

MICROBIOLOGY

Large insights into microorganisms

Проникновение в сущность
микроорганизмов

ИНФОРМАЦИОННЫЙ
ДОКУМЕНТ

ΔΙΑ•M

современная лаборатория

 Oxford
NANOPORE
Technologies

Содержание

1

Преимущества нанопорового секвенирования
для микробиологического анализа

2

Практические примеры

3

Резюме

4

О компании Oxford Nanopore Technologies

5

Литература

Введение

Микроорганизмы – наиболее многочисленная и разнородная форма жизни на Земле, насчитывающая, по оценкам, 1 триллион видов (рис. 1)¹. Это необходимые компоненты всех экосистем, играющие решающую роль в здоровье, заболеваниях и многих промышленных процессах.

Считается, что примерно 90% секвенированных бактериальных геномов определены не полностью³.

Технологии секвенирования оказали огромное влияние на область микробиологии. Традиционно, микроорганизмы изучались путем культивирования отдельных видов или штаммов на искусственных питательных средах; однако из 10 миллионов видов, описанных до настоящего времени, всего 10 000 (0,1%) культивировались в лаборатории¹.

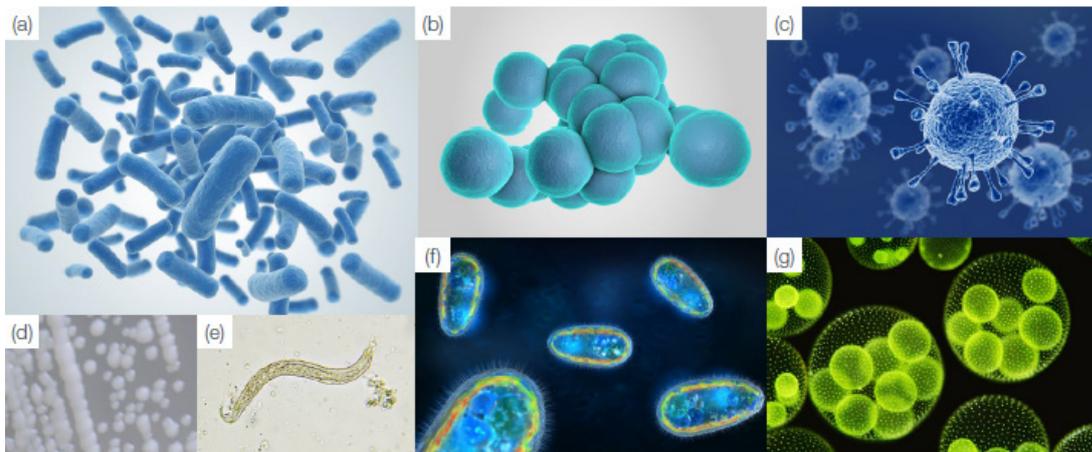
Появление современных технологий секвенирования, позволяющих высокопроизводительный геномный анализ культивированных и, что важно, ранее не культивированных микроорганизмов, резко повысил возможности идентификации и описания свойств микроорганизмов.

В настоящее время общедоступны геномные последовательности примерно 150 000 микробных штаммов². Однако в связи с ограничениями, присущими традиционным технологиям секвенирования на основе коротких прочтений, большая часть наших знаний о микробных геномах основывается на неполных данных. Фактически, полагают, что примерно 90% бактериальных геномов определено не полностью³.

В этом обзоре описано, каким образом современные микробиологи используют нанопоровое секвенирование на основе длинных прочтений в реальном времени, чтобы преодолеть проблемы технологии секвенирования коротких прочтений и полностью описать микробные геномы – проливая новый свет на микробную эволюцию, патогенность и устойчивость к антибиотикам.

Рис. 1

Существует 7 основных типов микроорганизмов: (a) бактерии (напр., *Mycobacterium tuberculosis*); (b) археи (напр., *Methanocaldococcus jannaschii*); (f) вирусы (напр., вирус простого герпеса); (d) грибы (напр., *Saccharomyces cerevisiae*); (e) гельминты (напр., *Strongyloides stercoralis*) (f) простейшие (напр., *Paramecium aurelia*); (g) водоросли (напр., *Volvox aureus*).



1

Преимущества нанопорового секвенирования для микробиологического анализа

Сборка генома

Для реального понимания разнообразия микроорганизмов обязательно создание полного и подробно описанного генома. Области повторов и структурные варианты выполняют важные функции у микроорганизмов, в том числе развитие и распространение устойчивости к антибиотикам и факторов вирулентности^{3,4}. Однако широко известно, что технологии секвенирования с помощью коротких прочтений, используемые для создания большинства существующих эталонных геномов, связаны с проблемой разрешения таких областей^{4,5} (рис. 2). По этим причинам большинство эталонных геномов неполные и содержат пробелы, где секвенирование или выравнивание невозможно.

Нанопоровое секвенирование позволило воссоздать полный геном *Escherichia coli* с точностью 99,98%⁹.

В противоположность традиционным платформам для секвенирования, которые обычно работают с короткими (<300 п.о.) фрагментами ДНК, нанопоровая технология секвенирования позволяет читать фрагменты ДНК, проходящие через пору, независимо от их размера.

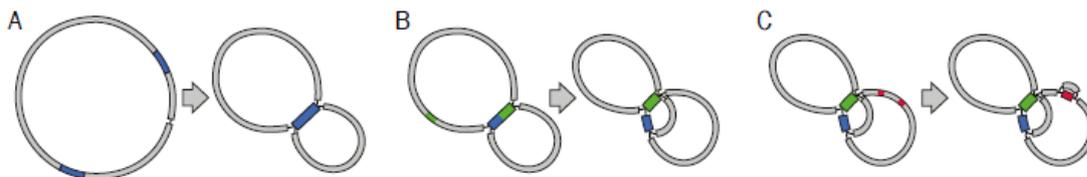
Целые фрагменты длиной в сотни тысяч оснований анализируются в обычном порядке, а длина прочитанных фрагментов превышает 1 Мб⁶. Очевидно, что такие длинные прочтения с большей вероятностью охватят полные области ДНК с повторяющимися последовательностями и структурные варианты, давая возможность более полной сборки генома без пробелов^{5,7} (рис. 3).

Длинные прочтения последовательностей дают дополнительное преимущество, так как обеспечивают лучшее перекрытие между прочтениями и облегчают сборку фрагментов ДНК в правильном порядке. Это можно представить в виде головоломки-мозаики: чем крупнее фрагменты, тем легче головоломка.

Благодаря ультрадлинным нанопоровым прочтениям теперь уже возможно секвенировать полный вирусный геном за одно прочтение, полностью устранив необходимость в сборке¹⁰. Вероятно, что по мере разработки протоколов пробоподготовки, позволяющих создавать даже более длинные цельные молекулы ДНК и РНК, станет возможным секвенировать даже более крупные геномы за одно прочтение.

Рис. 2

Схематическое изображение проблемы правильной сборки генома при использовании данных коротких прочтений. По мере увеличения числа повторов (синие, зеленые и красные области) графическое представление сборки становится все более запутанным, приводя к фрагментации. Рисунок любезно предоставлен Райаном Уиком, Мельбурнский Университет, Австралия.



Профилирование устойчивости к антибиотикам

Согласно Всемирной Организации Здравоохранения: «Устойчивость к антибиотикам является чрезвычайной глобальной проблемой здравоохранения, серьезно угрожающей прогрессу современной медицины»¹¹. Таким образом, необходимо, чтобы исследователи могли точно и быстро определять свойства выделенных возбудителей с целью получения данных об эволюции и передаче устойчивости к лекарствам, а также лучшего понимания потенциальных стратегий лечения.

Значительным преимуществом нанопорового секвенирования является получение данных в реальном времени, что позволяет сразу анализировать их, резко ускоряя получение результата.

Нанопоровое секвенирование дает оптимизированный подход к профилированию устойчивости к антибиотикам, как в практических условиях, так и в лаборатории. Портативное устройство MinION™ можно использовать везде, в том числе в условиях ограниченных ресурсов или в отдаленных местах, таким образом, оно идеально подходит для анализа в месте возникновения инфекции. Настольные устройства GridION™ X5 и PromethION™ позволяют проводить секвенирование по требованию под разные задачи и подходят для ситуаций с большим потоком проб для анализа.

В отличие от традиционной технологии секвенирования, при которой все данные становятся доступны в конце цикла, значительное преимущество нанопорового секвенирования заключается в возможности анализа данных в реальном времени. В дополнение к резкому сокращению времени ожидания результата, анализ в реальном времени позволяет сразу подтвердить правильность сбора образцов. Кроме того, после получения достаточных данных анализ можно остановить — что позволяет эффективнее использовать рабочее время.

Рис. 3

Схематическое представление преимуществ длинных прочтений при сборке областей повторов *de novo*. Длинные прочтения с большей вероятностью охватят всю длину повтора (синие блоки), позволив более аккуратную сборку. Изображение на основе публикации Kellog⁸.

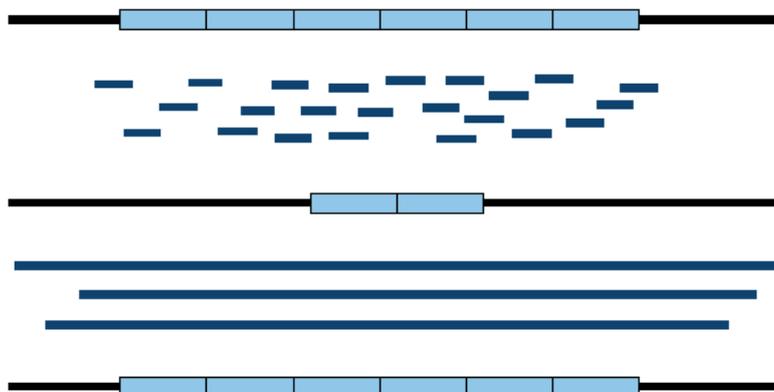
Геномная последовательность

Короткие прочтения

Последовательность, полученная на основании коротких прочтений

Длинные прочтения

Последовательность, полученная на основании длинных прочтений



Компания Oxford Nanopore разработала схему анализа «WIMP-ARMA» для идентификации микроорганизмов в реальном времени и профилирования устойчивости к антибиотикам¹². Эта схема заключается в выравнивании прочтений в сравнении с Всеобъемлющей базой данных устойчивости к антибиотикам (Comprehensive Antibiotic Resistance Database; CARD); в полученном отчете подчеркивается, какие последовательности, определенные при выравнивании, указывают на устойчивость к данному антибиотику (рис. 4). Схема WIMP-ARMA не требует глубоких знаний в области биоинформатики и интуитивно понятна, позволяя исследователю установить особенности устойчивости к антибиотикам путем анализа образцов.

С помощью нанопорового секвенирования исследователи могут сократить время, необходимое для анализа устойчивости к антибиотикам у возбудителя туберкулеза, *Mycobacterium bovis*, с 8–15 недель при традиционных культуральных методов до всего 12 ч¹³ – при этом метод продолжает совершенствоваться¹⁴.

С помощью ультрадлинных прочтений и анализа в реальном времени нанопоровое секвенирование дало возможность быстро установить характеристики устойчивости к лекарством ряда возбудителей, включая бактерии^{15,13}, вирусы¹⁶ и грибы^{17,18}.

Полная сборка плазмид

У бактерий гены устойчивости к антибиотикам могут переноситься с бактериальным геномом или плазмидами. Понимание местоположения этих генов проясняет механизмы передачи устойчивости между возбудителями и является существенным вопросом в эпидемиологических стратегиях отслеживания и ограничения распространения болезни^{19,20,21}.

В связи с большим количеством ДНК-повторов, которые также могут присутствовать в геноме, полная сборка плазмид и их дифференциация от геномных последовательностей при секвенировании с помощью коротких прочтений особенно сложна^{21,22}. Возможность секвенирования очень длинных фрагментов ДНК или РНК по нанопоровой технологии, чтобы охватить области с повторами, позволяет решить эту проблему путем полной и четкой сборки плазмид и генома. С помощью нанопорового секвенирования исследователи могут быстро установить конкретное местоположение генов устойчивости, получив более подробную информацию об их передаче и эволюции^{19,20}.

Рис. 4

Схема WIMP-ARMA позволяет идентифицировать микроорганизмы в реальном времени и определить характеристики устойчивости к антибиотикам по данным нанопорового секвенирования.



При нанопоровой технологии длина прочтения ограничена только размером фрагмента ДНК.

Эксперимент, проведенный Li *et al.*²⁰, показал, что единичное нанопоровое прочтение штамма *Escherichia coli*, устойчивого к карабапенему, охватывает всю плазмиду длиной >90 тыс.п.о. Размеры бактериальных плазмид крайне разнообразны и варьируют от 1 до 100 тыс.п.о.²³. При нанопоровой технологии длина прочтения ограничена только размером фрагмента ДНК, проходящим через пору. Как результат, теоретически возможно секвенировать даже крупнейшие плазмиды за единичные прочтения. Такой сценарий устраняет необходимость в сборке, дополнительно упрощая ход анализа.

Вирулентность

Гены вирулентности часто сгруппированы в острова патогенности (ОП), которые могут быть встроены в геном или расположены вне хромосом (т. е. в плаزمиде). Как обсуждалось для генов устойчивости к антибиотикам, ОП также часто граничат со вставками, содержащими повторы и облегчающими перемещение в пределах одного вида и между видами²⁴ (рис. 5).

Большие размеры ОП (обычно 10–200 тыс.п.о.²⁵) в сочетании с повторами делает их точный анализ с помощью техник коротких прочтений особенно сложным^{4,26}. Нанопоровое секвенирование с длинными прочтениями позволяет секвенировать ОП полностью за одно прочтение, чтобы достоверно охарактеризовать и установить местоположение этих областей.

Исследование вирулентности микроорганизмов важно не только для традиционных исследований и здравоохранения; теперь его стали применять также для исследования внеземных образцов²⁸. Предыдущие исследования показали возможность повышения патогенности микроорганизмов во время полета в космосе²⁹. В качестве первого шага к пониманию этой информации научная группа NASA, США использовала нанопоровую технологию для успешного секвенирования и анализа метагеномного образца на борту Международной Космической Станции (МКС)^{28,30}. Как подчеркнула научная группа, возможно, что в будущем нанопоровое секвенирование будет применяться для анализа эволюции микроорганизмов, диагностики с целью правильного подбора лечения инфекции во время полетов и даже для поиска внеземной жизни²⁸.

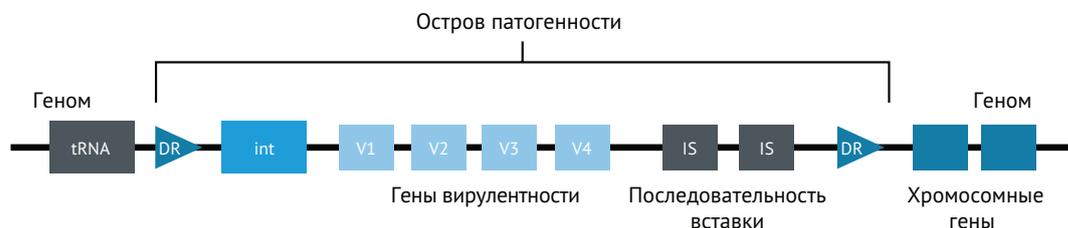


Рис. 5

Большой размер и наличие повторов в ОП затрудняет точную сборку и определение местоположения этих областей при помощи технологий секвенирования коротких прочтений. Гены мобильности, такие как интегразы (*int*), часто расположены в начале острова близко к локусу тРНК или соответствующему месту прикрепления. ОП содержат гены вирулентности (от V1 до V4) и часто перемежаются мобильными элементами, такими как перемещающиеся встроенные элементы/последовательности, которые могут быть полными или частичными. ОП часто ограничены прямыми повторами (ПП), которые используются при процессах вставки и делеции. Изображение на основе публикации Schmidt & Hensel²⁷.

РНК-геномы

РНК-содержащие вирусы лишены механизмов корректирования, которые обычно есть у организмов с геномом на основе ДНК и, следовательно, частота мутаций у них намного выше. Такая высокая частота ошибок дает эволюционное преимущество, позволяя РНК-вирусам быстро приспосабливаться, чтобы избежать воздействия иммунного ответа организма хозяина на инфекцию и последующей противовирусной терапии. Таким образом, неудивительно, что многие появляющиеся вирусные заболевания человека вызваны РНК-вирусами (например, эбола, тяжелый острый респираторный синдром [ТОРС], чикунгунья, лихорадка Западного Нила и грипп), таким образом, возникает настоятельная необходимость в точном анализе генома этих микроорганизмов.

«Большая часть наших знаний о биологии РНК видится через линзу кДНК»³¹.

Можно провести подробный анализ генома, генетического и географического происхождения болезни, а также выявить новые варианты, усиливающие вирулентность, обеспечивающие возможность распространения между видами или передачи от человека к человеку.

Секвенирование кДНК-копий РНК-геномов вирусов стало движущей силой многих важных открытий, однако общеизвестно, что процесс превращения РНК в кДНК путем обратной транскрипции и амплификации может стать источником погрешности³⁸. Как утверждает д-р Мэттью Келлер, научный сотрудник ORISE Центра контроля и профилактики болезней, США: «Большая часть наших знаний о биологии РНК видится через линзу кДНК»³¹.

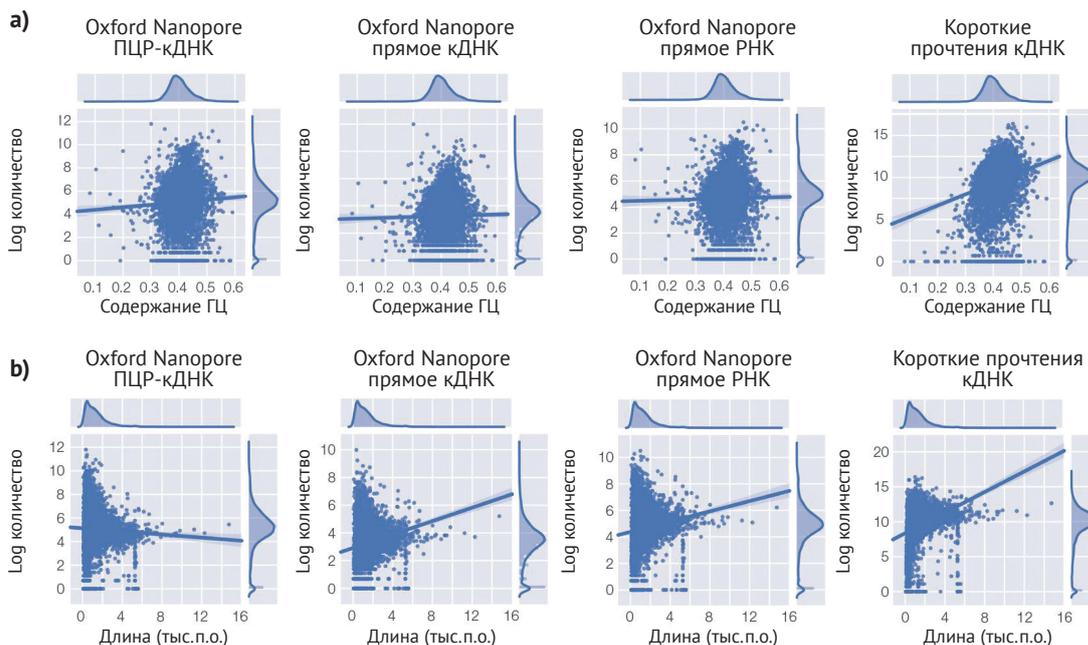
Недавно компания Oxford Nanopore представила возможность непосредственного секвенирования РНК с помощью нанопоровой технологии, сочетающей преимущества длинных прочтений для полного охвата генома со сниженной погрешностью по сравнению с методами коротких прочтений кДНК (рис. 6). Использование модифицированной схемы и нанопоровой технологии позволяет исследователям полностью секвенировать РНК-геном вируса гриппа А, при этом каждый из 8 сегментов генома представляет собой полную длину прочтения³¹. Кроме того, существенно упрощенный процесс непосредственного секвенирования РНК позволяет секвенировать вирус за один день вместо нескольких дней, требующихся при стандартной технологии коротких прочтений³¹.

Рис. 6

Схема секвенирования, включающая амплификацию, подвержена специфическим погрешностям секвенирования. Были подготовлены библиотеки дрожжевого транскрипта с помощью трех технологий нанопорового секвенирования (ПЦР-кДНК, прямое кДНК и прямое РНК) и типичного метода коротких прочтений кДНК).

а) Во всех случаях погрешность определения ГЦ в данных нанопорового секвенирования была ниже, чем в данных, полученных с помощью коротких прочтений.

б) Данные нанопорового секвенирования также характеризуются меньшей погрешностью определения длины при всех методах по сравнению с данными, полученными с помощью коротких прочтений³².



Нанопоровое секвенирование не требует амплификации или синтеза цепи, то есть и исходные основания, и их модификации можно выявить в одном цикле секвенирования в реальном времени.

Обнаружение модифицированных оснований

Модифицированные основания (например, 5-метилцитозин, N6-метилированный аденин) обнаружены практически у всех изученных организмов. Специфические роли многих этих модифицированных оснований все еще полностью не изучены; однако известно, что они влияют на экспрессию генов и (у прокариот) защищают от бактериофагов³³. Кроме того, исследователи предложили роль модифицированных оснований в устойчивости к антибиотикам³⁴.

Из-за необходимости в амплификации нуклеиновых кислот при традиционной технологии секвенирования при помощи коротких прочтений эти модифицированные основания удаляются и их нельзя обнаружить без дополнительных методов обработки проб, занимающих много времени и часто неэффективных^{34,35}.

Нанопоровое секвенирование не требует амплификации или синтеза цепей, таким образом, и исходное, и модифицированное основание возможно обнаружить в одном цикле секвенирования в реальном времени. До настоящего времени исследователи использовали нанопоровое секвенирование для обнаружения ряда модифицированных оснований, в том числе псевдоуридина³⁶, N6-метиладенозина (m6A)^{37,38}, 5-метилцитозина (5mC)³⁸ и 7-метилгуанозина (m7G)³⁴.

2

Практический пример 1

Сборка бактериального генома и плазмид

Проблема полной сборки генома с помощью традиционных технологий коротких прочтений подробно описана в литературе^{5,4}. Согласно Райану Уику из Мельбурнского Университета, Австралия: «*Это имеет значительные последствия для отслеживания распространения мобильных генетических элементов, включая несущие детерминанты устойчивости к антибиотикам*»¹⁹. Так как большинство геномных сборок создано по технологии коротких прочтений, существуют тысячи бактериальных штаммов с неполными геномными последовательностями, которые теперь можно дополнить с помощью сочетания данных нанопорового секвенирования длинных прочтений и стратегии гибридной сборки.

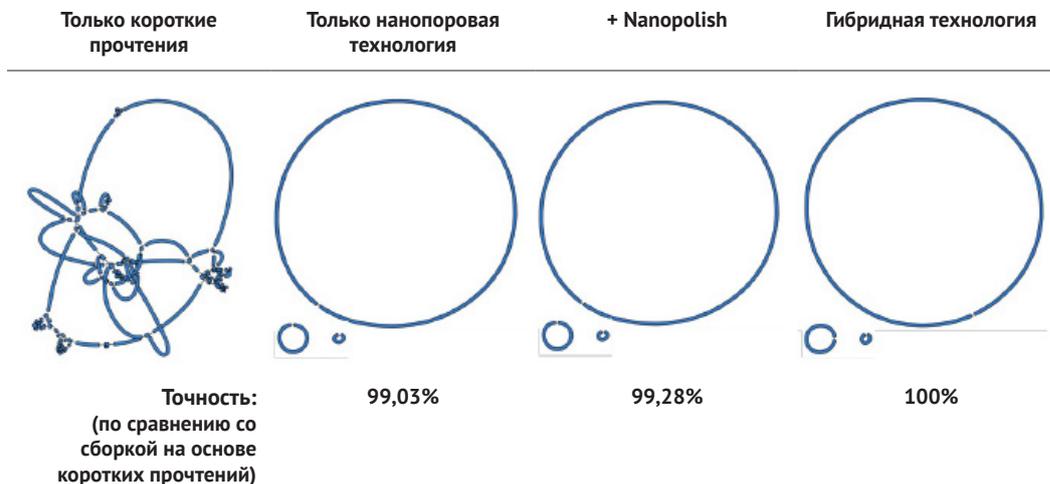
Чтобы решить проблему экономической эффективности при полной сборке большого количества геномов, Райан изобрел стратегию мультиплексного нанопорового секвенирования с низким покрытием, позволяющую исследовать до 12 штаммов в одном цикле³⁹. Кроме того, он разработал сборщик Unicycler⁴⁰ для преодоления ограничений, присущих существующим гибридным сборщикам при работе с прочтениями с низким покрытием и кольцевыми бактериальными хромосомами.

Применение этой стратегии к штамму *Klebsiella pneumoniae* позволило научной группе получить полную информацию о бактериальных хромосомах и плаزمиде с высокоточным распознаванием оснований (рис. 7). Кроме того, мультиплексный метод с низким покрытием позволил секвенировать 12 бактериальных штаммов с помощью нанопоровой технологии по цене всего 80 долларов США за образец¹⁹.

Комментируя эти результаты, Райан заявил: «*Теперь мы можем видеть расположение генов друг относительно друга, мы можем видеть, какие из них расположены в плазмиде, а какие – в хромосоме, и это исключительно важно для отслеживания горизонтального переноса генов*»³⁹.

Мультиплексный метод с низким покрытием позволил секвенировать 12 бактериальных штаммов с помощью нанопоровой технологии всего за \$80 за образец¹⁹.

Рис. 7
Гибридная стратегия анализа с использованием инструмента для сборки Unicycler для сочетания технологии секвенирования коротких прочтений с данными нанопорового секвенирования длинных прочтений (покрытие 28x), позволившая точную и полную сборку генома штамма *K. pneumoniae* INF177. Рисунок любезно предоставлен Райаном Уиком, Мельбурнский Университет, Австралия.



Практический пример 2

Сборка *de novo* и определение характеристик лекарственной устойчивости вируса герпеса человека 1 типа (ВГЧ-1)

Примерно 60–90% населения инфицировано вирусом герпеса человека 1 типа (ВГЧ-1)⁴⁶. Несмотря на то, что большинство инфекций бессимптомны, до 45% населения страдает от периодических высыпаний на губах⁴⁷. Хотя существует ряд препаратов для лечения инфекции ВГЧ-1, все вирусы склонны к мутациям, обуславливающим устойчивость. ВГЧ-1 – крупный вирус, содержащий двухцепочечную ДНК (152 тыс. п.о.), со структурно сложным и богатым ГЦ геномом. Это делает сборку полного генома ВГЧ-1 по данным секвенирования коротких прочтений технически сложной.

Для улучшения сборки и анализа генома ВГЧ-1, установления особенностей мутаций, обуславливающих устойчивость к лекарствам, исследователи из Оксфордского Университета, Великобритания, и организации общественного здравоохранения Англии, сочетали данные нанопорового секвенирования с данными, полученными с помощью платформы секвенирования коротких прочтений¹⁶. Научная группа секвенировала 18 образцов ВГЧ-1, выделенных от пациентов с ослабленным иммунитетом, получающих противовирусную терапию. Для сборки генома использовали инструменты MIRA⁴⁸ и LINKS⁴⁹.

Длина прочтений при нанопоровом секвенировании позволила объединить существующие контиги, полученные с помощью коротких прочтений, которые были разделены повторяющимися элементами. Это позволило создать усовершенствованные геномные сборки, о чем говорит меньшее количество контигов и увеличенные значения N50 (табл. 1).

Также, научной группе удалось охарактеризовать области структурных различий, в том числе удвоений, делеций и перестроек. Кроме того, обнаружена высокая степень вариабельности нуклеотидов в *UL23*, гене, в котором происходит большинство мутаций, обуславливающих устойчивость к лекарствам. Исследователи полагают, что эти вариации, скорее всего, возникают во время противовирусной терапии, применявшейся до получения образца¹⁶.

Согласно научной группе, это исследование доказывает, что нанопоровое секвенирование позволяет усовершенствовать сборку вирусного генома *de novo* при отсутствии эталонного генома, и пройти через повторяющиеся элементы, которыми оканчиваются контиги, полученные с помощью платформ секвенирования коротких прочтений¹⁶.

Таблица 1

Добавление данных нанопорового секвенирования длинных прочтений позволило создать усовершенствованные геномные сборки. Показаны данные исследования одного образца ВГЧ-1 (p1A_454). Таблица на основе работы Karamitros *et al.*¹⁶

Сборка	Число контигов	Самый большой контиг (п.о.)	Общая длина (п.о.)	N50
Короткие прочтения	21	62 373	136 935	43 352
Короткие + длинные прочтения с помощью нанопор	18	111 746	136 978	111 746

Практический пример 3

Быстрое секвенирование РНК-геномов вирусов

Энтеровирусы (ЭВ) – вирусы, содержащие одноцепочечную РНК и вызывающие миллионы случаев инфекции у людей во всем мире ежегодно. Клинические проявления инфекции разнообразны и могут варьировать от доброкачественной боли в горле до более серьезных состояний, таких как бронхит и пневмония¹⁰. Обнаружение методом ПЦР – самый распространенный метод стандартной идентификации вирусов, имеющих клиническое значение. И все же, точечные мутации и явления рекомбинации, часто встречающиеся в вирусных геномах, потенциально способны привести к ложноотрицательным результатам при применении техники ПЦР. Кроме того, текущие техники обнаружения требуют культивирования вируса, что обычно занимает 5–10 дней и значительно замедляет получение результата¹⁰. Чтобы преодолеть эти сложности, д-р Албан Раметте и его научная группа из Бернского Университета, Швейцария, оценили возможности нанопорового секвенирования кДНК и прямого секвенирования РНК для получения полных геномных последовательностей энтеровирусов из клинических образцов¹⁰.

Прямое секвенирование РНК заняло всего 5,5 ч, по сравнению с 23 часами при технике с кДНК¹⁰.

С помощью вирусной кДНК, полученной из образца после культивирования, удалось получить консенсусные последовательности с точностью 98,8% всего через несколько минут после начала секвенирования. «Полировка» последовательности с использованием инструмента nanopolish⁴¹ дополнительно повысила точность до 99,8% (рис. 8).

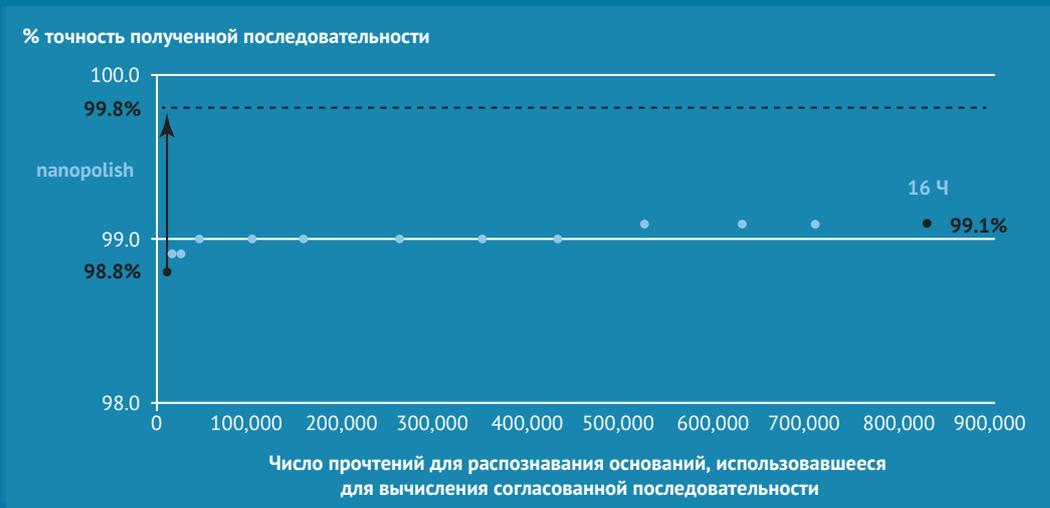
Прямое секвенирование РНК, не требующее обратной транскрипции или амплификации, особенно хорошо подходит для случаев, требующих быстрого результата, например, определения характеристик возбудителя. Метод подготовки проб для прямого секвенирования РНК, использовавшийся в Бернском Университете, занял всего 5,5 ч, по сравнению с 23 часами, необходимыми для метода с кДНК¹⁰.

В попытке дополнительно упростить процедуру был получен образец РНК для прямого секвенирования из образца кала без предварительного культивирования вируса. Хотя при этой методологии пробоподготовки было получено всего 140 нг РНК – что несколько ниже рекомендованного начального количества 500 нг – научной группе удалось секвенировать и собрать полный геном вируса Коксаки на основе 11 прочтений, в целом длиной более 1000 оснований. Кроме того, показано, что одно прочтение 7208 оснований охватывает почти весь геном (в частности, оказалось пропущено всего 25 и 109 оснований оказались с 5' и 3'-конца последовательности при сравнении с эталонной геномной последовательностью вируса Коксаки).

Подводя итог этой работе, Албан комментирует: «Секвенирование кДНК дает чувствительность, равную ПЦР, тогда как прямое секвенирование РНК позволяет получить результат быстрее всего – без погрешностей, обусловленных амплификацией или обратной транскрипцией»¹⁰.

Рис. 8

Нанопоровое секвенирование кДНК, полученной из выделенного в культуре штамма вируса Коксаки, показавшее точность согласованной последовательности 98,8% в течение нескольких минут секвенирования, и эта точность значительно не повысилась в течение последующих 16 ч секвенирования. Применение инструмента nanopore polish к первым 5-10000 прочтениям, полученным в течение 10 минут секвенирования, повысило точность до 99,8%. Изображение любезно предоставлено д-ром Албаном Раметте, Бернский Университет, Берн, Швейцария.



Практический пример 4

Понимание эволюции крупных ДНК-содержащих вирусов

Исследователи из Университета Юты, США, используют полногеномное секвенирование на основе нанопор для понимания эволюционных механизмов крупных ДНК-содержащих вирусов, действующих во время конфликта хозяина-патогена⁴². Как и другие вирусы, содержащие двухцепочечную ДНК (дцДНК), вакцинный ортопоксивирус способен к быстрой адаптации несмотря на относительно низкую частоту однонуклеотидных мутаций (по сравнению с вирусами, содержащими одноцепочечную ДНК или РНК)⁴². Предыдущие исследования вируса выявили два белка, E3L и K3L, подавляющие ответ хозяина на инфекцию^{43,44}. Показано, что делеция гена *E3L* и последующие пересевы на клеточные линии человека для стимуляции конфликта хозяина-патогена приводит к удвоению гена *K3L* в длинных tandemных повторах. Кроме того, показано, что в гене *K3L* этих штаммов с делецией *K3L* присутствует однонуклеотидный вариант (кодирующий замену аминокислоты H47R), обуславливающий повышенную патогенность.

Нанопоровое секвенирование с длинными прочтениями позволило предложить новый механизм эволюции вирусов, содержащих дцДНК.

Согласно научной группе Университета Юты, платформы для секвенирования с использованием коротких прочтений могут дать информацию о частоте аллеля H47R на популяционном уровне и изменениях локуса *K3L* в целом; однако они не позволяют

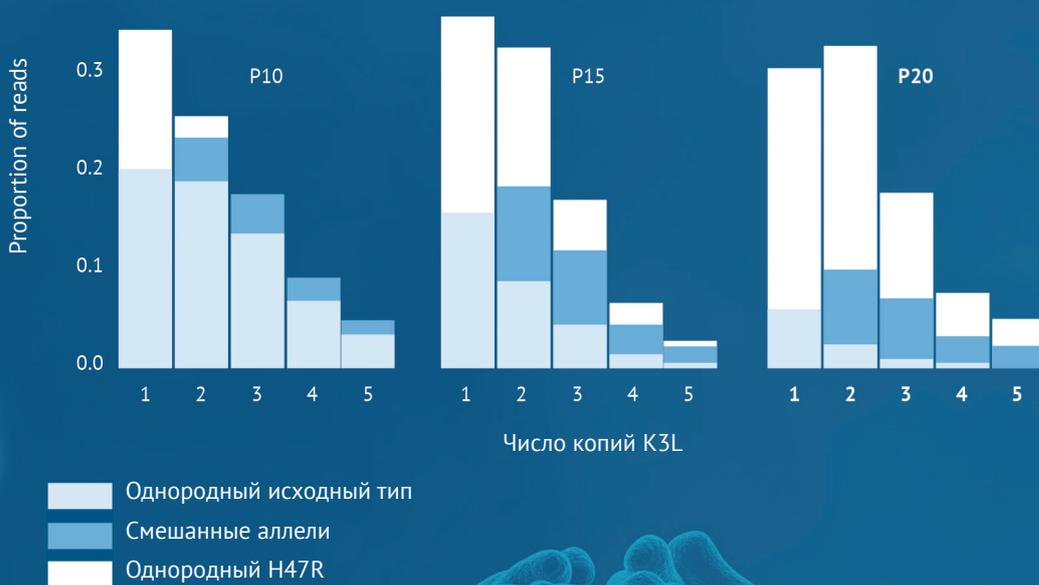
генотипировать точечные мутации в tandemных повторах или установить изменения в числе копий⁴².

Чтобы понять механизмы возникновения этих определенных адаптаций во время эволюции вируса, научная группа обратилась к секвенированию длинных прочтений с помощью нанопоровой технологии, позволяющему охватить длинные области ДНК, содержащие повторы. Результаты показали, что, хотя увеличение числа копий стабилизируется к 10 пересеву (до 15 копий), ОНП H47R накапливаются с низкой частотой при пересеве 10 до почти фиксированного количества при пересеве 20 (рис. 9)⁴⁵. Кроме того, научная группа показала, что сочетание двух генетических изменений также повышает приспособляемость вируса сильнее, чем каждое из изменений по отдельности. С помощью нанопоровой технологии научная группа смогла предложить новый механизм эволюции вируса, когда редкие благоприятные варианты быстро закрепляются с помощью множественных копий гена.

Подводя итог, исследователи заключили, что их работа: «...показывает возможности секвенирования длинных повторов для анализа сложной динамики генома высокого разрешения. [...] Этот тип анализа дает основу для окончательного определения содержания последовательности tandemных удвоений гена и точной идентификации вариантов в пределах этих удвоений»⁴⁵. Сейчас научная группа планирует использовать длинные прочтения с помощью нанопор для изучения фазирования геномов.

Рис. 9

Геномы с множественными копиями гена *K3L* быстро становятся однородными по аллелю H47R, что подразумевает, что данная мутация обуславливает лучшую приспособляемость. Изображение любезно предоставлено Томасом Сасани, Университет Юты, США.



Практический пример 5

Быстрое секвенирование плазмид и обнаружение генов устойчивости

Полирезистентные бактерии представляют собой растущую угрозу для общественного здравоохранения. Многие гены устойчивости к антибиотикам расположены в плазмидах; однако секвенирование плазмид с помощью традиционной технологии коротких прочтений затрудняется наличием большого количества повторов в ДНК. Кроме того, длина бактериальных плазмид может достигать сотен тысяч пар оснований²³, что дополнительно осложняет точную сборку.

Применение методов коротких прочтений дает неполные, фрагментированные плазмидные сборки, которые часто невозможно дифференцировать от геномной последовательности. Понимание местоположения генов устойчивости к антибиотикам (в плазмиде или геноме) может дать возможность более обоснованного эпидемиологического наблюдения и новую информацию об эволюции и передаче механизмов, лежащих в основе развития устойчивости к антибиотикам^{19,20,21}.

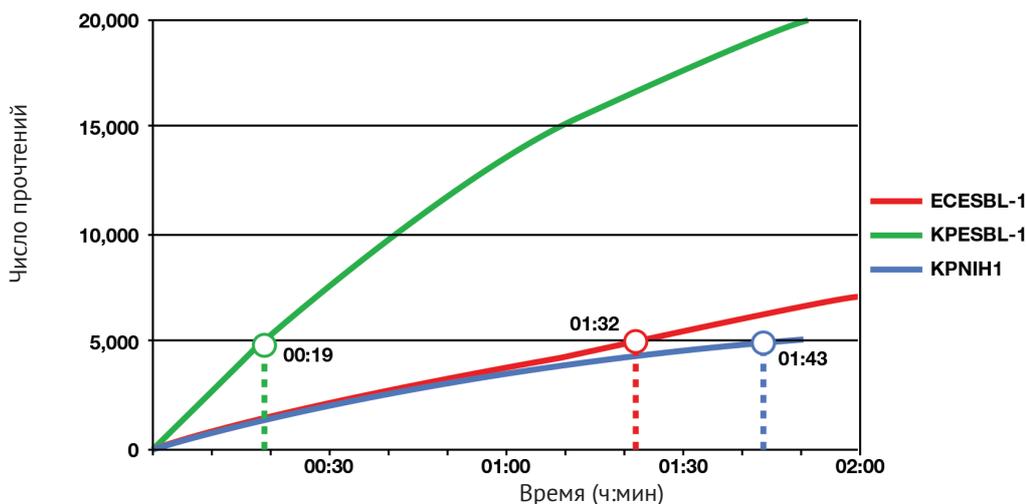
Исследователи из Национального Института Здравоохранения, США, в настоящее время применяют нанопоровое секвенирование для совершенствования сборки плазмид с целью быстрого определения особенностей устойчивости к антибиотикам²¹.

Сначала научная группа секвенировала плазмидную ДНК хорошо описанного устойчивого к карбапенему штамма *Klebsiella pneumoniae* с помощью набора для подготовки библиотек ДНК на основе лигирования (Oxford Nanopore). Сборка длинных прочтений с помощью нанопор дала точность полученной последовательности 99%.

Точность можно повысить до 99,9% путем полировки прочтений, полученных по технологии коротких прочтений; однако исследователи заключили, что для возможного будущего клинического применения они предпочитают только прочтения по нанопоровой технологии в связи с сокращением времени исследования.

Рис. 10

Время, необходимое для получения 5000 прочтений по нанопоровой технологии, при трех последовательных циклах с разными бактериальными штаммами. Набор для быстрого секвенирования на основе транспозазы, использовавшийся для KPESBL-1 *K. pneumoniae*, позволил получать данные гораздо быстрее, чем наборы, основанные на лигировании и использовавшиеся для ECESBL-1 *E. coli* и KPNIH1 *K. pneumoniae*. Изображение из публикации Lemon et al.²¹



Покрытие всех трех известных плазмид в штамме после сборки составило 98%, и все гены устойчивости были правильно идентифицированы.

С помощью нанопорового секвенирования полное определение гена устойчивости к антибиотикам заняло менее 6 ч²¹.

Для оценки минимального времени, необходимого для подробной идентификации гена устойчивости, исследователи секвенировали плазмидную ДНК из второго штамма *K. pneumoniae* с использованием набора для быстрого секвенирования на основе транспозона (Oxford Nanopore). С помощью этой стратегии стало возможно получить полный результат определения гена устойчивости к антибиотикам менее чем за 6 ч²¹.

Как сообщили исследователи, «Использование плазмидной ДНК позволило проводить секвенирование с меньшим покрытием, а сборки, достаточные для полного описания гена устойчивости к антибиотикам, были получены всего за 2000–5000 прочтений, для чего достаточно 20 минут секвенирования»²¹.

Нанопоровое секвенирование плазмидной ДНК для профилирования устойчивости к антибиотикам также показано исследователями из Шэньчжэньского научно-исследовательского института, Китай, которые использовали штрих-кодирование для экономически эффективного мультиплексного анализа 12 полирезистентных бактериальных штаммов²⁰. Их работа позволила создать 20 полных плазмид (и 1 почти полную плазмиду) за один 8-часовой цикл секвенирования. Следует отметить, что одна плазида >90 тыс.п.о. была проанализирована полностью за одно прочтение и, следовательно, не требовалась сборка.

Исследователи также указали на возможность многократных циклов секвенирования в одной нанопоровой проточной ячейке в течение 48 ч с начала первого цикла. На основании своих исследований они полагают, что в одной проточной ячейке возможно провести 2 цикла, каждый по 8, 10 и 12 ч, соответственно. Исследователи заявляют, что при сочетании со штрихкодированием возможно секвенировать в целом 36 образцов, что приводит к значительному снижению стоимости получения полных плазмидных последовательностей.

Практический пример 6

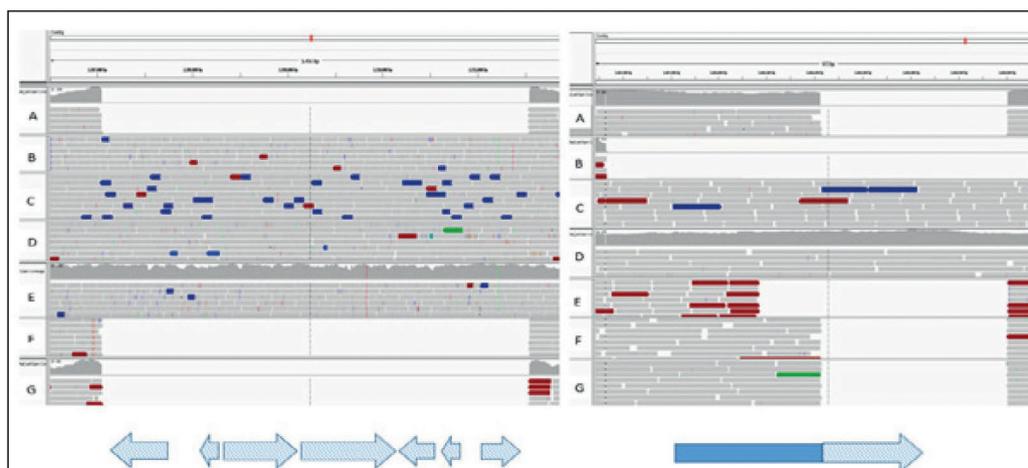
Определение характеристик вирулентности и устойчивости к антибиотикам у *Mycobacterium tuberculosis*

Ежегодно диагностируется более 10 млн. новых случаев туберкулеза, 600 000 которых вызваны полирезистентными штаммами *Mycobacterium tuberculosis*, устойчивыми к препаратам первой линии – рифампицину и изониазиду⁵⁰. Больше беспокойство вызывает увеличение количества штаммов с широкой полирезистентностью, показывающих дополнительную устойчивость к другим классам лекарств. Механизмы, лежащие в основе развития легко передающихся штаммов с широкой полирезистентностью, полностью не изучены, а исследования с использованием технологии коротких прочтений имеют ограниченные возможности выявления структурных вариаций, дупликаций генов и областей повторов, которые могут способствовать устойчивости, вирулентности и передаче. Чтобы преодолеть эти сложности, исследователи из Университета Квинсленда, Австралия, используют длинные прочтения, возможные благодаря нанопоровой технологии, для более подробного понимания эволюционных механизмов, лежащих в основе появления штаммов *M. tuberculosis*⁵¹ с высокой способностью к передаче.

Научная группа выполнила полногеномное секвенирование штамма *M. tuberculosis* с широкой полирезистентностью, вызывавшего вспышку заболевания, устойчивого к лекарствам, в Западной провинции Папуа-Новой Гвинеи. С использованием инструмента для сборки CANU⁵² и полировкой последовательности с помощью Racon⁵³ была создана полная кольцевая сборка *de novo* со средней глубиной прочтения 273x и точностью распознавания оснований 99,95%. Анализ генома позволили определить профиль устойчивости к лекарствам с полным фенотипическим соответствием. Также удалось идентифицировать все соответствующие однонуклеотидные полиморфизмы, придающие устойчивость к лекарствам. Далее, научная группа установила мутации в генах транспортных белков, участвующих в биосинтезе клеточной стенки и вирулентности, которые могут способствовать фенотипу устойчивости к лекарствам и успешной передаче этого штамма.

Рис. 10

Программа для визуального представления генома Integrative Genomic Viewer (IGV), показывающая данные коротких прочтений разных линий *M. tuberculosis* (A-G) в сравнении с черновым геномом при нанопоровом секвенировании. Левое изображение: вставка 4490 п.о, охватывающая 7 аннотированных генов. Правое изображение: вставка 390 п.о. Изображение любезно предоставлено д-ром Лахланом Койном, Университет Квинсленда, Австралия.



Особенно следует отметить точное определение свойств генов, богатых ГЦ и содержащих большое число повторов пролин-глутамат, пролин-пролин-глутамат (PE/PPE). Эти гены играют роль в способности избегать воздействия иммунной системы и вирулентности и представляют повышенный интерес для исследований туберкулеза.

Анализ генома позволил определить показатели устойчивости к лекарствам с полным фенотипическим соответствием.

Многие из изученных генов не присутствовали в геномной сборке, созданной по технологии секвенирования коротких прочтений, что, по мнению исследователей, обусловлено высоким содержанием в них ГЦ и, в некоторых случаях, делециями, нарушающими открытую рамку считывания.

Сравнение генома с геномами других штаммов *M. tuberculosis* показало 2 области (~4,5 тыс. п.о. и 390 п.о.), отсутствовавшие у европейско-американских штаммов (рис. 11).

Подводя итог своим исследованиям, научная группа заявила: «...сборка полного генома «эпидемического штамма» с широкой полирезистентностью с помощью нанопоровой технологии не только дала доказательство принципа будущей разработки этой технологии в эндемичных условиях устойчивого к лекарствам туберкулеза, но и показала возможности применения этой технологии для дальнейшего понимания генетики *M. tuberculosis*. Это позволило охарактеризовать особенности устойчивости к лекарствам и потенциальные факторы вирулентности этого штамма, а также дало эталонный штамм для будущей сборки и картирования генома»⁵¹.

3

Резюме

Микроорганизмы распространены повсеместно и составляют необходимую часть всех экосистем. Для улучшения понимания влияния микроорганизмов на здоровье и окружающую среду необходимо полностью изучить характеристики этих организмов. Хотя появление высокопроизводительных технологий секвенирования коротких прочтений улучшило возможности обнаружения и анализа микробов, присущие этим методам ограничения вызывают значительные сложности при сборке и анализе геномов.

Непосредственное секвенирование длинных прочтений в реальном времени, ставшее возможным благодаря нанопоровой технологии, позволяет преодолеть эти проблемы, проникая в самую суть микроорганизмов, как никогда ранее — давая возможность сборки полного генома, быстрого профилирования устойчивости к антибиотикам и вирулентности, а также обнаружения модифицированных оснований. Как заявил профессор Ник Ломан, Университет Бирмингема, Великобритания: «...мы находимся на новом рубеже полногеномной реконструкции с использованием метагеномной сборки на основании секвенирования длинных прочтений»⁵⁴.



4

О компании Oxford Nanopore Technologies

Компания Oxford Nanopore Technologies стоит за первым в мире и единственным нанопоровым ДНК-секвенатором, MinION – портативным недорогим устройством, дающим возможность длинных прочтений в реальном времени. Устройство MinION весом менее 100 г, питающееся от USB-порта ноутбука или устройства MinIT™, легко перевозить и использовать в полевых условиях, что открывает множество областей применения, в том числе наблюдение за эпидемиями и контроль окружающей среды. Возможность анализа в реальном времени в сочетании с упрощенной подготовкой проб и анализом данных позволяет быстро получить результаты, например, профилирования устойчивости к антибиотикам и вирулентности. Доступен ряд платформ, подходящих для геномов разных размеров, с более высокими требованиями к покрытию и производительности.

Оригинальная платформа MinION может дать десятки Гб данных на цикл, тогда как GridION X5 и PromethION дают сотни и тысячи Гб данных, соответственно. GridION использует ту же нанопоровую технологию, как MinION, и вмещает до 5 проточных ячеек с 512 каналами в каждой, в то время как PromethION размещает до 48 проточных ячеек с 3000 каналами в каждой. Каждую проточную ячейку можно использовать независимо, и пользователь может выбрать, сколько ячеек использовать каждый раз, чтобы выполнять разные эксперименты параллельно. GridION X5 и PromethION доступны без капитальных затрат – необходимо приобретать только расходные материалы, что дает возможность экономически эффективного анализа с возможностью масштабирования.

Последние новости, информацию о продукции, методиках и разработках в области нанопорового секвенирования см. на сайте: www.nanoporetech.com.



Рис. 12

MinION: портативное устройство карманного размера. Каждая проточная ячейка позволяет использовать до 512 каналов одновременно.



Рис. 13

GridION X5: 5 независимых проточных ячеек, встроенная обработка данных.



Рис. 14

PromethION: 48 независимых проточных ячеек, каждая из которых позволяет использовать до 3000 каналов одновременно. Встроенная обработка данных для высокопроизводительного секвенирования.

*Доступно в 2018 г.

5

Литература

- Locey, K.J. and Lennon, J.T. Scaling laws predict global microbial diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(21):5970-5 (2016).
- NCBI National Center for Biotechnology Information. Genomes information by organism. Available at: <www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/overview/> [Accessed: 21 February 2018].
- Land, M. et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct Integr Genomics* 15(2): 141–161 (2015).
- Duc Cao, M. et al. Scaffolding and completing genome assemblies in real-time with nanopore sequencing. *Nature Communications* 8 (2017).
- Tyson, J.R. et al. MinION-based long-read sequencing and assembly extends the *Caenorhabditis elegans* reference genome. *Genome Res.* 28(2):266-274 (2018).
- Loose, M. [Twitter] 18 January 2018. Available at: <[www.twitter.com/mattloose/status/954147458778587136](https://twitter.com/mattloose/status/954147458778587136)> [Accessed 08 February 2018].
- Hultqvist, J.J. Nanopore sequencing for genomics of heterotrophic protists. Presentation. Available at: <www.vimeo.com/250451494> [Accessed 08 February 2018].
- Kellog, E.A. Genome sequencing: Long reads for a short plant. *Nature Plants* 1, 15169 (2015).
- Oxford Nanopore Technologies. De novo assembly of prokaryotic and large eukaryotic genomes with long nanopore reads. Poster. Available at: <www.nanoporetech.com/resource-centre/posters/de-novo-assembly-prokaryotic-and-large-eukaryotic-genomes-long-nanopore> [Accessed: 05 April 2018].
- Ramette, A. Applications of nanopore sequencing to whole genome sequencing of human viruses in the clinical setting. [online] Available at: <www.vimeo.com/252171562> [Accessed: 13 February 2018].
- World Health Organisation. The world is running out of antibiotics, WHO report confirms. [online] Available at: www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/running-out-antibiotics/en/ [Accessed: 08 October 2017].
- Oxford Nanopore Technologies. Oxford Nanopore launches analysis workflow for antimicrobial resistance. [online] Available at: www.nanoporetech.com/about-us/news/oxfordnanopore-launches-analysis-workflow-antimicrobialresistance [Accessed: 28 February 2018].
- Votintseva, A.A. et al. Same-day diagnostic and surveillance data for tuberculosis via whole genome sequencing of direct respiratory samples. *J Clin Microbiol* 55(5):1285-1298 (2017).
- Iqbal, Z. (2017) Personal communication with Oxford Nanopore Technologies on 13 October 2017.
- Schmidt, K. et al. Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing. *J Antimicrob Chemother* 72: 104–114 (2017).
- Karamitros, T. et al. De novo assembly of Human Herpes Virus Type 1 (HHV-1) genome, mining of noncanonical structures and detection of novel drug-resistance mutations using short- and longread next generation sequencing technologies. *PLoS One* 11(6) (2016).
- Rhodes, J. Nanopore sequencing of a pathogenic fungi outbreak in a UK hospital. Presentation. Available at: <www.nanoporetech.com/resourcecentre/videos/nanopore-sequencingpathogenicfungi-outbreak-ukhospital-0> [Accessed: 06 October 2017].
- Luo, R. et al. First draft genome sequence of the pathogenic fungus *Lomentospora prolificans* (formerly *Scedosporium prolificans*) G3 (Bethesda). doi: 10.1534/g3.117.300107 [Epub ahead of print] (2017).
- Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L. and Holt, K.E. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *bioRxiv* 160614 (2017).
- Li, R. et al. Efficient generation of complete sequences of MDR-encoding plasmids by rapid assembly of MinION barcoding sequencing data. *GigaScience* gix132 (2018).
- Lemon, J.K, Khil, P.P, Frank, K.M. & Dekker, J.P. Rapid nanopore sequencing of plasmids and resistance gene detection in clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 55 (2017).
- Arredondo-Alonso, S., Willems, R.J., van Schaik, W. & Schürch, A.C. On the (im)possibility of reconstructing plasmids from whole-genome shortread sequencing data. *Microb Genom.* 3(10) (2017).
- European Nucleotide Archive. Genome pages – Plasmid. [online] Available at: <www.ebi.ac.uk/genomes/plasmid.html> Accessed: 21 March 2018.
- Ashton, P.M. MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. *Nature Biotechnology* 33 (2015).

25. Hacker, J. & Kaper, J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol.* 54:641-79 (2000).
26. Ricker, N., Qian, H., and Fulthorpe, R.R. The limitations of draft assemblies for understanding prokaryotic adaptation and evolution. *Genomics.* 100(3):167-75 (2012).
27. Schmidt, H. & Hensel, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 17(1): 14–56 (2004).
28. Castro-Wallace, S.L. et al. Nanopore DNA sequencing and genome assembly on the International Space Station. *Scientific Reports.* 7 (2017).
29. Wilson, J. W. et al. Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 16299–16304 (2007).
30. Stahl, S. Beyond nanopore sequencing in space: Identifying the unknown. Presentation. Available at: <www.vimeo.com/250263515> [Accessed: 21 February 2018].
31. Keller, M. Direct RNA sequencing of influenza viral RNA using the MinION. Presentation. Available at: <www.vimeo.com/250295802> [Accessed 13 February 2019].
32. Oxford Nanopore Technologies. Low bias RNAseq: PCR-cDNA, PCR-free direct cDNA and direct RNA sequencing. Poster. Available at: <www.nanoporetech.com/resource-centre/posters/low-biasrna-seq-pcr-cdna-pcr-free-direct-cdna-and-directrna-sequencing> [Accessed: 23 February 2018].
33. Weigele, P. & Raleigh, E.A. Biosynthesis and function of modified bases in bacteria and their viruses. *Chem Rev.* 116(20):12655-12687 (2016).
34. Smith, A.M. et al. Reading canonical and modified nucleotides in 16S ribosomal RNA using nanopore direct RNA sequencing. *bioRxiv* 132274 (2017).
35. Euskirchen, P. et al. Same-day genomic and epigenomic diagnosis of brain tumors using real-time nanopore sequencing. *Acta Neuropathol.* 134(5):691-703 (2017).
36. Timp, W. & Jain, M. Direct RNA cDNA sequencing of the human transcriptome. Available at: www.nanoporetech.com/resource-centre/videos/directrna-cdna-sequencing-human-transcriptome [Accessed 1 February 2018].
37. Alexa B.R. McIntyre, A.B.R. et al. Nanopore detection of bacterial DNA base modifications. *bioRxiv* 127100; doi: www.doi.org/10.1101/127100.
38. Garalde, D. R. et al. Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nature Methods* (2018) doi: 10.1038/nmeth.4577. [Epub ahead of print].
39. Wick, R. Hybrid Nanopore and Illumina assembly: working towards the perfect bacterial genome. Presentation. Available at: <www.vimeo.com/219736365> [Accessed: 15 February 2018].
40. GitHub. Unicycler. Available at: www.github.com/rrwick/Unicycler [Accessed 28 February 2018].
41. GitHub. Nanopolish. Available at: <www.github.com/jts/nanopolish> [Accessed: 25 February 2018].
42. Sasani, T. Tracking adaptive structural variation during host-pathogen conflict. Presentation. Available at: <www.nanoporetech.com/resourcecentre/talk/tracking-adaptive-structural-variation-during-host-pathogen-conflict> [Accessed: 16 February 2018].
43. Beattie, E. et al. Reversal of the interferon-sensitive phenotype of a vaccinia virus lacking E3L by expression of the reovirus S4 gene. *J Virol* 69, 499–505 (1995).
44. Elde, N.C. et al. Poxviruses deploy genomic accordions to adapt rapidly against host antiviral defenses. *Cell* 150, 831–41. doi:10.1016/j.cell.2012.05.049 (2012).
45. Sasani, T.A., Cone, K.R., Quinlan, A.R., & Elde, N.C. Long read sequencing reveals poxvirus evolution through rapid homogenization of gene arrays. *bioRxiv* 245373 (2018).
46. Chayavichitsilp, P., Buckwalter, J.V., Krakowski, A.C., & Friedlander, S.F. Herpes simplex. *Pediatr Rev.* 30(4): 119-29 (2009).
47. Harmenberg, J., Oberg, B. & Spruance, S. Prevention of ulcerative lesions by episodic treatment of recurrent herpes labialis: A literature review. *Acta dermato-venereologica.* 90(2):122–30 (2010).
48. GitHub. MIRA. Available at: <www.github.com/mira> [Accessed: 25 February 2018].
49. Warren, R.L. et al. LINKS: Scalable, alignmentfree scaffolding of draft genomes with long reads. *Gigascience.* 4:35 (2015).
50. World Health Organisation (WHO). Global tuberculosis report 2017. [online] Available at: www.who.int/tb/publications/global_report/en/ [Accessed: 28 February 2018].
51. Bainomugisa, A. et al. A complete nanopore-only assembly of an XDR Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage strain identifies novel genetic variation in repetitive PE/PPE gene regions. *bioRxiv* 25671 (2018).
52. GitHub. CANU. Available at: <www.github.com/marbl/canu> [Accessed: 28 February 2018].
53. GitHub. Racon. Available at: <www.github.com/isovic/racon> [Accessed: 27 March 2018].
54. Loman, N. [Twitter] 1 December 2018. Available from: [www.twitter.com/pathogenomenick/status/936636777078710272](https://twitter.com/pathogenomenick/status/936636777078710272) [Accessed: 21 March 2018].

Oxford Nanopore Technologies

Тел. +44 (0)845 034 7900

email info@nanoporetech.com

twitter [@nanopore](https://twitter.com/nanopore)

www.nanoporetech.com



Oxford Nanopore Technologies, пиктограмма колеса, GridION, Metrichor, MinION, MinIT, MinKNOW, PromethION, VolTRAX и SmidgION – зарегистрированные товарные знаки Oxford Nanopore Technologies в различных странах. Все остальные товарные знаки и названия являются собственностью соответствующих владельцев. © 2018 Oxford Nanopore Technologies. Все права сохранены. GridION, MinION, PromethION и VolTRAX предназначены только для научного использования.

MO_W1008_v1_revA_10Apr2018

000 «Диаэм»

Москва

ул. Магаданская, д. 7, к. 3 ■ тел./факс: (495) 745-0508 ■ sales@dia-m.ru

www.dia-m.ru

С.-Петербург

+7 (812) 372-6040
spb@dia-m.ru

Новосибирск

+7(383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Воронеж

+7 (473) 232-4412
vrn@dia-m.ru

Йошкар-Ола

+7 (927) 880-3676
nba@dia-m.ru

Красноярск

+7(923) 303-0152
krsk@dia-m.ru

Казань

+7(843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

Ростов-на-Дону

+7 (863) 303-5500
rnd@dia-m.ru

Екатеринбург

+7 (912) 658-7606
ekb@dia-m.ru

Кемерово

+7 (923) 158-6753
kemerovo@dia-m.ru

Армения

+7 (094) 01-0173
armenia@dia-m.ru

