

Експериментальне обґрунтування застосування зразків мокротиння з різним бактеріальним навантаженням *M. tuberculosis* для методу цільового секвенування нового покоління

Журило О.А.¹, Чернов О.В.², Барбова А.І.¹, Трофімова П.С.¹, Миронченко П.С.¹, Яременко М.С.¹

1. ДУ «Національний науковий центр фтизіатрії, пульмонології та алергології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України», м. Київ, Україна

2. Міжнародна організація РАТН в Україні, м. Київ, Україна

Обґрунтування. Цільове секвенування нового покоління (цСНП) – це потужний інструмент для швидкого виявлення збудника туберкульозу. Перевагами методу цСНП є можливість отримання результату безпосередньо з клінічного зразка ще до виділення клінічного ізоляту *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ). Однак метод цСНП, як і всі молекулярно-генетичні технології, має обмеження щодо чутливості та специфічності, тому правильний підхід до відбору зразків є головним фактором для отримання надалі ефективного результату дослідження.

Мета. Вивчення впливу різної концентрації МБТ у зразку мокротиння за методом бактеріоскопії на результати виділення високомолекулярної ДНК МБТ, кількісні її характеристики та вирішення питання про її прийнятну якість для подальших досліджень методом цСНП.

Матеріали та методи. Фенотипові методи охоплювали світлову мікроскопію мазків осаду мокротиння, забарвлених за методом Циля – Нільсена.

Молекулярно-генетичні методи: цСНП проводилося з використанням наборів Deeplex Мус-ТВ для виявлення ДНК МБТ (Genoscreen, Франція). Виділення високомолекулярної ДНК МБТ для цСНП відбувалося відповідно до СОП «Виділення високомолекулярної ДНК мікобактерій за допомогою набору реагентів QIAamp® DNA Mini Kit». Контроль якості та кількості ДНК здійснювали згідно із СОП «Вимірювання концентрації ДНК за допомогою спектрофотометра Denovix і флуориметра Quantus». Бібліотеки ДНК готувалися відповідно до СОП «Приготування бібліотеки ДНК для цільового секвенування з послідовним використанням наборів

Deeplex® Мус-ТВ та Nextera XT». Секвенування зразків проводилося згідно із СОП «Запуск секвенування на платформі Illumina MiSeq». Аналіз файлів даних секвенування у форматі FASTQ виконано за допомогою застосунку Deeplex Web Application відповідно до СОП «Аналіз файлів даних FASTQ за допомогою застосунку Deeplex Web Application».

Результати. Зразки нативного мокротиння для подальшого проведення цСНП відбирали залежно від бактеріального навантаження в зразку – вмісту певної кількості кислостійких бактерій (КСБ) у 1,0 мл мокротиння. Для цього ми провели рутинні фено- та генотипові дослідження мокротиння від хворих, за результатами яких було відібрано 40 зразків нативного мокротиння з такими результатами бактеріоскопії: з умістом КСБ 3+ – 10 зразків; з умістом КСБ 2+ – 10 зразків; з умістом КСБ 1+ – 10 зразків; негативні за результатами бактеріоскопії – 10 зразків. Надалі з відібраних зразків, що містили КСБ у різній концентрації, було виділено ДНК МБТ. Концентрацію бактеріальної ДНК у позитивних зразках залежно від градації мазків продемонстровано на рисунку 1.

З рисунку 1 видно, що кількість виділеної бактеріальної ДНК МБТ напряму залежить від бактеріального навантаження зразка. Що більше КСБ міститься в зразку, то більше виділяється бактеріальної ДНК МБТ.

Відомо, що прийнятними для цСНП можуть бути проби, які містять лише необхідну кількість ДНК МБТ для цього методу, тому в подальших дослідженнях потрібно було вирішити, чи можна досліджувати всі відібрані нами

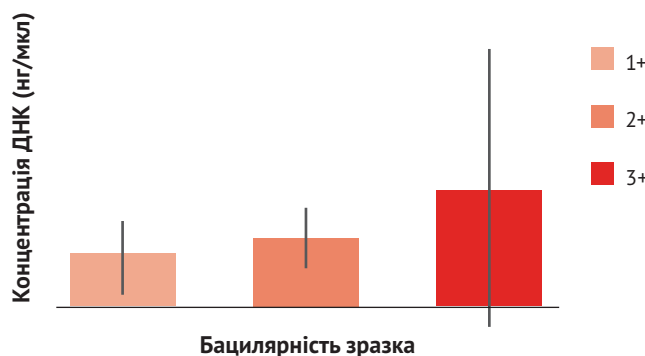


Рис. 1. Концентрація ДНК МБТ у зразках мокротиння з різною градацією мазка (КСБ 1+, КСБ 2+, КСБ 3+)

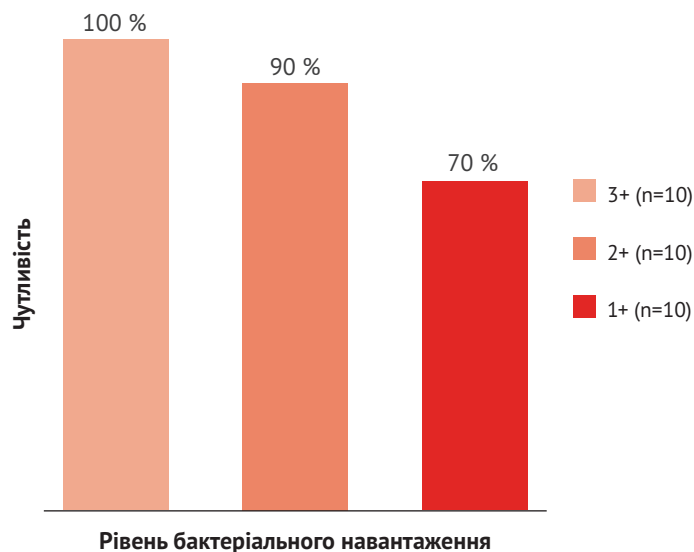


Рис. 2. Аналітична чутливість цСНП

Примітки: КСБ 3+ (n=10): 100 % чутливість (світліший стовпчик); КСБ 2+ (n=10): 90,0 % чутливість (темніший стовпчик); КСБ 1+ (n=10): 70,0 % чутливість (червоний стовпчик).

позитивні зразки мокротиння з різною концентрацією МБТ. Було вивчено аналітичну чутливість цСНП залежно від бактеріального навантаження зразка (рис. 2).

Отримані результати демонструють, що аналітична чутливість методу цСНП за допомогою набору Deeplex Мус-ТВ залежить від рівня бактеріального навантаження

в зразках нативного мокротиння. За високого навантаження (КСБ 3+) чутливість становила 100 % (10/10), за середнього навантаження (КСБ 2+) – 90,0 % (9/10), а за низького навантаження (КСБ 1+) – 70,0 % (7/10). Ці дані вказують на ефективність методу для зразків із КСБ 3+ і КСБ 2+.

Висновки. Кількість виділеної ДНК МБТ для встановлення цСНП залежить від бактеріального навантаження мазка. Отримані результати демонструють ефективність методу для рутинної діагностики зразків, де бактеріальне навантаження оцінюється як КСБ 2+ або КСБ 3+.

Ключовим чинником для отримання послідовності з повним охопленням усіх цільових ділянок є якість як зразка мокротиння, так і геномної ДНК МБТ після екстракції. Наявність достатньої кількості бактерій (геномів МБТ) для ампліфікації мішені є необхідною для цСНП. Низьке охоплення мішеней призводить до отримання обмеженої інформації про резистентність, що ускладнює прийняття рішень щодо використання ПТП.