

Secvențierea 16S

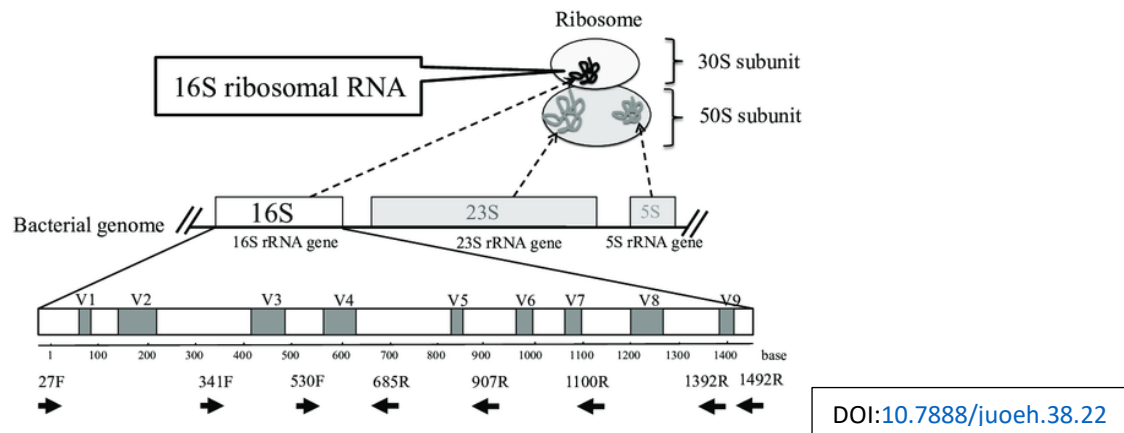
ARNr 16S

Ribozomii sunt complexe macromoleculare prezente în toate celulele, formate din proteine și subunități de ARN ribozomal (ARNr), cu rol în procesul de sinteză a proteinelor. Ribozomii sunt compuși din două componente: subunitatea ribozomală mică (30S în celulele procariote, 40S în celulele eucariote), și subunitatea ribozomală mare (50S în celulele procariote, 60S în celulele eucariote). Fiecare subunitate conține una sau mai multe molecule de ARN (ARNr) și o varietate de proteine. ARNr reprezintă aproape două treimi din masa unui ribozom, unde îndeplinește atât un rol structural, formând arhitectura ribozomului, cât și catalitic, fiind implicat direct în sinteza proteinelor.

Procariotele prezintă trei tipuri de ARNr, diferențiate în funcție de rata de sedimentare la ultracentrifugare (măsurată în Svedberg): 23S, 16S și 5S. ARNr 16S este codificat de gena ARNr 16S (prezentă în toate celulele procariote, inclusiv bacteriile și archaea) și intră în structura subunității ribozomale 30S. ARNr 23S și ARNr 5S sunt subunitățile de ARNr prezente în subunitatea ribozomală 50S. Genele pentru ARNr sunt conservate în evoluție, adică secvențele și structurile lor s-au schimbat foarte puțin de-a lungul timpului, ceea ce reflectă importanța lor în traducerea ARNm în proteine. Clasificarea în cele trei domenii (Eukarya, Bacteria și Archaea) se face în baza arborelui filogenetic construit pornind de la secvențele genelor ARNr.

Prin regiunea sa 3' terminală, ARNr 16S interacționează cu ARNm și are un rol important în fixarea ribozomului pe extremitatea 5' a ARNm. Inițierea translației la procariote implică două secvențe distincte din regiunea 5' a ARNm: codonul START (AUG) și, la aproximativ zece nucleotide în amonte, o regiune bogată în purine denumită Shine-Dalgarno. ARNm interacționează prin intermediul Shine-Dalgarno cu capătul 3' al ARNr 16S, favorizând identificarea codonului START și inițierea sintezei proteice. De remarcat că ARNr 16S interacționează de asemenea cu factorul de elongare EF-Tu și monitorizează acuratețea interacțiunii codon-anticodon din pozițiile 1 și 2. Mai mult de atât, la nivelul subunității 30S se leagă factorii proteici inițiatori ai translației (IF1, IF2 și IF3), fără de care formarea complexului inițiator 70S nu ar fi posibilă.

În procariote, genele ARNr 5S, 16S și 23S sunt grupate, fiind spațiate prin regiuni ITS (internal transcribed spacer) care conțin ARNt și flancate prin regiuni adiacente conservate. Clusterul este exprimat ca un singur operon, iar moleculele individuale de ARN transcrise sunt procesate de ARNaze în ARNr și ARNt. Numărul și localizarea operonilor ARNr sunt foarte diverse: aceștia pot fi prezenți în 1-15 copii în genomurile procariote, peste 80% din genomurile bacteriene secvențiate având mai mult de un operon. Gena ARNr 16S are o lungime de aproximativ 1600 de perechi de baze și prezintă zece regiuni conservate, separate prin nouă regiuni hipervariabile (V1-V9). Regiunile conservate pot fi folosite pentru designul primerilor de amplificare PCR; analiza regiunilor hipervariabile permite încadrarea taxonomică bacteriană la nivel de specie.



Secvențierea genei 16S

În mod tradițional, identificarea bacteriilor în laboratoarele de microbiologie clinică se realiza cu ajutorul testelor fenotipice, inclusiv a frotiului Gram și a testelor biochimice, luând în considerare cerințele de cultură și caracteristicile de creștere. Cu toate acestea, aceste metode de identificare a bacteriilor au limitări majore. În primul rând, se întâlnesc ocazional organisme cu caracteristici biochimice care nu se încadrează în tiparele niciunui gen și specie cunoscute. În al doilea rând, acestea nu pot fi utilizate pentru organismele necultivabile. În al treilea rând, identificarea unor grupuri particulare de bacterii, cum ar fi anaerobii și micobacteriile, ar necesita echipamente și expertiză suplimentare, care nu sunt disponibile în majoritatea laboratoarelor de microbiologie clinică. Folosind tehnici moleculare de analiză a ADNr 16S, aceste probleme pot fi depășite, ceea ce facilitează, de asemenea, descoperirea de noi genuri și specii.

Dezvoltarea tehnologiilor PCR și a secvențierii ADN au extins studiile microbiologice la populații microbiene care nu au fost vreodată cultivate sau izolate, iar cea mai populară țintă este gena ARNr 16S. Secvențele nucleotidice ale genei ARNr 16S sunt utilizate pentru clasificarea organismelor și sunt înregistrate în baze de date publice, cum ar fi DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL (<http://www.embl.org>) etc.

Secvențierea ADNr 16S a fost intens exploatată în laboratoarele de microbiologie clinică. Caracterizarea precisă a izolatelor bacteriene este crucială pentru a determina dacă bacteria în cauză provoacă o infecție sau este un simplu colonizator/contaminant, fiind esențială pentru alegerea antibioticului și stabilirea duratei tratamentului, precum și instituirea procedurilor adecvate de control a infecției. La scară populațională, o identificare precisă este importantă pentru analiza modelelor de rezistență la antibiotice, a planurilor de tratament și a rezultatelor infecțiilor asociate cu o anumită bacterie.

Identificarea rapidă și precisă a izolatelor bacteriene este o sarcină fundamentală în microbiologia clinică și oferă informații privind etiologia bolilor infecțioase și tratamentul antibiotic adecvat. Deși metodele fenotipice convenționale sunt relativ ieftine și permit identificarea celor mai des întâlnite bacterii, anumite grupuri de bacterii sunt dificil de identificat, necesitând expertiză și echipamente speciale, ca de exemplu, cromatografia în fază gazoasă cuplată cu spectrometria de masă, pentru germeii anaerobi. Metodele fenotipice eșuează, de asemenea, în cazul bacteriilor rare sau al bacteriilor cu profiluri ambigue. În plus, metodele fenotipice se bazează pe disponibilitatea unei culturi pure și depind de caracteristicile ulterioare de creștere și de profilarea biochimică. Prin urmare, este

necesar un timp considerabil pentru identificarea bacteriilor cu creștere lentă. Secvențierea ADNr 16S reprezintă o tehnologie universală care oferă soluții la aceste probleme, furnizând date neechivoce, reproductibile între laboratoare, chiar și pentru izolatele neobișnuite și cu creștere lentă, în termen de maxim 48 de ore.

Secvențierea ADNr 16S este deosebit de utilă în identificarea bacteriilor neobișnuite care sunt dificil (sau chiar imposibil) de identificat prin metode convenționale, permițând identificarea genului în >90% din cazuri și identificarea a 65-83% dintre acestea la nivel de specie. Spre deosebire de identificarea fenotipică, care poate fi afectată de prezența sau absența genelor non-housekeeping sau de variabilitatea expresiei caracterelor, secvențierea ADNr 16S asigură o identificare precisă a izolatelor cu caracteristici fenotipice atipice și are un impact semnificativ asupra deciziei de a iniția antibioterapia și asupra alegerii regimului specific de antibiotice cu consecințe importante asupra rezultatelor clinice.

Secvențierea ADNr 16S are marele avantaj de a reduce timpul necesar pentru identificarea bacteriilor cu creștere lentă, cum ar fi micobacteriile, care pot avea nevoie de 6-8 săptămâni pentru a crește în cultură suficient pentru a permite efectuarea de teste fenotipice. Chiar și în cazul micobacteriilor cu creștere rapidă, unele reacții biochimice pot dura până la 28 de zile pentru a se finaliza. În ceea ce privește analiza acizilor grași din celule întregi prin cromatografie în fază gazoasă, aceasta necesită echipamente și expertiză speciale care, adesea, nu sunt disponibile în laboratoarele de microbiologie clinică. Un număr limitat de specii de micobacterii (*Mycobacterium avium intracellulare* și *M. paratuberculosis*, *M. chelonae* și *M. abscessus*) nu au putut fi diferențiate prin secvențierea ADNr 16S. Pentru diferențierea acestor specii trebuie utilizate alte ținte genetice, uneori completate de rezultatele fenotipice, cum ar fi *hsp65* și *rpoB* pentru cele care cresc rapid, sau spacerul transcris intern al ARNr 16S-23S sau *gyrB* pentru micobacteriile care cresc lent.

Secvențierea ADNr 16S este foarte utilă în contextul speciilor bacteriene care sunt adesea dificil de identificat cu ajutorul testelor fenotipice. Acest lucru a dus la o mai bună înțelegere a epidemiologiei și patogenității acestor bacterii "neidentificabile" din punct de vedere clinic. Un exemplu remarcabil este oferit de bacteriile Gram-pozitive anaerobe, în cazul cărora metodele convenționale pur și simplu nu sunt fiabile, nici măcar pentru identificarea genului; cu ajutorul secvențierii ADNr 16S, s-a constatat că multe specii bacteriene anaerobe nedescrise sau ignorate anterior contribuie la situațiile de bacteriemie.

În situația în care există o diferență semnificativă între caracteristicile fenotipice și/sau secvențele ADNr 16S ale bacteriilor analizate și ale celor mai apropiate bacterii, se presupune că identificăm specii noi. Atunci când se definește o specie nouă se folosește de obicei o abordare polifazică, care, în funcție de grupul de bacterii analizate, implică diverse combinații de caracteristici fenotipice, secvențierea ADNr 16S și secvențierea altor gene housekeeping. Speciile bacteriene noi izolate/identificate din specimene umane trebuie raportate, chiar dacă este disponibilă doar o singură tulpină bine caracterizată. În ciuda investigațiilor extinse, la aproximativ jumătate dintre pacienții cu boli infecțioase nu se poate determina o cauză microbiologică. Pentru unele sindroame clinice, cum ar fi febra neutropenică, nu se poate găsi nicio cauză microbiologică în până la 80% dintre pacienți. Pentru alte câteva sindroame, de exemplu gastroenterita acută și pneumonia comunitară, cauza microbiologică a rămas nedeterminată la circa 40% dintre pacienți. De-a lungul anilor, s-au depus eforturi uriașe pentru a determina microorganismele asociate cu aceste "sindroame de boli infecțioase inexplicabile". Deși formele standard sau neobișnuite ale microbilor cunoscuți sunt uneori considerate a fi cauze noi ale "sindroamelor de boli infecțioase inexplicabile", majoritatea cauzelor noi sunt, de fapt, microbii nedescrși anterior.

O utilizare importantă a secvențierii ADNr 16S este identificarea sindroamelor clinice cauzate de bacterii necultivabile sau cu culturi negative. Acestea se referă la infecții cauzate de bacterii care nu au putut fi cultivate în mod fiabil prin metode cunoscute la momentul descoperirii. Până la o treime din toate cazurile de endocardită infecțioasă sunt negative la cultură, iar diagnosticul se bazează în principal pe constatările clinice și ultrasonografice. În multe cazuri, hemoculturile sunt negative din cauza utilizării anterioare de antibiotice sau a utilizării unui volum insuficient de sânge. Secvențierea ADN 16S devine de asemenea semnificativă în diagnosticul altor infecții cu cultură negativă, inclusiv meningita, infecțiile tractului urinar, artrita septică și septicemia.

Mai multe studii au demonstrat că secvențierea ADNr 16S duce la un procent mai mare de identificare a speciilor relevante clinic decât metodele convenționale sau comerciale. Rata de succes a identificării speciilor prin secvențierea ADNr 16S variază între 62% și 92%, în funcție de grupul de bacterii și de criteriile utilizate pentru definirea speciilor. Cu toate acestea, există "blind spots" în cadrul unor genuri majore, în care secvențele ADNr 16S nu sunt suficient de discriminatorii. În aceste circumstanțe, trebuie să se investigheze ținte alternative, cum ar fi *groEL* și *tuf* pentru diferențierea speciilor de *Staphylococcus*.

Avantajul major al secvențierii genei ARNr 16S prin NGS este acela că nu necesită cultivarea microbiologică, fiind astfel la fel de eficientă chiar dacă bacteria este cultivabilă sau nu. Prin aceasta tehnică se poate determina abundența relativă a tuturor bacteriilor din probă și se pot secvenția în paralel mai multe probe. Cultura microbiologică poate dura câteva zile, însă tehnica 16S este rapidă, astfel că rezultatele pot fi obținute în aceeași zi în care a fost prelevată proba. Secvențierea 16S permite identificarea precisă a speciilor, spre deosebire de cultura microbiană care se bazează pe identificarea fenotipică a bacteriilor testate prin creșterea pe medii selective și evaluarea metabolismului bacterian pe diferiți nutrienți. În comparație cu analiza metagenomică, secvențierea 16S generează un număr mai mic de citiri, fiind o alternativă mai economă din acest punct de vedere. Numărul mai mic de citiri se datorează pe de o parte lungimii mai reduse a genei în comparație cu întregul genom, iar, pe de altă parte, lipsei amplificării altor genomuri în afara celui bacterian (inclusiv genomul gazda). Alte avantaje ale tehnicii 16S sunt prețul de cost mai scăzut și interpretarea bioinformatică mai ușoară. În plus, bazele de date care arhivează genele ARNr 16S sunt mai cuprinzătoare și constant revalidate, prin comparație cu cele conținând întregul genom bacterian.

Principalul neajuns al metodei de secvențiere a genei 16S este universalitatea primerilor „consens” din etapa de PCR. Designul primerilor este realizat astfel încât aceștia să hibridizeze cu regiunile conservate din gena 16S, care sunt presupuse a fi invariabile de la o specie la alta. Însă, în realitate, nu există primeri perfect complementari și care să se lege cu aceeași eficacitate de gena 16S a tuturor speciilor microbiene cunoscute (darămite speciile încă nedescoperite). În timp ce unele nepotriviri primer-template au efecte neglijabile asupra amplificării, o parte din ele pot anula complet hibridizarea primerilor și implicit identificarea speciei respective. În plus, unele regiuni conservate ale genei bacteriene ARNr 16S se aseamănă într-o proporție mare cu gena umană. Prin urmare, construirea de primeri complementari acestor regiuni ar conduce la generarea de ampliconi umani. Un alt dezavantaj al secvențierii genei 16S este imposibilitatea detecției speciilor patogene care nu conțin gena ARNr 16S, precum fungii, protistele, arheele și virusurile. Prin comparație, analiza metagenomică, este mai sigură, sensibilă, universală și cu mai puține bias-uri decât

secvențierea 16S. Pentru a fi folosită pe scară largă în laboratoarele de diagnostic microbiologic, tehnica necesită protocoale standardizate și validări riguroase.

Referințe bibliografice:

1. Matsuo Y, Komiya S, Yasumizu Y, Yasuoka Y, Mizushima K, Takagi T, Kryukov K, Fukuda A, Morimoto Y, Naito Y, Okada H, Bono H, Nakagawa S, Hirota K. Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION™ nanopore sequencing confers species-level resolution. *BMC Microbiol.* 2021 Jan 26;21(1):35. doi: 10.1186/s12866-021-02094-5.
2. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, Leopold SR, Hanson BM, Agresta HO, Gerstein M, Sodergren E, Weinstock GM. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun.* 2019 Nov 6;10(1):5029. doi: 10.1038/s41467-019-13036-1.
3. Martinez-Porchas M, Villalpando-Canchola E, Ortiz Suarez LE, Vargas-Albores F. How conserved are the conserved 16S-rRNA regions? *PeerJ.* 2017 Feb 28;5:e3036. doi: 10.7717/peerj.3036.
4. Darby EM, Trampari E, Siasat P, Gaya MS, Alav I, Webber MA, Blair JMA. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol.* 2022 Nov 21. doi: 10.1038/s41579-022-00820-y.
5. Gupta S, Mortensen MS, Schjørring S, Trivedi U, Vestergaard G, Stokholm J, Bisgaard H, Krogfelt KA, Sørensen SJ. Amplicon sequencing provides more accurate microbiome information in healthy children compared to culturing. *Commun Biol.* 2019 Aug 5;2:291. doi: 10.1038/s42003-019-0540-1.
6. Muhamad Rizal NS, Neoh HM, Ramli R, A/L K Periyasamy PR, Hanafiah A, Abdul Samat MN, Tan TL, Wong KK, Nathan S, Chieng S, Saw SH, Khor BY. Advantages and Limitations of 16S rRNA Next-Generation Sequencing for Pathogen Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory: Perspectives from a Middle-Income Country. *Diagnostics (Basel).* 2020 Oct 14;10(10):816. doi: 10.3390/diagnostics10100816.
7. Bukin YS, Galachyants YP, Morozov IV, Bukin SV, Zakharenko AS, Zemskaya TI. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci Data.* 2019 Feb 5;6:190007. doi: 10.1038/sdata.2019.7. Erratum in: *Sci Data.* 2022 Mar 17;9(1):94. PMID: 30720800; PMCID: PMC6362892.
8. Kambouris ME, Velegriaki A. *Microbiomics. Dimensions, Applications, and Translational Implications of Human and Environmental Microbiome Research.* Academic Press. 2020. ISBN 0128172827, 9780128172827.
9. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GI, Stryer JL. *Biochemistry.* Ninth edition. W.H. Freeman. 2019. ISBN 1319114679, 9781319114671.
10. Kupferwasser LI, Darius H, Müller AM, Martin C, Mohr-Kahaly S, Erbel R, Meyer J. Diagnosis of culture-negative endocarditis: the role of the Duke criteria and the impact of transesophageal echocardiography. *Am Heart J.* 2001 Jul;142(1):146-52. doi: 10.1067/mhj.2001.115586.
11. Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Oct;14(10):908-34. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x.