

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

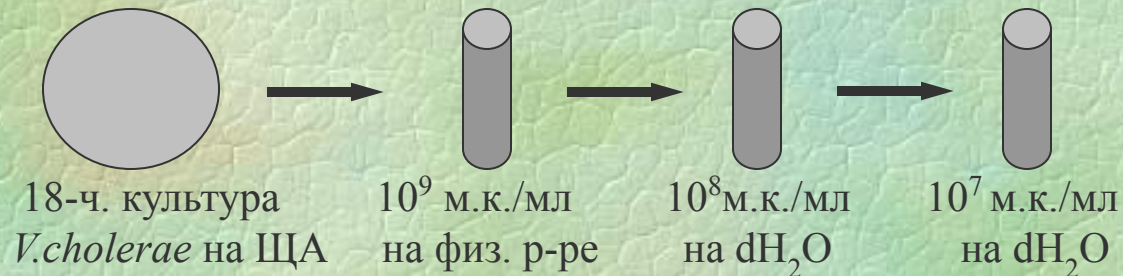
} *объем пробы - 1 литр*
концентрирование пробы:
- центрифугированием
- фильтрацией

- 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**



ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ ПРОБ

добавление мертиолята натрия до конечной концентрации 1:10000 с последующим прогреванием при 56 °С 30 мин.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

Применение стандартных наборов для выделения ДНК (по протоколу)

Изготовители: - РосНИПЧИ «Микроб»

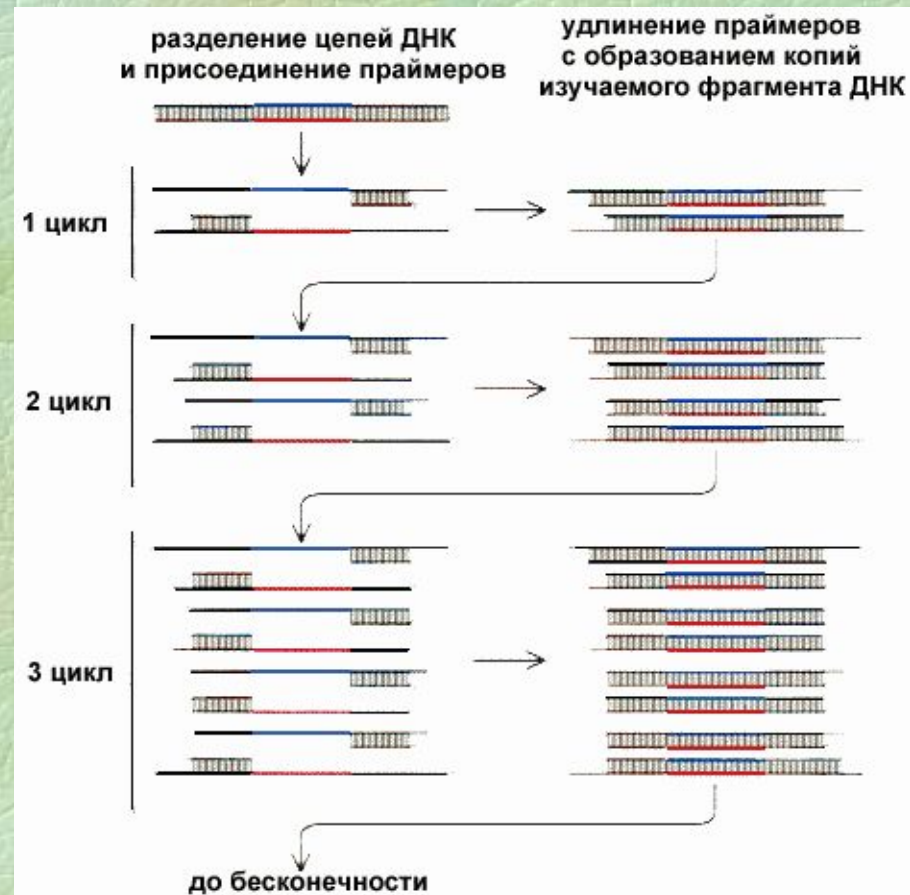
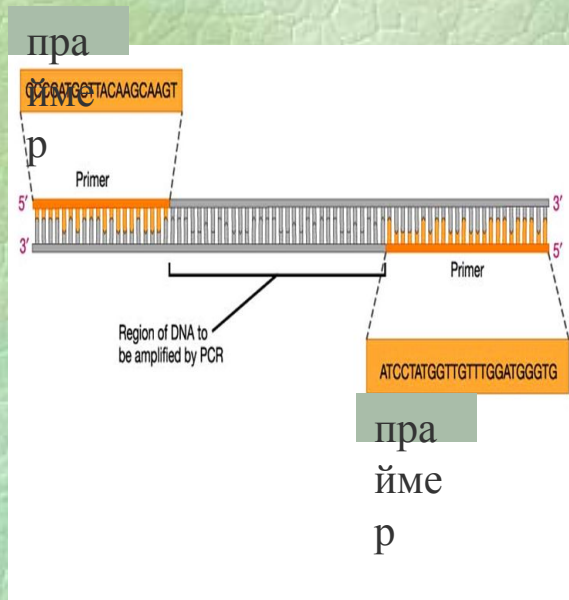
- ДНК-Технология

- Интерлабсервис (ДНК-сорб, Рибо-преп)

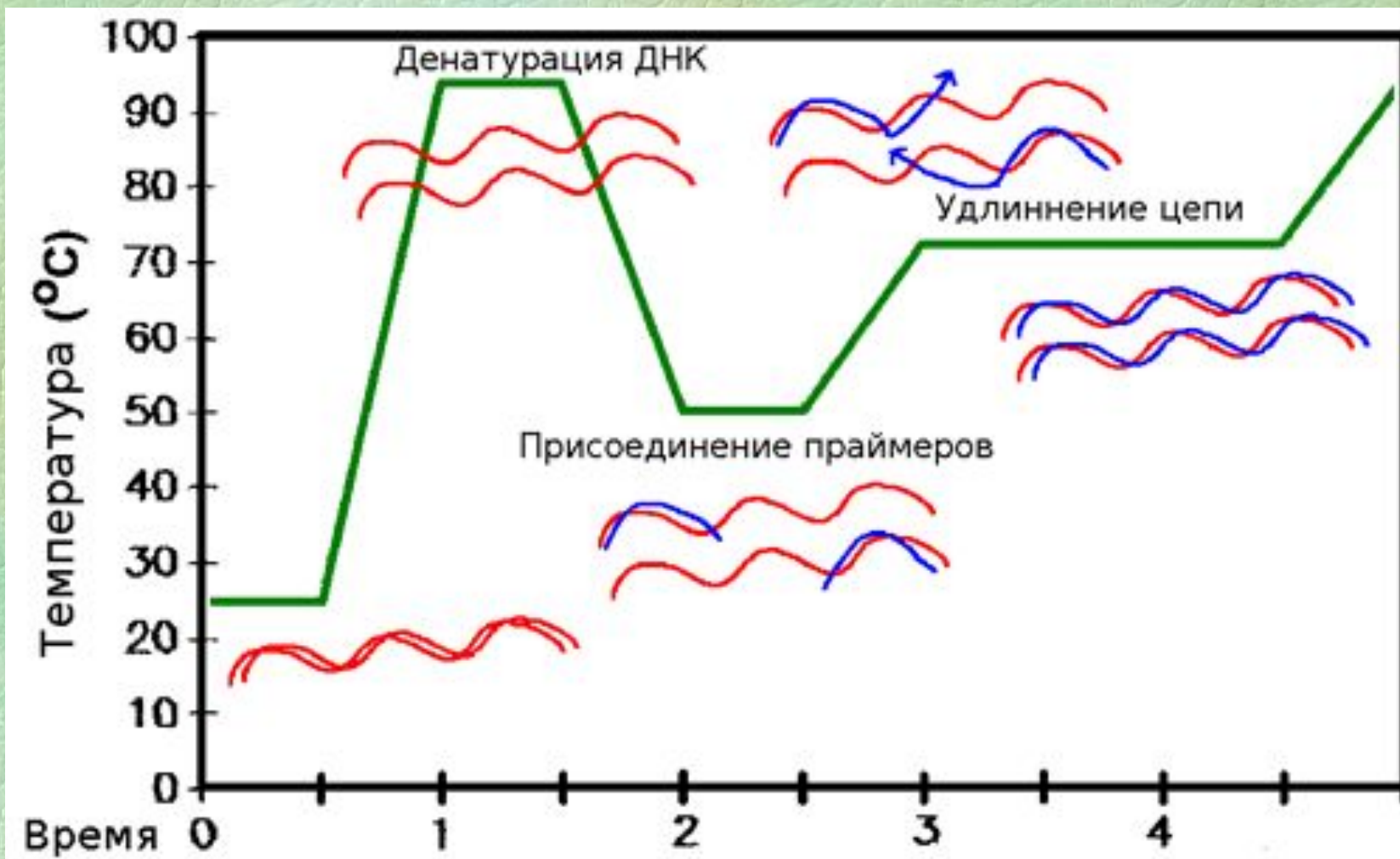


АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК (ПЦР)

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

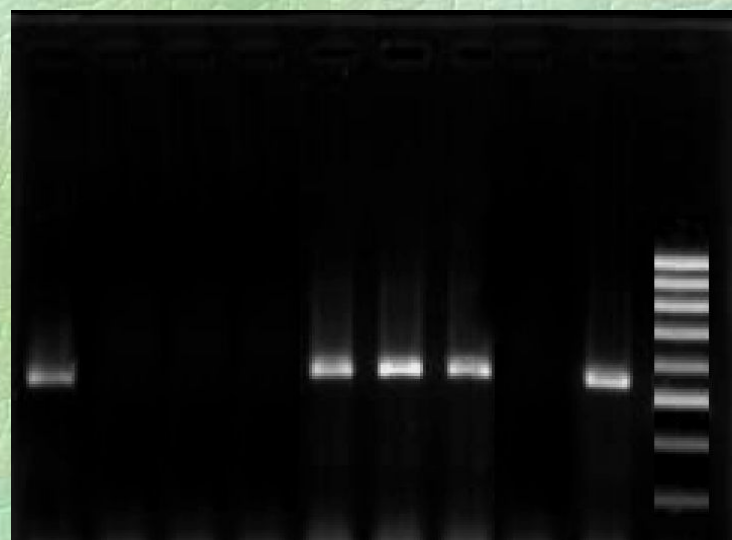


СТАДИИ ПЦР



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

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



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1000 н.п.

←

564 н.п.

←

300 н.п.

←

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 - *ctxA*⁻ → культуры эпидемически неопасные

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

Рег. уд. № ФСР 2012/13430 - 210512

ТУ 9398-039-01898109-2011

(РосНИПЧИ «Микроб», Саратов)

ПЦР-смесь-«ctx-tcp»,

определение эпидемической значимости:

фрагменты 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/ne-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 СТХВ-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).

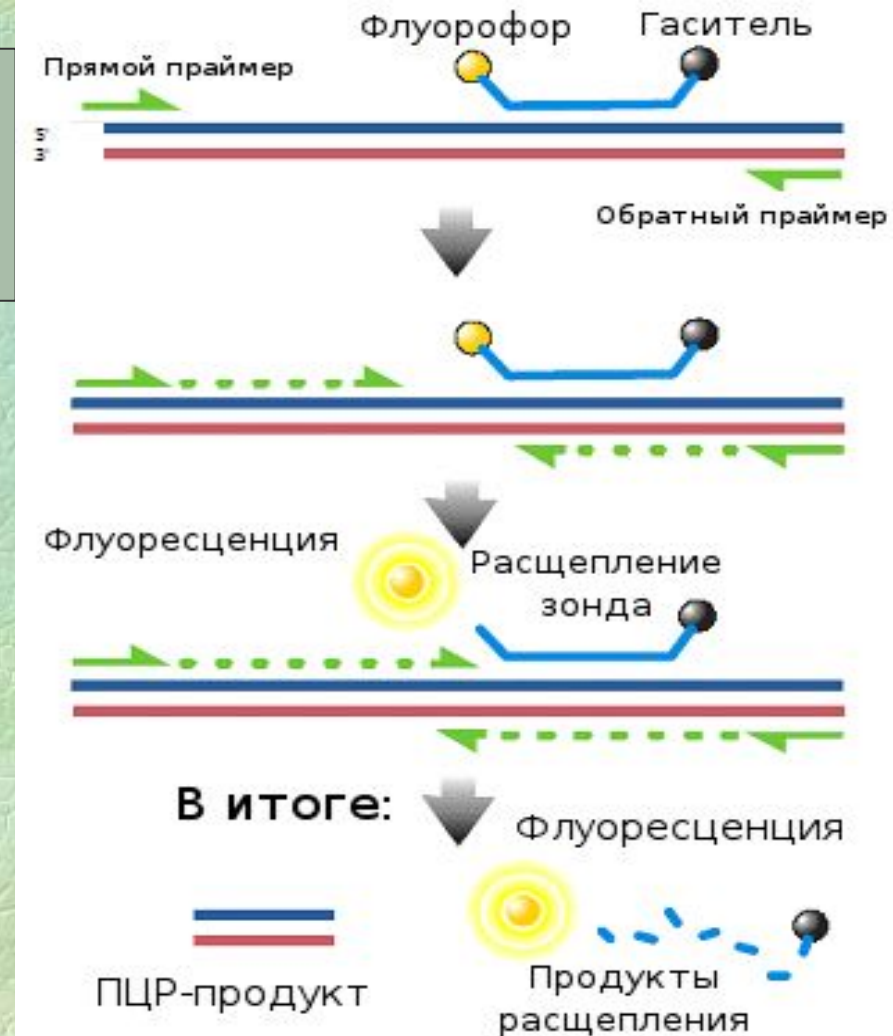
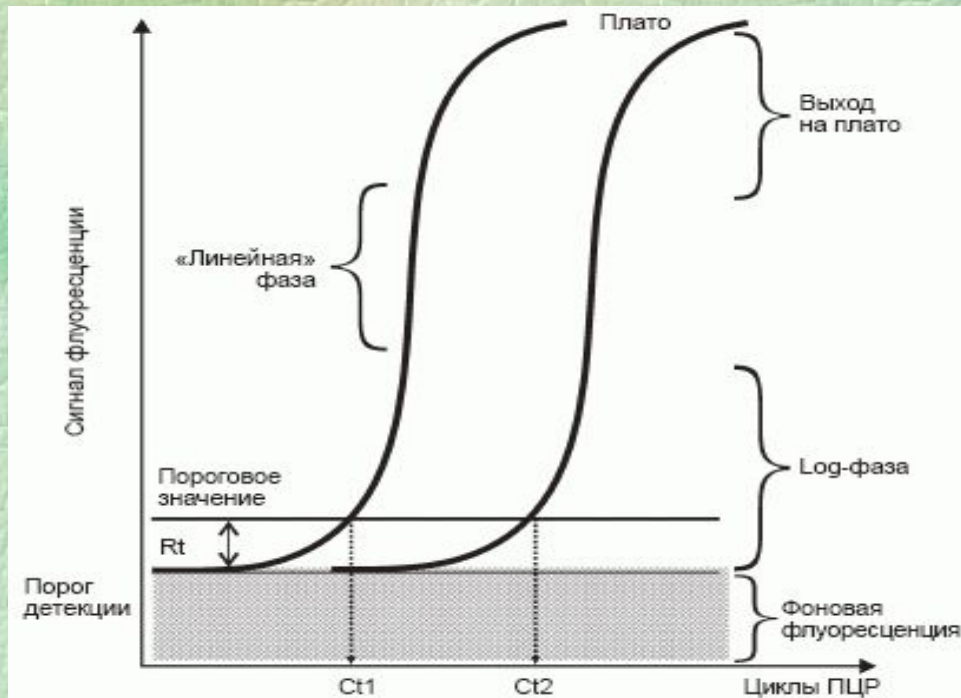
Измененные варианты Эль Тор вибрионов наряду с генами *wbO1* и *rtxC* характерно наличие ампликона *ctxBClass*.

**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).

 - Taq-пол
«R» - метка
«Q» - гаситель



1. Полимеризация

2. Расщепление зонда и
высвобождение метки

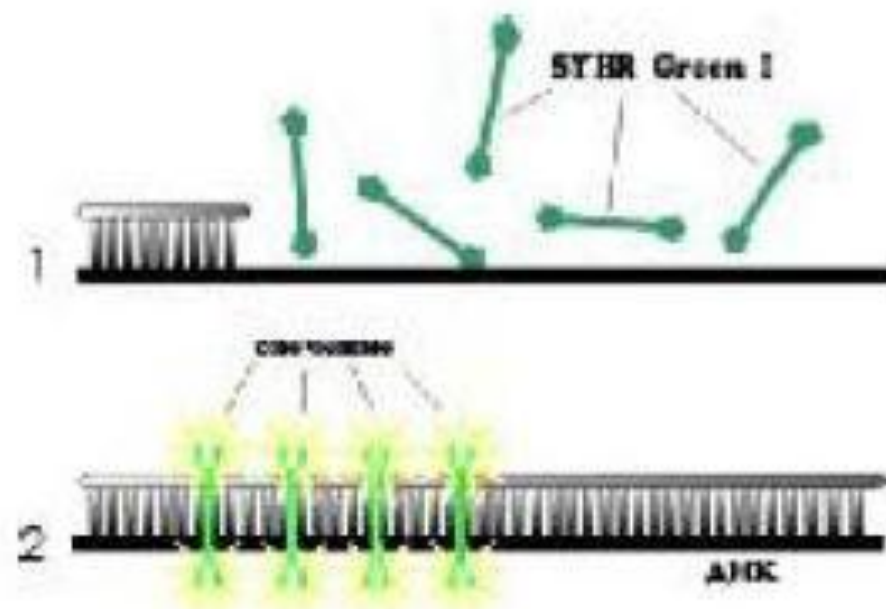
3. Достраивание цепи
и накопление
флюоресцентного сигнала



AmpliSens
www.wildtype.ru

Использование интеркалирующих красителей

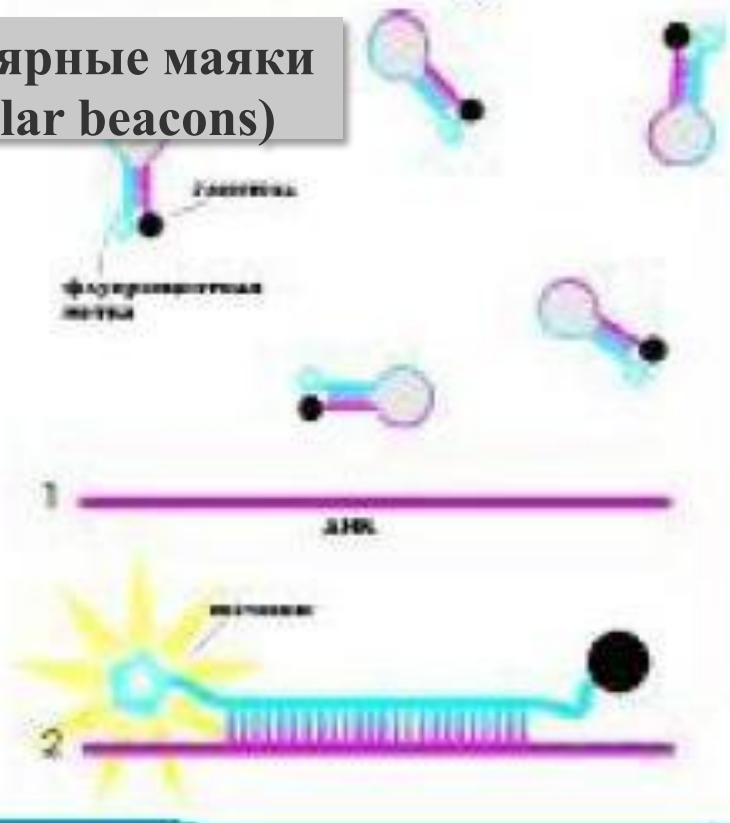
- Уровень флуоресценции интеркалирующих агентов в свободном состоянии низкий.
- При связывании с двухцепочечной ДНК их флуоресценция резко возрастает
- Чем больше образуется молекул ДНК в ходе ПЦР, тем сильнее флуоресценция.



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

- 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)



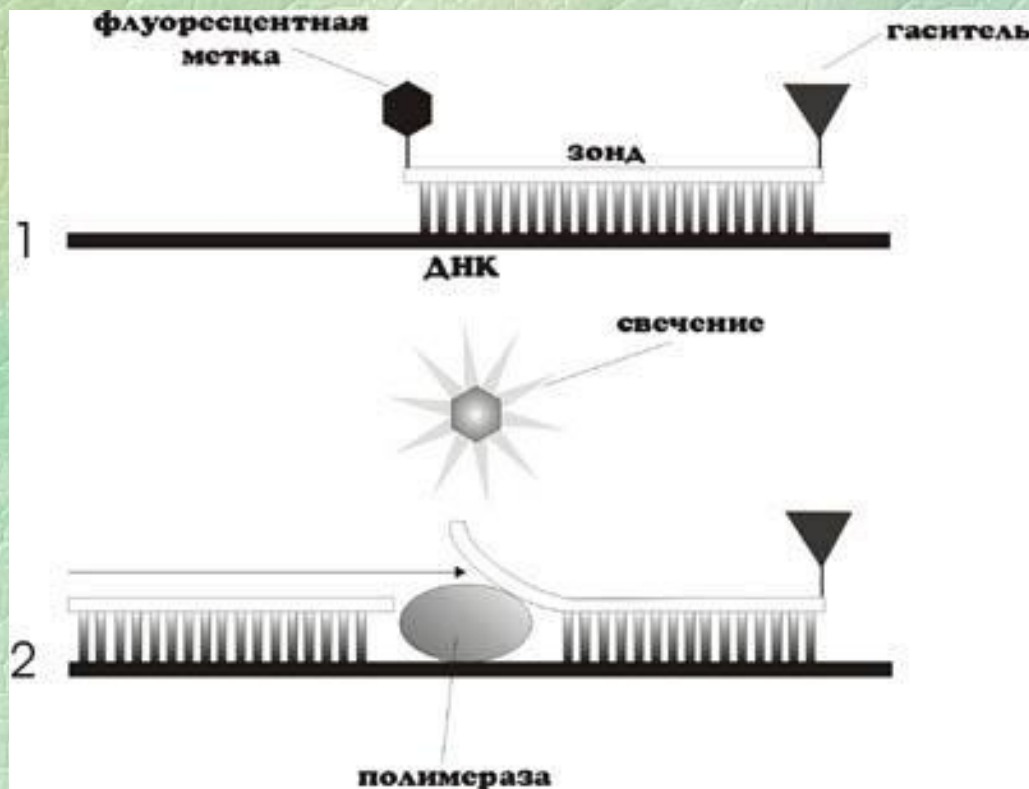
ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ флуоресцентных методов детекции результатов ПЦР

- 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 В ДВУХ ПРОБИРКАХ:

Пробирка «Скрин» - амплификация мишеней

ctxA (FAM/Green)

tcpA (ROX/Orange)

внутреннего контрольного образца (JOE/Yellow/HEX)

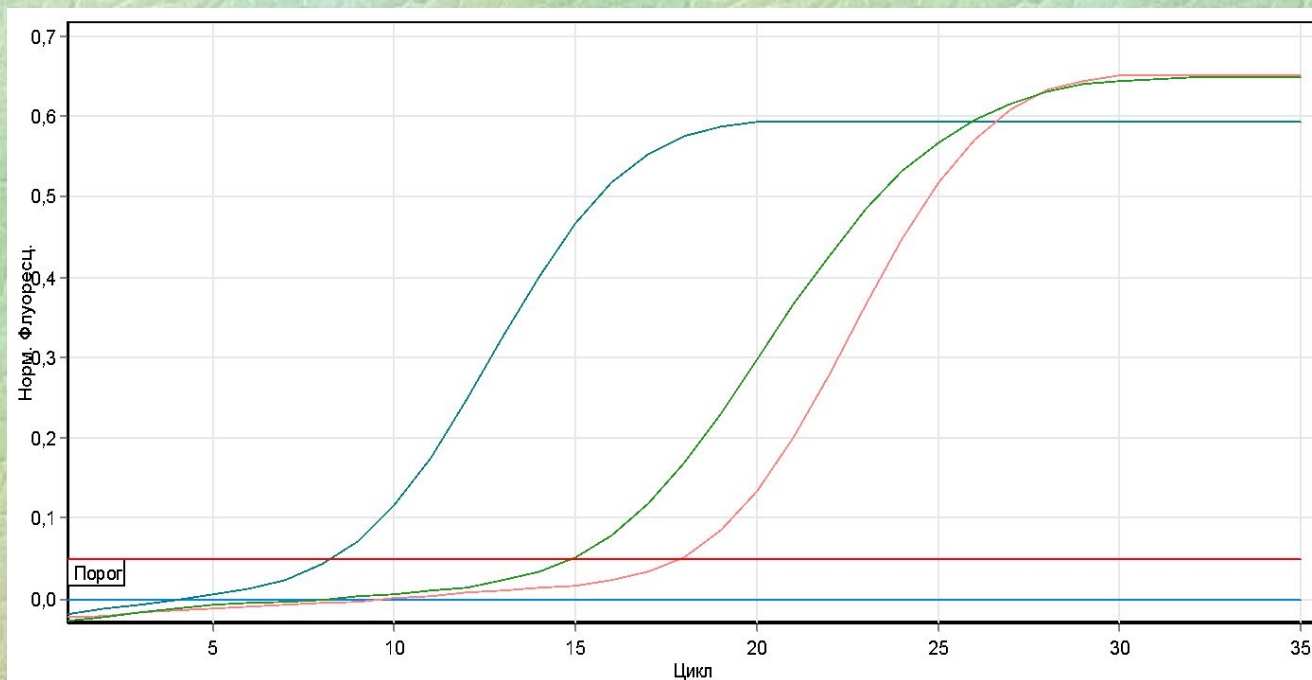
Пробирка «Тип» - амплификация мишеней

wbeT (FAM/Green)

wbeF (ROX/Orange)

hly (JOE/Yellow/HEX)

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ



№	Имя	Тип	СТ	Конц. Стандарта	Конц. Расч. (Кон)	Коефф. 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 <i>Vibrio cholerae</i> <u>скрин</u>			ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> <u>тип</u>		
Варианты	Значение порогового цикла <i>Ct</i> по каналу					
	FAM/Green (ctxA)	JOE/Yellow (BKO)	ROX/Orange (tcpA)	FAM/Green (O1)	JOE/Yellow (<i>V.cholerae</i>) (hlyA)	ROX/Orange (O139)
<i>V.cholerae</i> O1 токсигенный	< 33	Любое значение или отсутствие	< 33	< 33	< 33	Нет значений
<i>V.cholerae</i> O139 токсигенный	< 33	Любое значение или отсутствие	< 33	Нет значений	< 33	< 33
<i>V.cholerae</i> O1 НЕ токсигенный, но содержащий последовательн- ость tcpA	Нет значений	< 33	< 33	< 33	< 33	Нет значений
<i>V.cholerae</i> O139 НЕ токсигенный, но содержащий последователь- ность tcpA	Нет значений	< 33	< 33	Нет значений	< 33	< 33
<i>V.cholerae</i> O1 НЕ токсигенный	Нет значений	< 33	Нет значений	< 33	< 33	Нет значений
<i>V.cholerae</i> O139 НЕ токсигенный	Нет значений	< 33	Нет значений	Нет значений	< 33	< 33
<i>V.cholerae</i> 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 cholerae - FL" V.	"Ген V. cholerae - идентификация - РЭФ"	"Ген Vibrio cholerae вариант ctxB-РЭФ"
V. cholerae классического биовара	Не определяет	<u>Наличие</u> амплификации фрагмента wbeN размером 420 п.н. и <u>отсутствие</u> образования фрагмента гена hlyA^{eltor/не-01} размером 264 п.н. с ПЦР-смесью "01-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"	<u>Наличие</u> амплификации фрагментов wbeN размером 420 п.н. и hlyA^{eltor/не-01} размером 264 п.н. с ПЦР-смесью "01-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^{eltor/не-01} размером 264 п.н. с ПЦР-смесью "01-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

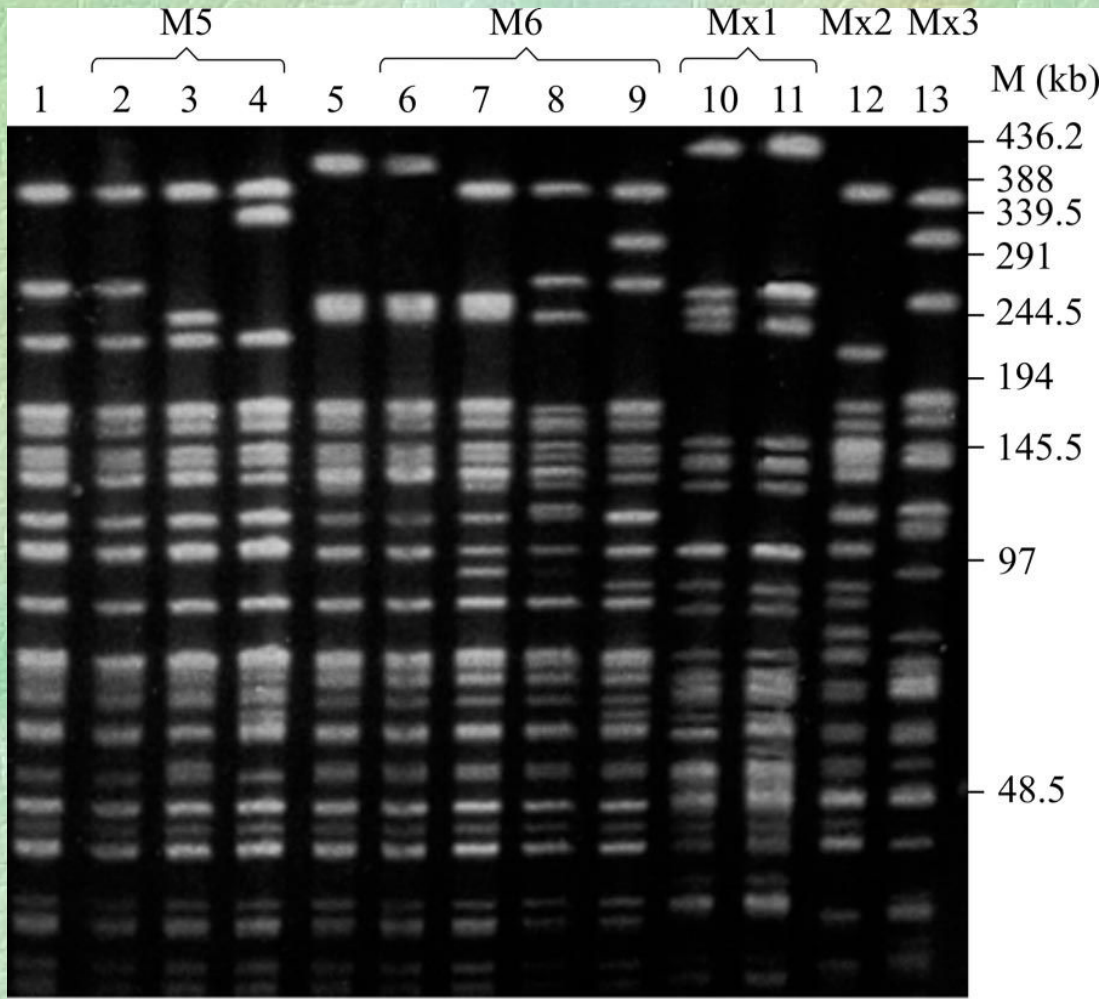
Наименование микроорганизма	"АмплиСенс <i>V. cholerae</i> - FL"	"Ген <i>V. cholerae</i> - идентификация - РЭФ"	"ГенХол"
<i>V. cholerae</i> (ctxA+ tcpA+) эпидемические значимые	Наличие флуоресценции по каналам FAM и ROX с ПЦР-смесью "Скрин"	Наличие образования фрагментов <i>ctxA</i> гена размером 564 п.н., <i>tcpA</i> - 218 п.н. с ПЦР-смесью "ctx-tcp"	Наличие образование фрагмента <i>ctxA</i> гена размером 564 п.н.
<i>V. cholerae</i> (ctxA- tcpA+) эпидемическая значимость требует уточнения	Наличие флуоресценции по каналу ROX и отсутствие - по каналу FAM с ПЦР-смесью "Скрин"	Наличие образования фрагмента гена <i>tcpA</i> размером 218 п.н., отсутствие образования фрагмента гена <i>ctxA</i> размером 564 п.н. с ПЦР-смесью "ctx-tcp"	Не определяет
<i>V. cholerae</i> (ctxA- tcpA-) эпидемические безопасные	Отсутствие флуоресценции по каналам FAM и ROX с ПЦР-смесью "Скрин"	Отсутствие образования фрагментов <i>ctxA</i> гена размером 564 п.н., <i>tcpA</i> - 218 п.н. с ПЦР-смесью "ctx-tcp"	Отсутствие образование фрагмента <i>ctxA</i> 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 (amplification fragment length polymorphism)** - полиморфизм длин амплифицированных фрагментов
- **RAPD (random amplified polymorphic DNA)** - произвольно амплифицированная полиморфная ДНК
- **MLVA (Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis)** - мультилокусный анализ переменных тандемных повторов
- **MLST (Multilocus sequence typing)** - мультилокусное секвенирование
- **секвенирование** отдельных участков генома
- **SNP-типирование (Single nucleotide polymorphism)**
- **WGS whole genome sequencing**

PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)



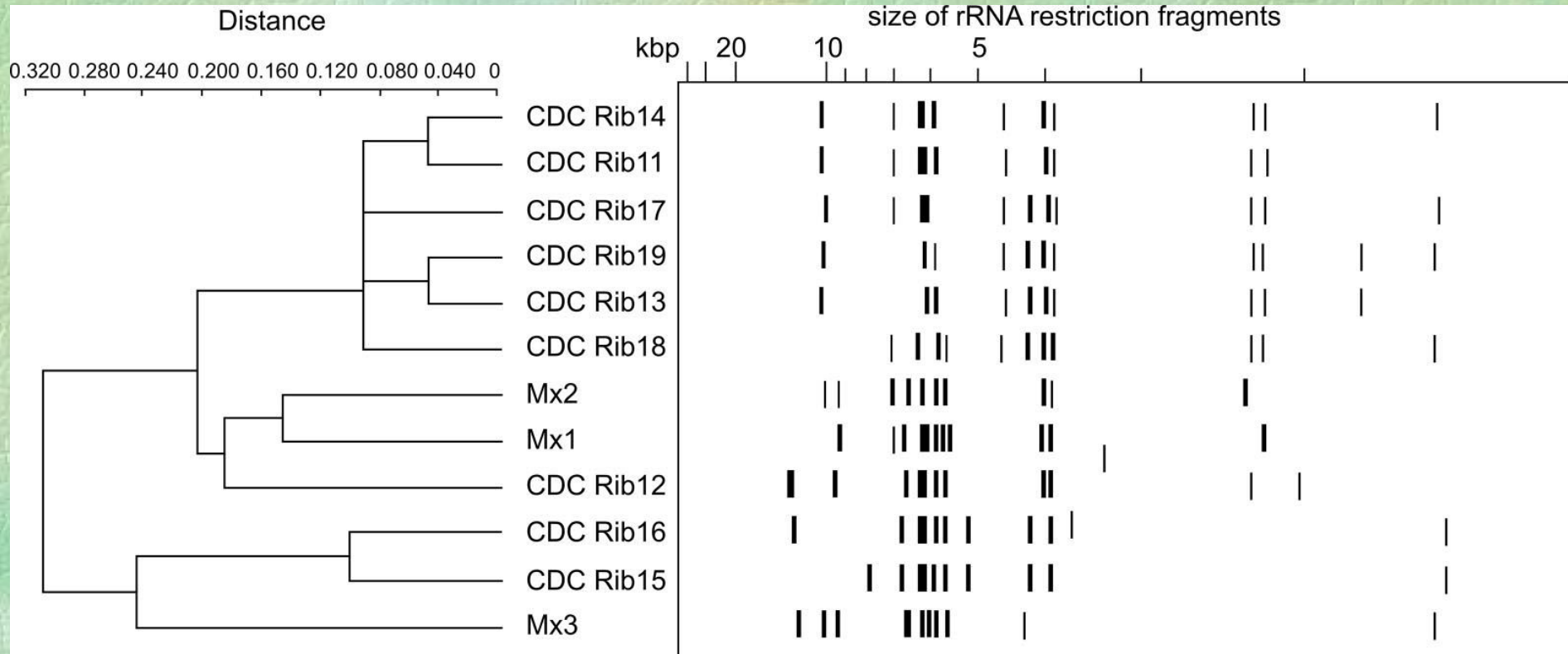
ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ:

- *NotI* 5'...GC[^]GGCC GC...3'
3'...CG CCGG[^]CG...5'

- *SfiI* 5'...GGCCN NNN[^]NGGCC...3'
3'...CCGGN[^]NNN NCCGG...5'

RIBOTYPING

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



Эндонуклеазы рестрикции:

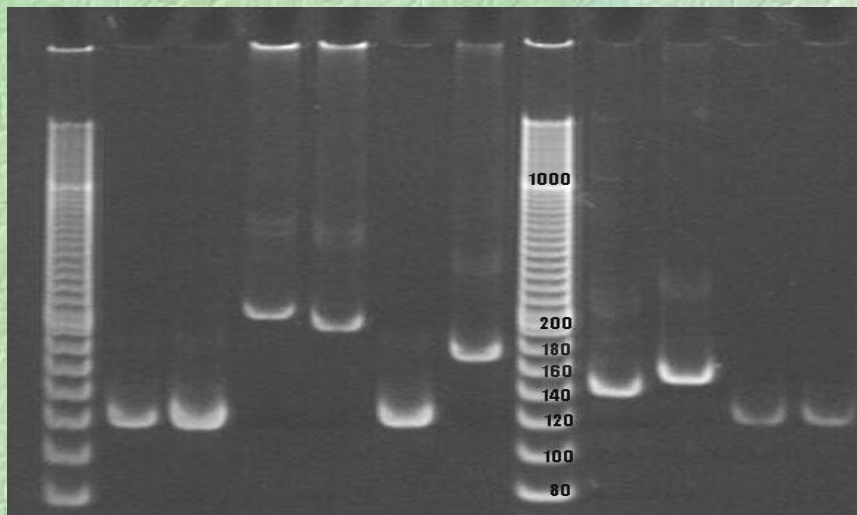
- *HindIII* 5'...A[^]AGCT T...3'

3'...T TCGA[^]A...5'

- *BglII* 5'...GCCN NNN[^]NGGC...3'

3'...CGGN[^]NNN NCCG...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
2хромосома	VcA (VCA0171)	Кодируют белки с неизвестной функцией	TGCTGT	6 (23)
	VcB (VCA0283)		ACCAGA	6 (14)
1хромосома	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								
	<i>dnaE</i>	<i>lap</i>	<i>rstA</i>	<i>gmd</i>	<i>recA</i>	<i>pgm</i>	<i>gyrB</i>	<i>cat</i>	<i>chi</i>
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

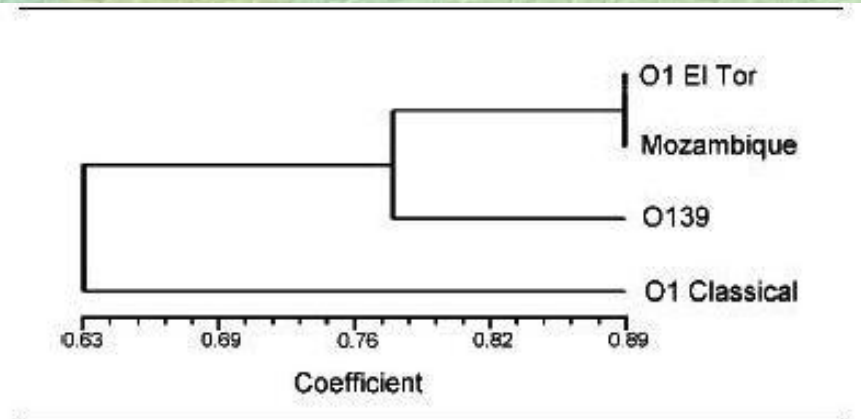
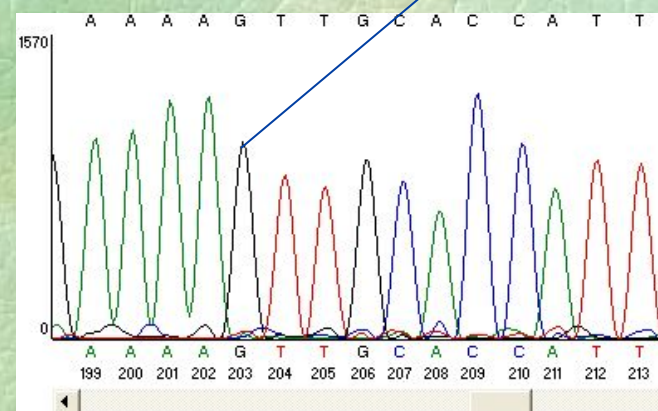
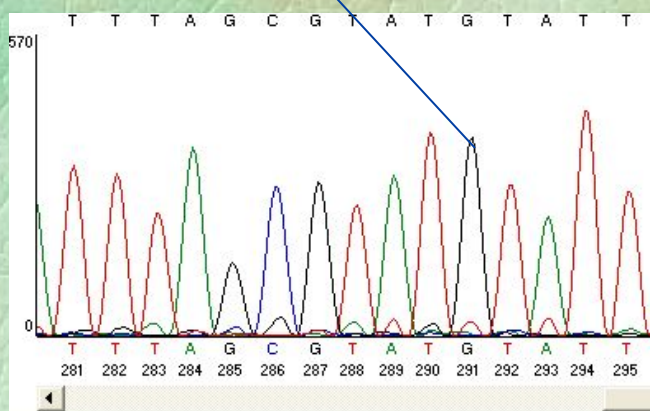


Fig. 1. Dendrogram of *V. cholerae* strains based on allele profiles created by using unweighted pair grouping with mathematical averaging (UPGMA). *V. cholerae* isolates from Mozambique were closely related to *V. cholerae* O1 El Tor strains.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА *ctxB*

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

	115	120	130	140	150	160	170	180	190	200	203	
ctxB 16961	111	A T A T A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A T T T T T										
» I-1264	111	A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T										
» I-1187	111	A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T										
» I-1184	111	A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T										
» I-1181	111	A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T										
ctxB 569B	111	A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T										
» I-1335	111	A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T										
» I-1324	111	A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T										
» I-1300	111	A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T										
» I-1336	111	A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T										
Contig 1	111	A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T										



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