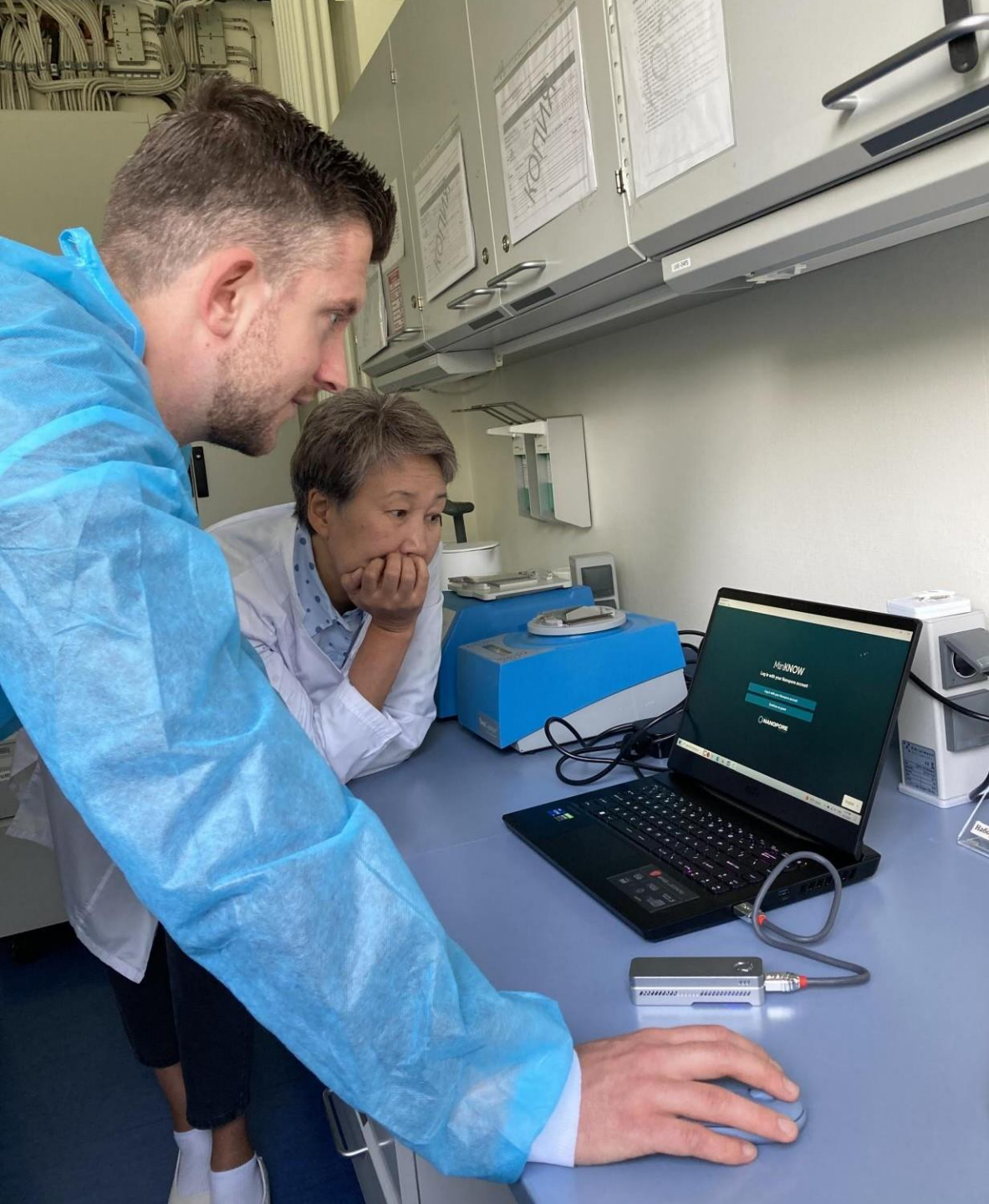
12 июня 2023 года Общественный фонд «KNCV-Кей Джи» предоставила 2 MinION платформы вместе с необходимыми реагентами в Национальную референс лабораторию, Национального центра фтизиатрии МЗ КР. Национальная референс лаборатория в настоящее время внедряет нанопоровое секвенирование в рамках проекта "НЕТ ПАНДЕМИИ, СНОВА!".

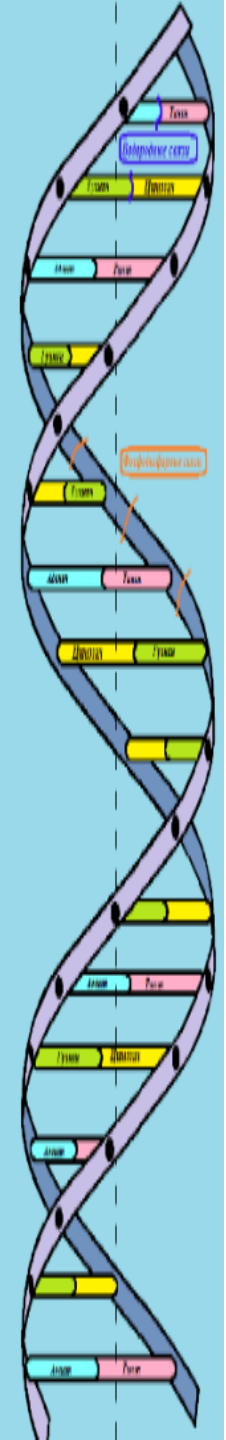


Под-задачи проекта

- Валидация целевого нанопорового секвенирования ТБ и SARS-CoV-2
- Определение значимых для пациента результатов целевого нанопорового секвенирования генома *M.tuberculosis*
- Демонстрация целесообразности нанопорового секвенирования для дозорного наблюдения за SARS-CoV-2
- Разработать и/или оценить метод “all-in-one” тестирования на АМР для приоритетных респираторных и других патогенов
- Осуществимость и приемлемость нанопорового секвенирования для диагностики туберкулеза в Кыргызстане
- Экономическая эффективность использования нанопорового секвенирования с использованием платформы MinION для диагностики ТБ и лекарственной устойчивости к ПТП

Первое нанопоровое секвенирование в Кыргызстане 12-15 сентября 2023





IV. Ситуационный анализ по оценке готовности НТП Кыргызстана к внедрению tNGS в программных условиях

Миссия экспертов Института San Raffaele IRCCS, г. Милан, Италия, при поддержке USAID

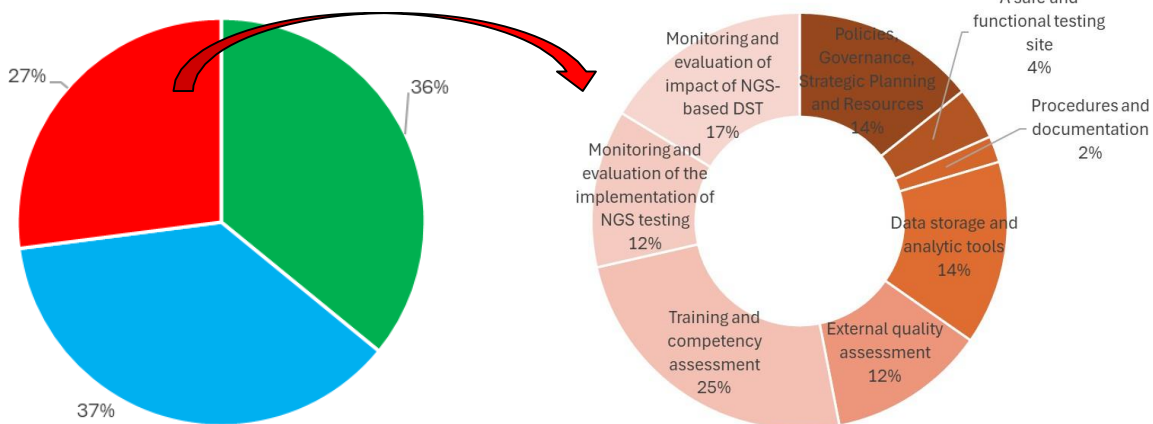
Визит экспертов из Института Сан-Раффаэле, 26 февраля -1 марта 2024

- Оценка готовности к внедрению целевого секвенирования в программных условиях с разработкой Плана Действий
- Обучение на рабочем месте сотрудников НРЛ НЦФ
- Вводное обучение врачей интерпретации результатов целевого секвенирования (ЦС)

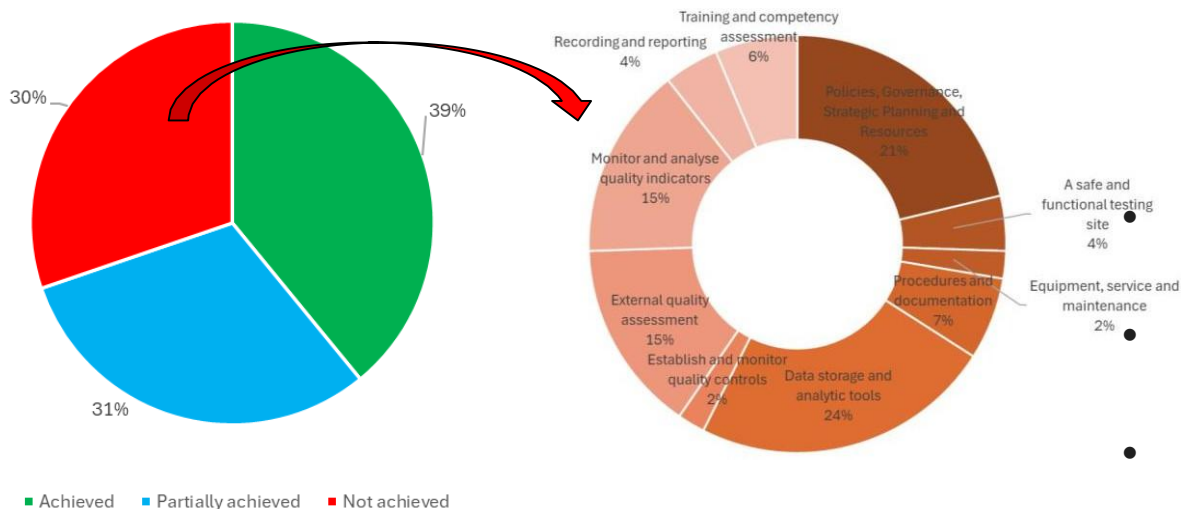


Результаты – Оценка готовности НРЛ НЦФ

Part A. National-Level NGS Situational Analysis Checklist*



Part B. Site-Level NGS Situational Analysis Checklist *



■ Achieved ■ Partially achieved ■ Not achieved

- Установить национальные требования к лабораторной инфраструктуре NGS, к сети ТБ лабораторий
- Разработать политику отчетности о результатах секвенирования
- Создать техническую/клиническую РГ
- Определить круг полномочий и процедуры оценки компетентности
 - лаборантов,
 - специалистов по биоинформатике,
 - врачей и работников здравоохранения,
 - сотрудников НТП

- Разработать
 - СОП по выдаче результатов
 - стандартизированные формы, регистры, журналы и электронные файлы для регистрации результатов NGS
- Разработать и контролировать индикаторы для рабочего процесса NGS
- Разработать СОП по биоинформатике, используем для анализа, интерпретации и отчетности о результатах NGS
- Создать адекватную экспертизу в области биоинформатики

Результаты СА – НРЛ/НЦФ готова к использованию ЦС в программных условиях

- ✓ НТП определила сферу использования и схему процесса внедрения NGS (эпидемиологический контекст, лабораторная сеть и алгоритм тестирования)
- ✓ Цель разделяет видение Плана геномного надзора за инфекционными заболеваниями (2023-2025) в Кыргызской Республике
- ✓ Четкое понимание рабочего процесса лаборатории ЦС (ручные процедуры) в НРЛ и ЧС являются адекватным
- ✓ Секвенатор MiSeq и вспомогательное оборудование - достаточно для программного использования. Для проведения эпиднадзора необходимо закупить еще оборудование
- ✓ Здание НРЛ/площади - необходимо будет расширить для эпидемиологического надзора
- ✓ Необходимо обучение клиницистов интерпретации результатов ЦС



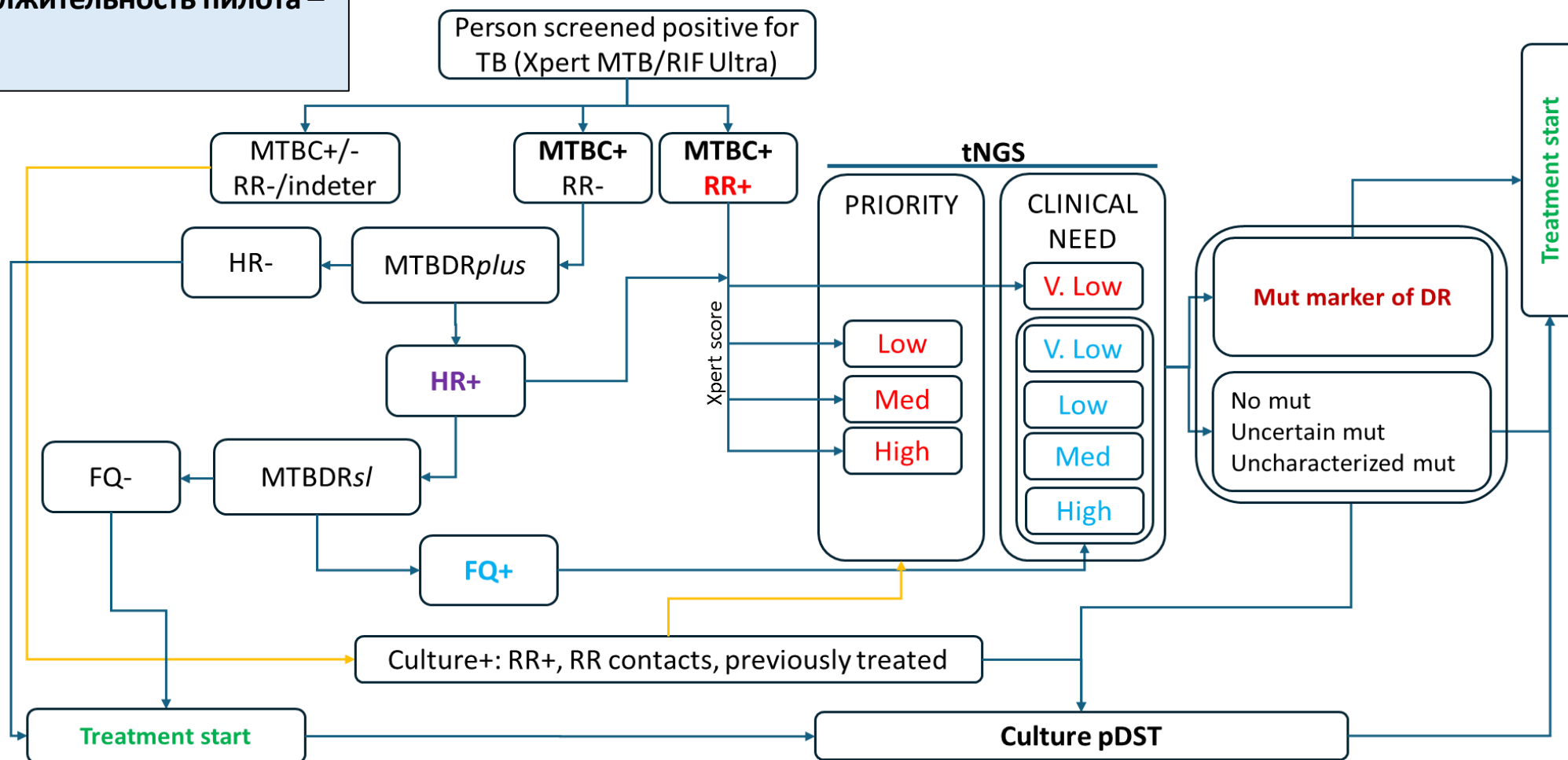


Пилотный алгоритм диагностики туберкулеза на основе ЦС

До: 500 РУ-/МЛУ-ТВ

образцов

Продолжительность пилота –
1 год

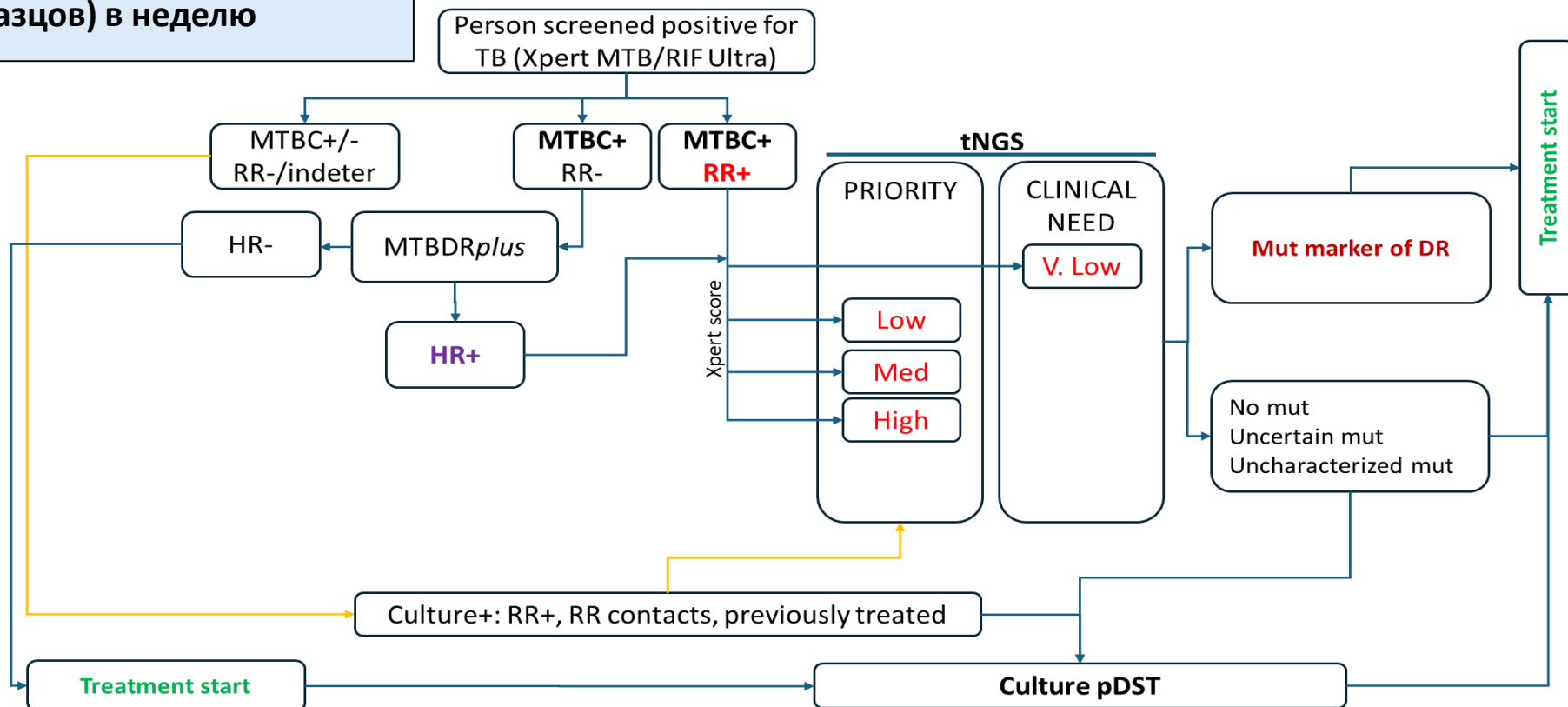


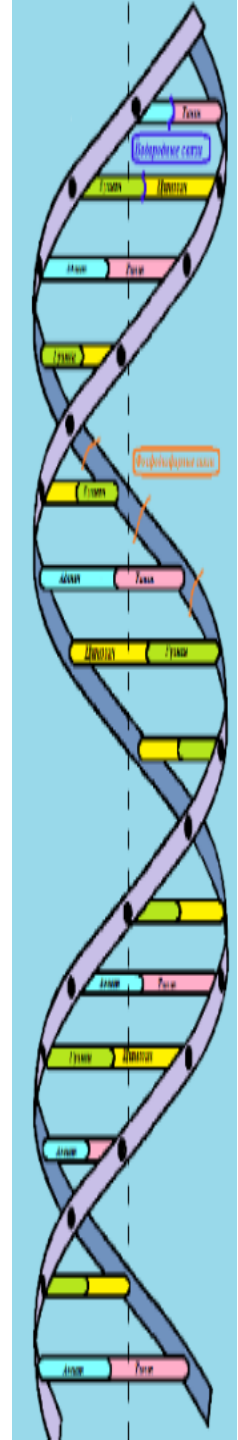
Предложен рутинный алгоритм диагностики туберкулеза на основе ЦС

Ожидаемый объем ЦС:
900 РУ/МЛУ-ТБ
620 НУ

~ 2 MiSeq v2 рана (по 13 образцов) в неделю

ЦС заменит
MTBDRplus и MTBDRsl для РУ+ PTB
и MTBDRsl для НУ+ PTB
(бактериальная нагрузка)

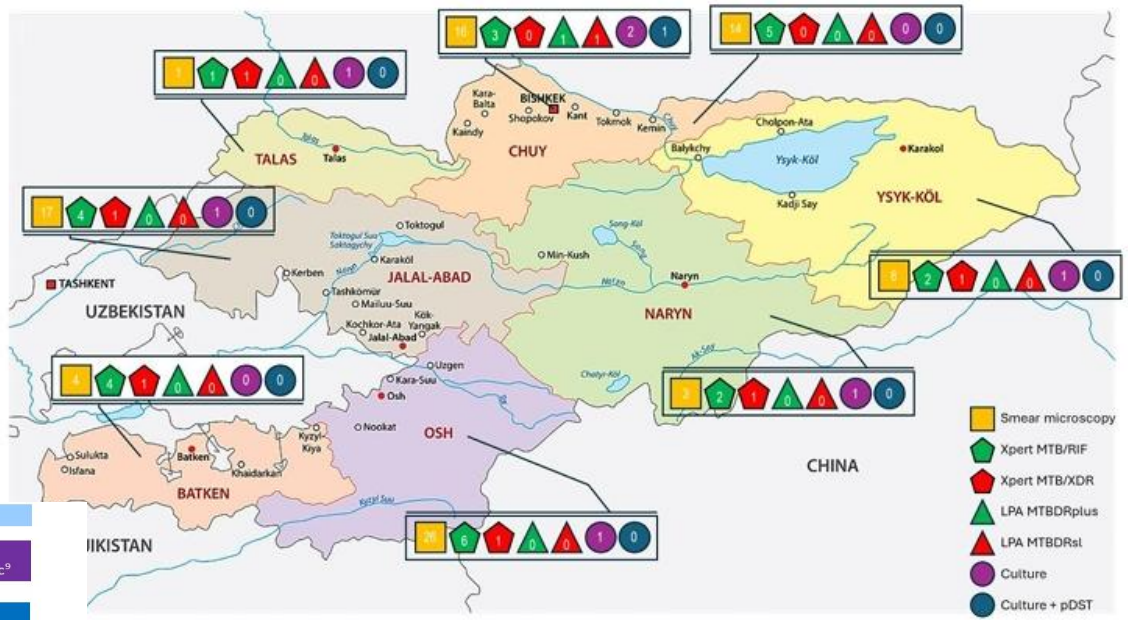




План действий по использованию ЦСП в программных целях

Разработан **План действий** по использованию NGS (секвенирования нового поколения) в повседневной клинической практике и для эпидемиологического надзора за туберкулезом в Кыргызстане.

Action Plan		
National action plan strategic objective 1: Strengthening and expanding the scope of the genomic surveillance system for pathogens with pandemic and epidemic potential, in the interests of protecting and strengthening the public health of the population of the Kyrgyz Republic*		
Governance		
Objective 1	Establish relevant NGS working groups	
Strategic interventions		Activities
	1.1. Establish of a NGS technical working group (TWG)	1.1.1. Appoint representatives from the MoH, NTP and NRL. 1.1.2. Appoint representatives with expertise in NGS technologies, data management and information technology. 1.1.3. Appoint representatives of regulatory and procurement bodies, international agencies and technical partners. 1.1.4. Appoint representatives of laboratories and clinical facilities participating in the NGS programme. 1.1.5. Appoint representatives for overseeing the overall implementation of the NGS action plan.
	Milestone: TWG (members) defined by July 2024	
	1.2. Define roles and responsibilities of the TWG	1.2.1. Define clear roles and responsibilities of each member of the TWG. 1.2.2. Select key documentation to be used as reference by the TWG. 1.2.3. Set up regular meetings among members defined at 1.1.1, and schedule follow-up meetings involving members defined at 1.1.2-5. 1.2.4. Engage with NGS platform and product providers for updates, troubleshooting and training. 1.2.5. Liaise with other teams within the National genomic surveillance plan for updates, troubleshooting and training.
	Milestone: December 2024	
	1.3. Establish of a NGS clinical management expert group	1.3.1. Appoint clinicians and/or epidemiologists for providing advice for patient care and disease transmission. 1.3.2. Select key documentation to be used as reference by the clinical management expert group.



- Образцы для ЦС – транспортируются в НРЛ со всей страны

* from "Genomic Surveillance Plan for Infectious Diseases for 2024-2025 in the Kyrgyz Republic."



План Действий: Определение целей и областей вмешательства

Запланированные цели:

- ЦС обеспечивает ранние результаты ТЛЧ по РУ-/МЛУ-ТВ, что приводит к быстрому началу и более высокому набору на эффективные режимы (например, ВРА/М или более длительные)
- ЦС предлагает наиболее полный и своевременный выбор диагностики ЛУ-ТВ для врачей (снижение эмпирического лечения RR-/MDR-TB)
- ЦС обеспечивает улучшение результатов лечения пациентов
- ЦС заменяет тестирование LPA 2-й линии и частично LPA 1-й линии в НРЛ.
- ЦС заменяет частично фТЛЧ (зависит от контекста и препарата) в НРЛ

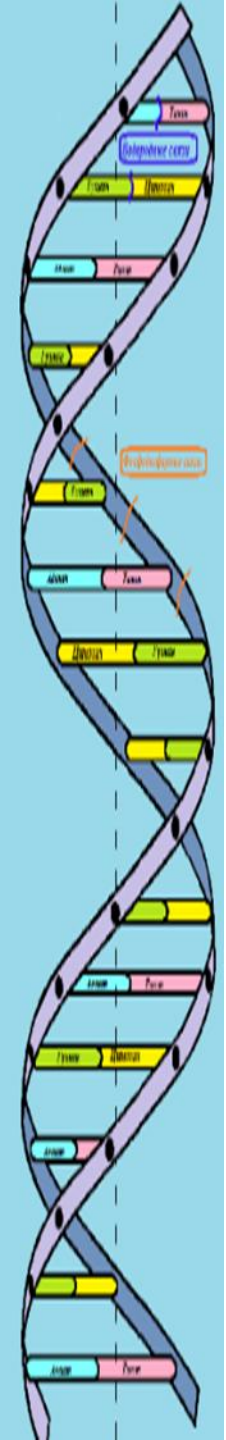
Области вмешательства и рекомендации:

- Планирование в стране: финансовые и кадровые обязательства для обеспечения устойчивости
- Оборудование и реагенты:
- Расширение инфраструктуры NGS для более широкого доступа после пилотного проекта (например, диагностика любого лекарственно-устойчивого туберкулеза и непрерывное наблюдение)
- Высокие затраты на лаборатории NGS > ожидаемое сокращение за счет GDF
- Образование и обучение:
- Укрепление потенциала лабораторий, обучение биоинформатиков, врачей и сотрудников программы
- Определение координатора NGS, создание рабочих групп по NGS



Мероприятия, проведенные в рамках проекта

- Разработка Плана действий по рутинному использованию NGS и надзору за туберкулезом в КР
- Разработка алгоритма использования целевого секвенирования
- Разработка формы отчетности для врачей
- Еженедельное обсуждение результатов секвенирования РГ в течение пилотирования ЦС
- Определение индикаторов для мониторинга эффективности использования результатов секвенирования



Предварительные результаты пилотного проекта

Цель. Оценить время выполнения и точность ЦС для тестирования лекарственной чувствительности и охарактеризовать популяционную структуру лекарственно-устойчивых *M. tuberculosis* в Кыргызской Республике.

Методология. 432 клинических образца были подвергнуты рутинным диагностическим тестам на туберкулез. 333 результата секвенирования были проанализированы с помощью системы Deeplex-MycTB Report, GenoScreen.

- Профили резистентности ЦС сравнивались с профилями из Xpert MTB/RIF, анализа линейного зонда (GenoType MTBDRplus и GenoType MTBDRsl) и фТЛЧ.
- Соответствие, чувствительность, специфичность и общее согласованность теста сравнивались между методами исследования.

tNGS mutation analysis using the WHO MBTC Mutation Catalog, 2023

hsp65-based species identification

Av coverage depth (x)	Consensus length	% Identity	E-value	Best match
113.4	399.0	100	0.0	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex

Drug resistance associated variants³

Gene	Genomic position	Codon change	% Variant	Dx-score	AA change	Drug [*]	Confidence	PMID
<i>embB</i>	4247429	ATG306GTG	99.8	368.75	M306V	EMB	High	Campbell PJ et al., 2011
<i>gyrB</i>	6750	GCG504GTG	99.4	1348.25	A504V	FO	High	ReSeqTb
<i>katG</i>	2155168	AGC315ACC	99.9	231.75	S315T	INH	High	ReSeqTb
<i>pncA</i>	2288839	ACC135CCC	99.4	761.25	T135P	PZA	High	ReSeqTb
<i>rpoB</i>	761155	TCG450TTG	99.8	459.25	S450L	RIF	High	ReSeqTb
<i>rpsL</i>	781687	AAG43AGG	99.8	119.00	K43R	SM	High	ReSeqTb
<i>rv0678</i>	779182	delG	86.2		frameshift	BDQ, CFZ		

Uncharacterized variants²

Uncharacterized variants designate sequence variants of as yet unknown association with drug sensitivity or resistance.

Gene	Genomic position	Codon change	% Variant	Dx-score	AA change	Drug [*]
<i>ethA</i>	4326533	ACC314ATC	99.8	514.25	T314I	ETH

Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance

Second edition



Вариант выдачи результатов ЦС клиницистам (тестовый режим)

Образец 10374-24:

- Результат Xpert MTB/RIF ULTRA - S
- Пациент «ранее леченный»

ЦС:

- RIF – Ч и PZA-Ч
- INH – R (katG – мутация с высокой степенью достоверности, остальные 4 мутации еще не охарактеризованы)
- ETM – R (mutation in the embB gene – high-confidence)
- Для других ПТП выявленные мутации неохарактеризованные или уровень доказательности не определен, или клиническая значимость неясна

Report for Deeplex Myc-TB assay (GenoScreen)

Patient ID: 10374-24	Quality: ++
Patient name: *835694	Median coverage: 1667
Birth date:	Species ID: Mycobacterium tuberculosis complex
Test:	MTBC lineage: Lineage 2
Test date: 22.06.2024	SIT code: 796
	Operator: Gulshan Mataeva

Page 1 / 1

Analysis of the mutations associated with drug resistance (*M. tuberculosis complex*)

Drug	Gene	Mutation	Frequency	Interpretation°	Comments
Rifampin	---	---	---	Susceptible	---
Isoniazid	katG	99.740	S315T	Resistant	---
	inhA	4.410	T196A	Uncharacterised	---
	fabG1	10.040	c-78t	Uncharacterised	---
	fabG1	9.330	C60Y	Uncharacterised	---
Ethambutol	embB	99.660	M306I	Resistant	---
	embB	3.070	T487A	Uncharacterised	---
Pyrazinamide	---	---	---	Susceptible	---
Levofloxacin	gyrA	11.110	R133W	Uncharacterised	---
Moxifloxacin	gyrA	11.110	R133W	Uncharacterised	---
Amikacin	rrs	18.460	c385t	Uncertain significance	---
Ethionamide	ethA	13.520	V118I	Uncharacterised	---
	ethA	99.850	G182S	Uncertain significance	---
	inhA	4.410	T196A	Uncharacterised	---
	fabG1	10.040	c-78t	Uncharacterised	---
	fabG1	9.330	C60Y	Uncharacterised	---
Bedaquiline	rv0678	9.950	R38Q	Uncharacterised	---
	rv0678	4.900	G155R	Uncharacterised	---
Linezolid	rrl	12.470	g2879a	Uncharacterised	---
Clofazimine	rv0678	9.950	R38Q	Uncharacterised	---
	rv0678	4.900	G155R	Uncharacterised	---

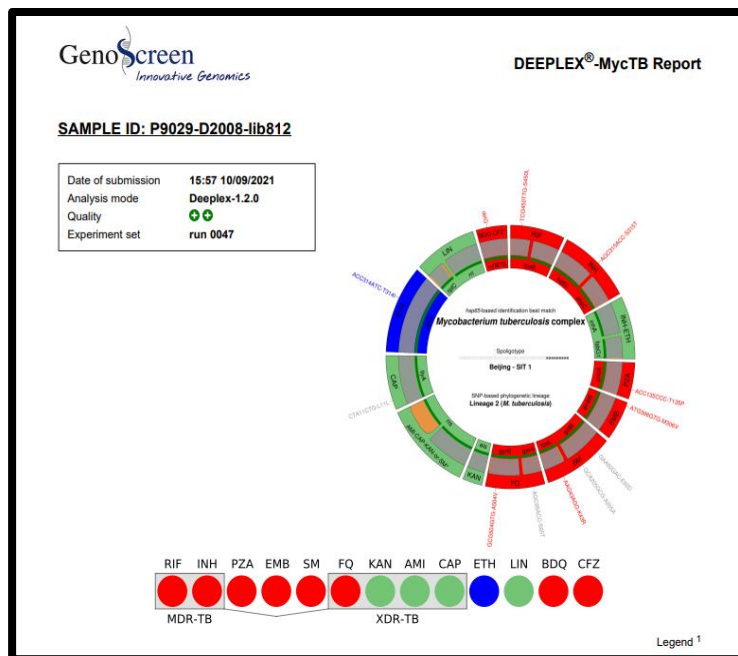
Предварительное заключение.

➤ В этом исследовании ЦС и LPA, а также фТЛЧ продемонстрировали высокий уровень соответствия

➤ ТАТ ЦС - 5-7 дней, фТЛЧ 14-21 день в среднем (до 30 дней)

➤ Назначение раннего индивидуализированного лечения улучшает эффективность лечения

Использование ЦС предлагает многообещающую альтернативу фТЛЧ, что особенно важно для Кыргызстана как страны с высоким бременем МЛУ-ТБ





Благодарю за внимание!