

MorphoCatcher: применение программного комплекса в дифференциальной диагностике бактериальных и вирусных патогенов

Научный руководитель – Беспятых Юлия Андреевна

Шишкин Фёдор Владимирович

Аспирант

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Факультет химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов (ХФТ), Москва, Россия

E-mail: shrshkv@ya.ru

Доступность полногеномного секвенирования и дальнейшее совершенствование алгоритмов расчёта геномных индексов родства повысили точность микробиологических исследований. Благодаря появлению метода цифровой ДНК:ДНК-гибридизации (от англ. *digital DNA:DNA hybridization*, dDDH) были разработаны надёжные критерии биологического вида у прокариот [1], что привело к уточнению систематического положения ряда микроорганизмов и появлению новых таксонов разного уровня. Несмотря на множество изменений в классификации бактерий и вирусов, в литературе достаточно мало внимания отводится роли таксономии и филогеномики патогенов в разработке новых способов их дифференциальной диагностики методами амплификации нуклеиновых кислот, хотя именно эти данные имеют важное значение как на этапе поиска гена-мишени, так и при создании коллекций штаммов для оценки аналитической специфичности тест-системы. Подбор мишеней в геноме целевого таксона патогена в свою очередь является ключевым этапом в разработке новых тест-систем. Недавно предложенный алгоритм MorphoCatcher (<http://morphocatcher.ru>) [2] позволяет выявлять в кандидатных нуклеотидных последовательностях скопления таксон-специфичных нуклеотидных полиморфизмов и размещать их на концах олигонуклеотидных праймеров, помогая повысить селективность отжига набора праймеров в отношении одного из близкородственных таксонов. В дальнейшем были разработаны дополнительные скрипты и алгоритмы, расширяющие применимость всего программного комплекса в целом при создании тест-систем с помощью ПЦР и подходов на основе CRISPR-Cas, таких как SHERLOCK, DETECTR, HOLMES и др.

Цель: провести апробацию программного комплекса MorphoCatcher при разработке тест-систем на этапе поиска различных типов генов-мишеней, подходящих для дифференциальной диагностики бактериальных и вирусных патогенов.

Задачи:

- 1) Разработать алгоритм формирования инклюзивной и эксклюзивной панели бактериальных штаммов, содержащих целевые и близкородственные виды соответственно, используя результаты сравнительного анализа полных геномов по значениям dDDH;
- 2) Разработать алгоритм анализа полных геномов вирусов для их распределения в инклюзивную и эксклюзивную панели, последующего множественного выравнивания и идентификации нуклеотидных полиморфизмов, характерных для конкретного вида или генотипа вирусов;
- 3) Продемонстрировать применимость MorphoCatcher для поиска видоспецифичных участков в бактериальных генах домашнего хозяйства, а также уникальных генов, специфичных только для целевого вида бактерий.

Результаты и обсуждение:

Особенность используемого в MorphoCatcher подхода заключается в предварительном филогеномном анализе известных штаммов для их последующего распределения в инклюзивную или эксклюзивную панель. Для бактериальных патогенов сравнение значений dDDH на основе полных геномов позволяет достоверно распределить геномы бактерий на уровне вида. При необходимости разрешения таксонов более высокого уровня, таких как род и семейство, значения dDDH могут быть посчитаны для последовательностей гена 16S рРНК. Для вирусных патогенов филогеномный анализ и кластеризация геномов проводятся с применением алгоритмов UPGMA или NJ, исходя из объёма анализируемой выборки.

Разработанный алгоритм MorphoCatcher был успешно апробирован для видоспецифичной диагностики бактериальных патогенов картофеля из рода *Dickeya* методом петлевой изотермической амплификации (LAMP). В качестве гена-мишени был выбран консервативный ген домашнего хозяйства *infB*, в котором были идентифицированы скопления видоспецифичных нуклеотидных полиморфизмов, подходящие для дифференциации наиболее агрессивных видов — *D. solani*, *D. dianthicola* и *D. dadantii*. Экспериментально показано, что различия в последовательности сайтов отжига праймеров можно использовать для быстрой идентификации вида по геномной ДНК в одинаковой концентрации.

Филогеномный анализ известных представителей *Dickeya* и *Pectobacterium* позволяет в перспективе выявить потенциальные видоспецифичные мишени для всех известных видов этих фитопатогенов. Кроме того, это помогает контролировать горизонтальный транспорт гена *evf*, который является перспективным маркером штаммов, способных к персистенции в насекомых-векторах. Впервые в рамках представленной работы наличие этого гена было соотнесено именно с видом *P. versatile*. Сегодня гомологи гена *evf* уже найдены в штаммах *P. odoriferum* и *P. polonicum*. Обнаружен гомолог *evf* в геноме *Cedecea* sp. ND14a.

Другой вариант применения алгоритма MorphoCatcher подразумевает анализ полных вирусных геномов и выявление областей нуклеотидной последовательности, характерных либо для различных видов вирусов, либо генотипов вируса. На данный момент показана применимость алгоритма при анализе близкородственных видов коронавирусов, вирусов иммунодефицита человека, а также флавивирусов с природными генотипами — вируса Зика, вируса лихорадки денге и вируса гепатита С.

Кроме того, один из алгоритмов программного комплекса MorphoCatcher предназначен для поиска уникальных генов целевого таксона, что актуально для диагностики бактериальных патогенов. Проведённый сравнительный анализ полных геномов представителей семейства *Mycobacteriaceae*, объединяющего более 200 различных видов микобактерий, позволил обнаружить гены, уникальные для всех известных вариантов *M. tuberculosis* и отсутствовавшие в геномах нетуберкулёзных микобактерий и бактерий других видов. Один из консервативных и важных с точки зрения физиологии возбудителя туберкулёза ген, обозначаемый как *rv2341*, уже успешно применён в качестве мишени при создании тест-системы ТБ-ИЗАТЕСТ на основе метода LAMP [3]. Уточнено распространение гена *rv2341* среди известных вариантов *M. tuberculosis*. Получен ряд дополнительных фактов несоответствия критериям видоспецифичности некоторых мишеней, часто применяемых в диагностике *M. tuberculosis*, включая последовательность IS6110.

Источники и литература

- 1) Meier-Kolthoff & Göker, 2019. *Nat Commun.* 10(1):2182.
- 2) Shirshikov *et al.*, 2019. *PeerJ.* 7:e6801.
- 3) Shirshikov & Bespyatykh, 2023. *Russ J Bioorg Chem.* 49(6):1279–92.