

Molekulární diagnostika mikroorganismů

Molekulární diagnostika salmonel. Moderní metody sekvenování DNA

Ivan Rychlík

Výzkumný ústav veterinárního lékařství v.v.i. Brno

ČSN EN ISO 6579 Mikrobiologie potravin a krmiv Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella*

Předpomnožení v neselektivní tekuté půdě

Pomnožení v selektivních tekutých půdách

Vyočkování a identifikace

Konfirmace

Další typizace

Předpomnožení v neselektivní tekuté půdě

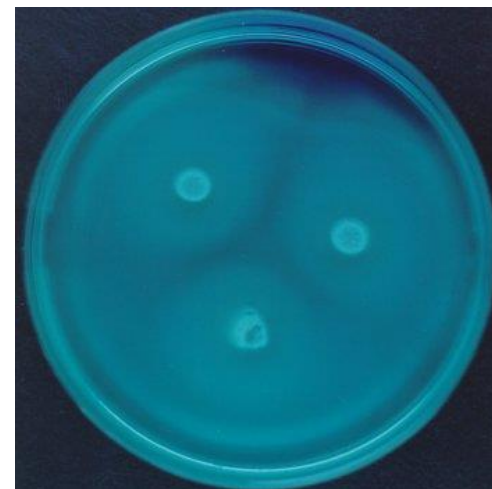
Pufrovaná (tlumivá) peptonová voda
Buffered peptone water

25 g vzorku do 225 ml půdy

16 - 20 hod při 37 C

Pomnožení v selektivních tekutých půdách

Půda podle Rappaporta a Vassiliadis
(pro průkaz bakterií rodu *Salmonella*
v trusu zvířat a vzorcích
z prostředí prvovýroby,
může být semisolidní)



Inokulace 0,1 ml z předpomnožovací půdy do 10 ml RV půdy
inkubace při 41,5 °C po dobu 24 h (dle potřeby i dalších 24 h)
Inhibiční efekt vysoké koncentrace MgCl₂ a malachitové zeleně

Půda podle Mullera a Kaufmanna s tetrathionátem a
novobiocinem
inkubace při 37 °C po dobu 24 h (dle potřeby i dalších 24 h)
Inhibiční efekt brilant zeleně, jódu a jodidu draselného,
žlučových kyselin, thiosíranu sodného a novobiocinu

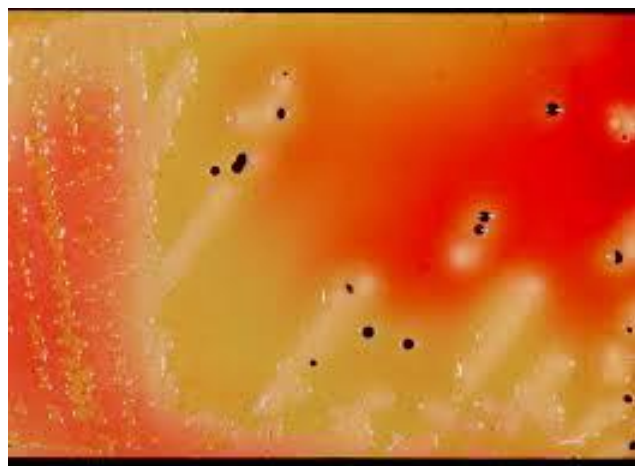


Vyočkování a identifikace

Z pomnožovací půdy se kličkou vyočkuje na

1. xyloso-lysin-deoxycholátový agar (XLD)
2. jakoukoliv selektivní půdu určená pro stanovení salmonel tedy např.
Briliant Green Agar (BGA)
Rambach agar

Xyloso-lysin-deoxycholátový agar (XLD)



Xylóza, laktóza, sacharóza

L-lysine

thiosíran sodný

citronan železitý

fenolová červeň – pouze indikátor

Sodium desoxycholate – potlačuje růst G+

Salmonella využívá thiosíran a metabolizuje jej na H_2S . Vzniklý sirovodík pak reaguje s citronanem za vzniku černého precipitátu FeS . *Salmonella* sice fermentuje xylózu, ale ne zbývající dva cukry. *Salmonella* současně dekarboxyluje lysin za vzniku bazického kadaverinu. Ten neutralizuje kyselé pH vzniklé fermentací xylózy. *E. coli* však fermentuje i laktózu a dekarboxylace lyzinu nestačí neutralizovat pH. To se projeví změnou barvy fenolové červeně do žluté.

Brilliant Green Agar



Laktóza, sacharóza – nejsou fermentovány salmonelami

fenolová červeň jako indikátor pH

briliant zeleň

Salmonella roste jako červená nebo růžová kolonie



Laktóza nebo sacharóza fermentující bakterie
rostou jako drobné žluté kolonie

Rambach agar



Propylene glycol -> acids (pouze *Salmonella*)

neutral červeně v kyselém prostředí precipituje

Salmonella proto roste jako výrazně červená

X-Gal, proto Lac pozitivní *E. coli* rostou modře

deoxycholát na potlačení růstu Gram pozitivních

Konfirmace

Nejméně 5 kolonií ze selektivních agarů se subkultivuje na živný agar k další testaci pomocí biochemických a sérologických testů

Triple Sugar Iron agar (TSI agar, s glukózou, laktózou, sacharózou a citranem železitým)

Agar s močovinou

Půda k otestování dekarboxylace L-lyzinu

Pestrá řada cukrů slouží ke sledování schopnosti mikroorganismů využívat různé druhy cukrů.

Testy jsou prováděny v tekuté půdě s přídavkem 0,5-1 % substrátu.

Nejčastěji se testuje schopnost využít glukózu, laktózu, sacharózu, ribózu, atd.

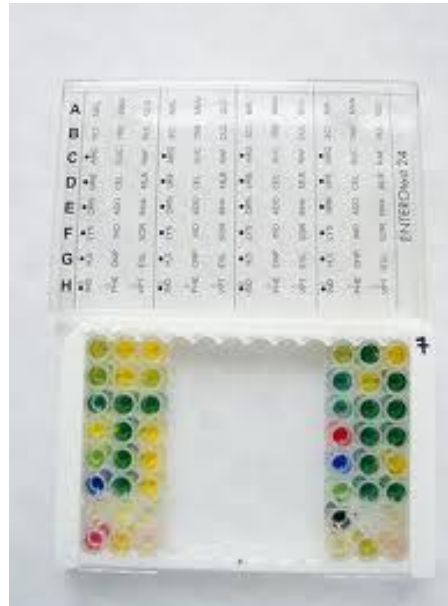
K detekci se používá acidobazický indikátor (např. bromthymolová modř, bromkrezolový purpur, fenolová červeň). V pozitivním případě dochází kvašením substrátu ke tvorbě organických kyselin, které okyselují médium a způsobí změnu indikátoru, tj. reakční směs změní barvu z původní zelené, resp. červené, na žlutou.

Serologie

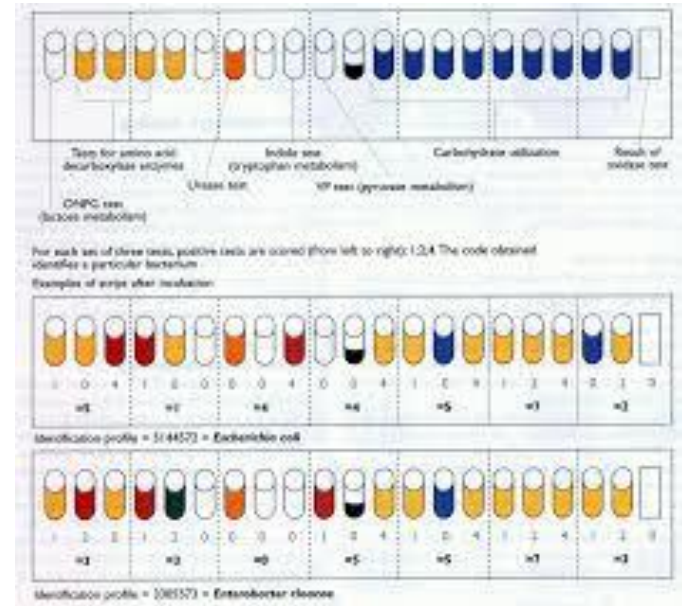
PCR

Konfirmace - biochemie

Enterotest



API



Konfirmace - serologie



B

O1 antigen

Glc

| 1→6

O12 antigen

| 1-3

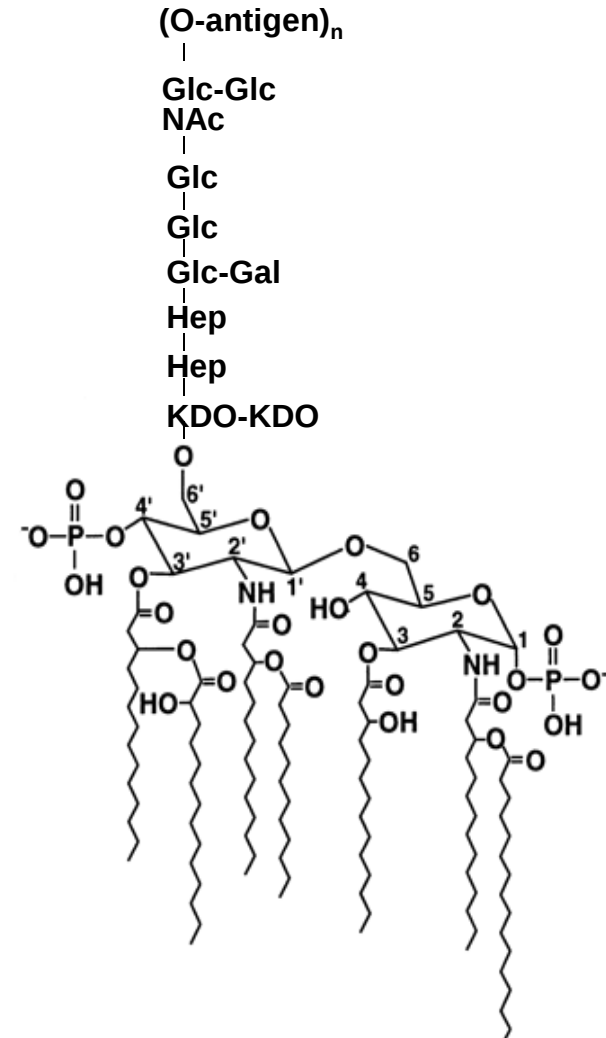
O12 antigen

| 1 -> 3

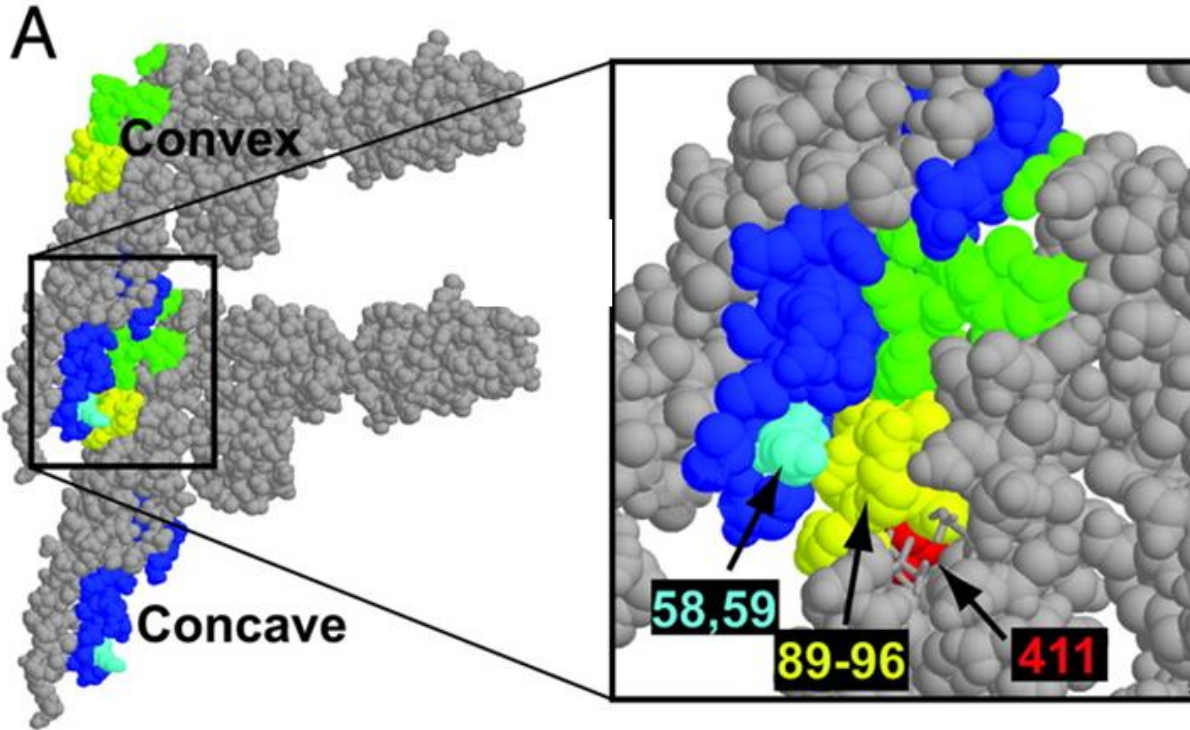
O12 antigen

A

D



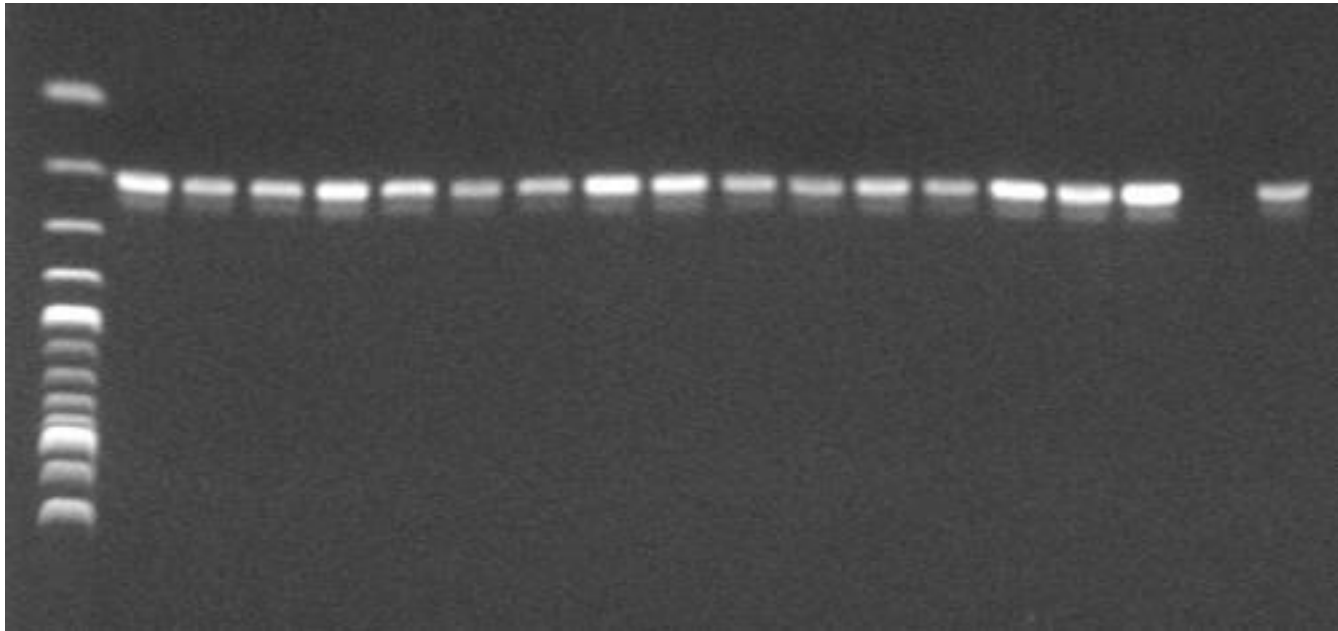
Serotypizace – H antigeny salmonel



```

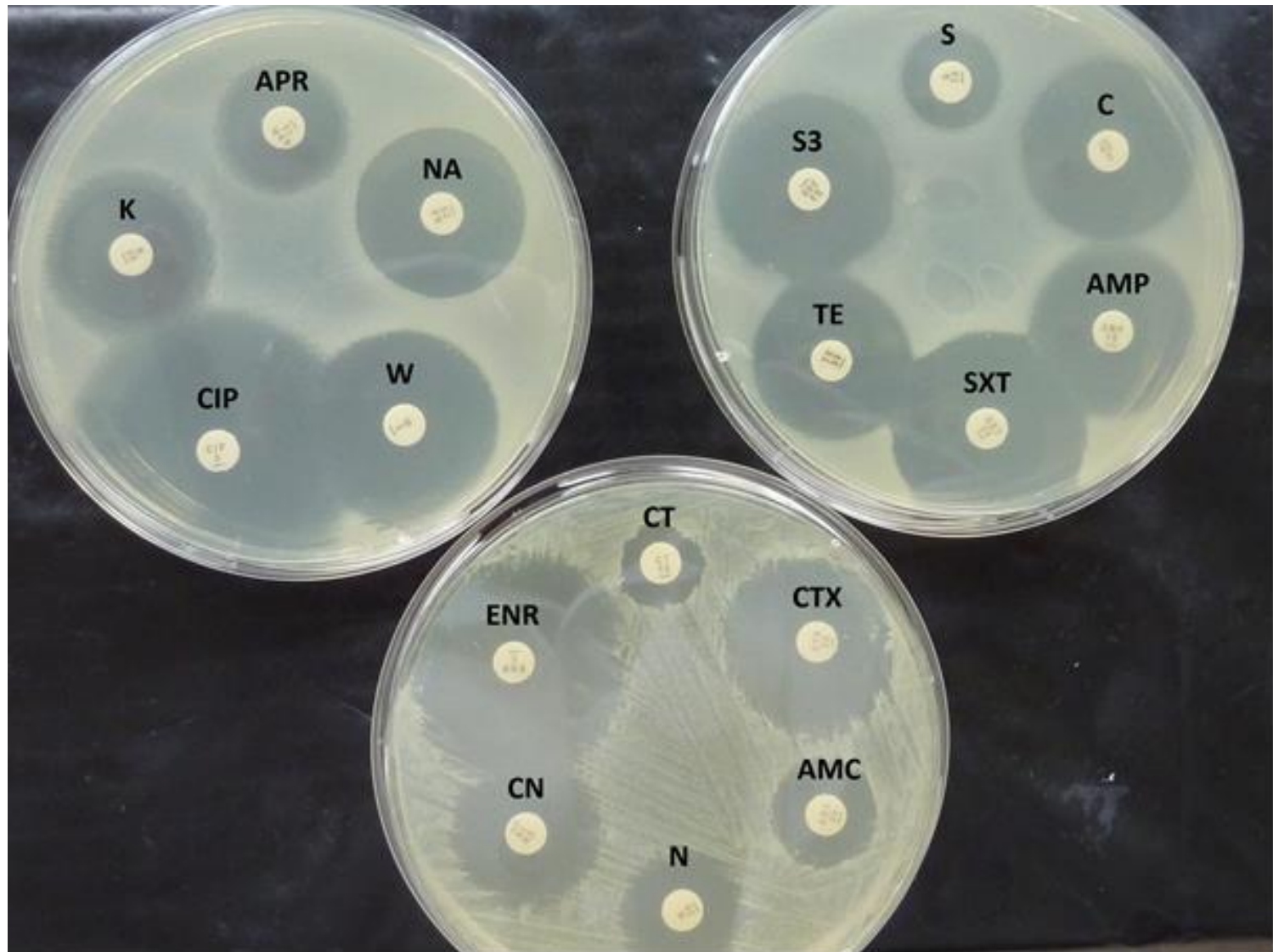
ALTVTNIIAS LNTQRLNAS SNDLNTSLER LTTGYRINSA KDDAAGLQIS
NRLSNQISGL NVATRNANDG ISLAQTAEGA LQQTNILOQ IRDLALQSAN 100
                        A A A
GSNSDADRAA LQKEVAAQQA ELTRISDTT FGGRKLLDGS FGTTSFQVGS
NAYETIDISL QNASASAIGS YQVGSNGAGT VASVAGTATA SGIASGTVNL 200
VGGGQVKINIA IAAGDSAKAI AEKMDGAIPN LSARARTVFT ADVSGVTGGS
LNFDVTVGSN TVSLAGVTST QDLADQLNSN SSKLGITASI NDKGVLTTIS 300
ATGENVKFGA QTGTATAGQV AVKVQGSDBG FEAAAKNVVA AGTAATTTIV
TGYVQLNSPT AYSVSGTGQ ASQVFANASA AQKSSVASVD ISTADGAQNA 400
A A
FAAETAALSK NQVLQQAQTA ILAQANQLPQ AVLSLLR
    
```

Konfirmace - PCR



cílové geny z ostrova patogenity SPI1 = velmi specifické pro rod *Salmonella*
hila, *invA*

Další typizace a charakterizace - rezistence k antibiotikům



Další typizace a charakterizace

Next Generation sekvenování

Dideoxysekvenování, sekvenování dle Sangera,
s využitím dideoxyterminátorů extenze řetězce

Next generation (NextGen) sekvenování, ale už je
na trhu od roku 2008 ...

Bakteriální genomy

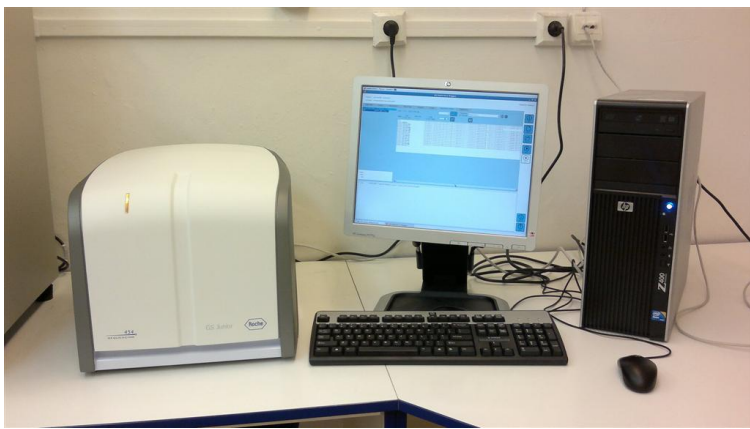
První sekvenovaný bakteriální genom

***Haemophilus influenzae* a *Mycoplasma genitalium*
v roce 1995**

***Escherichia coli* v roce 1997**

***Salmonella* Typhimurium v roce 2001**

Human genome, duben 2003



Roche
100,000 sequences, 400 bp

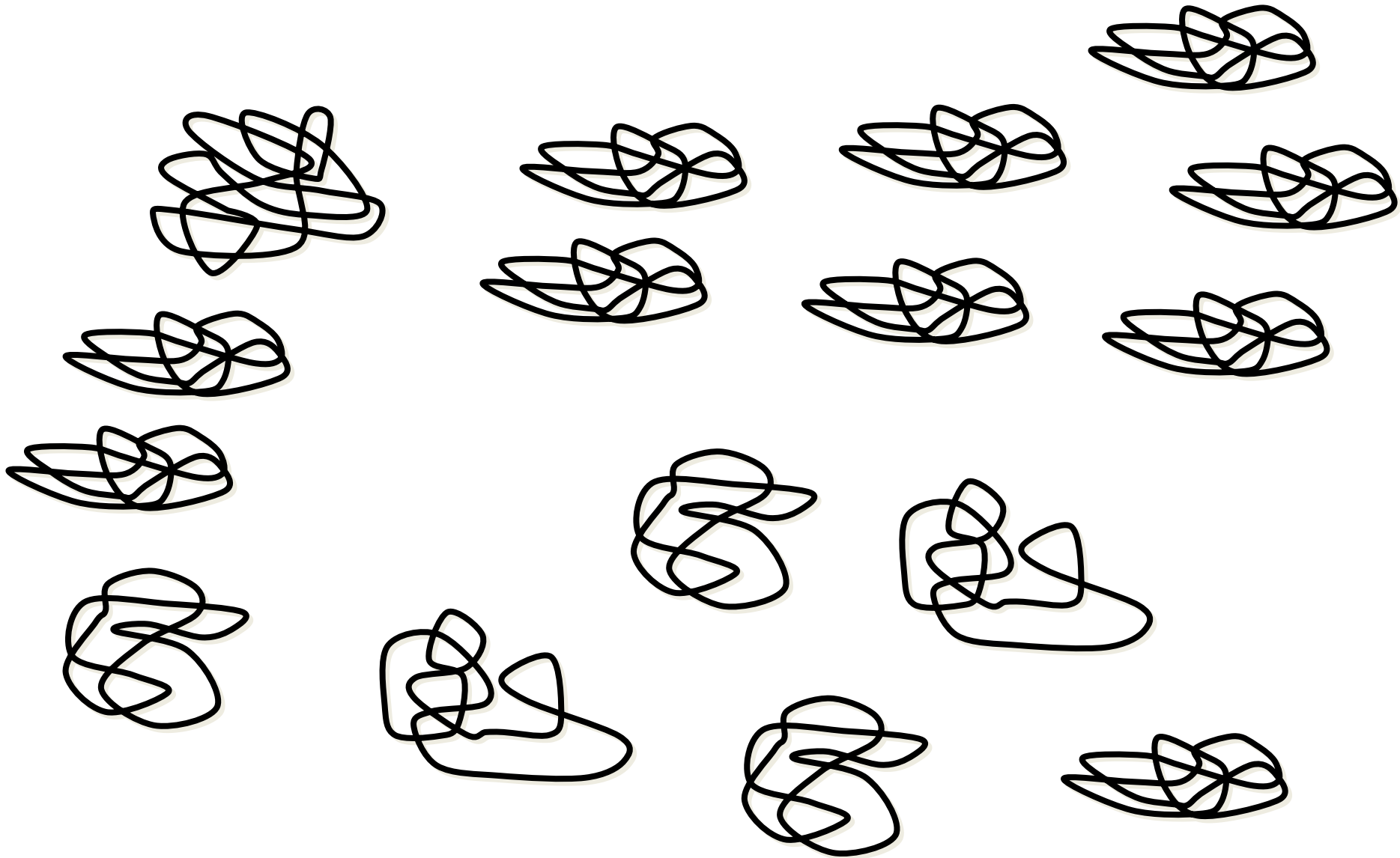


Illumina
10,000,000 sequences,
each 600 bp

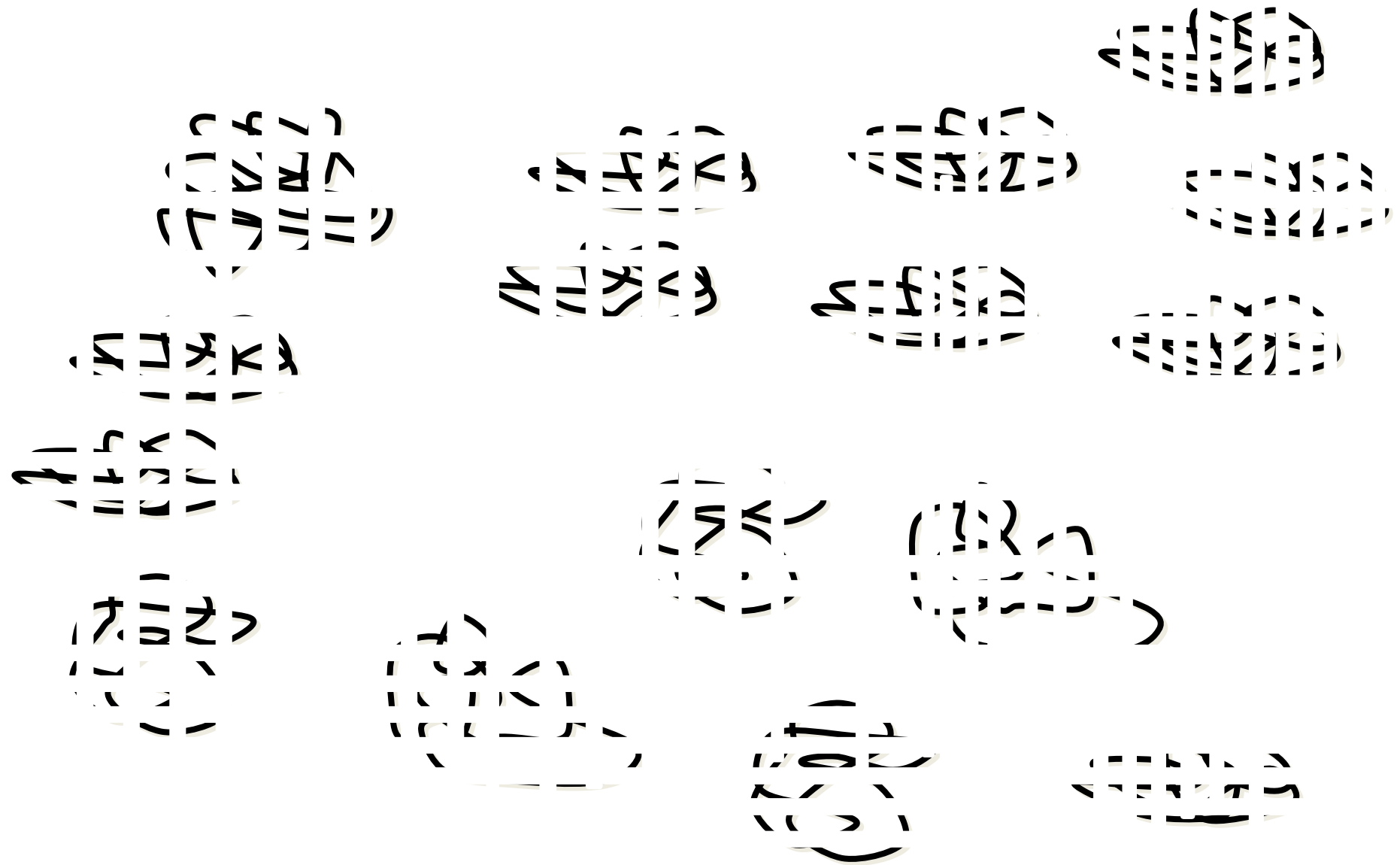
MinION
long sequences
upto 10,000 bp



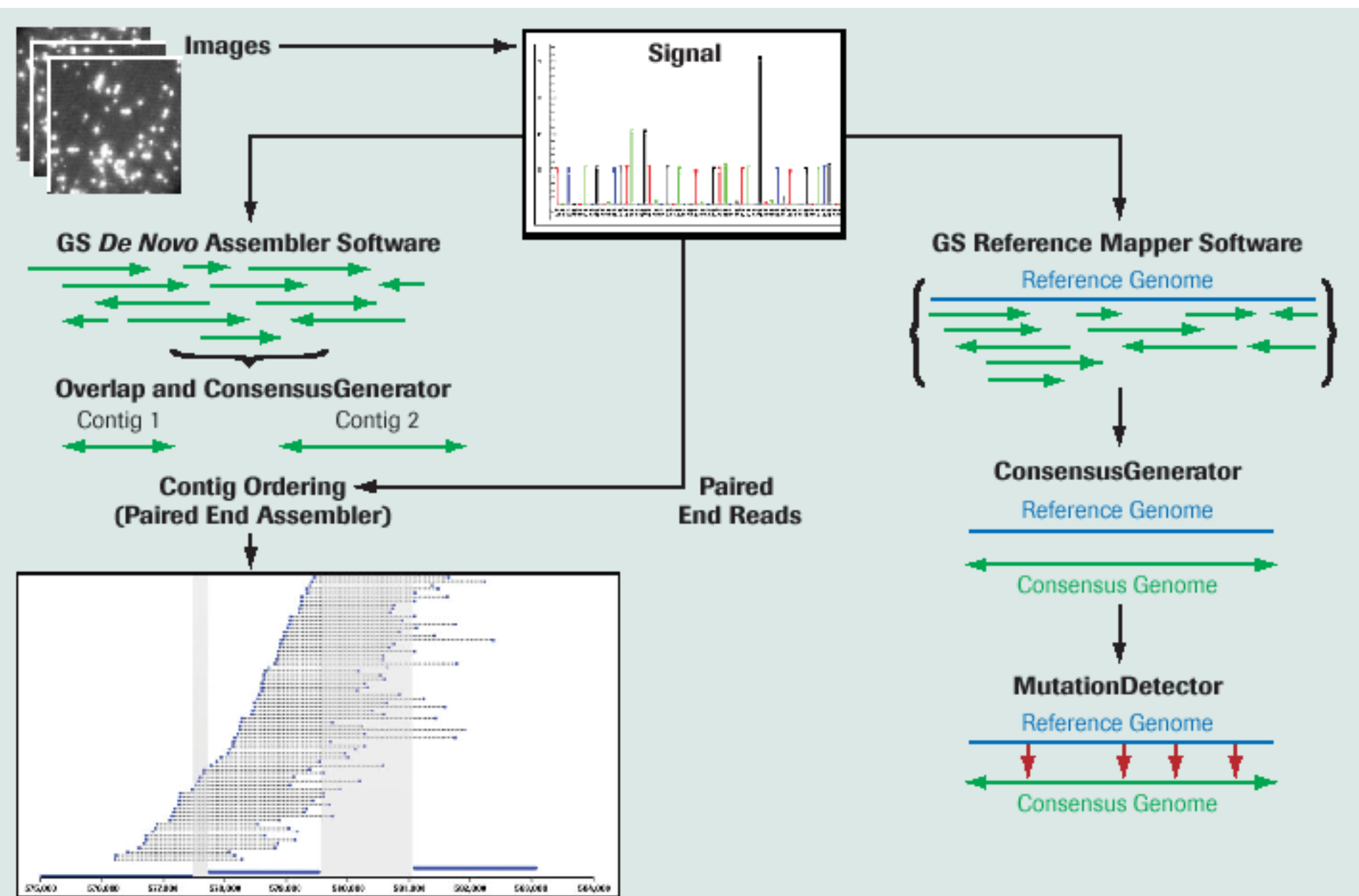
Sekvenování genomů

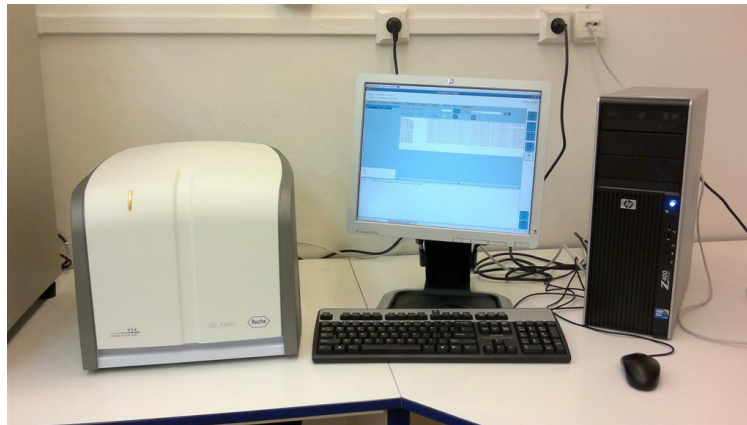


Sekvenování genomů



NextGen sequencing (Roche, Illumina)





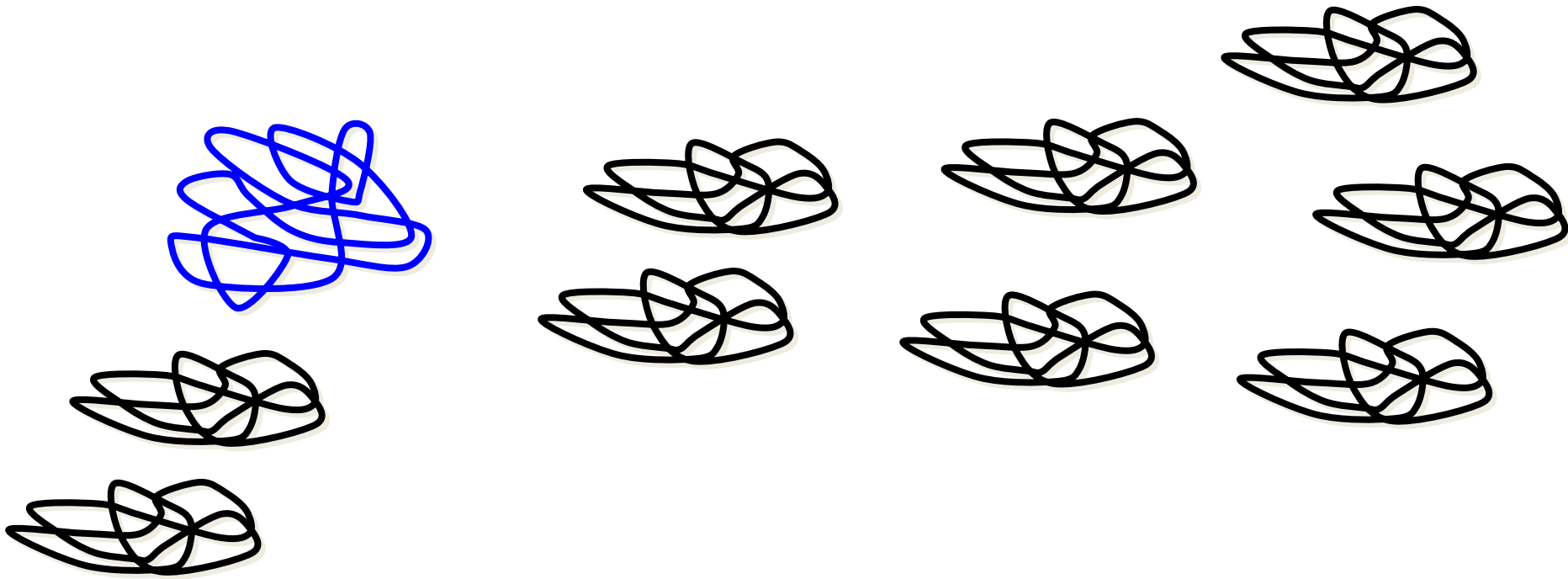
100 000 sekvencí, každá 400 bp

tedy $400 \times 100\,000$ bp genetické informace

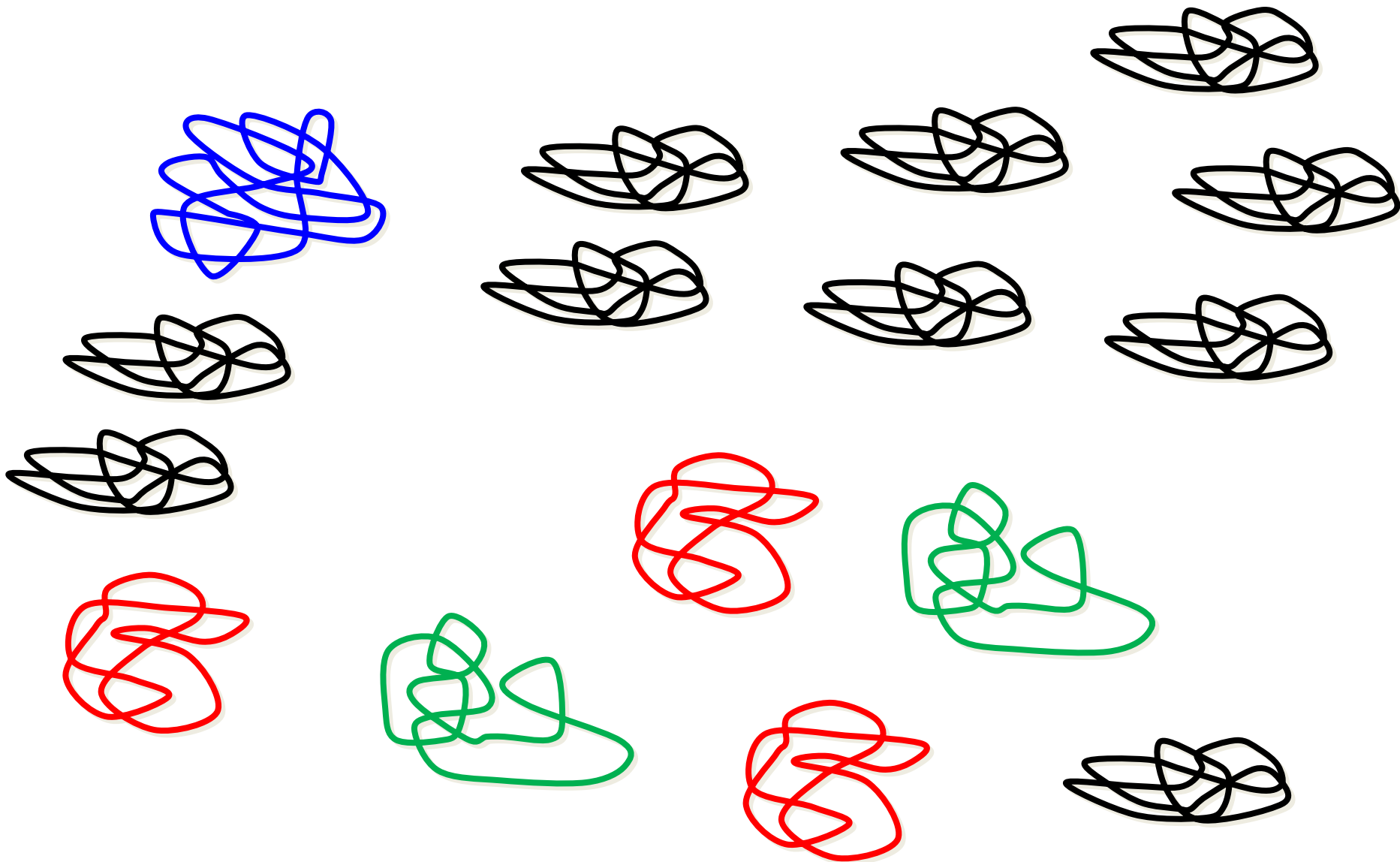
tedy 40 000 000 bp, tedy 40 Mbp genetické informace

Velikost genomu *E. coli*?

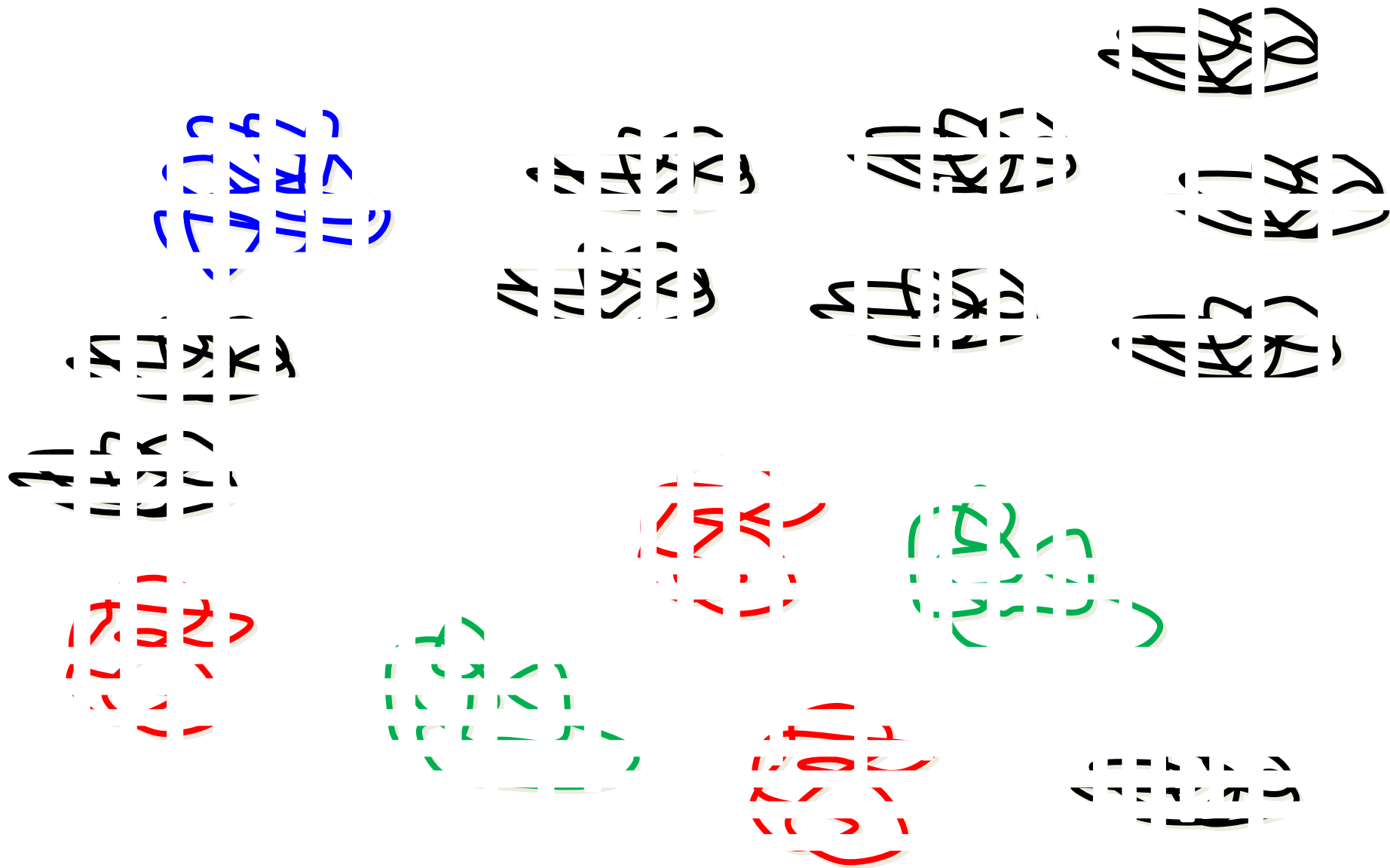
Sekvenování směsných vzorků



Sekvenování směsných vzorků

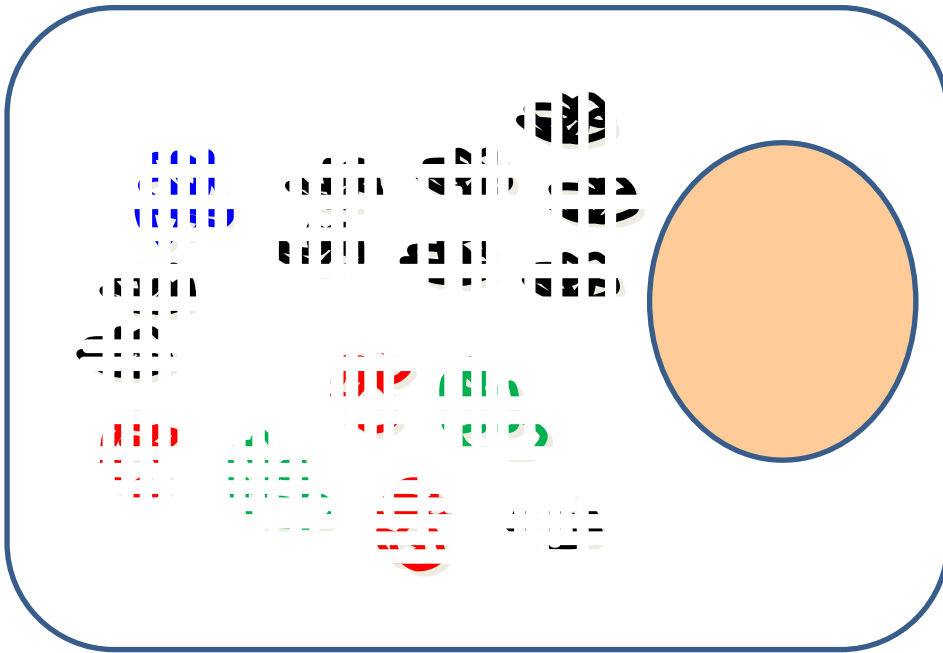


Sekvenování směsných vzorků



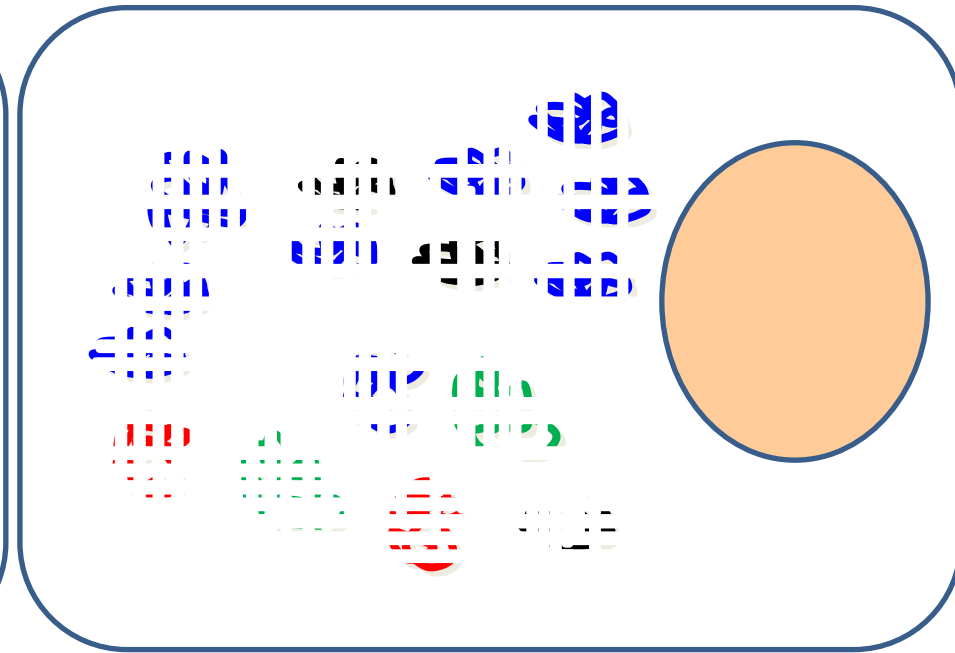
Sekvenování mRNA, exprese genetické informace

vzorek jaterní tkáně



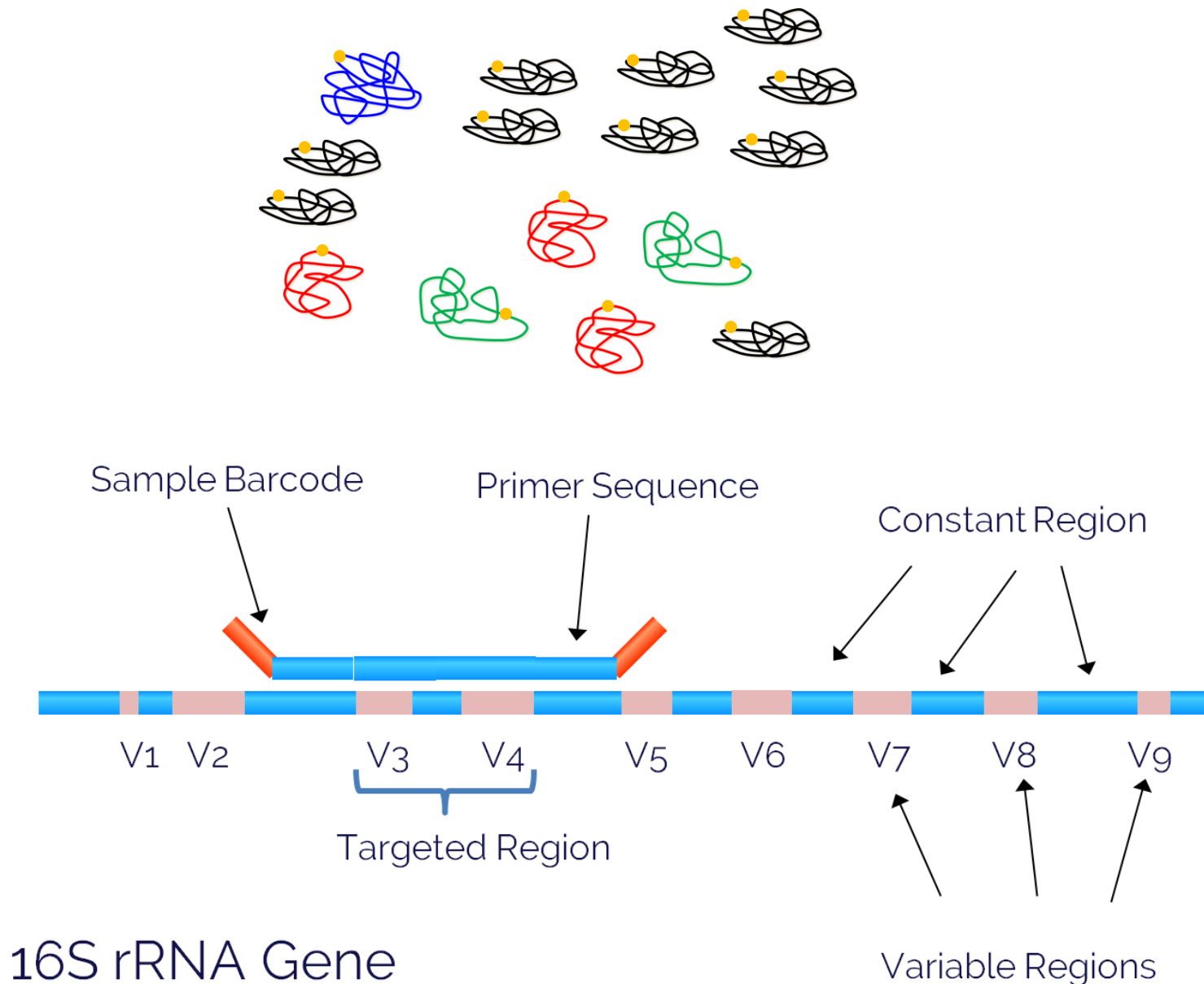
makrofág před kontaktem se
Salmonella Enteritidis

vzorek tkáně slepého střeva



makrofág 4 hodiny po kontaktu se
Salmonella Enteritidis

DNA sequencing – 16S rRNA gene



Využití NextGeneration sekvenování

Sekvenování genómů čistých kultur

Sekvenování směsných vzorků → **Exprese
sekvenování mRNA
(cDNA)**

→ **Sekvenování DNA**

**Sekvenování „total“ DNA
metagenom**

**Sekvenování
amplifikačních
produktů**

NextGen sekvenování DNA

Illumina MiSeq

10,000,000 sequences,

each 600 bp -> 6 Gbp of total sequence

Illumina NextSeq

400,000,000 sequences,

each 300 bp -> 120 Gb of total sequence

CCGCAGTATATCGA GTAGTCGTGGTA ACTCATGATATCTCA GTAGTCGTGGTA ATACGCTAGATTGA

Sekvenování genomů (bakteriálních chromozómů)

Illumina

10,000,000 sequences,
each 600 bp



MinION

long sequences
upto 10,000 bp



NextGen sekvenování DNA

Cena okolo 100 Euro za sekvenaci jednoho bakteriálního genomu

Mám sekvenci, ale co s ní?

Plasticita genomu - core genome vers accessory genom

Porovnáním genomů 61 různých izolátů *E. coli* se zjistilo, že

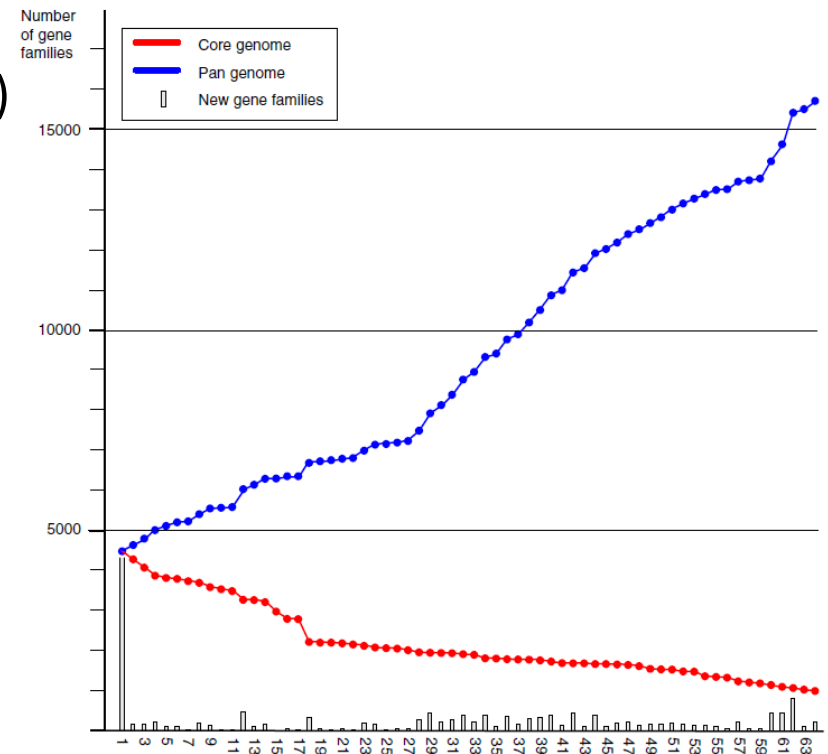
velikost se pohybuje od 4,56 Mbp až 5,7 Mbp

sdílí pouze 1472 stejných genů (core genom *E. coli*)

dohromady kódovaly 13 296 (pangenom *E. coli*)

accessory genom 11 824 genů

Oksana Lukjancenko, Trudy M. Wassenaar and David W. Ussery. Comparison of 61 Sequenced Escherichia coli Genomes. Microb Ecol 2010; 60: 708–720.



Mám sekvenci, ale co s ní?

Funkční anotace, RAST, PROKKA

Selekce genu pro 16 rRNA, BLAST porovnání s GenBank, (druhová) identita bakterie

Identifikace genů pro rezistence k antibiotikům

Identifikace faktorů virulence

Serotypizace (přes vyhledání genů, které se podílejí na sestavení O a H antigenů)

Klasifikace do sekvenčních typů (ST) nebo Multi Locus Sequence Typing (MLST u *E. coli* - *adk*, *fumC*, *icd*, *gyrB*, *mdh*, *purA*, *recA*)

Sekvenování „total“ DNA - metagenom

Sekvenování vzorků střevní mikroflóry, atypické ekologické niky - metabolic potential

viry u zvířat bez klinických příznaků
fágy ve střevním traktu
genom a mikroflóra mamuta

absence jakéhokoli zkreslení výsledků
náročné na zpracování

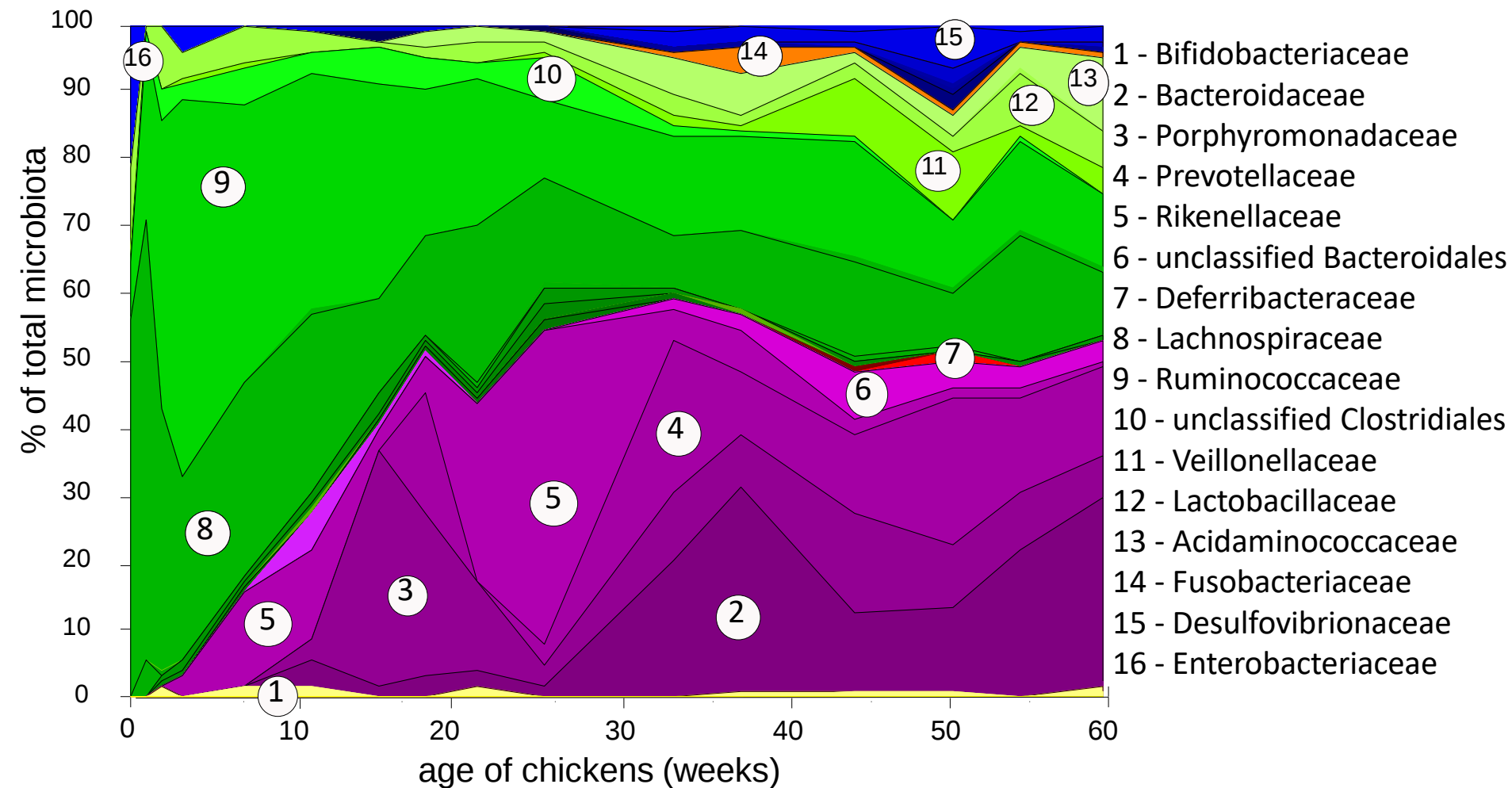
Sekvenování amplifikačních produktů

sekvenování genů kódující 16S rRNA

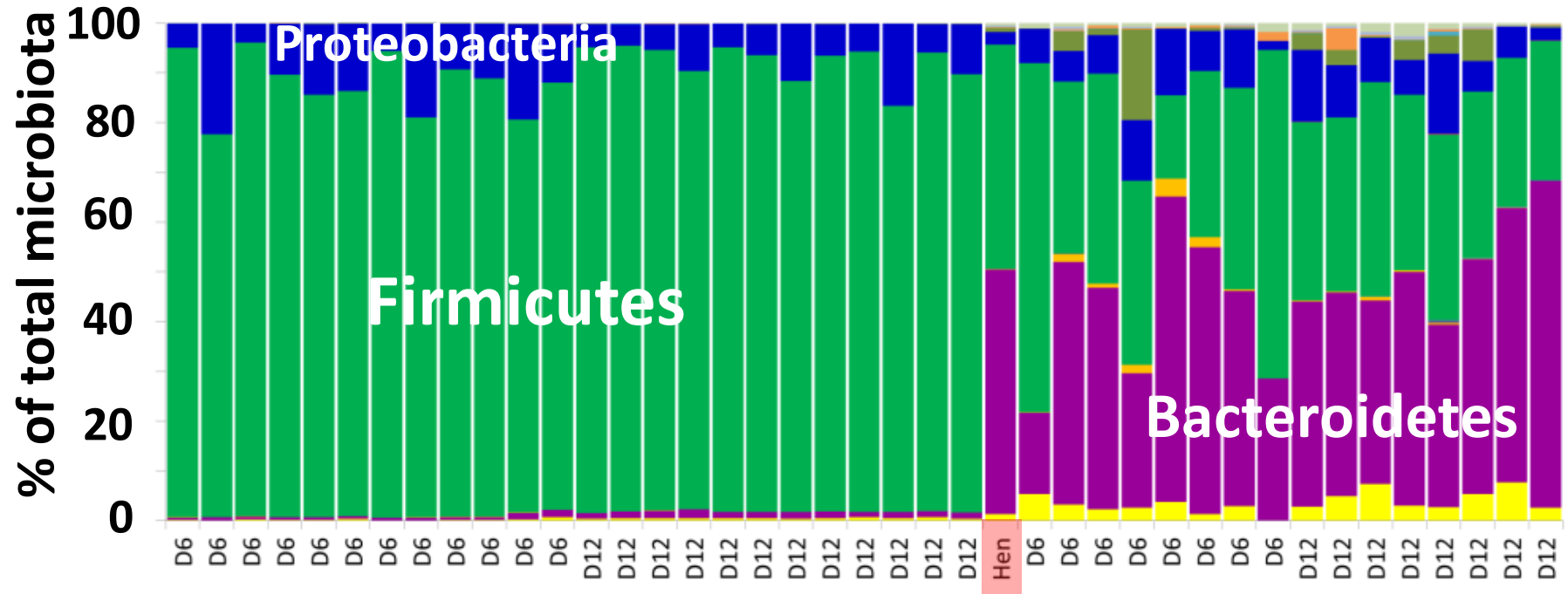
sekvenování variabilních částí imunoglobulinů

sekvenování genových kazet v integronech

Development of chicken caecal microbiota



Development of chicken caecal microbiota



Sequencing of variable regions of Ig transcripts

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130		
H87BXXZ01DL5	GCAGGCAGCGCTGACTCA	---GCCGTCC	TCGGTGT	CAGCGAA	CCCGGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGGTAGC	AGC	TA	CTATGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GG	
H87BXXZ01A6U	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCGGTGT	CAGCAAAA	CCCGGGAGAA	CCGTC	CAAGAT	CACC	TGCTCCGGGGGTAGTG		GCAGCTACTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GT	
H87BXXZ01CC0	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCAGTGT	CAGCGAA	CCCGGGG	AGAAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGGTGGTA		GCAGCAGCTACTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GT	
H87BXXZ01DNY	GCAGGCAGCAGTGA	CTCAGCCGGCCT	CGGTGT	CAGCAAAA	CCCGGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGAT	A	GGAGCTACTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GG	
H87BXXZ01BCY	GCAGGCAGCAGTGA	CTCAGCCGGCCT	CGGTGT	CAGCAAAA	CCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGATA		GGAGCTACTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GG	
H87BXXZ01CFZ	GCAGGCAGCAGTGA	CTCAGCAGCCGGCCT	CGGTGT	CAGCAAAA	CCCGGGAGAA	C	CGTCAAGAT	CACCTG	CTCTGGGGGCAGC	TA	TAG	CTATGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GG	
H87BXXZ01BQD	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCAGTGT	CAGCGA	ACCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGG	TTA	CAGTTACTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GG	
H87BXXZ01AOJ	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCAGTGT	CAGCGAA	CCCGGGG	AGAAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGGTAGTGGCAGCT		AT	GGCTGGTAT	CAGCAGAA	GT	
H87BXXZ01CSJ	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCAGTGT	CAGCGA	ACCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGATAGTG			GCAGCTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GG
H87BXXZ01CY6	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCGGTGT	CAGCAAAA	CCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGGT	AGTG		GCAGCTACTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GT
H87BXXZ01B5I	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCGGTGT	CAGCGA	ACCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGG		T	AGCAACA	ACTATGGCTGGT	TATCAGCAGAA	GT
H87BXXZ01B7H	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCGGTGT	CAGCGA	ACCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGAGTA		GT	GGCAGCTACTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GG
H87BXXZ01CHJ	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCAGTGT	CAGCAA	ACCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGATAG	G		AGCTACTAT	TGGCTGGT	TATCAGCAGAA	GG
H87BXXZ01B49	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCGGTGT	CAGCGA	ACCCGGGAG	GAAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGGTAG	T		GGCAGCTAC	GGCTGGT	TCCAGCAGAA	GT
H87BXXZ01B4G	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCGGTGT	CAGCGAA	ACCCGGGGAGAA	CCGTC	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGGTGG		CAGCTATGCTGGAAGTTACTATTTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GC	
H87BXXZ01CZV	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCAGTGT	CAGCGA	ACCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGCTAG	C		TATAGCTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GT
H87BXXZ01A7C	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCAGTGT	CAGCGAA	CCCGGGG	AGAAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGATAGCAGTGGCTGT			GGTTAT	GGCTGGT	TCCAGCAGAA	GT
H87BXXZ01BJ4	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCGGTGT	CAGCAAAA	CCCTGGGAG	GAAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGGTGGCAGCA			GCTATGGTTACAGCTGGT	TACCAGCAGAA	GT	
H87BXXZ01BKB	GCAGGCAGCAGTGA	CTCAGCCGGCCT	CGGTGT	CAGCAAAA	CCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGATA			GGAGCTACTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GG
H87BXXZ01ACV	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCGGTGT	CAGCAAAA	CCCTGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGATAGT	GG		CAGCTAC	GGCTGGT	TCCAGCAGAA	GT
H87BXXZ01BMS	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCAGTGT	CAGCGA	ACCCG	GGAGAA	CCGTC	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGGT	AGTG	GCAGGTAC	GGCTGGT	TCCAGCAGAA	GT
H87BXXZ01CVI	GCAGGCAGCAGTGA	CTCAGCCGGCCT	CGGTGT	CAGCAAAA	CCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGATA			GGAGCTACTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GG
H87BXXZ01AH3	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCAGTGT	CAGCGA	ACCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGATAGC			AGCTACTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GG
H87BXXZ01BLV	GCAGGCAGCAGTGA	CTCAGCCGGCCT	CGGTGT	CAGCAAAA	CCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGATA			GGAGCTACTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GG
H87BXXZ01DQ2	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCAGTGT	CAGCGA	ACCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGATA			GGAGCTACTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GG
H87BXXZ01B8Y	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCGGTGT	CAGCAAAA	CCCTGGGAG	GAAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCTGGGGGTGGT	A		GCTGGTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GG
H87BXXZ01CR4	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCAGTGT	CAGCGAA	CCCGGGG	AGAAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGGTGGTAGTGGCTGT			GGTTAT	GGCTGGT	TACCAGCAGAA	GT
H87BXXZ01AI1	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCGGTGT	CAGCGA	ACCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGATAGTG			GCAGCTAT	TGGCTGGT	TATCAGCAGAA	GT
H87BXXZ01AGA	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCAGTGT	CAGCGA	ACCCGGGAG	AAACCGT	CAAGAT	CACCTG	CTCCG	GGGATAG		GAGCTACTAT	TGGCTGGT	TATCAGCAGAA	GG
H87BXXZ01BLZ	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCGGTGT	CAGCAA	ACCCGGGGAGAA	CCGTC	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGGTGG			CAGCTATGCTGGAAGTTACTATTTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GC
H87BXXZ01AJU	GCAGGCAGCGCTGACTCAG	CCGTCC	TCGGTGT	CAGCAA	ACCCAGGAGAA	CCGTC	CAAGAT	CACCTG	CTCCGGGGGTGG			CAGCTATGCTGGAAGTTACTATTTAT	TGGCTGGT	TACCAGCAGAA	GC

Struktura integronu

5'CS - *int I* + *att I*

centrální variabilní region

3'CS - *sul1*

