

Molekulárně biologické metody – princip, popis, výstupy

Klára Labská

Evropský program pro mikrobiologii ve veřejném zdravotnictví (EUPHEM),
ECDC, Stockholm

NRL pro herpetické viry, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní
zdravotní ústav

ÚVOD – využití molekulárně biologických metod v mikrobiologii a epidemiologii

- zkvalitnění
 - laboratorní diagnostiky infekčních onemocnění
 - surveillance infekčních onemocnění
 - terapie infekčních onemocnění
- Přesná surveillance data jsou předpokladem:
 - účinné kontroly infekčních onemocnění
 - provádění opatření v ohnisku onemocnění
 - hodnocení účinnosti vakcinační strategie a doporučování její aktualizace
- Molekulární metody jsou postupně zaváděny v evropských zemích do **rutinního** použití v surveillance infekčních onemocnění.
- Molekulární epidemiologická data jsou **mezinárodně srovnatelná**,
 - globální surveillance
 - řešení přeshraničních hrozeb infekčních onemocnění.

Cíle sdělení

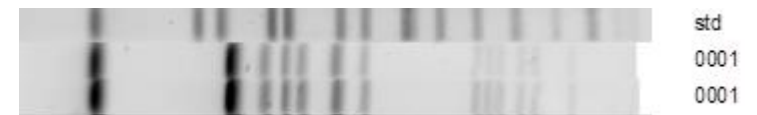
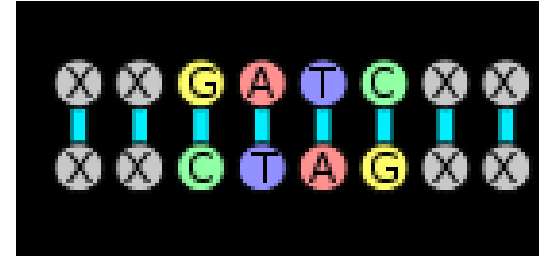
Popsat:

- Metody bez potřeby celogenomového sekvenování
 - PFGE
 - MLST
 - MLVA
 - Ribotypizace
 - Sequence-based typing (SBT);
- Rozdíl mezi klasickou sekvenací a metodami NGS (next generation sequencing)
- Metodu celogenomového sekvenování - WGS - její aplikace

Makrorestrikční analýza – pulzní gelová elektroforéza (PFGE)

Nukleová kyselina patogenu je štěpena

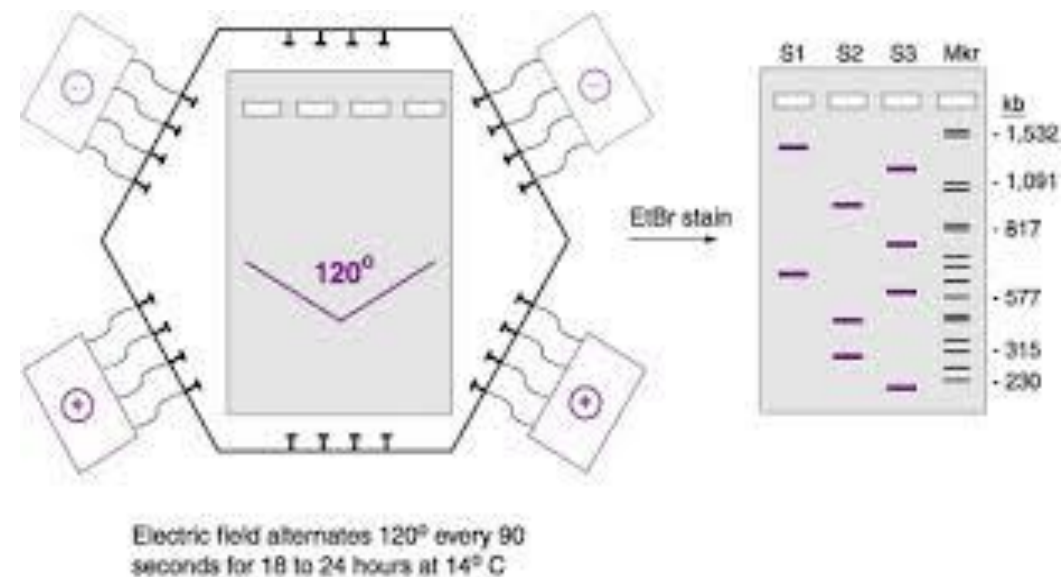
- bez amplifikace
- Restrikčními endonukleázami
 - enzymy, které štěpí NA vždy v určité sekvenci (palindrom)
- Následná elektroforéza v pulzním elektrickém poli
- **Pulzotyp**= restrikční profil
 - Lze porovnat
 - Standartizováno (PulseNet)



PFGE -využití

zůstává jako podpůrná typizační metoda

- *Listeria monocytogenes*
- *Salmonella enterica*
- Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC)



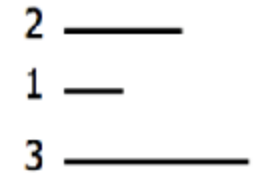
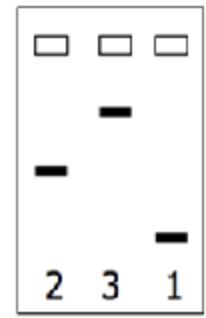
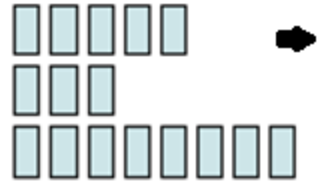
https://uvmgg.fandom.com/wiki/Pulsed_Field_Gel_Electrophoresis

MLVA

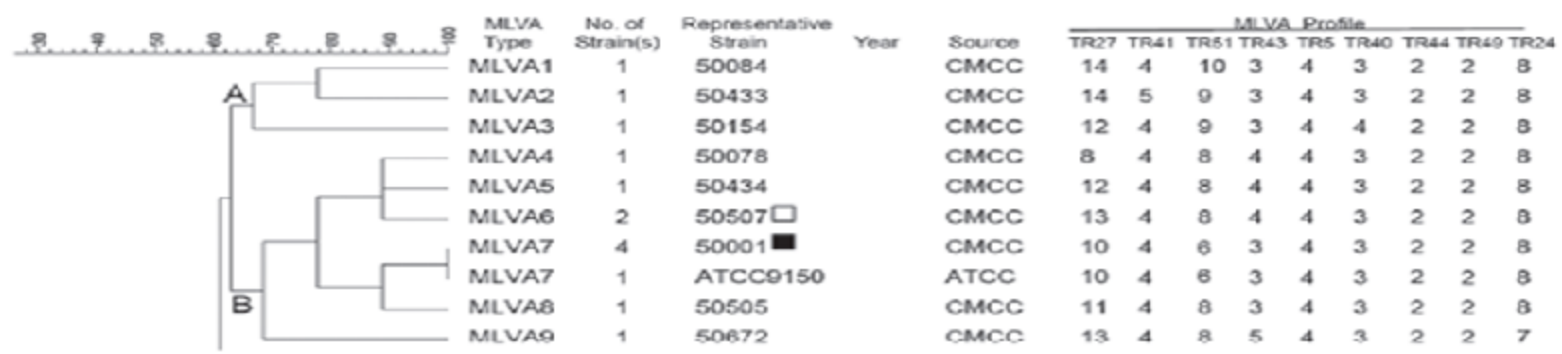
=Multiple Loci Variable number of tandem repeats Analysis

- PCR amplifikace úseků s repetitivními sekvencemi a elektroforetické stanovení délky
- Variabilní úseky= lokusy
- Různý počet lokusů pro různé sp.
- Standartizovaný protokol (PulseNet, ECDC)
- **MLVA profil**
 - např 14-0-2-4-1-7-1-6
(=8 lokusů)

PCR of VNTR region



Gel or capillary electrophoresis

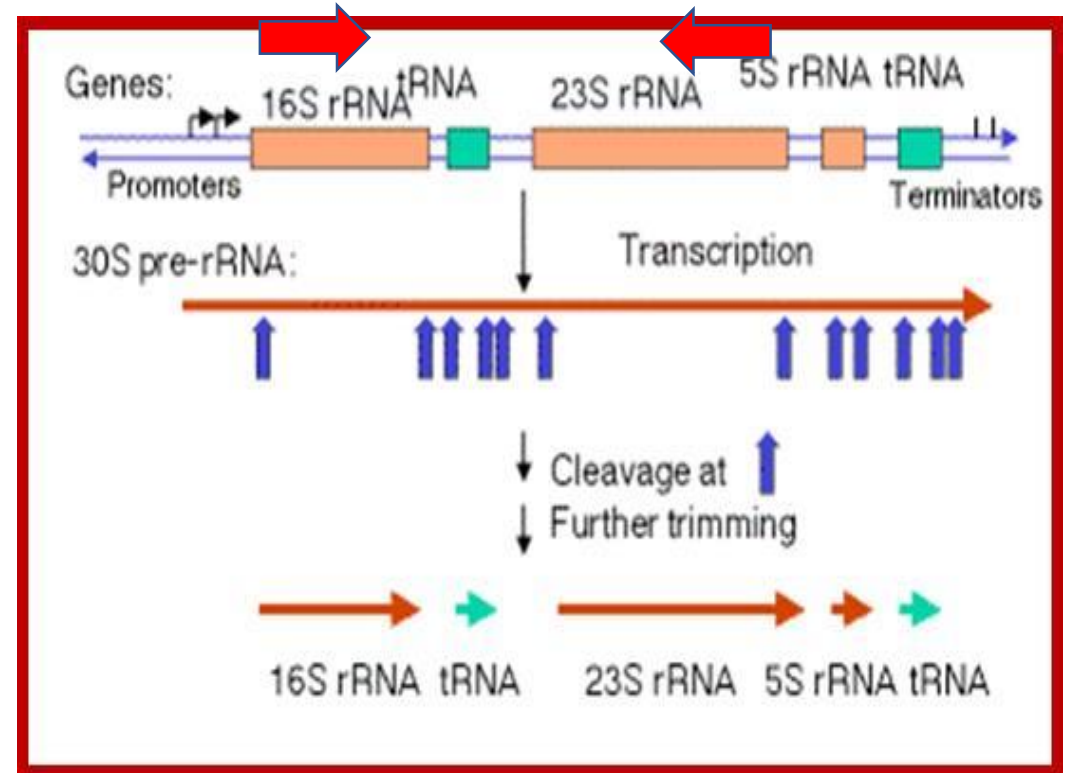


MLVA – využití

- ***Salmonella enterica* spp. *enteritidis* (sekundární metoda)**
- **Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC)**
- ***Mycobacterium tuberculosis* complex**
 - MIRU VNTR (mycobacterial interspersed repetitive units)

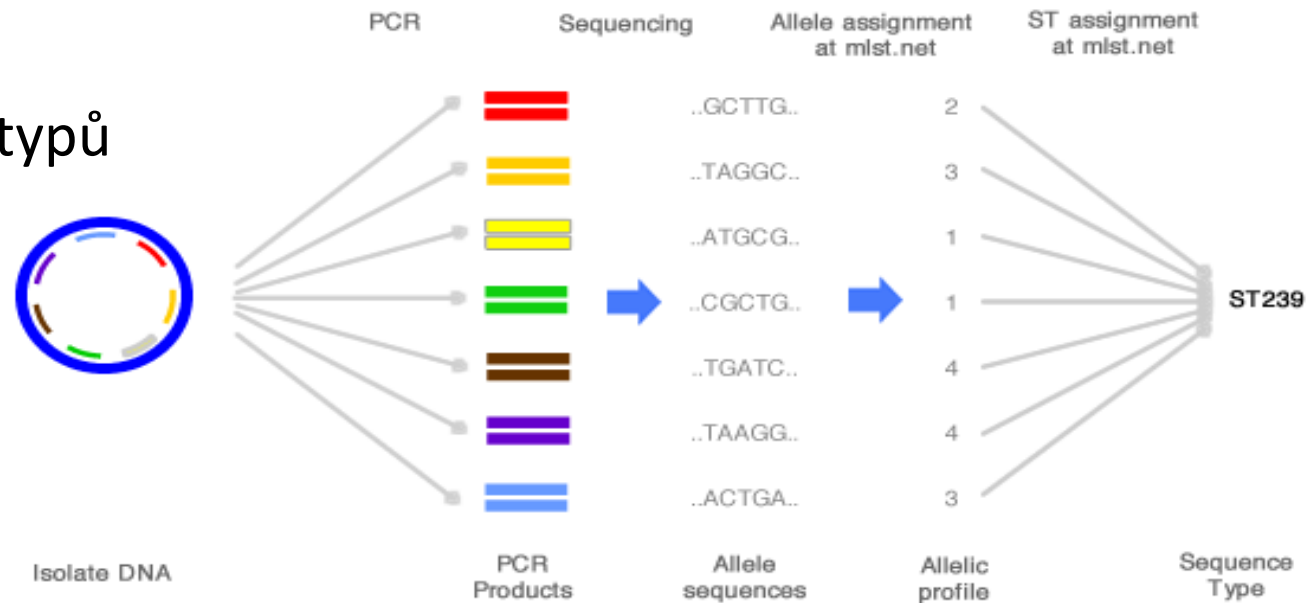
Ribotypizace

- Stejný princip jako MLVA
- *Clostridium difficile*
 - U prokaryot geny pro 16S ribosomální RNA, 23S ribosomální RNA, and 5S rRNA jsou v organizovány do operonu
 - *Clostridium difficile* 11 RNA operonů
 - standartizovaný protokol (ECDC)
 - nomenklatura (<https://webribo.ages.at/webribo>)



MLST = multi locus sequencing

- PCR amplifikace vybraných house keeping genů (5-7) a jejich sekvenace
- jedna varianta sekvence genu = **alela**
- Kombinací alel vzniká **ST** – sequence type = **sekvenční typ**
- **CC – klonální komplex**
= skupina sekvenčních typů



MLST -využití

- Standartizované protokoly a databáze na <https://pubmlst.org/databases/>

Pro více než 100 druhů prokaryot a eukaryot

The logo for PubMLST, featuring the text "PubMLST" in a bold, italicized, blue font with a slight shadow effect, set against a light gray rectangular background.

PubMLST

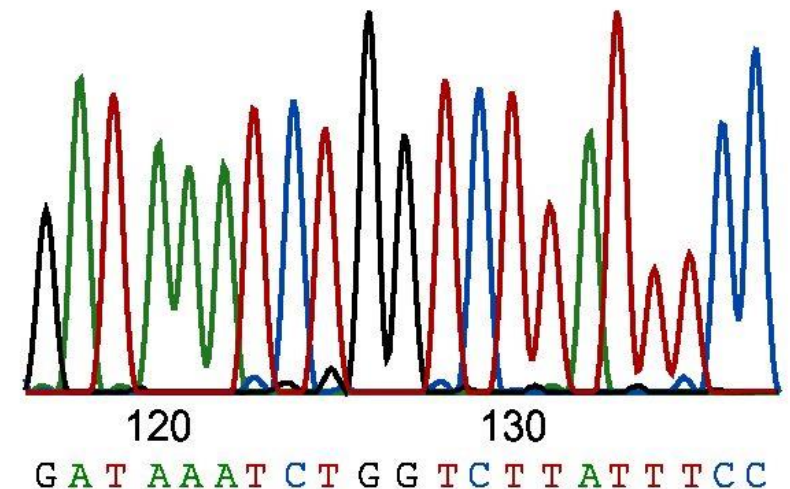
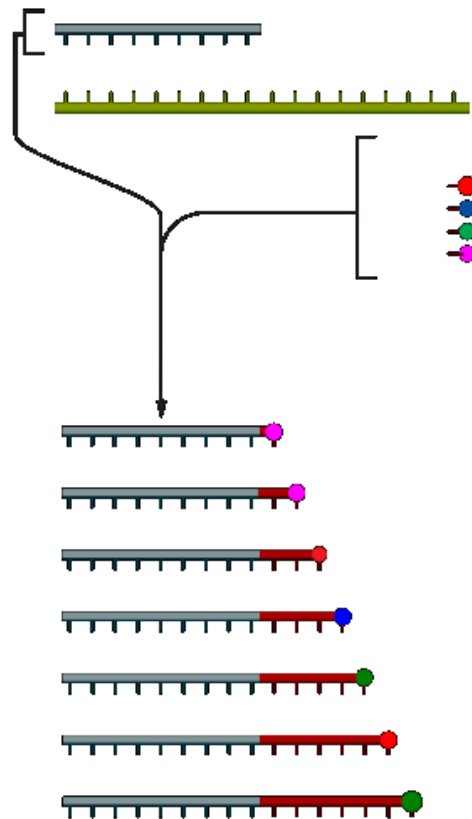
Sequence-based typing (SBT)

- Varianta MLST pro *Legionella pneumophila*
 - Kromě housekeeping genů i faktory virulence
- European Working Group for Legionella Infections ([EWGLI](#))
 - Protokol
 - Databáze s nomenklaturou – číslování alel, ST – sekvenční typy

Sekvenace

= získání informace o sekvenci (pořadí nukleotidů)

- 1977 Frederic Sanger
- Princip dideoxynukleotidů
 - Terminátory řetězce při amplifikaci DNA
 - Následná elektroforéza
- Délka sekvenovaného úseku cca 800-1500 pb
- Rozlišení přítomnosti heterogenních sekvencí cca od 20%
- Úsek čtený z obou stran



Next-Generation (NGS) – sekvenování „nové generace“

- **Zastřešující termín pro vysokovýkonnostní sekvenační platformy**
- = Masivní paralelní sekvenace**
 - **Illumina (Solexa) sequencing**
 - Ion torrent: Proton / PGM sequencing
 - SOLiD sequencing
 - Pacific Biosciences RS
 - MinION Nanopore
- Jednotlivé platformy se liší v objemu dat, chybovosti, délce osekvenovaného fragmetu a ceně

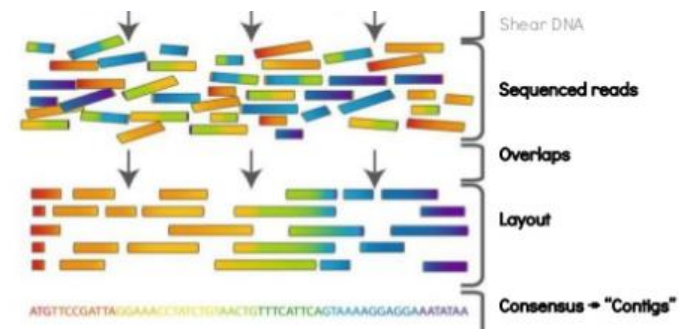
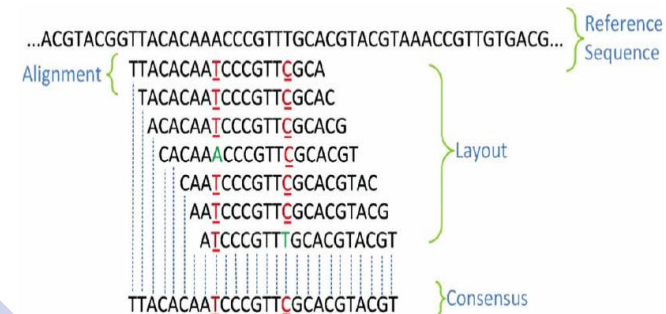
izolace
cílové
DNA/RNA

sekvenace

Složení
cílové
sekvence

příprava
DNA
knihovny

čištění dat



Analýza WGS dat – MLST analýzy

- 1: Core genome = geny by měly mít všichni zástupci druhu
 - 2: Disposable genome = “volný”
 - 3: unique genome = „unikátní“
- } Accessory genom
“doplňkový”

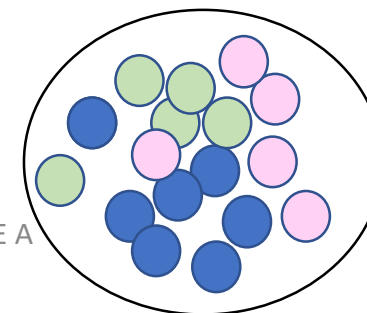
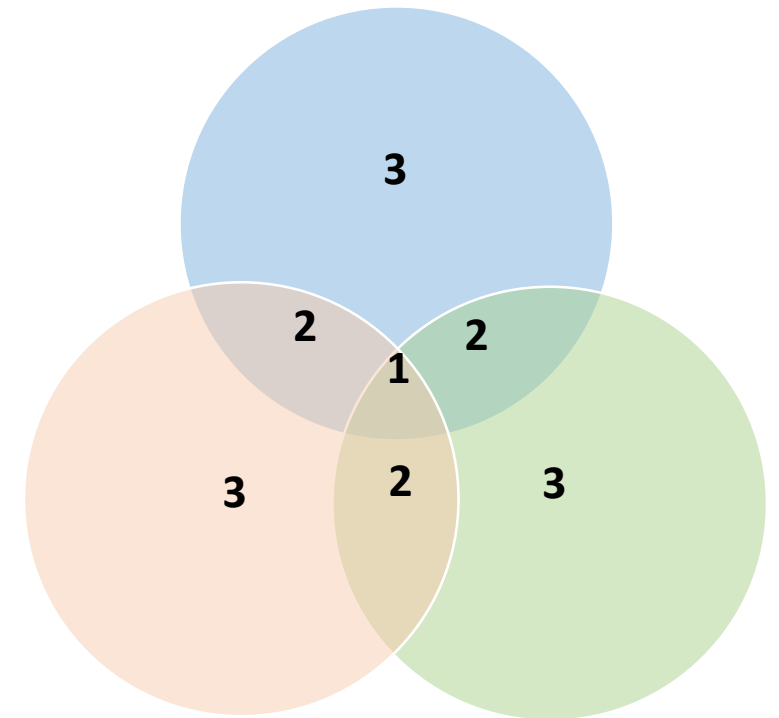
MLST (7 house-keeping genů/lokusů)

r MLST (53 genů/lokusů ribozomálních proteinů)

cg MLST (core genom – cca 1000-3000 genů/lokusů)

wg MLST (core genom + accessory genom)

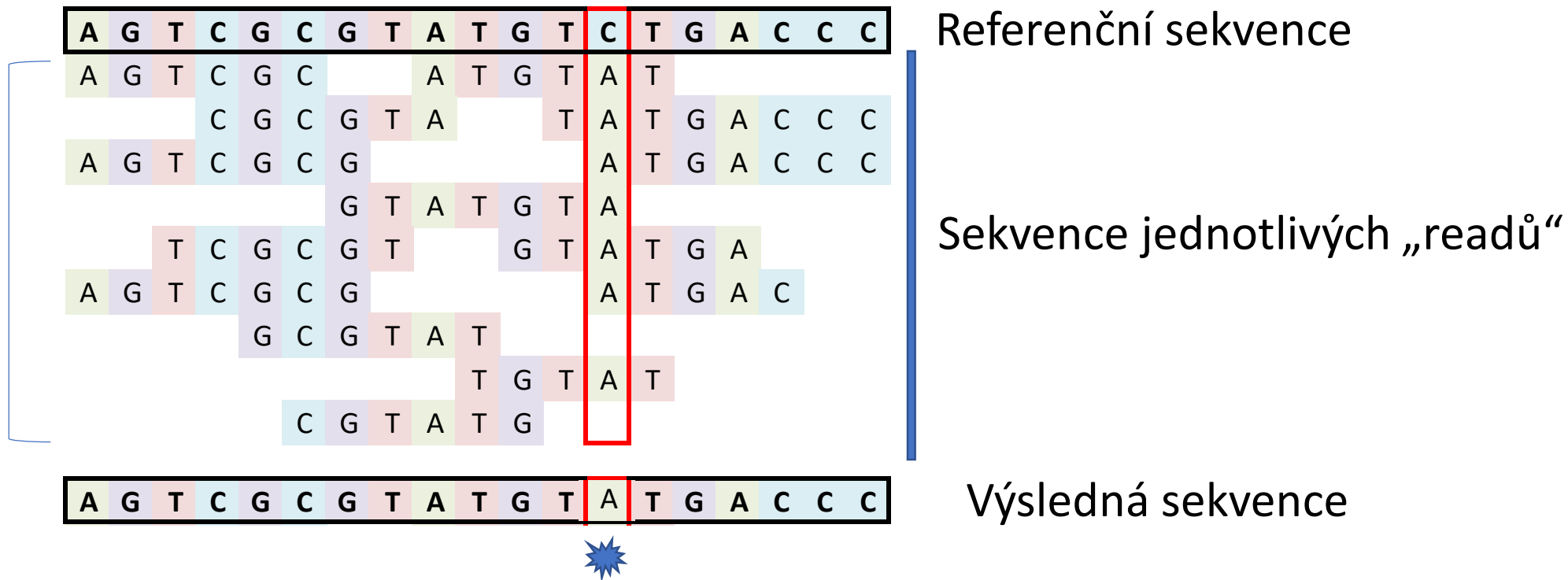
- Výstup je v alelách a ST (sekvenčních typech)



pangenom

Analýza WGS dat – SNP analýza

- SNP – single nucleotid polymorfism = bodová mutace/inzerce/delece



Zjištěná bodová mutace

cg MLST

= core genome multi locus sequence typing

Core genome

= soubor genů, který by měli mít všichni zástupci druhu

Varianta genu = alela

Soubor všech analyzovaných genů tvoří sekvenční typ –ST

Vizualizace

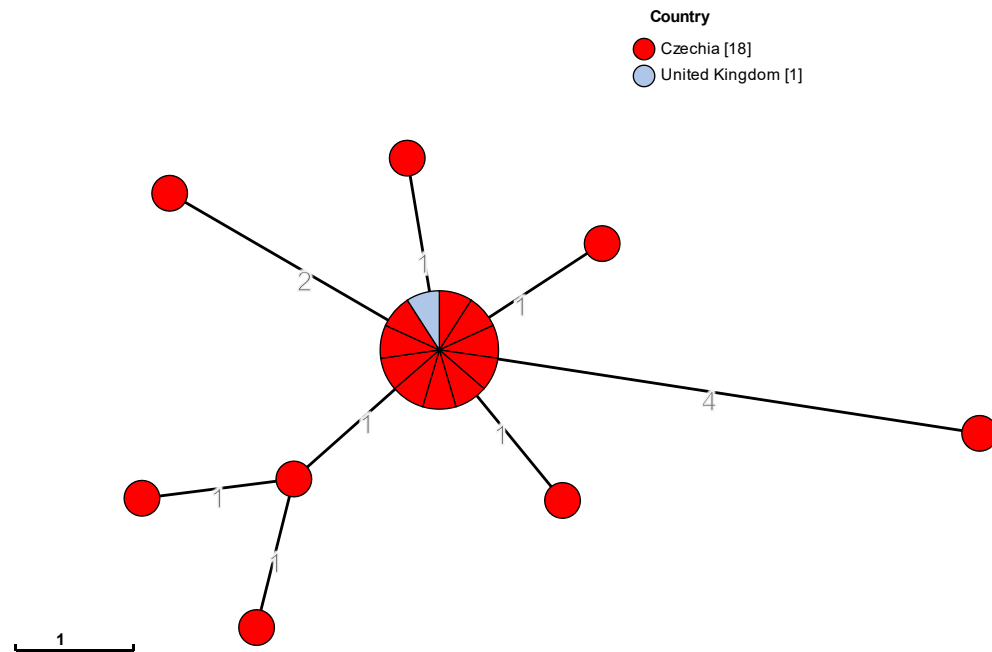
- Minimum spanning tree
- Neighbor joining tree

Preferovaný způsob analýzy WGS dat

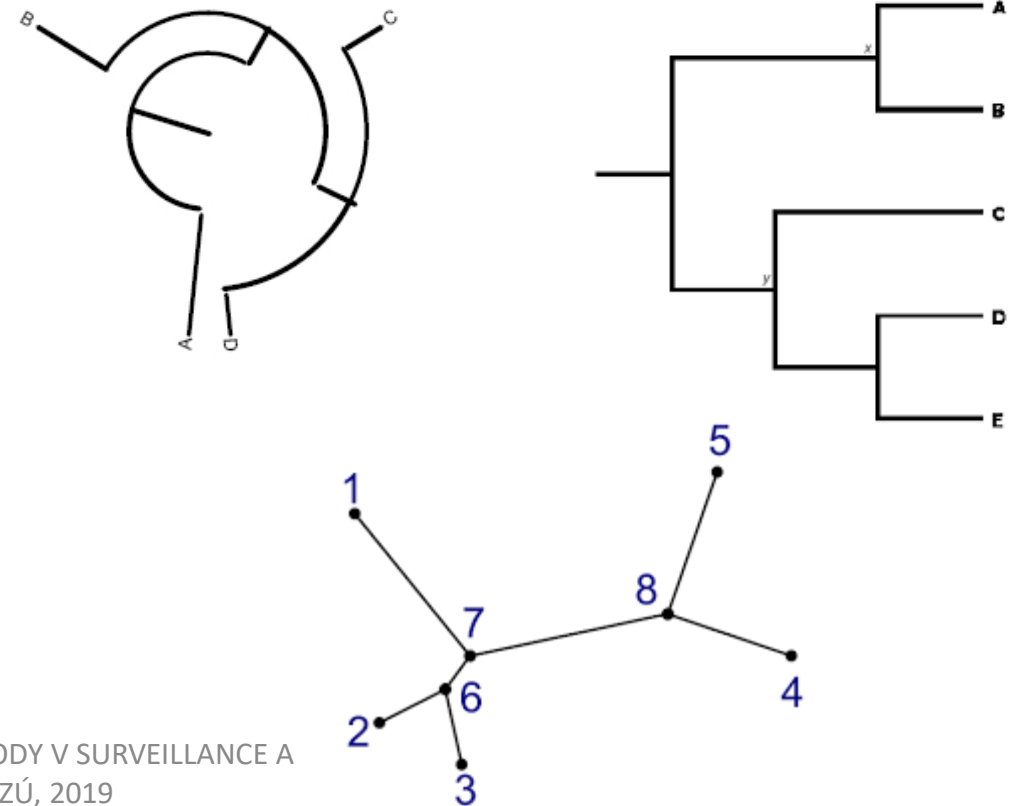
- *Neisseria meningitidis*
- *Campylobacter jejuni/Campylobacter coli*
- *Listeria monocytogenes*
- *Salmonella enterica*
- Shiga- toxigenní *E. coli* (STEC)
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Mycobacterium tuberculosis* komplex
- *Bordetella pertussis*
- Standartizace nomenklatury
 - <http://pubmlst.org/>
 - BIGSdb-Lm cgMLST <https://bigsdatabases.pasteur.fr/listeria/listeria.html>

Vizualizace (nejen) WGS dat

- MST-minimum spanning tree



- Fylogenetické stromy

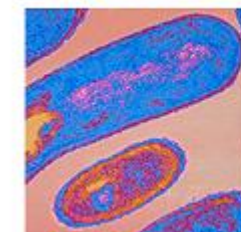


Závěr

- Molekulárně –biologické metody se uplatňují v epidemiologii v řešení epidemií, surveillance i zpětném dohledání zdroje/vehikula
- Probíhá masivní snaha o standartizaci postupů, názvosloví i výstupů
- Náklady klesají



Listeria Sequence Typing



- Sequences and profiles database
[Public]
- Isolates database
[Public] [Private]