



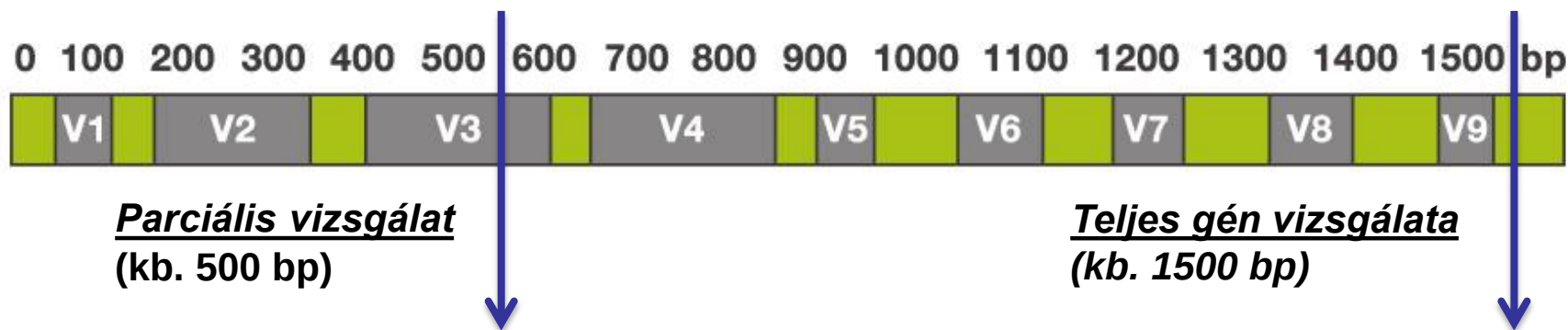
A Multi Locus Sequence Typing (MLST) alkalmazhatósága az élelmiszer- mikrobiológiában

**Sipos Rita, Lukács Alena, Simon Janka,
Szántó-Egész Réka, Micsinai Adrienn**

A 16S rRNS gén alkalmassága:

- **minden baktériumban** univerzálisan előfordul
- **hosszúsága** megfelelő bioinformatikai tartalommal bír
- erősen konzervatív és variábilis szakaszokból áll

16S rRNS génszakasz



- **Konzervatív részek** → „univerzális” PCR primer tervezés
- **Variábilis részek** → filogenetikai információ/felbontás
- Nagyszámú, és folyamatosan növekvő publikus 16S rRNS **adatbázisok**

POZITÍVUM:

- 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510
TTTCCCTGCACATCAACCTCCCCAGCCTGATCCACACCTTCCGCCCGCATCATGACACAAAGGCCACGCTGTGGAAAGGGGGGACGCCAGGTGSCGAGACCCGCCGACGACCTGGTGGTCTGSCCCT

KORLÁTOK:

- ## FAJ alatti szintű felbontás igénye a bakteriális identifikációban:

- baktérium genotipizálás
- „*root-cause*” analízis/kivizsgálásokban

- I. DNS MINTÁZAT-alapú
- II. DNS HIBRIDIZÁCIÓN-alapuló
- III. DNS SZEKVENCIA-alapú

- **NINCSEN** tökéletes **MÓDSZER**, ami minden taxonra/minden esetre jól alkalmazható

GIVE & TAKE

Több szempontot kell figyelembe venni

1) ALKALMAZHATÓSÁG:

- Minden izolátumra alkalmazható legyen

2) MEGKÜLÖNBÖZTETHETŐSÉG/FELBONTÁS:

- Nem rokon izolátumok elkülönítésének képessége

3) REPRODUKÁLHATÓSÁG:

- Laboratóriumon belül és laboratóriumok között

4) KIVITELEZHETŐSÉG:

- Gyorsaság, ár, műszerigény

I. DNS MINTÁZAT-alapú genotipizáló módszerek

Enzimatisz RESTRIKCIÓ módszerek

DNS AMPLIFIKÁCIÓN-alapuló módszerek

DNS **olvadási** tulajdonsága alapján szeparál

DGGE/HRM

Számosságban különböző **tandem repeat** szakaszok

MLVA

Repetitív DNS szakaszok (REP/ERIC/BOX)

REP-PCR

Random PCR amplifikáció (<10mer oligo)

RAPD

Restriktio+ligálás+specifikus PCR mintázat

AFLP

PCR amplifikálás+Restriktio emésztés

PCR-RFLP

Restriktio fragmentumok GE/Southern blot (<10kb)

RFLP/
Ribotyping

DNS pulzáló elektroforézis mintázat (>20kb)

PFGE

II. DNS HIBRIDIZÁCIÓN-alapú genotipizáló módszerek

DNS-DNS hibridizáció

Maximum 5000 pont/array

MACRO-
ARRAY

cDNS vagy oligonukleotid microarray

MICRO-
ARRAY

III. DNS SZEKVENCIA-alapú genotipizáló módszerek

NEM-kódoló DNS szakaszok

Kódoló DNS szakaszok közötti nem kódoló DNS
(16S-23S *internal transcribed spacer*)

ITS

Több inter-genikus spacer szakasz

MST

KÓDOLÓ génszakaszok

Egy kódoló gén szekvenálása (16S rRNS, rpoB)

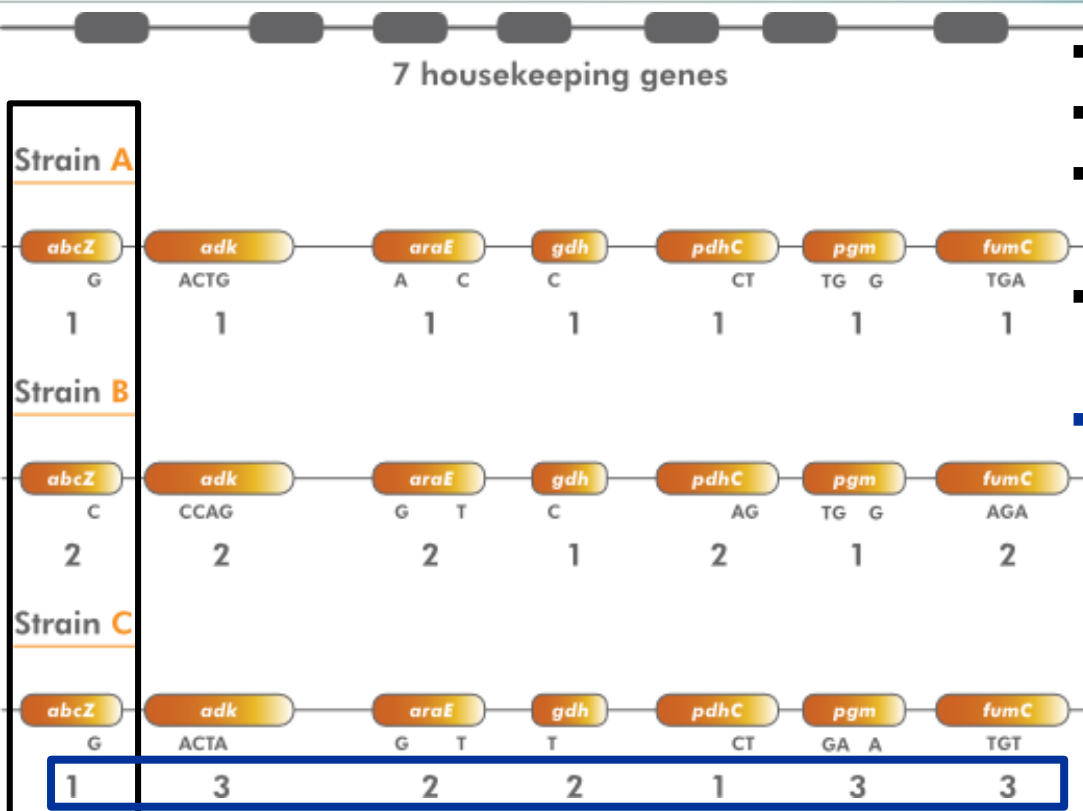
SLST

Több kódoló gén szakaszon alapuló tipizálás

MULTI LOCUS SEQUENCE TYPING

MLST

MLST (Multi Locus Sequence Typing)



- TÖBB (ált. 7 db) háztartási gén vizsgálata
- faj-specifikus
- előzetes filogenetikai információ szükséges
- 450-500bp szakaszok szekvenálása
- Allél variációk vizsgálata
új variáció, új allél számot (*Allele ID*)
- 7 génből egy 7-allél számkombináció adja a szekvencia típust (*ST-sequence type*)

- Számos fajra publikus **MLST adatbázis** létezik (<https://pubmlst.org/data>)-
 - **baktérium lista**: ismertek a **gén**ek, PCR **primerek** adatai, PCR reakció **körülmények**
- Bármilyen fajra **saját MLST módszer / adatbázis tervezhető** a genomok ismeretében
 - melyik génekkel válnak el megfelelő mértékben az izolátumok
 - rendszer-finomítás

MLST - *Staphylococcus epidermidis* rendszer



➤ 7 gén vizsgálata

- 1) carbamate kinase (*arcC*)
- 2) shikimate dehydrogenase (*aroE*)
- 3) ABC transporter (*gtr*)
- 4) DNA mismatch repair protein (*mutS*)
- 5) pyrimidine operon regulatory protein (*pyrR*)
- 6) triosephosphate isomerase (*tpiA*)
- 7) acetyl-CoA acetyltransferase (*yqiL*)

GÉN	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>gtr</i>	<i>mutS</i>	<i>pyrR</i>	<i>tpiA</i>	<i>yqiL</i>
Hossz (NU)	465	420	438	412	428	424	416
ALLÉL típusok #	62	56	52	41	46	44	55

➤ Adatbázisban leírt ST variációk száma 626 db

	ALLELE ID							
	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>gtr</i>	<i>mutS</i>	<i>pyrR</i>	<i>tpiA</i>	<i>yqiL</i>	MLST_ST
1_STR_REF DSM_20044	1	1	1	2	2	1	1	5
2_STR_REF DSM_1798	2	1	7	1	1	1	1	8
3_STR	1	1	7	1	3	5	14	32
4_STR	8	no-ID	45	4	29	6	13	no-ID
5_STR	8	7	12	4	12	2	2	19
6_STR	1	19	17	4	9	10	2	65
7_STR	1	5	2	6	2	1	6	73
8_STR	1	2	2	2	2	1	3	297
9_STR	1	5	2	6	2	1	6	73
10_STR	1	1	1	2	no-ID	1	1	no-ID
11_STR	1	5	2	6	2	1	6	73
12_STR	1	5	2	6	2	1	6	73
13_STR	8	19	17	4	9	10	2	183
14_STR	1	2	2	2	2	1	3	297
15_STR	1	1	2	1	4	1	1	327
16_STR	1	1	7	2	5	1	1	364
17_STR	1	1	9	5	2	1	1	284
18_STR	1	1	no-ID	1	3	5	14	no-ID
19_STR	1	1	7	1	3	5	14	32
20_STR	2	1	6	2	no-ID	1	1	no-ID

➤ **VALIDÁLÁS** referencia törzsekre és környezeti izolátumokra
2 db REF + 18db izolátum

➤ 7 számból álló kombináció
ST-sequence type

➤ MLST online adatbázis
• 11 db különböző ST

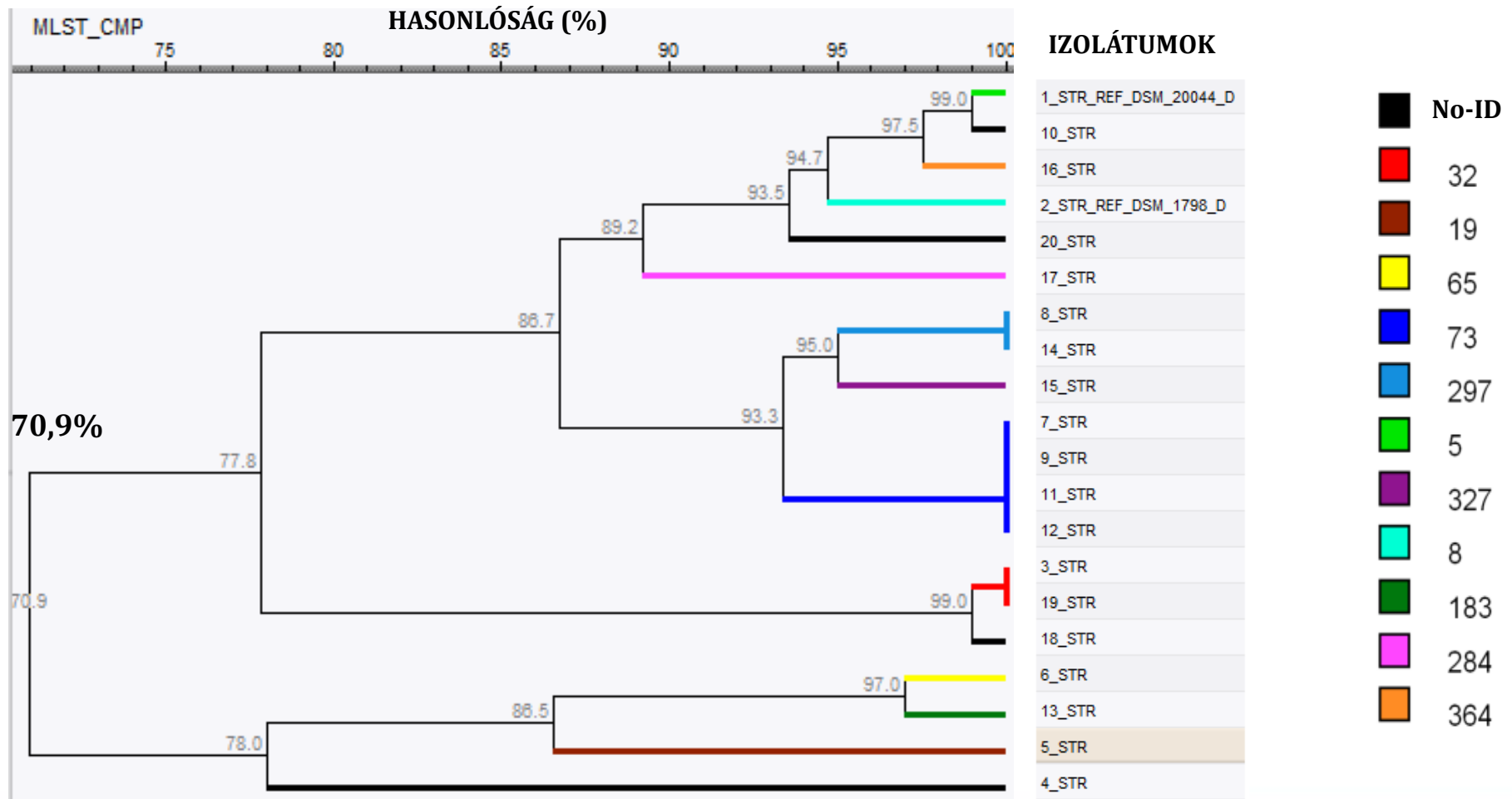
➤ 4 db eddig még LE NEM ÍRT
Új típus fordul elő

MLST - *Staphylococcus epidermidis* rendszer

GÉN	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>gtr</i>	<i>mutS</i>	<i>pyrR</i>	<i>tpiA</i>	<i>yqiL</i>
Hossz (NU)	465	420	438	412	428	424	416
ALLÉL típusok #	62	56	52	41	46	44	55

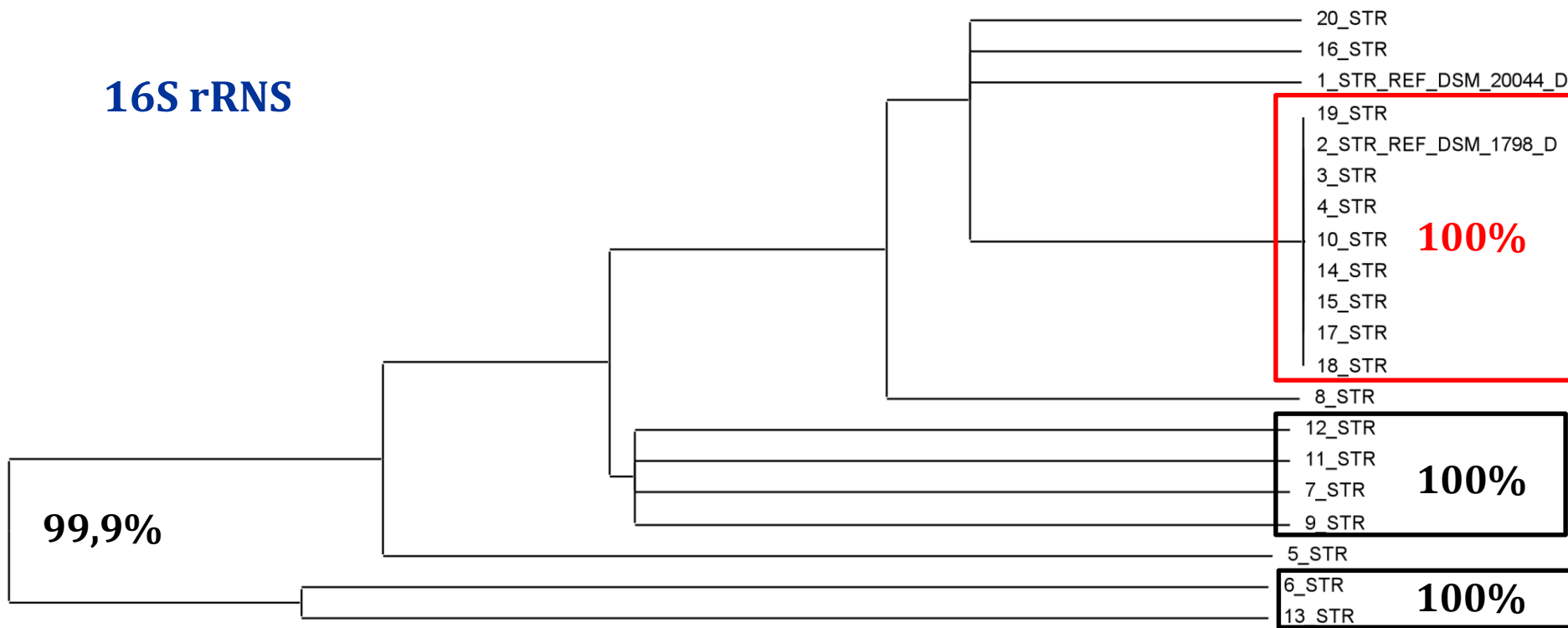
- 7 lókus-20db izolátum
- Összesen 3003 nukleotid pozíció
- 76 db különböző nukleotid pozíció
- **Kompozit karakter adatmátrix**

Hasonlósági dendrogram (UPGMA)



VALIDÁLÁS- *Staphylococcus epidermidis* törzsek 16S rRNS

- Az MLST validálásban szereplő 20 db *Staphylococcus epidermidis* törzs:
 - 2db REFERENCIA törzs (1-2 REF_DSM)
 - 18 db Környezeti izolátum (3-20 STR)
- Teljes 16S rRNS szekvencia alapján **csak 8 db polimorf pozícióban** különböznek

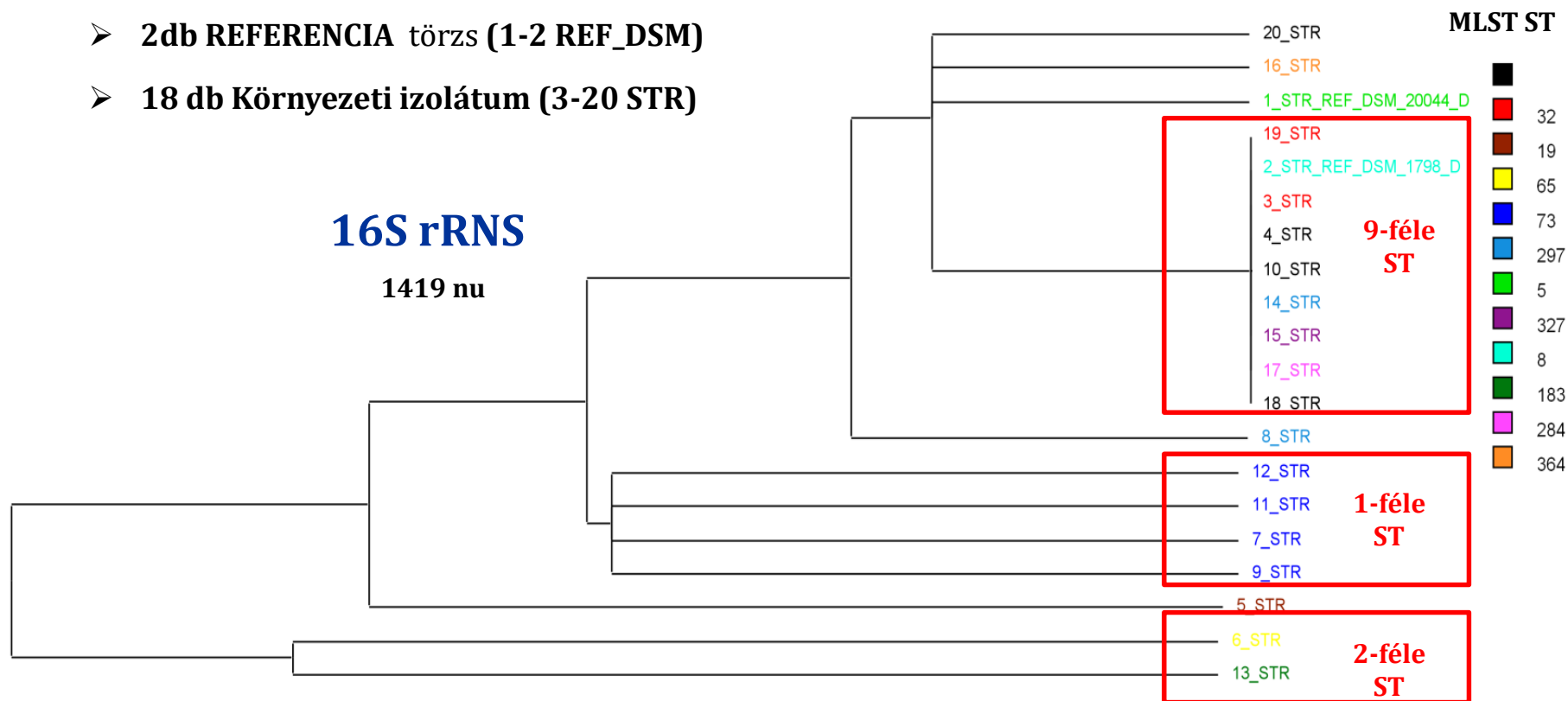


- A két legtávolabbi csoport is **99,9%-ban** identikus a teljes 16S gén szakaszon

Staphylococcus epidermidis törzsek 16S rRNS vs. MLST

➤ **VALIDÁLÁS:** 20 db *Staphylococcus epidermidis* törzs:

- 2db REFERENCIA törzs (1-2 REF_DSM)
- 18 db Környezeti izolátum (3-20 STR)



10 törzsből álló csoport, 16S alapján 100% identikus

9 db MLST ST-re különül

2 törzsből álló csoport, 16S alapján 100% identikus

2 db MLST ST-re különül

4 törzsből álló csoport, 16S alapján 100% identikus

1 db MLST ST-re különül

MLST - *Staphylococcus epidermidis* rendszer VALIDÁLÁS

- A módszer **reprodukálhatóságának** vizsgálata során a **kritérium**, hogy ugyanabból a törzsből származó párhuzamos DNS minták esetében:

Minden lókuszt, minden nukleotid pozíciója 100%-ban azonos legyen

- **FÜGGETLEN:** - párhuzamos DNS izolálások (időben és személyzetben különböző)
 - párhuzamos PCR-ek
 - párhuzamos szekvenálások
 - különböző passzázsok vizsgálatától

VALIDATION STR_#		Validálás paralell samples	MLST_sequence type MLST ST	arcC	aroE	MLST_allele type				
				gtr	mutS	pyrR	tpiA	yqiL		
REF_1 DSM_20044	1_STR_REF_DSM_20044_A	DNS-1	5	1	1	1	2	2	1	1
	1_STR_REF_DSM_20044_B	DNS-2	5	1	1	1	2	2	1	1
	1_STR_REF_DSM_20044_C1.1	DNS-3-PCR1-SEQ1	5	1	1	1	2	2	1	1
	1_STR_REF_DSM_20044_C1.2	DNS-3-PCR1-SEQ2	5	1	1	1	2	2	1	1
	1_STR_REF_DSM_20044_C1.3	DNS-3-PCR1-SEQ3	5	1	1	1	2	2	1	1
	1_STR_REF_DSM_20044_C2	DNS-3-PCR2	5	1	1	1	2	2	1	1
	1_STR_REF_DSM_20044_C3	DNS-3-PCR3	5	1	1	1	2	2	1	1
	1_STR_REF_DSM_20044_D	DNS-4	5	1	1	1	2	2	1	1
	1_STR_REF_DSM_20044_E	DNS-5	5	1	1	1	2	2	1	1
	1_STR_REF_DSM_20044_F	DNS-6-5passzázs	5	1	1	1	2	2	1	1
	1_STR_REF_DSM_20044_G	DNS-7-10passzázs	5	1	1	1	2	2	1	1
REF_2 DSM_1798	2_STR_REF_DSM_1798_A	DNS-1	8	2	1	7	1	1	1	1
	2_STR_REF_DSM_1798_B	DNS-2	8	2	1	7	1	1	1	1
	2_STR_REF_DSM_1798_C	DNS-3	8	2	1	7	1	1	1	1
	2_STR_REF_DSM_1798_D	DNS-4	8	2	1	7	1	1	1	1

1) ALKALMAZHATÓSÁG:

- Bármely izolátumra alkalmazható
- MLST rendszerek: *Staphylococcus aureus* törzsek (vs. AFLP)
Salmonella enterica törzsek (vs. szerotípus)



2) MEGKÜLÖNBÖZTETHETŐSÉG/FELBONTÁS:

- Törzsek elkülönítése
- A **felbontóképessége** ugyan kisebb bizonyos esetekben, mint PFGE, MLVA, MST



3) REPRODUKÁLHATÓSÁG:

- Jó reprodukálhatóság laboratóriumon belül és laboratóriumok között is



4) KIVITELEZHETŐSÉG:

- Elérhető technológia



(Whole Genome Multi Locus Sequence Typing) genotipizálás



Roche GS-FLX

➤ Teljes genom illesztések alapján történik - **NGS technológiák**



Life Technologies Ion Torrent

➤ „**CORE gene pool**” kb. 1800-2000 gén/lókuszt alapján

➤ Sokkal nagyobb felbontást ígér, mint a tradicionális MLST, vagy más genotipizáló módszerek (PFGE, AFLP)



Illumina HiSeq

Már elérhető, kész adatbázisok

- [*Brucella* spp.](#)
- [*Campylobacter coli* - *C. jejuni*](#)
- [*Escherichia coli* / *Shigella*](#)
- [*Klebsiella pneumoniae*](#)
- [*Legionella pneumophila*](#)
- [*Listeria monocytogenes*](#)
- [*Mycobacterium tuberculosis*](#)
- [*Salmonella enterica*](#)
- [*Staphylococcus aureus*](#)

Folyamatban levő, hamarosan elérhető adatbázisok

- *Acinetobacter baumannii*
- *Bordetella pertussis*
- *Citrobacter*
- *Clostridium botulinum*
- *Clostridium difficile*
- *Cronobacter*
- *Enterobacter cloacae* complex
- *Enterococcus faecium*
- *Enterococcus faecalis*
- *Mycobacterium abscessus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Vibrio* spp.
- *Yersinia* spp.

KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!

Import sequence
trace files
(any source)

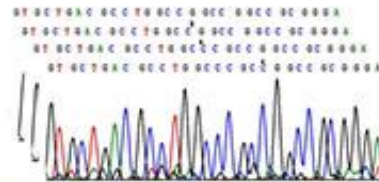
Automatic parsing of
strain number & gene
from file name

Auto forward and
reverse assembly,
auto trimming

Detailed quality
report using
color codes

For sequences with
problems: clean up
assembly interactively,
while visualizing
aligned traces

Match alleles;
store result in database



MLST screen

Key	MLST	aspA	gltA	gltB	gltC	gltD	gltE	gltF	gltG	gltH	gltI	gltJ	gltK	gltL	gltM	gltN	gltO	gltP	gltQ	gltR	gltS	gltT	gltU	gltV	gltW	gltX	gltY	gltZ
CAMP4761	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
CAMP4762	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
CAMP4763	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
CAMP4764	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
CAMP4765	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
CAMP4766	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Report for IS02 / fucC from batch 2009-05-14 14:49:27

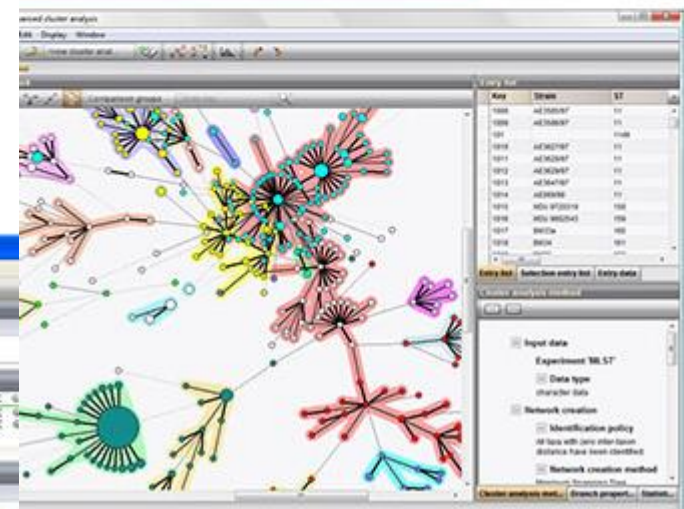
CODE	MESSAGE	STATUS	COMMENT
error	Unresolved base in consensus at position 724	new	
warning	Inconsistency in alignment at position 683 in sequence(s) 2	new	
warning	Inconsistency in alignment at position 350 in sequence(s) 1	new	
warning	Inconsistency in alignment at position 347 in sequence(s) 1	new	
info	Overwrite previous assembly from batch 2009-05-14 11:03:21		



MLST Identification

Entry IS02: MLST Identification

Allele ID	Mismatches	Assembly	Contig	Allele
3	0	358	C	T
23	1			
86	1			
200	1			
228	1			
310	1			
341	1			
449	1			
195	2			



KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!

