

¹Beata Krawczyk, Karolina Stojowska, Justyna Leibner-Ciszak

OPRACOWANIE ZESTAWU DIAGNOSTYCZNEGO DO GENETYCZNEGO TYPOWANIA SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH METODĄ PCR MP

Katedra Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska
Kierownik: prof. dr hab. J. Kur

Omówiono etapy tworzenia zestawu diagnostycznego przeznaczonego do genetycznego typowania szczepów bakteryjnych wykorzystującego procedurę PCR MP (PCR Melting Profiles). Dokonano optymalizacji warunków i walidacji metody w celu przystosowania jej do potrzeb epidemiologicznej oceny zakażeń szpitalnych. Opracowany zestaw stwarza możliwości zastosowania go w laboratoriach prowadzących rutynowo badania diagnostyczne.

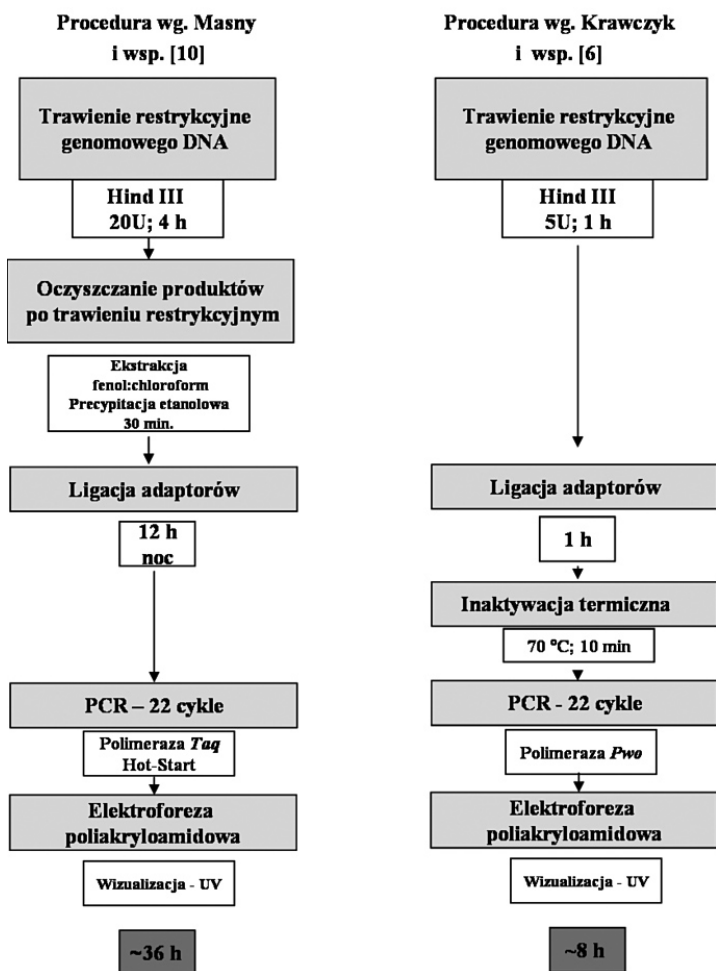
Od kilku lat dostępne są komercyjne zestawy diagnostyczne oparte o analizę materiału genetycznego do wykrywania i identyfikacji drobnoustrojów. Natomiast brak jest wygodnych w użyciu i tanich zestawów diagnostycznych do genetycznego typowania mikroorganizmów, przydatnych w badaniach epidemiologicznych. Metody takie powinny być uniwersalne, charakteryzować się wysokim potencjałem różnicującym, wysoką precyzją, powtarzalnością otrzymanyh wyników, łatwością i szybkością wykonania, łatwością interpretacji wyników oraz możliwością przebadania jednocześnie wielu próbek.

W roku 1995 Międzynarodowa Organizacja ds. Standaryzacji (ISO - International Organization for Standardization) ustaliła wytyczne, co do jakości klinicznych testów laboratoryjnych i systemowych testów diagnostycznych *in vitro* oraz walidacji metod mikrobiologicznych. W Europie, zasady walidacji alternatywnych metod mikrobiologicznych zostały określone normą PN-EN ISO 16140:2004. Ustalono, że każda nowo wprowadzana metoda powinna zostać zwalidowana. Walidacji należy dokonywać także wówczas, gdy kontrolując jakość stosowanej metody stwierdzono zmienność jej parametrów w czasie oraz, gdy planuje się rozszerzenie stosowania danej metody. Dana metoda może zostać poddana walidacji dopiero wówczas, gdy została poddana procesowi optymalizacji. Nie zostały do tej pory podane na świecie normy dla metod typowania genetycznego drobnoustrojów, dlatego w pracy kierowano się wytycznymi ICH (The International Conference of Pharmaceuticals for Humans Use) (2) oraz monografii EP (European Pharmacopeia) określonymi dla metod badawczych wykorzystujących techniki amplifikacji kwasów nukleinowych – NAT (Nucleic Acid Amplification Technique) (1). Brano także pod uwagę wskazówki zamieszczone

w raporcie dla Europejskiego Towarzystwa Mikrobiologii Klinicznej i Chorób Zakaźnych (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) (11).

Wśród molekularnych metod genetycznego typowania mikroorganizmów wyróżnia się techniki „genomowego odcisku palca” (fingerprinting), opierające się na analizie całego materiału genetycznego zawartego w komórce. Jedną z nich jest metoda PCR MP (Polymerase Chain Reaction Melting Profiles) opisana w roku 2003 przez *Masny i Plucienniczaka* (10). Łączy ona w sobie szybkość i prostotę wykonania z siłą dyskryminacji metody REA-PFGE (Restriction Enzyme Analysis - Pulsed Field Gel Electrophoresis) (6-9).

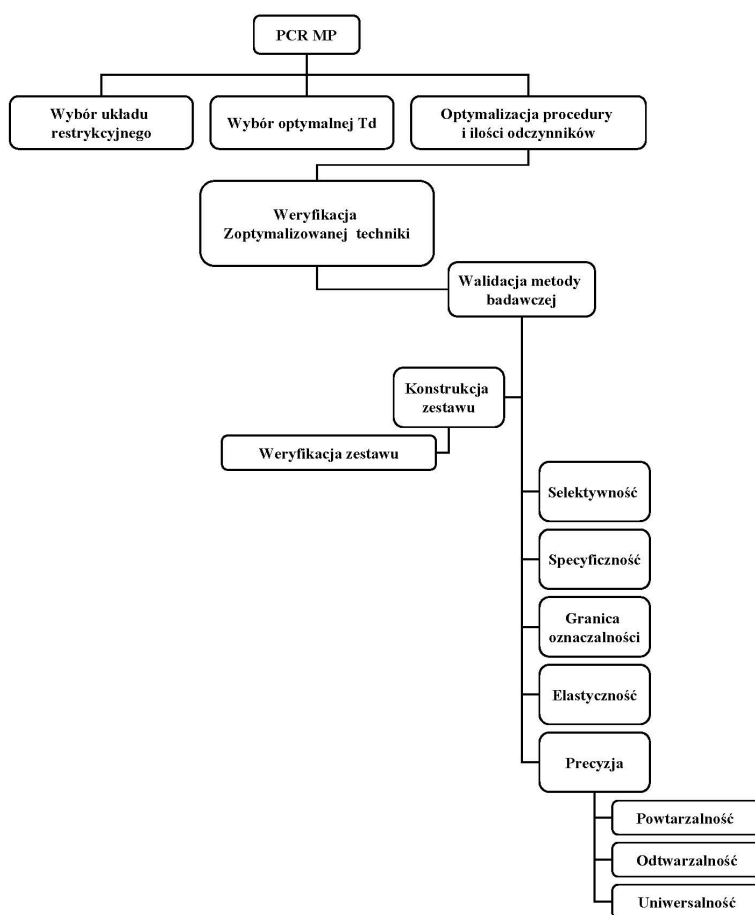
Metoda PCR MP oparta jest na trawieniu genomowego DNA jednym enzymem restrykcyjnym (średnio tnącym, dającym około 400-600 fragmentów i pozostawiającym wiszące końce 5'), ligacji krótkiego adaptoru (zbudowanego z oligonukleotydu pomocniczego o sekwencji komplementarnej do wiszącego końca 5' i właściwego oligonukleotydu ligowa-



Ryc. 1. Porównanie procedury PCR MP opublikowanej przez *Masny i Plucienniczak* (10) z zmodyfikowaną procedurą w pracy *Krawczyk i wsp.* (6).



nego) oraz amplifikacji ze starterami komplementarnymi do sekwencji końców fragmentów restrykcyjnych zakończonych adaptorem. Zastosowanie standardowej temperatury denaturacji w cyklach PCR, w zakresie 94 - 95°C, powoduje amplifikację wszystkich fragmentów restrykcyjnych zakończonych adaptorami. Aby uzyskać ograniczoną ilość amplifikowanych fragmentów (wybiórczą amplifikację) w celu łatwiejszej analizy wyników, stosuje się niższą temperaturę denaturacji w cyklach PCR. Ze względu na różną stabilność termiczną dwuniciowych fragmentów restrykcyjnych (zależną od składu sekwencji nukleotydowej oraz procentowego udziału par GC) możliwe jest eksperymentalne dobranie temperatury denaturacji, w której tylko część fragmentów restrykcyjnych ulega denaturacji, stając się matrycami do amplifikacji. Odpowiedni dobór temperatury denaturacji w cyklach PCR MP decyduje o potencjale różnicującym i stopniu złożoności profilu prążków. Po rozdziale elektroforetycznym, powstałe amplikony tworzą unikalny wzór prążków charakterystyczny dla DNA danego szczepu bakteryjnego, które następnie analizuje się po wybarwieniu bromkiem etydyny w świetle lampy UV.



Ryc. 2. Schemat postępowania zastosowany przy tworzeniu zestawu diagnostycznego.

Zastosowanie metody PCR MP w badaniach epidemiologicznych po raz pierwszy przedstawiono w roku 2006 w pracy Krawczyk i wsp. (6) dla genetycznego typowania izolatów *E. coli*, modyfikując procedurę metody PCR MP opublikowaną przez Masny i Phucienniczaka (10), znacząco skracając poszczególne jej etapy (Ryc. 1).

Przykłady zastosowań powyższej metody dla genotypowania innych gatunków mikroorganizmów zostały przedstawione w kolejnych pracach (7-9). Metoda PCR MP umożliwia określenie genotypu izolatów bakterii pochodzących z ognisk zakażeń szpitalnych, co pozwala ustalić szczep dominujący w danym oddziale szpitalnym i drogę jego transmisji w tym środowisku oraz ułatwia odróżnienie szczepów epidemicznych od endemicznych. Ze względu na duże możliwości aplikacyjne tej metody podjęto badania nad optymalizacją, walidacją i opracowaniem zestawu diagnostycznego na potrzeby wewnątrzgatunkowego typowania drobnoustrojów. Poszczególne etapy tworzenia zestawu diagnostycznego przedstawiono na Ryc. 2.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. Przedmiot badań stanowiły szczepy *Staphylococcus aureus* (3), *Escherichia coli* (3), *Klebsiella pneumoniae* (3), *Serratia marcescens* (3) i *Enterococcus faecium* (7), pochodzące z kolekcji Katedry Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej i dobrze scharakteryzowane genotypowo z zastosowaniem technik REA-PFGE, ADSRRS,

Tabela I. Szczepy bakterii o znanych genotypach, ustalonych za pomocą technik REA-PFGE, ADSRRS lub RAPD stanowiące przedmiot badań walidacji.

Lp.	Szczepy bakterii wykorzystane do walidacji PCR MP	Genotyp	Piśmiennictwo
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	SaA	(9)
2		SaA	
3		SaB	
1	<i>Serratia marcescens</i>	SmA	(4)
2		SmB	
3		SmB	
1	<i>Escherichia coli</i>	EcA	(6)
2		EcA	
3		EcB	
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KpA	(5)
2		KpA	
3		KpB	
1	<i>Enterococcus faecium</i>	EfA	(3)
2		EfA	
3		EfB	
4		EfC	
5		EfD	
6		EfE	
7		EfE1	



Tabela II. Szczepy *E. faecium* wykorzystane do weryfikacji zoptymalizowanej procedury PCR MP (8).

Lp.	Pacjent	Źródło pochodzenia	Genotyp ustalony wg procedury PCR MP przed optymalizacją	Genotyp ustalony wg REA-PFGE
1	1	Krew	A	A
2		Kał	A'	A
3		Kał	A'	A
4	2	Kał	B	B
5		Kał	A	A
6		Kał	A'	A
7		Kał	A'	A
8		Kał	C	C
9		Kał	A	A
10	3	Krew	D	D
11		Kał	A	A
12	4	Kał	B	B
13		Krew	B	B

RAPD (Tabela I). Ponadto, do badań włączono scharakteryzowane technikami PCR MP i REA-PFGE szczepy *Enterococcus faecium* (13 szczepów), izolowane z próbek materiału klinicznego pobranych od pacjentów hospitalizowanych w Specjalistycznym Publicznym Szpitalu Klinicznym Nr 1 w Gdańsku (Tabela II).

Izolacja genomowego DNA. Izolację genomowego DNA przeprowadzono zestawem Genomic Mini (A&A Biotechnology, Polska) zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. Stężenie DNA wynosiło 100 - 600 ng/μl w zależności od szczepu bakterii.

Enzymy restrykcyjne i ligaza polinukleotydowa. Trawienie genomowego DNA przeprowadzano z użyciem enzymów *HindIII*, *EcoRI*, *SalI*, *NcoI* i *BamHI*

Tabela III. Sekwencje oligonukleotydów i starterów wykorzystane w PCR MP.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencje oligonukleotydów	Stężenie wyjściowe
Oligonukleotydy tworzące adaptor w metodzie PCR MP		
Oligonukleotyd pomocniczy		
HindIII HELP	5' AGCTGTCGACGTTGG 3'	100 μM
SalI HELP	5' TCGAGTCGACGTTGG 5'	100 μM
NcoI HELP	5' CATGGTCGACGTTGG 3'	100 μM
EcoRI HELP	5' AATTGTCGACGTTGG 3'	100 μM
BamHI HELP	5' GATCGTCGACGTTGG 3'	100 μM
Oligonukleotyd ligowany		
PowieTm	5' CTCACTCTACCAACAACGTCGAC 3'	100 μM
Starter do amplifikacji PCR		
PowaAGCTT	5' CTCACTCTACCAACGTCGACAGCTT 3'	100 μM



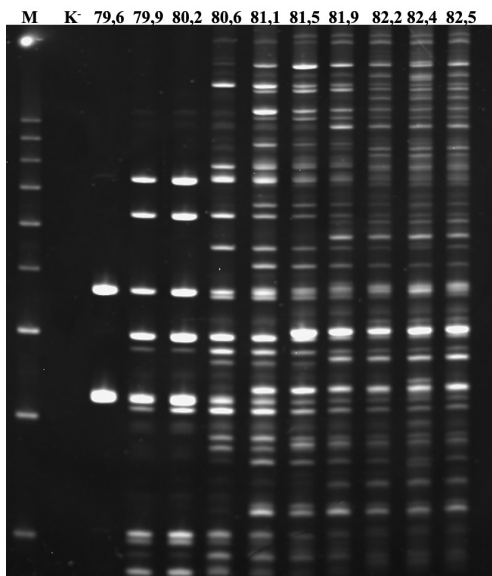
w odpowiednich dla nich buforach, zalecanych przez producenta (Fermentas, Litwa) w objętości 25 μ l. Aktywność enzymu restrykcyjnego *Hind*III w reakcji trawienia optymalizowano stosując: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 lub 10,0 U na reakcję. Optymalne stężenie adaptorów w reakcji ligacji wyznaczano stosując 0,2; 2,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 lub 50,0 pM w objętości 30 μ l, w warunkach jak w pracy Krawczyk i wsp. (6). Stosowano ligazę DNA faga T4 (Epicentre, Madison, WI lub Fermentas, Litwa) o aktywnościach 0,02; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 lub 1,2 U.

Sekwencje oligonukleotydów i starterów wykorzystane w PCR MP zostały przedstawione w tabeli III. Adaptor otrzymywano na drodze hybrydacji dwóch odpowiednio zaprojektowanych oligonukleotydów: pomocniczego i ligowanego (6). Do reakcji PCR użyto polimerazę DNA Hypernova (DNA Gdańsk II s.c., Polska) i odpowiednie dla niej bufony: Shark (10x: 200mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 % Triton X – 100, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) i Pwo (10x: 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 1 % Triton X – 100).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Optymalizacja procedury PCR-MP

Optymalizacja to cykl badań, pozwalający określić optymalne wartości badanych parametrów oraz wyznaczyć parametry krytyczne. Celem optymalizacji metody PCR MP było skrócenie czasu potrzebnego na przeprowadzenie badania, obniżenie kosztów materiałowych, uproszczenie procedury, przy jednoczesnym zachowaniu jakości i powtarzalności otrzymywanych wyników.



Ryc. 3. Elektroforetyczny rozdział produktów PCR MP przy określonej temperaturze denaturacji w cyklach reakcji PCR dla szczepu *E. faecium*; M – marker wielkości DNA (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 pz); K - kontrola negatywna reakcji PCR; 79,6 - 82,5 – zakres temperatury na etapie denaturacji w cyklach PCR



1. Wybór układu restrykcyjnego dla wybranego modelu badawczego.

Proces optymalizacji techniki PCR MP został przeprowadzony na kilku dowolnie wybranych klinicznych szczepach *E. faecium*. Pierwszym etapem metody PCR MP jest enzymatyczne trawienie genomowego DNA, które decyduje o różnicującym potencjale metody. Przebadano pięć układów restrykcyjnych: *HindIII*, *EcoRI*, *Sall*, *NcoI* i *BamHI*. Do optymalizacji zmodyfikowanej procedury metody PCR MP wybrano enzym restrykcyjny *HindIII* i odpowiednio dobrane do układu adaptory i startery. Układ ten nazwano „układem *HindIII*”.

2. Wybór optymalnej temperatury denaturacji.

Dla *E. faecium* w układzie *HindIII* przebadano zakresy temperatur denaturacji w cyklach PCR: od 75 °C do 90 °C; od 78,4 °C do 83,9 °C i od 79,6 °C do 82,5 °C. Za kryterium doboru optymalnej temperatury przyjmowano stabilność elektroforetycznego obrazu (profil prążków) oraz czytelność i łatwość do interpretacji ich obrazu wystarczającego do zróżnicowania

Tabela IV. Porównanie wartości parametrów dwóch badanych procedur (przed optymalizacją i po optymalizacji) oraz wytypowanie parametrów krytycznych procedury PCR MP.

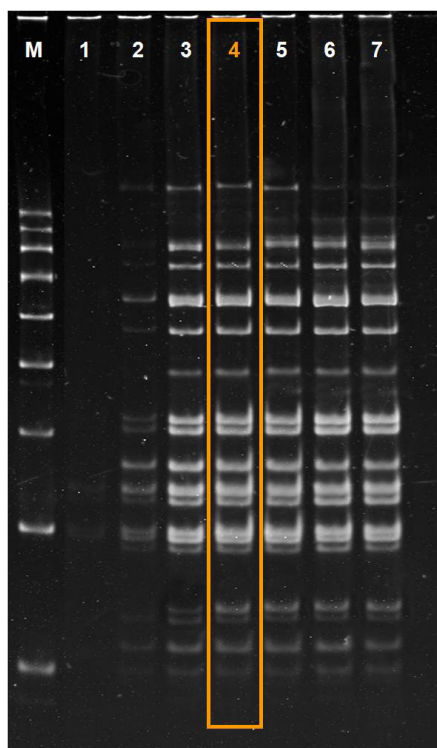
Etap		Parametr	Wartość początkowa parametru (6)	Wartość parametru wg procedury zoptymalizowanej	Parametr krytyczny
I.	Trawienie restrykcyjne	ilość genomowego DNA	~1000 ng	~400 ng	krytyczny (jakość)
		aktywność enzymu restrykcyjnego	5 U	2 U	krytyczny (koszt)
		temperatura reakcji	37°C	37°C	bez zmian
		czas trwania reakcji	1 h	15 min	krytyczny (czas)
II.	Reakcja ligacji	aktywność ligazy faga T4	1U	0,6 U	krytyczny (koszt)
		ilość adaptora	40 pmol	20 pmol	krytyczny (jakość)
		temperatura reakcji	16 - 18°C	16 -18°C	bez zmian
		czas trwania reakcji	1 h	15 min	krytyczny (czas)
III.	Inaktywacja termiczna	temperatura etapu	70°C	70°C	bez zmian
		czas trwania etapu	10 min	10 min	bez zmian
IV.	PCR	siła jonowa buforu reakcyjnego	bufor <i>Pwo</i> (firma DNA Gdańsk); 2 mM MgCl ₂	bufor <i>Shark</i> (firma DNA Gdańsk); 2mM MgCl ₂	krytyczny (jakość)
		aktywność polimerazy DNA (<i>Hypernova</i>)	2 U	0,5 U	krytyczny (koszt)
		ilość mieszaniny liganicyjnej	1µl	1µl	bez zmian
		ilość startera	25 pmol	25 pmol	bez zmian
		temperatura denaturacji dobrana w zależności od gatunku bakterii oraz mol % G+C		81,0°C dla <i>Enterococcus faecium</i>	krytyczny (jakość)



szczepów bakteryjnych. Na podstawie uzyskanych profili PCR za optymalną uznano temperaturę denaturacji w zakresie 81,1 - 81,5°C. W celu sprawdzenia różnicujących zdolności metody PCR MP przy ustalonej temperaturze denaturacji i składzie buforu, przetestowano dwa szczepy *E. faecium* o odmiennych genotypach z zastosowaniem gradientu temperatury denaturacji MP PCR. Wyniki doświadczenia wykazały, że ustalona temperatura denaturacji 81,0°C dla *E. faecium* spełnia wymienione wyżej kryteria (Ryc. 3). Dalsze badania optymalizacji zostały przeprowadzone w temperaturze denaturacji 81,0°C.

3. Optymalizacja parametrów PCR MP.

Za optymalną wartość parametru przyjmowano wartość dwukrotnie wyższą od przyjętej za minimalną, przy której uzyskiwano powtarzalny wynik. Przyjęty sposób rozumowania zilustrowano na przykładzie optymalizacji stężenia adaptora w reakcji ligacji (Ryc.4). Wszystkie parametry, których zmiana powodowała pogorszenie jakości uzyskiwanych wyników, skrócenie czasu trwania procedury badawczej oraz obniżenie jej kosztów uznawano za krytyczne dla metody PCR MP.



Ryc. 4. Elektroforetyczny profil produktów PCR przy zastosowaniu różnych ilości adaptora w reakcji ligacji. M – marker wielkości DNA (200-1000), 1-7 – kolejne próbki wg poniżej podanego opisu. Ścieżka 3 (wartość minimalna), ścieżka nr 4 – odpowiadająca obrazowi uzyskanemu przy dwukrotnym zwiększeniu stężenia adaptora przyjmowana jako wartość optymalna (zaznaczona ramką)

Lp.	1	2	3	4	5	6	7
Ilość adaptora [pmol]	0,2	2	10	20	30	40	50



Pozostałe oceniane parametry PCR MP przedstawiono w tabeli IV. Na podstawie analizy wyników doświadczenia stwierdzono, że najistotniejszym etapem procedury PCR MP, mającym znaczny wpływ na jakość otrzymywanych wyników jest PCR. Jest to etap krytyczny metody PCR MP, dlatego optymalizacji poddano również profil temperaturowo - czasowy reakcji PCR (Tabela V).

Tabela V. Optymalizacja podstawowego profilu temperaturowo - czasowego metody PCR MP.

Optymalizowany etap	Czas trwania etapu (s)		Zmiana
	Przed optymalizacją	Po optymalizacji	
ETAP I – Dysocjacja niezligowanego oligonukleotydu	120	60	2-krotnie (o 60s)
ETAP II - Wypełnianie końców 3'	300	60	5-krotnie (o 240s)
ETPA III – Denaturacja wstępna	90	30	3-krotnie (o 60s)
ETAP IV - Denaturacja	21 cykli	60	2-krotnie (o 30s)
ETAP V - Przyłączanie starterów i wydłużanie		135	90
ETAP VI - Wydłużanie końcowe	300	120	2,5-krotnie (o 180s)
Całkowity czas trwania	4905	2790	1,75-krotnie (o 2115s)

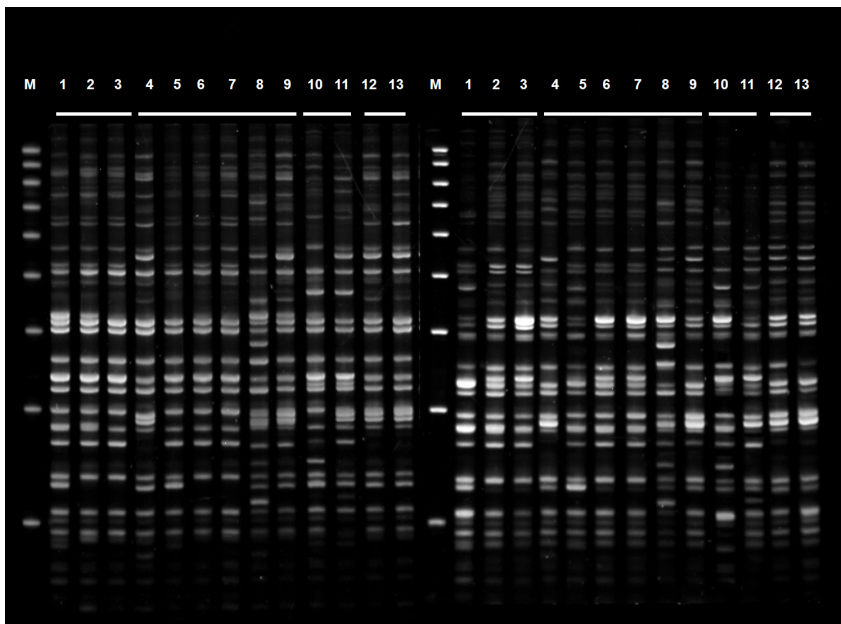
Legenda: ↓ skrócenie czasu

Uzyskane wyniki optymalizacji pozwoliły na skrócenie czasu trwania poszczególnych etapów reakcji PCR od 1,5 do 5x. Za krytyczny parametr uznano czas trwania etapu wydłużania końcowego. Całkowity czas trwania nowego profilu temperaturowo – czasowego wynosił 46,5 minuty i był krótszy od podstawowego profilu o około 35 minut. Zoptymalizowaną metodę PCR MP nazwano *PCR MP unique*.

Weryfikacja zoptymalizowanej procedury PCR MP dla szczepów *E. faecium*. Optymalizacja każdego z etapów przebiegała przy zachowaniu niezmienionej procedury dotyczącej pozostałych etapów. Zoptymalizowana procedura PCR MP powstała przy przyjęciu założenia, że jednoczesna zmiana wszystkich parametrów z wartości standardowych na uznane jako optymalne zachowa lub poprawi jakość otrzymywanych wyników. W celu sprawdzenia słuszności założeń zoptymalizowanej procedury PCR MP wykonano doświadczenie, w którym 13 wybranych szczepów *Enterococcus faecium* poddano analizie wykorzystując procedurę niezoptymalizowaną i zoptymalizowaną (Ryc. 5 A i B). Analiza wyników doświadczenia wykazała, że jednoczesna zmiana wszystkich parametrów ze standardowych na optymalne poprawiła jakość uzyskiwanych wyników (otrzymany obraz elektroforetyczny był czytelny i łatwy w interpretacji) i zachowała potencjał różnicujący metody PCR MP (uzyskano te same grupy genotypowe).

Efektem optymalizacji było czterokrotne skrócenie czasu reakcji trawienia restrykcyjnego i ligacji oraz prawie dwukrotne skrócenie czasu PCR. Ponadto, obniżono ilości





Ryc. 5. Analiza szczepów *E. faecium* wykonana według zoptymalizowanej procedury PCR MP (A) i według procedury PCR MP przed optymalizacją (B); M – marker wielkości DNA (100 – 1000), 1 - 13 – kolejne próbki.

wykorzystywanych odczynników, co znacząco wpłynęło na redukcję kosztów badania, przy jednoczesnym zachowaniu jakości i powtarzalności otrzymywanych wyników (Tabela VI).

Tabela VI. Porównanie procedury PCR MP przed optymalizacją i po optymalizacji pod względem czasu, kosztów, powtarzalności oraz jakości i interpretacji wyników.

Parametr	Podstawowa procedura PCR MP	Zoptymalizowana procedura PCR MP (<i>PCR MP unique</i>)
Całkowity czas badania*	8h	6h
Całkowity koszt pojedynczego badania	100%	71%
Jakość otrzymywanych wyników	bardzo dobra	bardzo dobra
Powtarzalność otrzymywanych wyników	wysoka	wysoka
Interpretacja wyników	łatwa	łatwa

* Całkowity czas badania razem z rozdziałem elektroforetycznym produktów amplifikacji i wybarwieniem żelu

Walidacja metody badawczej *PCR MP unique*

Celem walidacji zoptymalizowanej metody *PCR MP unique* było potwierdzenie, iż metoda ta jest odpowiednia do różnicowania drobnoustrojów w badaniach epidemiologicznych dla potrzeb testu jakościowego. Badano selektywność i siłę różnicującą metody badawczej, granicę oznaczalności oraz elastyczność pod względem źródła pochodzenia stosowanych



odczynników, temperatury przeprowadzonych reakcji oraz wykorzystywanej aparatury, a także powtarzalność i precyzję uzyskiwanych wyników.

1. **Selektywność metody badawczej *PCR MP unique*.** Jako miarę selektywności metody *PCR MP unique* przyjęto zdolność do amplifikacji cząsteczek DNA, zakończonych z obu stron sekwencją odpowiedniego adaptora w obecności pozostałych składników mieszaniny (enzymy, składniki buforów, niewykorzystane adaptory, zanieczyszczenia, składniki matrycy). Za wynik pozytywny analizy uznano obecność produktów amplifikacji PCR. Warunkiem koniecznym do uzyskania pozytywnego wyniku analizy metodą *PCR MP unique* jest poddanie DNA pełnemu procesowi analitycznemu, tj. trawieniu enzymem restrykcyjnym, ligacji z adaptorem i przeprowadzenie selektywnej amplifikacji.

2. **Siła różnicująca metody *PCR MP unique*.** Specyficzność metody PCR MP dotyczy zdolności do różnicowania drobnoustrojów w obrębie gatunku. Aby zbadać specyficzność metody *PCR MP unique* różnicowaniu poddano kliniczne szczepy *E. faecium* pochodzące z tego samego ogniska epidemicznego (related strains) oraz szczepy niepowiązane z ogniskiem epidemicznym (unrelated strains). Wyniki doświadczenia pokazały, że metoda *PCR MP unique* pozwala na rozróżnienie szczepów niepowiązanych z ogniskiem, od związanych z określoną sytuacją epidemiologiczną.

3. **Granica oznaczalności metody badawczej *PCR MP unique*.** Za granicę oznaczalności dla metody *PCR MP unique* uznano taką ilość DNA, która dodana do pierwszego etapu badania (trawienie restrykcyjne genomowego DNA) pozwoli przy zastosowaniu metody barwienia DNA roztworem bromku etydy, zaobserwować w świetle UV obecność produktów PCR, dających charakterystyczny wzór prążków dla badanego organizmu i wybranej temperatury denaturacji. Najmniejsza ilość DNA zastosowana do reakcji trawienia restrykcyjnego w *PCR MP unique*, umożliwiającą uzyskanie pełnego, czytelnego wzoru elektroforetycznego wynosiła 240 ng. Wartość tę uznano za granicę oznaczalności metody *PCR MP unique*.

4. **Elastyczność metody badawczej *PCR MP unique*.** Elastyczność metody dotyczy zarówno cech ilościowych (ilość, aktywność stosowanych odczynników, czas trwania poszczególnych etapów) jak i jakościowych (rodzaj stosowanych odczynników i aparatury).

Metoda *PCR MP unique* jest wysoce elastyczna w przypadku reakcji trawienia i ligacji. Aby zbadać, czy źródło pochodzenia restryktazy *HindIII* wpływa na jakość otrzymanych wyników, przygotowano trzy próbki zawierające optymalną ilość genomowego DNA wybranego szczepu *E. faecium*. Dwie próbki poddano analizie metodą *PCR MP unique*, stosując w reakcji trawienia endonukleazę *HindIII* pochodzącą od dwóch różnych producentów (Roche i Fermentas). W trzeciej próbie DNA poddano trawieniu modyfikowanym enzymem *HindIII* Fast Digest™ (Fermentas). Według producenta enzym ten trawi całkowicie 1 µg DNA w ciągu 5 min. Okazało się, że źródło pochodzenia restryktazy *HindIII* nie wpływa na jakość otrzymywanych wyników. Uzyskane profile elektroforetyczne były identyczne. Stosowanie enzymu *HindIII* Fast Digest™ pozwala na trzykrotne skrócenie czasu przeprowadzania reakcji trawienia, ale niestety koszt pojedynczej reakcji wzrasta kilkakrotnie ze względu na wysoką cenę enzymu.

Czas prowadzenia reakcji, ilość i aktywność stosowanych odczynników może nieznacznie różnić się od wartości przyjętych za optymalne, bez wpływu na jakość otrzymywanych wyników. Nie jest wymagane, aby mieszaniny ligacyjne do reakcji PCR dla wielu

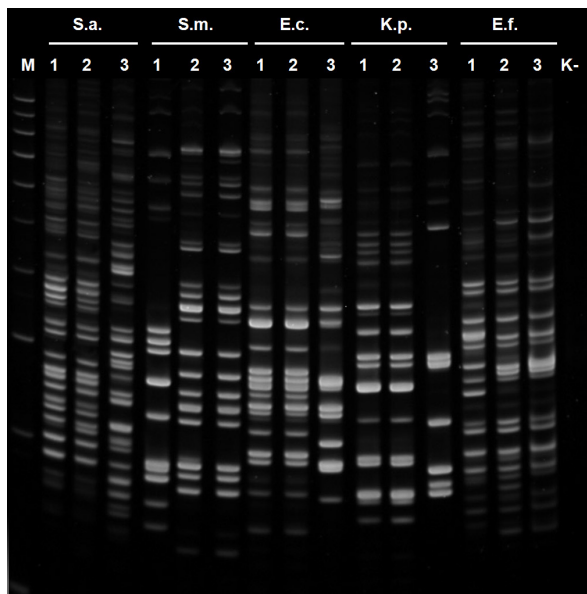


prób były przygotowywane jednocześnie i z wykorzystaniem tych samych odczynników. Z doświadczeń własnych wynika, że dla danej puli analizowanych szczepów, PCR powinien być wykonywany w mieszaninie reakcyjnej o jednakowym składzie i na tym samym termocyklerze. Pomimo niskiej elastyczności metody *PCR MP unique* na etapie PCR, zastosowanie jednakowych warunków dla wszystkich prób pozwala na prawidłowe różnicowanie analizowanych szczepów.

5. Precyzja metody badawczej *PCR MP unique*. Miarą precyzji metody *PCR MP unique* jest stopień zgodności elektroforetycznych profili produktów PCR, otrzymanych na drodze niezależnych badań tego samego szczepu. Precyzję wyraża powtarzalność i odtwarzalność otrzymywanych wyników.

5.1 Powtarzalność metody PCR MP. W celu określenia powtarzalności metody *PCR MP unique* wykonano trzy niezależne oznaczenia czterech szczepów *E. faecium* w odstępach dwutygodniowych. W wyniku tych oznaczeń uzyskano dla każdego badanego szczepu identyczny wzór elektroforetyczny. Grupowanie szczepów do ustalonych wcześniej i potwierdzonych innymi metodami grup genotypowych (REA-PFGE, ADSRRS-fingerprinting, RAPD) (3) nie uległo zmianie. Na podstawie analizy uzyskanych wyników stwierdzono, że metoda *PCR MP unique* jest powtarzalna.

5.2 Odtwarzalność metody. Aby zbadać odtwarzalność metody *PCR MP unique* przeprowadzono pełną analizę trzynastu szczepów *E. faecium* przez inną osobę. Dwa niezależne oznaczenia, wykonane przez dwie różne osoby doprowadzały do uzyskiwania identycznych wyników. W obu przypadkach zaklasyfikowano badane szczepy do tych samych grup genotypowych. Na podstawie analizy uzyskanych wyników stwierdzono, że metoda *PCR MP*



Ryc. 6. Różnicowanie wewnątrzgatunkowe drobnoustrojów w odpowiedniej dla nich temperaturze denaturacji PCR; M – marker wielkości DNA (200 – 1000 pz), 1 - 3 – kolejne próbki (wg Tab. VII); S.a. - *Staphylococcus aureus*, S.m. - *Serratia marcescens*, E.c. - *Escherichia coli*, K.p. - *Klebsiella pneumoniae*, E.f. - *Enterococcus faecium*.



unique jest odtwarzalna.

6. Uniwersalność metody badawczej *PCR MP unique*. W celu sprawdzenia przydatności *PCR MP unique* do wewnątrzgatunkowego różnicowania różnych drobnoustrojów, wybrano szczepy reprezentujące następujące gatunki bakterii: *S. aureus*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae*, *E. coli* i *E. faecium*. Z każdego gatunku wybrano po trzy szczepy: dwa o tym samym genotypie i jeden o genotypie odmiennym. Wynik doświadczenia pokazuje (Ryc. 5), że metoda *PCR MP unique* może być wykorzystana do wewnątrzgatunkowego różnicowania różnych bakterii, nawet odległych filogenetycznie. Warunkiem prawidłowego różnicowania jest dobór odpowiedniej temperatury denaturacji w reakcji

Tabela VII. Badanie uniwersalności metody *PCR MP unique*.

Oznaczenie szczepów	Gatunek bakterii	Mol % G+C	Temperatura denaturacji	Grupa genotypowa oznaczona metodą <i>PCR MP unique</i>
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	37	81,0°C	SaA
2				SaA
3				SaB
1	<i>Serratia marcescens</i>	59	87,9°C	SmA
2				SmB
3				SmB
1	<i>Escherichia coli</i>	50	87,9°C	EcA
2				EcA
3				EcB
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40	87,9°C	KpA
2				KpA
3				KpB
1	<i>Enterococcus faecium</i>	37	81,0°C	EfB
2				EfA
3				EfA

PCR, która zależy m.in. od procentowej zawartości par GC (Tab. VII).

Opracowanie zestawu diagnostycznego do szybkiego genotypowania szczepów bakteryjnych w oparciu o zoptymalizowaną technikę PCR MP (*PCR MP unique*).

Na podstawie zoptymalizowanej i zwalidowanej techniki PCR MP (*PCR MP unique*) został zaprojektowany zestaw diagnostyczny *PCR MP unique* – KIT obliczony na 50 prób. Zestaw został przygotowany do genotypowania *E. faecium* z możliwością dostosowania go dla innych bakterii, poprzez dobór odpowiedniej dla badanego gatunku drobnoustroju temperatury denaturacji w reakcji PCR. Również możliwość zmiany enzymu restrykcyjnego pozwala dostosować zestaw do potrzeb potencjału różnicującego metody.

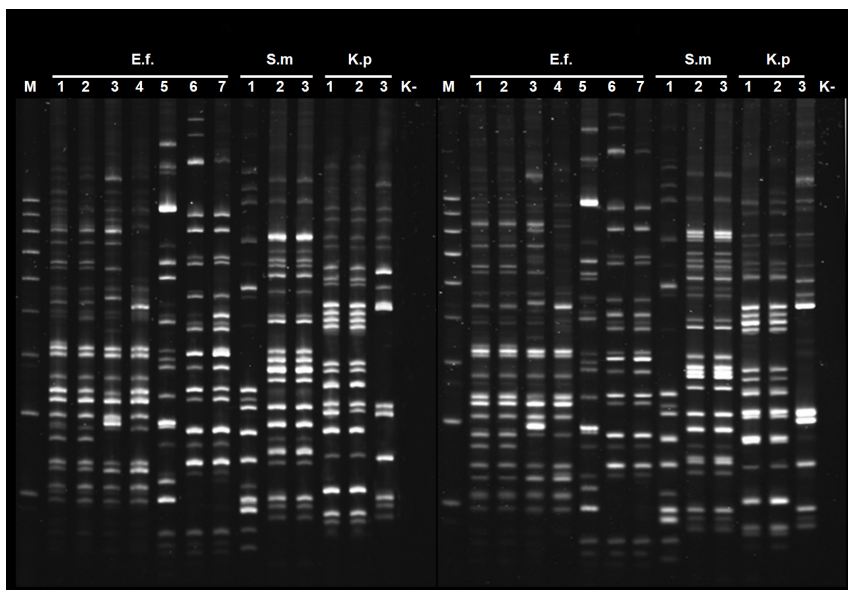
Zbadano trwałość zestawu diagnostycznego *PCR MP unique* – KIT przez okres sześciu miesięcy, wykonując w odstępach, co dwa tygodnie analizę wzorów PCR MP dla dwóch szczepów *E. faecium*, należących do różnych grup genotypowych. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że pojedynczy zestaw *PCR MP unique* – KIT może być wielokrotnie wykorzystywany przy zachowaniu trwałości przez okres sześciu miesięcy.



Weryfikacja zestawu *PCR MP unique* – KIT

W celu ostatecznego potwierdzenia przydatności zestawu *PCR MP unique* – KIT do różnicowania drobnoustrojów wykonano pełną analizę 13 klinicznych szczepów *Enterococcus faecium* zaklasyfikowanych do różnych grup genotypowych (8). Uzyskano identyczne wyniki analizy jak w przypadku stosowania zoptymalizowanej metody *PCR MP unique*.

Zbadano również odtwarzalność wyników, tym razem przy wykorzystaniu zestawu *PCR MP unique* – KIT. Wykonano dwie niezależne analizy dla 13 szczepów bakteryjnych różnych gatunków (*E. faecium*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae*). Wyniki doświadczenia pokazały, że badania przeprowadzone przez dwie różne osoby z zastosowaniem zestawu diagnostycznego *PCR MP unique*-KIT są odtwarzalne (Ryc. 6). Łatwość i szybkość wykonania badania oraz interpretacji uzyskiwanych wyników, niski koszt analizy i sprzętu sprawiają, iż zestaw ten może być z powodzeniem stosowany w rutynowych badaniach wykonywanych dla potrzeb analizy epidemiologicznej.



Ryc. 7. Analiza wybranych szczepów bakteryjnych z zastosowaniem zestawu *PCR MP unique* – KIT, wykonana przez osobę 1 (panel A) i przez osobę 2 (panel B); M – marker wielkości DNA (200 – 1000 pz), 1 - 13 – wyniki analiz dla różnych szczepów bakteryjnych różnych gatunków bakterii; E.f. - *Enterococcus faecium*, S.m. - *Serratia marcescens*, K.p. - *Klebsiella pneumoniae*; K- - kontrola ujemna.

B. Krawczyk, K. Stojowska, J. Leibner-Ciszak

ELABORATION OF PCR MP DIAGNOSTIC KIT FOR GENETIC TYPING OF BACTERIAL STRAINS

SUMMARY

The rules of diagnostic kit elaboration for genetic typing of microorganisms, designed for epidemiological studies, have been shown in this paper. PCR MP method has been used for diagnostic kit elaboration. Well defined epidemiologically *Enterococcus faecium* strains have been applied as a research model. The optimisation of the method has been carried out using different amount of reagents and time of the particular stages. Critical parameters, which have significant influence on the quality of obtained results, have been assigned. Optimised procedure, named *PCR MP unique*, has been validated for genetic typing of different species of microorganisms and its potential application for routine epidemiological studies. The PCR MP method has been successfully used for elaboration of diagnostic *PCR MP unique*-KIT, which allows intra-species differentiation of bacterial strains. The *PCR MP unique*-KIT enables fast, easy and cheap analysis of strains, using elementary laboratory equipment - gradient thermocycler.

PIŚMIENNICTWO

1. European Pharmacopoeia. (2003) Method 2.6.21. Nucleic Acid Amplification Techniques.
2. European Pharmacopoeia. Technical Guide – December 1999. Validation of analytical methods.
3. Krawczyk B, Lewandowski K, Bronk M i inni. Evaluation of novel method based on amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (ADSRRS-fingerprinting) for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J Microbiol Methods 2003; 52: 341-51.
4. Krawczyk B., Naumiuk L., Lewandowski K. i inni. Evaluation and comparison of random amplification of polymorphic DNA, pulsed-field gel electrophoresis and ADSRRS-fingerprinting for typing *Serratia marcescens* outbreaks. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 38: 241-48.
5. Krawczyk B., Samet A., Czarniak E. i inni. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit: control of an outbreak using a new ADSRRS technique. Pol J Microbiol 2005; 54: 105-10.
6. Krawczyk B., Samet A., Leibner J. i inni. Evaluation of a PCR melting profile (PCR MP) technique for bacterial strain differentiation. J Clin Microbiol 2006; 44: 2327-32.
7. Krawczyk B., Leibner J., Samet A., Kur J. Technika PCR MP (PCR Melting Profile) - możliwości zastosowania w badaniach epidemiologicznych. Med Dośw Mikrobiol 2007; 59: 5-16.
8. Krawczyk B., Leibner J., Stojowska K. i inni. PCR Melting Profile method for genotyping of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Hematological Unit patients. Pol J Microbiol 2007; 56: 65-70.
9. Krawczyk B., Leibner J., Barańska-Rybak W. i inni. ADSRRS-fingerprinting and PCR MP techniques for studies of intraspecies genetic relatedness in *Staphylococcus aureus*. J Microbiol Methods 2007; 71: 114-22.
10. Masny A, Plucienniczak A. Ligation mediated PCR performed at low denaturation temperatures-PCR melting profiles. Nucleic Acids Res 2003; 31: e114.
11. van Belkum A., Tassios P., Dijkshoorn L. i inni. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 1-46.



Otrzymano: 15 IV 2008 r.

Adres Autora: 80-952 Gdańsk, Narutowicza 11/12, Katedra Mikrobiologii,
Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska
email: beatak@chem.pg.gda.pl