

Проблемы генотипирования микроорганизмов

Р. А. Волкова¹, Е. С. Сколотнева², Е. В. Эльберт¹, Е. Д. Мыца¹, Д. С. Давыдов¹,
А. А. Мовсесянц¹, В. А. Меркулов¹, В. П. Бондарев¹, И. В. Борисевич¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Поступила 29.07.2015. Принята к публикации 18.08.2016.

Успешность генотипирования микроорганизмов зависит от разрешающей способности метода, которая в свою очередь зависит от выбора наиболее информативного участка генома, используемых ферментов и праймеров, а также условий рестрикции генома и ПЦР амплификации. Методы анализа быстро эволюционирующих маркеров, для методов MST, MLVA, DGE, HRM, обычно, обладают большей дифференцирующей способностью, чем те, которые опираются на слабо эволюционирующие маркеры (метод MLST). Степень разрешения выше у методов типирования, зависящих от предварительной информации о ДНК матрице (PFGE, AFLP, RFLP, ДНК микрочипы), по сравнению с методами, в которых аналитические мишени ограничиваются определенными локусами (риботипирование, RFLP-PCR). Мониторинг локальных вспышек эпидемий может осуществляться при использовании быстро эволюционирующих маркеров такими методами, как RAPD-PCR, MST, или MLVA, DGE, HRM. Для длительных эпидемиологических наблюдений или популяционных исследований более пригодны маркеры консервативных участков и стабильно воспроизводимые методы (MLST, PFGE, риботипирование), а также секвенирование полноразмерного генома. Для генотипирования микроорганизмов из полимикробных образцов целесообразно использование методов, специфичных к искомой матрице (PCR-RFLP, MLVA, DGE, HRM, MLST, MST, ДНК микрочипы). При установлении вида для полимикробных образцов оптимальным решением является изучение метагенома: совокупности генома определенного экологического сообщества бактерий. В этом случае предпочтительным является анализ высоко консервативных последовательностей ДНК, подобно гену 16S рРНК. Успехи генотипирования бактериальных штаммов позволяют исследовать взаимосвязь между генотипом и фенотипом путем филогенетического анализа генетических дистанций между штаммами в нескольких поколениях, что важно для характеристик, значимых с точки зрения эпидемиологии (вирулентностью, устойчивостью к антибиотикам и другим). Разработаны компьютеризированные методы соотнесения фенотипических профилей с отсеквенированными последовательностями генома. Полногеномное секвенирование является оптимальной методикой типирования штаммов, однако высокая стоимость и необходимость использования достаточно большого количества очищенной ДНК матрицы пока ограничивает его применение.

Ключевые слова: генотипирование; микроорганизмы; молекулярно-генетические методы.

Библиографическое описание: Волкова РА, Сколотнева ЕС, Эльберт ЕВ, Мыца ЕД, Давыдов ДС, Мовсесянц АА, Меркулов ВА, Бондарев ВП, Борисевич ИВ. Проблемы генотипирования микроорганизмов. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (3): 139–144.

Виды бактерий являются гетерогенными таксонами. Изучение генетического разнообразия микроорганизмов дает возможность понимать происхождение инфекций и контролировать их вспышки. Более 160 видов микроорганизмов являются патогенными [1]. Такие возбудители, как *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella* spp., *Francisella tularensis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia malle*, требуют непрерывного наблюдения [2].

В настоящий момент для оценки гетерогенности микроорганизмов используются методы генотипирования, которые можно разделить на следующие группы: фрагментный ДНК анализ, прямые методы (на основе секвенирования специфических участков ДНК, ДНК микрочипы, полногеномное секвенирование) и косвенные методы (электрофорез в денатурирующей системе, анализ кривых плавления) [3, 4], при этом способ идентификации продуктов анализа может быть электрофоретический или использующий секвенирование нуклеотидных последовательностей (рис. 1).

Фрагментный ДНК анализ включает различные методы получения фингерпринтов. Анализ фрагментов, полученных с помощью рестрикционного расщепления матри-

цы либо ПЦР амплификации выбранных участков ДНК включает следующие методы: гель-электрофорез в пульсирующем поле (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* PFGE), анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (*RFLP — Restriction Fragment Length Polymorphism*), в том числе риботипирование, полиморфизм длин произвольно амплифицированных фрагментов ДНК (ПЦР с неспецифическими праймерами RAPD-PCR (*Random Amplification of Polymorphic DNA*)), ПЦР амплификация повторяющихся последовательностей экстрагенных полиндромов, многолокусный анализ переменного числа копий tandemных повторов (*Multiple Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis* MLVA). Фингерпринтинг на основе анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (*Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP)) удачно совмещает возможности эндонуклеаз рестрикции и ПЦР амплификации.

Процедуры получения молекулярных маркеров для прямых методов MLST (*Multilocus Sequence Typing*, типирование по мультилокусным сиквенсам) и MST (*Multispacer Sequencing Typing*, типирование по множеству отсеквенированных участков) реализуются с помощью секвенирование специфических последовательностей тестируемого гено-

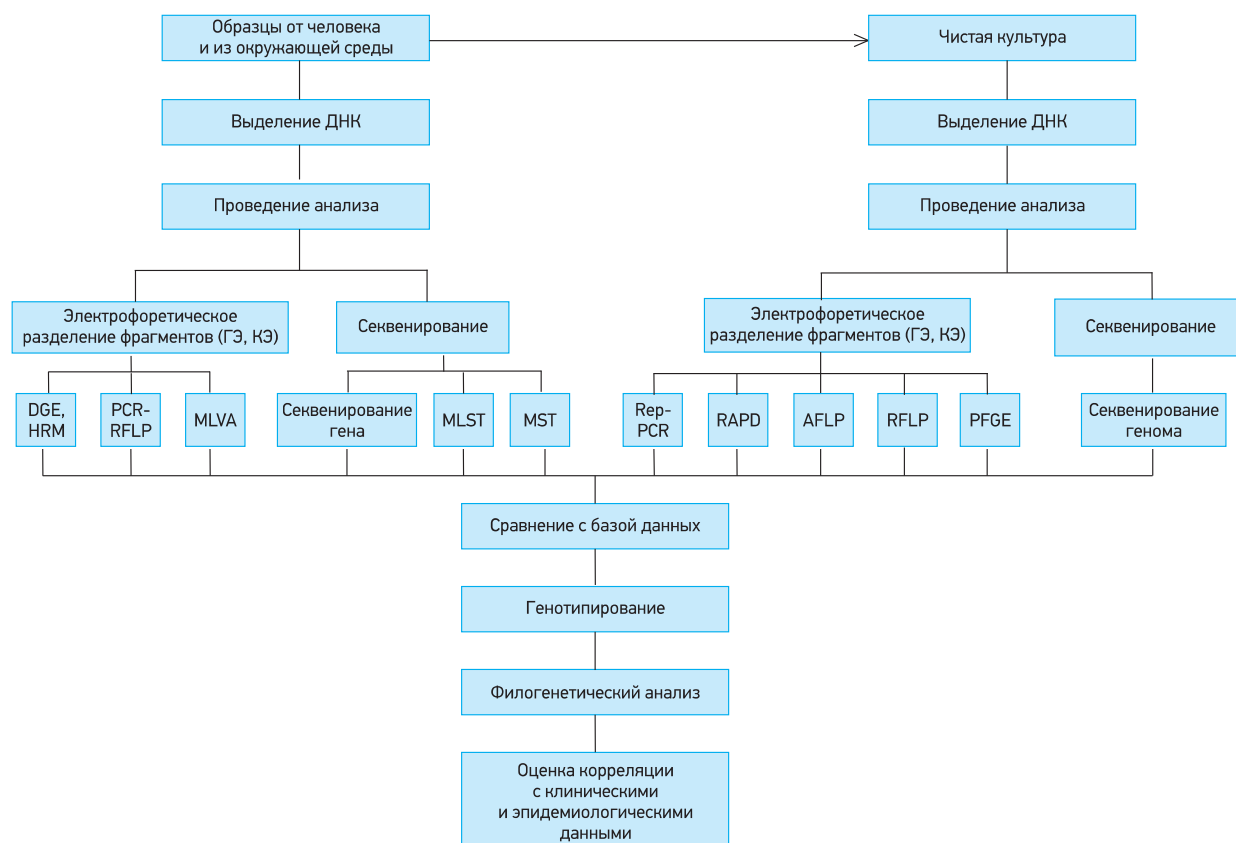


Рис 1. Схема использования молекулярно-генетических методов типирования микроорганизмов в зависимости от источника нуклеиновых кислот.

ма; в основе анализа матрицы на ДНК микрочипах (DNA microarrays) лежит метод ДНК гибридизации.

Косвенные методы DGE (*Denaturing Gel Electrophoresis, электрофорез в денатурирующей системе*) и HRM (*High-Resolution Melting Analysis, высокочувствительный анализ кривых плавления*), позволяют оценить нуклеотидный состав ПЦР продуктов с помощью анализа температуры плавления денатурированных комплексов нуклеиновых кислот.

Идеальный метод генотипирования должен обладать следующими характеристиками: подходить для всех штаммов, различать неидентичные штаммы, одинаково эффективно воспроизводиться в различных лабораториях, быть быстрым, экономичным, нетрудоемким. Однако среди доступных в настоящее время методов генотипирования ни один не может быть назван универсальным, и отвечать сразу всем указанным критериям.

Различными методами могут быть достигнуты две основные цели генотипирования. Мониторинг локальных вспышек эпидемий может осуществляться при использовании быстро эволюционирующих маркеров, используя такие методы, как RAPD-PCR [5, 6], MST [7, 8], или MLVA [9], DGE, HRM [10]. Напротив, для длительных эпидемиологических наблюдений либо популяционных исследований более пригодными являются консервативные и стабильно воспроизводимые методы, основанные на молекулярном маркировании с помощью методов MLST, PFGE, риботипирования или же на секвенировании полноразмерного генома [11] (рис. 2).

Дифференцирующие возможности, или же степень разрешения (*resolution*), определяющие способность ме-

тогда различить бактериальные штаммы конкретного вида, являются одним из наиболее важных критериев для выбора метода генотипирования объекта исследования. Например, популяции микроорганизмов могут быть расценены как идентичные при использовании фенотипического анализа или генотипирования со слабым разрешением, но в то же время генотипирование с высокими дифференцирующими возможностями обнаружит их различие. Такими свойствами, например, обладают молекулярные маркеры, полученные с помощью метода RAPD-PCR и AFLP, благодаря чему они позволяют оценить стабильность штаммов микроорганизмов при ведении коллекций и производстве лечебных, профилактических и диагностических препаратов [12]. Обычно, методы анализа с использованием быстро эволюционирующих маркеров такими методами, как MST, MLVA, DGE, HRM, обладают большими дифференцирующими способностями, чем те, которые опираются на слабо эволюционирующие маркеры (метод MLST). Степень разрешения методов типирования, зависящих от предварительной информации о ДНК матрице, гораздо выше тех, чьи аналитические мишени ограничиваются определенными локусами. К первой описанной категории можно отнести методы PFGE, AFLP, RFLP, а также с использованием ДНК микрочипов, при этом их можно противопоставить риботипированию и генотипированию с помощью RFLP-PCR. Кроме того, разрешающая способность метода зависит от множества других факторов, главные из которых это выбор наиболее информативного участка генома, т.е. выбор используемых ферментов и праймеров, а также условия рестрикции генома и ПЦР амплификации. Вдобавок, большинство методов геноти-

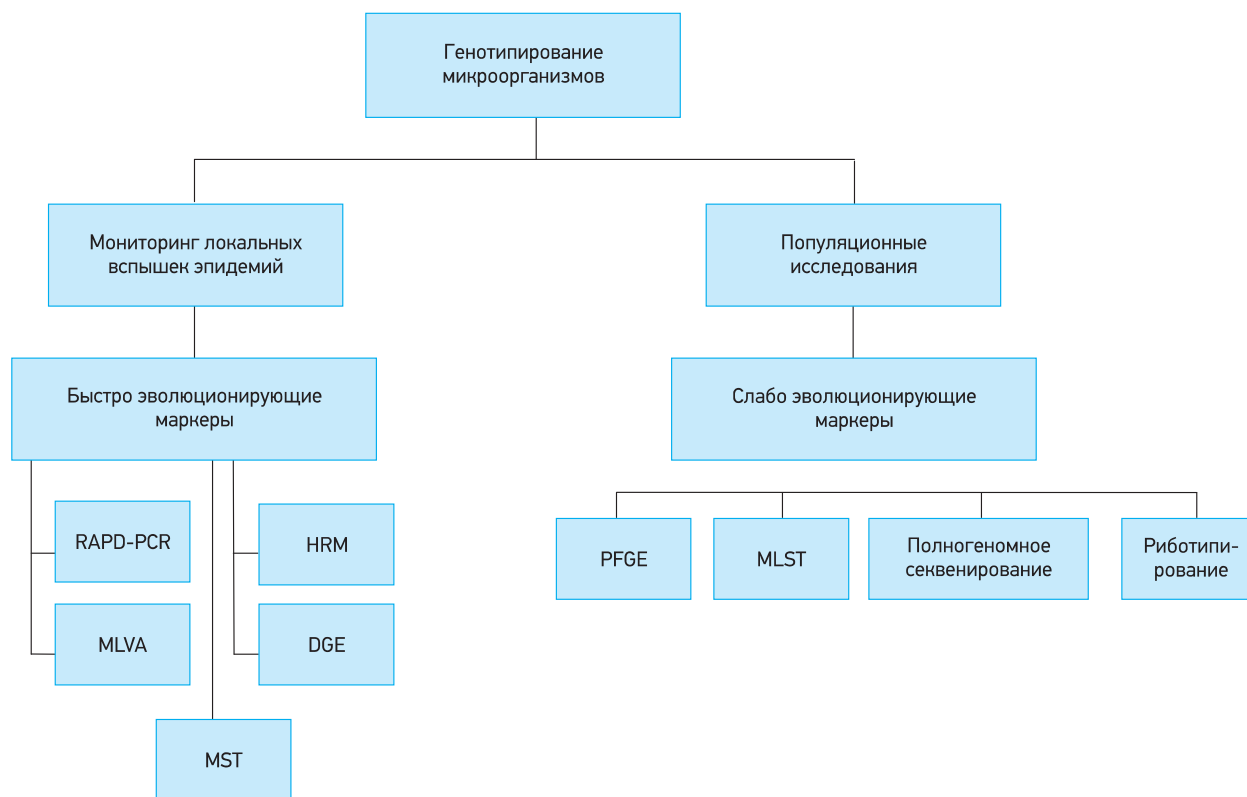


Рис. 2. Методы типирования микроорганизмов в зависимости от задачи исследований.

пирования проявляют специфичность по отношению к бактериальным штаммам, вследствие чего они с различной эффективностью дифференцируют тот или иной вид.

Воспроизводимость результатов генотипирования, т.е. возможность получить те же результаты вне зависимости от того, где был выполнен тест, внутри одной лаборатории или между лабораториями, является важным требованием к методу ДНК фингерпринтинга и позволяет осуществлять глобальный эпидемиологический контроль инфекционных заболеваний. Обычно, результаты фрагментного анализа ДНК труднее воспроизвести и сравнить между лабораториями, нежели результаты генотипирования, основанного на секвенировании последовательностей ДНК.

Природные образцы (т.е. от человека и из окружающей среды) являются, как правило, полимикробными. Для генотипирования микроорганизмов из такого рода образцов целесообразно использование методов, специфичных к искомой матрице, так как обычно затруднена возможность выделения чистой культуры. Это генотипирование с помощью методов PCR-RFLP, MLVA, DGE, HRM, MLST, MST и получение ДНК микрочипов [13, 14]. Методы фингерпринтинга с неспецифическими праймерами, такие как AFLP, RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) и REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic sequence-based PCR*) едва ли применимы при генотипировании полимикробных образцов. Также непригодными здесь оказываются методы, требующие для своей реализации большого количества очищенной геномной ДНК. Это касается методов PFGE, RFLP и олигонуклеотидных микрочипов.

При выборе метода типирования существенным фактором являются стоимость реагентов и оборудования, трудоемкость и сложность процедуры, время, требующееся для получения результатов и их интерпретации, воспроиз-

водимость при межлабораторных испытаниях, возможность обмена информацией в базе данных on-line и международной номенклатуре [15]. Как правило, при сравнении с методами, основанными на секвенировании ДНК и нуждающимися в дорогостоящем оборудовании для определения нуклеотидной последовательности, методы фрагментного анализа генома оказываются менее дорогими, но при этом уступают первым своей дифференцирующей способностью и воспроизводимостью результатов. Достаточно надежная информация на сегодняшний день обеспечивается ДНК микрочипами, однако стоимость их получения превосходит затраты на выполнение фрагментного анализа генома.

Поскольку внутривидовое разнообразие является результатом точковых мутаций, вставок, делеций или рекомбинации, то частота генетического обмена между штаммами должна приниматься во внимание при составлении алгоритма исследования вида. Некоторые представители родов *Streptococcus*, *Neisseria*, *Helicobacter*, *Salmonella* являются высоко полиморфными. Поэтому для типирования бактериальных штаммов таких видов необходимо анализировать несколько молекулярных маркеров. При этом сравнение нуклеотидных последовательностей генома нескольких штаммов может облегчить выбор подходящих для данного вида маркеров. Например, для *Staphylococcus aureus* было обнаружено, что разрешающая способность молекулярных маркеров, получаемых с помощью секвенирования набора генов, кодирующих суперантигенподобные белки (superantigenlike proteins) set2, set5, set7, превышает даже возможности метода MLST генотипирования [16].

В последние годы появилось множество работ, посвященных поиску оптимальных методов генотипирования для конкретных видов. Так, дифференциация высо-

копатогенного серотипа *Listeria monocytogenes* 4b с помощью методов риботипирования, PFGE и MLVA обнаружила, что наиболее приемлемой является разрешающая способность метода MLVA [17]. По результатам сравнительного анализа PFGE и REP-PCR маркеров для вида *Enterococcus faecium* рекомендовано применение REP-PCR генотипирования [18]. Для выявления внутривидового разнообразия *Yersinia pseudotuberculosis* одинаково эффективно могут быть использованы высокочувствительные методы MLVA и HRM, поэтому выбор исследователя будет определяться экономичностью и доступностью метода, по этим признакам метод HRM имеет преимущество [19].

Важной проблемой в микробиологии является идентификация видов. Некоторые методы генотипирования штаммов, основанные на использовании относительно консервативных маркеров, таких как MLST профиль, риботип, нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК и межгенного ITS региона, подходят также и для видовой идентификации. Напротив, быстро эволюционирующие маркеры, такие как VNTR профили (*Variable number tandem repeat* — варьирующее число tandemных повторов), нуклеотидный состав некодирующих последовательностей ДНК, генов горизонтального переноса, не пригодны для идентификации вида и могут привести к ошибочной паспортизации тестируемого образца. Полимикробные образцы, содержащие различные виды микроорганизмов, получение чистой культуры которых крайне затруднительно или невозможно, особенно проблематичны для видовой паспортизации. Оптимальным решением в этом случае является применение метагеномных методов исследования полимикробного образца, то есть изучение его метагенома: совокупности генома определенного экологического сообщества бактерий. В этом случае предпочтительным является анализ высоко консервативных последовательностей ДНК, подобно гену 16S рРНК [20].

Успехи генотипирования бактериальных штаммов позволяют подойти к решению еще одной важной задачи: нахождению взаимосвязей между генотипом и фенотипом, в том числе значимых с точки зрения эпидемиологии (например, такими характеристиками как вирулентность, устойчивость к антибиотикам, географическое происхождение штамма, признаки, обеспечивающие резкое повышение общего уровня адаптации микроорганизма). Несмотря на то, что большинство молекулярных маркеров, используемых при типировании бактериальных штаммов, не имеют непосредственного отношения к генам вирулентности или устойчивости к антибиотикам, возможно обнаружить корреляцию между специфическими генотипами и фенотипическими или эпидемиологическими признаками путем филогенетического анализа генетических дистанций между штаммами в нескольких поколениях. Генетической расшифровке признаков, имеющих прикладное значение, также способствует накопление в общих базах данных информации о результатах генотипирования бактериальных штаммов с помощью различных методов [18]. Разработаны компьютеризированные методы соотнесения фенотипических профилей с отсеквенированными последовательностями генома [21, 22].

Полногеномное секвенирование позволяет характеризовать все генетические особенности исследуемого вида и поэтому является оптимальной методикой типирования штаммов [23–25]. Широкому использованию данной методики препятствует ряд ограничений, все еще актуальных в настоящий момент: это, в первую очередь, высо-

кая стоимость и необходимость использования достаточно большого количества очищенной ДНК матрицы. Самыми доступными и в то же время надежными пока еще являются результаты секвенирования небольших нуклеотидных последовательностей, что определяет их трудоемкость, так как обработка информации такого рода требует привлечения методов выравнивания, объединения и анализа дискретных данных о геноме. Однако, исходя из темпов развития молекулярных методов, широкого применения пиросеквенирования [26, 27], разработки стратегий, позволяющих секвенировать ДНК материал одной единственной клетки, предпосылок увеличения длины определяемой нуклеотидной последовательности, можно ожидать, что полногеномное секвенирование выйдет на ведущие позиции среди прочих методов типирования уже в скором будущем.

Литература

1. Yang Y, Wang J, Wen H, Liu H. Comparison of two suspension arrays for simultaneous detection of five bioterror bacterial in powder samples. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 831052. doi: 10.1155/2012/831052.
2. Бондарева ОС, Савченко СС, Ткаченко ГА, Абуева АИ, Муратова ЮО, Антонов ВА. Современные подходы к генотипированию возбудителей особо опасных инфекций. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2014; (1): 34–44.
3. Сколотнева ЕС, Волкова РА, Эльберт ЕВ, Миронов АН, Меркулов ВА, Бондарев ВП, Борисевич ИВ. Методы генотипирования бактерий: фрагментный анализ. *Биопрепараты* 2014; (2): 13–21.
4. Волкова РА, Сколотнева ЕС, Эльберт ЕВ, Мыца ЕД, Миронов АН, Меркулов ВА, Бондарев ВП, Борисевич ИВ. Прямые и косвенные методы определения нуклеотидного состава ДНК последовательностей микроорганизмов. *Биопрепараты* 2015; (2): 9–16.
5. Power EG. RAPD typing in microbiology — a technical review. *J Hosp Infect.* 1996; 34: 247–65.
6. Rezk NA, Mansour H, Ghoneim NH, Rifaat MM. Typing of *Salmonella typhi* strains isolated from Egypt by RAPD PCR. *Biochem.* 2012; 2(1): 17–25.
7. Fournier PE, Zhu Y, Ogata H, Raoult D. Use of highly variable intergenic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 5757–66.
8. Li W, Chomel BB, Maruyama S, Guptil L, Sander A, Raoult D, et al. Multispacer typing to study the genotypic distribution of *Bartonella henselae* populations. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 2499–506.
9. van Belkum A, Scherer S, Verbrugh H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol R.* 1998; 62: 275–93.
10. Li W, Raoult D, Fournier P. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33(5): 892–916.
11. Cooper JE, Feil EJ. Multilocus sequence typing — what is resolved? *Trends Microbiol.* 2004; 12: 373–7.
12. Сухих ГТ, Павлова ГВ, Рысков АП, Бутовская ПР, Мартыросян ИА. Способ контроля за генетической изменчивостью в культуре животных клеток различной длительности пассирования. Патент Российской Федерации, № 2392330 С2; 2006.
13. Kellenberger E. Exploring the unknown. The silent revolution of microbiology. *EMBO Rep.* 2001; (2): 5–7.
14. Rappe MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57: 369–94.
15. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, S6-Lezo R, van Dijk JM, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 2013; 18(4): 20380.
16. Aguiar-Alves F, Medeiros F, Fernandes O, Pereira RM, Perdreau-Remington F, Riley L. New *Staphylococcus aureus* genotyping method based on exotoxin (set) genes. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 2728–32.
17. Miya S, Kimura B, Sato M, Takahashi H, Ishikawa T, Suda T, et al. Development of a multilocus variable-number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains. *Int J Food Microbiol.* 2008; 124(3): 239–49.

18. Chuang Y, Wang J, Chen M, Chen YC. Comparison of an automated repetitive-sequence-based PCR microbial typing system with pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 2897–901.
19. Souza RA, Falcao JP. A novel high-resolution melting analysis-based method for *Yersinia pseudotuberculosis* genotyping. *J Microbiol Meth.* 2012; 91(3): 329–35.
20. Knight R, Jansson J, Field D, Fierer N, Desai N, Fuhrman JA, et al. Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. *Nature Biotechnology* 2012; 30: 513–20.
21. Antonov AV, Mewes HW. Complex phylogenetic profiling reveals fundamental genotype–phenotype associations. *Comput Biol Chem.* 2008; 32: 412–6.
22. Benfey PN, Mitchell-Olds T. From genotype to phenotype: systems biology meets natural variation. *Science.* 2008; 320: 495–7.
23. Harris SR, Cartwright EJP, Török ME, et al. Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13(2): 130–6.
24. Тололян АА. Современные подходы и технологии в инфекционной эпидемиологии (на примере инфекций, вызываемых патогенными стрептококками). *Журнал инфектологии* 2012; 4(3): 88–100.
25. Koser CU, Ellington MJ, Cartwright EJP, Gillespie SH, Brown NM, Farrington M, et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathogen* 2012; 8(8): 1–9.
26. Алексеева АЕ, Бруснигина НФ. Возможности и перспективы применения методов массивного параллельного секвенирования в диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями (аналитический обзор). *Медиаль* 2014; 2(12): 1–28.
27. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genetics.* 2011; 52(4): 413–35.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний, д-р биол. наук. Эльберт Елизавета Викторовна. Ведущий эксперт лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний, канд. биол. наук.

Мыца Елена Дмитриевна. Эксперт 2-й категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний.

Давыдов Дмитрий Сергеевич. Начальник лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов, канд. биол. наук.

Мовсесянц Арташес Авакович. Начальник Испытательного Центра экспертизы качества МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р мед. наук, профессор.

Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Борисевич Игорь Владимирович. Директор Центра планирования и координации НИР, д-р мед. наук, профессор.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова. Биологический факультет. Российская Федерация, 119992, Москва, Ленинские горы, 1.

Сколотнева Екатерина Сергеевна. Научный сотрудник, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Волкова Рауза Асхатовна; volkova@expmed.ru

Genotyping problems of microorganisms

R. A. Volkova¹, E. S. Skolotneva², E. V. Elbert¹, E. D. Mytsa², D. S. Davydov¹,
A. A. Movsesyants¹, V. A. Merkulov¹, V. P. Bondarev¹, I. V. Borisevich¹

¹ Federal State Budgetary Institution “Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² Moscow Lomonosov State University, Biological faculty, Moscow, Russia

Genotyping efficiency depends on resolution of methods which provided by the target sequence of genome, efficiency of enzymes, primers and conditions of DNA restriction and PCR amplification. The most differential tools are methods involving the high evolutionary markers. They are methods MST, MLVA, DGE, HRM against to the method MLST based on the slow evolutionary marker. Methods PFGE, AFLP, DNA chips exploit the preliminary information of genome and have the better resolution than ribotyping and RFLP-PCR limited by certain loci. Monitoring of local outbreaks may be carried out using a rapidly evolving markers (methods RAPD-PCR, MST, or MLVA, DGE, HRM). The most suitable methods for prolonged epidemiological or population researches are MLST, PFGE, ribotyping and pyrosequencing analysis. Polymicrobial samples are investigated with DNA specific methods PCR-RFLP, MLVA, DGE, HRM, MLST, MST, DNA chips. The metagenomic analysis is the most informative to identify the species of bacterium from the polymicrobial sample. It is essential to use the conservative DNA sequences, for example 16S rRNA. The modern genotyping assays provide the informative and technological platform for phylogenetic studies of bacterial strains even through the several generations. The important results are figures of genetic distances between strains involving in complex of epidemiological characteristics: virulence, antibiotic resistance and the others. The computing tools for integration the phenotyping and sequencing data have developed. Whole-genome sequencing is the optimal method for bacterial genotyping. But there are several crucial restrictions of this method. It is still rather expensive and needs to operate with high quality DNA.

Key words: genotyping; microorganisms; molecular-genetic methods.

For citation: RA Volkova, ES Skolotneva, EV Elbert, ED Mytsa, DS Davydov, Movsesyants AA, Merkulov VA, Bondarev VP, Borisevich IV. Genotyping problems of microorganisms. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(3): 139–144.

References

- Yang Y, Wang J, Wen H, Liu H. Comparison of two suspension arrays for simultaneous detection of five biothreat bacterial in powder samples. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 831052. doi: 10.1155/2012/831052.
- Bondareva OS, Savchenko SS, Tkachenko GA, Abueva AI, Muratova SO, Antonov VA. Modern approaches to genotyping of pathogens of especially dangerous infections. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni* 2014; (1): 34–44 (in Russian).
- Skolotneva ES, Volkova RA, Elbert EV, Mironov AN, Merkulov VA, Bondarev VP, Borisevich IV. Bacterial genotyping methods: banding pattern-based analysis. *Biopreparaty* 2014; (2): 13–21 (in Russian).
- Volkova RA, Skolotneva ES, Elbert EV, Mytsa ED, Merkulov VA, Bondarev VP, Borisevich IV. Direct and indirect methods of determining DNA nucleotide sequences in microorganisms. *Biopreparaty* 2015; (2): 9–16 (in Russian).
- Power EG. RAPD typing in microbiology — a technical review. *J Hosp Infect.* 1996; 34: 247–65.
- Rezk NA, Mansour H, Ghoneim NH, Rifaat MM. Typing of *Salmonella typhi* strains isolated from Egypt by RAPD PCR. *Biohech.* 2012; 2(1): 17–25.
- Fournier PE, Zhu Y, Ogata H, Raoult D. Use of highly variable intergenetic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 5757–66.
- Li W, Chomel BB, Maruyama S, Guptil L, Sander A, Raoult D, et al. Multispacer typing to study the genotypic distribution of *Bartonella henselae* populations. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 2499–506.
- van Belkum A, Scherer S, Verbrugh H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol R.* 1998; 62: 275–93.
- Li W, Raoult D, Fournier P. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Rev.* 2009; 33(5): 892–916.
- Cooper JE, Feil EJ. Multilocus sequence typing — what is resolved? *Trends Microbiol.* 2004; 12: 373–7.
- Suhiih GT, Pavlova GV, Ryskov AP, Butovskaya PR, Martirosyan IA. The method of monitoring the genetic variability in animal cell culture passage of varying duration. Patent RF, № 2392330 C2; 2006 (in Russian).
- Kellenberger E. Exploring the unknown. The silent revolution of microbiology. *EMBO Rep.* 2001; (2): 5–7.
- Rappe MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57: 369–94.
- Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, S6-Lezo R, van Dijn JM, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 2013; 18(4): 20380.
- Aguiar-Alves F, Medeiros F, Fernandes O, Pereira RM, Perdreau-Remington F, Riley L. New *Staphylococcus aureus* genotyping method based on exotoxin (set) genes. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 2728–32.
- Miya S, Kimura B, Sato M, Takahashi H, Ishikawa T, Suda T, et al. Development of a multilocus variable-number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains. *Int J Food Microbiol.* 2008; 124(3): 239–49.
- Chuang Y, Wang J, Chen M, Chen YC. Comparison of an automated repetitive-sequence-based PCR microbial typing system with pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 2897–901.
- Souza RA, Falcao JP. A novel high-resolution melting analysis-based method for *Yersinia pseudotuberculosis* genotyping. *J Microbiol Meth.* 2012; 91(3): 329–35.
- Knight R, Jansson J, Field D, Fierer N, Desai N, Fuhrman JA, et al. Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. *Nature Biotechnology* 2012; 30: 513–20.
- Antonov AV, Mewes HW. Complex phylogenetic profiling reveals fundamental genotype–phenotype associations. *Comput Biol Chem.* 2008; 32: 412–6.
- Benfey PN, Mitchell-Olds T. From genotype to phenotype: systems biology meets natural variation. *Science.* 2008; 320: 495–7.
- Harris SR, Cartwright EJP, Török ME, et al. Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13(2): 130–6.
- Totolyan AA. Modern technologies and approaches in the epidemiology of infectious (for example, infections caused by pathogenic streptococci). *Zhurnal infektologii* 2012; 4(3): 88–100 (in Russian).
- Koser CU, Ellington MJ, Cartwright EJP, Gillespie SH, Brown NM, Farrington M, et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathogen* 2012; 8(8): 1–9.
- Alekseeva AE, Brusnigina NF. Opportunities and prospects of massive parallel sequencing methods in the diagnosis and epidemiological surveillance of communicable diseases (analytical review). *Medial* 2014; 2(12): 1–28 (in Russian).
- Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genetics.* 2011; 52(4): 413–35.

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Volkova RA. Head of the Laboratory of molecular biology and genetic testing methods. Doctor of Biological Sciences.

Elbert EV. Leading expert of the Laboratory of molecular biology and genetic testing methods. Candidate of Biological Sciences.

Mytsa ED. 2nd professional category expert of the Laboratory of molecular biology and genetic testing methods.

Davydov DS. Head of the Laboratory of bacteriophages, probiotics and culture collection. Candidate of Biological Sciences.

Movsesyants AA. Head of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Merkulov VA. Deputy Director-General for the expertise of drugs. Doctor of Medical Sciences, professor.

Bondarev VP. Director of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Borisevich IV. Director of Center for the planning and coordination of scientific research. Doctor of Medical Sciences, professor.

Moscow State University, Biological faculty. Leninskie gory 1, Moscow 119992, Russian Federation.

Skolotneva ES. Researcher. Candidate of Biological Sciences.