

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-213

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ТАРГЕТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ
КАК ИНСТРУМЕНТ ДИАГНОСТИКИ ПАТОГЕНОВ*****MODERN TARGETED SEQUENCING METHODS AS A TOOL FOR PATHOGEN DIAGNOSTICS**

М. И. Надтока¹, А. Ю. Бухарина¹, Г. В. Роев^{1,2}, А. В. Пересадына¹,
А. В. Выходцева¹, С. Е. Гончаров¹, К. Ф. Хафизов¹, В. Г. Акимкин¹

¹Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный

M. I. Nadтока¹, A. Y. Bukharina¹, G. V. Rojev^{1,2}, A. V. Peresadina¹, A. V. Vykhodtseva¹,
S. E. Goncharov¹, K. F. Khafizov¹, V. G. Akimkin¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

²Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

✉ nadтока@cmd.su

Аннотация

В условиях постоянно растущего разнообразия вирусов, способных инфицировать человека, отчетливо проявляются ограничения традиционных молекулярных методов диагностики. Методики, объединяющие мультиплексные панели праймеров и технологии NGS, выглядят перспективной альтернативой классическим методам. Мы разработали и апробировали методику mp-tNGS, способную выявить широкий спектр вирусов в рамках единого анализа.

Abstract

With the ever-increasing diversity of viruses capable of infecting humans, the limitations of traditional molecular diagnostic methods are becoming clear. Methods combining multiplex primer panels and NGS technologies appear to be a promising alternative to classical methods. We have developed and validated mp-tNGS technique capable of detecting a wide range of viruses in a single assay.

Разнообразие вирусов, способных заразить человека, неуклонно расширяется, помимо этого с развитием глобальной транспортной системы существенно возросла и мобильность патогенов. В текущих условиях, когда опасный патоген с легкостью может распространить инфекцию по всему миру, одним из ключевых направлений развития систем здравоохранения является разработка диагностических решений, способных выявить максимально возможный спектр инфекционных агентов. Одновременное выявление множества возбудителей становится затруднительной задачей для классических молекулярных методов, ввиду чего они медленно, но верно уступают место более современным технологиям. Этот процесс обуславливается несколькими ограничениями традиционных подходов, к наиболее ярко выраженным из которых можно отнести лимитированный набор мишеней в рамках одного анализа и необходимость в наличии предварительной гипотезы о возможном этиологическом агенте в образце. На фоне этого высокопроизводительное секвенирование (NGS) рассматривается как перспективный инструмент диагностики и мониторинга патогенов, преодолевающий ограничения классических методов. Благодаря получению полной геномной информации патогенов такие технологии в последние годы плотно интегрировались в практику обнаружения возбудителей заболеваний, существенно расширив возможности эпидемиологического надзора.

Одним из направлений NGS-диагностики является таргетное секвенирование (targeted NGS, tNGS), применяемое для выявления уже известных патогенов. tNGS позволяет выборочно обогатить последовательности определенных патогенов за счет использования наборов специфических праймеров или зондов. В последнее время все больше внимания приковывает к себе tNGS подход, основанный на использовании мультиплексных панелей — mp-tNGS (multiplex PCR-based tNGS). Этот подход нацелен не столько на углубленную характеристику отдельного вируса, сколько на максимально широкую идентификацию инфекционных агентов за единый анализ. Мультиплексный формат ПЦР подразумевает объединение множества пар праймеров для разных мишеней в единой реакции. В сочетании с технологиями NGS такой подход помогает преодолеть ограничения, присущие традиционным методам, и одновременно определить большее число патогенов в рамках одного исследования.

* Исследование выполнено за счет гранта Центрального НИИ эпидемиологии (ЕГИСУ НИОКТР № 125012900979-9).

© М. И. Надтока, А. Ю. Бухарина, Г. В. Роев, А. В. Пересадына, А. В. Выходцева, С. Е. Гончаров, К. Ф. Хафизов, В. Г. Акимкин, 2025

На основе этого подхода нами была разработана mp-tNGS-методика для одновременной идентификации 28 вирусных патогенов, преимущественно ассоциированных с респираторными инфекциями. В нашем подходе применяется мультиплексная праймерная панель для амплификации и последующего секвенирования консервативных участков геномов целевых возбудителей. При этом каждый праймер, образующий панель, имеет на 5'-конце адаптерную последовательности Nextera. Такая особенность строения праймеров в совокупности с малой длиной получаемых ампликонов (< 300 п. н.) обеспечивает сравнительно быстрый по меркам секвенирования анализ образцов. Одновременно данные особенности позволяют существенно снизить финансовые и временные затраты на диагностику.

Разработанная методика прошла несколько этапов валидации, которые представляли из себя оценку специфичности праймеров, а также определение пределов чувствительности панели. Вдобавок она прошла апробацию на нескольких независимых клинических выборках, которые суммарно насчитывали > 1000 образцов.

Наиболее примечательным результатом исследования клинического материала являлся обширный спектр патогенов, который может быть выявлен в рамках одного анализа посредством нашей методики. При этом с ее помощью возможно одновременно идентифицировать как РНК-, так и ДНК-вирусы. Таким образом, наши результаты демонстрируют перспективность mp-tNGS методик для диагностики, а также подсвечивают их преимущества по охвату разнообразных патогенов в сравнении с традиционными молекулярными подходами.

Кроме того, нами был разработан специальный биоинформатический модуль для анализа данных секвенирования, получаемых с использованием нашей панели. Ключевой особенностью модуля является гибко настраиваемая функция по устранению контаминации из данных каждого образца, благодаря чему становится возможным достоверно идентифицировать возбудителя заболевания. Вдобавок наша программа автоматически формирует наглядный отчет по патогенам, обнаруженным в каждом образце.

Таким образом, наше исследование закладывает прочную основу для создания новых высокочувствительных диагностических решений и демонстрирует, что mp-tNGS-методики могут быть успешно использованы в лабораторной практике.