استحداث فحص لتشخيص الأمراض المعدية باستخدام تقنية الجيل التالي لتسلسل الحمض النووي

سها بنت عبد العال علي فراج

إشراف
أ.د. طه بن عبدالله طه قمصاني
أ.د. عصام بن إبراهيم أزهر
أ.د. جهاد بنت مصطفى يوسف

المستخلص

المقدمة: تعتبر الأمراض المعدية هي السبب الرئيس في العالم لإصابة البشر بالأمراض والوفيات، حيث يتمثل العائق الرئيسي في الوقاية والحد من أعباء هذه الأمراض هو التعرف على العامل المسبب للعدوى. إن علم الميتاجينومك السريري هو نهج واعد يساعد في تحديد العوامل المسببة في حالات العدوى غير المعروفة، إلا أن تطبيقه في المجال الطبي يتطلب تحسين العمليات المستخدمة في تحضير العينة لاستخدامها في تقنية الجيل التالي لتسلسل الأحماض النووية قبل تطبيقها في المختبرات السريرية، لذلك تهدف هذه الدراسة الى إنشاء فحص للميتاجينومك السريري يستهدف أنواع مختلفة من العوامل المسببة سواء أكانت فيروسات أو بكتيريا أو فطريات في العينة السريرية على عكس ماهو متعارف عليه. الطرق: تم إنتاج عينة وهمية مستخدم فيها خمسة أنواع مختلفة من مسببات الأمراض وهم: المستخفية المورمة، وكليبسيلا الرئوية، والمكورات العنقودية الذهبية، وفيروس الخمرة، وفيروس الأدينو، من أجل المقارنة التقييمية لبروتوكولات مختلفة في خطوة استخلاص الحمض النووي و خطوة نضوب حمض الديوكسي رايبوز النووي الخاص بالإنسان إلى جانب اختبار خيار هضم أو عدم هضم حمض الديوكسي رايبوز النووي قبل خطوة النسخ المعاكس، واختيار نوع البادئات المستخدمة في نفس العملية، وقد خضعت جميع نواتج المقارانات لتحضير المكتبة وتحميلها على جهاز المايسيك، وتحليل البيانات الناتجة باستخدام برنامج "جينيس" لحساب أعداد القراءات التي تنتمي إلى كل ممرض مضاف في العينة ومقدار ما تغطيه هذه القراءات من جينومه المرجعي، و تم في النهاية تجميع الفحص وتطبيقه على عينات سريرية ذات عدوى منفردة أو متعددة معروفة. النتائج: لإنشاء فحص الميتاجينومك تم اختيار " PowerViral® Environmental RNA-DNA Isolation Kit" لاستخلاص الحمض النووي بعد ٥ دقائق من الطرق المبرد للعينة و" NEBNext

Microbiome DNA Enrichment Kit" للتخلص من الحمض النووي الديوكسي رايبوزي بناءً على تقييم المقارنات. كما تم في خطوة النسخ المعاكس تجاهل عملية هضم حمض الديوكسي رايبوز النووي واستخدام البادئات غير الريبوسومية للتخلص من الحمض النووي الرايبوزومي. الاستنتاج: استخدام فحص الميتاجينومك المنشأ في هذا البحث في تحاليل العينات السريرية وخاصَّة متعددة الميكروبات المعدية أظهرت قدرته في تحديد مسببات الأمراض بمختلف أنواعها. التوصيات: يوصى باستخدام فحص الميتاجينومك المنشأ في هذه الدراسة على عدد واسع من العينات السريرية قبل تطبيقه على العينات ذات العدوى المجهولة.

Establishment of Next-Generation Sequencing Assay as a Diagnostic Tool for Infectious Disease

Submitted by
Suha Abdulaal Ali Farraj

Supervised by
Prof. Taha A. Kumosani
Prof. Esam I. Azhar
Prof. Jehad M. Yousef

Abstract

Background: Globally, infectious diseases are still the leading cause of human morbidity and mortality. The main limitation to prevent and minimize the burden of infectious disease is identifying the etiological agent associated with the infection. Clinical metagenomics (CMg) is a promising approach that helps to identify etiological agents in cases of unknown infections. The application of CMg in clinical settings still requires an optimization of the sample preparation steps to be used in Next-Generation Sequencing platforms prior to introducing it into clinical laboratories. The study aimed to establish an assay for CMg targeting different taxonomy of etiological agents, whether virus, bacteria or fungus, in the clinical sample contrary to what is available in this regard. Methods: A mock sample spiked with five different pathogens, which were *C. neoformans*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, ALKV and AdV, was used for the comparative evaluation of different protocols belong to nucleic acid extraction step and human DNA depletion step. Also, the same mock sample was used to test the choices of digestion or not the DNA prior reverse transcription (RT) step and the primers used in this step. All the resultants were subjected to library preparation and loaded on the MiSeq platform. The analysis was done using GENEIOUS software to calculate the numbers of read belong to each spiked pathogen and how much of these reads covering from its reference genome. Finally, the assay was assembled and applied on clinical samples with single or multiple known infections. Results: the PowerViral® Environmental RNA-DNA Isolation Kit with a cooled 5-min bead beating and NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit were selected based on the outcome of their comparative evaluation. Also, ignoring DNA digestion step and using the non-ribosomal primers in the RT step to deplete rRNA were chosen for the metagenomic assay. Conclusion: The applying of the established metagenomic assay in this study on clinical specimens especially the multi-infectious ones showed the ability to successfully identify different types of pathogens. Recommendation: The established metagenomic assay in this study should be applied on a large scale of clinical samples with known infections prior using it with unknown infections.