



АКАДЕМИЯ
ПОСТДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБУ ФНКЦ ФМБА РОССИИ

Кафедра клинической лабораторной
диагностики и патологической анатомии с
курсом лабораторной микробиологии

Генетика микроорганизмов

*Миронов Андрей Юрьевич, профессор, д.м.н.,
доцент*

Версия 2024г.,
г.Москва

Микробы и генетика

Генетика изучает два важнейшие свойства живых существ - наследственность и изменчивость.

- Наследственность - свойство живых существ сохранять и передавать в неизменном виде свои свойства на протяжении ряда поколений от родителей потомству.
- Изменчивость - свойство живых существ изменять свои свойства, приспособляясь к изменяющимся условиям окружающей среды.

Наследственность и изменчивость - «две стороны одной медали», преследующие одну главную цель - сохранение биологического вида.

Молекулярная генетика - генетика бактерий и бактериофагов:

Бактерии - оптимальная модель для генетических исследований

- простота генома, гаплоидность (**исключает доминантность**);
- наличие обособленных и интегрированных фрагментов ДНК;
- лёгкость культивирования, быстрота накопления биомасс.

Особенности передачи генетической информации у бактерий:

- вертикальная передача в результате вегетативной репликации ДНК и деления бактериальной клетки;
- горизонтальная передача в результате **конъюгации, трансдукции, трансформации.**

Бактерии - оптимальная модель для генетических исследований

1. простота строения генома, позволяющая выявлять мутанты с частотой 10^{-9} и ниже;
2. гаплоидность, исключая явление доминантности;
3. дифференциация клеток на доноры и реципиенты;
4. наличие обособленных и интегрированных фрагментов ДНК (плазмид, транспозонов, вставочных последовательностей, профагов и т. д.), которые изменяют свойства микроорганизмов;
5. лёгкость и простота культивирования (на простых, дешёвых и доступных питательных средах);
6. возможность получения в течение короткого промежутка времени популяций, содержащих миллиарды микробных тел;
7. генетические эксперименты не занимают много места;
8. генетические эксперименты не занимают много времени.

Генетика бактерий изучает:

- строение и организация генома бактериальной клетки,
- изменчивость и мутагенез,
- формы переноса генетического материала,
- генетический анализ,
- генетический контроль жизненно важных процессов (репликация, рекомбинация, репарация, транскрипция, трансляция),
- регуляция действия генов,
- молекулярно-генетические методы диагностики инфекционных и соматических болезней,
- генетические основы селекции,
- основы генетической инженерии.

Генетический аппарат бактерий. Генетический контроль факторов патогенности

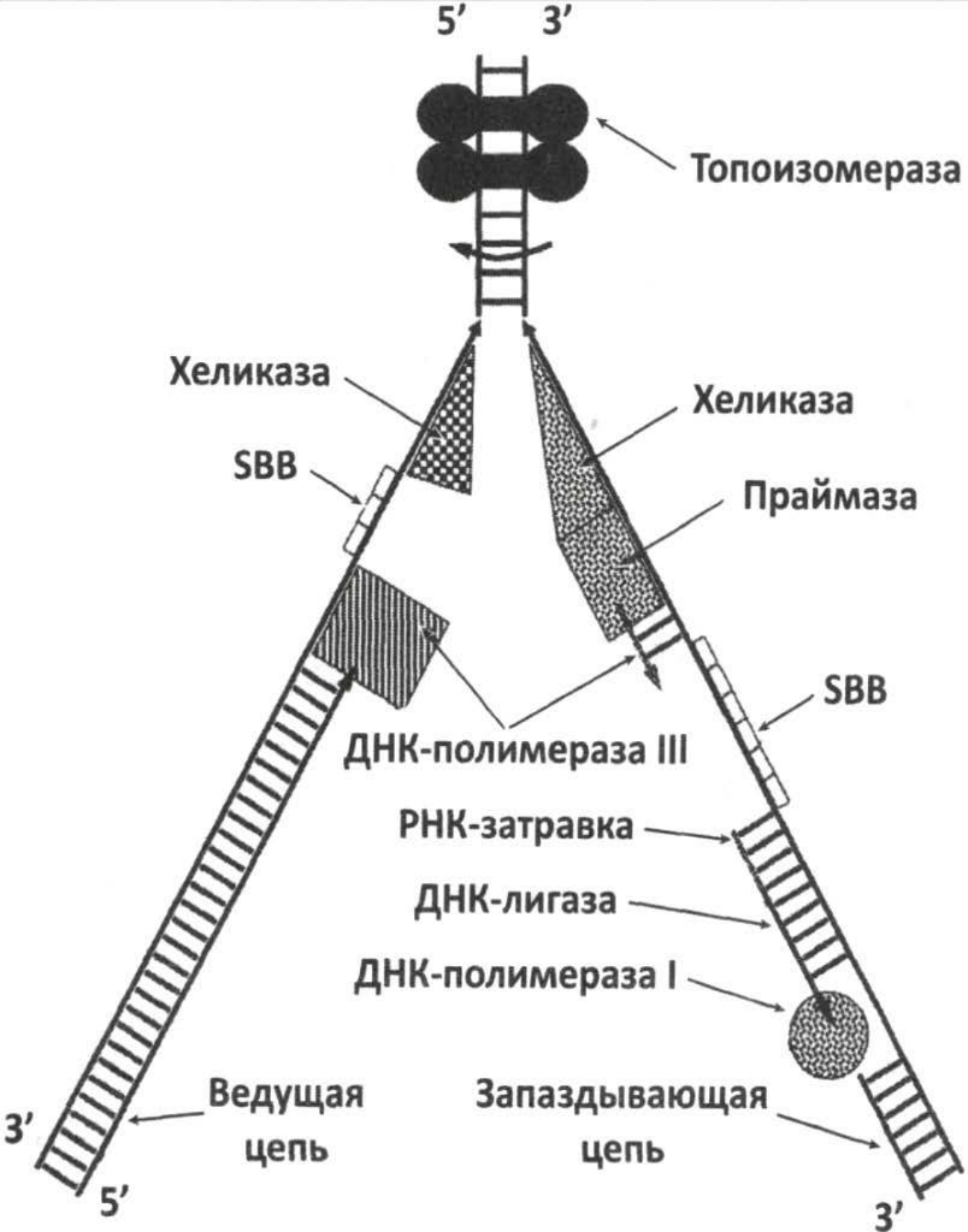
Генетический материал бактерий представлен ДНК, которая входит в состав **нуклеоида** (**хромосомная ДНК**) и **внехромосомными генетическими элементами** (**плазмиды, мобильные генетические элементы - транспозоны, вставочные или IS-элементы (insertion sequence), острова патогенности**).

У бактерий одна замкнутая кольцевидной формы хромосома, которая может содержать до нескольких тысяч отдельных генов. Вегетативная репликация хромосомной и плазмидной ДНК обуславливает передачу генетической информации по вертикали - от родительской клетки к дочерней. Передача генетической информации по горизонтали (**генетические рекомбинации**) осуществляется различными механизмами - в результате **конъюгации** (**при непосредственном контакте клеток, при участии *tra*-оперона, конъюгативных F-плазмид**), **трансдукции** (**при переносе генетической информации бактериофагами**), **трансформации** (**при захвате и поглощении фрагментов чужой ДНК и образовании на этой основе рекомбинанта**) и др.

Функция ДНК

- аутокаталитическая (способность к репликации)
- гетерокаталитическая (управление экспрессией генов)

Схема полуконсервативной репликации ДНК у прокариот



Плазмиды бактерий

Плазмиды — внехромосомные дополнительные факторы наследственности бактерий, представляющие кольцевые, реже линейные молекулы ДНК, способные к автономному существованию и автономной репликации, придающие бактериям дополнительные, как правило, полезные для них свойства.

Плазмиды

Плазмиды - внехромосомный генетический материал, более просто устроенные по сравнению с вирусами организмы, наделяющие бактерии дополнительными полезными свойствами. По молекулярной массе плазмиды значительно меньше хромосомной ДНК, содержат от 40 до 50 генов.

Их объединение в одно царство жизни с вирусами связано с наличием ряда общих свойств - отсутствием собственных систем мобилизации энергии и синтеза белка, саморепликацией генома, абсолютным внутриклеточным паразитизмом.

Их выделение в отдельный класс определяется существенными отличиями от вирусов.

1. Среда их обитания - только бактерии (среди вирусов, кроме вирусов бактерий - бактериофагов имеются вирусы растений и животных).
2. Плазмиды сосуществуют с бактериями, наделяя их дополнительными полезными свойствами. У вирусов эти свойства могут быть только у умеренных фагов при лизогении бактерий, чаще же всего вирусы вызывают отрицательные последствия, лизис клеток.
3. Геном представлен двунитевой ДНК.
4. Плазмиды представляют собой «голые» геномы, не имеющие никакой оболочки, их репликация не требует синтеза структурных белков и процессов самосборки.

Плазмиды могут распространяться по вертикали (при клеточном делении) и по горизонтали, прежде всего путём конъюгационного переноса. В зависимости от наличия или отсутствия механизма самопереноса (его контролируют гены *tra*-оперона) выделяют конъюгативные и неконъюгативные плазмиды. Плазмиды могут встраиваться в хромосому бактерий - интегративные плазмиды или находиться в виде отдельной структуры - автономные плазмиды (эписомы).

Классификация плазмид

Функциональная классификация плазмид основана на свойствах, которыми они наделяют бактерии. Среди них - способность продуцировать экзотоксины и ферменты, устойчивость к лекарственным препаратам, синтез бактериоцинов.

Типы плазмид:

1. F-плазмиды - донорские функции, индуцируют деление (от fertility - **плодовитость**). Интегрированные F-плазмиды - Hfr - плазмиды (**высокой частоты рекомбинаций**).
2. R-плазмиды (**resistance**) - устойчивость к лекарственным препаратам.
3. Col-плазмиды - синтез колицинов (**бактериоцинов**) - факторов конкуренции близкородственных бактерий (**антагонизм**). На этом свойстве основано колицинотипирование штаммов.
4. Hly-плазмиды - синтез гемолизина.
5. Ent-плазмиды - синтез энтеротоксинов.
6. Tox-плазмиды - токсинообразование.

Биологическая роль плазмид

Биологическая роль плазмид многообразна, в том числе:

- контроль генетического обмена бактерий;
- контроль синтеза факторов патогенности;
- совершенствование защиты бактерий.

Бактерии для плазмид - среда обитания, плазмиды для них - переносимые между ними дополнительные геномы с наборами генов, благоприятствующих сохранению бактерий в природе.

Подвижные генетические элементы

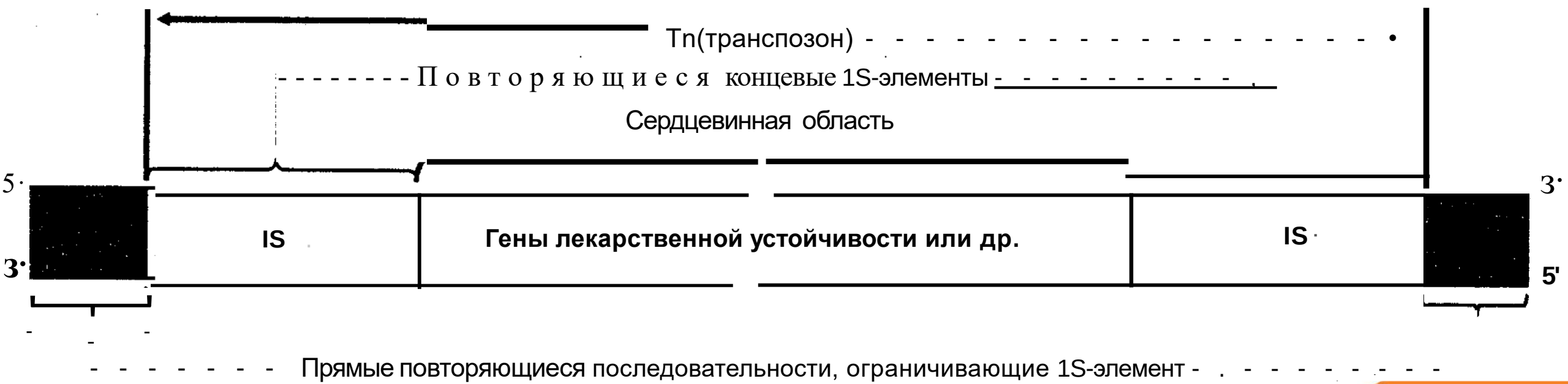
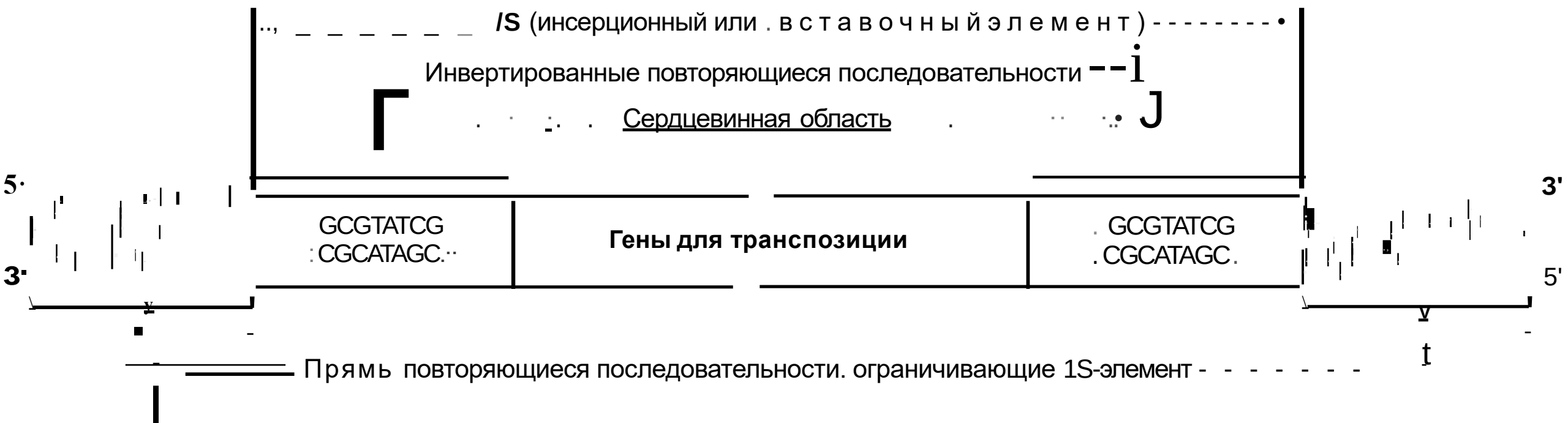
В бактериальный геном (бактериальная хромосома, плазмиды) входят подвижные генетические элементы - последовательности ДНК, имеющие специфическую структуру и автономно перемещающиеся по геному. Гены, кодирующие перемещение, локализованы в самих подвижных генетических элементах. К ним относятся:

- вставочные последовательности - *IS*-элементы (*Insertion Sequences*);
- транспозоны - Tn;
- конъюгативные транспозоны - CTn;
- интегроны - In;
- острова патогенности (ОП).

Мигрирующие генетические элементы

Мигрирующие генетические элементы - отдельные участки ДНК, способные определять свой перенос между хромосомами или хромосомой и плазмидой с помощью фермента рекомбинации транспозазы. Простейшим их типом являются **инсерционные последовательности (IS-элементы) или вставочные элементы**, несущие только один ген транспозазы, с помощью которой IS-элементы могут встраиваться в различные участки хромосомы. Их функции - координация взаимодействия плазмид, умеренных фагов, транспозонов и генофора для обеспечения репродукции, регуляция активности генов, индукция мутаций. Величина IS-элементов не превышает 1500 пар оснований.

Транспозоны (Tn) включают до 25 тысяч пар нуклеотидов, содержат фрагмент ДНК, несущий специфические гены, и два IS-элемента. Каждый транспозон содержит гены, приносящие важные для бактерии характеристики, как и плазмиды (**множественная устойчивость к антибиотикам, токсинообразование и т. д.**). Транспозоны - самоинтегрирующиеся фрагменты ДНК, могут встраиваться и перемещаться среди хромосом, плазмид, умеренных фагов, т. е. обладают потенциальной способностью распространяться среди различных видов бактерий.



Вставочные последовательности

От (англ. *Insertion* - вставка, *sequence* последовательность) представляют транспонируемые элементы - «вставки последовательностей оснований». Это фрагменты ДНК длиной 1000 пар нуклеотидов и более.

В IS-последовательностях содержится информация, необходимая только для их транспозиции, т. е. перемещения в различные участки ДНК.

Вследствие перемещений IS-последовательности могут выполнять ряд функций:

- 1. Координация** взаимодействия транспозонов, плазмид, умеренных фагов как между собой, так и с хромосомой бактериальной клетки и обеспечение их рекомбинации.
- 2. Включение и выключение:** инактивация гена, в которой произошла интеграция IS-последовательности («**выключение**» гена), либо, будучи встроенными в определённом положении в бактериальную хромосому, служить промотором (участками ДНК, регулирующих экспрессию подлежащих структурных генов бактерий реципиентов), который включает или выключает транскрипцию соответствующих генов, выполняя регуляторную функцию.

Конъюгативные транспозоны

Конъюгативные транспозоны (Ctn) - подвижные генетические элементы, встроенные в хромосому и плазмиды бактерий, способные к эксцизии, циркуляции, передаче в другое место того же репликона, в другой репликон либо в другую клетку за счёт собственной генетической системы (*tra-оперонов*), контролирующей способность бактерий к конъюгации. Сочетают свойства разных генетических элементов - транспозонов, плазмид, умеренных бактериофагов. Подобно Tn они встраиваются в разные репликоны бактерии, исключаются из них и переносятся в новое место того же репликона или в новый репликон в той же либо другой бактериальной клетке; несут гены резистентности к антибиотикам и любые другие гены. Напоминают плазмиды тем, что имеют собственные *tra*-опероны, то есть могут обеспечивать конъюгацию бактерий и собственный перенос или перенос различных репликонов в клетку-реципиент; имеют широкий круг хозяев. С умеренными бактериофагами сближает механизмы встраивания в ДНК-мишень и исключения из неё, контролируемые интегразой (*int*) и белком эксцизии (*xis*), аналогичным ферментам бактериофага.

Интегроны

Интегроны (от *англ. intervening regions; intron*) - подвижные генетические элементы, рекомбинация в пределах которых осуществляется интегразами лямбдоидного типа.

Встречаются у грамотрицательных бактерий в разных участках клеточных репликонов и даже в транспозонах. На этом основании они классифицируются как подвижные генетические элементы, хотя механизм их перемещения до сих пор не ясен. Имеется предположение, что они перемещаются по геному в составе транспозонов и плазмид.

«Острова» патогенности бактерий

Острова патогенности - фрагменты ДНК, включающие дискретные гены патогенности и обнаруживаемые только у патогенных микроорганизмов. Указанные фрагменты ДНК отличаются от основного (core) генома по % Г+Ц, фланкированы малыми прямыми нуклеотидными повторами (DR), способны распространяться среди одного или родственных видов бактерий путём естественной **конъюгации, трансдукцией, трансформацией**. Мобильность островов патогенности (**размеры от 10 до 200 kb - килобайт**) связана с тем, что они могут входить в состав ДНК бактериофагов, транспозонов, плазмид (**несут гены профаговых интеграз, транспозаз или IS-элементов**) и интегрированы в районах хромосомы вблизи генов (**3' областей локусов**), кодирующих специфические тРНК, что обеспечивает возможность горизонтального переноса генетической информации. Стабильность островов патогенности различна, поскольку гены патогенности могут быть включены в состав бактериофага, транспозона, плазмиды. Интеграция, стабилизация и экспрессия генов патогенности в составе островов патогенности определяет их основные функции - **патогенность, метаболизм, лекарственную устойчивость, секреторные функции** и др. Известны острова патогенности, несущие гены, контролирующие синтез адгезинов, инвазинов, токсинов (**гемолизинов, цитотоксинов, энтеротоксинов, некротизирующего фактора и др.**), усвоение ионов железа, синтез и транспорт эффекторных молекул из бактериальных клеток.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

Короткие палиндромные повторы регулярно расположенные группами, разделённые спейсерами, система, располагающаяся в нуклеоиде, иногда в плаزمиде бактерий, содержащая информацию о геномах бактериофагов, с которыми встречалась бактерия, блокирующая репликацию бактериофага, обеспечивающая формирование у бактерии приобретённого иммунитета. Состоит из спейсеров, повторов, лидерной последовательности, задающей направление транскрипции CRISPR-кассеты. Начало и конец повтора обратно комплементарны. Повторы разделены спейсерами, которые совпадают по нуклеотидной последовательности с протоспейсерами бактериофагов или плазмид и совместно с ассоциированными генами (**Cas-гены**) защищают бактерии от бактериофагов и плазмид. В результате процессинга CRISPR-локуса при участии Cas-белков, нарезающих первичный РНК-предшественник, образуется короткая РНК, гибридизирующаяся с протоспейсером, введённым бактериофагом в бактериальную клетку, что препятствует его размножению. CRISPR-гены участвуют в иммунитете против ДНК бактериофагов и плазмид, в репликации и сегрегации репликонов при делении бактерий, в рекомбинации между повторами, в репарации ДНК.

Спейсеры и протоспейсеры

Спейсер - переменный участок ДНК бактерии, совпадающий по нуклеотидной последовательности с протоспейсером бактериофагов или плазмид и совместно с ассоциированными генами (Cas-гены) защищающий бактерии от бактериофагов и плазмид; в результате процессинга CRISPR-локуса при участии Cas-белков, нарезающих первичный РНК-предшественник, образуется короткая РНК, гибридизирующаяся с протоспейсером, введённым бактериофагом в бактериальную клетку, что препятствует его размножению.

Протоспейсер - участок чужеродной ДНК бактериофагов или плазмид, совпадающий по нуклеотидной последовательности со спейсером бактерии.

Значение CRISPR/Cas-системы

- Точный «молекулярный скальпель»
- Способна вырезать любую последовательность нуклеотидов из ДНК
- Тонкое редактирование генома бактерий и даже эукариот

Направления использования CRISPR/Cas-системы

- генотерапия наследственных болезней – мультиплексное редактирование нескольких «неправильных» генов;
- создание производственных штаммов бактерий устойчивых к различным бактериофагам;
- инактивация эндогенных ретровирусов в организме;
- индикация патогенов (вирус Зика и др.);
- создание бактериофагов избирательно лизирующих антибиотикорезистентные бактерии.

Понятие о генотипе и фенотипе. Генотипическая и фенотипическая изменчивость

Генотип и фенотип

Генотип – совокупность имеющихся у организма генов.

Фенотип – совокупность реализованных (**внешних**) генетически детерминированных признаков, т. е. индивидуальное (**в определённых условиях**) проявление генотипа.

Изменчивость в мире микробов

Геном микроорганизмов способен как приобретать, так и терять генетическую информацию. Изменения генотипа микроорганизмов ведут и к изменениям их фенотипа. В большинстве случаев происходят фенотипические изменения микроорганизмов без изменения их генома.

Генотипическая и фенотипическая изменчивость

Виды изменчивости у бактерий – фенотипическая (модификации) и генотипическая (мутации, рекомбинации).

Модификации – временные, адаптивные, наследственно не закрепленные изменения:

- морфологические
- биохимические

Диссоциации - стандартные проявления модификации в разделении однородной популяции на два или более типа. S-колонии (гладкие) → R-колонии (шероховатые) - признак неблагоприятных условий ($S \rightarrow R$ диссоциация).

Формы изменчивости у бактерий

Изменчивость

Фенотипическая

Во время действия фактора

Сохраняется после действия фактора

Лабильные (кратковременные) модификации

Стабильные модификации (сохраняются во многих поколениях)

Спонтанные

Индукированные

Генотипическая

Мутации

Рекомбинации

Трансформация

Трансдукция

Конъюгация

Генотипическая изменчивость бактерий: мутации и генетические рекомбинации

1. **Мутации** - скачкообразные изменения, наследственно закреплённые изменения первичной структуры, ошибки копирования:

- **хромосомные** - новые признаки, более двух хромосом
- **генные** - один ген (**вставка, делеция, модификация оснований**)
 - ✓ Спонтанные – «дикие»
 - ✓ Индуцированные

Химические мутагены повышают частоту до 1 клетка/ 10^3

Физические мутагены – R-, УФ-, рентгеновское излучения

2. Рекомбинации – передача генетического материала по горизонтали между отдельными бактериями – **трансформация, трансдукция, конъюгация.**

Репарации

Бактерии обладают специальными системами, восстанавливающими повреждения генетического материала, процесс восстановления клеточного генома (ДНК) - репарации. Это обуславливает относительную стабильность их ДНК. Репарация ДНК осуществляется ферментами, которые контролируются специальными генами. Функции репаративных ферментов заключаются в установлении места повреждения ДНК, его «вырезании», синтезе повреждённых фрагментов на матрице сохранившейся нити ДНК, её встраивании в молекулу репарируемой нити ДНК.

Механизмы репарации

1. непосредственная реверсия от повреждённой ДНК к исходной структуре;
2. эксцизия («выпадание») повреждений с последующим восстановлением исходной структуры;
3. активация механизмов, обеспечивающих устойчивость к повреждениям.

Перенос генетического материала у бактерий

Особенности обмена генетическим материалом у прокариот

- Гаплоидность прокариот (отсутствие полового процесса)
- Однонаправленная передача генетического материала от клетки-донора к клетке-реципиенту
- Передача не всей хромосомы, а лишь малого её фрагмента
- Передача генетического материала от донора реципиенту с помощью процессор трансформации, трансдукции или конъюгации
- Превращение клетки-реципиента в мерозиготу с высокой степенью вероятности

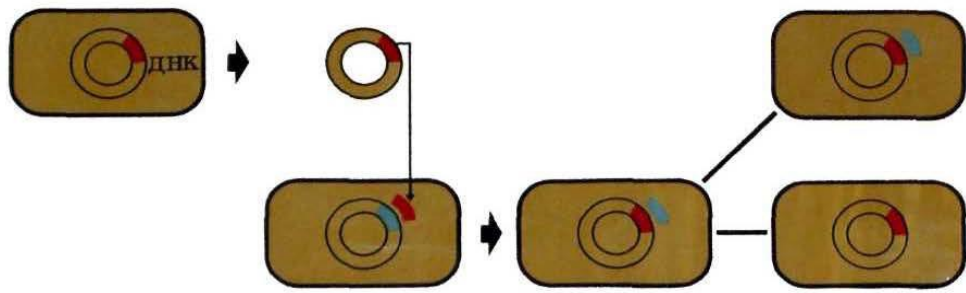
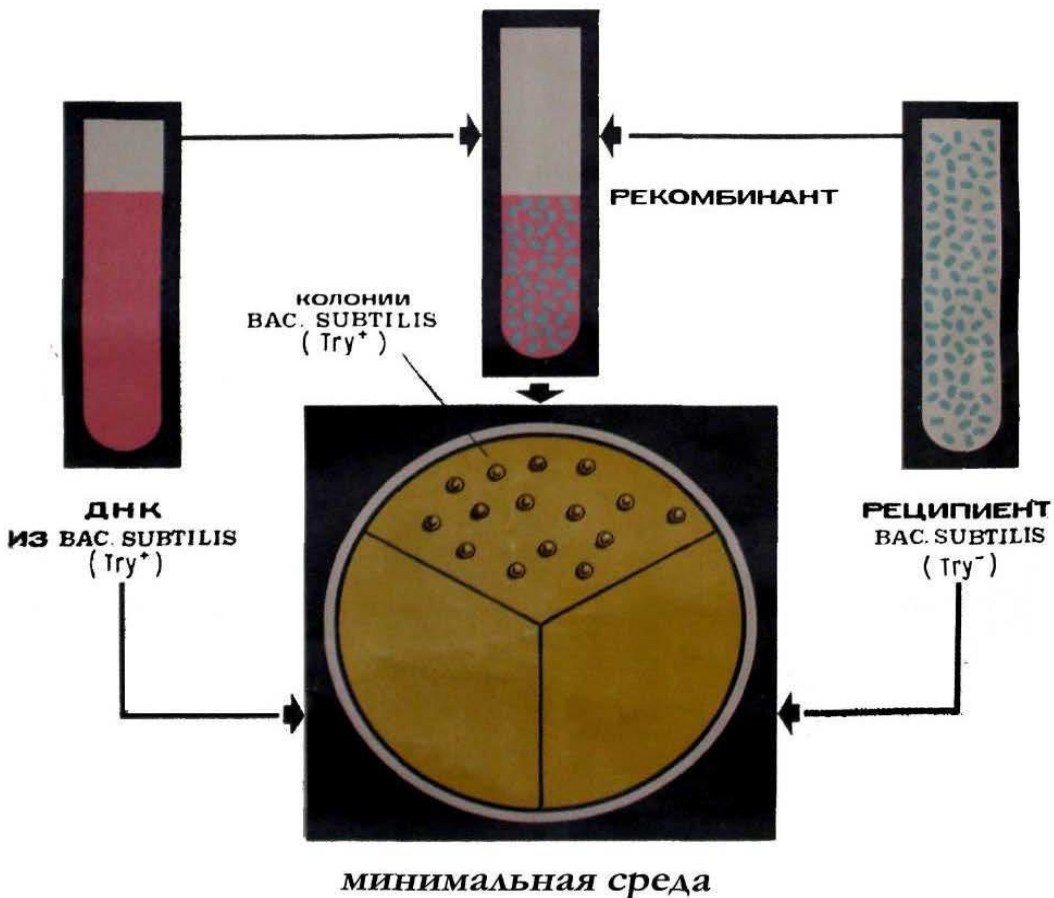


СХЕМА ПОСТАНОВКИ ОПЫТА
ТРАНСФОРМАЦИИ



Трансформация – захват и поглощение фрагментов чужой ДНК и образование на этой основе рекомбинанта.

Бактерия-реципиент захватывает из внешней среды фрагмент чужеродной ДНК в фазу физиологической компетентности (*log*), когда аутолитические ферменты растворяют клеточную стенку на участке её синтеза (чаще у Грам+)

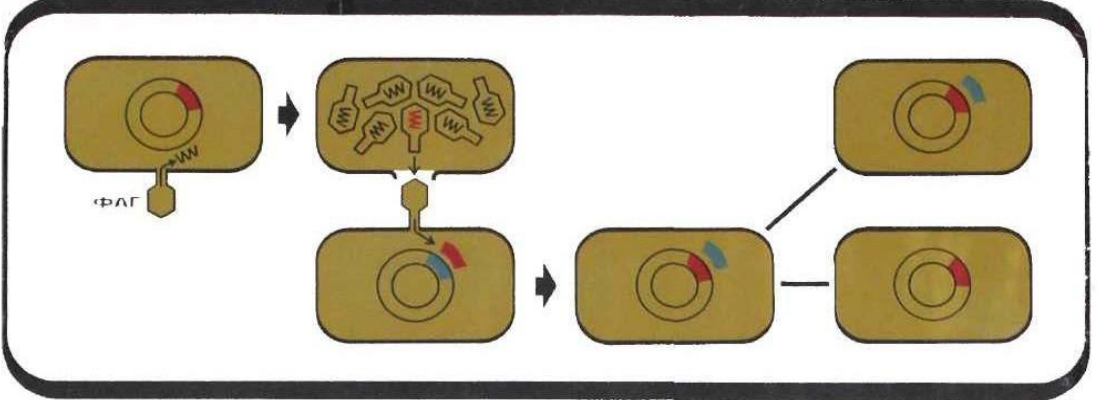
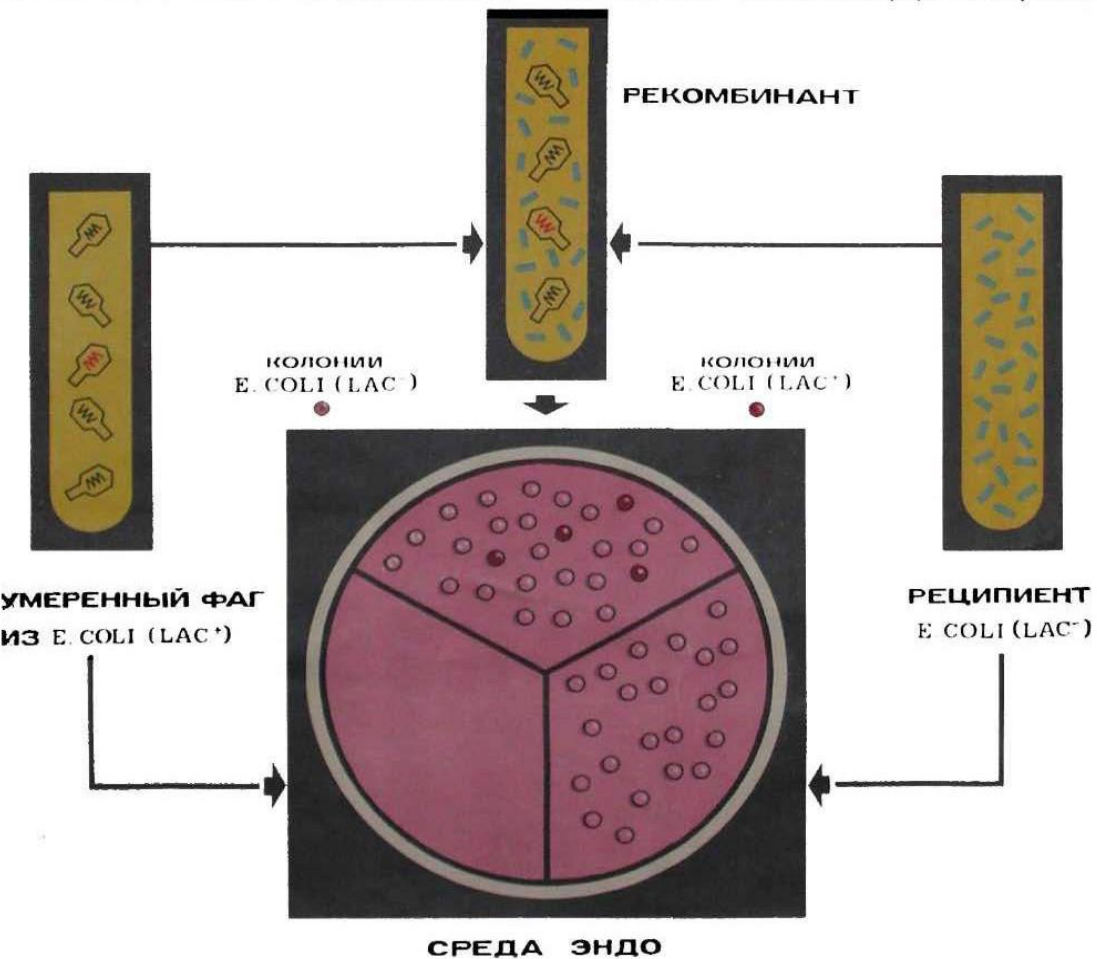


СХЕМА ПОСТАНОВКИ ОПЫТА ТРАНСДУКЦИИ



Трансдукция – перенос генетического материала от клетки-донора клетке-реципиенту умеренным бактериофагом.

Неспецифическая – перенос случайного фрагмента ДНК.

Специфическая – перенос строго определённого фрагмента ДНК умеренным фагом.

Абортивная – фрагмент ДНК не встраивается в хромосому.

Умеренные и дефектные фаги

Факторами изменчивости бактерий могут быть умеренные или дефектные фаги, напоминающие по своим свойствам плазмиды бактерий. Встраиваясь в хромосому, они вызывают лизогенизацию бактерий, которые могут приобретать новые признаки.

Изменчивость лизогенных бактерий связана с приобретением генов, переносимых данными фагами от их предыдущих хозяев (**бактерий-доноров**) или с экспрессией «молчащих» генов бактерий-реципиентов.

В последнем случае фаговая ДНК, встраиваясь вблизи повреждённого промотора, заменяет его. При этом синтезируются определённые продукты, например, протоксины *Corynebacterium diphtheriae*, клостридий.

Факторы патогенности, кодируемые бактериофагами

Бактериофаг	Бактерия-хозяин	Фактор патогенности	Ген	Функция
β-фаг	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	дифтерийный токсин	<i>tox</i>	экзотоксин
Фаг C1	<i>Clostridium botulinum</i>	нейротоксин	<i>C1</i>	экзотоксин
Фаг CTXφ	<i>Vibrio cholerae</i>	холерный токсин А, В	<i>ctxAB</i>	экзотоксин
Фаг лямбда	<i>Escherichia coli</i>	белок наружной мембраны Lom	<i>Lom</i>	адгезин
Фаг φC3208	<i>Escherichia coli</i>	гемолизин	<i>hly2</i> <i>stx2AB</i>	экзотоксин
Фаг φETA	<i>Staphylococcus aureus</i>	эксфолиатин А	<i>eta</i>	экзотоксин
Фаг H4489A	<i>Streptococcus pyogenes</i>	гиалуронидаза	<i>hylP</i>	инвазин
Фаг SopEφ	<i>Salmonella typhimurium</i>	эффектор III типа секреторной системы	<i>sopE</i>	инвазин

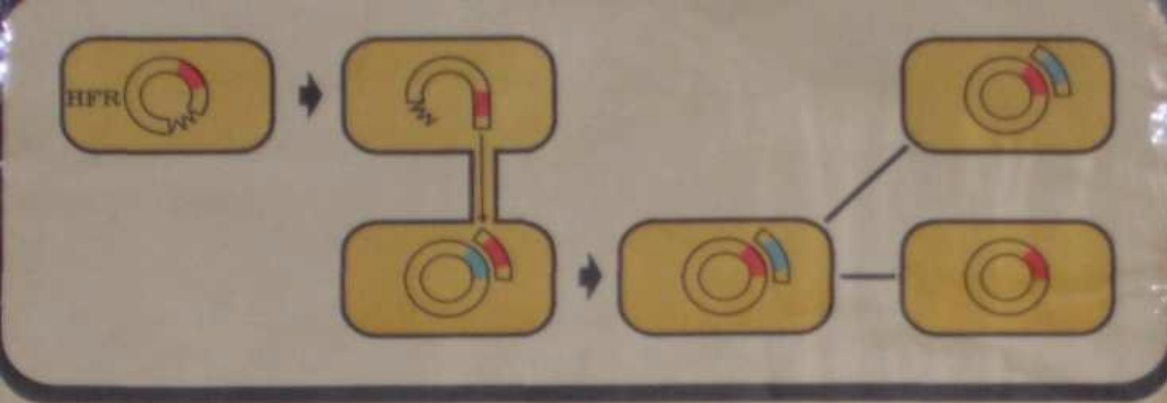
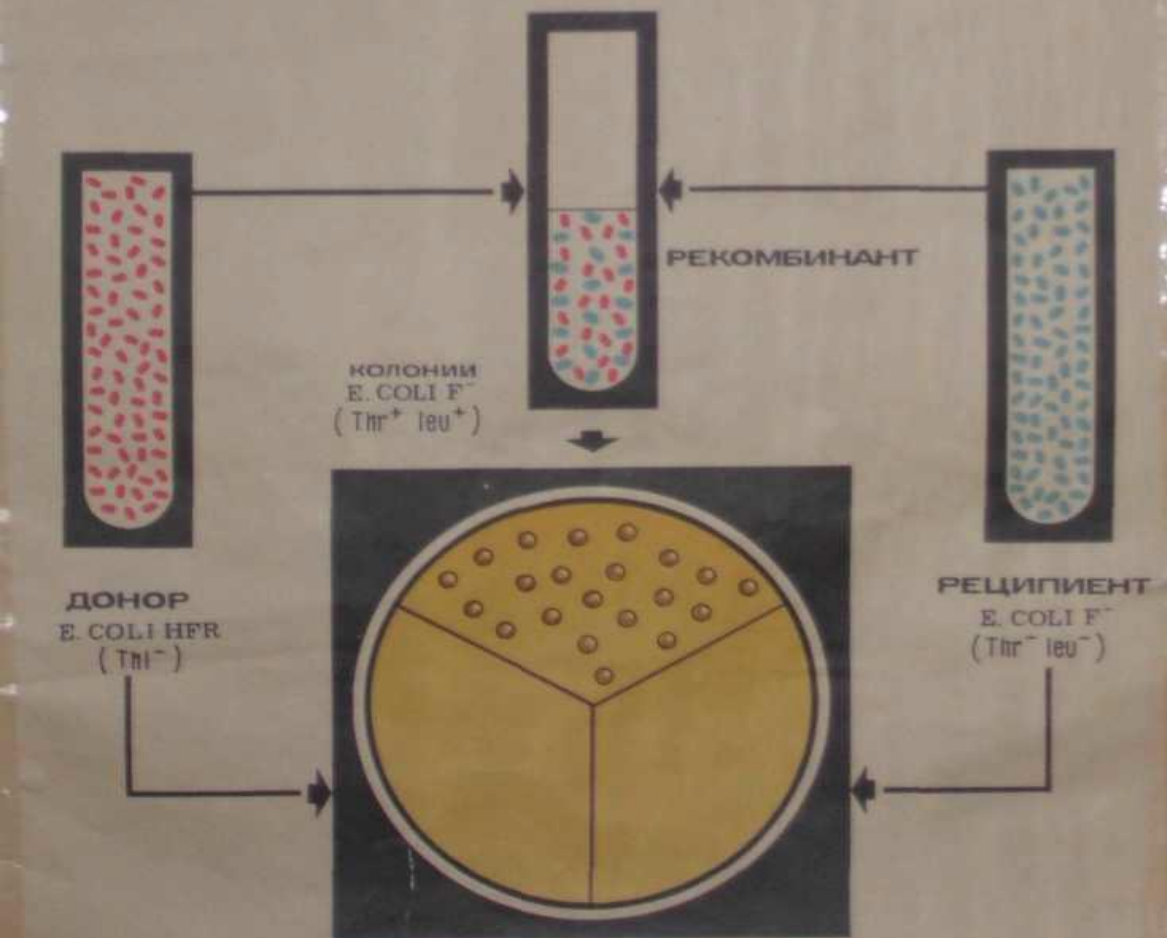
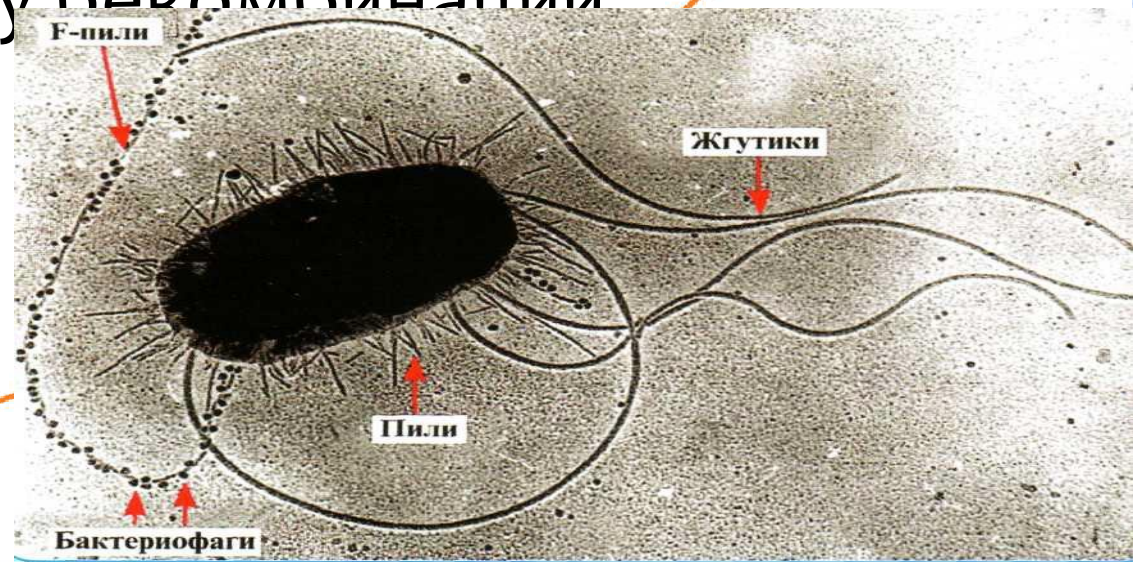
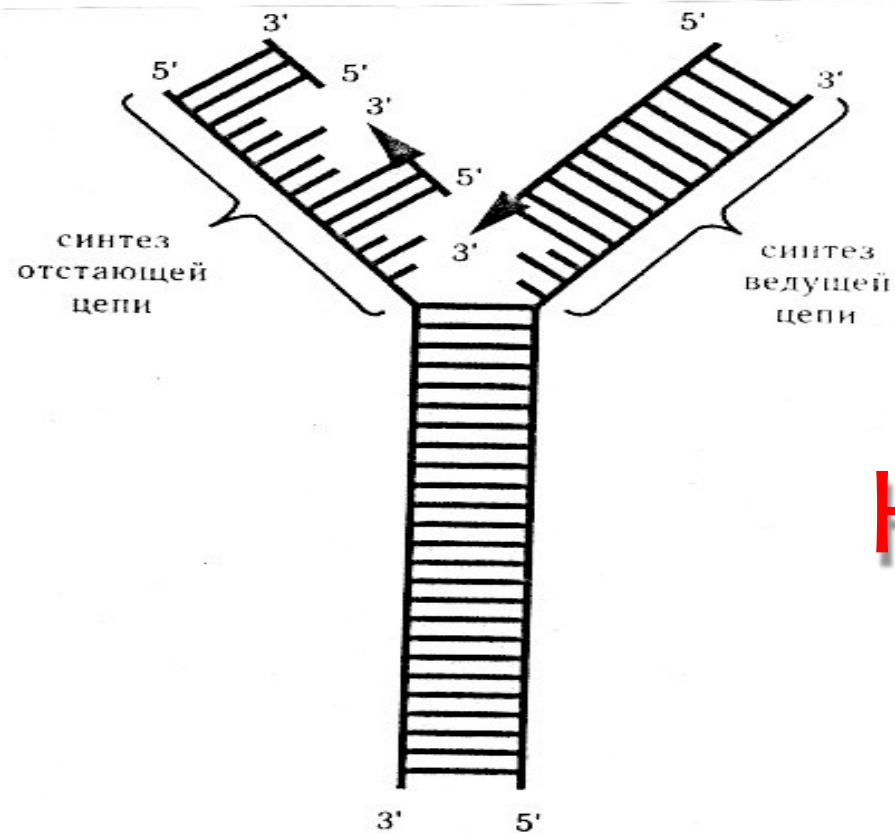


СХЕМА ПОСТАНОВКИ ОПЫТА КОНЬЮГАЦИИ

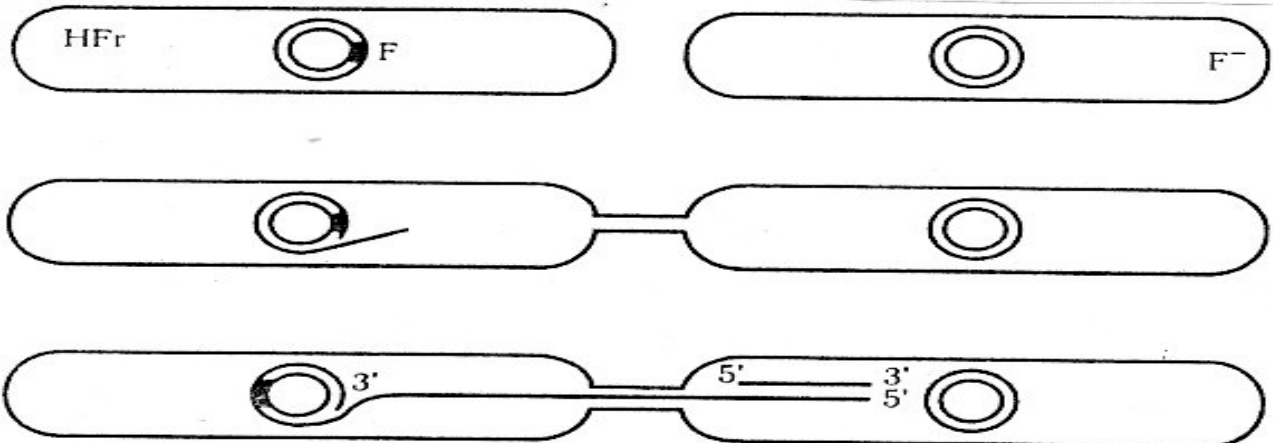


Конъюгация - перенос генетического материала от клетки-донора клетке-реципиенту при непосредственном контакте с помощью *F*-пилей. Контролируется конъюгативными *F*-плазмидами с *tra*-опероном (*transfer* - перенос). *Hfr*-клетки – имеют интегрированную в хромосому *F*-плазмиду, обеспечивают высокую частоту рекомбинаций





Конъюгационный перенос бактериальной ДНК



Генетические рекомбинации

Генетическая рекомбинация - взаимодействие между двумя геномами, то есть между двумя ДНК, обладающими различными генотипами, которое ведёт к образованию рекомбинантной ДНК, формированию дочернего генома, сочетающего гены обоих родителей.

- Общая гомологичная
- Сайт-специфическая
- Негомологичная (незаконная)

Гомологичная рекомбинация

Поступившая из вне ДНК рекомбинирует с клеточной ДНК путём реципрокного обмена соответствующими участками. Партнёры по рекомбинации должны иметь одинаковую нуклеотидную последовательность, т. е. быть максимально гомологичными. Рекомбинация находится под контролем гена *rec A*.

Сайт-специфическая рекомбинация

Короткая двуцепочечная ДНК встраивается в месте в длинную двойную спираль; при этом меньший партнёр теряет свою автономность (интеграция бактериофага или плазмиды в бактериальную хромосому)

Негомологичная рекомбинация

Рекомбинационные процессы, в которых участвуют сегменты ДНК, не обнаруживающие заметной генетической гомологии. Представляет интеграционную форму рекомбинации, т. е. не обмен, а соединение ДНК к которой способны вставочные последовательности и транспозоны.

Слияние протопластов

Цель данной методики получение гибридного потомства у микроорганизмов, не обладающих естественными природными системами генетического обмена.

Преодоление барьера нескрещиваемости достигается тем, что сливаются не интактные бактерии, а их **протопласты** или **сферопласты**.

Преимущества слияния протопластов перед естественными системами гибридизации бактерий

1. Отсутствует барьер нескрещиваемости, даже при совмещении таксономически далёких бактерий.
2. Взаимодействуют полные геномы и полные цитоплазмы слившихся клеток; возможно и множественное слияние клеток. В результате создаются возможности рекомбинации генетического материала с высокой частотой.
3. Возможен прямой обмен любыми плазмидами у бактерий, не имеющих природных систем их переноса.

Стадии слияния протопластов, рекомбинации генетического материала, формирования гибридных форм

- Случайные контакты протопластов разных форм при смешивании различных культур протопластов.
- Слияние ЦПМ протопластов, объединение цитоплазм разных клеток.
- Рекомбинационные обмены между хромосомами и плазмидами.
- Сегрегация и регенерация гибридных конгломератов протопластов.
- Реализация диплоидного/полиплоидного состояние слившихся протопластов. Может сразу произойти рекомбинация - образуются стабильные ранние рекомбинанты или, если рекомбинация не происходит, выщепляются родительские формы. Диплоидное состояние может сохраняться довольно долго и после регенерации с выщеплением гетерогенных гаплоидных рекомбинантов.

Практическое значение слияния протопластов

- Эффективно при создании межвидовых и межродовых гибридных форм, когда получение рекомбинантов затруднено или невозможно из-за отсутствия гомологии ДНК между репликонами родительских форм.
- Введение генетического материала реципиентам таксономически далеких групп бактерий, когда природные методы гибридизации не работают.

Практическое значение генетических рекомбинаций для медицины и медицинской микробиологии

Определяется результатами распространения нового генетического материала в популяциях патогенных и, особенно, условно-патогенных бактерий:

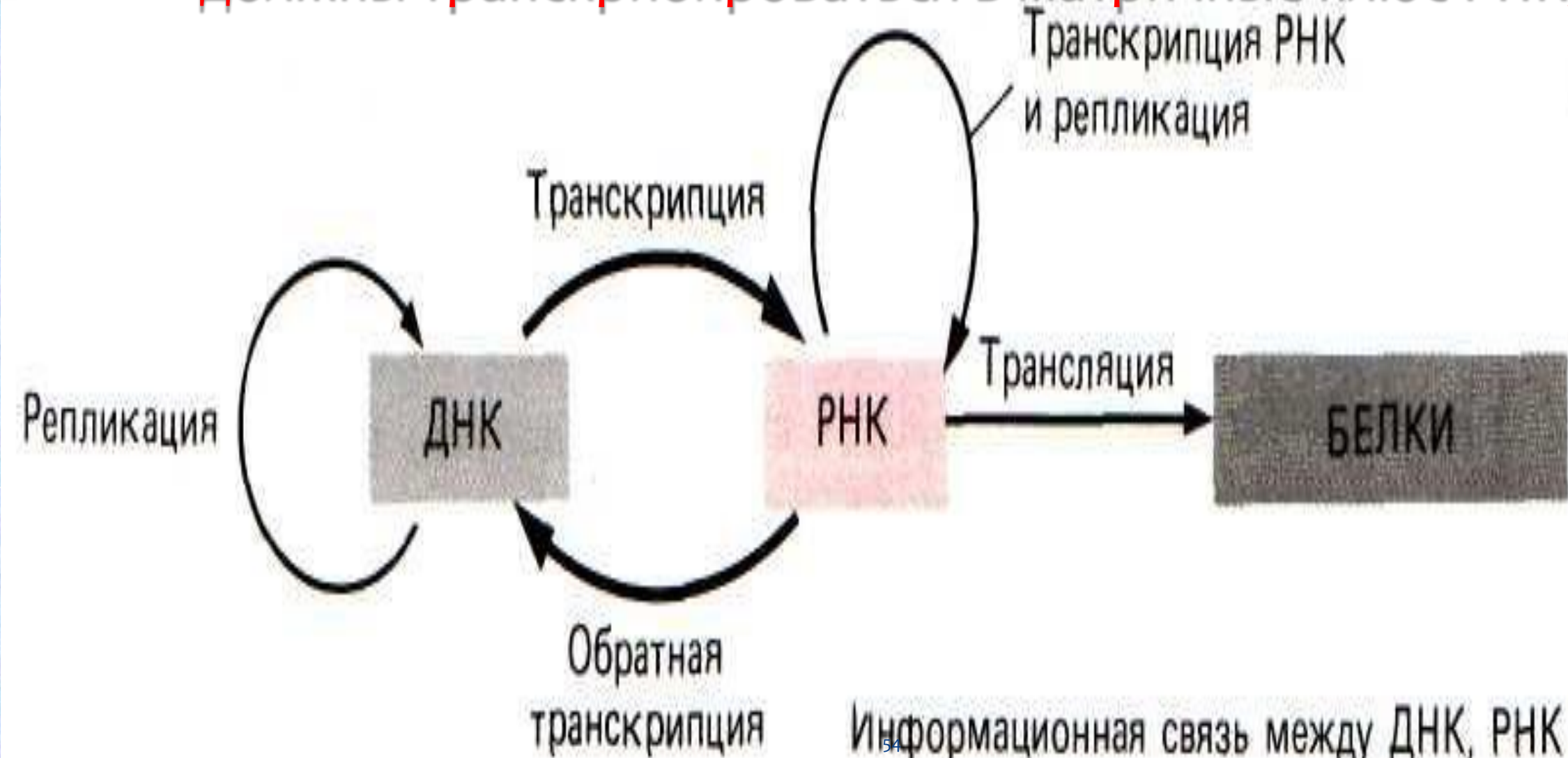
1. Передача генов, кодирующих факторы инвазии, ведёт к **патогенезации микроорганизмов резидентной микрофлоры** за счёт повышения их инвазивных свойств.
2. Передача тох-генов определяет приобретение микроорганизмами **высокой вирулентности**.
3. Передача R-генов, кодирующих множественную резистентность к антимикробным препаратам, определяет приобретение микроорганизмами **полирезистентности к антибиотикам, антисептикам, дезинфектантам**.⁵¹

Результат генетических рекомбинаций

- повышение патогенного потенциала патогенных и условно-патогенных микроорганизмов,
- приобретение микроорганизмами полирезистентности,
- селекция госпитальных штаммов микроорганизмов,
- распространение ИСМП.

Особенности генетики вирусов

Генетика вирусов. Вирусы ДНК – геномные и РНК – геномные (позитивные РНК с матричной активностью и негативные, которые должны транскрибироваться в матричные плюс РНК)



Стратегия репродукции вирусов

1. Вирионная (матричная)+РНК → комплементарная-РНК (в рибосомах) → вирионная+РНК.
2. Вирионная негативная (-) РНК → информационная (матричная)+РНК → вирионная -РНК (на геноме клетки хозяина).
3. Однонитевая ДНК → -ДНК → +ДНК.
4. Ретровирусная РНК → ДНК копия (провирус) → РНК.
5. Двунитевая ДНК → разделение нитей → формирование на каждой комплементарной нити ДНК.

У вирусов изменчивость связана с мутациями и селекцией, возможностью перехода любых, даже негативных мутаций в следующую генерацию.

Генетика вирусов

Генетическая рекомбинация встречается чаще у ДНК-геномных вирусов; среди РНК-геномных она наблюдается у вирусов, обладающих фрагментированным геномом. При рекомбинации происходит обмен между гомологичными участками генома.

Генетическая реактивация наблюдается между геномами родственных вирусов, имеющих мутации в разных генах; за счёт перераспределения генетического материала формируется полноценный дочерний геном.

Комплементация встречается в том случае, когда один из двух вирусов, инфицирующих клетку, в результате мутации синтезирует нефункциональный белок. Немутантный вирус, синтезируя полноценный белок, восполняет его отсутствие у мутантного вируса.

Фенотипическое смешивание наблюдается при смешанном заражении чувствительной клетки двумя вирусами, если часть потомства приобретает фенотипические признаки, присущие двум вирусам, при сохранении неизменности генотипа.

Молекулярно-генетические методы диагностики инфекционных болезней

Молекулярная диагностика

(син. молекулярно-биологическая диагностика)

раздел диагностики *in vitro*, включающий специфические методы, направленные на анализ нерегулярных биополимеров – ДНК, РНК, белков

Молекулярная диагностика

Одна из современных тенденций молекулярной диагностики - разработка и внедрение системы «point-of-care - POC» (диагностика «у постели больного») и сети соответствующих лабораторий. Преимущества применения диагностических тестов «point-of-care» заключаются в быстроте и простоте их постановки, доступности, низкой стоимости, отсутствии необходимости использования сложного оборудования, что позволяет максимально приблизить проведение тестирования к объекту исследования, ускорить получение результата.

Молекулярно-генетические методы диагностики

- Рестрикционный анализ
- Молекулярная гибридизация
- Полимеразная цепная реакция
- Риботипирование
- Опосредованная транскрипцией амплификация рибосомальной РНК

Рестрикционный анализ

Рестрикционный анализ основан на применении ферментов **рестриктаз**. Это эндонуклеазы, расщепляющие ДНК, разрывая фосфатные связи в определённых последовательностях нуклеотидов. Особое значение имеют рестриктазы, которые узнают последовательности, обладающие центральной симметрией и считывающиеся одинаково в обе стороны от оси симметрии. Точка разрыва ДНК может совпадать с осью симметрии или быть сдвинута относительно неё. Из бактерий выделено и очищено более 175 различных рестриктаз, для которых известны сайты узнавания (**рестрикции**). Выявлено более 80 различных типов сайтов, в которых может происходить разрыв двойной спирали ДНК. В геноме каждой таксономической единицы находится генетически задетерминированное число участков узнавания для определённой рестриктазы. Обработка ДНК, выделенной из микроба определённой рестриктазой, ведёт к образованию строго определённого количества фрагментов ДНК фиксированного размера. Размер каждого фрагмента можно определить с помощью электрофореза в агарозном геле. Можно получить рестрикционную карту микробов определённого вида. Сопоставляя карты рестрикции ДНК, выделенных из различных штаммов, можно определить их генетическое родство, выявить принадлежность к определённому виду или роду, обнаружить участки, подвергнутые мутациям. Рестрикционный анализ используется и как начальный этап метода секвенирования и метода молекулярной гибридизации.

Молекулярная гибридизация

Молекулярная гибридизация позволяет выявить степень сходства различных ДНК, применяется при идентификации микробов для определения их точного таксономического положения. Основана на способности двухцепочечной ДНК при повышенной температуре (90°C) в щелочной среде денатурировать, т. е. расплетаться на две нити, а при понижении температуры на 10°C вновь восстанавливать исходную двухцепочечную структуру. Метод требует наличия молекулярного зонда - одноцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, меченной радионуклидами, с которой сравнивают исследуемую ДНК. Для проведения молекулярной гибридизации исследуемую ДНК расплетают указанным выше способом, одну нить фиксируют на специальном фильтре, который затем помещают в раствор, содержащий радиоактивный зонд. Создаются условия, благоприятные для образования двойных спиралей. При наличии комплементарности между зондом и исследуемой ДНК, они образуют между собой двойную спираль.



Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция

- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – молекулярно-биологическая реакция, направленная на синтез большого количества копий специфического фрагмента ДНК *in vitro*.
- ПЦР представляет собой многократное увеличение числа копий (**амплификация**) специфического участка ДНК катализируемое ферментом ДНК-полимеразой.

ПЦР диагностика инфекционных заболеваний

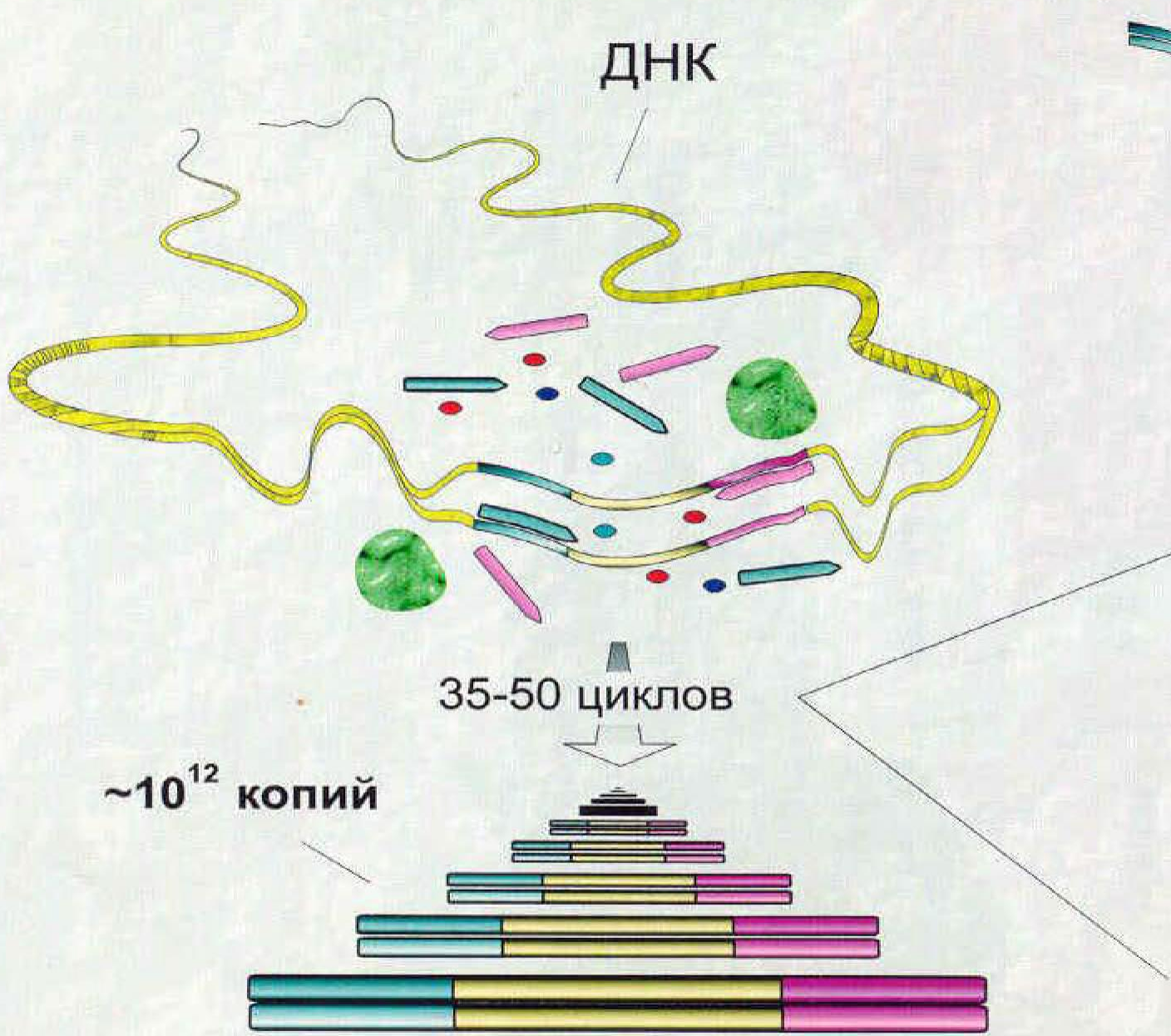
Открытие термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы) из термофильных бактерий *Thermis aquaticus*, оптимум работы которой находится в области 70-72°C, позволило сделать процесс репликации ДНК циклическим и использовать его для работы *in vitro*.

ПЦР диагностика инфекционных заболеваний

При многократном повторении циклов синтеза происходит экспоненциальное увеличение числа копий специфического фрагмента ДНК, что позволяет из небольшого количества анализируемого материала, который может содержать единичные клетки микроорганизмов получить достаточное количество ДНК копий для идентификации их методом электрофореза.

ПЦР диагностика инфекционных заболеваний

Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют две олигонуклеотидные затравки (**20 нуклеотидных пар**), называемые праймерами. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними.



Принцип полимеразной цепной реакции

Компоненты ПЦР

- **Праймеры** (синтетические олигонуклеотиды 20-30 нуклеотидных пар, комплементарные последовательностям ДНК на границах определяемого специфического фрагмента). Выбор специфического фрагмента и подбор праймеров играет важнейшую роль в специфичности проведения амплификации, что сказывается на качестве проведения анализа.
- **Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ)** (смесь четырёх дНТФ, являющихся материалом для синтеза новых комплементарных цепей ДНК).
- **Фермент Taq-полимераза** (термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путём последовательного присоединения нуклеотидных оснований к растущей цепи синтезируемой ДНК).
- **Буферный раствор** (реакционная среда, содержащая ионы Mg^{2+} , необходимые для поддержания активности фермента).

Этапы амплификации

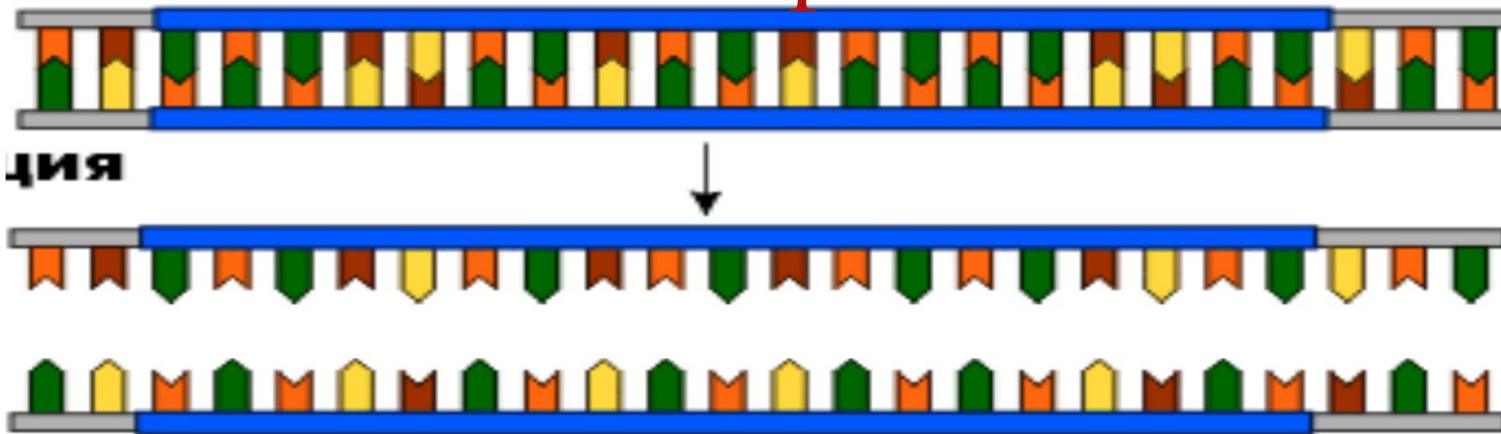
1 этап: Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали). Протекает при $93-95^{\circ}\text{C}$ в течение 30-40 сек.

2 этап: Присоединение праймеров (отжиг) происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига в интервале $50-65^{\circ}\text{C}$. Время отжига 20-60 сек.

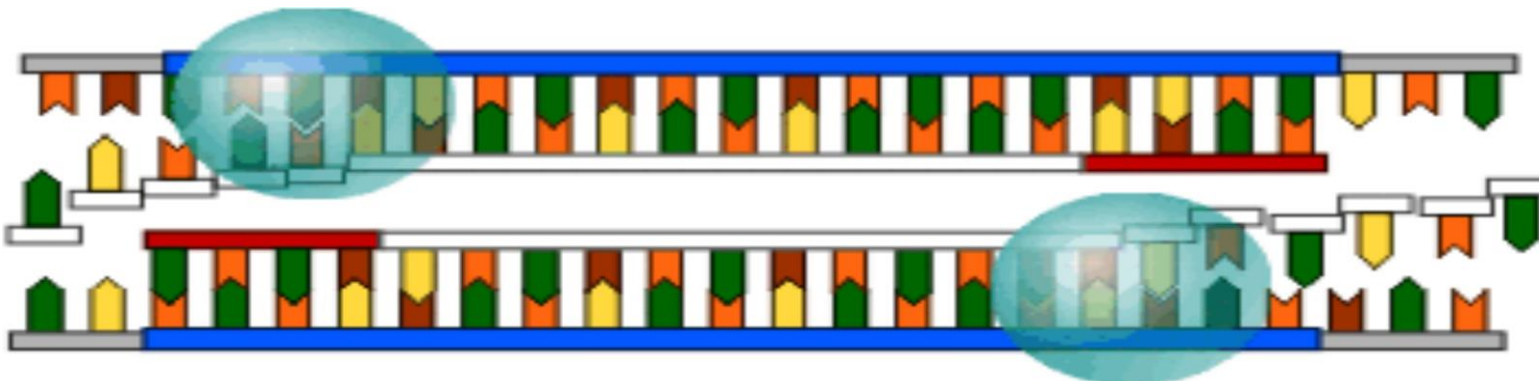
3 этап: Достаивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ). Процесс синтеза катализируется термостабильной ДНК-полимеразой (Taq-полимеразой), проходит при температуре $70-72^{\circ}\text{C}$. Время протекания синтеза 20-40 сек.

1-ый цикл амплификации

1-й этап
Денатурация
93 95 55



2-й этап
ОТЖК
прайм-меров
50 65 72



2-о ИЖ Плификации

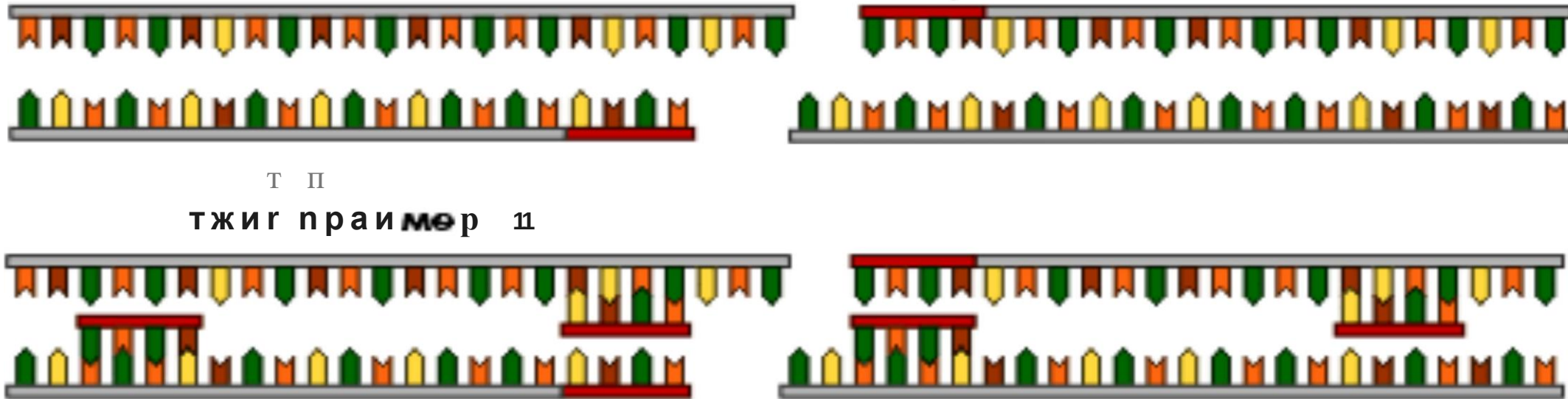
1-й этап

Денатурация



2-й этап

Синтез праймера



3-й этап

Экстензия ДНК



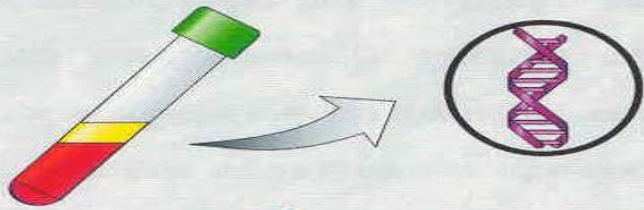
Продукты амплификации (ампликоны)

Этапы ПЦР

Процесс амплификации проводится в специальном программируемом термостате (**амплификаторе**), который по заданной программе автоматически осуществляет смену температур согласно числу циклов амплификации



1. Выделение ДНК



2. Амплификация

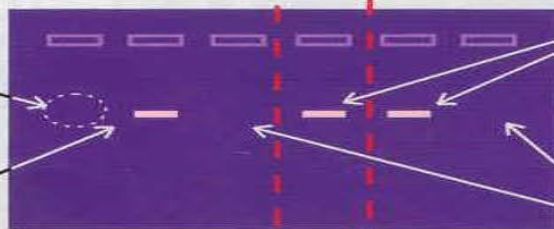


Стадии ПЦР

3. Детекция в агарозном геле

отрицательный контроль

положительный контроль



положительные образцы

отрицательные образцы

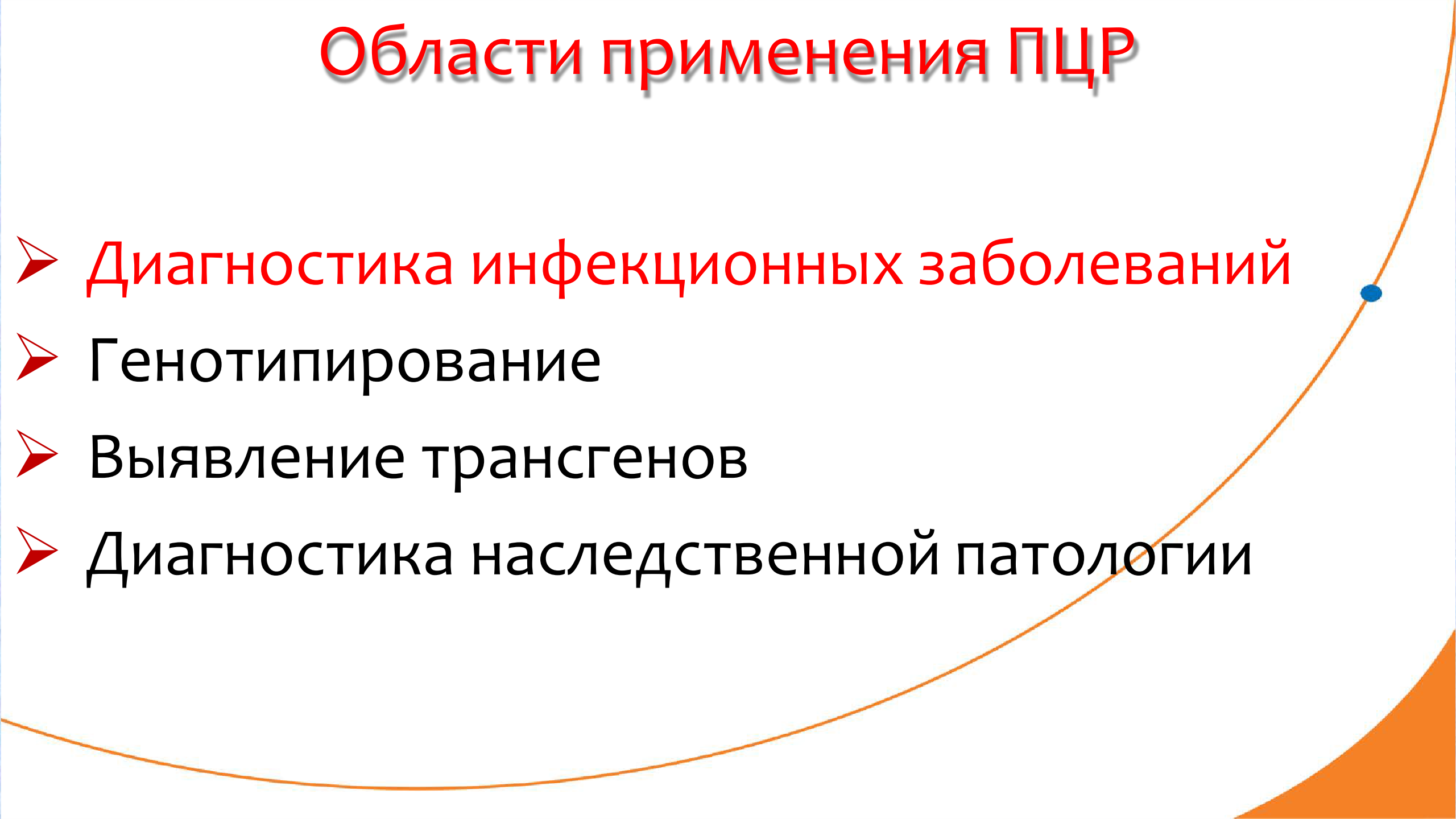
Разновидности полимеразной цепной реакции:

- с «горячим» стартом (**hot-start PCR**),
- мультиплексная (**мультипраймерная**),
- гнездовая («**вложенная**», **nested PCR**),
- «инвертированная», ассиметричная, метод молекулярных колоний, длинных фрагментов (**Long-range PCR**),
- с быстрой амплификацией концов кДНК (**RACE-PCR**),
- универсальная (**broad-range PCR**),
- с обратной транскрипцией (**ОТ-ПЦР, RT-PCR**),
- иммуно-ПЦР (**immuno-PCR-IPCR**),
- в режиме «реального времени» (**Real-Time PCR**),
- анализ «по конечной точке» (**End-point PCR**) и т. д.

Детекция продуктов амплификации нуклеиновых кислот:

- электрофоретический метод (в агарозном или полиакриламидном геле);
- гибридизационно-ферментный метод;
- гибридизационно-флуоресцентный метод (детекция продукта в режиме «реального времени» или регистрация продукта после окончания реакции амплификации («анализ по конечной точке»)).

Области применения ПЦР

- Диагностика инфекционных заболеваний
 - Генотипирование
 - Выявление трансгенов
 - Диагностика наследственной патологии
- 
- A decorative orange curve starts from the bottom left, curves upwards and to the right, ending near the top right corner. A small blue dot is located on this curve, approximately in the middle of its vertical span.

Применение методов амплификации нуклеиновых кислот микроорганизмов I-IV групп патогенности:

- метод экспресс-диагностики при исследовании биологического материала, взятого от человека с целью детекции у него ДНК/РНК микроорганизмов I-IV групп патогенности и их количественной оценки;
- метод специфической индикации ПБА в объектах окружающей среды и пищевых продуктах;
- ускоренный предварительный тест при выполнении культурального и биологического методов исследования и для идентификации культур;
- определение эпидемиологической значимости изолятов на основе выявления генетических маркёров патогенности, антибиотикоустойчивости;
- таксономическая характеристика штаммов на основе выявления специфических видовых, родовых и других маркёров;
- генотипирование штаммов с целью определения их происхождения;
- прогнозирование течения инфекционного заболевания и оценка эффективности проводимой терапии.

Преимущества ПЦР

Параметр	Характеристика
Высокая чувствительность.	Выявляет единичные клетки и вирионы.
Высокая специфичность.	Определяет уникальный фрагмент ДНК патогена, детерминирующий его видовые, токсигенные и другие отличительные свойства.
Быстрота получения результатов	2-6 часов от начала исследования.
Универсальность процедуры проведения реакции	Практически для всех известных возбудителей инфекционных заболеваний стандартная процедура проведения реакции.
Исследование клинического материала	Не требуется выделение чистой культуры и накопление биомассы.
Диагностика различных патологических процессов	Острые, хронические, латентные, медленные инфекции.
Диагностика микробов любых видов	Культивируемые, некультивируемые, персистирующие формы.

Преимущества ПЦР для диагностики инфекционных заболеваний

- 1. Прямое определение наличия возбудителей.** Многие классические методы диагностики выявляют белки-маркёры, являющиеся продуктами жизнедеятельности микробов, что даёт опосредованное свидетельство наличия инфекции. Выявление специфического участка ДНК возбудителя даёт прямое указание на присутствие возбудителя инфекции.
- 2. Высокая специфичность** обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов.
- 3. Высокая чувствительность** составляет 10-1000 клеток в пробе; позволяет выявлять даже единичные бактерии или вирусы; обнаруживает наличие возбудителей инфекционных заболеваний в тех случаях, когда другими методами это сделать невозможно.

Преимущества ПЦР для диагностики инфекционных заболеваний

- 4. Универсальность процедуры выявления различных возбудителей.** Материалом для исследования служит ДНК возбудителя. Метод основан на выявлении фрагмента ДНК/РНК, являющегося специфичным для конкретного организма. Сходство химического состава всех нуклеиновых кислот позволяет применять унифицированные методы проведения лабораторных исследований. Это даёт возможность диагностировать несколько возбудителей из одной биопробы. В качестве исследуемого материала могут использоваться различные биологические и патологические жидкости, соскобы эпителиальных клеток.
- 5. Высокая скорость получения результата анализа.** Не требуется выделение и выращивание культуры возбудителя, что занимает большое количество времени. Унифицированный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции, автоматизация процесса амплификации дают возможность провести полный анализ за 4-4,5 часа.
- 6. Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций.** ПЦР особенно эффективна для диагностики инфекций, вызванных трудно культивируемыми, некультивируемыми микроорганизмами, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, поскольку позволяет избежать сложностей при культивировании в лабораторных условиях, эффективно в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов.

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP)

LAMP

Технологические преимущества LAMP - амплификация при постоянной температуре 60-65° С (что исключает необходимость использования термоциклера), более быстрое получение результата при сохранении аналогичной чувствительности и специфичности. Важными достоинствами являются высокая экономичность и простота выполнения с возможностью выявления амплификационного продукта и оценки результата визуально, по изменению цвета после добавления одного из интеркалирующих красителей. Современные модификации технологии RT-LAMP позволяют получать количественный результат в режиме реального времени

Сравнение методов LAMP и классической ПЦР

Критерии	LAMP	ПЦР
Температурные циклы	Изотермальная амплификация (60-65° C)	Необходимость различных температурных циклов
Количество праймеров	4(6) специально разработанных праймеров	2 праймера
Время анализа	До 30 мин	2-4 часа
Выход ДНК	Выход ДНК - 10-20 мкг	Выход ДНК - до 0,2 мкг
Визуальная детекция	Возможна	Невозможна
Экономичность и простота выполнения	Экономичный и прост в выполнении	Требует дорогостоящего оборудования и подготовленных специалистов
Чувствительность к ингибиторам пробы	Нечувствительна	Чувствительна
Возможность мультиплексирования	Возможно	Невозможно
Известность метода, оценка в клинических условиях	Малоизвестен, клиническая оценка продолжается	Хорошо известен, клиническая эффективность доказана

Риботипирование и опосредованная транскрипцией амплификация рибосомальной РНК

Последовательность нуклеотидных оснований в оперонах, кодирующих рРНК, отличается консервативностью, присущей каждому виду бактерий. Опероны представлены на бактериальной хромосоме в нескольких копиях. Фрагменты ДНК, полученные после обработки её 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 этом свойстве основано **риботипирование**, позволяющее проводить мониторинг выделенных штаммов и определение их вида. Риботипирование проводится в автоматическом режиме в специальных приборах.

Опосредованная транскрипцией амплификация рРНК

Используется для диагностики микст-инфекций. Основана на детекции с помощью молекулярной гибридизации амплифицированных рРНК, специфичных для определённого вида бактерий. Проводится в три этапа:

1. Амплификация пула рРНК на матрице выделенной из исследуемого материала ДНК при помощи ДНК-зависимой РНК-полимеразы.
2. Гибридизация накопленного пула рРНК с комплементарными видоспецифическим рРНК олигонуклеотидами, меченными флюорохромом или ферментами.
3. Определение продуктов гибридизации методами денситометрии, ИФА.

Ведётся в автоматическом режиме в установках, в которых одномоментное определение рРНК, принадлежащих различным видам бактерий, достигается разделением амплифицированного пула рРНК на несколько проб, в которые вносятся комплементарные видоспецифическим рРНК меченые олигонуклеотиды для



Генетика микробов

Справочник бактериолога



Издатель ООО «Эпидионом-диагностика»

Национальный дистрибутор диагностических препаратов
Москва, ул. Салтыковская, д. 26, строение 1

Тел.: (495)- 7-699-000

e-mail: order@epidbiomed-d.ru

www.epidbiomed-d.ru

Москва — 2017

Благодарю за внимание

Москва



АКАДЕМИЯ
ПОСТДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБУ ФНКЦ ФМБА РОССИИ

Кафедра Клинической лабораторной
диагностики и патологической
анатомии



Денисова



Ольга



Владимировна



Телефон +7-985-644-



80-90 (в том числе
вотсапп)



[email.com](mailto:denisova_ov@inbox.ru)
[denisova_ov@inbox.r](mailto:denisova_ov@inbox.ru)
u

