ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ В ИССЛЕДОВАНИИ *Vibrio cholerae*

- ИНДИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ
- ОЦЕНКА ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ
- МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ

ИНДИКАЦИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ *Vibrio cholerae* В ПЦР

ЭТАПЫ ДИАГНОСТИКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР

Подготовка пробы

Выделение ДНК

Амплификация ДНК (ПЦР)

Регистрация результатов

ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемый материал:

- ***клинический материал***

  - испражнения (нативные или 1% п.в.)
  - рвотные массы (нативные или 1% п.в.)
  - мазок содержимого прямой кишки (в 1% п.в.)

- ***объекты окружающей среды***

  - вода поверхностных водоемов
  - сточные воды

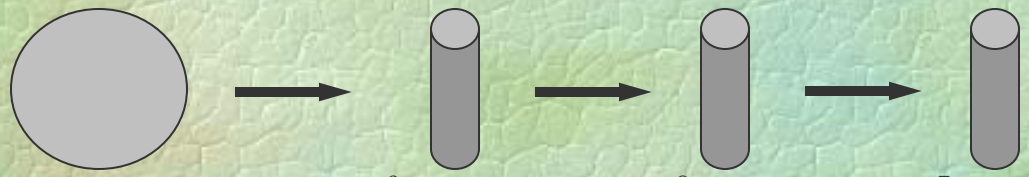
  } *объем пробы* - 1 литр
  концентрирование пробы:
  - центрифугированием
  - фильтрацией

  - смывы с поверхностей (берут стерильным зондом, помещают в 1,5 мл. пробирку с 0,5 мл. 1 % п.в.)

- ***I-я и II-я пептонная вода***

  центрифугирование в течение 10 мин. при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 300 мкл физ. раствора.

- ***микробная взвесь*** **10^6-10^7 м.к./мл**



18-ч. культура *V.cholerae* на ЩА | 10^9 м.к./мл на физ. р-ре | 10^8м.к./мл на dH_2O | 10^7 м.к./мл на dH_2O

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ ПРОБ

добавление мертиолята натрия до конечной концентрации 1:10000 с последующим прогреванием при 56 ^{0}С 30 мин.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

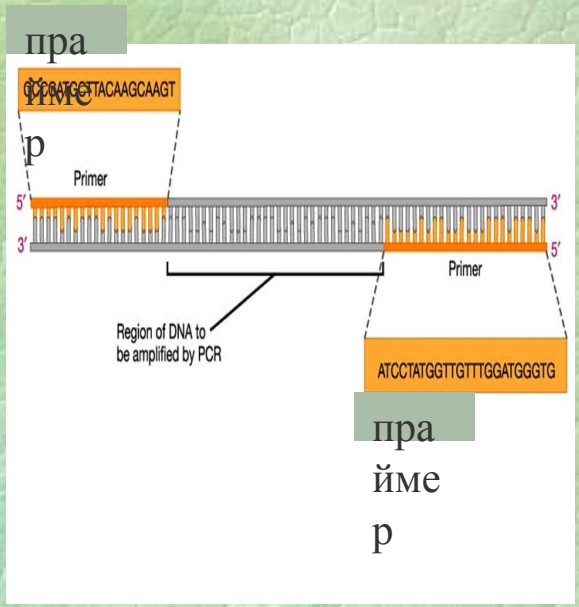
Применение стандартных наборов для выделения ДНК (по протоколу)

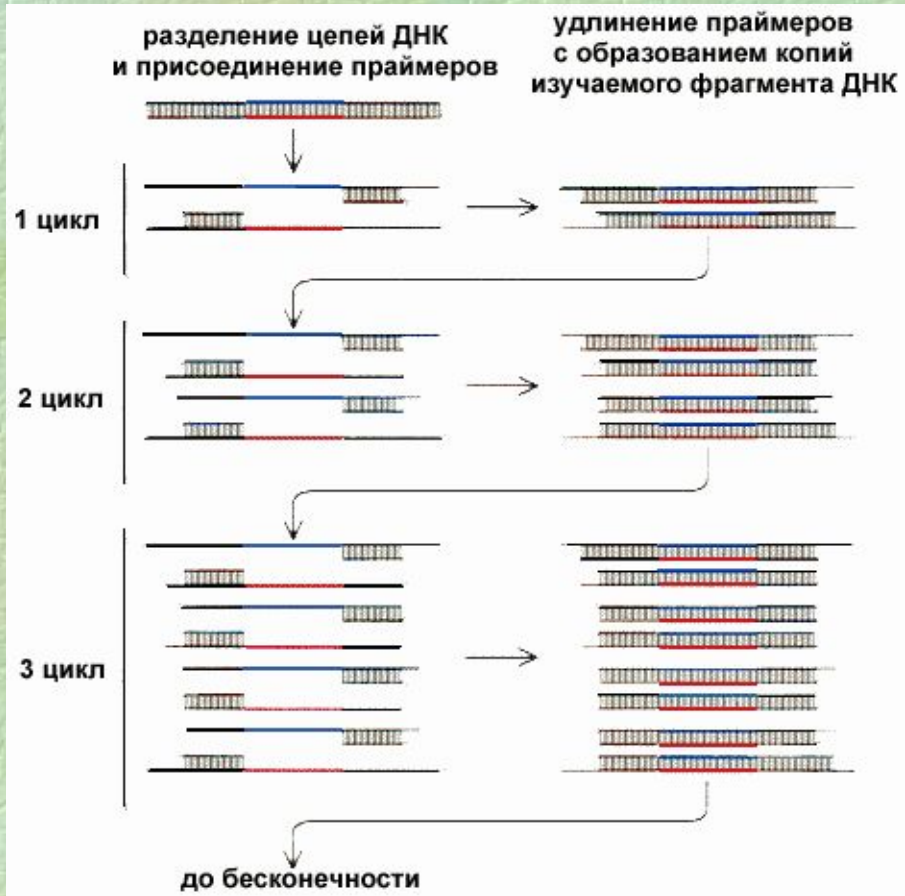
Изготовители: - РосНИПЧИ «Микроб»

- ДНК-Технология
- Интерлабсервис (ДНК-сорб, Рибо-преп)

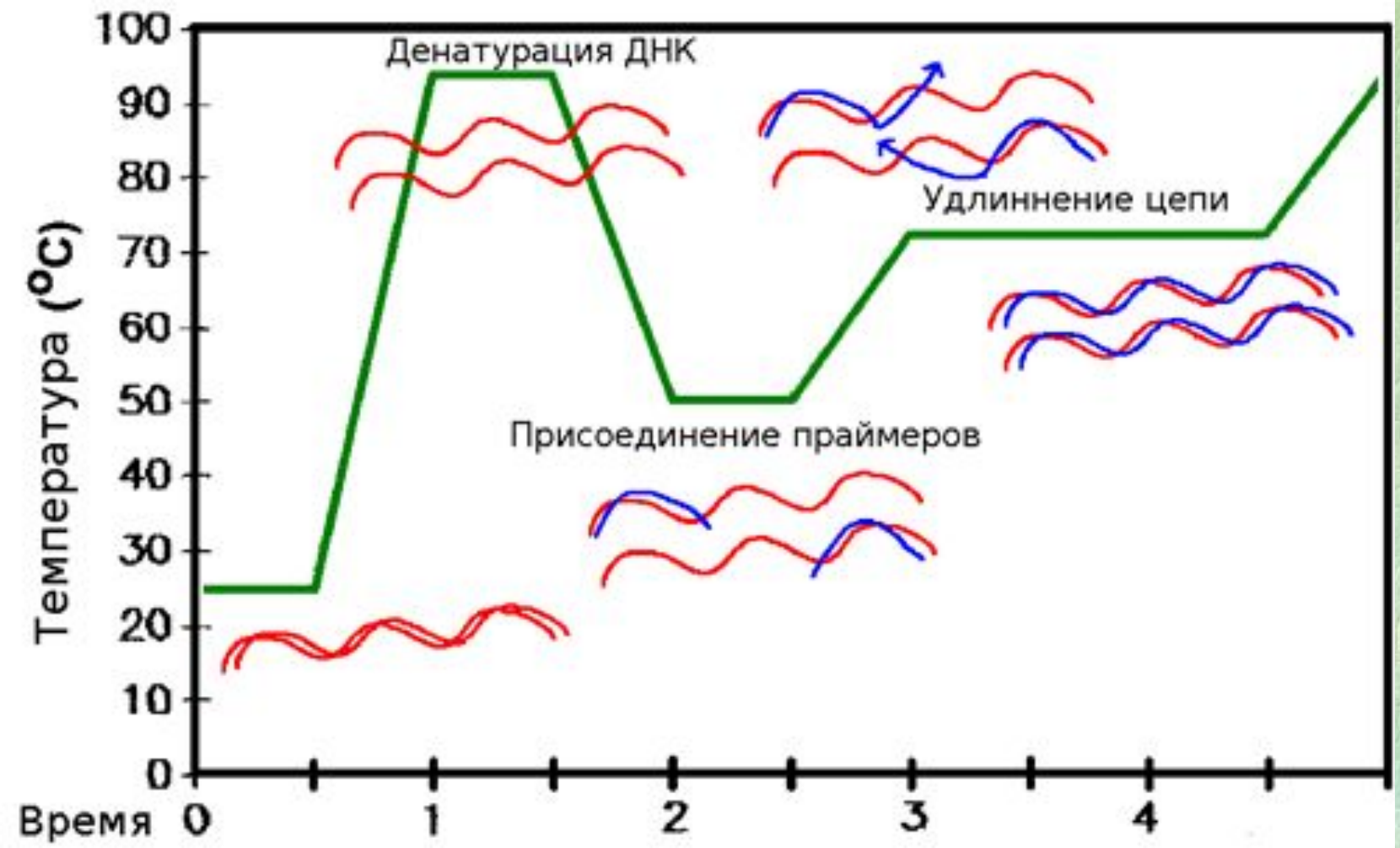
АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК (ПЦР)

ферментативная циклическая реакция синтеза *in vitro* относительно коротких (от нескольких десятков до нескольких тысяч п.о.) двухцепочечных фрагментов ДНК на ДНК-матрице



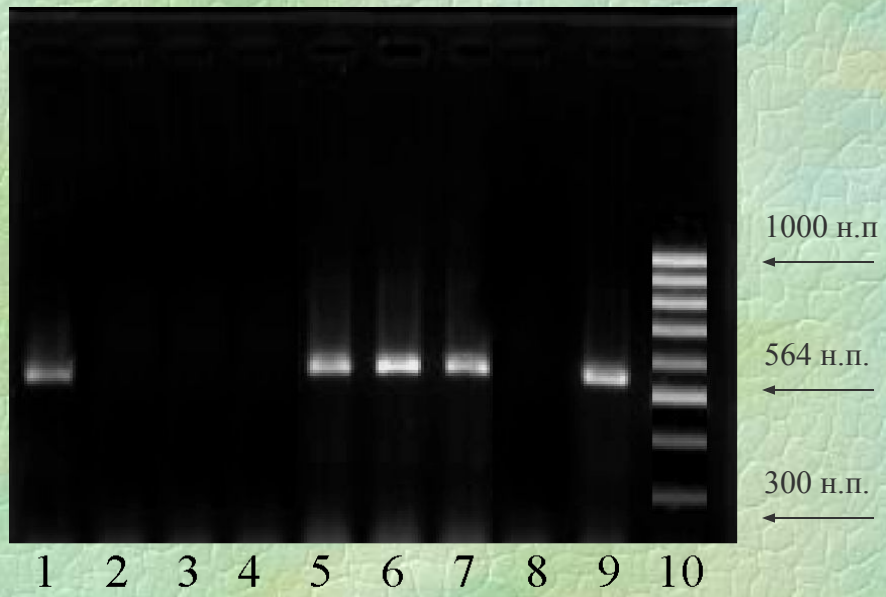


СТАДИИ ПЦР


Денатурация ДНК
Удлиннение цепи
Присоединение праймеров
Температура (°C)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Время
0
1
2
3
4

Выявление ДНК *V. cholerae* в ПЦР с электрофоретическим учетом реакции

Тест-система для выявления *V.cholerae* ctxA+ (РосНИПЧИ «Микроб», Саратов)



1. *V.cholerae eltor* И-449 (б-ой)
2. *V.cholerae eltor* И-1321 (вода)
3. *V.cholerae eltor* И-1355 (вода)
4. *V.cholerae eltor* И-1283 (вода)
5. *V.cholerae eltor* И-1263 (б-ой)
6. *V.cholerae eltor* И-1298 (б-ой)
7. *V.cholerae eltor* И-1345 (б-ой)
8. Дистил. вода (- контр.)
9. *V.cholerae eltor* М-878 (+ контр.)
10. Маркер молекулярного веса

1, 5-7 пробы - $ctxA^{+}$ ⟶ **культуры эпидемически опасные**

2- 4 пробы - $ctx\ A^{-}$ ⟶ **культуры эпидемически неопасные**

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДНК VIBRIO CHOLERAE МЕТОДОМ МУЛЬТИЛОКУСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ (ГЕН VIBRIO CHOLERAE - ИДЕНТИФИКАЦИЯ – РЭФ)

Рег. уд. № ФСР 2012/13430 - 210512

ТУ 9398-039-01898109-2011

(РосНИПЧИ «Микроб», Саратов)

ПЦР-смесь-«ctx-tcp»,

определение эпидемической значимости:

фрагмены генов ***ctxA*** (569 п.н.) ***tcpA*** (218 п.н.)

ПЦР-смесь-«O1-биовар»

определение принадлежности к O1 серогруппе биовара Эльтор: фрагменты генов ***wbeN*** (420 п.н.) и ***hlyAeltor/не-O1*** (264 п.н.)

ПЦР-смесь-«O139»

определение принадлежности к O139 серогруппе

фрагмент гена ***wbfR*** (439 п.н.)

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ VIBRIO CHOLERAE O1 КЛАССИЧЕСКОГО И ЭЛЬТОР БИОВАРОВ, ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ЭЛЬТОР ВИБРИОНОВ НА ТИПИЧНЫЕ И ИЗМЕНЕННЫЕ МЕТОДОМ МУЛЬТИЛОКУСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ

(ГЕН VIBRIO CHOLERAE ВАРИАНТ CTXB–РЭФ)

Рег. уд. № ФСР 2012/13427 - 210512

ТУ 9398-032-01898109-2011

(РосНИПЧИ «Микроб», Саратов)

Типичные токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 классического биовара фрагменты генов ***wbO1*** (кодирует биосинтез O1-антигена), **cas3** (хеликаза CRISPR/CAS-системы), ***ctxBClass*** (аллель гена ctxB классического типа).

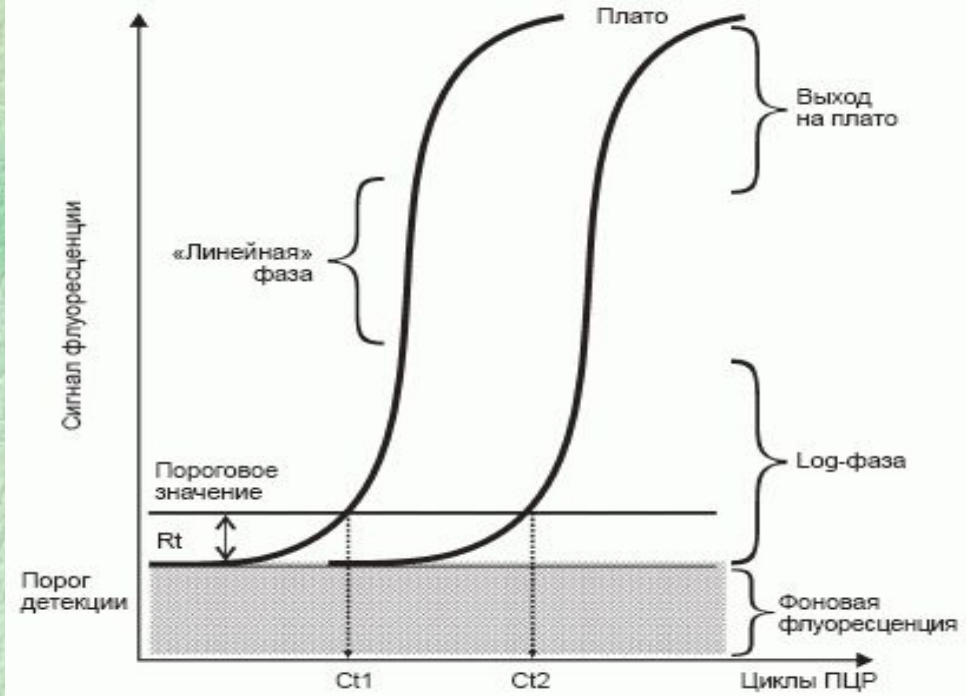
Типичные токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 Эль Тор вибрионов фрагменты генов ***wbO1***, ***rtxC*** (кластер ***rtx*** генов, кодирующих биосинтез RTX-токсина), ***ctxBEltor*** (аллель гена ctxB Эль Тор типа).

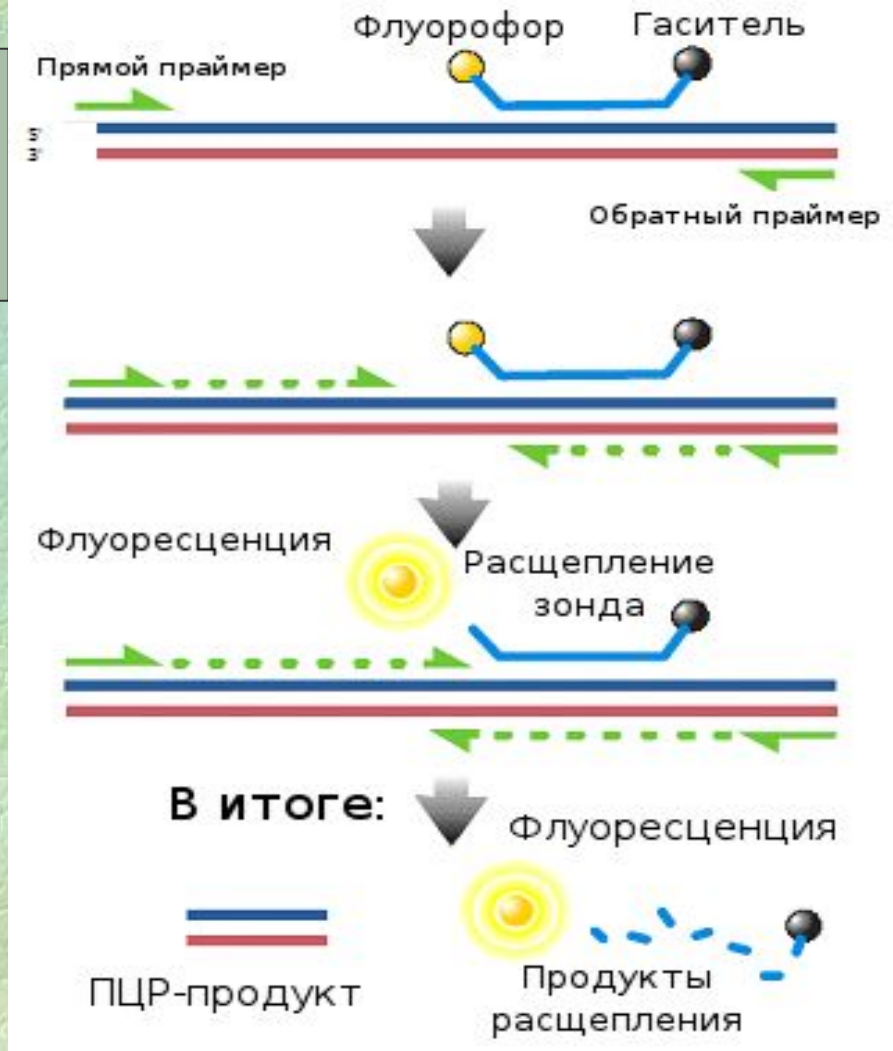
Измененные варианты Эль Тор вибрионов наряду с генами ***wbO1*** и ***rtxC*** характерно наличие ампликона ***ctxBClass***.

Выявление ДНК *V.cholerae* в ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени (real-time PCR)

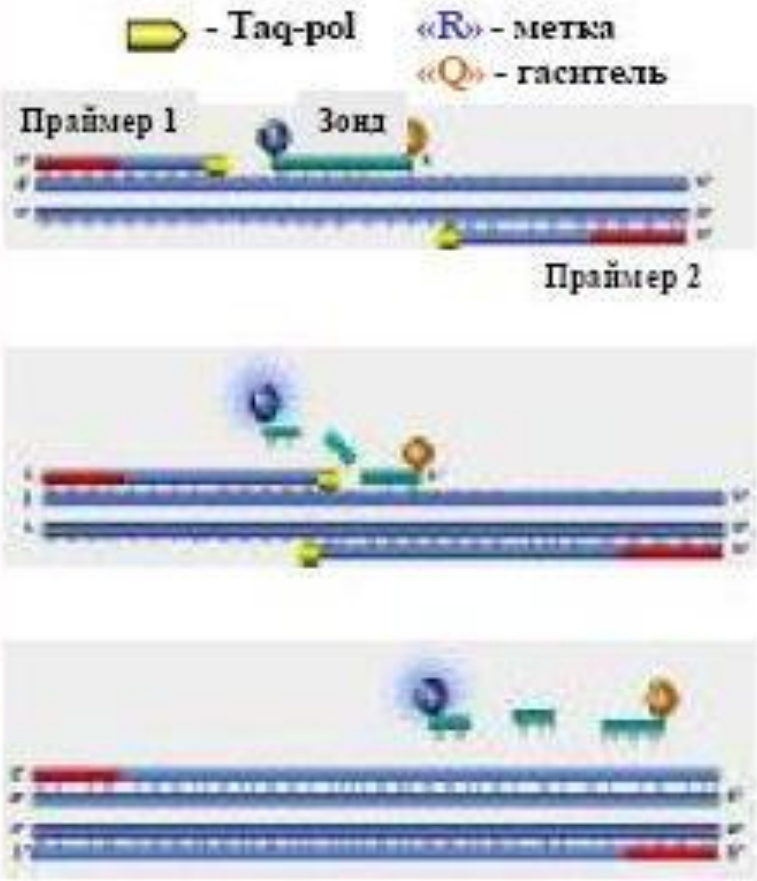
ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (real-time PCR) (ДИНАМИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ В ПРОЦЕССЕ ПЦР)

Сигнал флюоресценции пропорционален количеству молекул ДНК





Принцип технологии TaqMan® (выщепление 5`-концевой метки).



1. Полимеризация

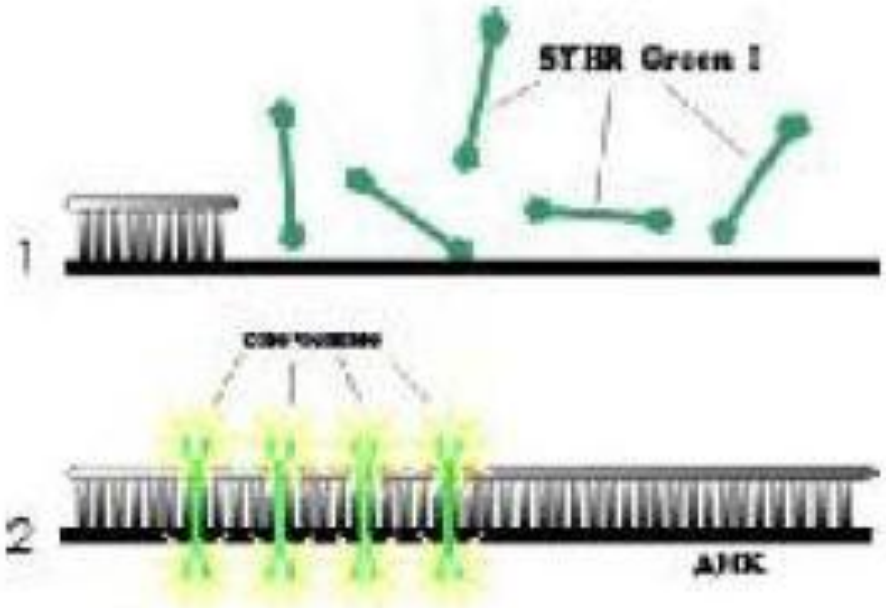
2. Расщепление зонда и высвобождение метки

3. Достраивание цепи и накопление флюоресцентного сигнала

AmpliSens

Использование интеркалирующих красителей

- Уровень флюоресценции интеркалирующих агентов в свободном состоянии низкий.
- При связывании с двухцепочечной ДНК их флюоресценция резко возрастает
- Чем больше образуется молекул ДНК в ходе ПЦР, тем сильнее флюоресценция.

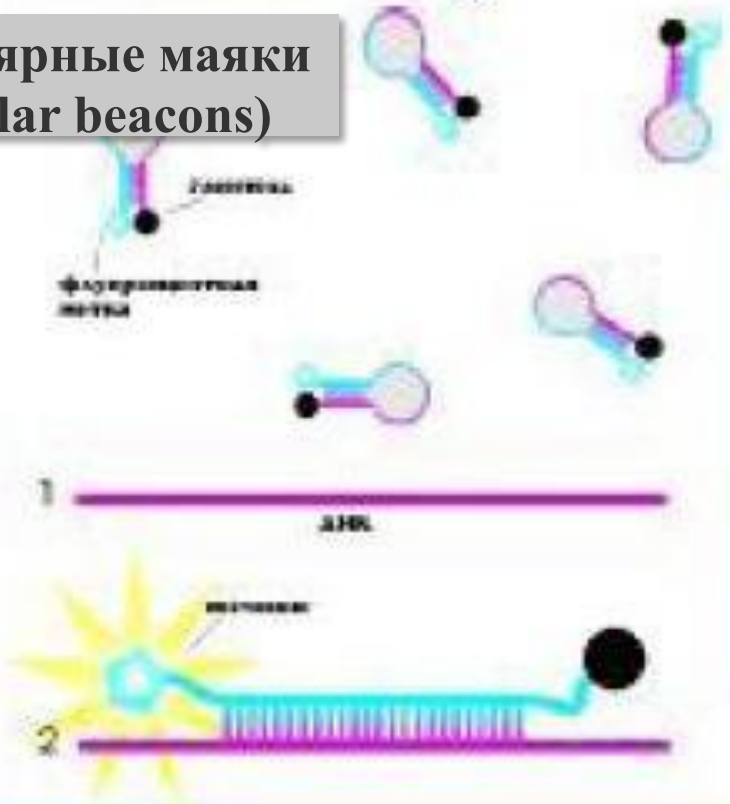


AmpliSens

Использование зондов с комплементарными концевыми последовательностями («молекулярные беконы»)

- Наличие комплементарных концевых последовательностей приводит к образованию шпильки и к тушению флюоресценции.
- При связывании зонда с ДНК матрицей происходит расхождение флюоресцентной метки и гасителя

Молекулярные маяки (molecular beacons)



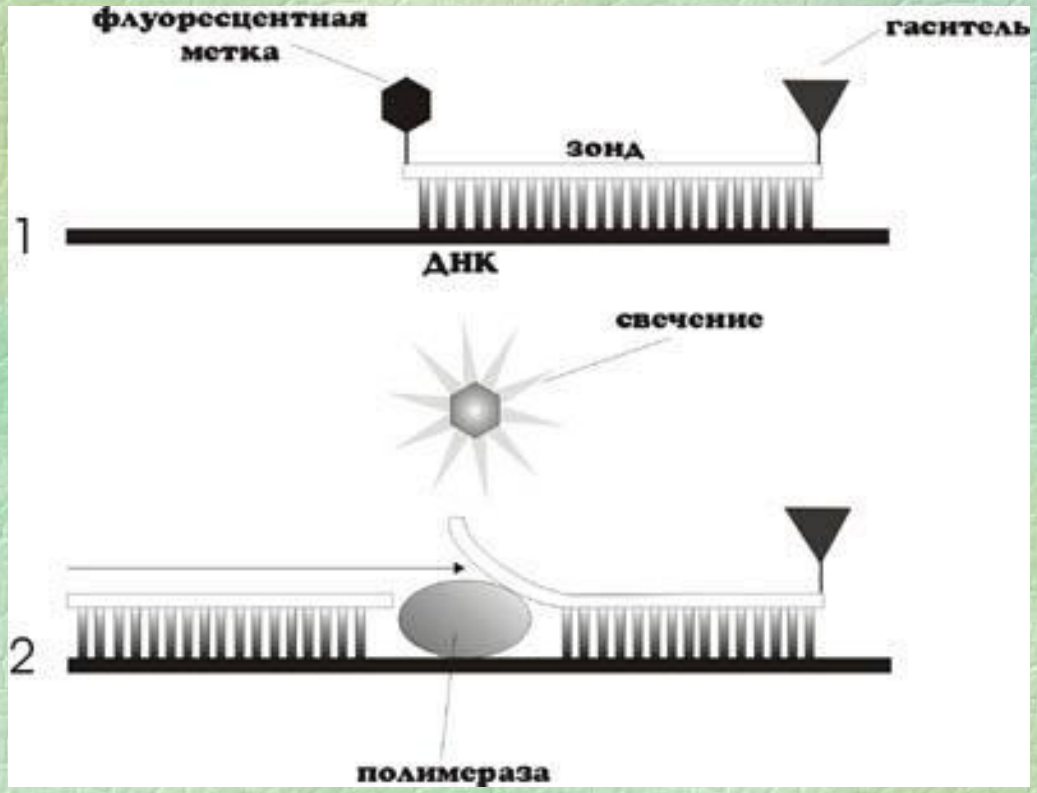
ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ
флуоресцентных методов детекции результатов ПЦР

1. Высокая чувствительность
2. Специфичность (гибридизационные методы)
3. Возможность количественного анализа
4. Упрощение аналитического процесса
5. Скорость
6. Уменьшение вероятности контаминации
7. Стандартная интерпретация результатов

1. Стоимость (флюорофоры, зонды)
2. Высокая чувствительность (контаминация, исходное количество материала)
3. Дополнительное оборудование

Индикация, идентификация и определение эпидемической значимости V. cholerae в ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени

СУЩНОСТЬ МЕТОДА



В реакционную смесь добавляют ДНК-зонды с флуоресцентной меткой в 5’ и гасителем флуоресценции в 3’ положении. Зонды имеют места посадки внутри амплифицируемой области.

НАБОР РЕАГЕНТОВ

для выявления ДНК *Vibrio cholerae* и идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией

«АмплиСенс *Vibrio cholerae*-FL»

Предназначен для:

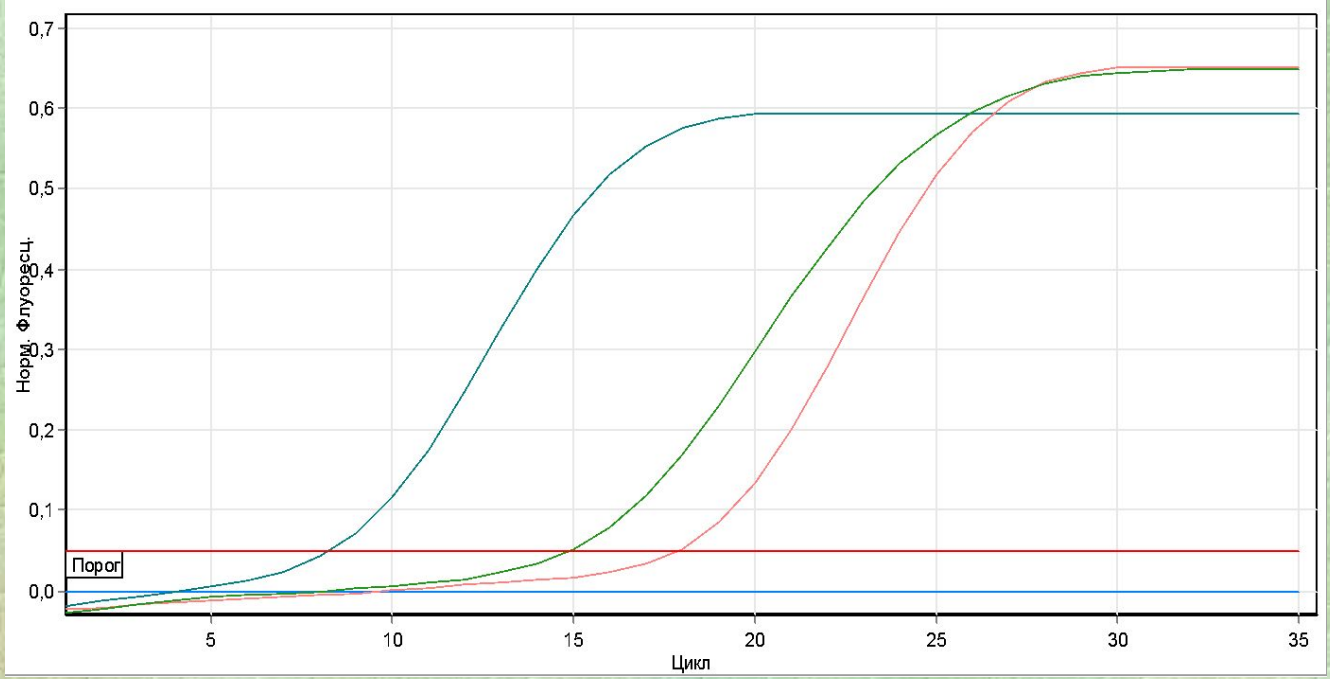
- выявления ДНК *V. cholerae* (по наличию последовательности гена ***hly***)
- идентификации патогенных штаммов *V. cholerae* (по наличию основных факторов патогенности – ***ctxA, tcpA***)
- определение принадлежности к серогруппе O1 (по наличию амплификации мишени ***wbeT***) или к серогруппе O139 (по наличию амплификации мишени ***wbfR***).

ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ В МУЛЬТИПЛЕКСНОМ ФОРМАТЕ <u>В ДВУХ ПРОБИРКАХ</u>:

<u>Пробирка «Скрин»</u> - амплификация мишеней
***ctxA* (FAM/Green)**
***tcpA* (ROX/Orange)**
внутреннего контрольного образца (JOE/Yellow/HEX)

<u>Пробирка «Тип»</u> - амплификация мишеней
***wbeT* (FAM/Green)**
***wbeF* (ROX/Orange)**
***hly* (JOE/Yellow/HEX)**

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ



Количественные Результаты - Cycling A.Green (Стр. 1)

№	Имя	Тип	CT	Конц.Стандарта	Конц. Расч. (Ког	Коэфф. Ва	Сред. Ct
6	к-т	Отрицате					
7	1	Образец	8,28				8,28
8	2	Образец	17,86				17,86
9	к+т	Положит	14,92				14,92

Учет результатов – на основании пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (указывается пороговый цикл - Ct)

	ПЦР-смесь-1-FRT *Vibrio cholerae* скрин			ПЦР-смесь-1-FRT *Vibrio cholerae* тип		
Варианты	**Значение порогового цикла *Ct* по каналу**					
	FAM/Green (ctxA)	**JOE/Yellow (ВКО)**	**ROX/Orange (tcpA)**	**FAM/Green (O1)**	**JOE/Yellow (*V.cholerae*) (hlyA)**	**ROX/Orange (O139)**
***V.cholerae* O1 токсигенный**	< 33	Любое значение или отсутствие	< 33	< 33	< 33	Нет значений
***V.cholerae* O139 токсигенный**	< 33	Любое значение или отсутствие	< 33	Нет значений	< 33	< 33
***V.cholerae* O1 НЕ токсигенный, но содержащий последовательн-ость tcpA**	Нет значений	< 33	< 33	< 33	< 33	Нет значений
***V.cholerae* O139 НЕ токсигенный, но содержащий последователь-ность tcpA**	Нет значений	< 33	< 33	Нет значений	< 33	< 33
***V.cholerae* O1 НЕ токсигенный**	Нет значений	< 33	Нет значений	< 33	< 33	Нет значений
***V.cholerae* O139 НЕ токсигенный**	Нет значений	< 33	Нет значений	Нет значений	< 33	< 33
***V.cholerae* НЕ O1 и НЕ O139**	Нет значений	< 33	Нет значений	Нет значений	< 33	Нет значений
Холерные вибрионы НЕ обнаружены	Нет значений	< 33	Нет значений	Нет значений	Нет значений	Нет значений

Определение генов, отвечающих за синтез O1 и O139 антигенов

Наименование микроорганизма	"АмплиСенс V. cholerae - FL"	"Ген V. cholerae - идентификация - РЭФ"	"Ген Vibrio cholerae вариант ctxB–РЭФ"
V. cholerae O1	Наличие амплификации по каналу FAM и JOE с ПЦР-смесью "Тип"	Наличие амплификации фрагмента wbeN размером 420 п.н. с ПЦР-смесью "O1-биовар"	Наличие амплификации фрагмента размером 638 п.н.
V. cholerae O139	Наличие амплификации по каналу JOE и ROX с ПЦР-смесью "Тип"	Наличие амплификации фрагмента wbf R размером 439 п.н. с ПЦР-смесью "O139"	Не определяет
V. cholerae non O1 / non O139	Наличие амплификации по каналу JOE с ПЦР-смесью "Тип"	Не определяет	Не определяет

Определение биоварспецифичных маркеров методом ПЦР

Наименование микроорганизма	**"АмплиСенс V. cholerae - FL"**	**"Ген V. cholerae - идентификация - РЭФ"**	**"Ген Vibrio cholerae вариант ctxB–РЭФ"**
V. cholerae классического биовара	Не определяет	Наличие амплификации фрагмента **wbeN** размером 420 п.н. и отсутствие образования фрагмента гена **hlyA**$^{\text{eltor/не-O1}}$ размером 264 п.н. с ПЦР-смесью "O1-биовар"	Наличие амплификации гена cas 3 размером 415 п.н. с Реакционной смесью 1.
V. cholerae (ctxA+ tcpA+) биовара эльтор	Наличие флуоресценции по каналу ROX с ПЦР-смесью "Скрин"	Наличие амплификации фрагментов **wbeN** размером 420 п.н. и **hlyA**$^{\text{eltor/не-O1}}$ размером 264 п.н. с ПЦР-смесью "O1-биовар"	Наличие амплификации гена rtxC размером 265 п.н. с Реакционной смесью 2.
V. cholerae (ctxA- tcpA-) биовара эльтор	Не определяет	Наличие амплификации фрагментов wbeN размером 420 п.н. и hlyA$^{\text{eltor/не-O1}}$ размером 264 п.н. с ПЦР-смесью "O1-биовар"	Наличие амплификации гена rtxC размером 265 п.н. с Реакционной смесью 2.

Определение эпидемической значимости холерных вибрионов на основании выявления *ctxA* и *tcpA* генов методом ПЦР

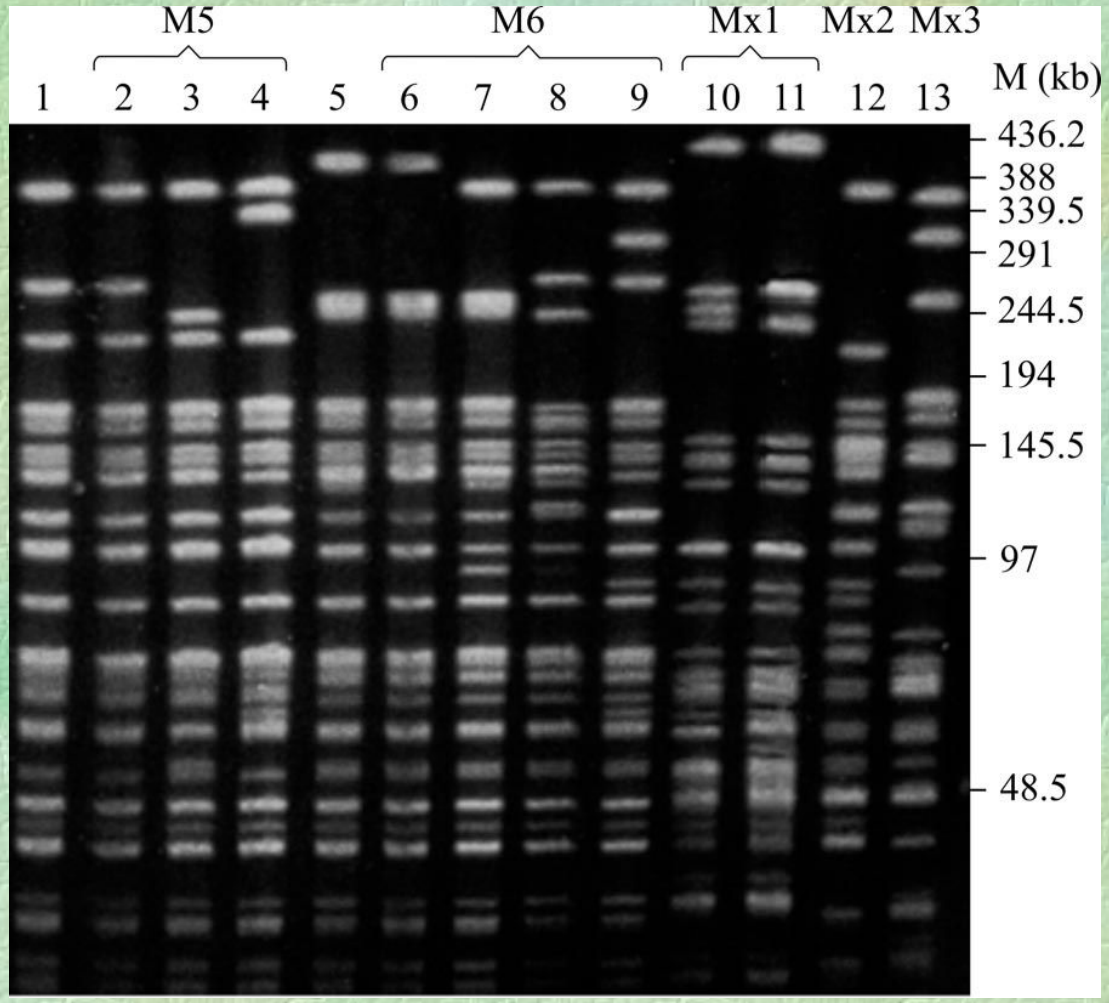
Наименование микроорганизма	**"АмплиСенс V. cholerae - FL"**	**"Ген V. cholerae - идентификация - РЭФ"**	**"ГенХол"**
V. cholerae (ctxA+ tcpA+) эпидемические значимые	Наличие флуоресценции по каналам FAM и ROX с ПЦР-смесью "Скрин"	Наличие образования фрагментов ctxA гена размером 564 п.н., tcpA - 218 п.н. с ПЦР-смесью "ctx-tcp"	Наличие образование фрагмента ctxA гена размером 564 п.н.
V. cholerae (ctxA- tcpA+) эпидемическая значимость требует уточнения	Наличие флуоресценции по каналу ROX и отсутствие - по каналу FAM с ПЦР-смесью "Скрин"	Наличие образования фрагмента гена tcpA размером 218 п.н., отсутствие образования фрагмента гена ctxA размером 564 п.н. с ПЦР-смесью "ctx-tcp"	Не определяет
V. cholerae (ctxA- tcpA-) эпидемические безопасные	Отсутствие флуоресценции по каналам FAM и ROX с ПЦР-смесью "Скрин"	Отсутствие образования фрагментов ctxA гена размером 564 п.н., tcpA - 218 п.н. с ПЦР-смесью "ctx-tcp"	Отсутствие образование фрагмента ctxA гена размером 564 п.н.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ

(выяснение источников, путей и факторов распространения холерного вибриона, установления эволюционных взаимосвязей между штаммами):

- **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) –** анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов
- **PFGE** (Pulsed Field Gel Electrophoresis) - метод электрофореза в пульсирующем поле
- **Ribotyping** – Ириботипирование
- **AFLP** (ampliphycation fragment lengh polymorphism) - полиморфизм длин амплифицированных фрагментов
- **RAPD** (random amplified polymorphic DNA) - произвольно амплифицированная полиморфная ДНК
- **MLVA (**Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis) - мультилокусный анализ вариабельных тандемных повторов
- **MLST** (Multilocus sequence typing) - мультилокусное сиквенс-типирование
- **секвенирование** отдельных участков генома
- **SNP-трипирование** (Single nucleotide polymorphism)
- **WGS** whole genome sequencing

PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)

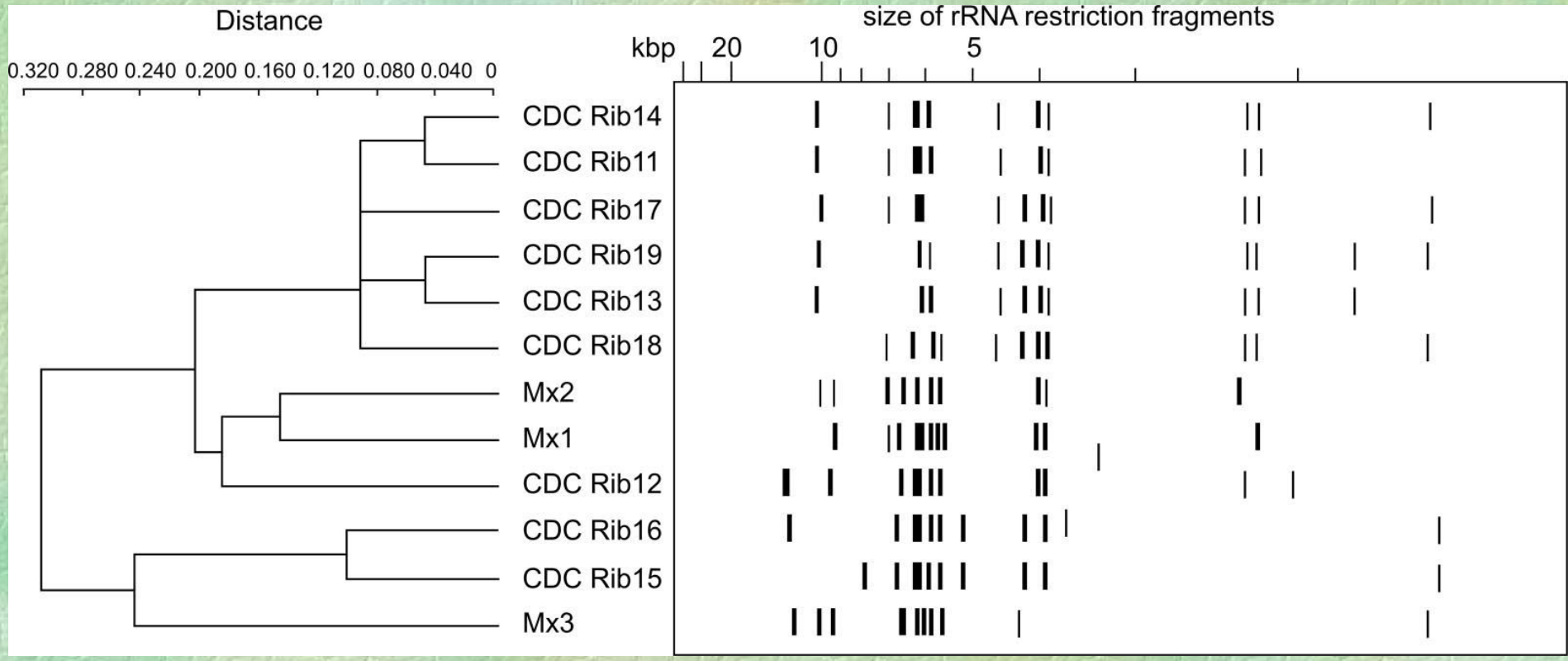


ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ:

- ***NotI*** *5'...G C^G G C C G C...3'*
  3'...C G C C G G^C G...5'
- ***SfiI*** *5'...G G C C N N N N^N G G C C...3'*
  3'...C C G G N^N N N N C C G G...5'

RIBOTYPING

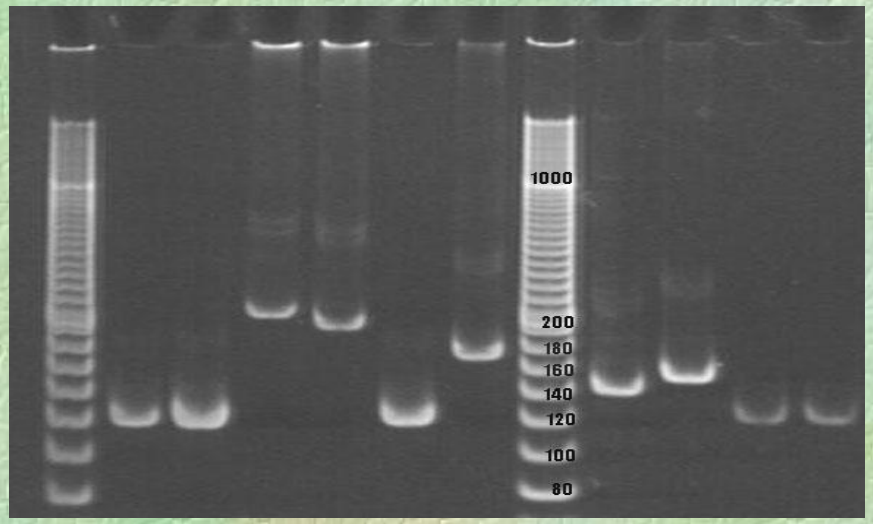
Изучение структуры генов рибосомальной РНК (16S и 23S рРНК)



Эндонуклеазы рестрикции:

- ***HindIII*** *5'...A^A G C T T...3'*
  3'...T T C G A^A...5'
- ***BglI*** *5'...G C C N N N N^N G G C...3'*
  3'...C G G N^N N N N C C G...5'

MULTIPLE-LOCUS VARIABLE NUMBER TANDEM REPEAT ANALYSIS (MLVA)



Электрофорез в 8% ПААГ продуктов амплификации локуса VcA штаммов *V. cholerae eltor O1*

Локализация	**Исследуемый локус**	Функция	Нуклеотидная последовательность повтора	Длина повтора (п.н.), число повторов[1]
2 хромосома	**VcA (VCA0171)**	Кодируют белки с неизвестной функцией	**TGCTGT**	6 (23)
	VcB (VCA0283)		**ACCAGA**	6 (14)
1 хромосома	**VcC (VC0147)**	Кодирует белок клеточного деления FtsY	**AACAGA**	6 (9)
	VcD (VC0437)	Некодирующая межгенная область	**GACCCTA**	7 (7)
	VcG (VC1650)	Кодирует белок коллагеназу	**GATAATCCA**	9 (7)

MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)

Типирование на основе секвенирования генов «домашнего хозяйства» (housekeeping gene)

Table 2. Allele profiles of *V. cholerae* O1 classical, O1 El Tor and O139 strains, and Mozambique isolates of this study

Numbers are previously reported allele profile numbers (Garg *et al.*, 2003). N, New allele type identified in this study.

Strain or isolate	Locus								
	dnaE	*lap*	*rstA*	*gmd*	*recA*	*pgm*	*gyrB*	*cat*	*chi*
O1 El Tor	1	1	2	2	1	1	1	1	1
O1 classical	1	1	12 (N)	2	3 (N)	1	1	1	6 (N)
O139	1	1	13 (N)	1	1	1	1	1	1
Mozambique	1	1	1	2	1	1	1	1	1
O1 El Tor N16961	1	1	1	2	1	1	1	1	1

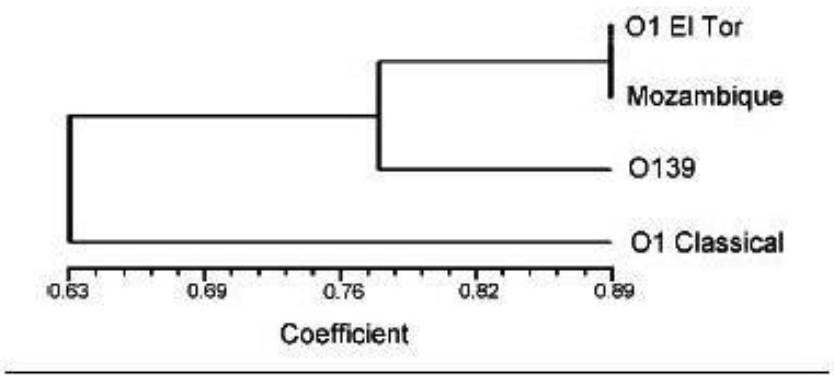


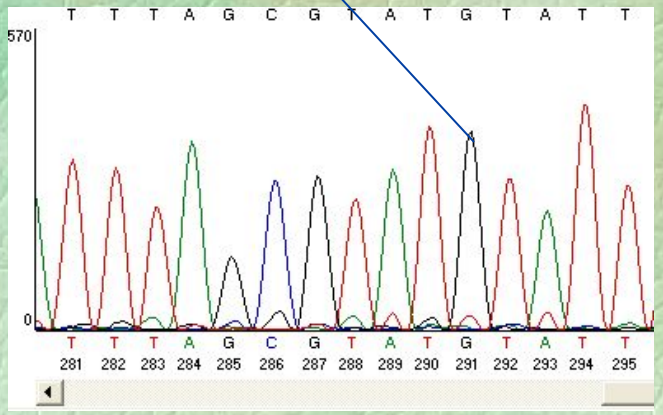
Fig. 1. Dendrogram of *V. cholerae* strains based on allele profiles created by using unweighted pair grouping with mathematical averaging (UPGMA). *V. cholerae* isolates from Mozambique were closely related to *V. cholerae* O1 El Tor strains.

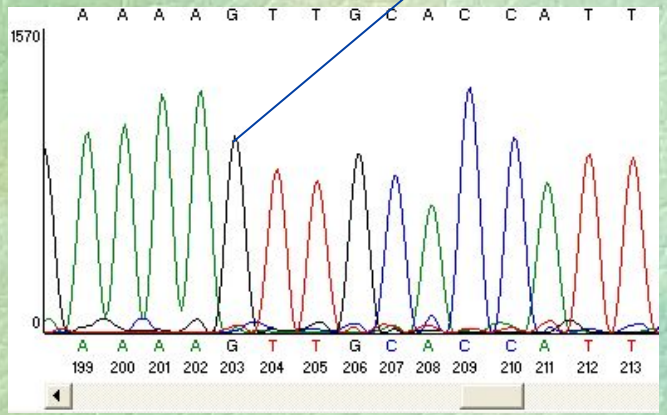
СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА *ctxB*

Нуклеотидная последовательность гена *ctxB* в штаммах *V. cholerae*, изолированных в 90-е годы (в Сибири и на Дальнем Востоке)

115 203

		120	130	140	150	160	170	180	190	200
ctxB 16961	111	ATATATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAATTTTT
» I-1264	111	ATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTT
» I-1187	111	ATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTT
» I-1184	111	ATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTT
» I-1181	111	ATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTT
- ctxB 569B	111	ATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTT
» I-1335	111	ATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTT
» I-1324	111	ATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTT
» I-1300	111	ATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTT
» I-1336	111	ATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTT
Contig 1	111	ATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTT





Фрагменты хроматограммы, полученной при секвенировании гена *ctxB* (*V. cholerae eltor* И-1324 (Владивосток, 1999 г.), комплементарная цепь)