

Принципы генотипирования.

**Современные методы
генотипирования.**

**Основные области
применения
генотипирования.**

Корсакова И.И.





Под **типированием** понимают фенотипический или генетический анализ изолятов бактерий на уровне вида/подвида, осуществляемый для выявления комплекса характеристик, специфичных для штаммов или клонов.

Типирование используют для изучения динамики бактериальных популяций на различном уровне, начиная от отдельного человека или ограниченной экологической ниши (например, учреждения) и заканчивая глобальной экосистемой.



Важнейшей характеристикой любого метода типирования является его **разрешающая способность**, под которой подразумевают способность метода оценивать как отдельные типы, так и два штамма, случайно отобранные из бактериальной популяции.

Для количественной оценки дискриминирующей способности методов типирования применяют индекс разнообразия Симпсона (D).

В идеале для методов с максимальной разрешающей способностью индекс Симпсона должен быть равен 1. Это означает, что метод может отнести к различным типам два любых штамма.



Однако необходимый уровень разрешающей способности определяется конкретными **задачами типирования**, к которым относятся:

- информационное обеспечение программ (систем) наблюдения за распространением инфекций на региональном, национальном или глобальном уровнях;
- расследование вспышек инфекционных болезней;
- изучение патогенеза инфекционных болезней, выявление групп (клонов) бактерий, обладающих повышенной вирулентностью;
- изучение динамики инфекционного процесса у отдельных пациентов (исключение или подтверждение предположений о рецидиве процесса или реинфекции).



Очевидно, что для изучения динамики инфекционного процесса у отдельных пациентов или расследования вспышек инфекционных болезней необходимы методы с максимальной разрешающей способностью.

Методы, применяемые для решения национальных и глобальных задач, должны позволять выделять группы сходных бактерий (клонов).



ДНК типирование: общие сведения

Проблема адекватного отнесения конкретного организма к той или иной группе кроме теоретического представляет и большой практический интерес. Знание источника различных штаммов патогенных микроорганизмов, вызывающих больничные инфекции, позволило бы выработать эффективные меры защиты.

Были обнаружены генетические маркеры в виде специфических последовательностей ДНК, которые дают возможность выявлять родственные отношения между особями одного вида путем внутри- и межпопуляционных исследований.



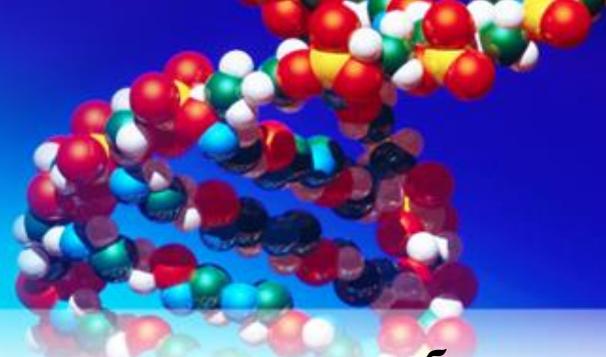
Генетическим, или ДНК-типированием, называют определение особенностей генотипа организма путем анализа ДНК его генома. В процессе ДНК-типирования определяют особенности первичной структуры ДНК исследуемого организма в конкретных генетических локусах. У каждого вида организмов имеется большое число внутривидовых различий в первичной структуре ДНК отдельных генетических локусов.

Генетические локусы, выполняющие одну и ту же функцию (содержащие один и тот же ген или несколько генов), но различающиеся по первичной структуре ДНК, называют полиморфными, а само явление существования в популяции полиморфных локусов получило название генетического полиморфизма.



Генотипирование — это метод, позволяющий на основе изучения ДНК комплексно проанализировать уникальный для каждого организма генотип (представляющий собой характерную для конкретной особи совокупность генов, отличающую их одну от другой).

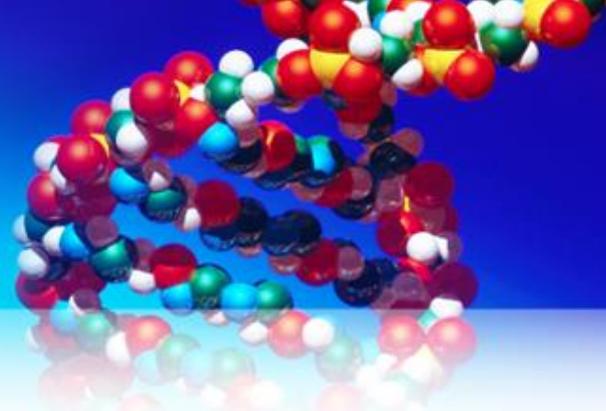
Суть данного метода состоит в исследовании вариаций генетического кода, которые имеют место, поскольку гены, являющиеся структурной и функциональной единицей наследственности и контролирующие развитие тех или иных признаков или свойств, подвержены изменениям за счёт ротации последовательности нуклеотидов в цепи ДНК.



Молекулярно-генетическое типирование является методом выбора в следующих ситуациях:

- при расследовании острых и хронических вспышек инфекций;
- в процессе верификации результатов фенотипических методов внутривидового типирования (в частности, антибиотикотипирования, резистенс-типирования), направленного на выявление госпитальных штаммов;
- при слежении за циркуляцией международных эпидемических клонов в пределах территориальных единиц, субъектов РФ и на национальном уровне.

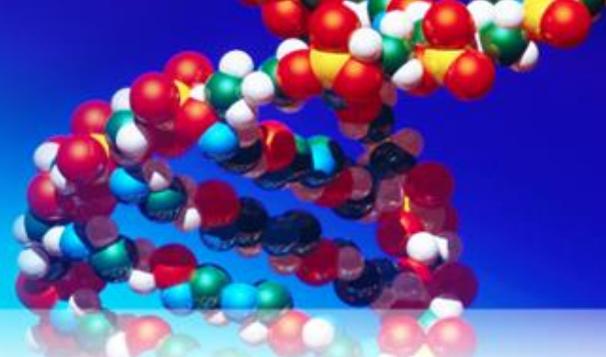
Проведение молекулярно-генетического типирования обязательно при оценке идентичности изолятов микроорганизмов, выявленных из различных источников, и нерезультативном применении при этом комплекса традиционных (фенотипических) методов.



Генетические маркеры, используемые при молекулярно-генетическом типировании возбудителей

Молекулярно-генетическое типирование возбудителей основано на выявлении специфических генетических особенностей штаммов возбудителя, общих для штаммов, происходящих из одного источника, и различающихся у штаммов из разных источников - **генетических маркеров** (маркеров геномного полиморфизма).

Генетические маркеры представляют собой участки нуклеотидных последовательностей ДНК или РНК микроорганизма. К их числу относят различные повторяющиеся последовательности ДНК, сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции, мобильные генетические элементы, точечные мутации в отдельных генах «домашнего хозяйства».



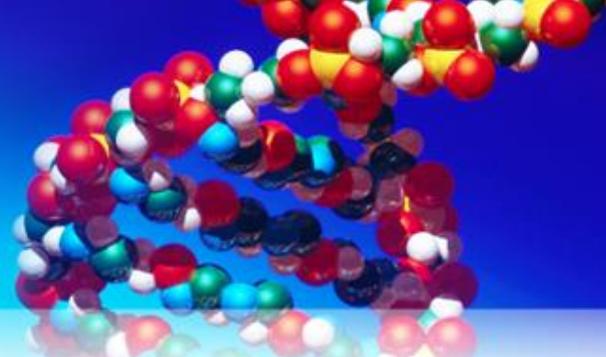
Повторяющиеся последовательности ДНК включают прямые повторы, инвертированные повторы, тандемные повторы и палиндромные последовательности, расположенные группами (кластерами).

Прямые повторы представляют собой повторяющиеся последовательности нуклеотидов, имеющие определенное число копий. Прямой повтор может выглядеть следующим образом: **5'...ТАСТGGСА ... ТАСТGGСА.. ...3'** (цифрами обозначены концы цепи ДНК, образованные 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной группами, соответственно).

Инвертированный повтор представляет собой последовательность ДНК, имеющую зеркально расположенную копию:

5'... TGCCTGТА.....АТGАССGТ ...3'.

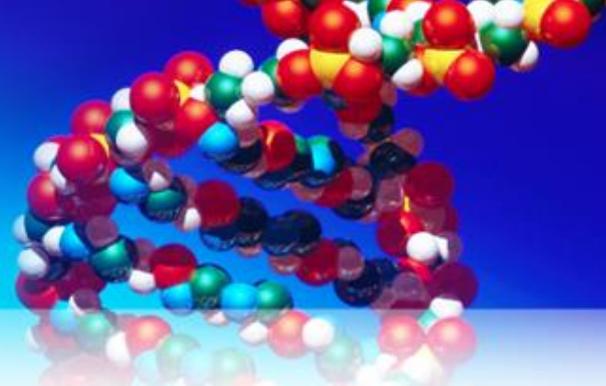
Тандемные повторы — тандемно повторяющиеся нуклеотидные последовательности: множественные копии последовательностей (единиц), следующие друг за другом: **ТАТАТАТА** - это тандемный повтор динуклеотида ТА, **CGGCGGCGG** – тандемный повтор тринуклеотида CGG. Тандемные повторы в одном локусе у разных штаммов могут отличаться количеством повторяющихся единиц.



Палиндромные последовательности ДНК — последовательности, которые по каждой из цепей ДНК считываются одинаково как слева направо, так и справа налево.

Например, последовательность ДНК **АССТАГГТ** является палиндромной, поскольку ей на комплементарной цепи ДНК соответствует последовательность **TGGATССА**, и обратный порядок нуклеотидов последовательности **TGGATССА** соответствует последовательности **АССТАГГТ**.

Благодаря наличию участков, которые комплементарны сами себе, молекулы ДНК, содержащие палиндромы, способны формировать сложные структуры, напоминающие шпильки. Данные структуры, будучи нестабильными, играют важную роль в рекомбинационной изменчивости микроорганизмов.



Широко распространенные структурные элементы генома прокариот, содержащие повторяющиеся последовательности:

REP (сокр. англ. Repetitive Extragenic Palindrome) - наиболее распространенные короткие повторяющиеся последовательности.

REP-элементы, впервые обнаруженные у *E. coli* и *S. enterica* серовар *typhimurium*, представляют собой палиндромы длиной 38 п.н. Они присутствуют в количестве 500–1000 копий на хромосому, имеют разную взаимную ориентацию, образуют тандемы или собраны в кластеры до 10 копий каждый.

В настоящее время REP- и REP-подобные элементы выявлены у представителей большинства бактериальных семейств, что позволяет использовать их для внутривидового типирования, в том числе с использованием автоматизированных систем.



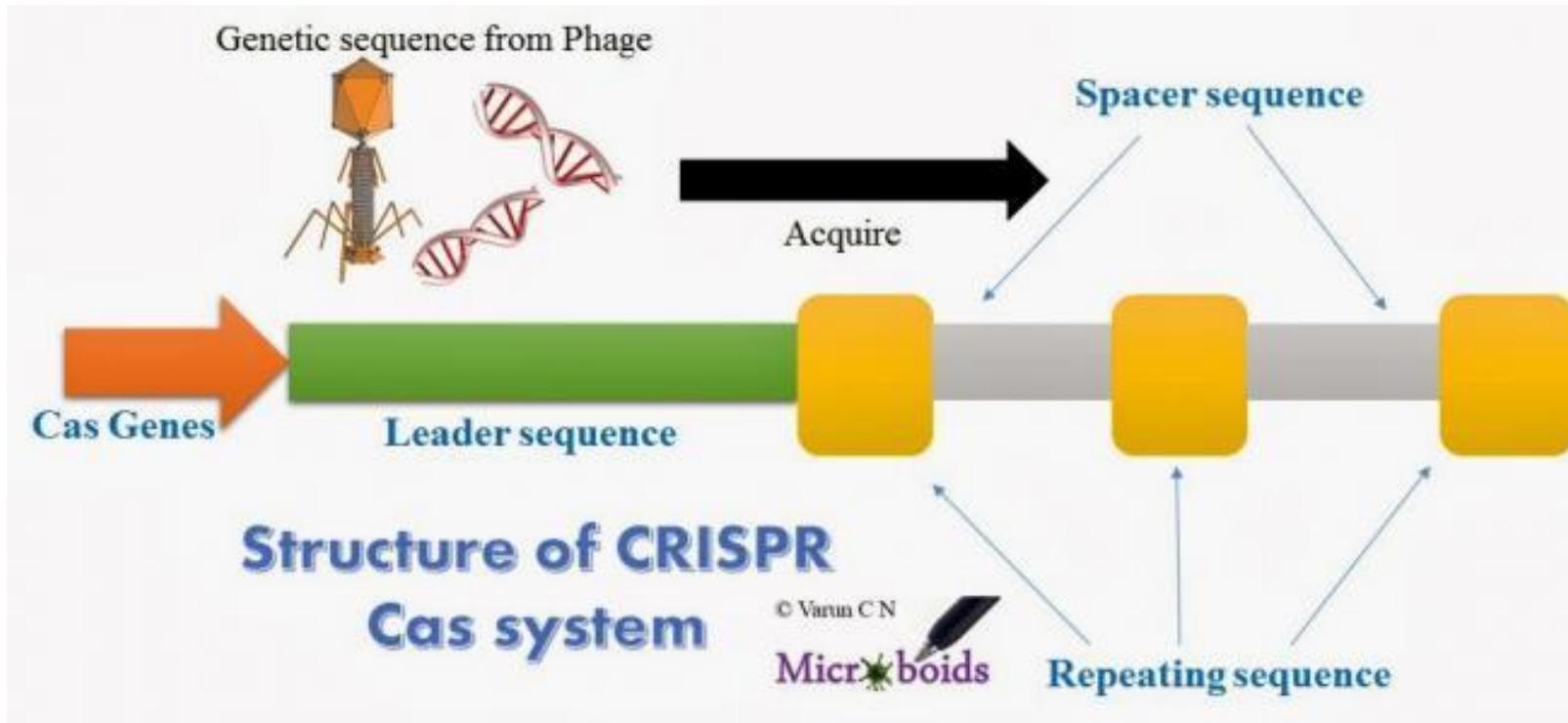
Широко распространенные структурные элементы генома прокариот, содержащие повторяющиеся последовательности:

ERIC (сокр. англ. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) - первоначально инвертированные повторы длиной 126 п.н. были описаны у энтеробактерий. Затем оказалось, что эти элементы широко распространены у представителей домена *Bacteria*.

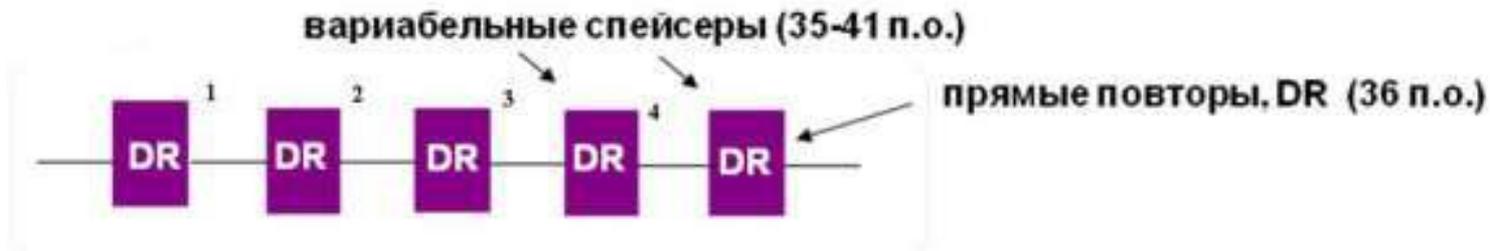
CRISPR (сокр. англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) — это обнаруженные в ДНК многих видов бактерий прямые повторы протяженностью 24–48 п.н., разделенные короткими вариабельными участками — так называемыми спейсерами (считают, что эти участки являются фрагментами фаговой ДНК). В пределах вида штаммы бактерий могут различаться наборами спейсеров.

Примером CRISPR может служить **DR-локус** хромосомы микобактерий туберкулезного комплекса, включающий несколько десятков коротких прямых повторов (англ. Direct Repeats) нуклеотидов, разделенных уникальными спейсерами. Полиморфизм этого локуса изучают с помощью метода сполиготипирования.

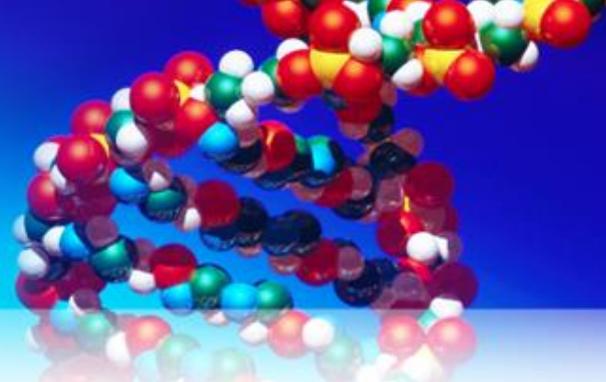
CRISPR



DR-локус

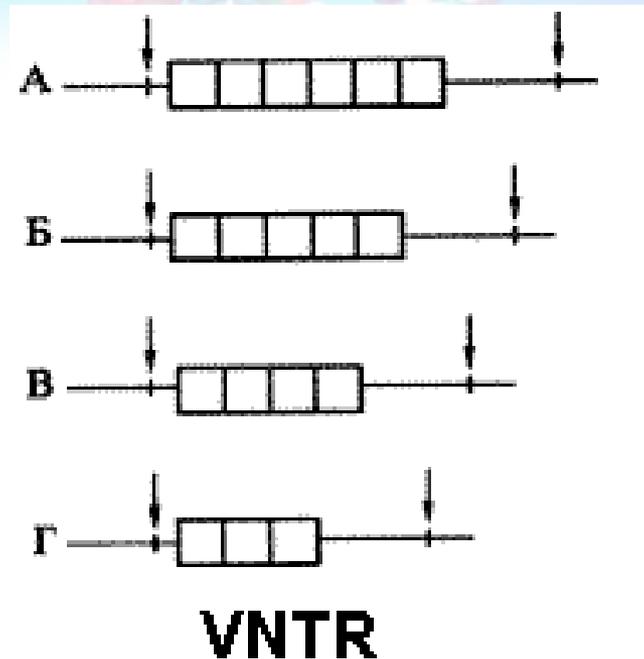


Структура DR-области хромосомы *Mycobacterium tuberculosis* complex.
Схема фрагмента DR-локуса. Прямые повторы (DR) обозначены прямоугольниками; переменные (по составу нуклеотидов и протяженности) спейсеры (1–4) показаны стрелками.

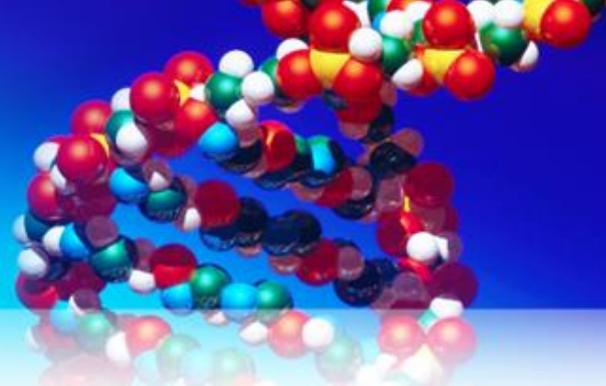


Широко распространенные структурные элементы генома прокариот, содержащие повторяющиеся последовательности:

VNTR-локусы (сокр. англ. Variable Number of Tandem Repeats) содержат различное (вариабельное) число тандемных (сцепленных линейно «голова–хвост») повторов в определенных участках хромосомы.



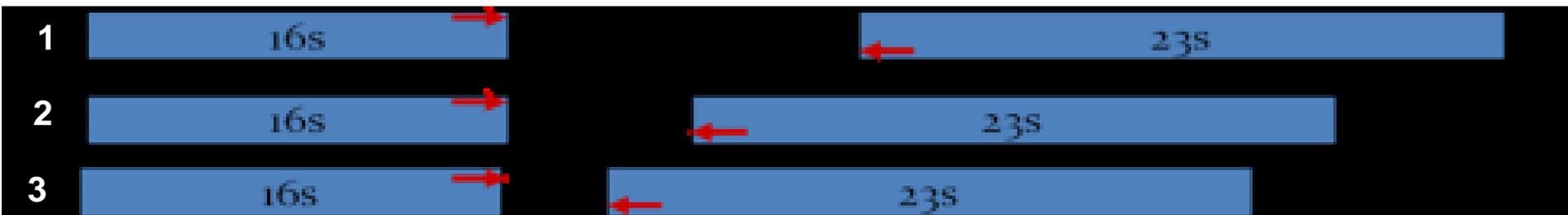
Тандемные повторы VNTR-локуса. Буквами обозначены изоляты с различным количеством тандемных повторов в VNTR-локусе. Квадратами обозначены тандемные повторы



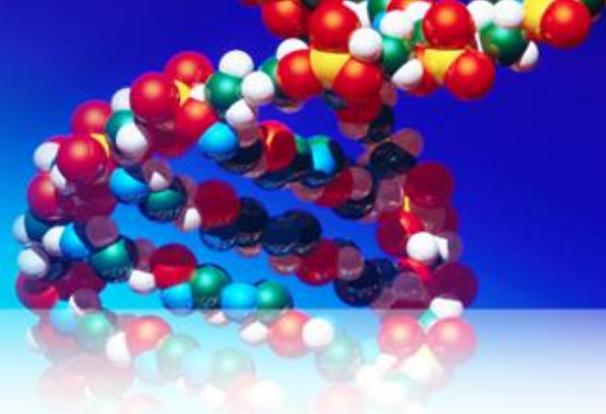
Полиморфизм межгенной области рибосомного оперона

К особому типу повторяющихся последовательностей можно отнести гены, кодирующие синтез двух фракций рибосомной РНК — 16S и 23S. Эти гены, представленные в бактериальных хромосомах несколькими копиями, имеют варибельную область между геном, кодирующим 16S, и геном 23S РНК.

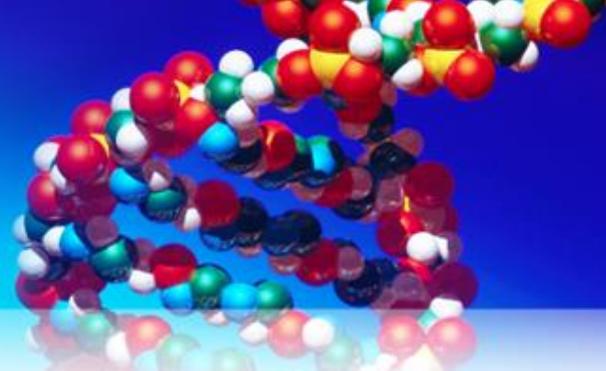
Вариации этой межгенной области позволяют осуществлять межвидовую и внутривидовую дифференциацию штаммов с помощью метода риботипирования.



Варибельная область между генами рибосомного оперона штаммов 1–3 (схема)

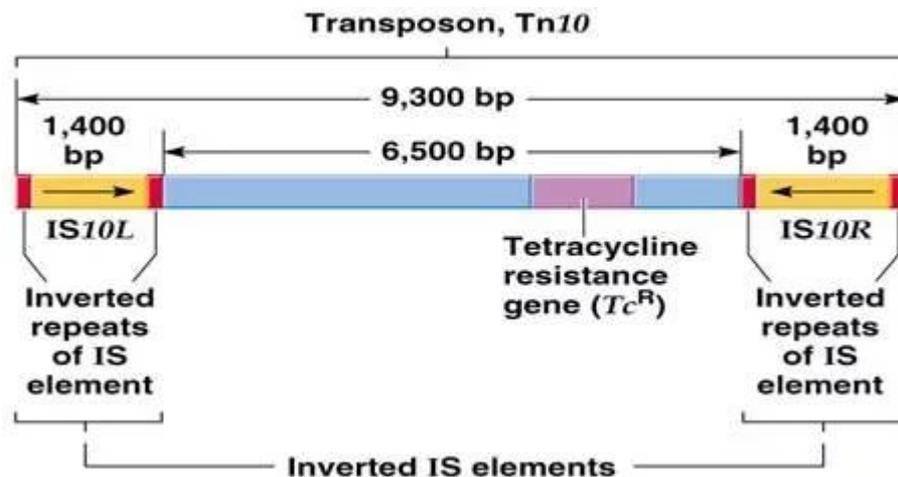


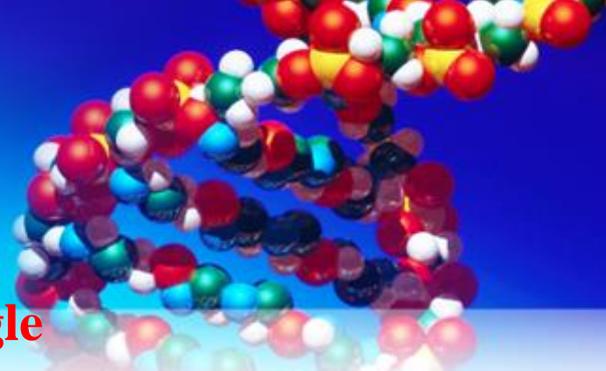
Сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции — это специфические последовательности ДНК, «узнаваемые» особыми ферментами — рестриктазами (эндонуклеазами рестрикции), которые способны разрезать двунитевые молекулы ДНК. В бактериальной клетке они распознают чужеродную ДНК и разрезают ее на фрагменты, выполняя, таким образом, защитную функцию. Каждая рестриктаза распознает только одну, специфическую последовательность нуклеотидов. Например, сайтом узнавания для рестриктазы EcoR1 является последовательность **G|AATC** (вертикальной линией обозначено место разреза), рестриктаза AluI распознает и разрезает последовательность **AG|CT**. Рестриктазы, которых в настоящее время известно несколько сотен, используют для рестрикционного анализа молекул ДНК.



Мобильные генетические элементы, широко распространенные в бактериальных геномах, представляют собой умеренные бактериофаги, транспозоны, а также **IS-элементы (англ. Insertion Sequence)** — «встраивающиеся последовательности», количество и расположение которых на хромосоме может варьировать у штаммов одного вида.

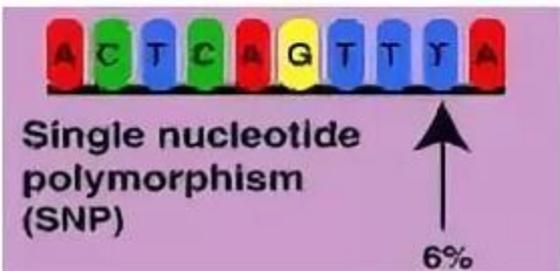
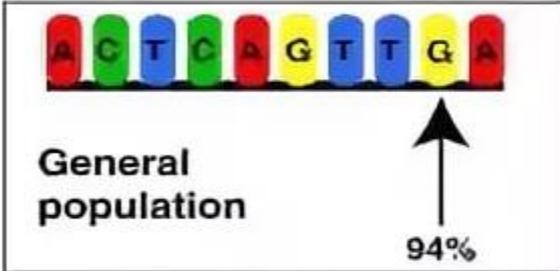
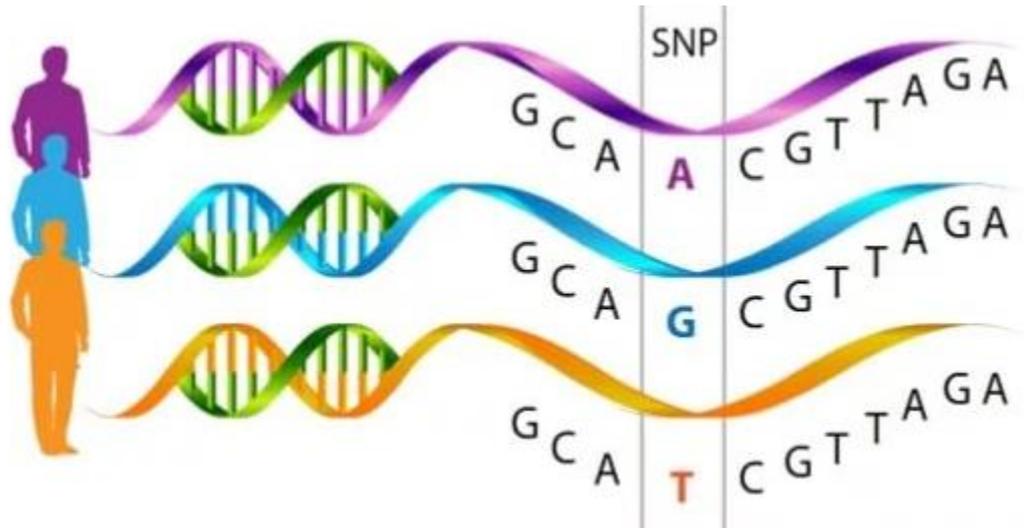
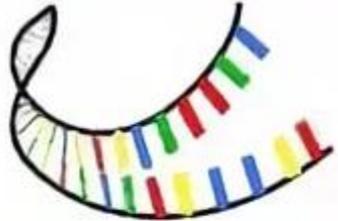
Например, последовательность IS 6110 *Mycobacterium tuberculosis*, IS 200 — бактерий рода *Salmonella*, IS 1548 — *Streptococcus* группы В являются генетическими маркерами штаммов.

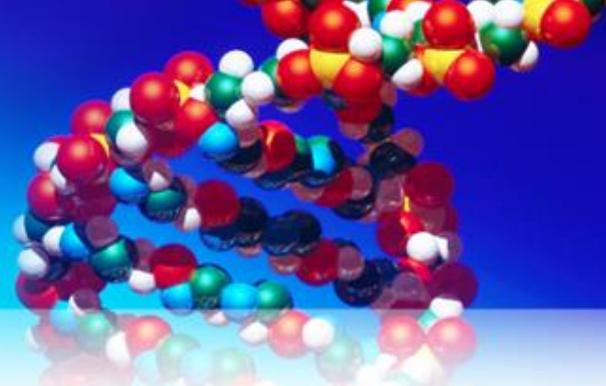




Однонуклеотидные полиморфизмы (англ. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) — точечные мутации в кодирующих (гены «домашнего хозяйства», гены вирулентности и др.) и некодирующих последовательностях геномной ДНК, служат маркерами для оценки генетической однородности изолятов данного вида с помощью рестрикционного анализа и различных модификаций метода ДНК-секвенирования.

Polymorphism
"Poly" *many* "morph" *form*





Основные методы молекулярно-генетического типирования, применяемые в системе эпидемиологического надзора

К числу методов молекулярно-генетического типирования относятся методы, основанные на полимеразной цепной реакции, методы рестрикционного анализа, гибридизации нуклеиновых кислот и ряд методов, основанных на секвенировании.

При расследовании вспышек используются молекулярно-генетические методы, позволяющие отнести тестируемые изоляты к тому или иному штамму, основываясь на наблюдаемом визуальном наборе «полос» (фрагментов ДНК с разной электрофоретической подвижностью) на электрофореграмме (методы геномной дактилоскопии). Детекция проводится по количеству фрагментов ДНК и их молекулярному весу, который оценивается по молекулярному весу контрольных маркеров и выражается в парах нуклеотидов (bp).



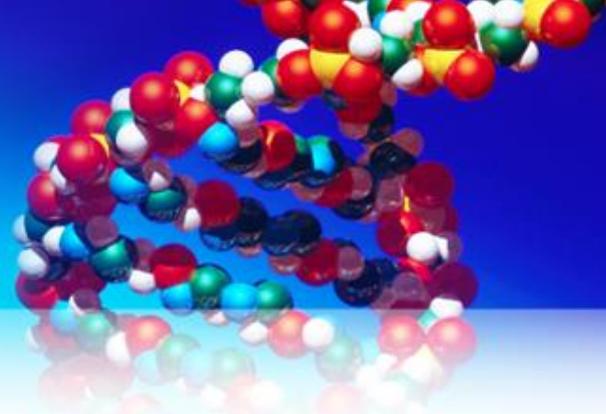
Методы, основанные на анализе рестрикционных профилей ДНК

Генетическими маркерами при использовании этой группы методов являются сайты узнавания рестриктазами, расположенные

- в плазмидной ДНК (рестрикционный анализ плазмид, RAP);
- в тотальной геномной ДНК (метод электрофореза в пульсирующем поле);
- в ограниченном участке ДНК, амплифицированном методом ПЦР (метод оценки полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ПЦР продукта - ПДРФ-ПЦР).

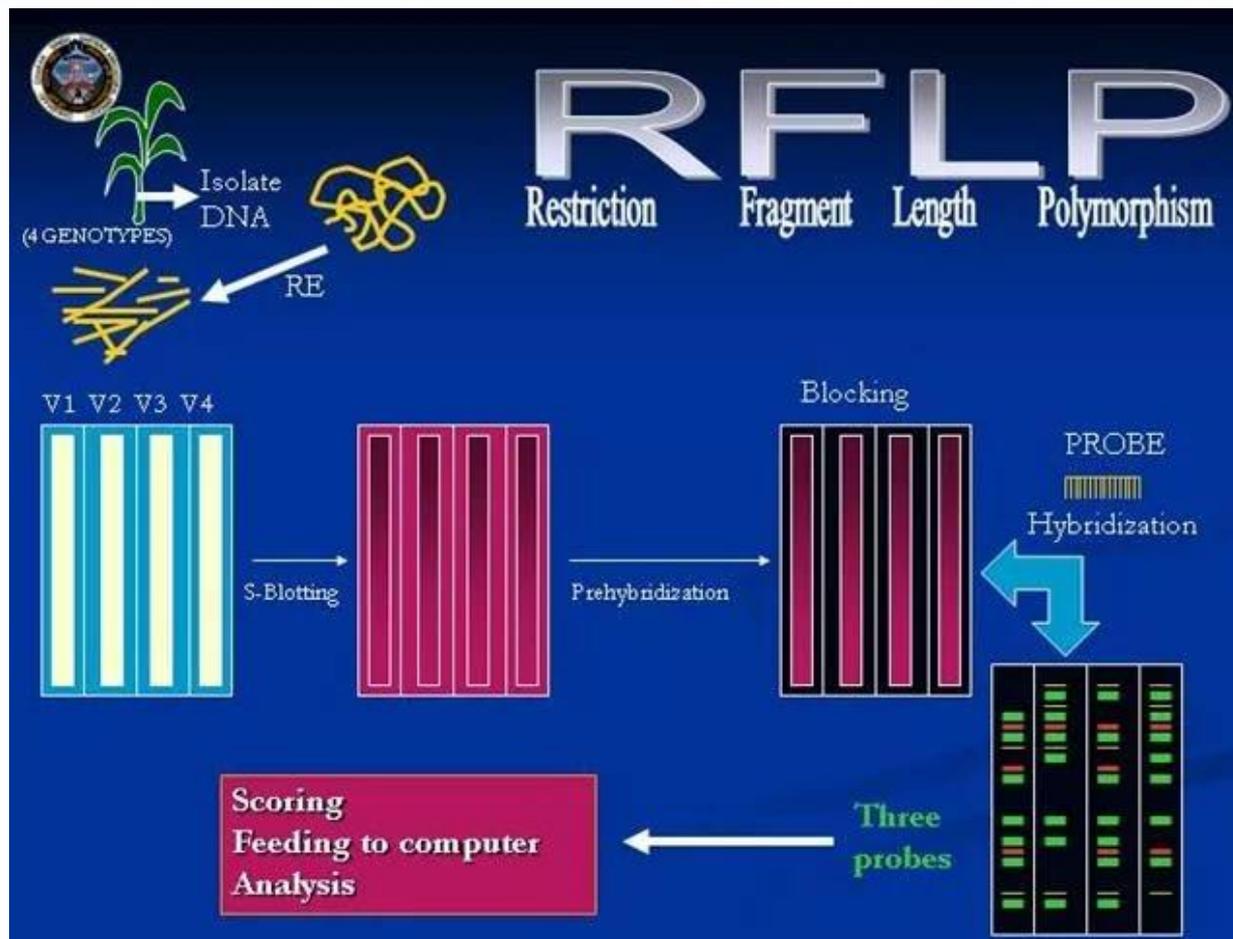


В свое время очень широкое распространение получили методы типирования, основанные на электрофоретическом изучении **плазмидного профиля** бактерий (количества и размера плазмид) и/или рестрикционных карт плазмид. Однако из-за нестабильности плазмид (частой утраты бактериями одних и приобретения других плазмид) разрешающая способность этих методов оказалась недостаточной.



Из молекулярно-генетических методов типирования к одним из самых распространенных относят методы анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ, restriction fragment length polymorphism — RFLP).

Бактериальную ДНК обрабатывают рестриктазами и анализируют с помощью электрофореза. Степень генетического родства сравниваемых изолятов оценивают по количеству и расположению рестрикционных фрагментов (полос на электрофорезе).





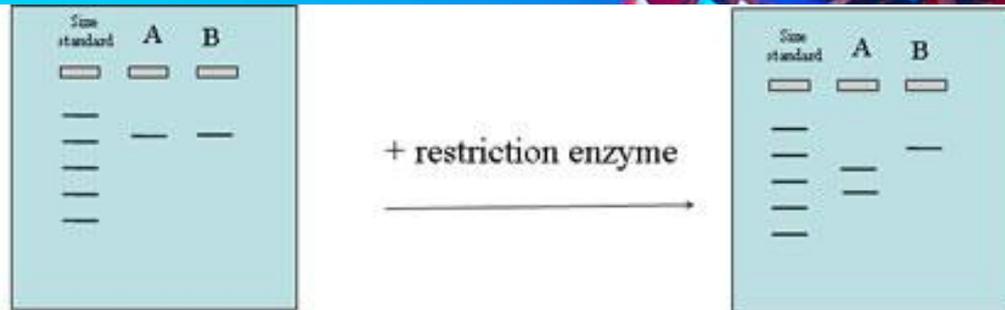
Развитием RFLP анализа явился метод **CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence)** – он основан на амплификации небольшого фрагмента ДНК вместо использования всего генома, как в RFLP.

Принцип работы CAPS-маркеров достаточно прост и основан как минимум на трех последовательных этапах:

- 1) проведение ПЦР со специфическими праймерами;
- 2) гидролиз фрагментов амплификации (ампликонов) с помощью эндонуклеаз рестрикции;
- 3) последующее разделение продуктов гидролиза в агарозном геле.

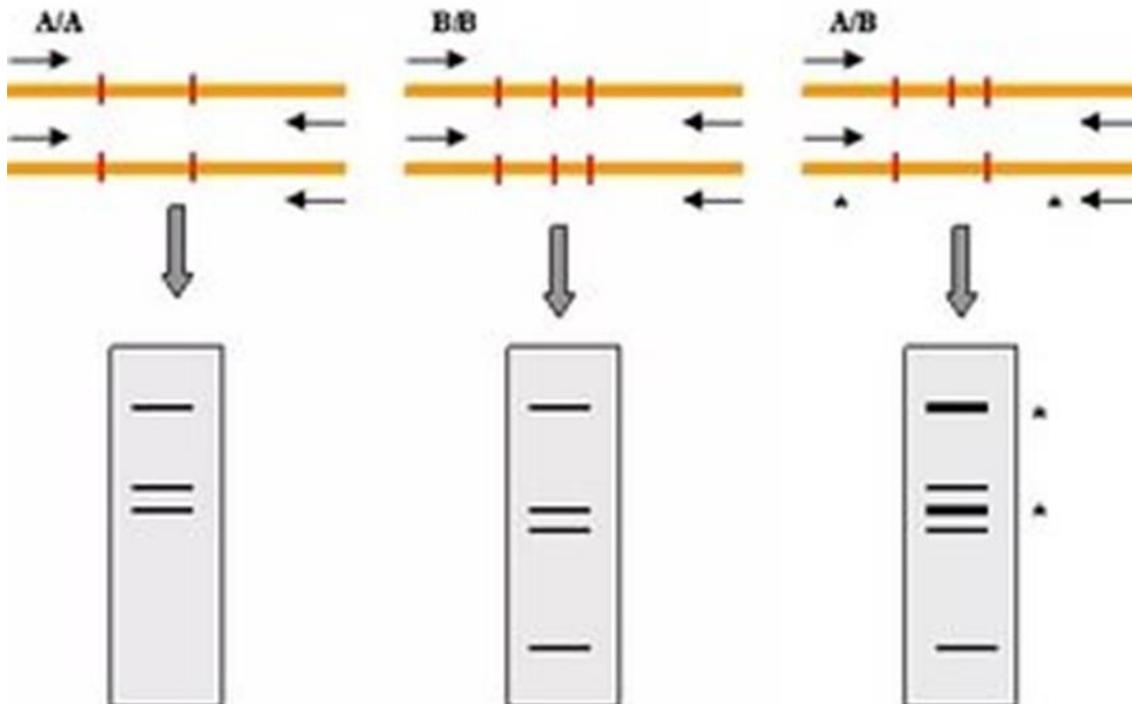
CAPS маркеры являются кодоминантными и позволяют выявлять полиморфизм в большом количестве индивидуумов.

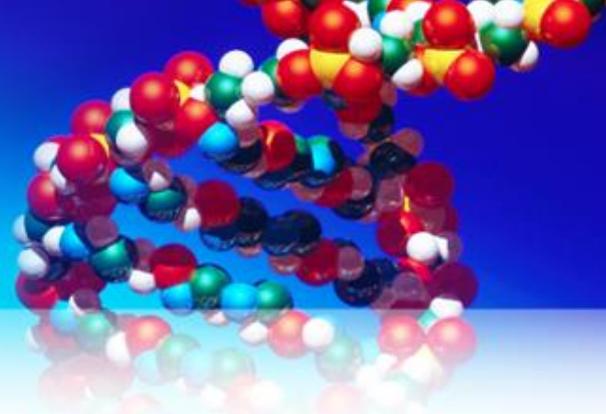
CAPS



In the first figure, no difference is seen in the PCR products of plant A and B, but after restriction digest a polymorphism can be identified.

CAPS assay: amplification – digestion – gel separation





Очень высокой разрешающей способности удалось достичь после разработки **метода гель-электрофореза в пульсирующем поле (Pulsed Field Gel Electrophoresis — PFGE)**.

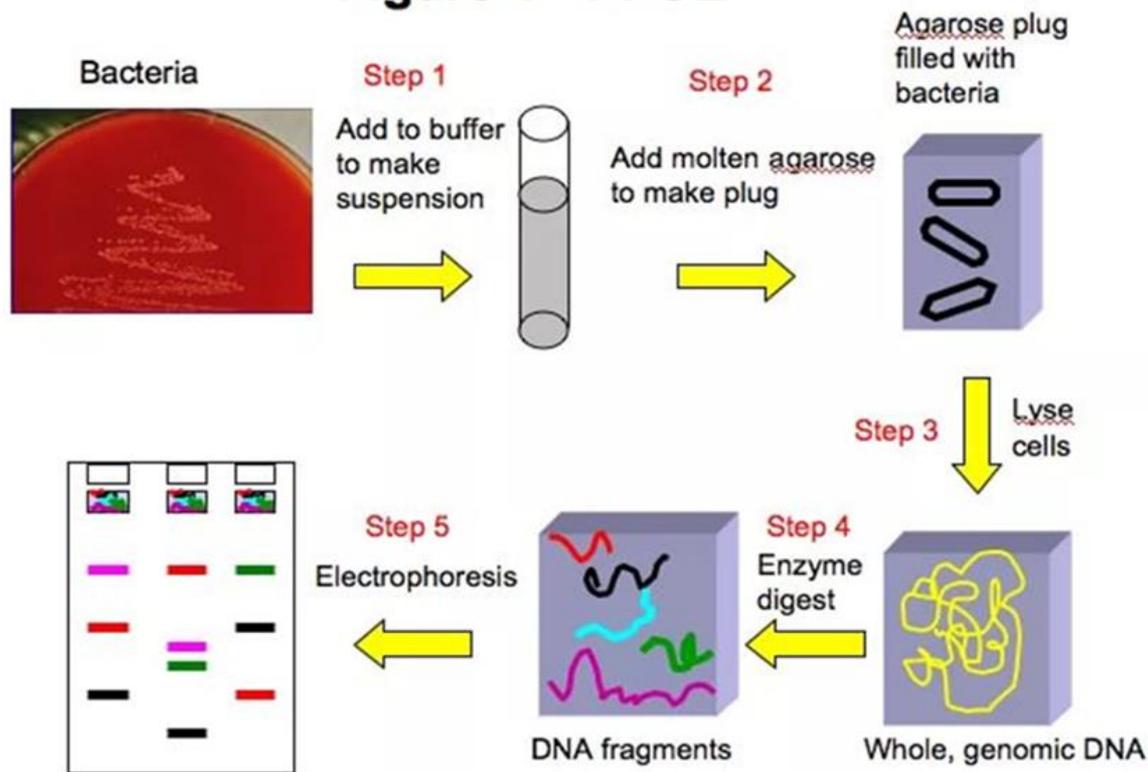
Суть данного метода заключается в том, что хромосомную ДНК изолятов микроорганизма расщепляют рестриктазами (часто используют эндонуклеазы рестрикции SmaI и XbaI) с тем, чтобы получить 10–20 фрагментов. Затем проводят электрофорез таким образом, чтобы направление электрического поля менялось с определенной частотой, т. е. ток подается в импульсном режиме в разных направлениях. В условиях «пульсирующего» электрического поля, в отличие от традиционного электрофореза с постоянным направлением электрического тока, крупные фрагменты ДНК получают возможность мигрировать через поры геля, что позволяет их разделить по массе.

Результат электрофореза оценивают при окраске геля бромистым этидием и визуализации в ультрафиолетовом излучении. Профили рестрикции (паттерны) изолятов представляют собой наборы светящихся полос, соответствующих полученным в результате рестрикции фрагментам ДНК.



PFGE применяли для типирования большинства клинически значимых бактерий, для некоторых из них были созданы международные базы данных пульс-типов. Однако значительная трудоемкость метода, высокие требования к стандартизации выполнения всех процедур, а также сложности в интерпретации результатов несколько ограничивают его широкое применение.

Figure 1 - PFGE



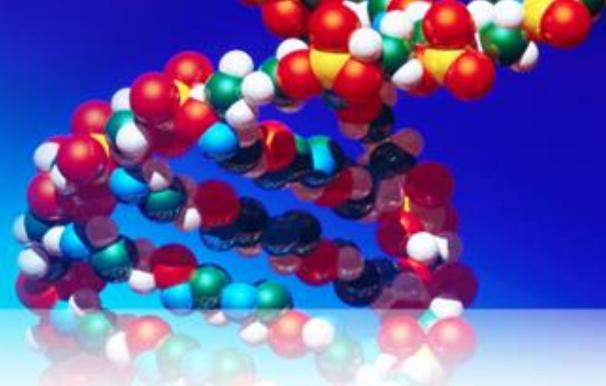


Методы, основанные на полимеразной цепной реакции

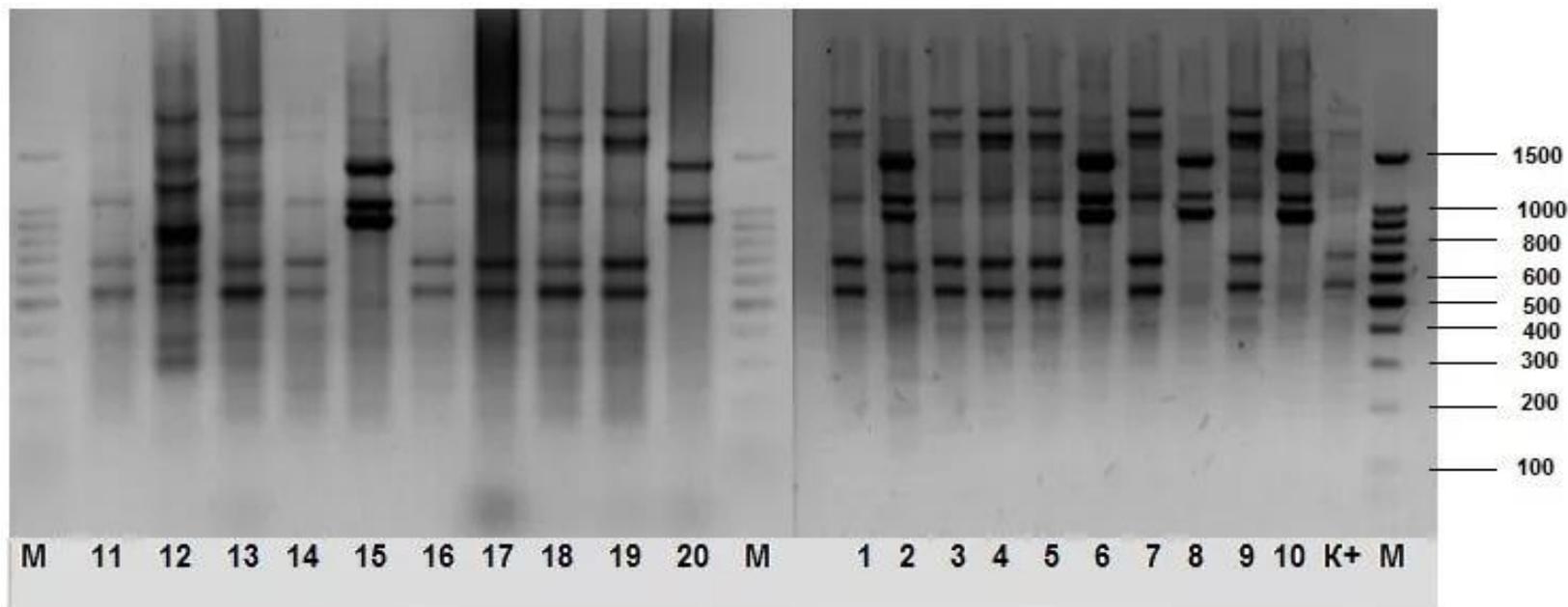
Достаточно широко распространены при использовании в рутинной практике эпидемиологического надзора и при необходимости принятия экстренных решений (например, при расследовании вспышек) в связи с их относительной простотой, экспрессностью и низкой стоимостью.

К разновидностям метода генотипирования, основанного на ПЦР, относят методы:

- ПЦР с «произвольными» праймерами (RAPD-ПЦР),
- ПЦР с идентификацией повторяющихся последовательностей ДНК (REP, ERIC-ПЦР),
- мультилокусный анализ VNTR (Variable Number Tandem Repeat) локусов (MLVA).



К числу молекулярно-генетических методов, использующих фингерпринты для отнесения культур микроорганизмов к тому или иному штамму, относится метод **RAPD-ПЦР** (от англ. Random Amplification of Polymorphic DNA – избирательная амплификация полиморфной ДНК).

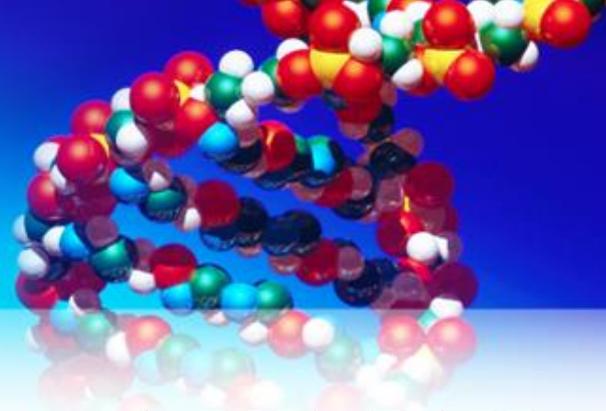




Метод **RAPD-ПЦР** (англ. **Random Amplification of Polymorphic DNA**) основан на отжиге при невысокой температуре «случайных» (универсальных) праймеров с произвольной короткой последовательностью или праймеров, специфичных для отдельных видов бактерий, с использованием комплементарных участков обеих цепей ДНК, с электрофоретическим анализом продуктов амплификации.

Число и локализация комплементарных праймеру участков хромосомной ДНК могут варьировать у штаммов одного вида. Как правило, родственные штаммы имеют одинаковые участки отжига праймера, что обеспечивает синтез ПЦР-продуктов различной молекулярной массы, которые выявляются в виде одинакового набора фрагментов на электрофореграмме.

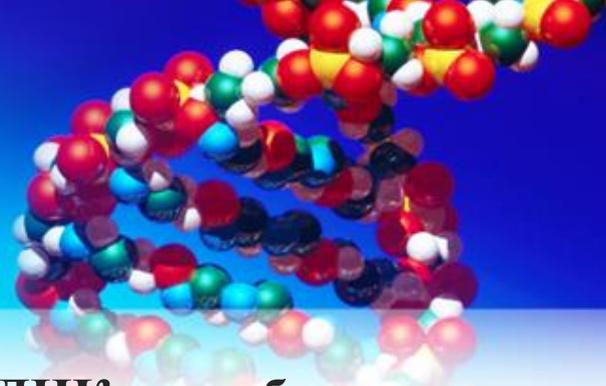
Наблюдаемый визуально набор полос на электрофореграмме, являющийся специфическим для каждого изучаемого штамма, называется **паттерном или фингерпринтом** — геномным «отпечатком пальца».



RAPD-маркеры – random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR – случайно амплифицированная полиморфная ДНК)

При необходимости амплификации гена или фрагмента ДНК с известной нуклеотидной последовательностью используют два геноспецифичных праймера, фланкирующих (ограничивающих) нужную последовательность. В этом случае прямой праймер соответствует по нуклеотидной последовательности началу нужного гена, а обратный комплементарен второй цепи в конце этого гена.

Таким образом можно исследовать полиморфизм конкретных локусов, для которых хотя бы частично известна нуклеотидная последовательность.



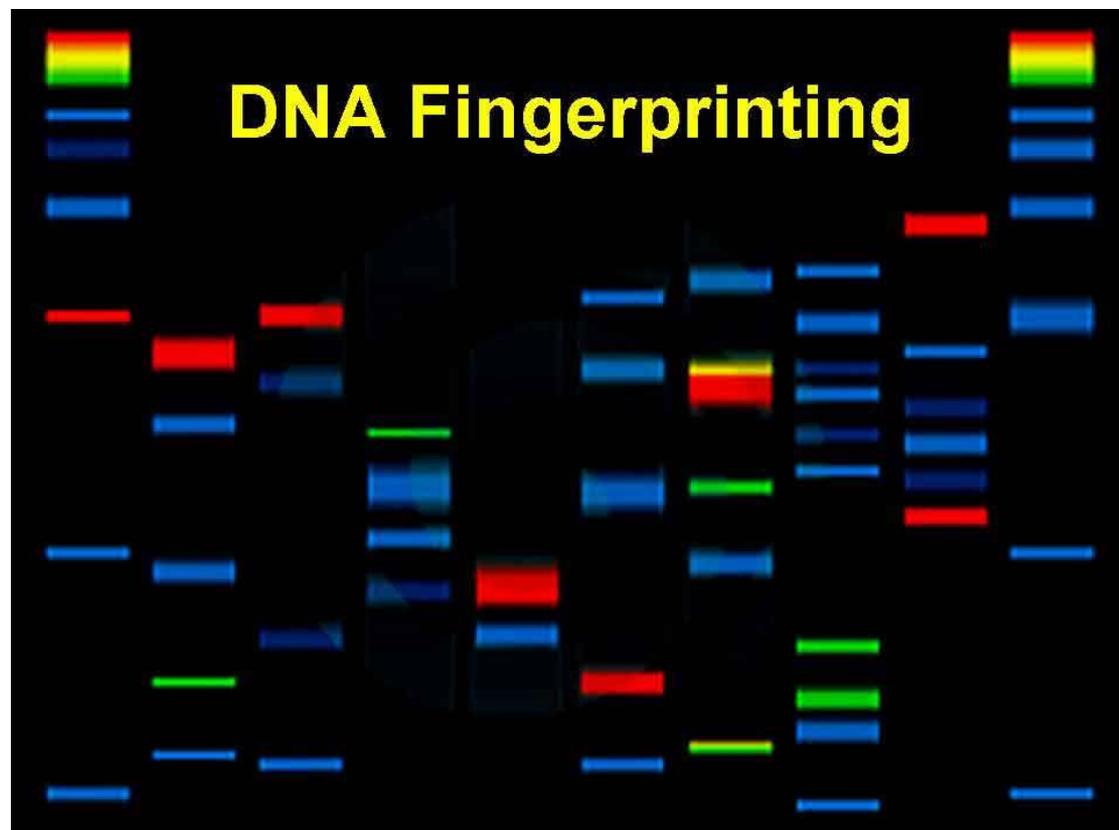
Методика ПЦР позволяет амплифицировать ДНК из любого участка генома, в том числе фрагменты ДНК с неизвестной (анонимной) нуклеотидной последовательностью (при использовании RAPD-маркеров).

При **RAPD-методе используют стандартные наборы праймеров – случайные (произвольные) праймеры. Использование олигонуклеотидных праймеров произвольной структуры основано на том, что в больших геномах для них имеются множественные сайты посадки, а следовательно, и инициации ПЦР. В этом случае используется, как правило, только один праймер и амплифицируются участки между этим праймером и его обратной (инвертированной) последовательностью. Праймер связывается с геномной ДНК в двух различных участках – инвертированных повторах.**

Инвертированные повторы – это участки молекулы ДНК, два сегмента которых имеют одинаковую нуклеотидную последовательность, но противоположную ее ориентацию.



Основным преимуществом ПЦР фингерпринтинга являются техническая простота выполнения, высокая скорость и производительность, однако межлабораторная воспроизводимость метода подвергается сомнению.

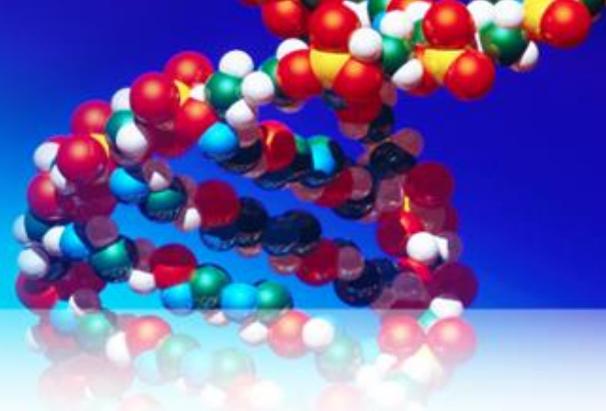




ПЦР с праймерами на IS-элементы и повторяющиеся элементы, REP-PCR

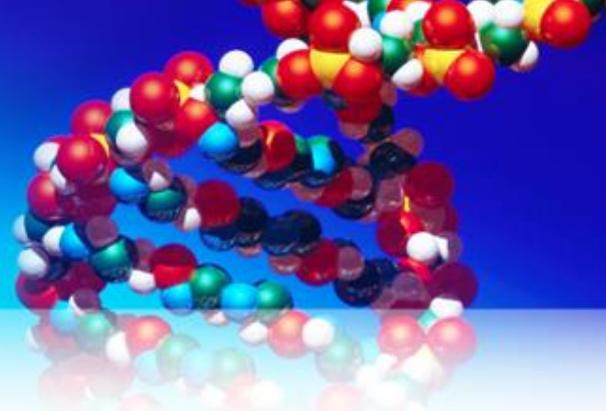
В данном случае амплификация проводится с праймерами к консенсусной последовательности повторяющихся элементов, рассеянных по геному. Совокупность амплифицированных последовательностей различной длины, заключенных между повторами, анализируется с помощью электрофореза.

Метод характеризуется хорошей воспроизводимостью, разрешающей силой, сопоставимой с PFGE, легкостью проведения анализа и быстротой.



Метод генотипирования на основе анализа переменных ампликонов (VAT - variable amplicontyping, DFR - different region) заключается в серии полимеразных цепных реакций с праймерами, фланкирующими фрагменты уникальных ДНК-мишеней, существующих только у определенных штаммов, что позволяет проводить внутривидовую дифференциацию.

Преимуществами данного метода является легкость интерпретации, использование стандартного оборудования, быстрота получения результата. Недостатком является необходимость проведения большого количества параллельных реакций амплификации, поскольку разрешающая сила метода зависит от количества выбранных локусов.



MLVA-типирование (мультилокусный анализ числа tandemных повторов по VNTR-локусам) основано на идентификации рассеянных в хромосоме VNTR-локусов (участков, содержащих разное число tandemных повторов) при помощи ПЦР.

Подобрав праймеры к консервативным концам VNTR-локуса, можно методом ПЦР с электрофоретической детекцией определить его длину и, зная размер входящих в него tandemных повторов, определить их количество. Учет результатов возможен и с применением методов масс-спектрометрии.

Поскольку различные изоляты содержат неодинаковое число повторов в VNTR-локусах, информация об их количестве позволяет отнести тестируемые культуры бактерий к тому или иному штамму.

Для повышения информативности и достоверности MLVA-анализа используют не один, а несколько (обычно 5–12) VNTR-локусов в зависимости от видовой принадлежности микроорганизма.



MLVA-типирование

Результат анализа записывают в виде цифрового профиля штамма, где каждая цифра обозначает число повторов в каждом VNTR-локусе.

Например, результат может выглядеть так:

изолят А: 2 — 16 — 28 — 14 — 5 — 7

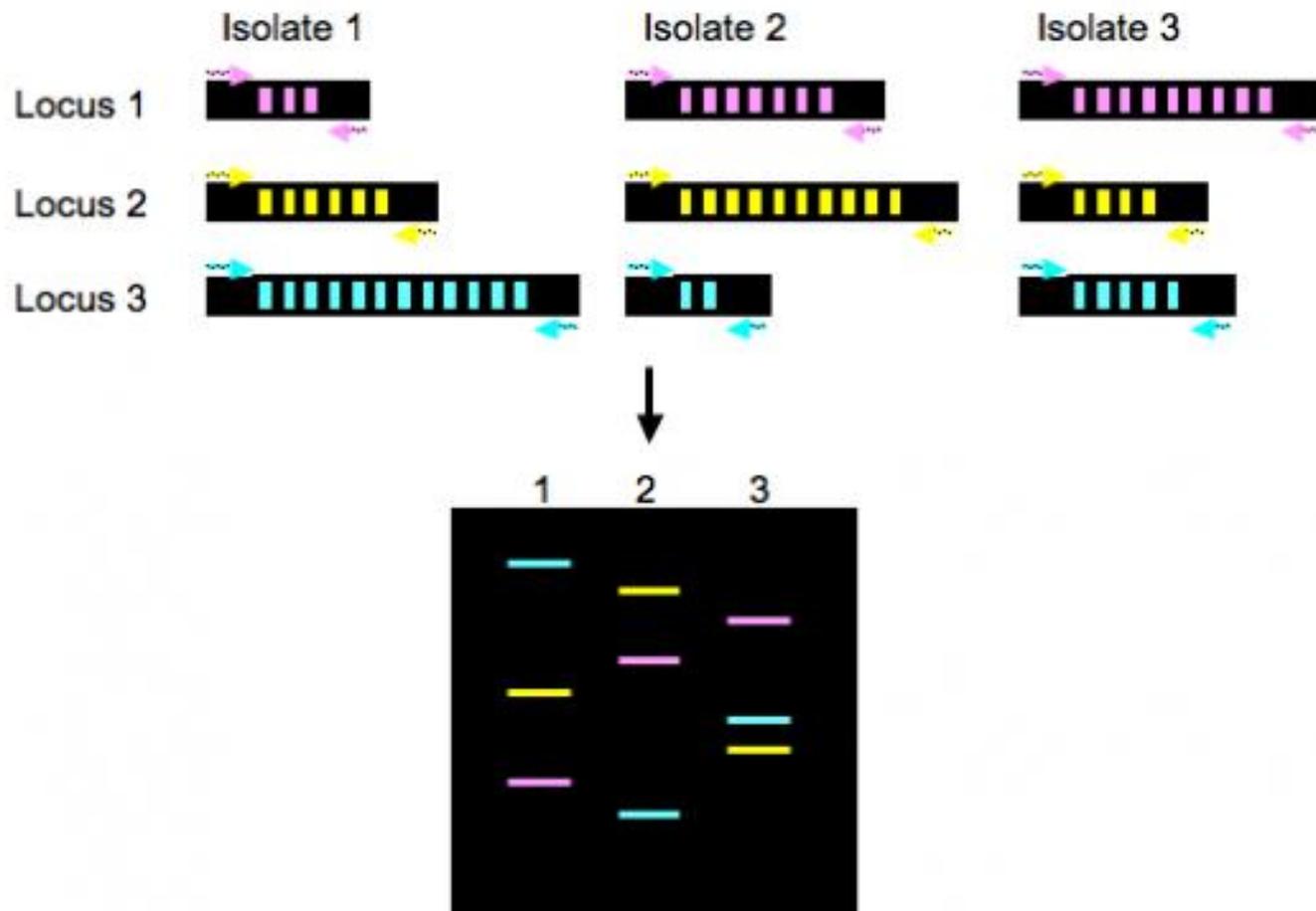
изолят В: 2 — 16 — 28 — 14 — 5 — 7

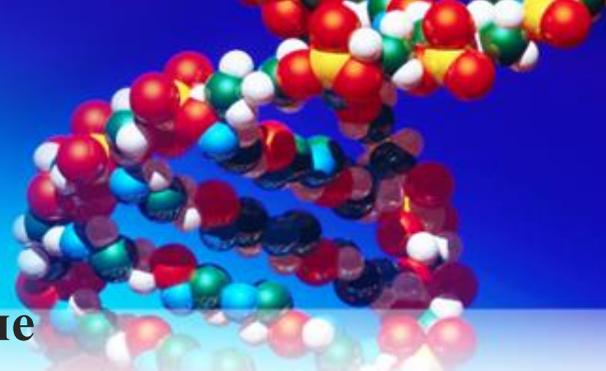
изолят С: 2 — 10 — 32 — 14 — 3 — 1

Изоляты А и В в представленном примере могут быть отнесены на основании MLVA-типирования к одному штамму.

Метод использовали для типирования микобактерий туберкулеза, легионелл, буркхольдерий. Создана международная база данных тандемных повторов (<http://vntr.csie.ntu.edu.tw>), что открывает хорошие возможности для стандартизации метода.

MLVA-типирование





Описаны методы генотипирования, использующие комбинацию ПЦР, фингерпринтинга и RFLP. Одним из вариантов этого метода является коммерчески доступный **метод анализа полиморфизма амплифицированных фрагментов (amplified fragment length polymorphism — AFLP)**. AFLP — сложный метод, состоящий из нескольких этапов: геномная ДНК одновременно рестрицируется двумя рестриктазами (EcoRI и MseI), узнающими 4 и 6 оснований соответственно, получают фрагменты с выступающими 3'-концами. Затем рестрицированная геномная ДНК лигируется с адаптором, содержащим «липкие» концы для рестрикционных сайтов (EcoRI и MseI). После этого проводятся две последовательные ПЦР: в первой (преамплификация) используются праймеры, полностью комплементарные адапторам EcoRI и MseI, образуется большое количество продуктов амплификации между адапторами EcoRI и MseI, которые трудно дифференцировать с помощью электрофореза. Во второй ПЦР праймеры с адапторами EcoRI и MseI содержат на 3'-конце дополнительные и не комплементарные адапторам от 1 до 3 оснований, для селективной амплификации. Разделение фрагментов ДНК выполняется в ПААГ, с радиоактивной или флюоресцентной меткой.

AFLP: Pre-Selective Amplification



Primer (+ 1) for pre-selective amplification

AFLP: Selective Amplification



Primer (+ 3) for selective amplification



Методы генотипирования, основанные на гибридизации НК

Для генотипирования в качестве зондов при гибридизации по Саузерну часто используют:

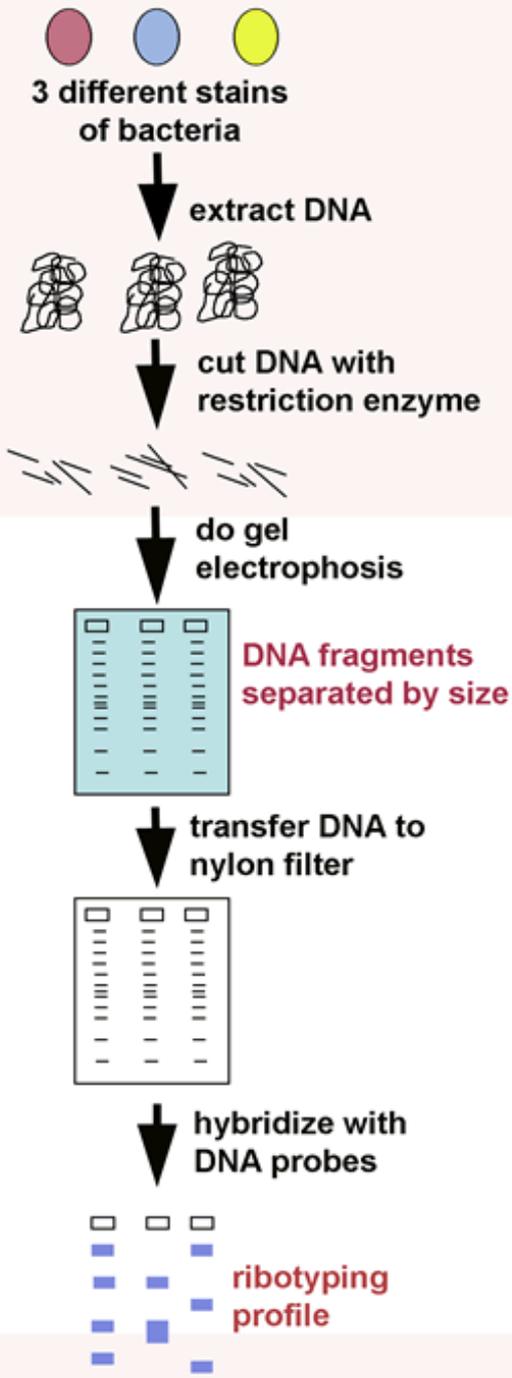
- меченые фрагменты IS-элементов;
- последовательности рибосомного оперона 16S–23S (метод риботипирования);
- другие последовательности (например, спейсеры DR-локуса *Mycobacterium tuberculosis complex*).

Риботипирование

Последовательность нуклеотидных оснований в оперонах, кодирующих рРНК, характеризуется наличием как консервативных участков, которые подверглись малым изменениям в процессе эволюции и имеют сходное строение у различных бактерий, так и переменных последовательностей, которые родо- и видо-специфичны и являются маркерами при генетической идентификации. Эти опероны представлены на бактериальной хромосоме в нескольких копиях.

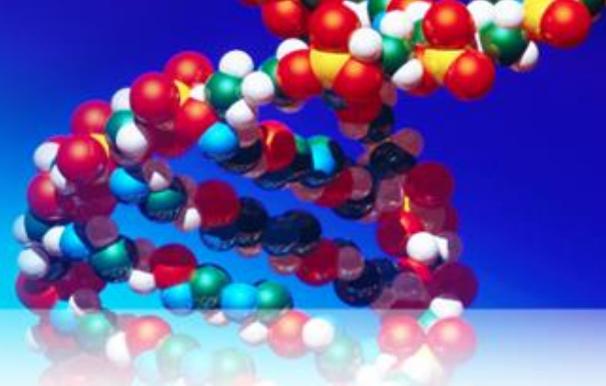
Фрагменты ДНК, полученные после обработки ее рестриктазами, содержат последовательности генов рРНК, которые могут быть обнаружены методом молекулярной гибридизации с меченой рРНК соответствующего вида бактерий. Количество и локализация копий оперонов рРНК и рестрикционный состав сайтов как внутри рРНК-оперона, так и по его флангам варьируют у различных видов бактерий. На основе этого свойства построен метод **риботипирования, который позволяет производить мониторинг выделенных штаммов и определение их вида.**





Риботипирование

На основе гибридизации по Саузерну разработаны автоматизированные методы риботипирования, оценивающие количество и положение на хромосоме рибосомальных генов.



Анализ полиморфизма **DR-локуса** (участка, содержащего прямые повторы) хромосомы изолятов микобактерий туберкулеза называется методом спוליготипирования.

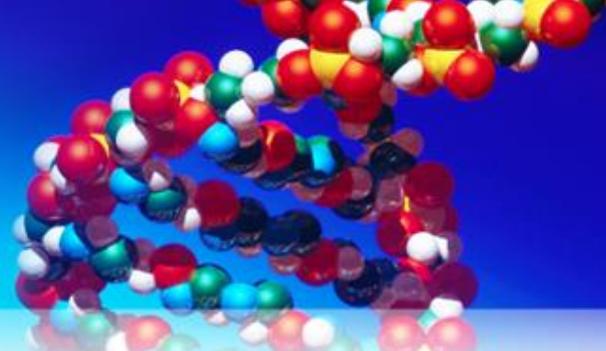
Сполиготипирование (англ. spoligotyping, spacer oligonucleotide typing) основано на детекции спейсеров - 43 последовательностей, находящихся между прямыми повторами (direct repeats), линейно расположенными на хромосоме *Mycobacterium tuberculosis complex*.

В ходе исследования продукты амплифицированного в ПЦР фрагмента DR-локуса исследуемых изолятов, меченные специальным реагентом — биотином, гибридизуют с 43 спейсерными последовательностями, нанесенными на специальную мембрану, которую затем экспонируют на светочувствительной фотографической пленке. В случае если гибридизация произошла, биотин засвечивает фотографическую пленку. По наличию или отсутствию в определенных участках пленки темных пятен судят о присутствии или отсутствии у штаммов (изолятов) соответствующих спейсеров.

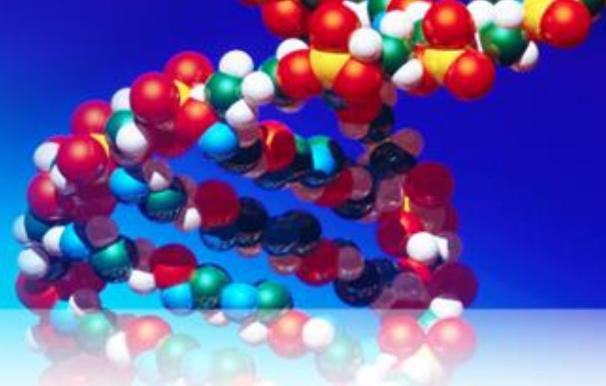


Каждый штамм характеризуется определенной комбинацией спейсеров (черных пятен на фотографической пленке), т. е. имеет определенный **сполиготип**. Сполиготипы, имеющие незначительные отличия друг от друга по содержанию спейсеров, группируются в генетические семейства (известно, например, широко распространенное генетическое семейство Beijing, которое объединяет наиболее вирулентные и резистентные к терапии штаммы микобактерии туберкулеза).

Сполиготипирование в комплексе с другими методами молекулярно-генетического типирования может быть использовано при расследовании случаев внутрибольничного инфицирования туберкулезом.



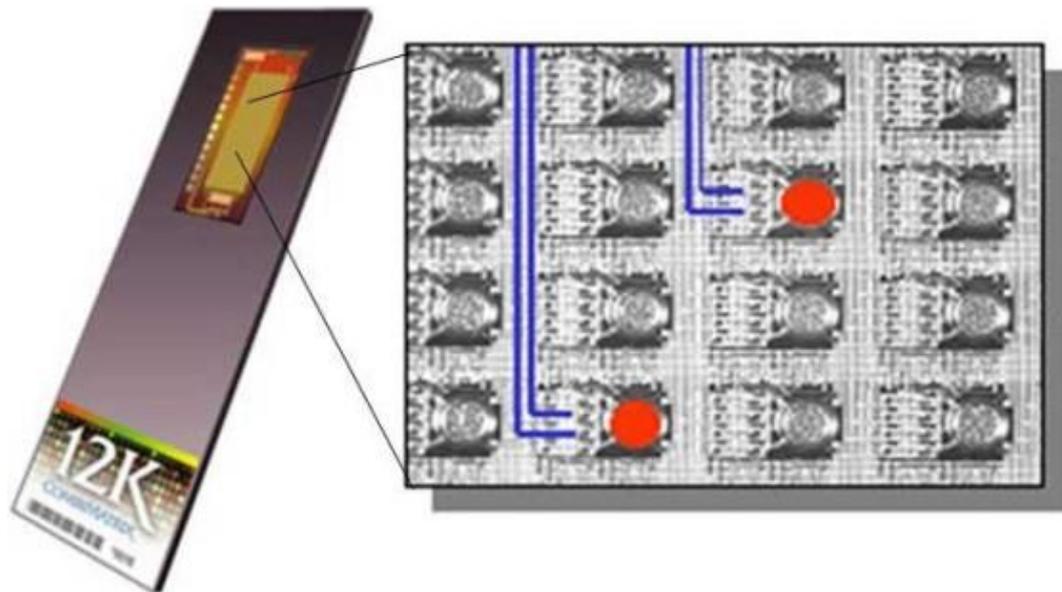
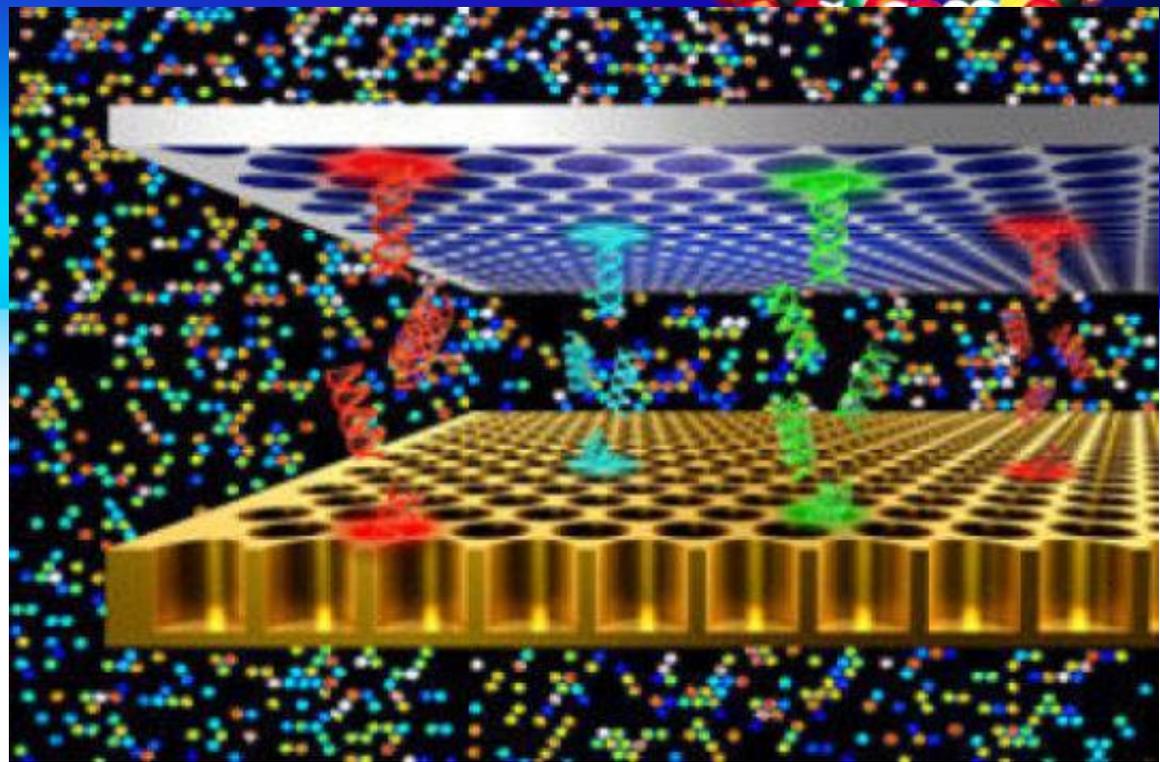
**Профили сполиготипирования 20 штаммов *Mycobacterium tuberculosis* complex как результат гибридизационного анализа.
Черными квадратами обозначены выявленные спейсеры.**



К числу гибридизационных технологий относят генотипирование с использованием **генетических чипов (ДНК-микрочипов), которые позволяют с высочайшей степенью достоверности одновременно определять десятки или даже сотни однонуклеотидных полиморфизмов и других генетических маркеров.**

К основанию каждой из микроскопических ячеек чипа (пластинки размером около 1 см²) прикреплен олигонуклеотидный зонд, комплементарный какой-либо последовательности ДНК или фрагменту какого-либо гена. Гибридизация исследуемой ДНК с использованием генетического чипа позволяет одновременно протестировать наличие или отсутствие нескольких сотен кодирующих последовательностей (генов) или некодирующих последовательностей, являющихся генетическими маркерами. Таким образом, одновременно можно получить информацию о большом количестве мобильных генетических элементов или генов вирулентности, что является весьма важным при генетическом типировании с эпидемиологическими целями.

ДНК-микрочипы





Методы молекулярного типирования, основанные на секвенировании ДНК

Они являются наиболее точными и перспективными, используются при определении первичной последовательности нуклеотидов (сиквенса) в одном вариабельном (однолокусное секвенирование) или нескольких (мультилокусное секвенирование, MLST) участках. При этом изоляты с одним и тем же сиквенсом (например, с одинаковым спектром мутаций) относят к одному штамму.

Для большинства патогенов сейчас разработаны унифицированные методы однолокусного или многолокусного (MLST) секвенирования — типирования, результаты которых могут быть внедрены в международные компьютерные базы данных, доступные on line.



Генотипирование секвенированием отдельных локусов

Основным преимуществом данного подхода является относительно незначительный объем секвенирования. В то же время этот подход основан на особенностях отдельных видов бактерий и не имеет универсального характера. Так, оказалось, что для получения результатов генотипирования *Streptococcus pyogenes*, полностью совпадающих с результатами классического М-серотипирования, достаточно определить нуклеотидную последовательность короткого фрагмента (150 пар оснований), кодирующего N-терминальную область М-белка.

Другим примером удачного использования секвенирования отдельного локуса является типирование *Staphylococcus aureus* по гену белка А (*spr*-типирование). Эффективность этого метода во многом объясняется тем, что по существу он является вариантом VNTR анализа, так как для *spr*-гена характерно наличие тандемных повторов, различающихся как по нуклеотидной последовательности, так и по количеству.

Генотипирование мультилокусным секвенированием



В 1998 г. М. С. J. Maiden и соавт. был предложен подход, основанный на прямом определении нуклеотидной последовательности соответствующих генов. Метод получил название **типирования мультилокусным секвенированием (Multi Locus Sequence Typing, MLST)**. Он заключается в секвенировании определенного набора генов «домашнего хозяйства» (обычно 6—7 генов), имеющих достаточное число аллелей (более 10), характеризующихся медленным накоплением мутаций и селективно нейтральных. В результате каждый штамм характеризуется специфическим «аллельным профилем» (или «сиквенс-типом») по выбранным локусам. Сравнение полученных данных между собой, выяснение эволюционных связей между штаммами, их генетического расстояния производится с использованием специализированного программного обеспечения. Подход подразумевает обязательное создание общедоступной on line базы данных для исследуемого микроорганизма, содержащей последовательности распространенных аллелей и информацию о соответствующих аллельных профилях для различных штаммов.

Генотипирование мультилокусным секвенированием

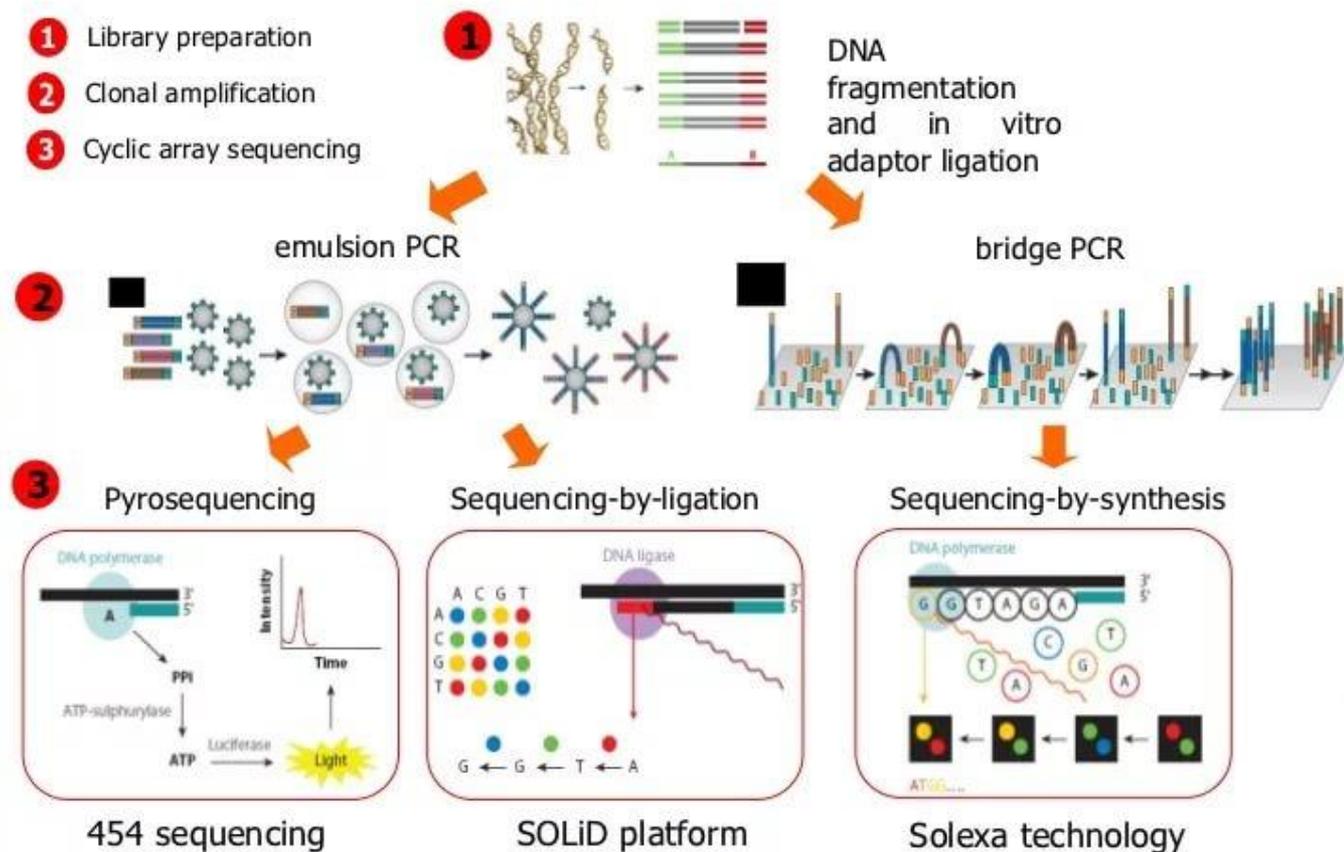


В настоящее время существуют два веб-сайта, на которых размещены базы данных по результатам типирования бактерий различных видов.

На веб-сайте www.mlst.net размещены базы данных для 23 видов бактерий и грибов, в ближайшее время анонсировано размещение еще около 40 баз данных. На сайте www.pubmlst.org размещены базы данных еще более чем для 20 видов бактерий.

Для анализа данных, получаемых при MLST-типировании, используется кластерный анализ, предложено несколько алгоритмов, наиболее популярный из них (eBURST) реализован в виде общедоступной программы на веб-сайте www.mlst.net. Популярность этой программы во многом объясняется возможностью выявления эволюционных связей (предшественник — потомок) в бактериальных популяциях, а также выделения клональных комплексов — групп сиквенс-типов, объединенных общим происхождением.

Next-generation DNA sequencing



В последнее время в практику активно внедряются технологии **секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS)**, которые позволили существенно повысить производительность секвенирования и удешевить эту процедуру. С помощью секвенирования нового поколения расшифрованы геномы множества микроорганизмов — возбудителей инфекционных заболеваний.



Полногеномное секвенирование

Секвенирование целых геномов микроорганизмов позволяет получить наиболее полную информацию о генетических особенностях изучаемых штаммов, включая наличие отдельных генов и мобильных генетических элементов, определяющих патогенный и эпидемический потенциал изучаемого штамма.

Полногеномное секвенирование может быть использовано при изучении молекулярной эпидемиологии возбудителей, для верификации филогенетических связей между эпидемическими штаммами, циркулирующими в различных географических регионах. При этом проводят сравнение геномов эпидемических штаммов, идентифицированных в различных географических регионах и выявляют кластеры штаммов, на основании которых судят о степени генетического родства штаммов, циркулирующих на различных территориях.

Аннотирование (расшифровка) геномов микроорганизмов может быть проведена в автоматическом режиме с использованием сервиса, представленного на web-ресурсе RAST (<http://rast.nmpdr.org>).

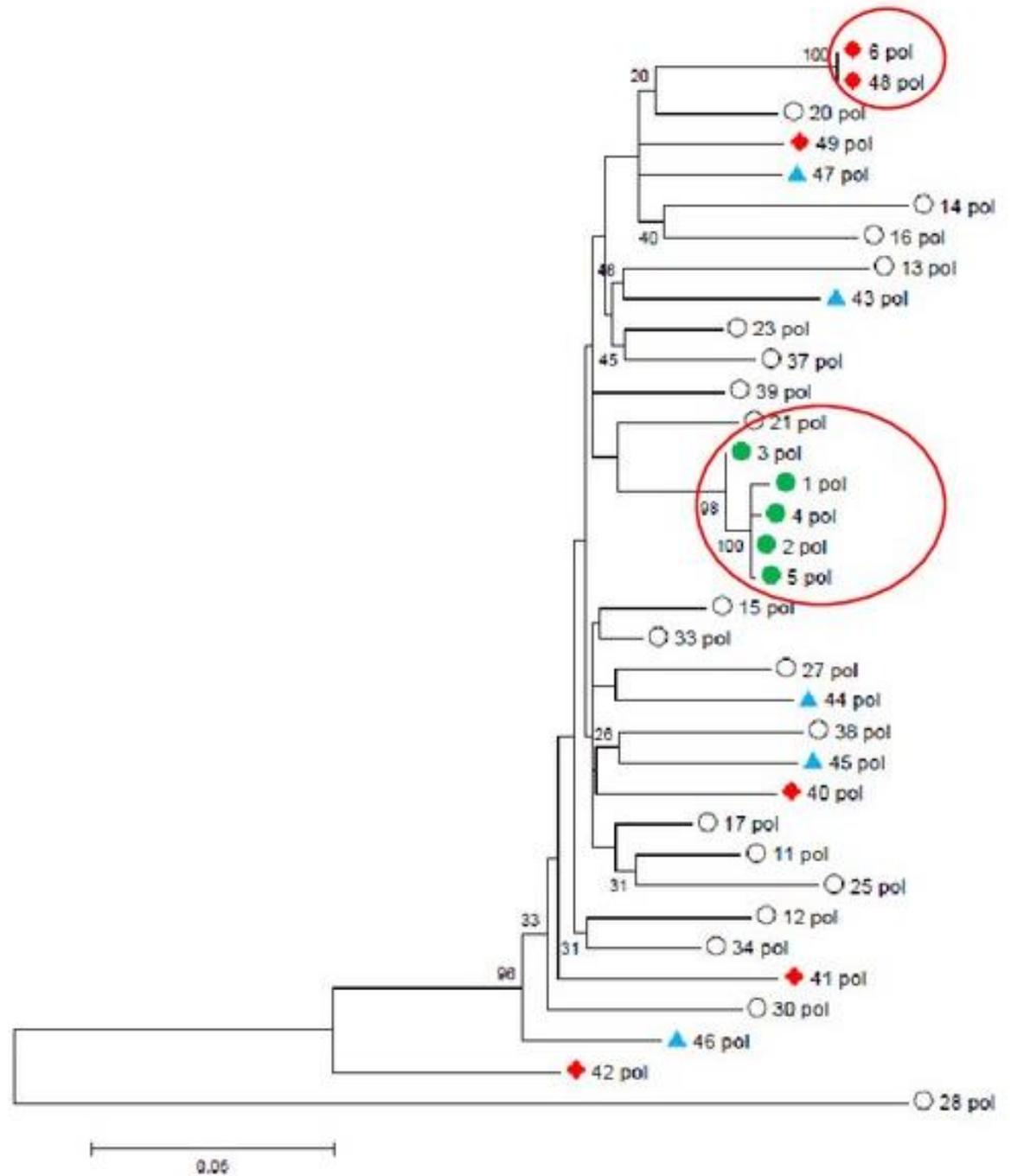
Установление эпидемиологических связей и отнесение тестируемых изолятов к одному штамму (клональной линии) на основании молекулярно-генетического типирования должно включать в себя количественную оценку степени генетического родства между изолятами с помощью филогенетического анализа.

Филогенетический анализ основан на оценке эволюционных дистанций - т.е. количества генетических изменений у сравниваемых изолятов (например, относительного количества нуклеотидных замен в молекуле ДНК или РНК). Чем меньше эволюционные дистанции между сравниваемыми культурами микроорганизмов, тем более они родственны друг другу и тем более вероятным является отнесение их к одному госпитальному или эпидемическому штамму.

Степень филогенетического родства между штаммами микроорганизмов может быть отображена графически в виде дендрограммы (филогенетического дерева). Дендрограммы, используемые в молекулярной эпидемиологии, строят на основании эволюционных дистанций, полученных в результате генотипирования. Существует ряд компьютерных программ, позволяющих построить филогенетические деревья на основании данных генетического типирования.



**Дендрограмма
эпидемиологического
расследования
очага
ВИЧ**



Конкретные примеры использования генотипирования



Дополнительные возможности определения прогноза течения папилломавирусной инфекции может дать генотипирование:

- выявление нескольких генотипов вируса ассоциировано с менее благоприятным прогнозом течения заболевания и более высоким риском персистенции;**
- степень онкогенности различных генотипов высокого риска не одинакова, наибольшей онкогенностью обладают 16 и 18 типы ВПЧ;**
- позволяет отличить реинфицирование от персистентной инфекции при повторном визите пациента. Опасность представляет именно хроническая персистентная форма инфекции, недавнее же инфицирование наиболее вероятно спонтанно излечивается. О реинфицировании говорит изменение спектра генотипов, о персистентной инфекции — сохранение генотипа вируса через год после первого тестирования, повторное инфицирование тем же генотипом вируса после самостоятельного излечения практически невозможно.**

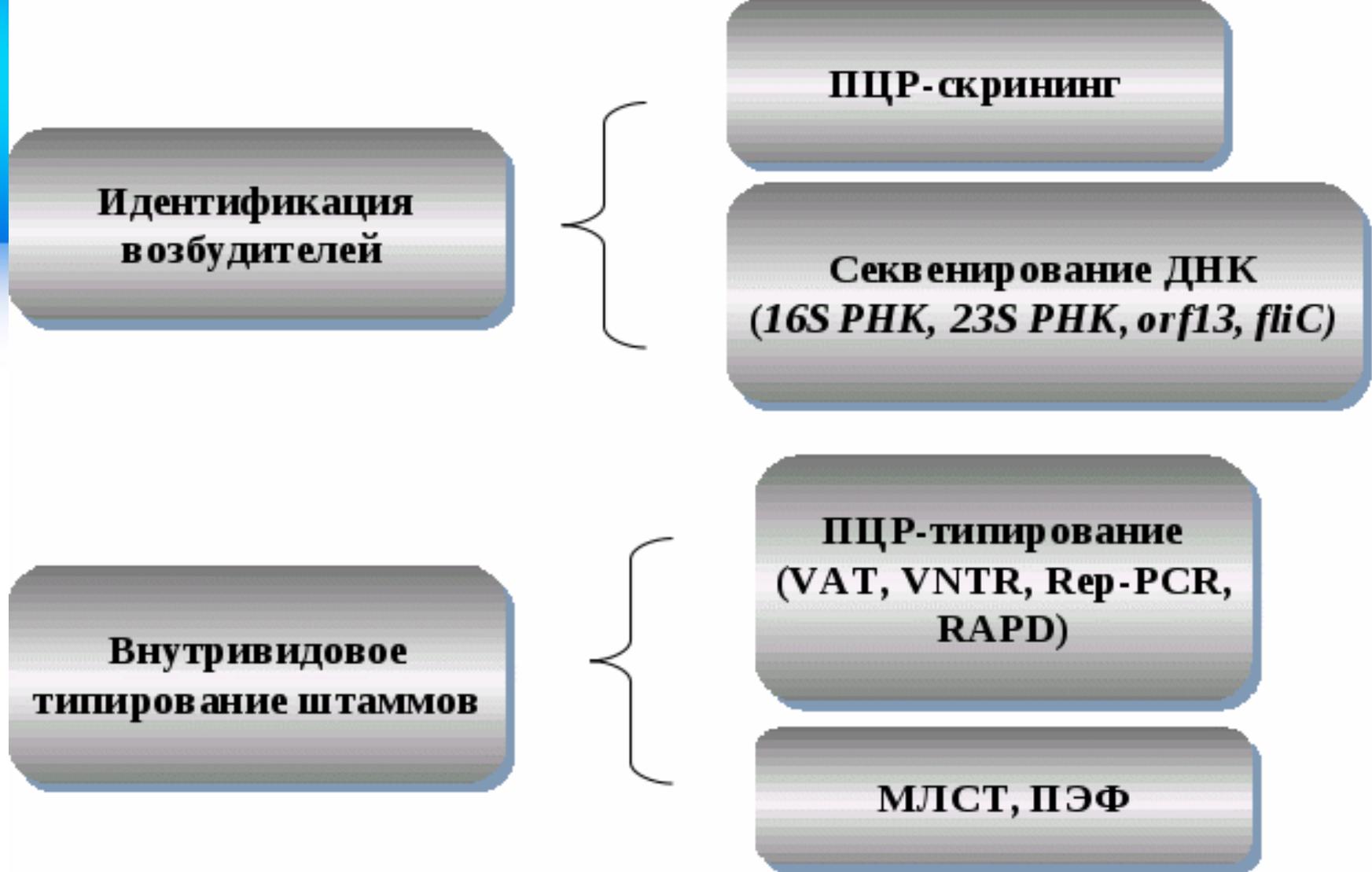


Схема генотипирования патогенных буркхольдерий

Благодарю за
внимание!

