

Politechnika Gdańska  
Wydział Chemiczny  
Katedra Mikrobiologii

## Rozprawa doktorska

Opracowanie nowych metod typowania genetycznego bakterii opartych o ligację adaptorów oligonukleotydowych do fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA i technikę PCR, zastosowanie i ocena ich przydatności w badaniach epidemiologicznych

**mgr inż. Karolina Stojowska**

Promotor: dr hab. Beata Krawczyk

Gdańsk 2012



*Składam serdeczne podziękowania  
Pani dr hab. Beacie Krawczyk  
za poświęcony czas, wsparcie merytoryczne i pomoc  
w wykonaniu i napisaniu niniejszej pracy.*

*Dziękuję prof. dr hab. Józefowi Kur  
oraz wszystkim Pracownikom, Koleżankom i Kolegom  
z Katedry Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej,  
za cenne wskazówki i miłą, rodzinną atmosferę  
oraz za wspólnie spędzony czas.*

*Dziękuję Mojej Mamie, Siostrze  
Mojemu Kochanemu Maciejowi,  
Natalii, Beacie i Mo-sHe  
za wsparcie, wyrozumiałość, ciepłe słowo  
- za wszystko.*









# Spis treści

1. Cel pracy .....	9
2. Streszczenie .....	10
3. Spis stosowanych skrótów .....	14
4. Wstęp .....	15
4.1. Dochodzenia epidemiologiczne.....	15
4.2. Metody typowania .....	16
4.2.1. Metody fenotypowe.....	17
4.2.2. Metody genotypowe .....	18
4.2.2.1. Typowanie oparte na analizie plazmidowego DNA.....	20
4.2.2.2. Typowanie oparte na analizie chromosomowego DNA .....	20
4.3. Badania epidemiologiczne i endemiczne – kryteria wyboru metody typowania .....	37
4.4. Statystyczna analiza wyników typowania genetycznego .....	39
5. Materiały i metody .....	43
5.1. Materiały .....	43
5.1.1. Szczepy <i>Acinetobacter</i> sp. ....	43
5.1.2. Szczepy <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	44
5.1.3. Szczepy bakteryjne stosowane w analizie porównawczej .....	45
5.1.4. DNA faga $\lambda$ .....	45
5.1.5. Pożywki i podłoża .....	45
5.1.6. Bufory .....	45
5.1.7. Enzymy .....	46
5.1.6. Oligonukleotydy .....	47
5.1.9. Markery wielkości DNA .....	48
5.1.10. Pozostałe roztwory i odczynniki .....	49
5.1.11. Materiały podstawowe .....	49
5.1.12. Aparatura i sprzęt laboratoryjny .....	49
5.1.13. Zestawy komercyjne.....	50
5.1.14. Stosowane programy komputerowe.....	50
5.2. Metody .....	50
5.2.1. Izolacja genomowego DNA bakterii .....	50
5.2.2. Rozdział elektroforetyczny DNA w żelu agarozowym .....	50
5.2.3. Rozdział elektroforetyczny DNA w żelu poliakryloamidowym.....	50
5.2.4. Oczyszczanie produktów PCR z mieszaniny reakcyjnej.....	51
5.2.5. Oczyszczanie produktów PCR z żelu agarozowego .....	51
5.2.6. Amplifikacja oparta na reakcji PCR.....	51
5.2.7. Trawienie restrykcyjne produktów PCR .....	52
5.2.8. Metoda <i>recA</i> -PCR/RFLP - <i>Tsp509I</i> .....	52

5.2.9. ITS PCR .....	53
5.2.10. PCR MP .....	54
5.2.11. Metoda LM PCR/ <i>Shifter</i> .....	56
5.2.12. LM PCR <i>simple</i> .....	57
5.2.13. ddLMS PCR.....	59
5.2.14. Analiza porównawcza profili elektroforetycznych .....	62
5.2.15. Analiza sekwencji DNA.....	62
6. Wyniki i wnioski .....	63
6.1. Genetyczna charakterystyka wybranych szczepów bakteryjnych.....	63
6.1.1. Genetyczna charakterystyka szczepów <i>K. oxytoca</i> .....	63
6.1.2. Genetyczna charakterystyka szczepów <i>Acinetobacter</i> sp. ....	66
6.2. Metoda ddLMS PCR .....	69
6.2.1. Mechanizm metody ddLMS PCR.....	74
6.2.2. Elementy krytyczne metody ddLMS PCR.....	76
6.2.2.1. Sekwencja markerowa jako czynnik decydujący o specyficzności metody ddLMS PCR.....	76
6.2.2.2. Enzymy restrykcyjne jako czynnik decydujący o poziomie dyskryminacji metody ddLMS PCR.....	76
6.2.2.3. Budowa adaptora .....	77
6.2.2.4. Startery w reakcji PCR.....	78
6.2.2.5. Profil temperaturowo – czasowy reakcji PCR.....	78
6.2.3. Rodzaje układów diagnostycznych ddLMS PCR.....	79
6.2.4. Weryfikacja mechanizmu metody ddLMS PCR na modelu DNA faga $\lambda$ .....	80
6.2.5. Zasady projektowania układów diagnostycznych wykorzystujących metodę ddLMS PCR .....	86
6.2.6. Przykłady układów diagnostycznych opartych o metodę ddLMS PCR .....	86
6.2.6.1. Układ <i>pehX</i> -ddLMS PCR do wewnątrzgatunkowego typowania <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	87
6.2.6.2. Układ <i>recA</i> -ddLMS PCR do typowania szczepów <i>Acinetobacter</i> sp.....	93
6.2.6.3. Układ <i>rrn</i> -dLMS PCR do wewnątrzgatunkowego typowania <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	98
6.3. Projektowanie układów diagnostycznych w oparciu o znane metody LM PCR do jednoczesnego typowania i identyfikacji gatunkowej drobnoustrojów.....	103
6.3.1. Układ LM PCR <i>simple/XhoI</i> do różnicowania i identyfikacji <i>A. baumannii</i> .....	104
6.3.2. Układ LM PCR <i>simple/XbaI</i> do różnicowania i identyfikacji <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	106
6.3.3. Układ LM PCR/ <i>Shifter</i> do typowania <i>A. baumannii</i> i identyfikacji rodzaju <i>Acinetobacter</i> .....	109
6.4. Porównanie metod LM PCR – zastosowanie i ocena przydatności w badaniach epidemiologicznych .....	113
7. Wnioski końcowe.....	122
8. Piśmiennictwo .....	124
9. Dorobek naukowy.....	130



## 1. Cel pracy

Celem pracy jest zaprojektowanie nowych metod typowania genetycznego drobnoustrojów w oparciu o technikę LM PCR, ich weryfikacja w stosunku do istniejących metod, konstrukcja układów diagnostycznych do jednoczesnego typowania i identyfikacji gatunkowej szczepów *Klebsiella oxytoca* oraz *Acinetobacter* spp. oraz ocena ich przydatności w badaniach epidemiologicznych.

## 2. Streszczenie

Wprowadzenie technik molekularnych do diagnostyki mikrobiologicznej znacznie przyspieszyło proces identyfikacji gatunkowej i różnicowania drobnoustrojów. W ostatnich latach szczególnie dużo uwagi przywiązuje się do kontroli zakażeń szpitalnych, czego konsekwencją jest poszukiwanie nowych technik molekularnych, jako narzędzi ułatwiających badania epidemiologiczne, a także badania taksonomiczne.

Celem pracy było opracowanie metody diagnostycznej, opartej na metodzie ligacji adaptorów (LM PCR, *ang.* Ligation Mediated PCR), która umożliwiłaby jednoczesną identyfikację gatunkową i różnicowanie drobnoustrojów, jej weryfikacja w stosunku do istniejących metod oraz ocena jej przydatności w badaniach epidemiologicznych.

W pierwszej części rozprawy przedstawiłam propozycję nowej metody ddLMS PCR (*ang.* double digestion Ligated Mediate Suppression PCR), która do specyficznego typowania drobnoustrojów wykorzystuje polimorfizm sekwencji poprzedzającej sekwencję markerową (znaną i specyficzną dla danego gatunku sekwencję DNA). Metoda ta łączy w sobie specyficzność charakterystyczną dla prostej reakcji PCR i możliwość różnicowania szczepów, typową dla technik LM PCR. W metodzie tej genomowe DNA poddawane jest trawieniu dwoma enzymami restrykcyjnymi. Do powstałych fragmentów restrykcyjnych w wyniku reakcji ligacji przyłącza się jeden rodzaj adaptoru. Reakcję PCR przeprowadza się z użyciem dwóch starterów, z których jeden jest komplementarny do adaptoru, a drugi do końca 5' sekwencji markerowej. Amplifikacji ulegają tylko te fragmenty restrykcyjne, które zawierają wewnątrz sekwencję markerową. Pozostałe fragmenty nie będą amplifikowane ze względu na brak miejsca wiązania dla startera.

Przedstawiłam etapy projektowania metody ddLMS PCR, opisałam elementy krytyczne oraz mechanizm molekularny, wpływający na selekcję fragmentów amplifikowanych w reakcji PCR. Koncepcję metody zweryfikowałam na DNA faga lambda. Zaprojektowałam dwa układy modelowe: (1) 5' ddLMS PCR wykorzystujący enzymy restrykcyjne pozostawiające jednoniciowe końce 5' oraz (2) 3' ddLMS PCR wykorzystujący enzymy restrykcyjne pozostawiające jednoniciowe końce 3'. Układy modelowe miały na celu potwierdzić przedstawione założenia mechanizmu molekularnego metody ddLMS PCR, określić specyficzność amplifikacji fragmentów zawierających wewnątrz sekwencję markerową oraz sprawdzić wrażliwość metody na kontaminację. Wykazałam, że wynik pozytywny, w postaci produktu PCR jest możliwy do uzyskania tylko wtedy, gdy DNA poddane analizie zawiera sekwencję markerową, charakterystyczną dla mikroorganizmu, dla którego układ został zaprojektowany. Kontaminacja próby materiałem genetycznym pochodzącym od innych drobnoustrojów nie miała wpływu na wynik typowania.

Ponieważ metoda ddLMS PCR nie jest uniwersalna, szczegółowo przedstawiłam zasady projektowania układów diagnostycznych w zależności od celu jaki chcemy uzyskać oraz warunki i parametry krytyczne, wpływające na specyficzność i poziom dyskryminacji metody. Zaprojektowałam trzy układy diagnostyczne: (1) *recA*-ddLMS PCR do międzygatunkowego typowania bakterii *Acinetobacter* sp.

(2) *rrn*-ddLMS PCR do wewnątrzgatunkowego typowania *Acinetobacter baumannii* oraz (3) *pehX*- ddLMS PCR do wewnątrzgatunkowego typowania *Klebsiella oxytoca*.

W drugiej części rozprawy przedstawiłam możliwość wykorzystania znanych metod LM PCR, do projektowania układów diagnostycznych umożliwiających jednocześnie różnicowanie i identyfikację gatunkową lub rodzajową wybranych drobnoustrojów, na podstawie obecności charakterystycznych prążków w profilu elektroforetycznym produktów PCR. Zaproponowałam trzy układy diagnostyczne. (1) Układ LM PCR *simple/XhoI* do wewnątrzgatunkowego różnicowania *A. baumannii*, zakłada trawienie genomowego DNA jednym rzadko tnącym enzymem restrykcyjnym, następnie ligację z jednym rodzajem adaptora i amplifikację z jednym rodzajem startera. W reakcji PCR amplifikowane są tylko fragmenty DNA nie przekraczające długości 3000 pz. Jest to najprostrzy wariant metody LM PCR, nazwany LM PCR *simple*. W wyniku typowania otrzymuje się ograniczoną liczbę produktów PCR, z których jeden występuje u wszystkich szczepów tego gatunku i wskazuje przynależność gatunkową. Pozostałe produkty PCR, charakterystyczne dla szczepu, umożliwiają wewnątrzgatunkowe różnicowanie. (2) Układ *pehX*-LM PCR *simple/XbaI* do typowania *K. oxytoca*, opiera się na metodzie LM PCR *simple*, wzbogaconej o dodatkową amplifikację specyficznej sekwencji genu *pehX*. Reakcję PCR prowadzi się z udziałem startera komplementarnego do adaptora umożliwiającego amplifikację krótkich fragmentów restrykcyjnych, odpowiadających za wewnątrzgatunkowe różnicowanie oraz pary starterów, komplementarnych do fragmentu genu *pehX*, odpowiadających za identyfikację gatunku *K. oxytoca*. (3) Układ LM PCR/*Shifter* do wewnątrzgatunkowego różnicowania *A. baumannii*, umożliwia identyfikację rodzaju *Acinetobacter* na podstawie obecności charakterystycznej długości produktu PCR. Układ wykorzystuje enzym *Alw26I*, adaptor o sekwencji NGCN na lepkiem końcu 5' oraz dwa startery o sekwencji AGCT oraz NGCA na końcu 3'. W wyniku typowania otrzymuje się ograniczoną liczbę produktów PCR, z których jeden o długości ok 470 pz występuje u wszystkich badanych szczepów *Acinetobacter* spp i wskazuje przynależność rodzajową.

Zaprojektowane układy diagnostyczne przetestowałam na 200 szczepach klinicznych i 9 wzorcowych *K. oxytoca*, 23 szczepach referencyjnych *Acinetobacter* sp., ponad 30 szczepach klinicznych i środowiskowych wchodzących w skład kompleksu *Acinetobacter calcoaceticus – baumannii* oraz ponad 30 szczepach innych gatunków. Wyniki porównywałam z wynikami typowania uzyskanymi metodą PCR MP oraz z metodami standardowo stosowanymi do identyfikacji wymienionych drobnoustrojów.

W ostatniej części rozprawy sprawdzałam możliwości zastosowania metod LM PCR w badaniach epidemiologicznych i diagnostyce medycznej, a także w badaniu różnorodności genetycznej drobnoustrojów. Zbadałam rozkład genotypów *K. oxytoca* pojawiających się w ciągu ostatnich 50 lat (typowanie dalekiego zasięgu) oraz sytuację epidemiczną na Oddziale Noworodków Szpitala Miejskiego w Warszawie (typowanie bliskiego zasięgu). Ukazałam możliwości wykorzystania metod LM PCR w identyfikacji zakażeń nawrotowych i przewlekłych oraz poszukiwaniu źródła i dróg rozprzestrzeniania się zakażeń szpitalnych.

## Abstract

The introduction of the molecular techniques in microbiological diagnostics significantly accelerated the process of identification and differentiation of microbe species. In the recent years, much attention has been paid to prevention of nosocomial infections which, in consequence, led to the development of new molecular techniques that would facilitate epidemiological and taxonomical research.

The purpose of this PhD research was to develop a diagnostic method, based on Ligation Mediated PCR (LM PCR), that would allow for simultaneous identification of the species of microorganisms and their differentiation, its verification of the method in relations to existing procedures and evaluation of its suitability in epidemiological research.

In the first part of the thesis I introduce the new method named ddLMS PCR (double digestion Ligated Mediate Suppression PCR), which uses polymorphism of the sequence preceding the marker sequence (a known DNA sequence particular to the species) for molecular typing of the microbes. This method combines the specificity of a simple PCR and the ability to differentiate strains characteristic for LM PCR techniques. In this method, the genome DNA is digested by two restriction enzymes, but only one adapter type is ligated to the restriction fragments. The PCR carried out using two primers, one of which is complementary to the adapter, and the second to the 5' end of the marker sequence. Only those restriction fragments are amplified which contain the marker sequence. The remaining fragments are not amplified due to the lack of binding sites for the primer.

Further, I describe the stages of development of the ddLMS PCR method, the critical elements and the molecular mechanism that influences the selection of the fragments amplified in the PCR reaction. The idea was verified using lambda phage DNA. I have designed two model configurations: (1) 5' ddLMS PCR using restriction enzymes leaving 5' single-strand ends and (2) 3' ddLMS PCR using restriction enzymes leaving 3' single-strand ends. The model configurations were designed in order to confirm the assumed molecular mechanism of the ddLMS PCR method, define the specificity of the amplification of the fragments containing marker sequence and find the sensitivity of the method to contamination. I have proven that a positive result of an analysis, in the form of a PCR product, is possible only when the analyzed DNA contains the marker sequence characteristic for the microorganism for which the method was designed. Contamination with genetic material from different organisms had no effect on the result of the analysis.

Since ddLMS PCR method is not universal, I have detailed design rules for the diagnostic kits, depending on the desired goal, environment and critical parameters that influence the specificity and the level of discrimination of the method. I have designed three diagnostic kits: (1) *recA*-ddLMS PCR for interspecific typing of the *Acinetobacter* sp., (2) *rrn*-ddLMS PCR for intraspecific typing of *Acinetobacter baumannii*, and (3) *pehX*- ddLMS PCR for intraspecific typing of *Klebsiella oxytoca*.

In the second part, I present the possibility of utilizing known LM PCR methods to design diagnostic

kits that allow simultaneous differentiation and identification of species or types of selected organisms based on the presence of characteristic bands in the electrophoretic profile of PCR products. Three different diagnostic kits were designed. (1) LM PCR *simple/XhoI*, for the intraspecies differentiation of *A. baumannii*, involves digestion of genomic DNA with a rare cutting restriction enzyme, followed by ligation with one type of adapter and amplification with one type of primer. Only DNA fragments shorter than 3000 bp are amplified. This is the simplest variant of the LM PCR method, aptly named LM PCR *simple*. As a result of typing a limited number of PCR products is obtained, one of which is present in all strains of this species and indicates membership in the species. Other PCR products are characteristic of the strain and allow intraspecific differentiation. (2) *pehX*-LM PCR *simple/XbaI* for typing *K. oxytoca* is based on LM PCR *simple* method, supplemented by an additional amplification of specific *pehX* gene. The PCR reaction is carried out with the primer complementary to the adapter, allowing the amplification of short restriction fragments, which are responsible for intraspecific differentiation and a pair of primers complementary to the gene *pehX*, responsible for the identification of *K. oxytoca* species. (3) LM PCR/*Shft*er for intraspecies differentiation for *A. baumannii* and simultaneous identification of the *Acinetobacter* type, based on the presence of a PCR product of characteristic length. The system uses *Alw26I* enzyme, an adapter with NGCN sequence at the sticky end and two primers with AGCT and NGCA sequence at the 3' end. As a result of typing a limited number of PCR products is obtained, one with a length of approximately 470 bp is present in all tested strains of *Acinetobacter* spp and indicates the species membership.

I tested the designed diagnostic kits on 200 clinical and 9 reference strains of *K. oxytoca*, 23 reference strains of *Acinetobacter* sp, more than 30 clinical and environmental strains included in the *Acinetobacter calcoaceticus – baumannii* complex, and more than 30 strains of other species. The results were compared with the results of typing obtained with PCR MP method and the methods typically used to identify these microorganisms.

In last part, I determine the applicability of the LM PCR methods in epidemiology and medical diagnostics, as well as in the study of genetic diversity of microorganisms. I have examined the distribution of *K. oxytoca* genotypes emerging in the last 50 years (long-term typing) and the epidemic situation in the neonatal unit of Municipal Hospital in Warsaw (short-term typing). I have shown the possibility of using LM PCR methods in the identification of recurrent and chronic

### 3. Spis stosowanych skrótów

A	adenina
ACB	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> – <i>baumannii</i> complex
ADSRRS	<b>A</b> mplification of <b>D</b> N <b>A</b> <b>S</b> urrounding <b>R</b> are <b>R</b> estriction <b>S</b> ites
AFLP	<b>A</b> mplified <b>F</b> ragment <b>L</b> ength <b>P</b> olymorphism
ang.	z angielskiego
AP - PCR	<b>A</b> rbitrary <b>P</b> rimed <b>P</b> CR
ARDRA	<b>A</b> mplified <b>r</b> D <b>N</b> A <b>R</b> estriction <b>A</b> nalysis
ATCC	<b>A</b> merican <b>T</b> ype <b>C</b> ulture <b>C</b> ollection
BLAST	<b>B</b> asic <b>L</b> ocal <b>A</b> lignment <b>S</b> earch <b>T</b> ool
C	cytozyna
CA	<b>C</b> luster <b>A</b> nalysis
CHEF	<b>C</b> ontour <b>C</b> lamped <b>H</b> omogenous <b>E</b> lectric <b>F</b> ield <b>E</b> lectrophoresis
DAF	<b>D</b> N <b>A</b> <b>A</b> mplification <b>F</b> ingerprinting
DGGE	<b>D</b> enaturing <b>G</b> radient <b>G</b> el <b>E</b> lectrophoresis
ddLMS PCR	<b>d</b> ouble <b>d</b> igest <b>L</b> igation <b>M</b> ediated <b>P</b> CR
DSMZ	<b>D</b> eutsche <b>S</b> ammlung von <b>M</b> ikroorganismen und <b>Z</b> ellkulturen
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
dsDNA	dwuniciowe DNA
rDNA	rybosomalne DNA
ssDNA	jednoniciowe DNA
FIGE	<b>F</b> ield <b>I</b> nversed <b>G</b> el <b>E</b> lectrophoresis
G	guanina
IRS PCR	<b>I</b> nfrequent <b>R</b> estriction <b>S</b> ite <b>P</b> CR
ITS - PCR	<b>P</b> CR amplification of <b>I</b> ntergenic <b>t</b> R <b>N</b> A <b>S</b> pacer regions
LM PCR	<b>L</b> igation <b>M</b> ediated <b>P</b> CR
LM PCR/ <i>Shifter</i>	<b>L</b> igation <b>M</b> ediated <b>P</b> CR <i>Shifter</i>
LMS PCR	<b>L</b> igation <b>M</b> ediated <b>S</b> uppression <b>P</b> CR
MLVA	<b>M</b> ultiple <b>L</b> ocus <b>V</b> ariable <b>N</b> umber <b>T</b> andem <b>R</b> epeats <b>A</b> nalysis
MLVF	<b>M</b> ultiple <b>L</b> ocus <b>V</b> ariable <b>N</b> umber <b>T</b> andem <b>R</b> epeats <b>F</b> ingerprinting
NCBI	<b>N</b> ational <b>C</b> enter for <b>B</b> io <b>T</b> echnology <b>I</b> nformation
nt	nukleotydy/nukleotydy
PCR	<b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction – <i>pol.</i> łańcuchowa reakcja polimerazy
PCR MP	<b>P</b> CR <b>M</b> elting <b>P</b> rofiles
PFGE	<b>P</b> ulse <b>F</b> ield <b>G</b> el <b>E</b> lectrophoresis
PPA	<b>P</b> lasmid <b>P</b> rofile <b>A</b> nalysis
pz	par zasad
RNA	kwas rybonukleinowy
rRNA	rybosomalne RNA
RAPD	<b>R</b> andom <b>A</b> mplified <b>P</b> olymorphic <b>D</b> N <b>A</b>
REA	<b>R</b> estriction <b>E</b> nzyme <b>A</b> nalysis
REAP	<b>R</b> estriction <b>E</b> nzyme <b>A</b> nalysis of <b>P</b> lasmid
RFLP	<b>R</b> estriction <b>F</b> ragment <b>L</b> enght <b>P</b> olymorphism
SDS-PAGE	<b>S</b> odium <b>D</b> odecyl <b>S</b> ulfate <b>P</b> olyacrylamide <b>G</b> el <b>E</b> lectrophoresis
SSCP	<b>S</b> ingle <b>S</b> trand <b>C</b> onformation <b>P</b> olymorphism
SSH	<b>S</b> uppression <b>S</b> ubtractive <b>H</b> ybridisation
SST	<b>S</b> ingle- <b>L</b> ocus <b>S</b> equencing <b>T</b> yping
STRs	<b>S</b> hort <b>T</b> andem <b>R</b> epeats
T	tymina
TEMED	<b>N,N,N',N'</b> – tetraetylenodiamina
TGGE	<b>T</b> emperature <b>G</b> radient <b>G</b> el <b>E</b> lectrophoresis
UPGMA	<b>U</b> nweighted <b>P</b> air <b>G</b> roup <b>M</b> ethod using <b>A</b> rithmetic averages
WPGMA	<b>W</b> eighted <b>P</b> air <b>G</b> roup <b>M</b> ethod with <b>A</b> veraging
VNTR	<b>V</b> ariable <b>N</b> umber of <b>T</b> andem <b>R</b> epeats

## 4. Wstęp

Identyfikacja i różnicowanie mikroorganizmów mają ogromne znaczenie w mikrobiologii medycznej oraz dochodzeniach epidemiologicznych. Służą do wykrywania i kontroli zakażeń szpitalnych i pozaszpitalnych w budynkach użyteczności publicznej (przedszkolach, szkołach, zakładach pracy), umożliwiają monitoring różnorodności klonalnej drobnoustrojów wśród pacjentów i w ich środowisku, a także pozwalają określić heterogenność populacji w dwóch wymiarach – w czasie i na określonej przestrzeni. Wyniki badań mogą być podstawą do wprowadzenia środków zapobiegawczych i działań sanitarnych, mających ograniczyć lub zahamować rozprzestrzenianie się mikroorganizmów patogennych i związanej z nimi lekooporności.

### 4.1. Dochodzenia epidemiologiczne

Epidemiologia to nauka badająca wpływ czynników środowiskowych na występowanie chorób w populacji lub wpływających na stan zdrowia ludności. Celem jej jest ocena częstości występowania stanów zdrowotnych, poszukiwanie czynników etiologicznych ryzyka, opracowanie zasad profilaktyki i wprowadzenie ich w życie, a także monitorowanie populacji ludzi i zwierząt. Epidemiologia może dotyczyć analizy parametrów w ujęciu globalnym (np. wirus HIV/AIDS) lub ograniczać się do lokalnych zdarzeń, np. kontroli zakażeń szpitalnych spowodowanych patogenami szpitalnymi. W przypadku sytuacji lokalnych możemy mieć do czynienia ze szczepami endemicznymi (endemia) lub epidemicznymi (epidemia). Endemia to pojęcie określające stałe występowanie zachorowań na określoną chorobę na danym obszarze, w liczbie utrzymującej się przez wiele lat na podobnym poziomie. Epidemia to występowanie zachorowań w znacznie większej liczbie w określonym okresie czasu i na określonym terenie. Analizy epidemiczne prowadzone w ujęciu globalnym umożliwiają niejednokrotnie wykrycie pandemii, czyli epidemii obejmującej rozległe obszary, np. kontynent.

Mikroorganizmy wywołujące daną epidemię lub pandemię są ze sobą spokrewnione. Najczęściej należą do jednego gatunku, mają te same czynniki wirulencji, te same szlaki biochemiczne, są również bardzo blisko spokrewnione pod względem genetycznym. Mimo, że są izolowane z różnych miejsc i w różnym czasie, posiadają wiele identycznych cech fenotypowych i genotypowych, świadczących o wspólnym pochodzeniu. W obrębie szczepów jednego gatunku mogą występować różnice genetyczne wynikające z postępującej zmienności na skutek procesów rekombinacji i mutacji. W przypadku drobnoustrojów zmiany w DNA są dziedziczone klonalnie, tzn. zmiany te są trwałe i są przekazywane komórkom potomnym. W pierwszych pokoleniach komórki potomne są praktycznie nierozróżnialne genetycznie od komórek macierzystych. Wzrost zróżnicowania komórek zachodzi na skutek kumulacji zmian zachodzących w genomie. Komórki bardziej odległe czasowo (dalsze pokolenia) charakteryzują się niższym stopniem podobieństwa. Celem typowania epidemiologicznego jest ustalanie genetycznego podobieństwa

szczepów izolowanych z różnych źródeł (od pacjentów, ze środowiska nieożywionego). Znalezienie klonalnie spokrewnionych izolatów w różnych próbkach jest dowodem na to, że szczepy te są elementami łańcucha transmisji zakażenia. Określenie stopnia podobieństwa genetycznego pomiędzy nimi jest wykorzystywane do badania źródła infekcji, rezerwarów i dróg rozprzestrzeniania się zakażenia.

## 4.2. Metody typowania

Kluczowym elementem w badaniach epidemiologicznych jest odpowiedni dobór metod diagnostycznych, pozwalających na jednoznaczną identyfikację czynnika chorobotwórczego, poznanie dróg rozprzestrzeniania się infekcji oraz potencjalnych rezerwarów mikroorganizmów patogennych, metod umożliwiających różnicowanie (lub inaczej typowanie) drobnoustrojów w obrębie danego gatunku. Metody te powinny spełniać odpowiednie warunki. Powinny być oparte na wykrywaniu określonych markerów, czyli cech, które będą łatwo i w sposób powtarzalny wykrywane oraz będą zapewniały stabilność klonalną badanej grupy drobnoustrojów. Markerem w typowaniu epidemiologicznym może być konkretny fragment DNA (sekwencja, długość) bądź obecność miejsca restrykcyjnego dla wybranego enzymu w danym obszarze DNA. Marker powinien być tak dobrany, aby zapewniał typowalność, tzn. dawał możliwość przypisania badanych izolatów do określonej grupy drobnoustrojów (przypisanie genotypu). Powinien także charakteryzować się odpowiednio dużą siłą dyskryminacji, tzn. dobrze rozróżniać niespokrewnione izolaty, a jednocześnie wykazywać podobieństwo pomiędzy organizmami izolowanymi z tego samego źródła (wykazywać zgodność epidemiczną). W czasie trwania epidemii, w kolejnych klonach mogą gromadzić się zmiany genetyczne (mutacje, utrata/zysk plazmidowego DNA). Stąd wybrany system typowania nie powinien jedynie opierać się na obecności/braku markera genetycznego (pojedyncza cecha), lecz także dawać możliwość oceny podobieństwa izolatów w badanej grupie.

Ważnym kryterium w wyborze metody typowania jest jej powtarzalność, czyli możliwość uzyskania tych samych wyników dla tych samych organizmów, przy każdym badaniu oraz przy użyciu tej samej procedury, odczynników i aparatury. W przypadku badań epidemiologicznych należy także wziąć pod uwagę czynnik ekonomiczny. Metoda powinna być łatwa i szybka w wykonaniu, nie wymagająca drogich odczynników ani specjalistycznego i drogiego szkolenia personelu medycznego (mogła być stosowana przez personel rutynowych laboratoriów mikrobiologicznych i diagnostycznych). Niezmiernie ważne jest również to, żeby dawała możliwość przebadania jednocześnie wielu prób.

Typowanie jest to analiza organizmów poniżej poziomu gatunku, na podstawie fenotypowych lub/i genetycznych cech. Może być ono zastosowane jako badanie wspomagające w szpitalnych dochodzeniach epidemiologicznych, w badaniach nad patogenezą i przebiegiem infekcji oraz w badaniach filogenetycznych. Typowanie można również wykorzystać w bioprzemysle do kontroli stabilności genetycznej szczepów przemysłowych, w ochronie przeciw-bioterrorystycznej do identyfikacji czynników wirulentnych drobnoustrojów oraz w medycynie sądowej. Obecnie typowanie wykorzystuje się nie tylko do analizy



organizmów haploidalnych, ale również w badaniach organizmów diploidalnych tj.: drożdży, grzybów i pasożytów.

Jak dotąd nie zaprojektowano uniwersalnej i idealnej metody do typowania wszystkich drobnoustrojów. Każda z obecnie dostępnych metod ma swoje zalety, wady i ograniczenia, zarówno pod względem zakresu zastosowania jak i mocy dyskryminacyjnej. Dlatego na całym świecie opracowuje się nowe i ulepsza już istniejące metody typowania, które mają na celu ułatwić i przyspieszyć badania epidemiologiczne.

Obecnie w diagnostyce mikrobiologicznej oraz w badaniach epidemiologicznych stosuje się klasyczne metody diagnostyczne oparte na analizie cech fenotypowych (techniki fenotypowe) oraz metody oparte na analizie materiału genetycznego, wykorzystujące nowoczesne techniki biologii molekularnej (techniki genotypowe).

#### 4.2.1. Metody fenotypowe

Metody fenotypowe opierają się głównie na obserwacji zewnętrznych efektów ekspresji informacji genetycznej. Wykorzystywane są przede wszystkim do wykrywania i identyfikacji drobnoustrojów [1]. Obejmują badania dotyczące charakterystyki morfologicznej drobnoustroju (morfologia kolonii, barwienie kolonii i przetrwalników), biochemicznej [2-4] oraz serologicznej [5,6]. Określana jest wrażliwość na antybiotyki i chemoterapeutyki [7-9], a także na bakteriofagi [10-14].

Do typowania drobnoustrojów najczęściej wykorzystuje się metody złożone, charakteryzujące się wysokim potencjałem różnicującym, np. analizę ilościową i jakościową białek komórkowych w warunkach denaturujących (SDS-PAGE [15-17]), analizę zmian ruchliwości elektroforetycznej enzymów podstawowego metabolizmu komórkowego (typowanie izoenzymatyczne - *ang.* **Multilocus Enzyme Electrophoresis**; **MLEE** [18,19]) oraz serotypowanie, czyli immunologiczną detekcję antygenów powierzchniowych komórek (np. testy ELISA [20,21])

Metody fenotypowe nie posiadają odpowiedniego potencjału różnicującego, wymaganego w badaniach epidemiologicznych. Większość z nich nie wykorzystuje w analizie wystarczającej liczby parametrów, które dobrze odzwierciedlałyby genotyp, zatem nie są w stanie odróżnić szczepów epidemicznych od endemicznych. Poza tym większość z nich jest pracochłonna i czasochłonna, charakteryzuje się niską czułością, a otrzymywane wyniki mogą być niejednoznaczne ze względu na zjawisko zmienności fenotypowej (zjawisko różnej ekspresji tych samych cech fenotypowych wśród izolatów należących do tego samego gatunku pod wpływem czynników zewnętrznych). Metody te są jednak niezbędne we wstępnej analizie sytuacji epidemiologicznej oraz w badaniach przesiewowych.

## 4.2.2. Metody genotypowe

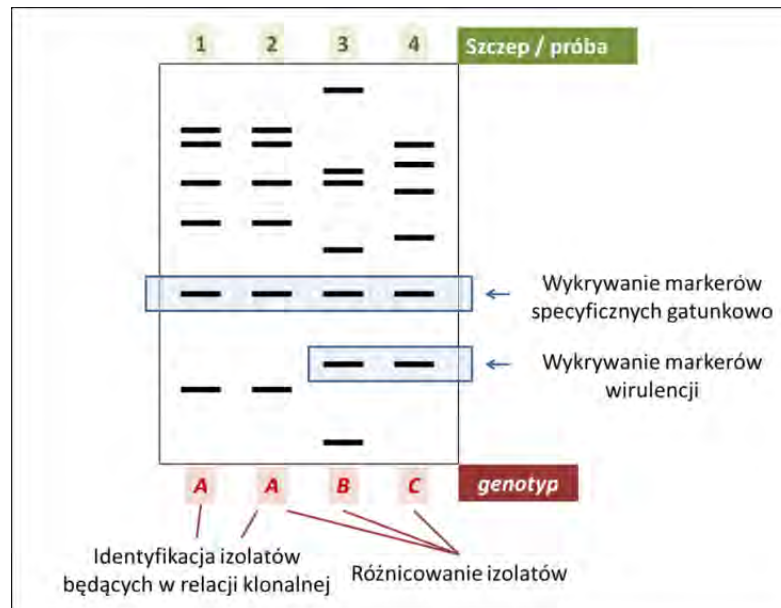
Gwałtowny rozwój technik genotypowych otworzył nowe możliwości dla diagnostyki mikrobiologicznej. Metody molekularne, oparte na analizie kwasów nukleinowych stanowią znakomite uzupełnienie klasycznej diagnostyki mikrobiologicznej. Pozwalają wychwycić zmiany w sekwencji nukleotydowej genomowego lub plazmidowego DNA, powstałe na skutek rekombinacji czy mutacji. W niektórych przypadkach pozwalają nawet zidentyfikować drobnoustrój bezpośrednio, bez potrzeby korzystania z diagnostyki klasycznej. Metody genotypowe oprócz tego, że skracają czas analizy, pozwalają uzyskać wiarygodne i jednoznaczne wyniki, gdyż opierają się na analizie niezależnych od czynników środowiskowych właściwości kwasów nukleinowych (głównie sekwencji DNA). Poszerzają także zakres możliwości diagnostycznych, pozwalając różnicować szczepy należące tego samego gatunku (nierozróżnialne klasycznymi metodami diagnostycznymi) i identyfikować szczepy klonalnie zależne (wywodzące się od tej samej komórki). Niewątpliwą zaletą metod genotypowych jest to, że nadają się również do badania mikroorganizmów wolno rosnących (np. *Mycobacterium tuberculosis*), trudnych w hodowli i niehodowalnych (np. wirus zapalenia wątroby typu C, HCV), o bardzo niskiej żywotności (*Chlamydia trachomatis*) i bardzo niebezpiecznych (np. wirusy krwiotoczne).

Zmienność genetyczna organizmów jest uwarunkowana procesami rekombinacji genetycznej i mutacji zachodzących podczas replikacji. W obrębie genomowego DNA można wyróżnić regiony o mniejszym lub większym stopniu zmienności. Szeroka wiedza na temat mechanizmów molekularnych oraz właściwości fizyko-chemicznych makrocząstek komórkowych pozwala tworzyć nowe, coraz bardziej dokładne metody genotypowania. Metody te wykorzystują podstawowe narzędzia molekularne tj. enzymy restrykcyjne, ligazy, polimerazy DNA oraz podstawowe techniki tj. hybrydyzacja DNA-DNA, amplifikacja DNA *in vitro* przy zastosowaniu łańcuchowej reakcji polimerazy (*ang.* Polymerase Chain Reaction, PCR), sekwencjonowanie oraz techniki elektroforetyczne, które pozwalają bezpośrednio lub pośrednio badać zmiany w sekwencji DNA.

Do typowania genetycznego wykorzystuje się najczęściej techniki typu *fingerprinting*, czyli techniki „genetycznego odcisku palca”, które na podstawie elektroforetycznego profilu fragmentów DNA (profil *fingerprint*), przypominającego kod kreskowy lub linie papilarne (stąd nazwa), przedstawiają wizualnie genetyczne zmiany, stanowiące niejako wizytówkę badanego drobnoustroju. Typowanie genetyczne może wskazać fragmenty specyficzne gatunkowo oraz fragmenty specyficzne dla danego szczepu, będące podstawą do różnicowania. Może wskazać także fragmenty przypisane do fenotypu drobnoustroju (np. świadczące o wirulencji szczepu) (rys. 1).

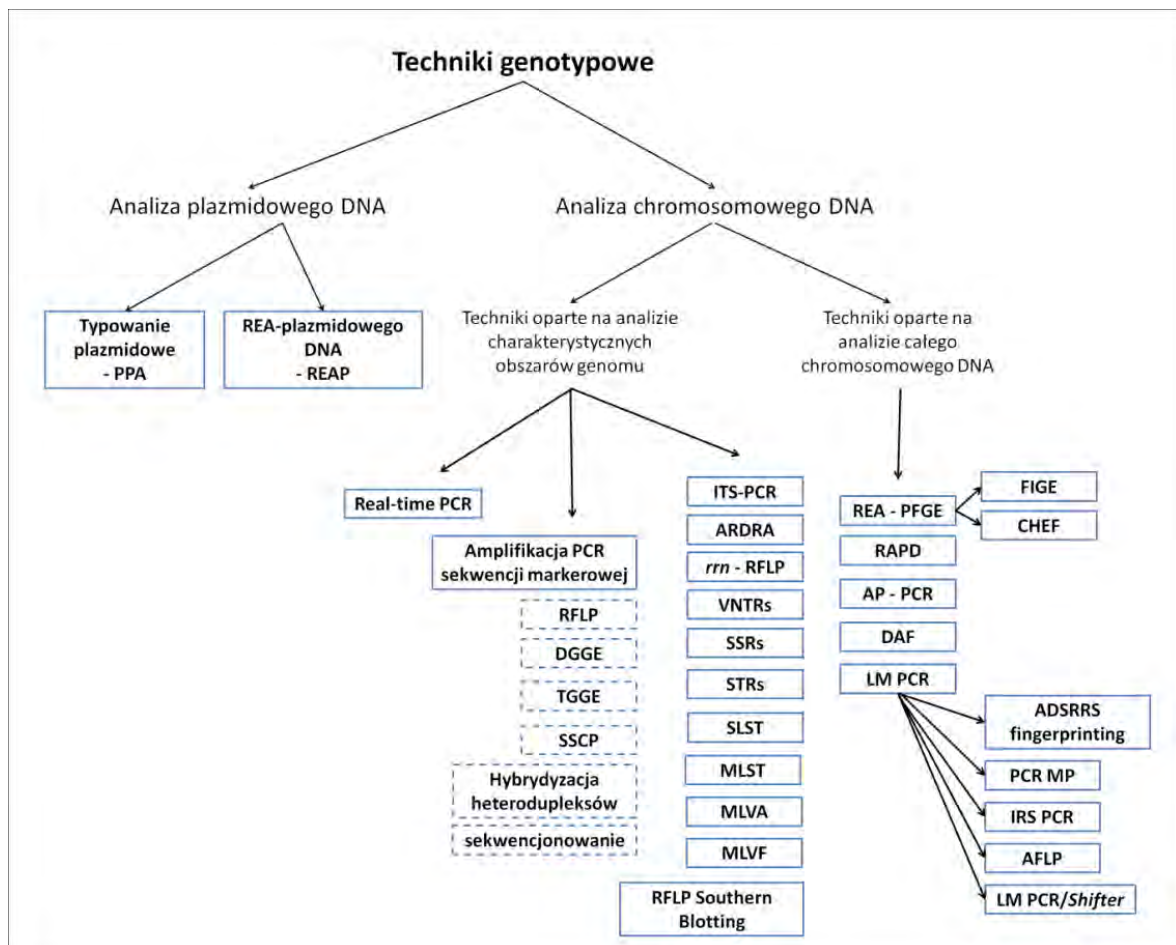
Wiele inicjatyw naukowych doprowadziło do powstania ogólnie dostępnych elektronicznych baz danych zawierających wyniki typowania. Podjęto próby standaryzacji niektórych z technik, (np. PFGE [22]), dzięki czemu wyniki typowania mogą być porównywane międzylaboratoryjnie i stanowić punkt odniesienia dla nowo tworzonych metod. Standaryzacja obejmuje przede wszystkim określenie wytycznych dotyczących

protokołu postępowania, wizualizacji wyników, analizy danych i ich interpretacji.



Rys. 1. Różne aspekty typowania genetycznego.

Techniki typowania genetycznego charakteryzuje duża różnorodność rozwiązań technicznych. Zasadniczo można je podzielić na techniki opierające się na analizie genomowego lub plazmidowego DNA (rys. 2).



Rys. 2. Techniki genotypowe, wykorzystywane w identyfikacji i typowaniu drobnoustrojów; wyjaśnienie skrótów w tekście oraz w spisie skrótów; linią przerywaną zaznaczono techniki uzupełniające.

#### 4.2.2.1. Typowanie oparte na analizie plazmidowego DNA

Pierwszą metodą zastosowaną do typowania bakterii było typowanie plazmidowe (*ang.* **Plasmid Profile Analysis, PPA**). Metoda ta opiera się na założeniu, że komórki będące w relacji klonalnej zawierają zestaw takich samych plazmidów, które izolowane i rozdzielane elektroforetycznie dają charakterystyczny profil plazmidowy [23-26]. Potencjał różnicujący metody można zwiększyć stosując analizę restrykcyjną plazmidowego DNA (*ang.* **Restriction Enzyme Analysis of Plasmid, REAP**)[27].

Typowanie plazmidowe obecnie nie jest wykorzystywane w dochodzeniach epidemiologicznych, ze względu na zachodzący pomiędzy bakteriami horyzontalny transfer informacji genetycznej, w skutek czego klonalnie niezwiązane izolaty lub też różne gatunki bakterii mogą wykazywać podobny profil plazmidowy, co może prowadzić do błędnych wniosków. Ponadto, metoda ta charakteryzuje się niskim potencjałem różnicującym oraz małą uniwersalnością, gdyż nadaje się do typowania szczepów zawierających co najmniej dwa różne plamidy.

Metoda ta znalazła jednak zastosowanie w badaniu rozprzestrzeniania się wśród bakterii lekooporności determinowanej plazmidowo oraz w epidemiologii zakażeń szpitalnych, gdyż pozwala odróżnić szpitalne szczepy endemiczne i epidemiczne w określonym przedziale czasowym. Zastosowano ją m.in. do śledzenia zakażeń, których czynnikiem etiologicznym były szczepy *Staphylococcus aureus* i bakterie z rodziny Enterobacteriaceae [27,28].

#### 4.2.2.2. Typowanie oparte na analizie chromosomowego DNA

W ostatnich 20 latach nastąpił gwałtowny rozwój metod genotypowych opierających się na analizie chromosomowego DNA. Materiał genetyczny zawarty w chromosomowym DNA jest unikalny i stały dla każdego organizmu, niezmienny w porównaniu do cech fenotypowych i zawsze obecny w odróżnieniu od plazmidowego DNA. Wyróżnia się techniki oparte na analizie wybranych regionów polimorficznych lub techniki badające polimorfizm w obrębie całego genomowego DNA.

##### 4.2.2.2.1. Analiza charakterystycznych sekwencji DNA

Badanie zmienności genowej (w obrębie danego *locus*) wymaga wyróżnienia charakterystycznego dla danej grupy drobnoustrojów (poziomu taksonomicznego) fragmentu DNA, który następnie jest analizowany pod względem długości lub/i sekwencji. Do tego celu najczęściej wykorzystuje się technikę PCR (enzymatycznego powielania DNA), trawienie restrykcyjne oraz techniki elektroforetyczne.

Podstawową i najczęściej stosowaną metodą analizy sekwencji amplifikowanego fragmentu DNA jest metoda RFLP (*ang.* **Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP**). Produkty PCR trawi się enzymem restrykcyjnym (PCR/RFLP), a utworzone fragmenty DNA rozdziela elektroforetycznie uzyskując charakterystyczny profil *fingerprint*. Metoda PCR/RFLP, w zależności od polimorfizmu sekwencji

analizowanej, może być wykorzystana do różnicowania międzygatunkowego (np. *recA*-PCR/RFLP – identyfikacja genomogatków *Acinetobacter* sp. [29]) i wewnątrzgatunkowego (*coa*-PCR/RFLP – typowanie *Staphylococcus aureus* [30]).

Do badania zmienności sekwencji nukleotydowych we fragmencie DNA można wykorzystać różne techniki elektroforetyczne m.in. elektroforezę w rosnącym gradiencie czynnika denaturującego (*ang.* **Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE** [31-33]) oraz elektroforezę w rosnącym gradiencie temperatury (*ang.* **Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE** [34-36]). W obu metodach powielone techniką PCR fragmenty DNA nanosi się na żel poliakryloamidowy, w którym uformowany jest rosnący, liniowy gradient czynnika denaturującego/temperatury. Rozdział opiera się na spadku elektroforetycznej mobilności fragmentu DNA w momencie denaturacji. Metody te nadają się do różnicowania fragmentów zawierających kilkunukleotydowy polimorfizm sekwencji. Pojedyncze zmiany punktowe mogą być niewykrywalne, zwłaszcza w przypadku transwersji, ze względu na ich niewielki wpływ na zmianę stabilności fragmentu (podatność na działanie czynników denaturujących tj. temperatura czy środki chemiczne).

Badanie polimorfizmu konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (*ang.* **Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP** [37,38]) jest jedną z najczęściej stosowanych technik elektroforetycznych, umożliwiających wykrywanie punktowych zmian w DNA. Produkty PCR przed elektroforezą denaturuje się termicznie w buforze obciążającym z dodatkiem czynnika denaturującego (formamidu, mocznika lub wodorotlenku sodowego). Rozdział prowadzi się w natywnym żelu poliakryloamidowym, nie zawierającym czynnika denaturującego. Szybkość migracji jednoniciowego DNA zależy od jego wielkości oraz konformacji. Fragmenty o takiej samej długości i sekwencji przyjmują takie same konformacje i wykazują tą samą ruchliwość elektroforetyczną. Fragment z sekwencją zmienioną tworzy inną konformację przestrzenną, a jego zmieniona ruchliwość elektroforetyczna wpływa na zmianę położenia prążka w profilu elektroforetycznym.

Do typowania drobnoustrojów można wykorzystać technikę **Real-Time PCR**, czyli PCR w czasie rzeczywistym. Analiza profilu topnienia amplikonów dostarcza informacji o procentowym składzie zasad (G+C). Różnice w sekwencji (%GC) przekładają się na różnice w temperaturze topnienia, co jest podstawą do różnicowania szczepów [39,40].

Najbardziej precyzyjną metodą analizy sekwencji DNA jest jego sekwencjonowanie [41]. Znaczenie analizy sekwencyjnej jako metody typowania genetycznego wzrasta ze względu na szybki rozwój technik sekwencjonowania, wśród których można wyróżnić: automatyczne sekwencjonowanie z wykorzystaniem ddNTP znakowanych fluorescencyjnie, sekwencjonowanie cykliczne, technologia SMS (*ang.* **Single Molecule Sequencing** [42]) oraz pirosekwencjonowanie, czyli sekwencjonowanie w czasie rzeczywistym. Metoda **SLST** (*ang.* **Single-Locus Sequence Typing**) polegająca na analizie sekwencyjnej specyficznych loci (genów wirulencji, patogenności, oporności na leki itp.) dla różnych szczepów tych samych gatunków może być

użyteczna w wykrywaniu polimorfizmów jednonukleotydowych, bądź polimorfizmów sekwencji repetytywnych. Została zastosowana do różnicowania gronkowców na podstawie analizy genu *spa* kodującego białko A [43]. Sekwencjonowanie genu 16S rDNA jest podstawą obecnej taksonomii. Niezawodną ale i kosztowną metodą jest **MLST** (*ang.* **M**ulti-**L**ocus **S**equencing **T**yping), która polega na sekwencjonowaniu fragmentów siedmiu genów niezbędnych do utrzymania podstawowego metabolizmu komórkowego (*ang.* housekeeping genes) [44-51]. Technika MLST wykrywa zmiany, które wolno gromadzą się w genomie, dlatego nie jest zalecana do krótko-terminowych badań epidemiologicznych oraz dla szczepów blisko spokrewnionych. Z powodzeniem może być zastosowana do badań ewolucji i analizy populacyjnej. Technikę tą zastosowano zarówno do typowania gatunków haploidalnych (np. typowanie *Staphylococcus aureus* [52,53]) jak i diploidalnych (np. *Candida albicans* [54]).

U wielu mikroorganizmów stwierdzono istnienie repetytywnych (powtórzonych) sekwencji DNA. Powtórzenia występujące w genomie mogą być zgromadzone w jednym miejscu lub mogą być rozproszone w całym genomie. Sekwencje repetytywne są rejonami wysoce polimorficznymi. Podczas replikacji, wskutek poślizgu polimerazy DNA, w obrębie sekwencji repetytywnych dość często pojawiają się błędy, czego rezultatem jest skrócenie lub wydłużenie regionu repetytywnego (delecja lub insercja jednostki repetytywnej). Sekwencje repetytywne występują w zmiennej liczbie kopii i mogą charakteryzować się różną długością. Do typowania bakterii najczęściej wykorzystuje się analizę regionu zawierającego krótkie tandemowe powtórzenia **VNTR** (*ang.* **V**ariable **N**umber of **T**andem **R**epeats) [55,56]. Liczba powtarzających się podjednostek w danym regionie jest indywidualną cechą mikroorganizmu. W metodzie VNTR amplifikacji poddaje się regiony minisatelitarne, składające się od kilku do kilkunastu powtórzeń o długości od 10 do 60 pz każdy oraz odcinki mikrosatelitarnego DNA, składające się z krótkich (od 2 do 6 pz) nukleotydowych podjednostek, występujących w kilkunastu/kilkudziesięciu tandemowo ułożonych powtórzeniach (*ang.* **S**hort **T**andem **R**epeats, **STRs**). VNTR wykorzystywane jest z powodzeniem w różnicowaniu mikroorganizmów bakteryjnych oraz różnych gatunków drożdżaków m.in. *C. albicans* [57] i *C. glabrata* [58].

Testy oparte na VNTR opierają się na bezpośredniej amplifikacji PCR jednego, określonego *locus*. Metoda **MLVA** (*ang.* **M**ultiple **L**ocus **V**ariable Number Tandem Repeats **A**nalysis) bazuje na jednoczesnej amplifikacji wielu loci o różnicowanej liczbie tandemowych powtórzeń. Elektroforetyczny obraz produktów PCR można traktować jako genetyczny *fingerprinting*, stąd też metoda ta znana jest pod nazwą **MLVF** (*ang.* **M**ultiple **L**ocus **V**ariable Number Tandem Repeats **F**ingerprinting). Typowanie MLVA było wykorzystane do typowania m.in. *Staphylococcus aureus* w oparciu o tandemowe powtórzenia w obrębie genów *clfB*, *spa*, *sspA* [59,60] oraz *Streptococcus pyogenes* [61] i *Streptococcus agalactiae* [62].

Znaną i użyteczną metodą typowania bakterii jest rybotypowanie połączone z techniką PCR (rDNA/PCR). Rybotypowanie polega na badaniu polimorfizmu sekwencji operonu *rrn* zawierającego geny kodujące rybosomalne RNA (rRNA). Operon *rrn* znajduje się w każdej komórce bakteryjnej w zmiennej, zależnej od gatunku liczbie kopii. Zawiera geny kodujące podjednostki 16S, 23S i 5S rRNA, poprzedzielane

sekwencjami polimorficznymi zarówno pod względem sekwencji jak i długości. W metodzie **ITS PCR** (*ang.* **PCR** amplification of Intergenic **tRNA** Spacer regions) amplifikacji poddaje się polimorficzny region znajdujący się pomiędzy genami 16S rDNA i 23S rDNA, zawierający oprócz sekwencji zmiennych także sekwencję kodującą tRNA [63]. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR odzwierciedla różnice w długości tego rejonu w różnych kopiach operonu *rrn*. Natomiast w metodzie **ARDRA** (*ang.* **A**mplified **R**ibosomal **D**N **A** **R**estriction **A**nalysis), region zawierający geny kodujące podjednostki 16S rRNA i 23S rRNA oraz sekwencję polimorficzną znajdującą się pomiędzy nimi amplifikuje się w reakcji PCR, a następnie trawi enzymatycznie wybranym enzymem restrykcyjnym [64]. Technika ta z wykorzystaniem enzymu *AluI* została z powodzeniem zastosowana do różnicowania szczepów z rodzaju *Streptococcus* [65].

#### 4.2.2.2.2. Analiza całego genomowego DNA

Wysoka specyficzność metody zazwyczaj jest odwrotnie proporcjonalna do jej możliwości różnicujących (poziomu dyskryminacji). Badanie zmienności genetycznej tylko w obrębie specyficznej sekwencji markerowej jest znacznie ograniczone długością obszaru badanego. Prawdopodobieństwo wystąpienia zmian w sekwencji DNA w tym obszarze jest tym niższe, im bardziej zakonserwowana i specyficzna jest sekwencja markerowa. Zatem pozornie identyczne mikroorganizmy mogą w rzeczywistości znacznie różnić się genetycznie poza obszarem sekwencji markerowej. Wiele obecnie stosowanych technik typowania molekularnego opiera się na analizie całego genomowego DNA. Są to techniki bardziej uniwersalne i zarazem wykazujące wysoką moc dyskryminacji. Co więcej, nie wymagają doboru odpowiedniego markera genetycznego oraz nie wymagają znajomości sekwencji analizowanego DNA.

W chwili obecnej za „złoty standard” w typowaniu mikroorganizmów uważa się analizę restrykcyjną chromosomowego DNA połączoną z elektroforezą pulsową – **REA-PFGE** (*ang.* **R**estriction **E**nzyme **A**nalysis **P**ulse **F**ield **G**el **E**lectrophoresis) [22,66]. Elektroforeza pulsowa polega na wymuszonej zmianie kierunku migracji cząstek DNA pod wpływem zmieniającego się kierunku działania pola elektrycznego. W metodzie tej, w wyniku trawienia całego genomowego DNA jednym, rzadko tnącym enzymem restrykcyjnym, generuje się od 10 do 30 fragmentów DNA o wielkości od ok. 0,5 kbp do 1000 kbp. Fragmenty rozdziela się w zmiennym polu elektrycznym, uzyskując profil prążków charakterystyczny dla badanego drobnoustroju. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych odzwierciedla polimorfizm sekwencji genomowego DNA.

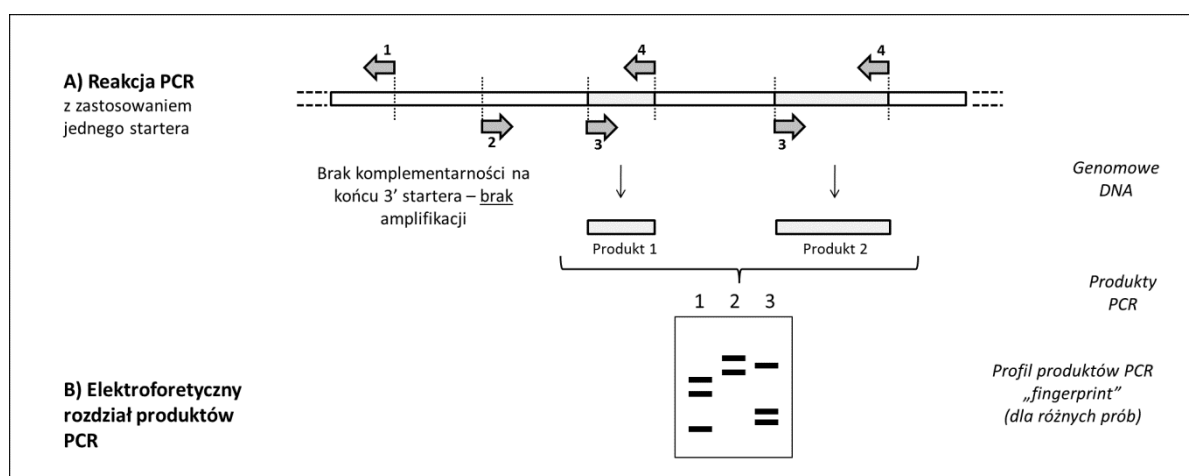
Powstało wiele odmian techniki PFGE, różniących się głównie sposobem rozmieszczenia elektrod, które nadają kształt pola elektrycznego. Największe zastosowanie w typowaniu genetycznym znalazły metody: **FIGE** (*ang.* **F**ield **I**nversed **G**el **E**lectrophoresis), czyli elektroforeza w odwracalnym polu elektrycznym [67] oraz **CHEF** (*ang.* **C**ontour **C**lamped **H**omogenous **E**lectric **F**ield **E**lectrophoresis) czyli elektroforeza w zmiennym, homogenym polu o kształcie sześciokąta foremnego [68].

Technika REA-PFGE charakteryzuje się wysokim potencjałem różnicującym, jest uniwersalna

i nadaje się do typowania wszystkich bakterii. Została wykorzystana do badań epidemiologicznych wielu mikroorganizmów m.in. *Esherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, a także *Candida* [69-73]. Dla wielu z nich metoda została wystandaryzowana, np. *S. aureus* [74] czy *E. coli* 0157:H7. W Stanach Zjednoczonych, Centers for Disease Control and Prevention poleca REA-PFGE jako metodę referencyjną do nadzoru nad patogenami powodującymi zatrucia pokarmowe. Ujednolicone i wystandaryzowane kryteria interpretacji wyników zaproponowane przez Tenover'a [75] pozwalają porównywać wyniki międzylaboratoryjnie. Metoda ta uznawana jest za metodę referencyjną, stanowiącą wzorzec odniesienia dla innych, nowych metod genotypowania.

Mimo wielu zalet, metoda REA - PFGE jest trudna technicznie, kosztowna, czaso- i pracochłonna oraz wymaga posiadania drogiego specjalistycznego sprzętu do wykonania badań oraz zachowania stałych warunków analizy. Wymaga przedłużonej inkubacji (hodowli) szczepów do typowania, dlatego istnieje potencjalne ryzyko kontaminacji laboratorium materiałem zakaźnym. Częste zachodzenie i pokrywanie się fragmentów DNA o podobnej wielkości tworzy trudny do zinterpretowania obraz elektroforetyczny. Wzory mogą być również zaburzone fragmentami plazmidowego DNA, izolującego się łącznie z chromosomem. Obecnie wykorzystywana jest głównie przez ośrodki naukowe i referencyjne jako metoda odnośnikowa.

Najprostszą i najpopularniejszą techniką do typowania genetycznego jest technika **RAPD** (*ang.* **R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA) [76] oraz podobne: AP-PCR (*ang.* **A**rbitrary **P**rimed **P**CR) i DAF (*ang.* **D**NA **A**mplification **F**ingerprinting). Wymienione metody opierają się na przypadkowej amplifikacji w prostej reakcji PCR i różnią się między sobą długością stosowanych starterów, która dla RAPD wynosi 9-10 nt, dla AP-PCR 18-32 nt, a dla DAF 5-15 nt [77-81]. Reakcję PCR prowadzi się z zastosowaniem jednego bądź kilku starterów, które hybrydują do matrycy losowo, z określoną wydajnością, z mniej lub bardziej homologicznymi sekwencjami. Obniżoną specyficznosc przyłączania starterów do matrycy DNA uzyskuje się poprzez obniżenie temperatury przyłączania w cyklach reakcji PCR. Amplifikację fragmentu DNA warunkuje odpowiednia orientacja i odległość starterów na obu niciach (nie przekraczająca 1500 – 2000 pz) (rys.3).



Rys. 3. Schemat przedstawiający technikę RAPD, AP-PDR i DAF; amplifikacji ulega fragment ograniczony starterami przyłączonymi w miejscu 3 i 4. Pomiędzy starterami przyłączonymi w miejscu 2 i 4 jest zbyt duża odległość, by amplifikacja fragmentu przebiegała wydajnie, natomiast startery w miejscach 1 i 2 są przyłączone w niewłaściwej orientacji.



W wyniku amplifikacji uzyskuje się od kilku do kilkudziesięciu amplikonów w zakresie około 100 – 2000 pz. Uzyskany profil elektroforetyczny produktów PCR odzwierciedla różnice w sekwencji nukleotydowej miejsc wiążących starter, różnice w długości amplifikowanych fragmentów i w konformacji DNA wpływającej na wydajne wiązanie starterów i amplifikację. Im mniejsze pokrewieństwo między badanymi szczepami tym większe różnice w liczbie i długości amplikonów.

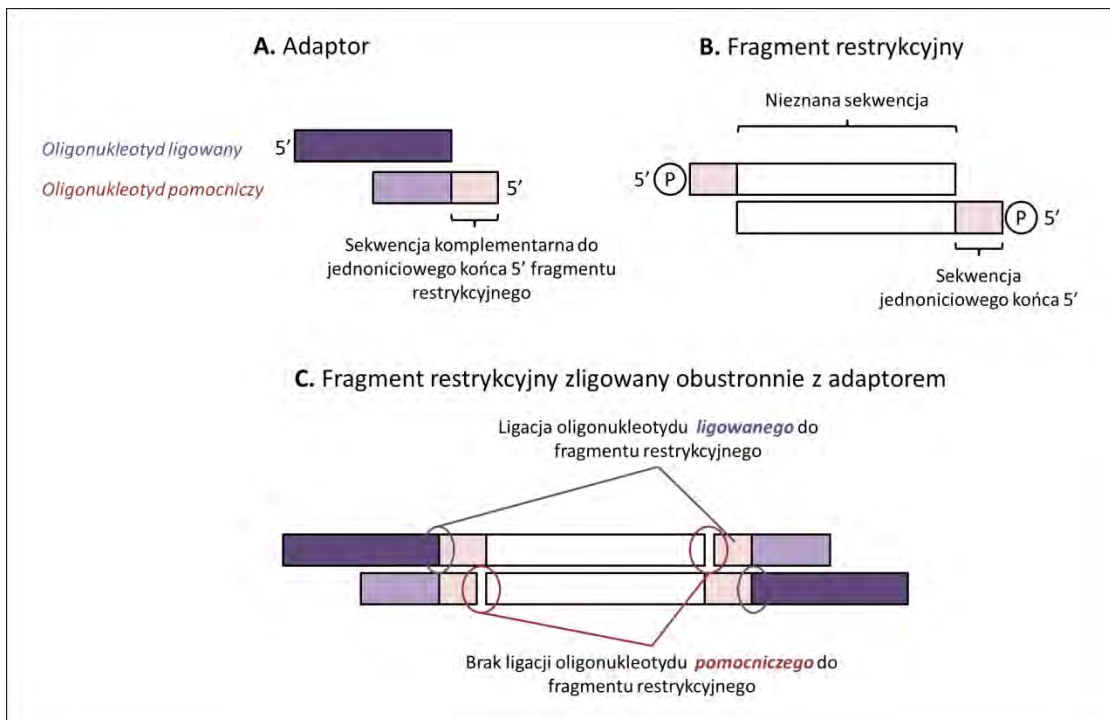
Dzięki prostocie i szybkości wykonania, technika RAPD znalazła szerokie zastosowanie w badaniach epidemiologicznych zarówno dla mikroorganizmów bakteryjnych jak i eukariotycznych. Zastosowano ją w badaniach m.in. *Enterococcus faecium* [81], *Enterococcus faecalis* [82], *Salmonella enterica* [83], *Klebsiella pneumoniae* [84], *Serratia marcescens* [85], *Helicobacter pylori* [86] oraz *Candida* spp. [87-93].

Ze względu na wysoką wrażliwość na niewielkie zmiany warunków prowadzenia reakcji PCR tj. skład buforu do reakcji PCR, czystość i stężenie matrycy DNA oraz parametry reakcji PCR, a także niespecyficzną przyłączanie starterów, głównym problemem techniki RAPD jest mała powtarzalność wyników. Brak jasnych kryteriów interpretacji wyników nie pozwala porównywać uzyskanych wyników międzylaboratoryjnie. Dla niektórych gatunków m.in. dla *S. aureus* i *C. difficile* wykonano optymalizację i walidację metody. Obecnie metodę RAPD stosuje się we wstępnej ocenie sytuacji epidemicznej lub jako metodę pomocniczą, potwierdzającą wyniki uzyskane innymi metodami genotypowymi.

Coraz szersze zastosowanie w badaniach epidemiologicznych znajdują metody oparte na selektywnej amplifikacji fragmentów restrykcyjnych z dołączonymi do nich adaptorami oligonukleotydowymi – **LM PCR** (*ang.* **Ligation Mediated PCR**). Wśród nich wyróżnia się:

- **AFLP** (*ang.* **Amplified Fragment Length Polymorphism** [94]);
- **IRS PCR** (*ang.* **Infrequent Restriction Site PCR**) [95];
- **ADSRRS** (*ang.* **Amplification of DNA Surrounding Rare Restriction Sites** [96]),
- **PCR MP** (*ang.* **PCR Melting Profiles** [87]).
- **LM PCR/Shifter** (*ang.* **Ligation Mediated Shifter PCR** [98])

Metody LM PCR opierają się na selektywnej amplifikacji fragmentów DNA, które uzyskuje się na drodze trawienia całego genomowego DNA jedną lub dwoma endonukleazami restrykcyjnymi, pozostawiającymi jednoniciowe końce 5' lub 3' oraz obustronnej ligacji z odpowiednio zaprojektowanymi adaptorami. Adaptor jest to odcinek DNA, składający się z dwóch wzajemnie komplementarnych, oligonukleotydowych nici o różnej długości, spełniających określone funkcje (rys. 4). Oligonukleotyd pomocniczy zawiera na jednoniciowym (lepkim) końcu 5' sekwencję komplementarną do sekwencji lepkiego końca 5' fragmentu restrykcyjnego, zatem umożliwia hybrydyzację adaptora do fragmentu DNA. Oligonukleotyd ligowany tworzy w reakcji ligacji z końcem 5' fragmentu restrykcyjnego właściwe wiązanie fosfodiesterowe, stając się tym samym częścią matrycy DNA i jednocześnie tworząc miejsce hybrydyzacji dla startera w reakcji PCR.

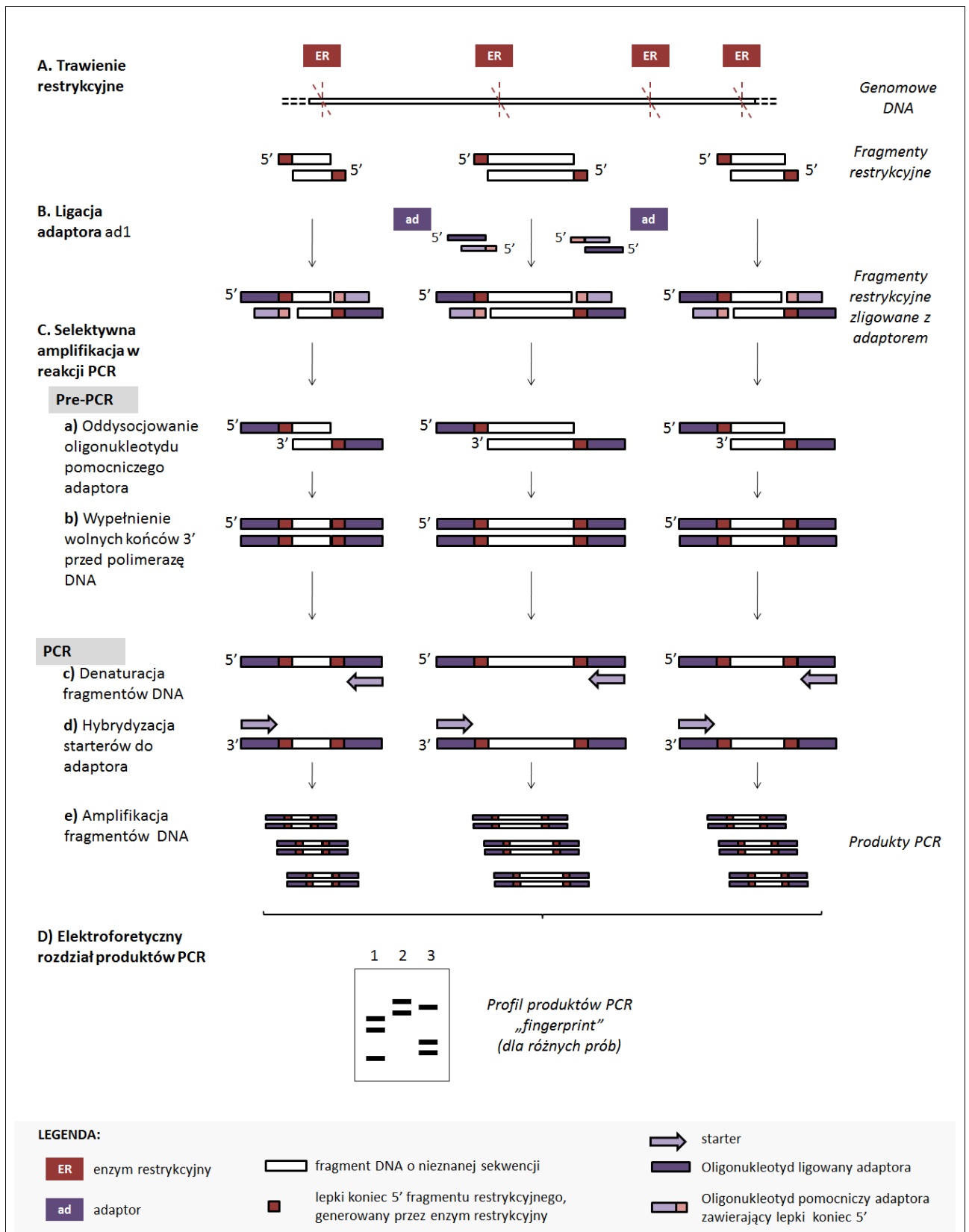


Rys. 4. Schemat ligacji adaptora do fragmentu restrykcyjnego w metodach LM PCR; (P)-grupa fosforanowa.

W metodach LM PCR oligonukleotydy tworzące adaptor są nieufosforylowane na końcu 5', aby nie dopuścić do ich polimeryzacji podczas reakcji ligacji. Oligonukleotyd pomocniczy nie jest ligowany do fragmentu restrykcyjnego i na etapie denaturacji w reakcji PCR ulega oddysocjowaniu. W wyniku ligacji adaptora do fragmentów restrykcyjnych otrzymuje się dwuniciowe fragmenty DNA o ściśle zdefiniowanych końcach, które mogą być amplifikowane w reakcji PCR, bez konieczności znajomości sekwencji tych fragmentów.

Wszystkie metody LM PCR przebiegają według tego samego schematu, obejmującego enzymatyczne trawienie genomowego DNA, ligację adaptorów do końców fragmentów restrykcyjnych, amplifikację wybranych fragmentów w reakcji PCR oraz elektroforetyczny rozdział produktów amplifikacji (rys. 5).

W reakcji trawienia enzymatycznego stosuje się enzymy często tnące lub kombinację enzymów rzadko i często tnących, aby uzyskać stosunkowo krótkie fragmenty DNA, przez wzgląd na ograniczoną procesywność stosowanych polimeraz DNA. Ze względu na ogromną liczbę generowanych w ten sposób fragmentów DNA, metody LM PCR wprowadzają różne mechanizmy selekcji ilości amplifikowanych w reakcji PCR fragmentów DNA.

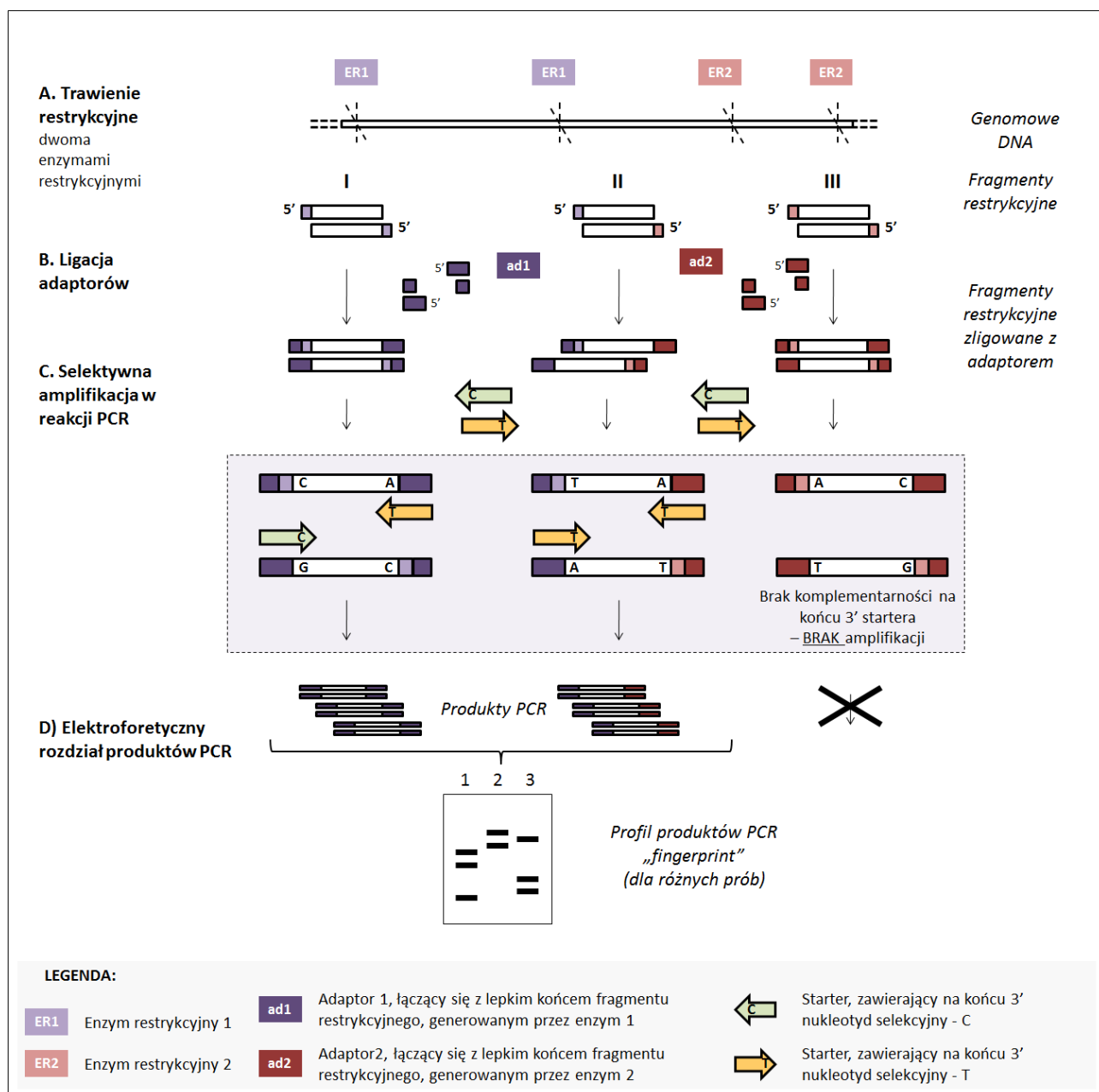


Rys.5. Ogólny schemat metod LM PCR

### Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

W metodzie AFLP, opisaney w 1999 roku przez Vos i in. [94], reakcję PCR prowadzi się z zastosowaniem starterów o sekwencji identycznej z sekwencją oligonukleotydu ligowanego adaptora,

wydłużonej na końcu 3' o sekwencję miejsca restrykcyjnego oraz o 2-4 selekcyjne nukleotydy. Amplifikacja fragmentu DNA zachodzi jedynie w przypadku pełnej komplementarności startera na końcu 3', po obu stronach fragmentu restrykcyjnego (rys. 6). Częstość rozpoznawania specyficznego miejsca przez starter selekcyjny wynosi  $1/4^n$  (n-liczba zasad selekcyjnych). Minimalizacji powstających artefaktów dokonuje się poprzez stosowanie pre-amplifikacji przeprowadzanej ze starterem wydłużonym o jeden dodatkowy nukleotyd, natomiast właściwa amplifikacja zachodzi z użyciem startera wydłużonego o 3 dodatkowe nukleotydy. Aby wyeliminować niespecyficzne wiązanie się startera do matrycy stosuje się stosunkowo długie startery i wysoką temperaturę przyłączania.



Rys. 6. Schemat metody AFLP; w ramce zaznaczono etap selekcji fragmentów amplifikowanych.

Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji można prowadzić w żelu poliakryloamidowym, jednakże ze względu na dużą ilość amplifikowanych fragmentów DNA (>100), preferowane jest stosowanie żeli sekwencyjnych oraz starterów znakowanych izotopowo lub fluorescencyjnie, co znacznie podwyższa

koszt analizy.

Ilość amplifikowanych fragmentów może być kontrolowana poprzez zastosowanie różnych enzymów restrykcyjnych, zmianę rodzaju i liczby selekcyjnych nukleotydów na starterze oraz liczby starterów w reakcji PCR. W standardowej metodzie AFLP wykorzystuje się dwa enzymy restrykcyjne, najczęściej jeden rzadko, drugi często tnący badane DNA. W procedurze uproszczonej SE-AFLP (*ang.* Single Enzyme AFLP [99]) stosuje się tylko jeden enzym rzadko tnący. W procedurze TE-AFLP (*ang.* Three Enzyme AFLP), zaproponowanej przez Van der Wurff i in. [100] w celu podniesienia mocy dyskryminacji i redukcji puli amplifikowanych fragmentów zastosowano trzy różne endonukleazy oraz selektywną ligację tylko dwóch rodzajów adaptorów.

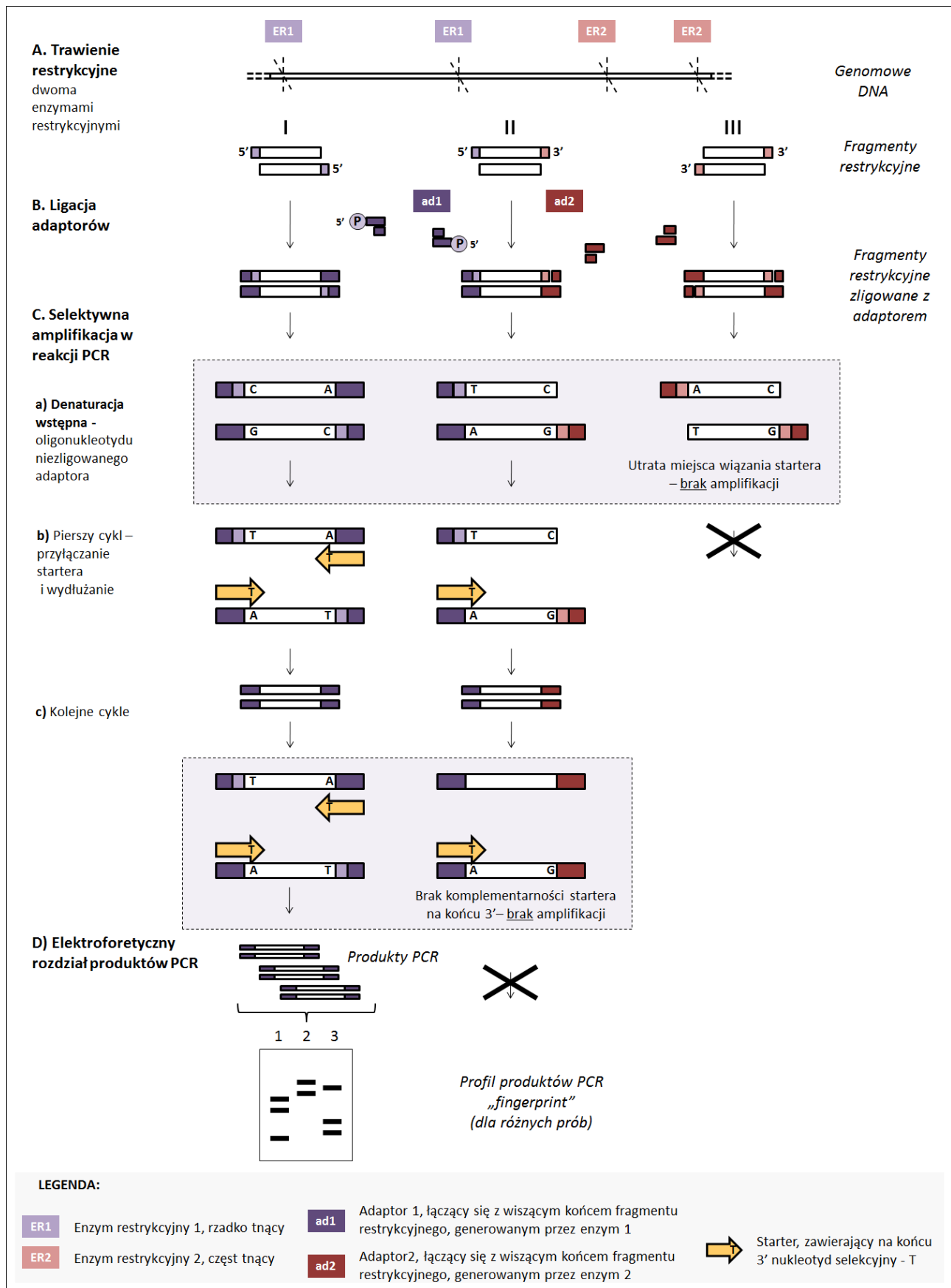
Metoda AFLP charakteryzuje się dużym potencjałem różnicującym. Przy zastosowaniu kombinacji wielu starterów umożliwia wykrycie nawet pojedynczych różnic pomiędzy organizmami blisko spokrewnionymi. Jest ona powtarzalna, uniwersalna i stosunkowo prosta w wykonaniu, jednakże interpretacja wyników, zwłaszcza w przypadku dużej ilości produktów PCR, wymaga od badacza dużego doświadczenia. Jest szczególnie przydatna w badaniach dotyczących pokrewieństwa klonalnego zarówno bakterii np. *A. baumannii* [101], *S. aureus* [102], *E. coli* [103], *E. faecium* [104], jak i drożdży z rodzaju *Candida* [105-107]. Wykorzystywano ją również do śledzenia transferu horyzontalnego genów, do tworzenia map genetycznych nowych gatunków oraz w badaniach filogenetycznych [99].

Technika ta ze względu na wysoki koszt analizy stosowana jest głównie w ośrodkach naukowych, do opisu pojedynczych sytuacji epidemicznych, rzadziej stosowana jest w ogólnych badaniach epidemiologicznych.

### **Infrequent Restriction Site PCR (IRS PCR)**

W metodzie IRS PCR, zaproponowanej w 1996 roku [95] amplifikacja fragmentów restrykcyjnych uzależniona jest od obecności miejsca wiązania startera, co uwarunkowane jest odpowiednią konstrukcją adaptorów i starterów. W celu zmniejszenia ilości amplifikowanych fragmentów, podobnie jak w metodzie AFLP, stosuje się startery zawierające na końcu 3' selektywne nukleotydy. Schemat metody jest przedstawiony na rysunku 7.

W reakcji trawienia stosuje się dwa enzymy: rzadko tnący (ER1) pozostawiający lepkie końce 5' oraz często tnący (ER2), pozostawiający lepkie końce 3', w wyniku czego powstają trzy grupy fragmentów restrykcyjnych. Na etapie reakcji ligacji dwa rodzaje adaptorów: ad1 i ad2, przyłączają się odpowiednio: do lepkiego końca 5' i końca 3'. Adaptor ad1 zawiera dodatkowo na końcu 5' grupę fosforanową. W reakcji PCR



Rys. 7. Schemat metody IRS PCR, ramką zaznaczono etap selekcji fragmentów amplifikowanych.

na skutek oddysocjowania niezligowanego oligonukleotydu ligowanego adaptoru ad2, następuje utrata miejsca wiązania dla startera. Jedynie fragmenty obustronnie trawione enzymem rzadko tnącym (grupa I)

oraz fragmenty trawione oboma enzymami (grupa II), wykazujące pełną komplementarność w stosunku do końca 3' startera, mogą być amplifikowane. Amplifikacja fragmentów trawionych różnymi enzymami (grupa II) w pierwszym cyklu reakcji PCR zachodzi liniowo (zostaje utworzone miejsce hybrydyzacji dla startera *forward*). W kolejnych cyklach amplifikacja zachodzi w postępie geometrycznym.

Technika IRS PCR jest wysoce uniwersalna i może być stosowana dla szerokiego zakresu organizmów przy zachowaniu tych samych enzymów restrykcyjnych, starterów, adaptorów i warunków amplifikacji. Technika znalazła zastosowanie m.in. w różnicowaniu klinicznych izolatów *A. baumannii* i *S. marcescens* [108], *S. aureus* [109], *E. faecium* [110], *E. faecalis* [111] oraz *Candida* [112]. Metoda jest stosunkowo prosta i tania, przez to staje się dobrym narzędziem w badaniach epidemiologicznych. W wyniku analizy uzyskuje się niewielką ilość produktów PCR (od 10 do 12), które można rozdzielać w żelu poliakryloamidowym, a w niektórych przypadkach także w żelu agarozowym. Charakteryzuje się ponadto krótkim czasem wykonania badania, łatwością interpretacji wyników, powtarzalnością oraz wysokim potencjałem różnicującym, porównywalnym z techniką REA-PFGE. Moc dyskryminacyjną można regulować poprzez zmianę enzymów restrykcyjnych oraz selekcyjnego nukleotydu na końcu 3' startera. Dużym ograniczeniem metody są trudności w doborze odpowiedniego układu restrykcyjnego, głównie przez niewielką ilość dostępnych komercyjnie enzymów restrykcyjnych, generujących jednoniciowe końce 3'.

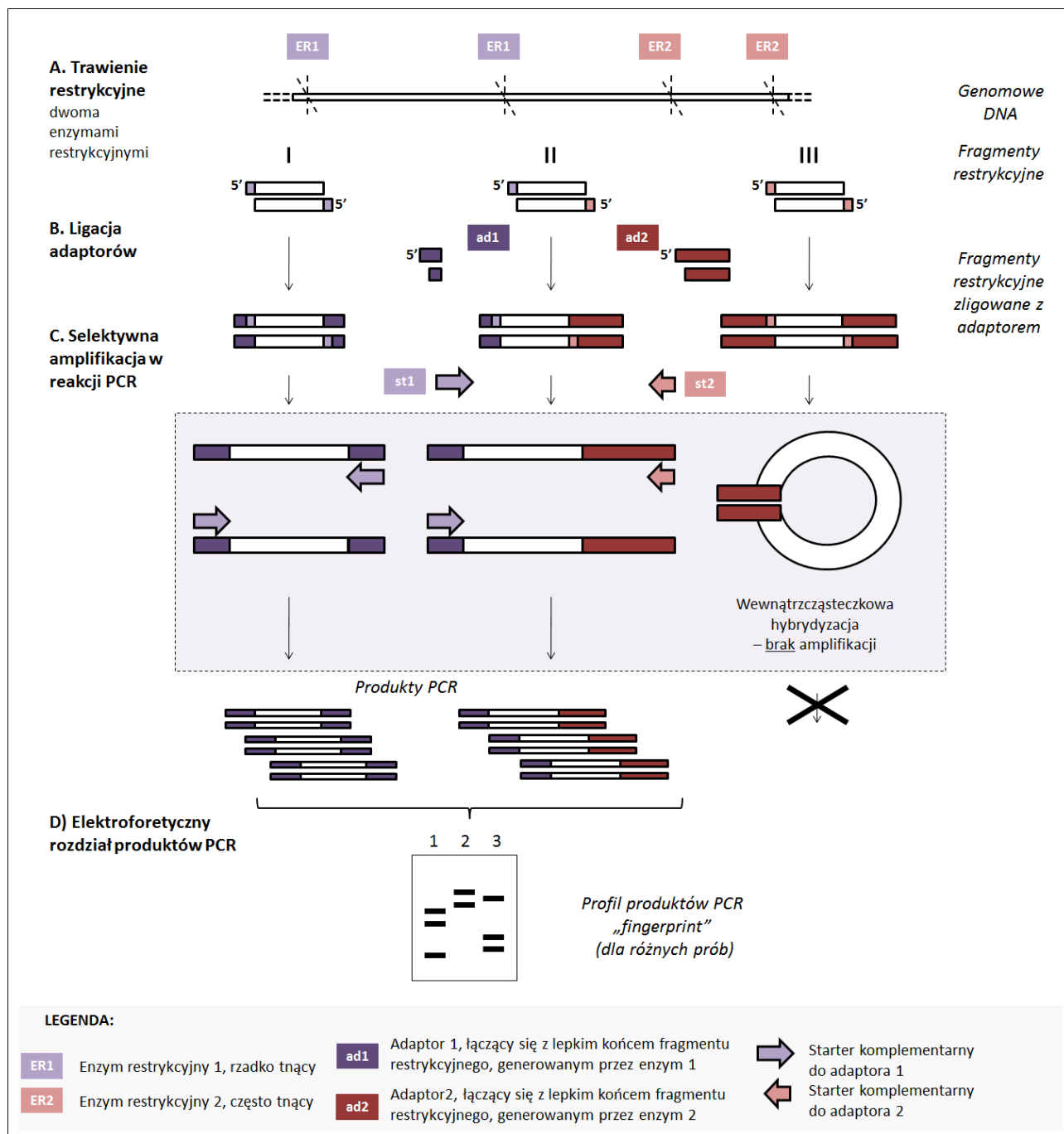
#### **Amplification of DNA Surrounding Rare Restriction Sites (ADSRRS)**

W metodzie ADSRRS [96] ilość amplifikowanych fragmentów jest ograniczona zjawiskiem supresji (**SSH**, *ang.* Suppression Subtractive Hybridisation) reakcji PCR. Po raz pierwszy zjawisko to zostało wyjaśnione przez Diatchenko w 1996 roku, który wykorzystał je do konstrukcji bibliotek genów [113]. Supresja w reakcji PCR może zajść wtedy, gdy DNA poddawane amplifikacji w reakcji PCR zawiera na obu końcach terminalne sekwencje homologiczne, które są jednocześnie miejscem przyłączenia startera. Podczas reakcji PCR dochodzi do konkurencji pomiędzy wewnątrzcząsteczkową hybrydyzacją terminalnych sekwencji komplementarnych a hybrydyzacją startera. Utworzenie wewnątrzcząsteczkowej struktury drugiego rzędu zwanej strukturą „rakiety tenisowej” blokuje miejsce wiązania startera i tym samym uniemożliwia amplifikację fragmentu DNA. Supresja w reakcji PCR jest tym silniejsza im sekwencje komplementarne w ssDNA są dłuższe, bogatsze w C i G, a startery krótsze i o relatywnie niższym stężeniu.

W metodzie ADSRRS genomowe DNA trawi się dwoma enzymami restrykcyjnymi: rzadko (ER1) i często tnącym (ER2), pozostawiającymi jednoniciowe końce 5' o różnej sekwencji (rys. 8). W wyniku trawienia otrzymuje się trzy grupy fragmentów, z czego najliczniejsza grupa to fragmenty obustronnie trawione enzymem często tnącym (grupa III), mniej liczna grupa to fragmenty trawione enzymem rzadko i często tnącym (grupa II), natomiast najmniej liczna grupa to fragmenty obustronnie trawione enzymem rzadko tnącym (grupa I).

Do utworzonych fragmentów restrykcyjnych dołącza się dwa rodzaje adaptorów. Adaptor ligowany

do miejsca cięcia enzymem rzadko tnącym (ad1) jest stosunkowo krótki (ok. 20 nt), natomiast adaptor ligowany do miejsca cięcia enzymem często tnącym (ad2) jest prawie dwukrotnie dłuższy. Produkty ligacji poddaje się amplifikacji w reakcji PCR z zastosowaniem dwóch starterów. Starter 1 (st1) ma taką samą sekwencję jak oligonukleotyd ligowany adaptora krótkiego, natomiast starter 2 (st2) ma sekwencję identyczną z 5' terminalną sekwencją oligonukleotydu ligowanego adaptora ad2.



Rys. 8. Schemat metody ADRSST *fingerprinting*; ramką zaznaczono etap selekcji fragmentów amplifikowanych

Fragmety obustronnie trawione enzymem często tnącym, ligowane obustronnie z adaptorem długim nie są amplifikowane w reakcji PCR. Fragmenty te zawierają terminalne sekwencje komplementarne, na tyle długie, by utworzyć stabilną strukturę „rakiety tenisowej” i zablokować miejsce wiązania dla startera. Dodatkowo sekwencje te są dwa razy dłuższe od sekwencji komplementarnego



startera, co wpływa korzystnie na zjawisko wewnątrzcząsteczkowej hybrydyzacji i supresję amplifikacji w reakcji PCR. Fragmenty obustronnie trawione enzymem rzadko tnącym (ER1) także zawierają terminalne sekwencje komplementarne i mogą tworzyć strukturę „rakiety tenisowej” (grupa I). Jednakże niewielka długość tych sekwencji, podobna do długości startera powoduje, że wewnątrzcząsteczkowa struktura jest mało stabilna, a prawdopodobieństwo supresji w reakcji PCR jest niewielkie. Fragmenty te będą amplifikowane w reakcji PCR, ale ich ilość będzie niewielka.

W reakcji PCR amplifikowane są głównie fragmenty DNA trawione dwoma różnymi endonukleazami, ligowane z różnymi adaptorami (grupa II). Fragmenty te nie zawierają terminalnych sekwencji komplementarnych, które na skutek wewnątrzcząsteczkowej hybrydyzacji mogłyby blokować miejsca wiązania starterów.

Technika ADSRRS jest metodą powtarzalną, specyficzną, o wysokim potencjale różnicującym, który można regulować na etapie trawienia restrykcyjnego poprzez dobór odpowiedniej pary endonukleaz. Jest prosta w wykonaniu, stosunkowo niedroga i nie wymaga dodatkowego specjalistycznego sprzętu, dzięki czemu może być wykorzystana w badaniach epidemiologicznych. Jedyną trudnością jest dobranie odpowiedniego dla badanych drobnoustrojów układu restrykcyjnego. Jak dotąd metoda ta znalazła zastosowanie w typowaniu *S. marcescens* [114], *E. faecium* [115], *K. pneumoniae* [116], *S. aureus* [117] i *Corynebacterium pseudotuberculosis* [118].

### **PCR Melting Profiles (PCR MP)**

Technika PCR MP zaproponowana w 2003 roku przez Masny i Płucienniczaka [97] do ograniczenia ilości amplifikowanych fragmentów w reakcji PCR wykorzystuje dwa zjawiska:

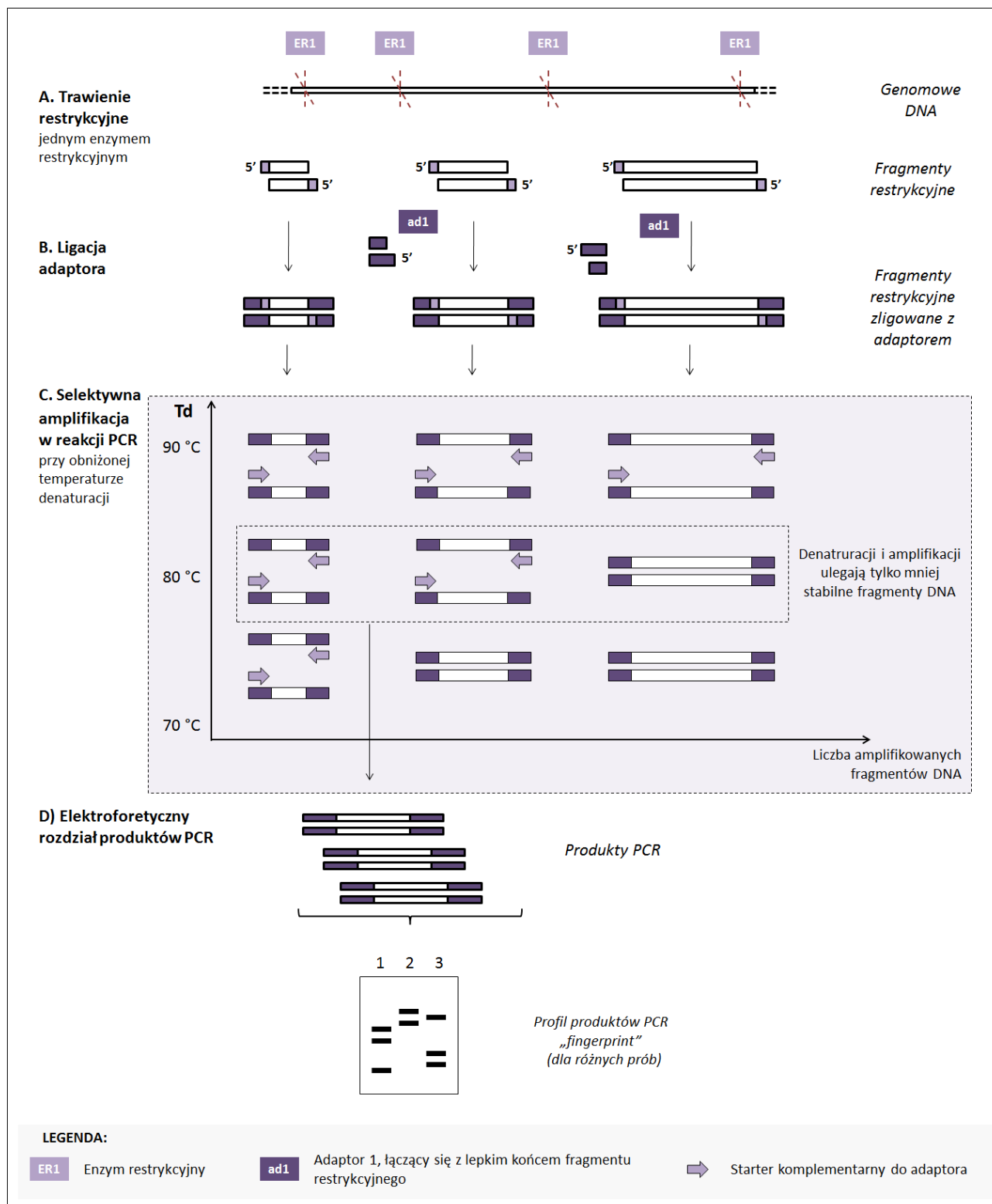
- ✓ fragmenty powstałe po trawieniu genomowego DNA różnią się temperaturą topnienia,
- ✓ do powielenia fragmentu DNA techniką PCR niezbędna jest jego całkowita denaturacja.

Ze względu na występowanie heterogeniczności w rozmieszczeniu par GC w genomie drobnoustroju, po trawieniu restrykcyjnym uzyskuje się fragmenty, które różnią się długością i składem zasad. Różnią się także temperaturą, przy której następuje ich pełna denaturacja. Temperatura topnienia jest tym wyższa im dłuższy i bogatszy w pary GC jest dany fragment DNA.

W metodzie PCR MP genomowe DNA trawi się jedną endonukleazą często tnącą, pozostawiającą lepkie końce 5', do których dołącza się jeden rodzaj adaptor. W reakcji PCR stosuje się starter o sekwencji identycznej, co oligonukleotyd ligowany adaptor, wydłużony na końcu 3' o sekwencję miejsca restrykcyjnego. Długość startera jest równa długości terminalnych sekwencji homologicznych, co zapobiega zjawisku supresji w reakcji PCR. Schemat metody PCR MP został przedstawiony jest na rysunku 9.

Ograniczenie ilości amplifikowanych fragmentów uzyskuje się poprzez zastosowanie niższej niż w standardowej metodzie LM PCR temperatury denaturacji. Zazwyczaj w reakcji PCR stosuje się

temperaturę denaturacji w zakresie 94 - 96°C w celu uzyskania całkowitego rozdzielania nici, co umożliwia amplifikację wszystkich obecnych w mieszaninie fragmentów dsDNA. Obniżenie temperatury denaturacji powoduje, iż rozdzielaniu i następnie amplifikacji ulegają tylko krótsze i mniej stabilne fragmenty DNA, uboższe w pary GC. Fragmenty, które nie uległy całkowitej denaturacji, nie będą amplifikowane, gdyż miejsca hybrydzacji starterów są zablokowane przez komplementarną nić.



Rys. 9. Schemat metody PCR MP; ramką zaznaczono etap selekcji fragmentów amplifikowanych.

Stosowanie różnej temperatury denaturacji pozwala regulować liczbę produktów w reakcji PCR (rys. 9, C), a tym samym zmieniać poziom dyskryminacji metody. W niskich temperaturach denaturacji ulega niewielka ilość fragmentów DNA. Wraz ze wzrostem temperatury ich liczba wzrasta.

Temperatura denaturacji, właściwa do różnicowania danej grupy mikroorganizmów dobierana jest empirycznie poprzez przeprowadzenie reakcji PCR w gradiencie temperatury denaturacji z zastosowaniem termocyklera gradientowego. Przy optymalnej temperaturze denaturacji liczba produktów PCR powinna być na tyle duża, aby umożliwić różnicowanie badanych mikroorganizmów w obrębie grupy, i jednocześnie na tyle mała, aby uzyskany elektroforetyczny profil produktów PCR był czytelny i łatwy w interpretacji. Najczęściej liczba widocznych na żelu poliakryloamidowym produktów amplifikacji mieści się w granicach 15-30.

Istnieją dwa podejścia badawcze techniki PCR MP:

- analiza profilu elektroforetycznego produktów PCR, otrzymanych dla jednej, wybranej temperatury denaturacji.
- analiza wzrostu liczby amplifikowanych fragmentów DNA, przy gradientowo wzrastającej temperaturze denaturacji.

Technika PCR MP jest metodą powtarzalną, charakteryzującą się wysokim potencjałem różnicującym, który może być regulowany poprzez dobór odpowiedniego enzymu restrykcyjnego i zmianę temperatury denaturacji w cyklach reakcji PCR.

Metoda PCR MP jest wysoce uniwersalna. Jak dotąd wykorzystano ją do typowania genetycznego bakterii (*E. coli* [119], *E. faecium* [120], *K. oxytoca* [121,122]), drożdży z rodzaju *Candida* [123], dermatofitów z rodzaju *Trichophyton* [124], a także do identyfikacji mutacji punktowych. W odróżnieniu od pozostałych technik grupy LM PCR, PCR MP pozwala na różnicowanie fragmentów o identycznej długości, ale różnym składzie nukleotydowym, wpływającym na zmianę temperatury topnienia. Za pomocą PCR MP wykryto delecję jednego nukleotydu we fragmencie DNA o długości 218 pz. Delecja spowodowała obniżenie stabilności fragmentu DNA i obniżenie temperatury topnienia. Zmiana temperatury denaturacji o 0,5°C spowodowała, iż fragment pozbawiony delecji nie był amplifikowany [125].

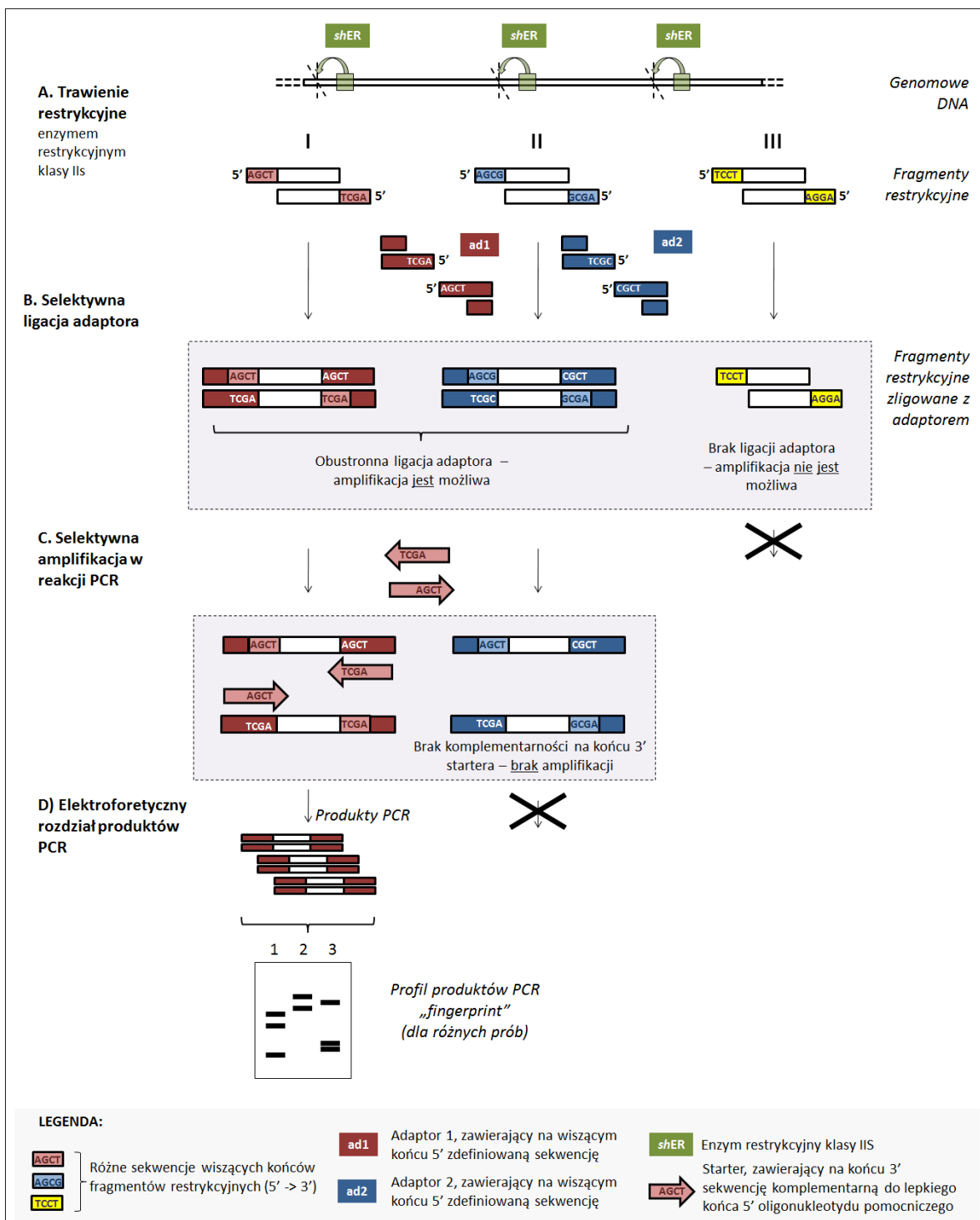
Przez wzgląd na konieczność regulacji temperatury denaturacji w cyklach reakcji PCR, metoda PCR MP wymaga korzystania z termocyklera gradientowego. Charakteryzuje się niewielkim stopniem odtwarzalności przez wzgląd na wysoką wrażliwość na niewielkie odchylenia temperatury w cyklach reakcji PCR, które mogą wynikać ze stosowania różnych termocyklarów.

#### **Ligation Mediated PCR/Shifter (LM PCR/Shifter)**

W metodzie LM PCR/Shifter, zaprojektowanej w 2011 roku przez Krawczyk i in [98] do trawienia genomowego DNA wykorzystuje się enzymy klasy IIS, pozostawiające niezdefiniowane lepkie końce 5'.

Amplifikacja fragmentu DNA jest uzależniona od obecności miejsca hybrydyzacji dla startera oraz od pełnej komplementarności startera na końcu 3'.

Enzymy restrykcyjne klasy IIS rozpoznają specyficzną sekwencję o długości 4-7 nukleotydów, jednak cięcie następuje w zdefiniowanym miejscu poza sekwencją rozpoznania, w odległości 1-20 pz. Sekwencja rozpoznania jest całkowicie lub częściowo asymetryczna. Założeniem metody LM PCR/*Shifter* jest zastosowanie do trawienia genomowego DNA jednego enzymu restrykcyjnego klasy IIS, pozostawiającego różne wiszące końce 5' o długości 4 nukleotydów. W wyniku trawienia powstają fragmenty restrykcyjne o różnej wielkości i o dowolnej sekwencji nukleotydowej na lepkich końcach 5' (rys. 10).



Rys. 10. Schemat metody LM PCR/*Shifter*; ramką zaznaczono etap selekcji fragmentów amplifikowanych.

W reakcji ligacji stosuje się adaptor o zdefiniowanej sekwencji lepkiego końca (sekwencja dyskryminująca), który zostaje zligowany z fragmentem restrykcyjnym tylko w przypadku pełnej komplementarności wiszących końców. Ilość różnych 4-nukleotydowych sekwencji, jakie mogą znajdować się na wiszących końcach 5' fragmentów restrykcyjnych wynosi  $4^4=256$ . Statystycznie, prawdopodobieństwo, że zaprojektowany adaptor połączy się z fragmentem restrykcyjnym wynosi 1/256. Jedynie fragmenty obustronnie zligowane z adaptorem mogą być amplifikowane w reakcji PCR. Amplifikacji dokonuje się przy zastosowaniu startera o sekwencji identycznej, co oligonukleotyd ligowany adaptora, wydłużony na końcu 3' o sekwencję miejsca restrykcyjnego. Taka długość zapobiega zjawisku supresji w reakcji PCR.

Poziomą dyskryminację metody LM PCR/*Shifter* można regulować na wiele sposobów. Pierwszym jest dobór odpowiedniego enzymu restrykcyjnego, drugim zastosowanie kilku różnych adaptorów różniących się sekwencją lepkiego końca 5'. Zastosowanie adaptora zawierającego na lepkim końcu 5' jeden lub dwa nukleotydy zdegenerowane (np. 5' – NGCN) nie tylko zwiększa liczbę fragmentów DNA ligowanych z adaptorem, ale także pozwala regulować poziom dyskryminacji na etapie reakcji PCR, przez konieczność zastosowania różnych starterów, komplementarnych do fragmentu DNA na końcu 3'. Zmiana ilości starterów reguluje moc dyskryminacji. Dużym ograniczeniem metody LM PCR/*Shifter* jest niewielka ilość dostępnych enzymów restrykcyjnych klasy IIS, które mogłyby być zastosowane w układzie diagnostycznym.

Metoda LM PCR/*Shifter* jest bardzo młodą techniką genotypowania drobnoustrojów. Jak dotąd jej użyteczność sprawdzono dla bakterii *E. coli*, *K. oxytoca* [98] oraz *S. marcescens*, *A. baumannii* i grzybów z rodzaju *Candida* (dane nie opublikowane). Metoda wydaje się być stosunkowo łatwa, niedroga i nie wymagająca specjalistycznego sprzętu.

### **4.3. Badania epidemiologiczne i endemiczne – kryteria wyboru metody typowania**

Wybór odpowiedniej techniki do typowania drobnoustrojów powinien uwzględniać nie tylko cel typowania, ale także charakterystykę badanych szczepów. Molekularne metody typowania są często stosowane w badaniach epidemiologicznych, jednak w przypadku badań endemicznych ich wykorzystanie jest ograniczone. W badaniach epidemiologicznych stosuje się metody porównawcze o wysokim stopniu dyskryminacji tj. PFGE, metody oparte o PCR, pozwalające porównywać szczepy związane i niezwiązane z epidemią. Typowaniu poddaje się ograniczoną liczbę izolatów pozyskanych od pacjentów, personelu medycznego, środowiska szpitalnego i pozaszpitalnego, a na podstawie wyznaczonego stopnia podobieństwa szczepów (tzw. typowanie porównawcze), bada się źródła, rezerwuary i drogi rozprzestrzeniania się patogenów. W badaniach endemicznych dotyczących nadzoru, kolekcja i analiza izolatów to proces ciągły, trwający kilka lat. Wymaga stosowania metod opartych na wykrywaniu odpowiednich markerów epidemicznych (np. czynników wirulencji), pozwalających potwierdzić lub

wykluczyć obecność danego patogenu w środowisku. Taki system typowania nazywany jest „biblioteką typowania” (*ang.* library typing) i wymaga posiadania kolekcji patogenów alarmowych (*ang.* alert pathogens) [126].

Dostępnych jest coraz więcej technik typowania molekularnego, różniących się odtwarzalnością wyników i potencjałem różnicującym. Wybór metody typowania zależy przede wszystkim od laboranta, a nie od epidemiologa, jednak dla uzyskania poprawnych wyników istotna jest ich współpraca. Laborant powinien rozumieć cel badania epidemiologicznego oraz wiedzieć z jakimi szczepami ma on do czynienia, aby dobrać metodę o odpowiednim potencjale różnicującym. Epidemiolog natomiast powinien znać zasady interpretacji wyników. Bardzo ważnym aspektem jest, aby wyniki typowania molekularnego były zgodne z wynikami tradycyjnych analiz epidemiologicznych. Identyfikacja szczepów klonalnie identycznych powinna mieć przełożenie m.in. na zbiegające się okresy hospitalizacji pacjentów na tym samym oddziale, narażenie na wspólny czynnik środowiskowy, wspólny personel medyczny lub sposób leczenia [126].

O wyborze metody typowania decyduje głównie jej potencjał różnicujący [127] oraz cel badania. W przypadku podejrzenia wybuchu epidemii, w kontekście danych epidemiologicznych, metody typowania szczepów wykorzystywane są w celu potwierdzenia lub zaprzeczenia obecności związków epidemicznych i relacji klonalnej. W takim wypadku można stosować metody szybkie i niedrogie, o stosunkowo niższym potencjale różnicującym, które będą wystarczające, aby zidentyfikować źródło zakażenia. W przypadku braku danych epidemiologicznych, zastosowanie metod o wyższym potencjale różnicującym pozwala na identyfikację potencjalnych źródeł zakażenia oraz dróg transmisji, a także umożliwia wykrycie epidemii. Metody te jednak stosuje się w przypadku, gdy mamy do czynienia ze wspólnym źródłem infekcji a czynnik wywołujący infekcję jest genetycznie podobny u wszystkich zainfekowanych osób. W przypadku epidemii rozprzestrzeniających się lub w badaniach długoterminowych (badanie transmisji zakażenia w długim okresie czasu) mogą nastąpić różnice w sekwencji DNA mikroorganizmów na początku i na końcu epidemii, będące wynikiem naturalnej zmienności (tempo procesu zależy od drobnoustroju). W takim przypadku wysoce różnicujące metody mogą błędnie zaklasyfikować izolaty pochodzący z końca epidemii jako niespokrewniony i nieepidemiczny, zwłaszcza gdy brak jest endemicznych szczepów do porównania. W tej sytuacji konieczne jest zastosowanie technik pozwalających na określenie relacji filogenetycznych (np. MLST) [127,128].

Liczba obecnie dostępnych technik typowania genetycznego jest bardzo duża. Każda z nich ma swoje zalety, wady i ograniczenia, zarówno pod względem zakresu zastosowania oraz mocy dyskryminacyjnej. Nie ma metody uniwersalnej, która pozwalałaby różnicować wszystkie drobnoustroje. Dlatego tworzy się nowe, coraz bardziej dokładne metody analizy materiału genetycznego, ale równocześnie dąży się do uproszczenia istniejących już metod przy jednoczesnym zwiększaniu ich czułości, wiarygodności, powtarzalności i potencjału różnicującego.

#### 4.4. Statystyczna analiza wyników typowania genetycznego

Analiza wyników typowania, uzyskanych metodami *fingerprinting* może służyć do oznaczania wzajemnych relacji genetycznych, tj. podobieństwa genetycznego drobnoustrojów. Analiza ta może być przeprowadzana na podstawie wizualnego porównania profili elektroforetycznych produktów PCR oraz z zastosowaniem metod statystycznych. Wizualne porównanie profili elektroforetycznych jest wystarczające do identyfikacji szczepów będących w relacji klonalnej (identycznych genetycznie) i jest wykonywane we wstępnym etapie analizy danych oraz wstępnej ocenie sytuacji epidemiologicznej (np. przy identyfikacji zakażenia szpitalnego, ogniska epidemii). Jest jednak niewystarczające do zbadania stopnia podobieństwa pomiędzy badanymi szczepami.

Metody statystyczne zajmujące się analizą skupień (*ang. Cluster Analysis, CA*) umożliwiają klasteryzację (grupowanie) obiektów (szczepów) na podstawie zestawu cech (np. obecność/brak produktu PCR o danej długości w profilu elektroforetycznym) lub parametrów (np. intensywność fluorescencji znakowanego produktu PCR) w zbiorze o największym podobieństwie [129].

Do wyznaczenia podobieństwa między dwoma obiektami (klastrami) najczęściej stosuje się współczynnik podobieństwa Dice'a, który wyznacza podobieństwo pomiędzy dwoma obiektami ( $S_{i,j}$ ) na podstawie obecności lub braku danej cechy (obecność lub brak prążka na danej wysokości w profilu elektroforetycznym produktów PCR). Wartość każdej cechy przedstawiona jest w systemie binarnym (1/0).

Podobieństwo pomiędzy dwoma obiektami jest wyrażane w postaci ilorazu liczby zaznaczonych produktów dla obiektu  $i$  i  $j$  ( $n_{i,j}$ ) w stosunku do sumy liczb zaznaczonych produktów dla obiektu  $i$  ( $n_i$ ) i obiektu  $j$  ( $n_j$ ).

$$S_{i,j} = \frac{2 \cdot n_{i,j}}{n_i + n_j}, \quad S \in \langle 0,1 \rangle$$

$S_{i,j}$  – podobieństwo pomiędzy obiektami (ścieżkami)  $i$  i  $j$   
 $n_{i,j}$  – liczba zaznaczonych fragmentów dla obiektów (ścieżek)  $i$  i  $j$   
 $n_i$  – liczba zaznaczonych fragmentów dla obiektu (ścieżki)  $i$   
 $n_j$  – liczba zaznaczonych fragmentów dla obiektu (ścieżki)  $j$

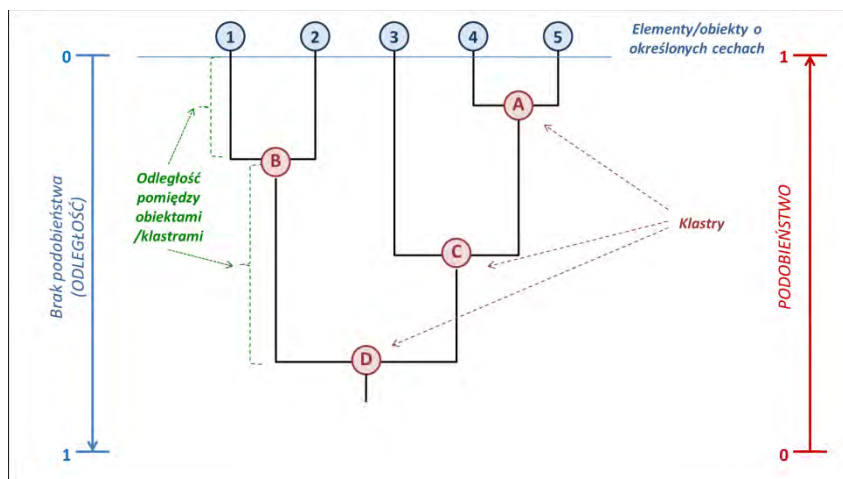
Podczas porównywania profili elektroforetycznych dla metod *fingerprinting* bierze się pod uwagę obecność lub brak produktu PCR o danej długości. Intensywność prążka, czyli ilość produktu PCR jest cechą drugorzędą, która nie jest uwzględniana w statystycznej analizie podobieństwa.

Grupowanie obiektów (analiza skupień) wykonuje się z wykorzystaniem różnych metod [129], m.in.:

- **UPGMA** (*ang. Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*),
- **WPGMA** (*ang. Weighted Pair Group Method with Averaging*).

Analiza skupień jest wykorzystywana do analizy co najmniej trzech obiektów, opisywanych przez co najmniej trzy cechy. Metoda ta polega na stopniowej redukcji liczby obiektów poprzez grupowanie ich

w podgrupy (klastry). Na początku liczba klastrow równa się liczbie obiektów. Każde połączenie dwóch obiektów zmniejsza ogólną liczbę klastrow, zwiększając jednocześnie liczbę obiektów w pojedynczym klastrze. Proces łączenia obiektów i klastrow dokonywany jest na podstawie wartości podobieństwa [130] na podstawie wybranej metody klasteryzacji i jest kontynuowany aż do momentu utworzenia jednego dużego klastru zawierającego wszystkie obiekty. Wynik tego procesu można przedstawić w postaci dendrogramu (rys. 11).

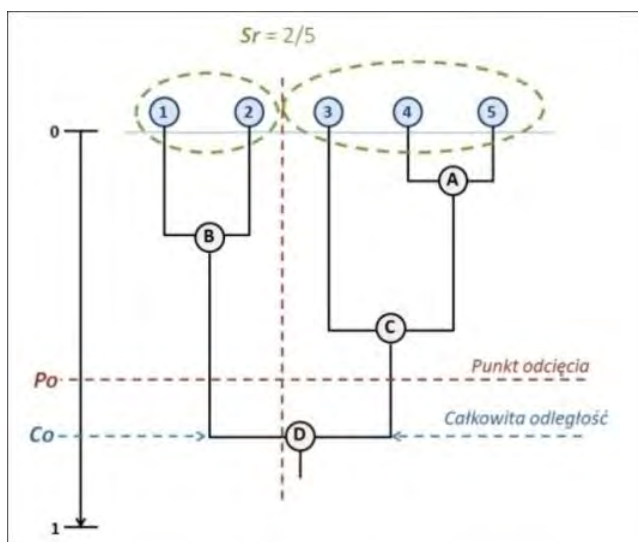


Rys. 11. Dendrogram przedstawiający podobieństwo obiektów określanych danym zestawem cech.

Dendrogram to diagram w kształcie drzewa, przedstawiający związki pomiędzy obiektami danego zbioru. Pień drzewa (podstawa) symbolizuje wspólnego przodka, natomiast korona (szczyt) wszystkie elementy (szczepy bakteryjne) badanego zbioru. Kolejne klastry (połączenia elementów zbioru) zaznacza się w postaci rozgałęzień (węzłów). Położenie węzła względem osi odległości przedstawia odległość (brak podobieństwa) pomiędzy elementami wchodzącymi w skład klastru.

### Interpretacja danych.

Analiza dendrogramu pozwala wyznaczyć całkowite podobieństwo i stopień zróżnicowania badanych szczepów, poziom identyczności oraz wyróżnić punkty odcięcia (rys. 12).



Rys. 12. Opis dendrogramu;  $C_o$  – całkowita odległość zbioru;  $P_o$  – punkt odcięcia dzieli elementy na dwa zbiory, zaznaczone zieloną linią;  $S_r$  – stopień zróżnicowania zbioru.



- ❖ **Punkt odcięcia (Po)** - jest to poziom podobieństwa (odległości), który pozwala wyróżnić w zbiorze obiektów badanych podgrupy obiektów podobnych.

Punkt odcięcia (Po) nie jest wartością stałą. Metody *fingerprinting* z wyjątkiem REA-PFGE nie posiadają ujednoliconego systemu interpretacji wyników, stąd punkt odcięcia ustalany jest eksperymentalnie na podstawie informacji dotyczących badanych obiektów (dane epidemiologiczne) oraz na podstawie samego obrazu dendrogramu. Liczba punktów odcięcia zależy od zróżnicowania profili elektroforetycznych w badanym zbiorze. W przypadku wysokiej jednorodności badanych szczepów (profile elektroforetyczne są bardzo podobne) lub przeciwnie, bardzo wysokiej różnorodności wyznaczenie punktu odcięcia może okazać się niemożliwe.

- ❖ **Całkowite podobieństwo (Cp)** - to podobieństwo pomiędzy najbardziej odległymi elementami w zbiorze.

Całkowite podobieństwo wyznacza się na podstawie dendrogramu według wzoru:

$$Cp = 1 - Co$$

**Cp** – całkowite podobieństwo zbioru obiektów

**Co** – całkowita odległość - odległość klasteru zawierającego wszystkie obiekty zbioru od pojedynczych obiektów

Wielkość całkowitego podobieństwa obiektów w badanym zbiorze jest odwrotnie proporcjonalna do różnorodności pomiędzy obiektami (im wyższa różnorodność tym niższe całkowite podobieństwo). Wyższa wartość genetycznego podobieństwa badanej grupy obiektów, świadczy o niższym poziomie różnicowania danej metody.

- ❖ **Stopień zróżnicowania obiektów w zbiorze (Sr)** - to stosunek ilości zidentyfikowanych typów (grup) do ilości analizowanych szczepów.

$$Sr = \frac{\text{liczba grup, na które podzielono obiekty}}{\text{całkowita liczba obiektów}}$$

Stopień zróżnicowania jest proporcjonalny do poziomu różnicowania danej metody (im wyższy Sr, tym metoda ma wyższy potencjał różnicujący).

- ❖ **Poziom identyczności (Pi)** – jest to punkt odcięcia, przy którym szczepy referencyjne analizowane wybraną metodą określane są jako identyczne.

Poziom identyczności wyznacza się w celu określenia stopnia podobieństwa, przy którym obiekty uznawane są za identyczne. W celu określenia poziomu identyczności dla danej metody, wykonuje się tzw. kontrole wewnętrzne. Szczep referencyjny lub wzorcowy poddaje się wielokrotnie analizie według tej samej procedury (metody genotypowania). Produkty PCR rozdziela się elektroforetycznie w tych samych warunkach na conajmniej trzech żelach. Określa się wewnątrz-żelowy i między-żelowy poziom identyczności.

- Wewnątrz- żelowy poziom identyczności – podobieństwo (odległość) profili elektroforetycznych produktów PCR, znajdujących się na tym samym żelu.
- Między-żelowy poziom identyczności – podobieństwo (odległość) profili elektroforetycznych produktów PCR, znajdujących się na różnych żelach.

## 5. Materiały i metody

### 5.1. Materiały

#### 5.1.1. Szczepy *Acinetobacter* sp.

Referencyjne szczepy *Acinetobacter* spp. (tab. 1) zostały zakupione z kolekcji DSMZ (*niem.* Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; *ang.* German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Niemcy) oraz z kolekcji ATCC (*ang.* American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA).

lp	Gatunek (genomogatunek – oznaczenie pierwotne)	Kolekcja (źródło)	Symbol stosowany w rozprawie
1	<i>Acinetobacter junii</i> (gs 5)	DSMZ 6964	
2	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (gs 8)	DSMZ 2403	
3	<i>Acinetobacter parvus</i>	DSMZ 16617	
4	<i>Acinetobacter radioresistens</i> (gs 12)	DSMZ 6976	
5	<i>Acinetobacter schindleri</i>	DSMZ16038	
6	<i>Acinetobacter soli</i>	DSMZ 22956	
7	<i>Acinetobacter tandoii</i>	DSMZ 14970	
8	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	DSMZ 14971	
9	<i>Acinetobacter towneri</i>	DSMZ 14962	
10	<i>Acinetobacter ursingii</i>	DSMZ16037	
11	<i>Acinetobacter baumannii</i> (gs 2)	DSMZ 30007	Ab2
12	<i>Acinetobacter baylyi</i>	DSMZ 14959	
13	<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	DSMZ 22901	
14	<i>Acinetobacter bouvetii</i>	DSMZ 14964	
15	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (gs 2)	DSMZ 30006	Ac1
16	<i>Acinetobacter pittii</i>	DSMZ 9306	Ap
17	<i>Acinetobacter guillouiae</i> (gs 11)	DSMZ 590	
18	<i>Acinetobacter gernerii</i>	DSMZ 14967	
19	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	DSMZ 22705	
20	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (gs 4)	DSMZ 6962	
21	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (gs 2)	DSMZ 1139	Ac2
22	<i>Acinetobacter venetianus</i>	DSMZ 23050	
23	<i>Acinetobacter baumannii</i> (gs 2)	ATCC 17978	Ab1

Tabela 1. Spis referencyjnych szczepów *Acinetobacter* sp.

Szczepy kliniczne i środowiskowe *Acinetobacter* sp. (tab. 2) pochodzą z Kolekcji Katedry Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej, szczepy wzorcowe pochodzą z kolekcji CIP (Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France), AZ (Acadisch Ziekenhuis, Leiden, Holandia) oraz SSI (Statens Serum Institut, Copenhagen, Dania).

Gatunek	Charakterystyka/ oznaczenie szczepu spotykane w literaturze	Pochodzenie	Piśmiennictwo	Ilość szczepów	Symbol stosowany w rozprawie
<i>A. baumannii</i> (gs 2)	szczoney kliniczne	Kolekcja Katedry	-	16	Ab:1 ... 16
<i>A. calcoaceticus</i> (gs 1)	szczoney środowiskowe	Mikrobiologii PG	-	5	Ac:1 ... 5
<i>A. pittii</i> (gs 3)	ATCC 19004 (= CIP 70.29)	CIP	Bouvet, Grimont 1986 [131] (jako genomogatunek 3), Nemec i in. 2011 [132] (jako <i>A. pittii</i> )	1	Ap: 1, 2
	RUH 1163	AZ		1	
<i>A. nosocomialis</i> (gs 13TU)	ATCC 17903 (= CIP 70.11)	CIP	Tjernberg, Ursing 1989 [133] (jako genomogatunek 13TU), Nemec i in. 2011 [132] (jako <i>A. nosocomialis</i> )	1	An
<i>Acinetobacter</i> „close to 13TU”	5804 (= LUH 1471)	SSI	Gerner- Smidt, Tjernberg 1995 [134]	1	C-to-13TU
<i>Acinetobacter</i> „between 1 and 3”	10095 (= LUH 1469)	SSI	Gerner- Smidt, Tjernberg 1995 [134]	1	1/3

Tabela 2. Kliniczne, środowiskowe i wzorcowe szczepy *Acinetobacter* spp. należące do kompleksu ACB.

### 5.1.2. Szczepy *Klebsiella oxytoca*

Szczepy wzorcowe *Klebsiella* (tab. 3) pochodzą ze zbiorów prof. dr hab. Stanisława Kałużewskiego z Polskiego Zakładu Higieny. Zostały one udostępnione przez dr Ide Ørskov w 1956r. Szczepy te izolowane były w latach 1950 – 1955 i przyjmowane są za szczepy reprezentujące gatunek *K. oxytoca*.

Lp.	Oznaczenie szczepu	Oznakowanie szczepu		Budowa antygenowa	Biotyp	Piśmiennictwo
		w zestawie wg Ørskov	wg pierwotnej publikacji			
1	K26	5884	Br. 15	1:26	2	Brooke M.S.: Acta path. Microbiol. Scand., 1951, 28, 313 i 328 [135]
2	K29	5725y	Br. 18	1:29	2	
3	K32	6837	Br. 22	1:32	8	
4	K41	6177	Br. 32	1:41	3	
5	K44	7730	Br. 35	1:44	8	
6	K65	SW 4	SW 4	1:65	4	Edmunds P.N.: J. Infect. Dis., 1954, 94, 65 [136]
7	K66	438/3a/	438/3a/	1:66	4	
8	K68	265/1/	265/1/	1:68	4	
9	K72	1205	1205	2”a”, e:72	8	Orskov I., Acta path. Microbiol. Scand., 1955, 36, 449. [137]

Tabela 3. Szczepy wzorcowe *K. oxytoca*

100 szczepów klinicznych *K. oxytoca* pochodzi z kolekcji prof. dr hab. Stanisława Kałużewskiego z Polskiego Zakładu Higieny w Warszawie. Szczepy izolowane były od pacjentów w okresie 1959-2007 hospitalizowanych różnych ośrodkach medycznych w Polsce.

100 szczepów klinicznych *K. oxytoca* wyizolowano od pacjentów w okresie 1999-2007 hospitalizowanych w Szpitalu Uniwersyteckim im. dr A. Jurasza i pacjentów Poradni Przykliniknych w Bydgoszczy.

### 5.1.3. Szczepy bakteryjne stosowane w analizie porównawczej

Do sprawdzenia specyficzności metody ddLMS PCR wykorzystano DNA izolowane od szczepów *K. pneumoniae* (20), *S. aureus* (5), *S. agalactiae* (5), *E. faecium* (5), *E. coli* (5), *E. faecalis* (5), *S. marcescens* (5) - w nawiasie podano liczbę szczepów. Szczepy pochodzą z Kolekcji Katedry Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej.

### 5.1.4. DNA faga $\lambda$

DNA faga  $\lambda$  o stężeniu 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  zostało zakupione z firmy Fermentas (Thermo Fisher Scientific, Litwa).

### 5.1.5. Pożywki i podłoża

- Podłoże stałe LA (0,5% (w/o) ekstrakt drożdżowy, 1% (w/o) pepton, 1% (w/o) NaCl)
- Pożywka płynna LB (0,5% (w/o) ekstrakt drożdżowy, 1% (w/o) pepton, 1% (w/o) NaCl, 1,5% agar)

### 5.1.6. Bufory

Nazwa buforu	Skład
TE	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA
Tris	10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Bufory stosowane do reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi	
R+ (Fermentas) 1 x stężony	10 mM Tris-HCl (pH 8.5) 10 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 0,1 mg/ml BSA
Tango (Fermentas) 1 x stężony	33 mM Tris-acetate (pH 7.9 at 37°C) 10 mM Mg-acetate 66 mM K-acetate 0.1 mg/ml BSA
EcoRI (Fermentas) 1x stężony	50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37°C), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl, 0.02% Triton X-100 0.1 mg/ml BSA.
B (Fermentas) 1x stężony	10 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37°C), 10 mM MgCl <sub>2</sub> 0.1 mg/ml BSA.
Bufory stosowane do reakcji ligacji	
Bufor dla ligazy DNA faga T4 (Fermentas) 10 x stężony	400 mM Tris-HCl (pH 7.8) 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM DTT, 5 mM ATP

Bufory do reakcji PCR	
<i>Shark</i> 10 x stężony	200 mM Tris – HCl 100 mM KCl 1% Triton X-100 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<i>Taq</i> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Fermentas) 10x stężony	750 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C) 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1% (v/v) Tween 20
Bufor do elektroforezy agarozowej	
TAE (pH 8.0) 1 x stężony	40mM Tris 20mM lodowatego kwasu octowego 1mMEDTA
Bufor do elektroforezy poliakrylamidowej	
TBE (pH 8.2) 1 x stężony	89mM Tris 89mM g kwas borowy 2mM EDTA
Bufor obciążający do nanoszenia próbek na żel	
I	0,25% błękit bromofenolowy 0,25% ksylen cyjanu FF 15% Ficoll (type 400, Pharmacia) w wodzie

Tabela 4. Skład buforów

### 5.1.7. Enzymy

Enzym		Stężenie	Optymalna temperatura inkubacji	Bufor
Enzym degradujący białka	proteinaza K (A & A Biotechnology)	20 mg/ml	37	TE
Enzym do ligacji DNA	Ligaza DNA bakteriofaga T4 (Fermentas)	2 U/μl	18-22	Bufor dla ligazy DNA faga T4
Enzym do PCR	Polimeraza DNA termostabilna <i>Pwo</i> (Delta2) (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk)	2 U/μl	72	<i>Shark</i>
	Polimeraza <i>Taq</i> (Fermentas)	5 U/μl	72	<i>Taq</i> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Enzym do trawienia restrykcyjnego	<i>AclI</i> ( <i>Psp1406I</i> ) (Fermentas) 5' AA/CGTT 3' 3' TTGC/AA 5'	10 U/μl	37	Tango
	<i>Alw26I</i> (Fermentas) 5'... GTCTC(N)1 / ...3' 3'... CAGAG(N)5/...5'	10 U/μl	37	Tango
	<i>ApaI</i> (Fermentas) 5' GGGCC/C 3' 3' C/CCGG 5'	10 U/μl	37	Tango
	<i>BalI</i> ( <i>MIsI</i> ) (Fermentas) 5' TGG/CCA 3' 3' ACC/GGT 5'	5 U/μl	37	Tango
	<i>BfaI</i> (Fermentas) 5' C/TAG 3' 3' GAT/C 5'	10 U/μl	37	Tango

Enzym do trawienia restrykcyjnego	<i>EcoRI</i> (Fermentas) 5'... G/AATTC ...3' 3'... CTAA/G ...5'	10 U/ $\mu$ l	37	EcoRI
	<i>HindIII</i> (Fermentas) 5'... A/AGCTT ...3' 3'... TTCGA/A ...5'	10 U/ $\mu$ l	37	R+
	<i>Maell (Tail)</i> (Fermentas) 5' ...ACGT/... 3' 3'... /TGCA ...5'	10 U/ $\mu$ l	65	R+
	<i>RsaI</i> (Fermentas) 5'... GT/AC ...3' 3'... CA/TG ...5'	10 U/ $\mu$ l	37	Tango
	<i>Tsp509I (TasI)</i> (Fermentas) 5'... /AATT ...3' 3'... TTAA/ ...5'	10 U/ $\mu$ l	65	B
	<i>XbaI</i> (Fermentas) 5' T/CTAGA 3' 3' AGATC/T 5'	10 U/ $\mu$ l	37	Tango
	<i>XhoI</i> (Fermentas) 5'... C/TCGAG ...3' 3'... GAGCT/C ...5'	10 U/ $\mu$ l	37	R

Tabela 5. Enzymy

### 5.1.6. Oligonukleotydy

Nazwa oligonukleotydu	Zastosowanie	Sekwencja oligonukleotydu (5' -> 3')	Stężenie wyjściowe [ $\mu$ M]
oligonukleotydy stosowane w metodzie <i>recA</i> /PCR			
rA1	starter FORWARD	CCTGAATCTTCTGGTAAAC	10
rA2	starter REVERSE	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	10
oligonukleotydy stosowane w metodzie 16S rDNA/PCR			
st16SF	starter FORWARD	TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGC	10
st16SR	starter REVERSE	TACCTGTTACGACTTCACCCA	10
oligonukleotydy stosowane w metodzie ITS PCR			
G1	starter FORWARD	GAAGTCGTAACAAGG	10
L1	starter REVERSE	CAAGGCATCCACCGT	10
oligonukleotydy stosowane do amplifikacji genu <i>pehX</i>			
stPehX1	starter FROWARD	GGACTACGCCGTCTATCGTCAAG	10
stPehX3	starter FORWARD	GATACGGAGTATGCCTTACGGTG	10
stPehX4	starter REVERSE	TAGCCTTTATCAAGCGGATACTGG	10
stPehX8	starter REVERSE	CACCGTAAAGGCATACTCCGTATC	10
oligonukleotydy stosowane w metodzie PCR MP			
aMPlig	oligonukleotyd ligowany adaptora	CTCACTCTACCAACGTCGAC	100
aEcoPOM	oligonukleotyd pomocniczy adaptora	AATTGTCGACGTTGG	100
aHindPOM		AGCTGTCGACGTTGG	100
stMPEco	starter	CTCACTCTACCAACGTCGACAATTC	100
stMPHind		CTCACTCTACCAACGTCGACAGCTT	100

oligonukleotydy stosowane w metodzie LM PCR/ <i>shifter</i>			
aLSlig	oligonukleotyd ligowany adaptora	CGAACTCGATAGCAGCTC	100
aNGCN	oligonukleotyd pomocniczy adaptora	NGCNGAGCGTCTATCG	100
stAGCT	starter	CGAACTCGATAGCAGCTCAGCT	10
stNGCA		CGAACTCGATAGCAGCTCNGCA	10
stNGCT		CGAACTCGATAGCAGCTCNGCT	10
stNGCG		CGAACTCGATAGCAGCTCNGCG	10
stNGCC		CGAACTCGATAGCAGCTCNGCC	10
oligonukleotydy stosowane w metodzie LM PCR <i>simple</i>			
aXhoLIG	oligonukleotyd ligowany adaptora	CTCACTCTACCAACGTCGAG	100
aXbaLIG		CTCACTCTACCAACGTCGAC	100
aXhoPOM	oligonukleotyd pomocniczy adaptora	TCGACTCGACGTTGG	100
aXbaPOM		CTAGGTCGACGTTGG	100
stXho	starter	CTCACTCTACCAACGTCGAGTCGAG	100
stXba		CTCACTCTACCAACGTCGACCTAGA	100
oligonukleotydy stosowane w układzie modelowym $\lambda$ -ddLMS PCR			
1F	starter FORWARD	GTTTAGTGCAATTTGATCCTTTTACTCCTCC	10
2F		CCACAGATTCAAGTGACGATG	10
1R	starter REVERSE	TCAGGTTACCAACTACTAAGGTTGTAGG	10
3R		CTGGGGAATGAGTTGCAATTATTGC	10
4R		CCATTGCGTGCATCGAGTAAGTC	10
adLIG8		oligonukleotyd ligowany adaptora typu	GCATGGTAGACGAAGCCGTGAGTAGCGACCGCAGACGT
aBfaPOM8	oligonukleotyd pomocniczy adaptora	TAACGCTGCGGTCGC	100
aMaeLIG8	oligonukleotyd ligowany adaptora	GCATGGTAGACGAAGCCGTGAGTAGCGACCGCAGACGT	100
stADP8	starter do adaptora	GGATGGTAGACGAAG	10
oligonukleotydy stosowane w metodzie <i>recA</i> -ddLMS PCR			
adMaeLIG8	oligonukleotyd ligowany do adaptora	GCATGGTAGACGAAGCCGTGAGTAGCGACCGCAGACGT	100
stADP8	starter	GGATGGTAGACGAAG	10
stRecAAc		GTTTACCAGAAGATTCAGG	10
oligonukleotydy stosowane w metodzie <i>pehX</i> -ddLMS PCR			
aLIG8	oligonukleotyd ligowany adaptora	GCATGGTAGACGAAGCCGTGAGTAGCGACCGCAGACGT	100
aAclPOM	oligonukleotyd pomocniczy adaptora	CGACGTCTGCGGTCGC	100
stADP8	starter	GGATGGTAGACGAAG	10
stPehX13		GCGCACCGTAAAGGCATACTCCG	10
oligonukleotydy stosowane w metodzie <i>rrn</i> -ddLMS PCR			
aLIG8	oligonukleotyd ligowany adaptora	GCATGGTAGACGAAGCCGTGAGTAGCGACCGCAGACGT	100
aHindPOM	oligonukleotyd pomocniczy adaptora	AGCTACGTCTGCGGTCGC	100
stADP8	starter	GGATGGTAGACGAAG	10
st16S		TGTTAAGCCTGCCGCCAGCG	10

Tabela 6. Sekwencje oligonukleotydów.

### 5.1.9. Markery wielkości DNA

symbol	Marker wielkości	Długości fragmentów [pz]
M1	M 100 – 1000 (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk)	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000
M2	GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas)	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000



M3	M 100 – 500 (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk)	100, 200, 300, 400, 500
M4	GeneRuler 1kb DNA ladder	250, 500, 7500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000
M5	plazmid pUC19 trawiony <i>MspI</i>	501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 64, 34
M6	IDEAL 700 - 9276 (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk)	700, 900, 1241, 1827, 2555, 3653, 5982, 9276

Tabela 7. Markery wielkości fragmentów DNA

### 5.1.10. Pozostałe roztwory i odczynniki

- Agaroz (PRONA Agarose Plus)
- Agaroz niskotopliwa (Bio-Rad)
- Akryloamidy – roztwór 30% (29g akryloamidów, 1g N,N'-metylenobisakryloamidów)
- ATP – 25 mM (Fermentas)
- Bromek etydyny (Sigma) – roztwór 5 mg/ml
- MgCl<sub>2</sub> (POCH S.A.) – roztwór 20 mM, 25 mM
- Nadsiarczan amonu (POCH S.A.) – roztwór 10%
- TEMED (N,N,N',N' – tetraetylenodiamina) (Sigma)
- Trifosforany deoksyrybonukleotydów – mieszanina dATP (Fermentas)

### 5.1.11. Materiały podstawowe

- Probówki Eppendorfa (1,5 ml i 0,5 ml)
- Cienkościenne probówki Eppendorfa do reakcji PCR (0,2 ml)
- Końcówki do pipet automatycznych
- Plastikowe płytki Pasteura
- Ezy jednorazowe
- Szklane probówki

### 6.1.12. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- Aparat do elektroforezy agarozowej (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk)
- Aparat do elektroforezy poliakryloamidowej Hoeffer SE 600 (Pharmacia Biotech)
- Autoklaw
- Cieplarka (Pozamet Poznań)
- NanoDrop100 ND-1000 (Thermo Scientific)
- pH-metr CP-401 ELMTRON
- Pipety automatyczne (Eppendorf)
- Termoblok (Eppendorf)
- Termocykler gradientowy (Eppendorf)
- Transluminator Spectraline Ultraviolet (312 nmUV)
- Waga elektroniczna AXIS AD300
- Wirówka Sigma 1-15
- Vortex WL – I
- VersaDoc Imaging System Model 1000 (BIO-RAD)
- Wytrząsarka 2002 (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk)
- Zasilacz Biometria Power Pack P25

### 5.1.13. Zestawy komercyjne

- Zestaw do izolacji genomowego DNA Genomic Mini (A & A Biotechnology)
- Zestaw do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych Clean-Up (A & A Biotechnology)
- Zestaw do izolacji DNA z żeli agarozowych Gel-out (A & A Biotechnology)

### 5.1.14. Stosowane programy komputerowe

- Quantity One version 4.3.1
- VectorNTI Advance 10
- Clone Manager version 4.01
- Adobe Photoshop Elements 4.0
- Word, Exel, Power Point (Microsoft Office 2011)

## 5.2. Metody

### 5.2.1. Izolacja genomowego DNA bakterii

Genomowe DNA bakterii izolowałam z wykorzystaniem zestawu DNA Genomic Mini (pkt. 5.1.13) wg instrukcji podanej przez producenta zestawu. Elucję DNA przeprowadziłam buforem Tris (pkt.5.1.6) ogrzanym do temperatury 75°C w objętości 150 µl. Stężenie DNA w pojedynczej próbie wynosiło od 10 do 100 ng/µl (pomiar wykonałam za pomocą spektrofotometru NanoDrop100 ND-1000, pkt.5.1.12).

### 5.2.2. Rozdział elektroforetyczny DNA w żelu agarozowym

5 - 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej DNA rozdzielałam elektroforetycznie w 1-2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (0,5 mg/ml), w buforze 1xTAE w czasie od 30 do 60 min przy napięciu ok. 7 V/cm długości żelu. Żel analizowałam w świetle UV przy zastosowaniu aparatu VersaDoc Imaging System version 1000 oraz programu Quantity One version 4.3.1.

### 5.2.3. Rozdział elektroforetyczny DNA w żelu poliakryloamidowym

5 µl mieszaniny produktów PCR rozdzielałam elektroforetycznie w 4, 6 lub 9% żelu poliakryloamidowym, w aparacie Hoeffer'a, w buforze 1xTBE, przez 2,5-3h przy napięciu ok. 12V/cm długości żelu. Po zakończeniu elektroforezy żel wybarwiałam w kąpeli wodnej zawierającej bromek etydyny (0,5 mg/l wody). Żel analizowałam w świetle UV, przy zastosowaniu aparatu VersaDoc Imaging System version 1000 oraz programu Quantity One version 4.3.1.

## 5.2.4. Oczyszczanie produktów PCR z mieszaniny reakcyjnej

Po reakcjach enzymatycznych (np. po reakcji PCR) DNA oczyszczałam z wykorzystaniem zestawu Clean-Up (pkt. 5.1.13) wg instrukcji podanej przez producenta zestawu. DNA po precypitacji zawieszałam w buforze TE (pkt.5.1.6) w objętości stanowiącej 80% początkowej objętości mieszaniny.

## 5.2.5. Oczyszczanie produktów PCR z żelu agarozowego

Fragmety DNA po rozdiale elektroforetycznym w 1,5% żelu z niskotopliwej agarozy oczyszczałam z wykorzystaniem zestawu Gel-Out (pkt. 5.1.13) wg instrukcji podanej przez producenta zestawu. DNA po precypitacji zawieszałam w 30 µl buforu TE (pkt.5.1.6).

## 5.2.6. Amplifikacja oparta na reakcji PCR

### Materiały:

- wyizolowane genomowe DNA bakterii, DNA faga λ – pkt. 5.1.1-4
- bufor *Shark* – pkt. 5.1.6
- polimeraza DNA *Pwo* – pkt. 5.1.7
- startery: 1F, 1R, 2F, 4R, 3R, rA1, rA2, st16SF, st16SR, stPehX1, stPehX3, stPehX4, stPehX8 – pkt. 5.1.8
- MgCl<sub>2</sub>, dNTPs – pkt. 5.1.10
- woda jałowa

W 0,2 ml próbówce przygotowałam mieszaninę reakcyjną zawierającą wszystkie składniki podane w tabeli 8. W zależności od celu molekularnego (sekwencji amplifikowanej) dodałam odpowiednią parę starterów oraz matrycowe DNA (tab. 9). Dla każdej reakcji PCR reakcję przygotowywałam kontrolę ujemną – mieszaninę reakcyjną zawierającą wszystkie składniki z wyjątkiem matrycowego DNA. Probówki umieszczałam w termocyklerze i prowadziłam reakcję PCR zgodnie z przedstawionym w tabeli 8 i 9 profilem temperaturowo – czasowym. Temperatura przyłączania starterów oraz czas elongacji zależy od celu molekularnego. Rozdział produktów PCR przeprowadzałam w 1 - 2% żelu agarozowym zgodnie z procedurą przedstawioną w pkt. 5.2.2.

Skład	Ilość na 1 próbę [µl]	Profil temperaturowo – czasowy		
		Temp. [°C]	Czas [s]	liczba cykli
woda jałowa	14	94	300	
bufor <i>Shark</i> 10 x stężony	2,5	94	30	25
MgCl <sub>2</sub> [20 mM]	2,5	Td <sup>3)</sup>	30	
dNTPs [25 mM]	2,5	72	t <sup>4)</sup>	
starter FORWARD [10 µM] <sup>1)</sup>	1,0	72	300	
starter REVERSE [10 µM] <sup>1)</sup>	1,0	4	∞	
Polimeraza DNA <i>Pwo</i> [2 U/µl]	0,3			
DNA <sup>2)</sup>	1,0			
objętość końcowa	25			

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo – czasowy w reakcji PCR; <sup>1),2),3),4)</sup> warunki dobierane w zależności od celu molekularnego (amplifikowanego fragmentu DNA) wg tab. 9.

Lp	Amplifikowany fragment DNA (długość)	<sup>1)</sup> startery	<sup>2)</sup> matrycowe DNA	<sup>3)</sup> temperatura przyłączenia starterów [°C]	<sup>4)</sup> czas elongacji [s]
1	Sekwencja analizowana (160 pz)	1F – 1R	DNA faga λ [10 ng/μl]	60	60
2	Sekwencja markerowa (777 pz)	2F – 1R		60	60
3	Sekwencja wewnętrzna (236 pz)	2F – 4R		60	30
4	Fragment sekwencji markerowej (265 pz)	2F – 3R		60	45
5	Fragment genu <i>recA</i> (425 pz)	rA1 – rA2	DNA <i>Acinetobacter</i> sp. [1 - 5 ng/μl]	55	30
6	Fragment genu 16S rDNA (1483 pz)	st16F – st16R		60	90
7	Fragment genu <i>pehX</i> (344 pz)	stPehX3 – stPehX4	DNA <i>K. oxytoca</i> [1 - 5 ng/μl] DNA <i>K. pneumoniae</i> [1 - 5 ng/μl]	60	30
8	Fragment genu <i>pehX</i> (193 pz)	stPehX1 – stPehX8		60	30

Tabela 9. Specyficzne elementy reakcji PCR, dobierane w zależności od celu molekularnego.

### 5.2.7. Trawienie restrykcyjne produktów PCR

#### Materiały:

- oczyszczony produkt PCR
- bufor do trawienia restrykcyjnego: Tango, R+, – pkt. 5.1.6
- enzymy restrykcyjne – *Maell*, *RsaI*, *BfaI*, *ApaI*, *BalI* – pkt. 5.2.7
- woda jałowa

W 1,5 ml próbownicy przygotowałam mieszaninę reakcyjną zawierającą wszystkie składniki podane w tabeli 10. Bufor dobrałam odpowiednio do enzymu restrykcyjnego (wg tab. 5). Probówkę umieściłam w termobloku, gdzie reakcję trawienia prowadzona była przez 60 min w temperaturze optymalnej dla danego enzymu restrykcyjnego (wg tab. 5). Rozdział produktów PCR przeprowadziłam w 2% żelu agarozowym zgodnie z procedurą przedstawioną w pkt. 5.2.2.

Skład	Ilość na 1 próbę [μl]	Warunki prowadzenia reakcji trawienia	
		Temp. [°C]	Czas [min]
bufor do trawienia <sup>1)</sup> 10 x stężony	2,5	T <sup>1)</sup>	60
<i>Maell</i> / <i>BfaI</i> / <i>RsaI</i> / <i>BalI</i> / <i>ApaI</i> <sup>2)</sup> [10 U/μl]	0,5	4	∞
woda	7		
oczyszczony produkt PCR	15		
objętość końcowa	25		

Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej i warunki prowadzenia reakcji trawienia oczyszczonego produktu PCR; <sup>1)</sup> wg tabeli 5, <sup>2)</sup> wybór enzymu zależy od celu badania.

### 5.2.8. Metoda *recA*-PCR/RFLP - *Tsp509I*

Typowanie metodą *recA*-PCR/RFLP z wykorzystaniem enzymu *Tsp509I* przeprowadziłam zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Krawczyk i in. [29].

#### Materiały:

- Produkt amplifikacji genu *recA* – tab. 11, pkt. 5.2.6
- Bufor B – pkt. 5.1.6
- endonukleaza restrykcyjna *Tsp509I* – pkt. 5.1.7
- olej mineralny – pkt. 5.1.10
- woda jałowa

W 1,5 ml próbki przygotowałam mieszaninę Master MIX zawierającą wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej z wyjątkiem produktów PCR (tab. 11). Mieszaninę Master MIX wymieszałam i rozporcjo wałam po 20 µl do 0,2 ml cienkościennych próbek PCR. Do każdej próbki dodałam odpowiednio 10 µl produktów PCR (produkt amplifikacji genu *recA*). Na powierzchnię mieszaniny naniosłam 30 µl oleju mineralnego. Mieszaninę inkubowałam w temperaturze 65°C przez 2 godziny. Rozdział produktów trawienia przeprowadziłam w 9% żelu poliakryloamidowym wg procedury przedstawionej w pkt. 5.2.3.

Skład	Ilość na 1 próbę [µl]	Warunki prowadzenia reakcji trawienia	
		Temp. [°C]	Czas [min]
bufor B 10 x stężony	3,0	65	120
<i>Tsp509I</i> [10 U/µl]	0,2	4	∞
woda	16,8		
produkt amplifikacji fragmentu genu <i>recA</i>	10		
objętość końcowa	30		

Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej i warunki prowadzenia reakcji trawienia w metodzie *recA*-PCR/RFLP -*Tsp509I*.

### 5.2.9. ITS PCR

Do typowania bakterii *K. oxytoca* wykorzystałam procedurę zaproponowaną przez Jansen i in. [63].

#### Materiały:

- wyizolowane genomowe DNA bakterii *K. oxytoca* – pkt. 5.1.4
- bufor *Shark* – pkt. 5.1.6
- polimeraza DNA *Pwo* – pkt. 5.1.7
- startery: G1, L1 – pkt. 5.1.8
- MgCl<sub>2</sub>, dNTPs – pkt. 5.1.10
- woda jałowa

W 1,5 ml próbki przygotowałam mieszaninę Master MIX zawierającą wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej z wyjątkiem genomowego DNA (tab. 12). Mieszaninę Master MIX wymieszałam i rozporcjo wałam po 24 µl do 0,2 ml cienkościennych próbek do reakcji PCR. Do każdej próbki dodałam odpowiednio 1 µl genomowego DNA. Probówki umieściłam w termocyklerze i przeprowadziłam reakcję PCR zgodnie z przedstawionym profilem temperaturowo - czasowym. Rozdział produktów PCR przeprowadziłam w 4% żelu poliakryloamidowym wg procedury przedstawionej w pkt. 5.2.3.

Skład	Ilość na 1 próbę [μl]	Profil temperaturowo – czasowy		
		Temp. [°C]	Czas [s]	liczba cykli
woda jałowa	14	94	300	
bufor <i>Shark</i> 10 x stężony	2,5	94	30	25
MgCl <sub>2</sub> [20 mM]	2,5	55	30	
dNTPs [25 mM]	2,5	72	60	
starter G1 [10 μM]	1,0	72	300	
starter L1 [10 μM]	1,0	4	∞	
Polimeraza DNA <i>Pwo</i> [2 U/μl]	0,3			
genomowe DNA [1 – 10 ng/μl]	1,0			
objętość końcowa	25			

Tabela 12. Skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo – czasowy w reakcji PCR w metodzie ITS PCR.

## 5.2.10. PCR MP

Do genotypowania bakterii wykorzystywałam zoptymalizowaną i zwalidowaną procedurę PCR MP [119]. Do typowania *Acinetobacter* spp. wybrałam enzym *EcoRI*, natomiast do typowania *K. oxytoca* enzym *HindIII*.

### Materiały

- Wyzolowane genomowe DNA [10 - 70 ng/μl] – pkt. 5.1.1-4
- Bufor do trawienia restrykcyjnego *EcoRI*, R+, O; bufor do ligacji; bufor *Shark* – pkt. 5.1.6
- Endonukleazy restrykcyjne *EcoRI*, *HindIII*, *BglII*; ligaza DNA faga T4, polimeraza DNA *Pwo* – pkt. 5.1.7
- Oligonukleotydy: aMPlig, aEcoPOM, aHindPOM, stMPEco, stMPHind – pkt. 5.1.8
- MgCl<sub>2</sub> [20 mM], dNTPs – pkt. 5.1.10

### 5.2.10.1. Przygotowanie adaptora

W celu otrzymania gotowego do reakcji ligacji adaptora, dwa oligonukleotydy: pomocniczy i ligowany (wg. tab. 13) o wyjściowym stężeniu 100 pmol/μl rozcieńczyłam dziesięciokrotnie w wodzie i mieszałam w stosunku objętościowym 1:1 w 1,5 ml próbówce. Mieszaninę oligonukleotydów umieściłam w termobloku i inkubowałam przez 2 min. w temperaturze 70°C, a następnie chłodziłam w temperaturze pokojowej przez 20 min. Do dalszych analiz adaptor był przechowywany w temperaturze -20°C.

Adaptor	Oligonukleotyd ligowany	Oligonukleotyd pomocniczy
adEcoRI <sup>1)</sup>	aEcoPOM	aMPlig
adHindIII <sup>2)</sup>	aHindPOM	aMPlig

Tabela 13. Nazwy oligonukleotydów tworzących adaptor w kolejnych układach diagnostycznych; <sup>1)</sup> układ dla *A. baumannii*, <sup>2)</sup> układ dla *K. oxytoca*, <sup>3)</sup> układ dla *Acinetobacter* spp.

### 5.2.10.2. Reakcja trawienia restrykcyjnego

W 1,5 ml próbówce przygotowałam mieszaninę Master MIX zawierającą wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej z wyjątkiem genomowego DNA (tab. 14). Wymieszaną mieszaninę Master MIX rozporcjowałam po 19 μl do 0,5 ml próbek. Do każdej próbki dodałam odpowiednio 6 μl genomowego DNA. Reakcję trawienia prowadziłam w termobloku w temperaturze 37°C przez 45 min. Próbkę chłodziłam w temperaturze 10°C.

Skład	Ilość na 1 próbę [μl]
bufor EcoRI <sup>1)</sup> / R+ <sup>2)</sup> / O <sup>3)</sup> 10 x stężony	2,5
EcoRI <sup>1)</sup> / HindIII <sup>2)</sup> [10 U/μl]	0,5
woda	14
genomowe DNA	8
objętość końcowa	25

Tabela 14. Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji trawienia restrykcyjnego w metodzie PCR MP; <sup>1)</sup> układ dla *A. baumannii*, <sup>2)</sup> układ dla *K. oxytoca*.

### 5.2.10.3. Reakcja ligacji adaptora

W 1,5 ml próbownicy przygotowałam mieszaninę Master MIX zawierającą wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej (tab. 15). Mieszaninę Master MIX wymieszałam i rozporcjowałam po 5 μl do próbek zawierających produkty trawienia restrykcyjnego. Probówki umieściłam w termobloku i prowadziłam reakcję ligacji przez 45 min. w temperaturze 18-22°C. Następnie przeprowadziłam inaktywację termiczną ligazy DNA inkubując próbki w temperaturze 70°C przez 10 min. Probki chłodziłam w temperaturze 10°C.

Skład	Ilość na 1 próbę [μl]
bufor do reakcji ligacji 10 x stężony	2,5
Ligaza T4 [2 U/μl]	0,2
adaptor adEcoRI <sup>1)</sup> / adHindIII <sup>2)</sup> [20 μM]	1,5
woda	0,8
objętość końcowa	5

Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji ligacji w metodzie PCR MP; <sup>1)</sup> układ dla *A. baumannii*, <sup>2)</sup> układ dla *K. oxytoca*.

### 5.2.10.4. Reakcja PCR

W 1,5 ml próbownicy przygotowałam mieszaninę Master MIX zawierającą wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej z wyjątkiem mieszaniny ligacyjnej (tab. 16). Mieszaninę Master MIX wymieszałam i rozporcjowałam po 24 μl do 0,2 ml cienkościennych próbek do reakcji PCR. Do każdej próbki dodałam odpowiednio 1 μl mieszaniny ligacyjnej z poprzedniego etapu. Probówki umieściłam w termocyklerze i prowadziłam reakcję PCR zgodnie z przedstawionym w tabeli 14 profilem temperaturowo - czasowym. Rozdział produktów PCR przeprowadziłam w 6% żelu poliakrylamidowym wg procedury przedstawionej w pkt. 5.2.3.

Skład	Ilość na 1 próbę [μl]	Profil temperaturowo – czasowy		
		Temp. [°C]	Czas [s]	liczba cykli
woda jałowa	15,95	72	120	1
bufor Shark 10 x stężony	2,5	81 <sup>1),3)</sup> / 86 <sup>2)</sup>	30	1
MgCl <sub>2</sub> [20 mM]	2,5	81 <sup>1),3)</sup> / 86 <sup>2)</sup>	30	23
dNTPs [25 mM]	2,5	72	90	
starter stMPEco <sup>1)</sup> / stMPHind <sup>2)</sup> [100 μM]	0,25	72	300	1
Polimeraza DNA Pwo [2 U/μl]	0,3	4	∞	1
DNA	1,0			
objętość końcowa	25			

Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo – czasowy w reakcji PCR w metodzie PCR MP; <sup>1)</sup> układ dla *A. baumannii*, <sup>2)</sup> układ dla *K. oxytoca*.

### 5.2.11. Metoda LM PCR/*Shifter*

Do genotypowania *bakterii* wykorzystywałam zoptymalizowaną i zwalidowaną procedurę LM PCR/*Shifter* [98].

#### Materiały

- Wyizolowane genomowe DNA bakterii [10 - 70 ng/ $\mu$ l] – pkt. 5.1.1-3
- Bufor Tango, bufor do reakcji ligacji, bufor *Taq* ( $(NH_4)_2SO_4$  (Fermentas) – pkt. 5.1.6
- Endonukleaza restrykcyjna *A/w26I*; ligaza DNA faga T4; polimeraza DNA *Taq* (Fermentas) – pkt. 5.1.7
- Oligonukleotydy: aLSlig, aNGCN, stAGCT, stNGCA, stNGCC, stNGCG, stNGCT – pkt. 5.1.8
- $MgCl_2$  [20 mM], dNTPs – pkt. 5.1.10
- Woda jałowa

#### 5.2.11.1. Przygotowanie adaptora do reakcji ligacji

W celu otrzymania gotowego do reakcji ligacji adaptora (adNGCN), dwa oligonukleotydy: pomocniczy aLSlig i ligowany aNGCN (wg. tab. 6) o wyjściowym stężeniu 100 pmol/ $\mu$ l rozcieńczyłam dziesięciokrotnie w wodzie i mieszałam w stosunku objętościowym 1:1 w 1,5 ml probówce. Mieszaninę oligonukleotydów umieściłam w termobloku i inkubowałam przez 2 min. w temperaturze 70°C, a następnie chłodziłam w temperaturze pokojowej przez 20 min. Do dalszych analiz adaptor był przechowywany w temperaturze -20°C.

#### 5.2.11.2. Reakcja trawienia restrykcyjnego

W 1,5 ml probówce przygotowałam mieszaninę Master MIX zawierającą wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej z wyjątkiem genomowego DNA (tab. 17). Wymieszaną mieszaninę Master MIX rozporcjowałam po 19  $\mu$ l do 0,5 ml probówek. Do każdej probówki dodałam odpowiednio po 6  $\mu$ l genomowego DNA. Reakcję trawienia prowadziłam w termobloku w temperaturze 37°C przez 60 min. Następnie przeprowadziłam inaktywację termiczną endonukleazy restrykcyjnej inkubując próbki w temperaturze 70°C przez 10 minut. Próbki chłodziłam w temperaturze 10°C.

Skład	Ilość na 1 próbę [ $\mu$ l]
bufor Tango 10 x stężony	2,5
<i>A/w26I</i> [10 U/ $\mu$ l]	0,5
woda	14
genomowe DNA	8
objętość końcowa	25

Tabela 17. Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji trawienia restrykcyjnego w metodzie LM PCR/*Shifter*.

#### 5.2.11.3. Reakcja ligacji adaptora

W 1,5 ml probówce przygotowałam mieszaninę Master MIX zawierającą wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej (tab. 18). Mieszaninę Master MIX wymieszałam i rozporcjowałam po 5  $\mu$ l do probówek zawierających produkty trawienia restrykcyjnego. Probówki umieściłam w termobloku i prowadziłam reakcję ligacji przez 45 min.



w temperaturze 18-22°C. Następnie przeprowadziłam inaktywację termiczną ligazy DNA inkubując próbki w temperaturze 70°C przez 10 min. Próbkę chłodziłam w temperaturze 10°C.

Skład	Ilość na 1 próbę [μl]
bufor do reakcji ligacji 10 x stężony	2,5
Ligaza T4 [2 U/μl]	0,2
adaptor adNGCN [20 μM]	1,5
woda	0,8
objętość końcowa	5

Tabela 18. Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji ligacji w metodzie LM PCR/Shifter.

#### 5.2.11.4. Reakcja PCR

W 1,5 ml próbki przygotowałam mieszaninę Master MIX zawierającą wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej z wyjątkiem mieszaniny ligacyjnej (tab. 19). Mieszaninę Master MIX wymieszałam i rozporcowałam po 24 μl do 0,2 ml cienkościennych probówek do reakcji PCR. Do każdej probówki dodałam odpowiednio 1 μl mieszaniny ligacyjnej z poprzedniego etapu. Probówki umieściłam w termocyklerze i prowadziłam reakcję PCR zgodnie z przedstawionym w tabeli 19 profilem temperaturowo - czasowym. Rozdział produktów PCR przeprowadziłam w 6% żelu poliakryloamidowym wg procedury przedstawionej w pkt. 5.2.3.

Skład	Ilość na 1 próbę [μl]	Profil temperaturowo – czasowy		
		Temp. [°C]	Czas [s]	liczba cykli
woda jałowa	12,2	94	60	1
bufor <i>Taq</i> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 x stężony	2,5	72	60	1
MgCl <sub>2</sub> [20 mM]	2,5	94	30	23
dNTPs [25 mM]	2,5	72	90	
starter stAGCT <sup>1)</sup> / stNGCN <sup>2)</sup> [10 μM]	4,0	72	300	1
Polimeraza DNA <i>Taq</i> [5 U/μl]	0,3	4	∞	1
DNA	1,0			
objętość końcowa	25			

Tabela 19. Skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo – czasowy w reakcji PCR w metodzie LM PCR/Shifter; <sup>1)</sup> układ AGCT <sup>2)</sup> układ NGCN; stNGCN to równomolowa mieszanina starterów stNGCC, stNGCA, stNGCT, stNGCG.

#### 5.2.12. LM PCR simple

##### Materiały

- Wyzolowane genomowe DNA [10 - 70 ng/μl] – pkt. 5.1.1-3
- Bufor do trawienia restrykcyjnego Tango, R+; bufor do ligacji; bufor *Shark* – pkt. 5.1.6
- Endonukleazy restrykcyjne *Xba*I, *Xho*I; ligaza DNA faga T4; polimeraza DNA *Pwo* – pkt. 5.1.7
- Oligonukleotydy: aXhoLIG, aXhoPOM, aXbaLIG, aXbaPOM, stXho, stXbaI – pkt. 5.1.8
- MgCl<sub>2</sub> [20 mM], dNTPs – pkt. 5.1.10
- Woda jałowa

##### 5.2.12.1. Przygotowanie adaptora

W celu otrzymania gotowego do reakcji ligacji adaptora, dwa oligonukleotydy: pomocniczy i ligowany (wg. tab. 20) o wyjściowym stężeniu 100 pmol/μl rozcieńczyłam dziesięciokrotnie w wodzie i mieszałam w stosunku

objętościowym 1:1 w 1,5 ml próbówce. Mieszaninę oligonukleotydów umieściłam w termobloku i inkubowałam przez 2 min. w temperaturze 70°C, a następnie chłodziłam w temperaturze pokojowej przez 20 min. Do dalszych analiz adaptor był przechowywany w temperaturze -20°C.

Adaptor	Oligonukleotyd ligowany	Oligonukleotyd pomocniczy
adXhoI <sup>1)</sup>	aXhoPOM	aXhoLIG
adXbaI <sup>2)</sup>	aXbaPOM	aXbaLIG

Tabela 20. Nazwy oligonukleotydów tworzących adaptor w kolejnych układach diagnostycznych w metodzie LM PCR *simple*; <sup>1)</sup> układ dla *Acinetobacter* spp. <sup>2)</sup> układ dla *K. oxytoca*.

### 5.2.12.2. Reakcja trawienia restrykcyjnego

W 1,5 ml próbówce przygotowałam mieszaninę Master MIX zawierającą wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej z wyjątkiem genomowego DNA (tab. 21). Mieszaninę Master MIX rozporcjowałam po 19 µl do 0,5 ml próbek. Do każdej próbki dodałam odpowiednio 6 µl genomowego DNA. Reakcję trawienia prowadziłam w termobloku w temperaturze 37°C przez 45 min. Próbkę chłodziłam w temperaturze 10°C.

Skład	Ilość na 1 próbę [µl]
bufor EcoRI <sup>1)</sup> / R+ <sup>2)</sup> 10 x stężony	2,5
<i>XhoI</i> <sup>1)</sup> / <i>XbaI</i> <sup>2)</sup> [10 U/µl]	0,5
woda	14
genomowe DNA	8
objętość końcowa	25

Tabela 21. Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji trawienia restrykcyjnego w metodzie LM PCR *simple*; <sup>1)</sup> układ dla *Acinetobacter* spp. <sup>2)</sup> układ dla *K. oxytoca*.

### 5.2.12.3. Reakcja ligacji adaptorów

W 1,5 ml próbówce przygotowałam mieszaninę Master MIX zawierającą wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej (tab. 22). Mieszaninę Master MIX wymieszałam i rozporcjowałam po 5 µl do próbek zawierających produkty trawienia restrykcyjnego. Probówki umieściłam w termobloku i prowadziłam reakcję ligacji przez 45 min. w temperaturze 18-22°C. Następnie przeprowadziłam inaktywację termiczną ligazy DNA inkubując próbki w temperaturze 70°C przez 10 min. Próbkę chłodziłam w temperaturze 10°C.

Skład	Ilość na 1 próbę [µl]
bufor do reakcji ligacji 10 x stężony	2,5
Ligaza T4 [2 U/µl]	0,2
adaptor adXhoI <sup>1)</sup> / adXbaI <sup>2)</sup> [20 µM]	1,5
woda	0,8
objętość końcowa	5

Tabela 22. Skład mieszaniny reakcyjnej i warunki prowadzenia w reakcji ligacji w metodzie LM PCR *simple*; <sup>1)</sup> układ dla *Acinetobacter* spp. <sup>2)</sup> układ dla *K. oxytoca*.

### 5.2.12.4. Reakcja PCR

W 1,5 ml próbówce przygotowałam mieszaninę Master MIX zawierającą wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej z wyjątkiem mieszaniny ligacyjnej (tab. 23 – dla reakcji PCR w metodzie LM PCR *simple*, tab. 24 – dla reakcji

PCR w metodzie LM PCR *simple* z dodatkową amplifikacją sekwencji markerowej). Mieszaninę Master MIX wymieszałam i rozporcowałam po 24 µl do 0,2 ml cienkościennych probówek do reakcji PCR. Do każdej probówki dodałam odpowiednio 1 µl mieszaniny ligacyjnej z poprzedniego etapu. Probówki umieściłam w termocyklerze i prowadziłam reakcję PCR zgodnie z przedstawionym w tabeli 14 profilem temperaturowo - czasowym. Rozdział produktów PCR przeprowadziłam w 6% żelu poliakryloamidowym wg procedury przedstawionej w pkt. 5.2.3.

Skład	Ilość na 1 próbę [µl]	Profil temperaturowo – czasowy		
		Temp. [°C]	Czas [s]	liczba cykli
woda jałowa	15,95	72	120	1
bufor <i>Shark</i> 10 x stężony	2,5	94	30	1
MgCl <sub>2</sub> [20 mM]	2,5	94	30	23
dNTPs [25 mM]	2,5	72	90	
starter stXho <sup>1)</sup> / stXbaI <sup>2)</sup> [100 µM]	0,25	72	300	1
Polimeraza DNA <i>Pwo</i> [2 U/µl]	0,3	4	∞	1
mieszanina ligacyjna	1,0			
objętość końcowa	25			

Tabela 23. Skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo – czasowy w reakcji PCR w metodzie LM PCR *simple*; <sup>1)</sup> układ dla *Acinetobacter* spp. <sup>2)</sup> układ dla *K. oxytoca*.

Skład	Ilość na 1 próbę [µl]	Profil temperaturowo – czasowy		
		Temp. [°C]	Czas [s]	liczba cykli
woda jałowa	13,95	72	120	1
bufor <i>Shark</i> 10 x stężony	2,5	94	30	1
MgCl <sub>2</sub> [20 mM]	2,5	94	30	23
dNTPs [25 mM]	2,5	72	90	
starter stXbaI [100 µM]	0,25	72	300	1
stPehX1 [10 µM]	1,0	4	∞	1
stPehX8 [10 µM]	1,0			
Polimeraza DNA <i>Pwo</i> [2 U/µl]	0,3			
DNA	1,0			
objętość końcowa	25			

Tabela 24. Skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo – czasowy w reakcji PCR w metodzie LM PCR *simple* z dodatkową amplifikacją fragmentu genu *pehX* (układ *pehX*-LM PCR *simple* dla *K. oxytoca*).

### 5.2.13. ddLMS PCR

#### Materiały

- Wyizolowane genomowe DNA bakterii [10 - 70 ng/µl], DNA faga λ [100 ng/µl] – pkt. 5.1.1-4
- Bufor do trawienia restrykcyjnego Tango, R+; bufor do ligacji, bufor *Shark* – pkt. 5.1.6
- Enzymy restrykcyjne: *Maell*, *Bfal*, *AclI*, *RsaI*, *BalI*, *HindIII*, *ApaI*; ligaza DNA faga T4; polimeraza DNA *Pwo* – pkt. 5.1.7
- Oligonukleotydy: aMaeLIG, aLIG8, aAclPOM, aBfaPOM, AHindPOM, stADP8, stRecAAc, stPehX13, st16S, 1F, 2F, 1R, 2R, 4R – pkt. 5.1.8
- MgCl<sub>2</sub> [20 mM], dNTPs – pkt. 5.1.10
- Woda jałowa

### 5.2.13.1. Przygotowanie adaptora

W celu otrzymania gotowego do reakcji ligacji adaptora typu 5' (układ 5' ddLMS PCR), dwa oligonukleotydy: pomocniczy i ligowany (wg. tab. 25) o wyjściowym stężeniu 100 pmol/μl rozcieńczyłam dziesięciokrotnie w wodzie i mieszałam w stosunku objętościowym 1:1 w 1,5 ml próbówce. Mieszaninę oligonukleotydów umieściłam w termobloku i inkubowałam przez 2 min. w temperaturze 70°C, a następnie chłodziłam w temperaturze pokojowej przez 20 min. W celu otrzymania adaptora typu 3' (układ 3' ddLMS PCR) oligonukleotyd MaeLIG8 o wyjściowym stężeniu 100 pmol/μl rozcieńczyłam dziesięciokrotnie w wodzie. Do dalszych analiz adaptory były przechowywane w temperaturze -20°C.

Adaptor	Oligonukleotyd ligowany	Oligonukleotyd pomocniczy
adBfa <sup>1), 3)</sup>	aLIG8	aBfaPOM
adMae <sup>2)</sup>	MaeLIG8	
adAcl <sup>4)</sup>	aLIG8	aAcIPOM
adHind <sup>5)</sup>	aLIG8	aHindPOM

Tabela 25. Nazwy oligonukleotydów tworzących adaptor w kolejnych układach diagnostycznych w metodzie ddLMS PCR; <sup>1)</sup> układ 5' λ-ddLMS PCR, <sup>2)</sup> układ 3'λ-ddLMS PCR, <sup>3)</sup> układ *recA*-ddLMS PCR do typowania *Acinetobacter* sp., <sup>4)</sup> układ *pehX*-ddLMS PCR dla *K. oxytoca*, <sup>5)</sup> układ *rrn*-ddLMS PCR dla *A. baumannii*.

### 5.2.13.2. Reakcja trawienia restrykcyjnego

W 1,5 ml próbówce przygotowałam mieszaninę Master MIX zawierającą wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej z wyjątkiem genomowego DNA (tab. 26). Wymieszaną mieszaninę Master MIX rozporcjowałam po 18,5 μl do 0,5 ml próbek. Do każdej próbki dodałam odpowiednio 6 μl genomowego DNA. Reakcję trawienia prowadziłam w termobloku w temperaturze optymalnej dla danego enzymu (tab. 6) przez 45 min. Próbki chłodziłam w temperaturze 10°C.

Skład	Ilość na 1 próbę [μl]
bufor R+ <sup>1), 3), 5)</sup> / Tango <sup>2), 4)</sup> 10 x stężony	2,5
<i>MaeI</i> <sup>1), 3)</sup> / <i>BfaI</i> <sup>3)</sup> / <i>AclI</i> <sup>4)</sup> / <i>HindIII</i> <sup>5)</sup> [10 U/μl]	0,5
woda	14
DNA	6
objętość końcowa	24,5

Tabela 26. Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji trawienia restrykcyjnego w metodzie ddLMS PCR; <sup>1)</sup> układ 5' λ-ddLMS PCR, <sup>2)</sup> układ 3'λ-ddLMS PCR, <sup>3)</sup> układ *recA*-ddLMS PCR do typowania *Acinetobacter* sp., <sup>4)</sup> układ *pehX*-ddLMS PCR dla *K. oxytoca*, <sup>5)</sup> układ *rrn*-ddLMS PCR dla *A. baumannii*.

Następnie do każdej próbki dodałam po 0,5 μl drugiego enzymu restrykcyjnego (tab. 27) i ponownie umieściłam w termobloku, prowadząc reakcję trawienia w w temperaturze 37°C przez kolejne 45 min. Próbki chłodziłam w temperaturze 10°C.

Skład	Ilość na 1 próbę [μl]
mieszanina produktów trawienia	24,5
<i>RsaI</i> <sup>1), 2), 3)</sup> / <i>BalI</i> <sup>4)</sup> / <i>ApaI</i> <sup>5)</sup> [10 U/μl]	0,5
objętość końcowa	25

Tabela 27. Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji trawienia restrykcyjnego w metodzie ddLMS PCR; <sup>1)</sup> układ 5' λ-ddLMS PCR, <sup>2)</sup> układ 3'λ-ddLMS PCR, <sup>3)</sup> układ *recA*-ddLMS PCR do typowania *Acinetobacter* sp., <sup>4)</sup> układ *pehX*-ddLMS PCR dla *K. oxytoca*, <sup>5)</sup> układ *rrn*-ddLMS PCR dla *A. baumannii*.

### 5.2.13.3. Reakcja ligacji adaptora

W 1,5 ml próbki przygotowałam mieszaninę Master MIX zawierającą wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej (tab. 28). Mieszaninę Master MIX wymieszałam i rozporcowałam po 5 µl do próbek zawierających produkty trawienia restrykcyjnego. Probówki umieściłam w termobloku i prowadziłam reakcję ligacji przez 45 min. w temperaturze 18-22°C. Następnie przeprowadziłam inaktywację termiczną ligazy DNA inkubując próbki w temperaturze 70°C przez 10 min. Probki chłodziłam w temperaturze 10°C.

Skład	Ilość na 1 próbę [µl]
bufor do reakcji ligacji 10 x stężony	2,5
Ligaza T4 [2 U/µl]	0,2
adaptor adMae <sup>1), 3)</sup> / adBfal <sup>2)</sup> / adAcl <sup>2)</sup> / aHindIII <sup>5)</sup> [20 µM]	1,5
woda	0,8
objętość końcowa	5

Tabela 28. Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji ligacji w metodzie ddLMS PCR; <sup>1)</sup> układ 5' λ-ddLMS PCR, <sup>2)</sup> układ 3'λ-ddLMS PCR, <sup>3)</sup> układ *recA*-ddLMS PCR do typowania *Acinetobacter* sp., <sup>4)</sup> układ *pehX*-ddLMS PCR dla *K. oxytoca*, <sup>5)</sup> układ *rrn*-ddLMS PCR dla *A. baumannii*.

### 5.2.13.4. Reakcja PCR

W 1,5 ml próbki przygotowałam mieszaninę Master MIX zawierającą wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej z wyjątkiem mieszaniny ligacyjnej (tab. 29 – próba specyficzna, z udziałem startera uniwersalnego i specyficznego, tab. 30 – próba niespecyficzna z udziałem startera specyficznego).

Skład	Ilość na 1 próbę [µl]	Profil temperaturowo – czasowy		
		Temp. [°C]	Czas [s]	liczba cykli
woda jałowa	13,7	72	120	1
bufor <i>Shark</i> 10 x stężony	2,5	94	30	1
MgCl <sub>2</sub> [20 mM]	2,0	94	30	25
dNTPs [25 mM]	2,5	63 <sup>1), 2)</sup> / 60 <sup>3), 4), 5)</sup>	30	
starter stADP8 [10 µM]	1,0	72	60 <sup>1), 2)</sup> / 120 <sup>3), 4), 5)</sup>	1
starter 3R <sup>1), 2)</sup> / stRecAAc <sup>3)</sup> / stpehX13 <sup>4)</sup> / st16S <sup>5)</sup> [10 µM]	2,0	72	300	
Polimeraza DNA <i>Pwo</i> [2 U/µl]	0,3	4	∞	1
DNA	1,0			
objętość końcowa	25			

Tabela 29. Skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo – czasowy w reakcji PCR w metodzie ddLMS PCR dla próby specyficznej; <sup>1)</sup> układ 5' λ-ddLMS PCR, <sup>2)</sup> układ 3'λ-ddLMS PCR, <sup>3)</sup> układ *recA*-ddLMS PCR do typowania *Acinetobacter* sp., <sup>4)</sup> układ *pehX*-ddLMS PCR dla *K. oxytoca*.

Skład	Ilość na 1 próbę [µl]	Profil temperaturowo – czasowy		
		Temp. [°C]	Czas [s]	liczba cykli
woda jałowa	15,7	72	120	1
bufor <i>Shark</i> 10 x stężony	2,5	94	30	1
MgCl <sub>2</sub> [20 mM]	2,0	94	30	25
dNTPs [25 mM]	2,5	63 <sup>1), 2)</sup> / 60 <sup>3), 4), 5)</sup>	30	
starter stADP8 [10 µM]	1,0	72	60 <sup>1), 2)</sup> / 120 <sup>3), 4), 5)</sup>	1
Polimeraza DNA <i>Pwo</i> [2 U/µl]	0,3	72	300	
DNA	1,0	4	∞	1
objętość końcowa	25			

Tabela 30. Skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo – czasowy w reakcji PCR w metodzie ddLMS PCR dla próby niespecyficznej; <sup>1)</sup> układ 5' λ-ddLMS PCR, <sup>2)</sup> układ 3'λ-ddLMS PCR, <sup>3)</sup> układ *recA*-ddLMS PCR do typowania *Acinetobacter* sp., <sup>4)</sup> układ *pehX*-ddLMS PCR dla *K. oxytoca*, <sup>5)</sup> układ *rrn*-ddLMS PCR dla *A. baumannii*.

Mieszaninę Master MIX wymieszałam i rozporcjo wałam po 24  $\mu$ l do 0,2 ml cienkościennych probówek do reakcji PCR. Do kaźdej probówki dodałam odpowiednio 1  $\mu$ l mieszaniny ligacyjnej z poprzedniego etapu. Probówki umieściłam w termocyklerze i prowadziłam reakcję PCR zgodnie z przedstawionym w tabeli 28 (lub tab. 29) profilem temperaturowo - czasowym. Rozdział produktów PCR przeprowadziłam w 6% żelu poliakryloamidowym wg procedury przedstawionej w pkt. 5.2.3.

#### 5.2.14. Analiza porównawcza profili elektroforetycznych

Porównanie profili elektroforetycznych uzyskanych metodami *fingerprinting* oraz ocenę długości produktu PCR na podstawie położenia prążka względem markera wielkości DNA przeprowadziłam z wykorzystaniem programu Quantity One 4.3.1 (BioRad) wykorzystując współczynnik podobieństwa Dice'a oraz metodę klasteryzacji UPGMA. Stopień podobieństwa genetycznego prób (profilu) przedstawiłam w postaci dendrogramu.

Dla potrzeb analizy podobieństwa genetycznego (identyfikacji szczepów o tym samym genotypie) wyznaczyłam poziom identyczności (*Pi*) równy **0.95** (95%). Poziom identyczność jest to stopień podobieństwa jaki wykazują szczepy, które wg danych epidemiologicznych są klonalnie zależne (np. szczepy izolowane od jednego pacjenta, wykazujące te same cechy fenotypowe). Jeśli niedostępne są dane epidemiologiczne, *Pi* można wyznaczyć poprzez porównanie wyników wielokrotnej analizy dla tego samego szczepu. Niektóre metody, jak PCR MP, są wrażliwe na niewielkie zmiany warunków prowadzenia analizy (np. wahania temperatury denaturacji w cyklach reakcji PCR). *Pi* wyznacza ilość różnic pomiędzy dwoma profilami elektroforetycznymi, przy których uznaje się je za identyczne (ten sam genotyp). Im więcej produktów PCR znajduje się w profilu elektroforetycznym tym więcej różnic pomiędzy profilami jest dopuszczalne. Poziom identyczności nie powinien spadać poniżej 90%. Ze względu na dużą liczbę analizowanych szczepów i brak możliwości wykonania rozdziału elektroforetycznego produktów PCR dla wszystkich szczepów jednocześnie na jednym żelu, na potrzeby analizy porównawczej oszacowałam wewnątrzżelowy i międzyżelowy poziom identyczności, który wyniósł odpowiednio **0.95** i **0.9**.

#### 5.2.15. Analiza sekwencji DNA

Analizę podobieństwa sekwencji DNA oraz analizę specyficzności starterów przeprowadziłam z wykorzystaniem programu VNTI (Invitrogene) oraz programu BLAST (*ang.* Basic Local Alignment Search Tool). Analizy restrykcyjne genomowego DNA oraz fragmentów DNA przeprowadziłam z wykorzystaniem programu Clone.

## 6. Wyniki i wnioski

Odkrycia biologii molekularnej wpłynęły znacząco na rozwój diagnostyki molekularnej, w tym także na powstawanie nowych metod typowania genetycznego drobnoustrojów w celu ułatwienia i upowszechnienia badań epidemiologicznych, a w szczególności kontroli zakażeń szpitalnych, chorób infekcyjnych i dochodzeń epidemiologicznych. Istotnymi parametrami decydującymi o użyteczności nowej metody typowania oraz o powszechności jej stosowania w rutynowych badaniach epidemiologicznych jest jej wiarygodność oraz szybkość uzyskiwania wyników.

Techniki *fingerprinting* należące do grupy LM PCR, są najbardziej uniwersalnymi metodami typowania genetycznego tzn. mogą być stosowane dla szerokiej gamy drobnoustrojów i wykazują wysoki potencjał różnicujący. Możliwe jest, aby za pomocą jednego układu diagnostycznego (układ enzymu/enzymów restrykcyjnych oraz metoda selekcji fragmentów amplifikowanych) jednocześnie typować wiele różnych gatunków drobnoustrojów. W wyniku analizy dla każdej z prób (szczepów) można otrzymać produkty PCR (wynik pozytywny typowania). W przypadku kontaminacji hodowli bakteryjnej czy błędnego przypisania drobnoustroju do gatunku bardzo trudno jest na podstawie otrzymanego profilu elektroforetycznego produktów PCR stwierdzić zajście tych nieprawidłowości, zwłaszcza jeżeli badana grupa szczepów wykazuje naturalnie wysoki stopień zróżnicowania genetycznego. Jedynie w przypadku, gdy analizie poddaje się grupę szczepów, których dane epidemiologiczne wskazują na bliską zależność, otrzymanie profilu elektroforetycznego znacznie odbiegającego od reszty wyników, może wzbudzić pewne wątpliwości i skłonić nas do powtórzenia badania.

Celem mojej pracy doktorskiej jest opracowanie metody typowania genetycznego, która poza różnicowaniem szczepów pozwala również uzyskać wzory potwierdzające przynależności gatunkową czy rodzajową badanego drobnoustroju.

### 6.1. Genetyczna charakterystyka wybranych szczepów bakteryjnych

#### 6.1.1. Genetyczna charakterystyka szczepów *K. oxytoca*

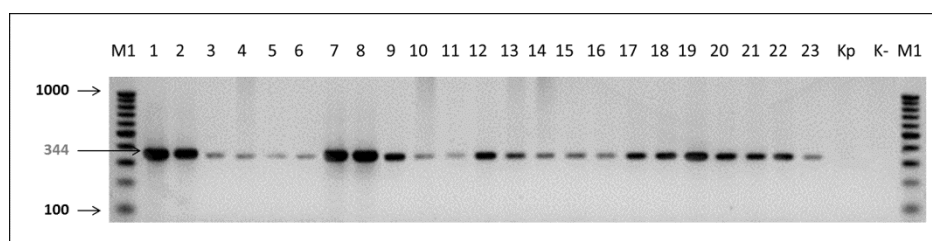
Pałeczki Gram-ujemne z rodzaju *Klebsiella*, jako patogeny oportunistyczne, są jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne, szczególnie na oddziałach Neonatologii. Mogą prowadzić do poważnych chorób tj. posocznicy, zapalenia płuc, infekcji dróg moczowych i tkanki miękkiej. Zrodzaju *Klebsiella*, *K. oxytoca* jest drugim, najczęściej identyfikowanym gatunkiem wśród szczepów izolowanych od hospitalizowanych pacjentów.

Identyfikacja gatunkowa *K. oxytoca* napotyka wiele trudności ze względu na duże podobieństwo fenotypowe do gatunku *K. pneumoniae* [138-140]. Różnicowanie pomiędzy tymi dwoma gatunkami opiera

się przede wszystkim na zdolności rozkładu tryptofanu do indolu przez *K. oxytoca*. Ponadto *K. pneumoniae* rośnie i rozkłada glukozę w wyższych temperaturach (41°C i 44,5°C), *K. oxytoca* natomiast preferuje temperatury niższe (10°C i 41°C) [1]. Obecnie do identyfikacji gatunkowej *K. oxytoca* można wykorzystać specyficzną reakcję PCR opartą na fragmencie genu *pehX*, kodującego enzym poligalaktouronazę [141].

Do badań wybrałam 200 szczepów klinicznych i 9 szczepów wzorcowych *K. oxytoca* (tab. 3) oraz 20 szczepów *K. pneumoniae*. Szczepy kliniczne izolowane były od pacjentów hospitalizowanych w różnych ośrodkach medycznych w Polsce w okresie od 1954 do 2007 (>50 lat). Szczepy wzorcowe *K. oxytoca* zostały opisane przez Ide Ørskov w 1956r i stanowią wzorzec dla tego gatunku. Identyfikacja gatunkowa szczepów *K. oxytoca* została potwierdzona poprzez amplifikację PCR fragmentu genu *pehX*, z wykorzystaniem starterów stPehX3 i stPehX4 (wg procedury przedstawionej w pkt. 6.2.6). Różnorodność genetyczną szczepów zbadalam za pomocą dwóch metod o różnym stopniu dyskryminacji: ITS PCR oraz PCR MP w układzie enzymu restrykcyjnego *HindIII* (wg procedury przedstawionej w pkt.6.2.9-10) [142].

Do wstępnych badań wybrałam 23 szczepy *K. oxytoca*, w tym 9 szczepów wzorcowych oraz jeden szczep *K. pneumoniae* jako kontrolę ujemną do identyfikacji gatunkowej. Wyniki identyfikacji gatunkowej oraz typowania genetycznego przedstawiałam na rysunkach 13-15.



Rys. 13. Elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu *pehX* (wielkość produktu 344 pz); M1 – marker wielkości DNA 100-1000, 1-23 szczepy *K. oxytoca*, Kp – *K. pneumoniae*, K - kontrola ujemna reakcji PCR.

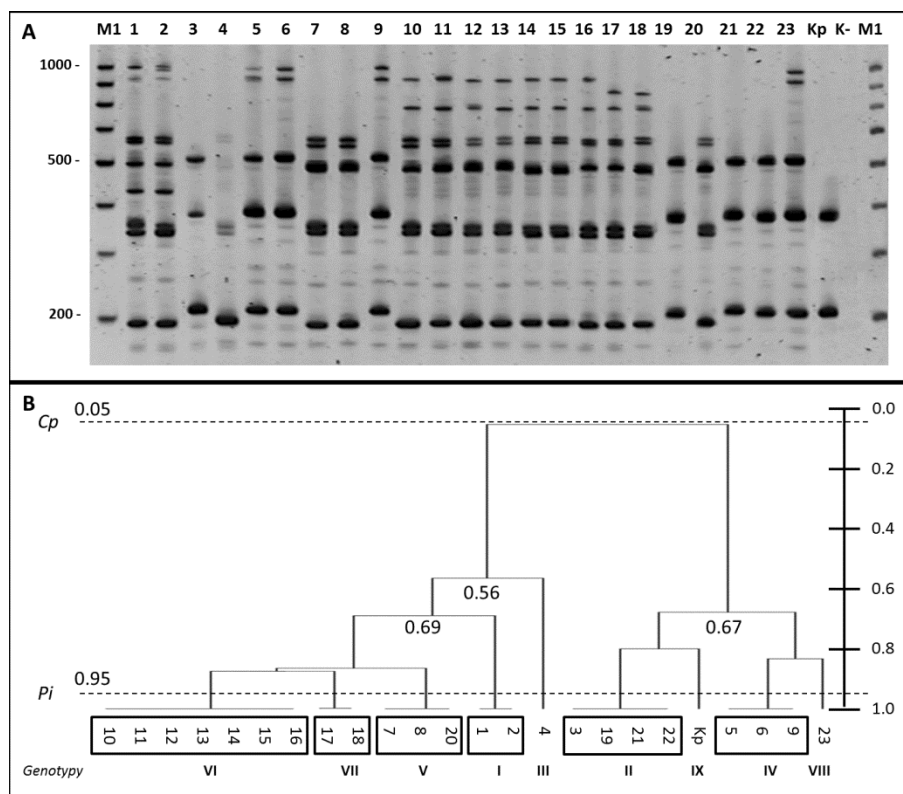
Specyficzny produkt o długości 344 pz otrzymano dla wszystkich szczepów *K. oxytoca*. Wynik amplifikacji dla szczepu *K. pneumoniae* jest negatywny (brak produktu PCR).

Różnorodność genetyczna szczepów *K. oxytoca* jest bardzo duża (rys. 14,15). Całkowite podobieństwo ( $C_p$ ) obliczone na podstawie wyników typowania ITS PCR wynosi 5%, a PCR MP 4%. Typowanie ITS PCR pozwoliło wyodrębnić 9 różnych wzorów genetycznych (I-IX), składających się z 5-8 fragmentów DNA o długości od 290 do 1000 pz, natomiast typowanie PCR MP 17 różnych wzorów genetycznych (A-R), zawierających do 10 fragmentów DNA o długości od 150 do 3000 pz.

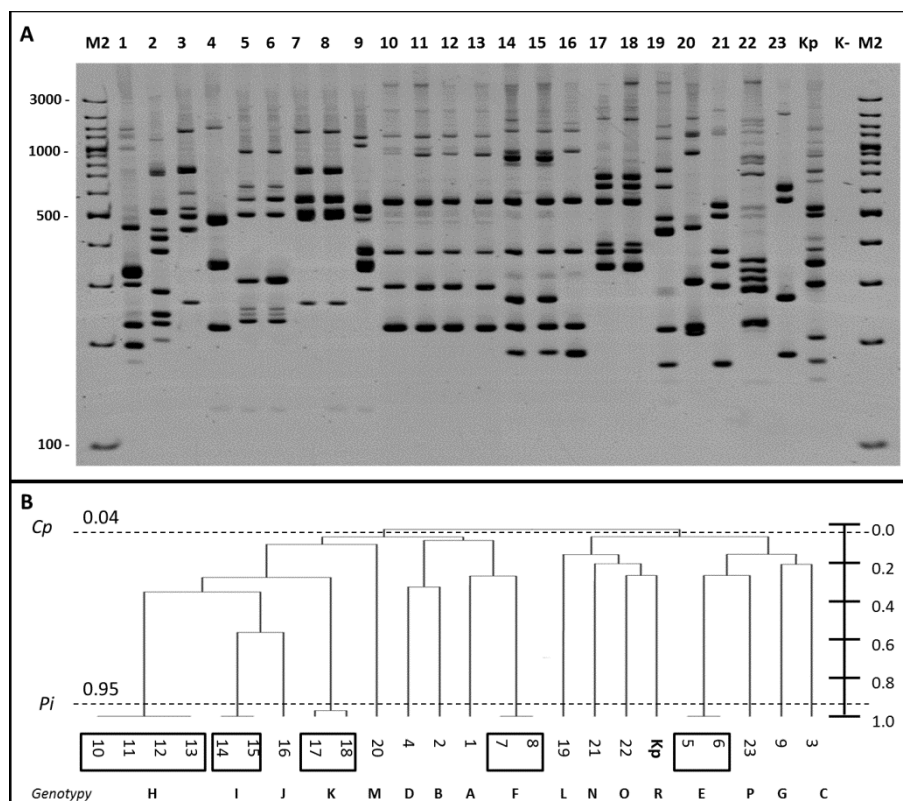
Szczep *K. pneumoniae* wykazuje wysoki stopień podobieństwa genetycznego względem *K. oxytoca*. Stosując wyłącznie typowanie genetyczne ITS PCR oraz PCR MP zostałby on uznany za gatunek *K. oxytoca* (szczepy 12, 21, 22 oraz *K. pneumoniae* połączone są w jeden klaster o stopniu podobieństwa 18%, przy czym całkowite podobieństwo szczepów *K. oxytoca* jest ponad trzy razy niższe). Nie wszystkie szczepy *K. pneumoniae* wykazują tak wysokie podobieństwo genetyczne względem *K. oxytoca*. W pracy przeanalizowałam 20 szczepów *K. pneumoniae*, a stopień ich podobieństwa względem *K. oxytoca* wynosił od 2 do 15%. Przedstawiony na rysunkach 13-15 szczep *K. pneumoniae* został wybrany celowo, aby móc



ocenić specyficzność proponowanych metod i układów diagnostycznych względem *K. oxytoca*.



Rys. 14. Wyniki typowania genetycznego metodą ITS PCR bakterii *K. oxytoca* (A) elektroforetyczny rozdział w 4% żelu poliakryloamidowym produktów PCR, (B) dendrogram podobieństwa genetycznego szczepów *K. oxytoca*, wyznaczony na podstawie współczynnika podobieństwa Dice'a oraz metody UPGMA; M2-marker wielkości DNA 100-1000, 1-23 szczepy *K. oxytoca*, Kp- szczep *K. pneumoniae*, K- kontrola ujemna reakcji PCR, I-IX genotypy,  $C_p$ - całkowite podobieństwo,  $P_i$ -poziom identyczności.



Rys. 15. Wyniki typowania genetycznego metodą PCR MP bakterii *K. oxytoca*; (A) elektroforetyczny rozdział w 6% żelu poliakryloamidowym produktów PCR, (B) dendrogram podobieństwa genetycznego szczepów *K. oxytoca* wyznaczony na podstawie współczynnika podobieństwa Dice'a oraz metody UPGMA; M2 – marker wielkości DNA 100-3000, 1-23 szczepy *K. oxytoca*, Kp- szczep *K. pneumoniae*, K- kontrola ujemna reakcji PCR, A-R genotypy,  $C_p$ - całkowite podobieństwo,  $P_i$ -poziom identyczności.

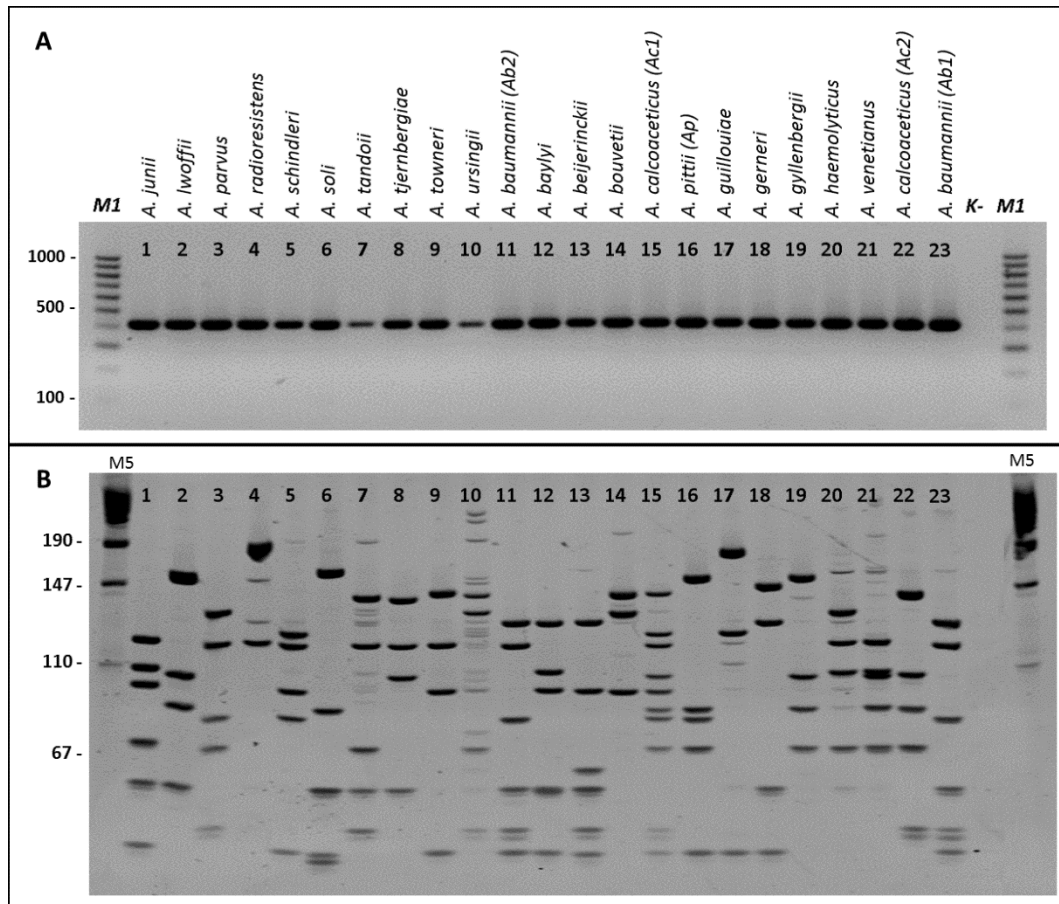
## 6.1.2. Genetyczna charakterystyka szczepów *Acinetobacter* sp.

Taksonomia rodzaju *Acinetobacter* sp. wraz z rozwojem metod biologii molekularnej często ulegała zmianom. Podstawy obecnie obowiązującej taksonomii *Acinetobacter* sp. stworzyli w 1986 roku Bouvet i Girmont, którzy, wykorzystując technikę hybrydyzacji DNA/DNA, wyodrębnili dwanaście genotypów [143]. Obecnie rodzaj *Acinetobacter* obejmuje 40 gatunków, z czego 31 nadano nazwy gatunkowe ([www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html](http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html)), a 9 widnieje jako osobne grupy DDH (*ang.* DNA-DNA hybridisation [144]).

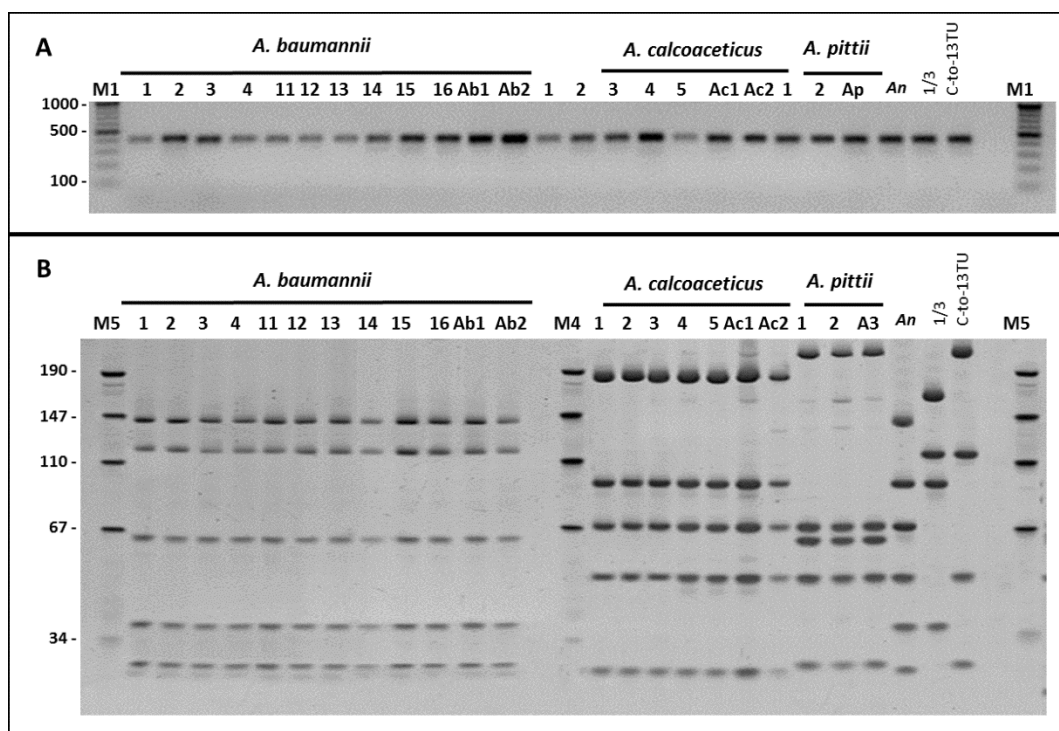
Bakterie z rodzaju *Acinetobacter* są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie [145]. Ich naturalnym rezerwuarem jest woda i gleba, mogą także wchodzić w skład fizjologicznej mikroflory skóry człowieka. Są to patogeny oportunistyczne. Obecnie szacuje się, że wywołują ok. 3% infekcji szpitalnych [145]. Oporne na większość istniejących antybiotyków, stanowią śmiertelne zagrożenie szczególnie dla pacjentów leczonych metodami inwazyjnymi. Największy udział w patogenezie mają genotypy należące do kompleksu ACB (*Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex), w którego skład wchodzi sześć genomogatunków: *A. calcoaceticus* (gs 1), *A. baumannii* (gs 2), *A. pittii* (gs 3), *A. nosocomialis* (13TU) i dwa najmniej liczne genomogatunki nie posiadające nazwy gatunkowej: „pomiędzy 1 i 3” (*ang.* between 1 and 3) oraz „blisko spokrewniony z 13TU” (*ang.* close to 13TU) – nazwy genomogatunkowe nadano przez wzgląd na ich genetyczne podobieństwo w stosunku do innych grup genotypowych należących do kompleksu [132,146].

Szczepy należące do kompleksu ACB izolowane ze środowiska szpitalnego charakteryzują się bardzo dużym podobieństwem zarówno pod względem fenotypowym jak i genetycznym [132]. W ostatnim czasie zaprojektowano wiele metod opartych na analizie DNA do identyfikacji genomogatunków *Acinetobacter*, jednak ze względu na duże podobieństwo genetyczne, identyfikacja i typowanie szczepów należących do kompleksu ACB jest utrudnione.

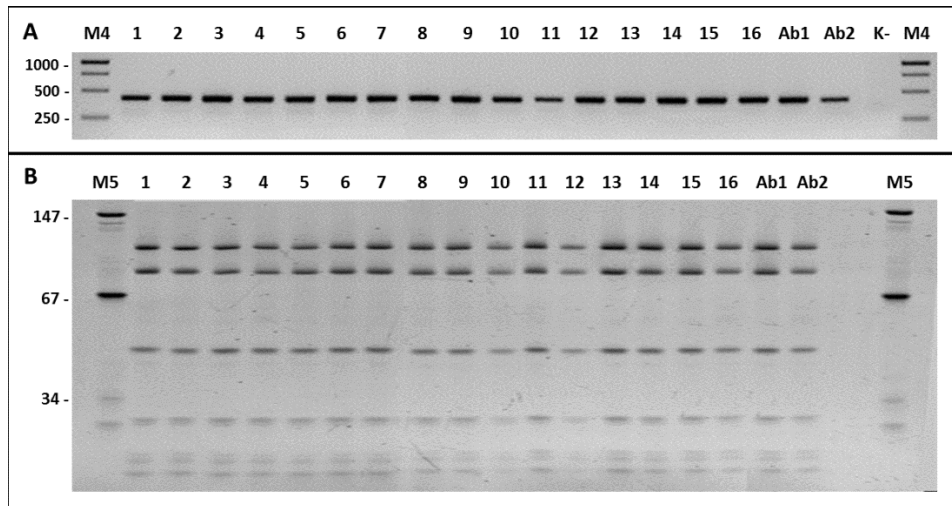
Do badań wybrałam 23 szczepy referencyjne należące do 21 gatunków *Acinetobacter* (tab. 1) oraz 16 szczepów klinicznych *A. baumannii*, 5 szczepów *A. calcoaceticus*, 2 szczepy *A. pittii*, po jednym szczepie: *A. nosocomialis*, genomogatek „between 1 and 3” i „close to 13TU” (tab. 2). Identyfikację gatunkową przeprowadziłam za pomocą metody *recA*-PCR/RFLP z wykorzystaniem enzymu *Tsp509I* (wg procedury przedstawionej w pkt. 5.2.8). Na podstawie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych fragmentu genu *recA* potwierdziłam ich przynależność do genomogateku [29]. Wyniki analizy przedstawiłam na rysunkach 16 – 18.



Rys. 16. Wyniki typowania genetycznego metodą *recA*-PCR/RFLP-*Tsp509I* referencyjnych szczepów *Acinetobacter* sp.; elektroforetyczny rozdział (A) produktów amplifikacji fargmentu genu *recA* w 2% żelu agarozowym (B) produktów trawienia fragmentu genu *recA* enzymem *Tsp509I* w 9% żelu poliakryloamidowym; M1 – marker wielkości DNA 100-1000, M5 – marker wielkości DNA pUC19/*MspI*, 1-23 referencyjne szczepy *Acinetobacter* sp. (wg tab.1), K- kontrola ujemna reakcji PCR.

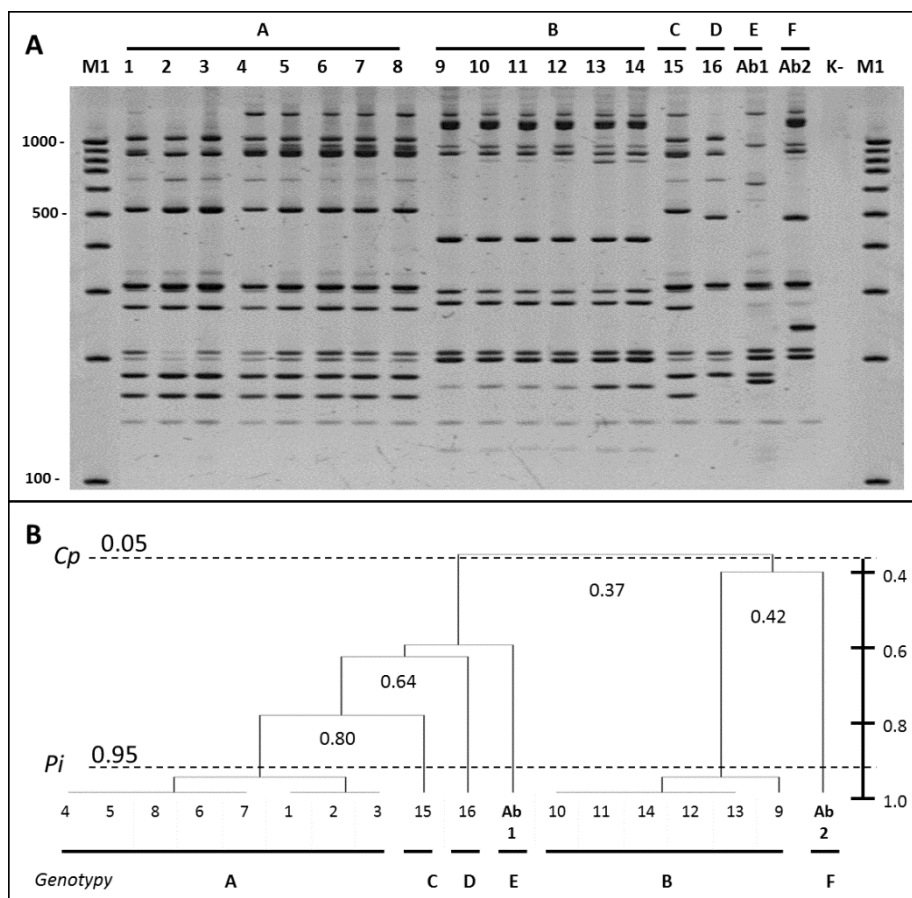


Rys. 17. Wyniki typowania genetycznego metodą *recA*-PCR/RFLP-*Tsp509I* wzorcowych, klinicznych i środowiskowych szczepów *Acinetobacter* sp. z kompleksu ACB; elektroforetyczny rozdział (A) produktów amplifikacji fargmentu genu *recA* w 2% żelu agarozowym (B) trawienia fragmentu genu *recA* enzymem *Tsp509I* w 9% żelu poliakryloamidowym; M1 – marker wielkości DNA 100-1000, M5 – marker wielkości DNA pUC19/*MspI*, K- kontrola ujemna reakcji PCR, 1-16 szczepy kliniczne i środowiskowe, Ab1, Ab2, Ac1, Ac2, Ap, An, 1/3, C-to-13TU – szczepy referencyjne i wzorcowe (wg tab. 1,2).



Rys. 18. Wyniki typowania genetycznego metodą *recA*-PCR/RFLP-*Tsp509I* referencyjnych i klinicznych szczepów *A. baumannii*; elektroforetyczny rozdział (A) produktów amplifikacji fragmentu genu *recA* w 2% żelu agarozowym, (B) produktów trawienia fragmentu genu *recA* enzymem *Tsp509I* w 9% żelu poliakrylamidowym; M1 – marker wielkości DNA 100-1000, M5 – marker wielkości DNA pUC19/*MspI*, K- kontrola ujemna reakcji PCR, 1-16 szczepy kliniczne, Ab1, Ab2 – szczepy referencyjne (wg tab. 1).

Różnorodność genetyczną szczepów *A. baumannii* zbadalam za pomocą metody PCR MP w układzie restrykcyjnym *EcoRI* (wg procedury przedstawionej w pkt. 5.2.10). Wyniki typowania oraz analizę porównawczą profili elektroforetycznych przedstawiłam na rysunku (rys. 19). Zróżnicowanie genetyczne wybranych szczepów jest niewielkie, a całkowite podobieństwo genetyczne ( $C_p$ ) wynosi 37%. Spośród 18 szczepów wyodrębniłam 6 genotypów oznaczonych symbolami A-F.



Rys. 19. Wyniki typowania genetycznego metodą PCR MP/*EcoRI* szczepów *A. baumannii*; (A) elektroforetyczny rozdział w 6% żelu poliakrylamidowym produktów PCR, (B) dendrogram podobieństwa genetycznego wyznaczony na podstawie współczynnika podobieństwa Dicea oraz metody UPGMA; M1 – marker wielkości DNA 100-1000, 1-16 szczepy kliniczne, Ab1, Ab2 szczepy referencyjne *A. baumannii* (wg tab. 2), K- kontrola ujemna reakcji PCR;  $C_p$ - Całkowite podobieństwo,  $P_i$ -Poziom identyczności, kolorami i symbolami A-F zaznaczono osobne genotypy.

## 6.2. Metoda ddLMS PCR

Metody specyficzne, służące identyfikacji gatunkowej, wykorzystują obecność charakterystycznych dla danego gatunku sekwencji DNA. Sekwencje te, zwane inaczej **sekwencjami markerowymi**, są zazwyczaj mocno zakonserwowane ewolucyjnie dlatego stopień ich zmienności jest bardzo niski. Stanowią najczęściej fragment genu odpowiedzialnego za ważne procesy życiowe lub za unikalne cechy fenotypowe danego mikroorganizmu. Sekwencje otaczające sekwencje markerowe mogą wykazywać dużo wyższy poziom zmienności, dlatego ich analiza może stanowić doskonałe narzędzie do specyficznego różnicowania drobnoustrojów.

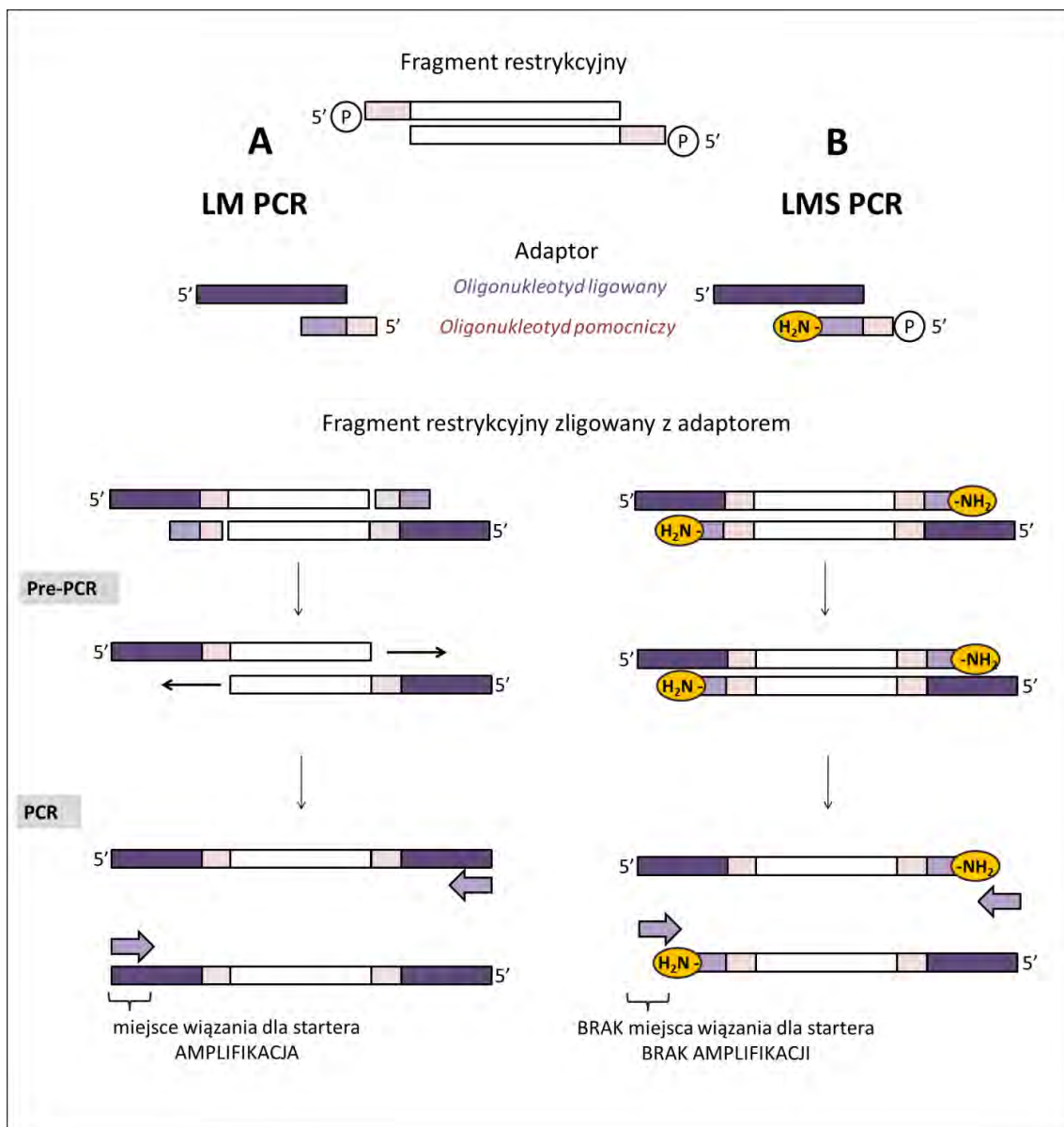
W ramach prowadzonych badań podjęłam próbę opracowania nowej metody typowania genetycznego, która na podstawie polimorfizmu sekwencji poprzedzającej sekwencję markerową pozwoliłaby typować drobnoustroje z zachowaniem specyficzności gatunkowej. Punktem wyjścia była opracowana w 1995 roku przez Siebert i in. [147], a następnie zmodyfikowana w 2005 roku przez Jeung i in. [148] metoda LMS PCR (*ang.* Ligation Mediated Suppression PCR).

Technika LMS PCR to technika należąca do grupy metod LM PCR, umożliwiająca amplifikację połączonych z adaptorem fragmentów restrykcyjnych, zawierających wewnątrz znaną sekwencję DNA. Jak dotąd wykorzystywana była do analizy obszarów promotorowych, do poznania sekwencji długich odcinków DNA (np. całych genów) [149], do identyfikacji izoform genów danej rodziny genów [150] oraz w połączeniu z metodą inverse-PCR, do analizy fragmentów otaczających znany fragment DNA [151]. Przeprowadzone przeze mnie studium literaturowe wykazało, że metoda LMS PCR jak dotąd nie była wykorzystana do genetycznego typowania drobnoustrojów.

LMS PCR jest metodą złożoną i jak pozostałe metody z grupy LM PCR składa się z etapu trawienia restrykcyjnego genomowego DNA, ligacji adaptora do fragmentów restrykcyjnych oraz selektywnej amplifikacji w reakcji PCR. Amplifikacji ulegają tylko te fragmenty, które zawierają wewnątrz sekwencję markerową. Pozostałe fragmenty nie są amplifikowane na skutek braku miejsc wiązania dla starterów. Ilość produktów PCR zależy ściśle od liczby kopii sekwencji markerowej w badanym DNA.

Selektywność amplifikacji w technice LMS PCR uzyskano wprowadzając na etapie reakcji ligacji adaptor, którego oligonukleotyd pomocniczy zawiera grupę aminową na końcu 3' oraz grupę fosforanową na końcu 5' (rys. 20). W wyniku fosforylacji oligonukleotyd pomocniczy łączy się wiązaniem fosfodiestrowym z końcem 3' fragmentu restrykcyjnego i podobnie jak oligonukleotyd ligowany, staje się częścią matrycy DNA w reakcji PCR. W metodach LM PCR we wstępnym etapie reakcji PCR (pre-PCR) następuje oddysocjowanie niezligowanego oligonukleotydu pomocniczego, wydłużenie końca 3' fragmentu restrykcyjnego i utworzenie miejsca wiązania dla startera komplementarnego do adaptora (rys. 20A). W metodzie LMS PCR oligonukleotyd pomocniczy po ligacji do fragmentu restrykcyjnego staje się przeszkodą w amplifikacji. Znajdująca się na końcu 3' grupa aminowa blokuje wydłużanie nici DNA przez

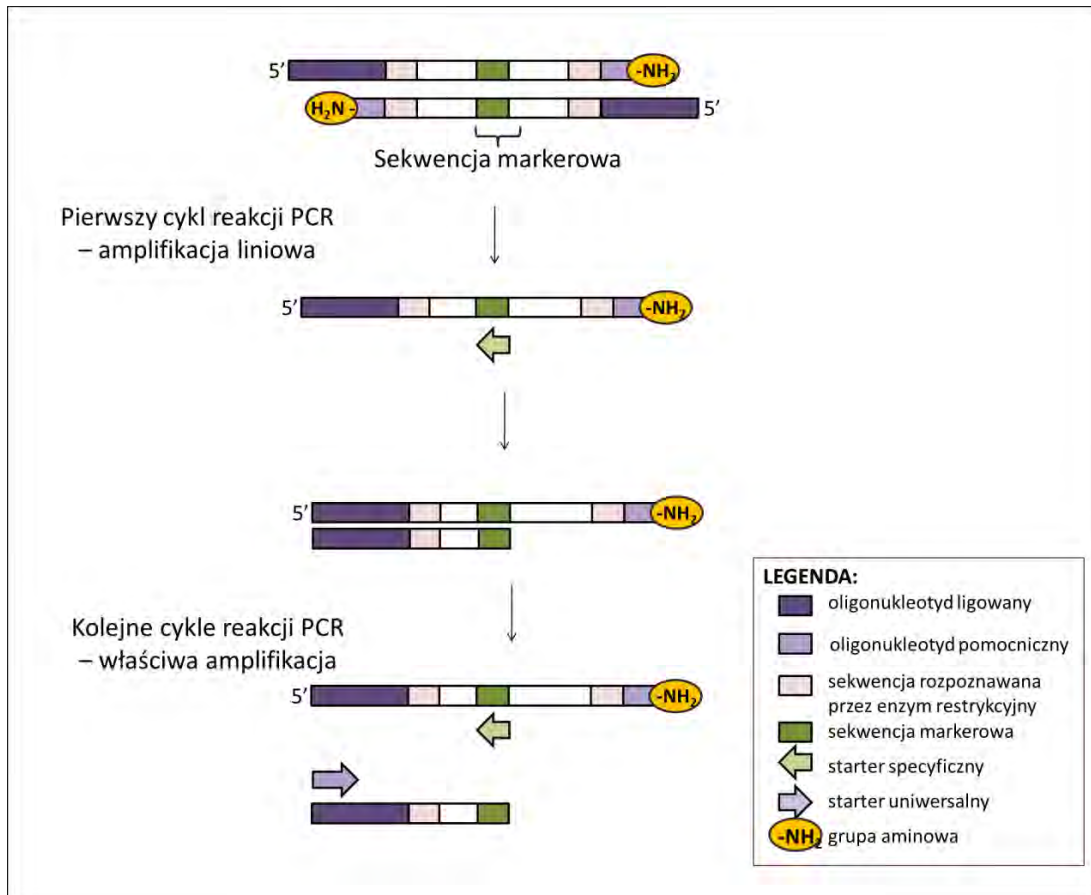
polimerazę DNA (rys. 20B) i miejsce hybrydyzacji startera komplementarnego do adaptora nie może być utworzone.



Rys. 20. Porównanie budowy adaptora stosowanego w metodzie LM PCR i LMS PCR, przebieg wstępnego etapu reakcji PCR (pre-PCR) oraz przedstawienie mechanizmu supresji amplifikacji w metodzie LMS PCR.

Amplifikacja fragmentów restrykcyjnych zawierających wewnątrz sekwencję markerową przebiega dwustopniowo (rys. 21). W pierwszym cyklu reakcji PCR do matrycy DNA przyłącza się starter komplementarny do sekwencji markerowej (zwany dalej **starterem specyficznym**), którego wydłużenie (amplifikacja liniowa) powoduje utworzenie miejsca wiązania startera komplementarnego do adaptora (zwanego dalej **starterem uniwersalnym**). W kolejnych cyklach reakcji PCR do matrycy DNA przyłączają się oba startery: uniwersalny i specyficzny, w wyniku czego fragment DNA poprzedzający sekwencję markerową jest amplifikowany. Pozostałe fragmenty DNA nie są amplifikowane ze względu na brak utworzenia miejsca hybrydyzacji dla startera uniwersalnego.

Metoda LMS PCR może być wykorzystana do specyficznego typowania drobnoustrojów, jeżeli wybrana przez nas sekwencja markerowa będzie specyficzna gatunkowo lub rodzajowo.

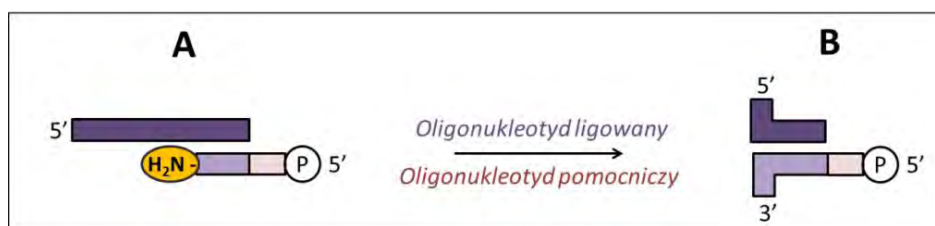


Rys. 21. Schemat opisujący mechanizm amplifikacji fragmentu DNA zawierającego sekwencje markerową w metodzie LMS PCR.

Wzór uzyskany metodą LMS PCR dostarcza dwóch informacji:

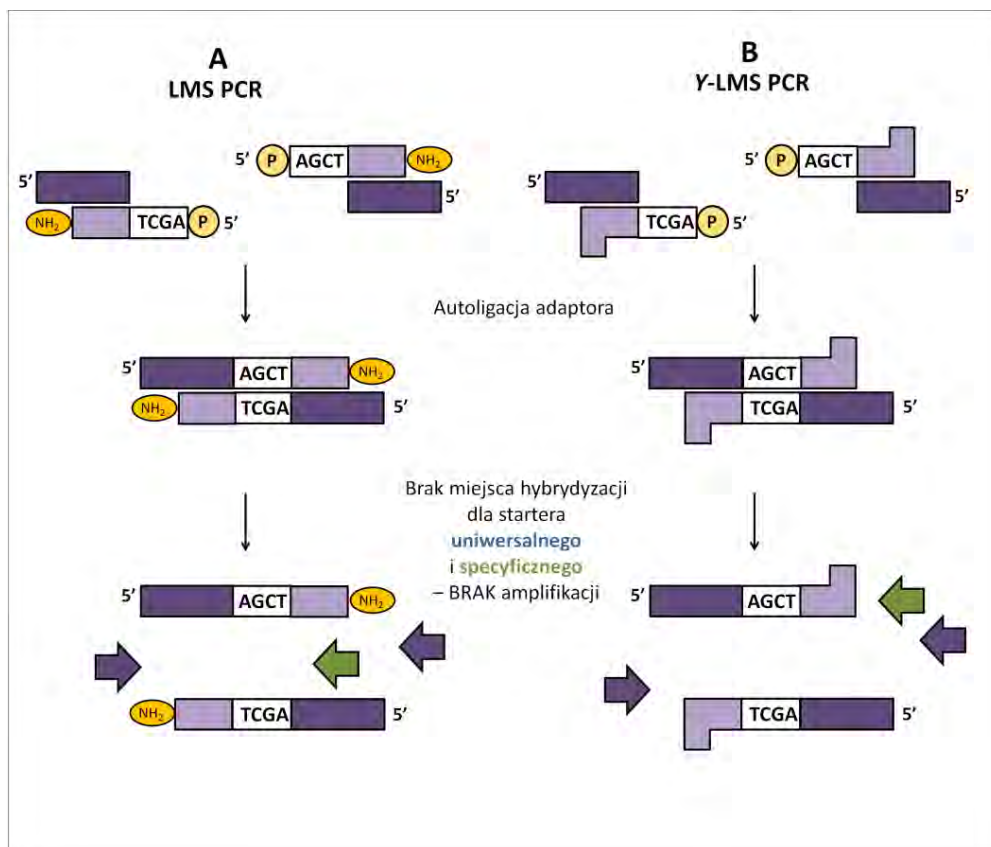
- (1) obecność produktu PCR świadczy o obecności charakterystycznej sekwencji w obrębie genomowego DNA, a tym samym potwierdza przynależność badanego drobnoustroju do danej grupy (jednostki taksonomicznej, np. gatunku),
- (2) długość produktu PCR dostarcza informacji o różnicach w sekwencji otaczającej sekwencję markerową, a tym samym o różnicach pomiędzy badanymi drobnoustrojami wchodzącymi w skład badanej grupy.

W roku 2005 zaproponowano wprowadzenie do metody LMS PCR adaptora typu Y-shape, który zawiera na końcu 3' oligonukleotydu pomocniczego, w miejsce grupy aminowej, niepełną komplementarność w stosunku do końca 5' oligonukleotydu ligowanego [148]. Adaptor ten tworzy strukturę drugorzędową, kształtem przypominającą literę „Y” (rys. 22).



Rys. 22. Schemat przedstawiający strukturę adaptora w metodzie LMS PCR; (A) typu liniowego, zawierający grupę aminową na końcu 3' oligonukleotydu pomocniczego; (B) typu Y-shape, z niepełną komplementarnością pomiędzy końcem 3' oligonukleotydu pomocniczego a końcem 5' oligonukleotydu ligowanego.

Obecność grupy fosforanowej na końcu 5' oligonukleotydu pomocniczego może spowodować autoligację adaptorów i tym samym obniżyć ilość wolnych cząsteczek adaptorów (rys. 23).

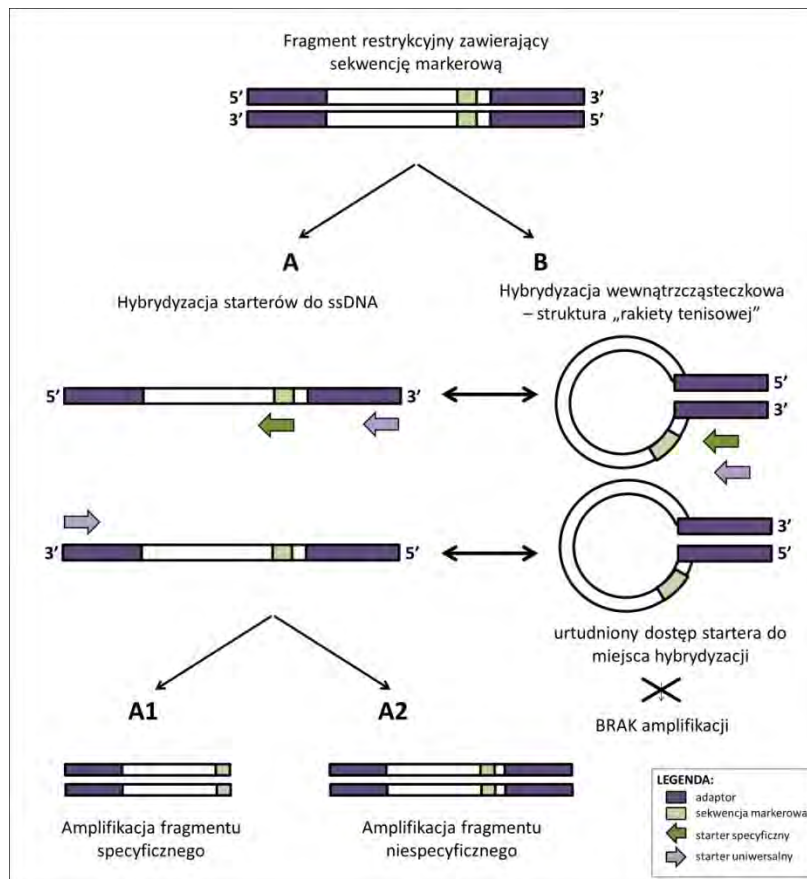


Rys. 23. Schemat przedstawiający zjawisko autoligacji ufosforylowanego na końcu 5' adaptorów w metodzie LMS PCR; (A) adaptor liniowy, zawierający grupę aminową na końcu 3' oligonukleotydu pomocniczego; (B) adaptor typu Y-shape; P – grupa fosforanowa, NH<sub>2</sub> – grupa aminowa, AGCT – sekwencja jednoniciowego końca DNA (przykład).

W skrajnych przypadkach, może dojść do sytuacji, w której nie dojdzie do ligacji pomiędzy adaptorem a fragmentem restrykcyjnym zawierającym wewnątrz sekwencję markerową, ze względu na brak wolnych cząsteczek adaptorów w mieszaninie reakcyjnej. Brak amplifikacji fragmentu specyficznego może być błędnie odczytany jako wynik negatywny (brak sekwencji markerowej w badanym genomowym DNA). Aby wykluczyć możliwość wystąpienia tego zjawiska postanowiłam zastosować adaptor pozbawiony grupy fosforanowej, a do selekcji amplifikowanych fragmentów wykorzystać zjawisko supresji w reakcji PCR. Zjawisko to wykorzystano w metodzie ADSRRS (pkt. 4.2.2.2.3). Obustronnie zligowane z adaptorem fragmenty restrykcyjne zawierają terminalne, komplementarne sekwencje. W temperaturze przyłączania startera fragmenty te wskutek wewnątrzcząsteczkowej hybrydyzacji mogą utworzyć strukturę tzw. „rakiety tenisowej”, która blokuje miejsce wiązania dla startera i uniemożliwia amplifikację fragmentu. Ponieważ zjawisko wewnątrzcząsteczkowej hybrydyzacji cząsteczek jednoniciowego DNA jest zjawiskiem konkurencyjnym w stosunku do hybrydyzacji startera, aby przesunąć równowagę reakcji w stronę tworzenia struktury „rakiety tenisowej” zastosowałam adaptor zbudowany z długiego, bogatego w G i C oligonukleotydu ligowanego oraz krótki starter (o połowę krótszy od oligonukleotydu ligowanego).

Fragment restrykcyjny zawierający wewnątrz sekwencję markerową, w zależności długości, może utworzyć strukturę „rakiety tenisowej” lub może być amplifikowany w reakcji PCR (rys. 24).





Rys. 24. Schemat przedstawiający teoretyczne rozważania wyników amplifikacji fragmentu restrykcyjnego zawierającego sekwencję markerową oraz zjawisko supresji w reakcji PCR; A1 – amplifikacja fragmentu specyficznego, A2 – amplifikacja fragmentu niespecyficznego, B – wewnątrzcząsteczkowa hybrydyzacja fragmentu DNA, blokująca przyłączenie starterów i amplifikację fragmentu DNA

W zależności od położenia sekwencji markerowej wewnątrz fragmentu restrykcyjnego, siły i szybkości wiązania starterów do matrycy DNA oraz warunków buforowych, możemy w reakcji PCR otrzymać poza właściwym, specyficznym produktem również produkt niespecyficzny, stanowiący amplifikowany w całości fragment restrykcyjny (rys.24A2). Jeżeli fragment restrykcyjny będzie wystarczająco długi, aby utworzyć stabilną strukturę „rakiety tenisowej”, powstająca drugorzędowa struktura cząsteczki DNA będzie utrudniała amplifikację fragmentu specyficznego, zwłaszcza jeżeli miejsce wiązania startera znajduje się blisko końca fragmentu restrykcyjnego (rys. 24B).

Zależność amplifikacji produktu specyficznego od warunków prowadzenia reakcji PCR oraz od stabilności struktury „rakiety tenisowej” fragmentu zawierającego sekwencję markerową, może obniżyć powtarzalność otrzymywanych wyników oraz czułość metody. W przypadku niskiego stężenia matrycy lub jej złej jakości (np. częściowa degradacja), supresja amplifikacji może doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie negatywnych (brak produktów PCR). Jedynym rozwiązaniem jest zastosowanie enzymów rzadko tnących, dla których miejsca cięcia położone są w znacznej odległości (ok. 2000-3000 pz) od obu stron sekwencji markerowej. W takim przypadku sekwencja markerowa zlokalizowana będzie w pętli struktury „rakiety tenisowej”, w miejscu o dużej relaksacji nici, gdzie dostęp dla startera będzie łatwiejszy. Niesie to za sobą konieczność amplifikacji długich fragmentów DNA, co wymaga stosowania polimeraz DNA o wysokiej procesywności.

Aby wyeliminować możliwość hybrydyzacji wewnątrzcząsteczkowej fragmentu restrykcyjnego, zawierającego wewnątrz sekwencję markerową, wprowadziłam do pierwszego etapu metody dodatkowe trawienie restrykcyjne. Zastosowanie dwóch enzymów restrykcyjnych, tnących DNA po obu stronach sekwencji markerowej, pozostawiających jednoniciowe końce o różnej sekwencji spowoduje, iż w reakcji ligacji adaptor przyłączy się tylko z jednej strony fragmentu restrykcyjnego. Brak homologicznych sekwencji terminalnych wyklucza możliwość tworzenia się struktury „rakiety tenisowej” i blokadę miejsca hybrydyzacji dla startera specyficznego.

Zmodyfikowaną metodę LMS PCR, wykorzystującą podwójne trawienie restrykcyjne oraz ligację nieufosoforylowanego adaptoru liniowego, nazwałam ddLMS PCR (*ang.* double digestion Ligation Mediated Suppression PCR).

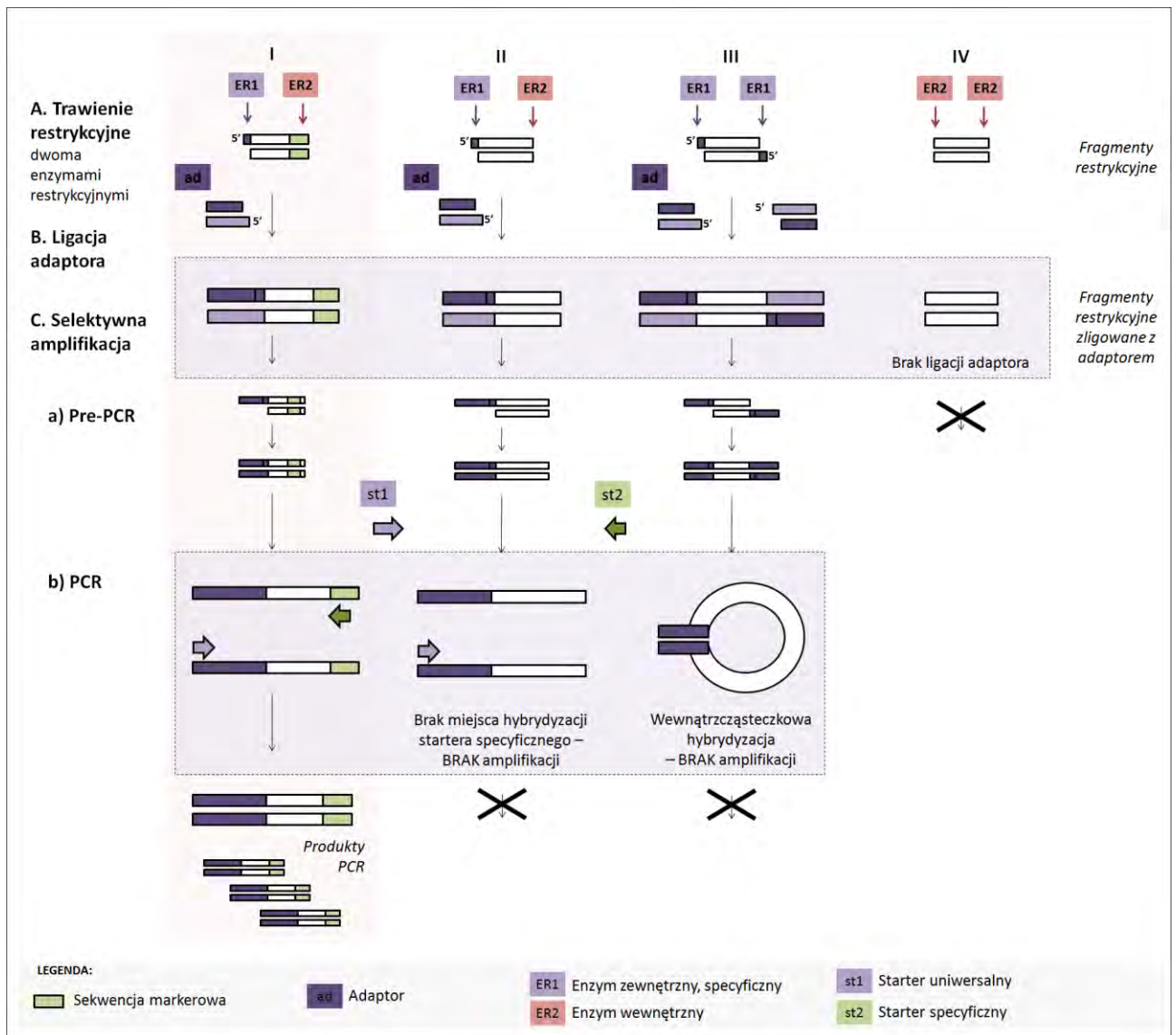
### 6.2.1. Mechanizm metody ddLMS PCR

W metodzie ddLMS PCR całe genomowe DNA poddaje się trawieniu dwoma enzymami restrykcyjnymi, otrzymując bardzo dużą ilość fragmentów DNA, z których część zawiera wewnątrz sekwencję markerową (ich liczba zależy od liczby kopii sekwencji markerowej). Fragmenty te można podzielić na cztery grupy (rys. 25A):

- I – fragmenty o różnych końcach generowanych przez dwa enzymy restrykcyjne, zawierające wewnątrz sekwencję markerową,
- II – fragmenty o różnych końcach pochodzących od dwóch enzymów restrykcyjnych, nie posiadające sekwencji markerowej,
- III – fragmenty o takich samych końcach, powstałe po trawieniu enzymem restrykcyjnym 1 (ER1),
- IV – fragmenty o takich samych końcach, powstałe po trawieniu enzymem restrykcyjnym 2 (ER2).

Dwa różne enzymy restrykcyjne pozostawiają różne końce. Adaptor zawiera sekwencję komplementarną tylko do końca pozostawionego przez enzym ER1, z którym łączy się w reakcji ligacji (rys. 25B). Koniec fragmentu powstały po cięciu enzymem ER2 pozostaje wolny. Adaptor jest nieufosforylowany na końcu 5' zatem w reakcji ligacji wiązanie fosfodiesterowe tworzy się tylko pomiędzy końcem 5' fragmentu restrykcyjnego, a końcem 3' oligonukleotydu ligowanego. Oligonukleotyd pomocniczy nie jest trwale połączony z matrycą i oddysocjowuje na etapie wstępnej denaturacji.

Adaptor zligowany z fragmentem restrykcyjnym tworzy w etapie pre-PCR miejsce wiązania dla startera uniwersalnego (st1). Obecność adaptoru z jednej strony fragmentu restrykcyjnego jest warunkiem wystarczającym do amplifikacji fragmentów, które zawierają wewnątrz sekwencję markerową (grupa I). Dla pozostałych fragmentów konieczne jest, aby adaptor zligowany był po ich obu stronach (grupa III). Etap ligacji blokuje amplifikację fragmentów z grupy II i IV.



Rys. 25. Schemat metody ddLMS PCR; ramką zaznaczono etap selekcji fragmentów ulegających amplifikacji w reakcji PCR.

Reakcja PCR w metodzie ddLMS PCR podobnie jak u innych metod z grupy LM PCR, składa się z dwóch etapów (rys. 25C):

- pre-PCR - wstępna reakcja PCR, w wyniku której oddysocjowanie niezligowanego oligonukleotydu pomocniczego i wydłużenie końca 3' przez polimerazę DNA, powoduje utworzenie miejsca wiązania dla startera uniwersalnego; etap ten zachodzi w temperaturze 72°C (optymalnej dla działania polimerazy DNA);
- właściwa reakcja PCR - amplifikacja fragmentu specyficznego z udziałem startera uniwersalnego (st1) i specyficznego (st2).

Fragmenty obustronnie zligowane z adaptorem (grupa III) zawierają długie homologiczne terminalne sekwencje, zatem podczas reakcji PCR tworzą strukturę „rakiety tenisowej”, która blokuje miejsce przyłączenia dla startera i hamuje amplifikację fragmentu. W reakcji PCR ulegają amplifikacji tylko fragmenty jednostronnie zligowane z adaptorem, zawierające wewnątrz sekwencję markerową (grupa I).

## 6.2.2. Elementy krytyczne metody ddLMS PCR

Metoda ddLMS PCR nie jest metodą uniwersalną. Sekwencję markerową oraz enzymy restrykcyjne dobiera się, w zależności od grupy badanych drobnoustrojów (poziomu taksonomicznego) oraz celu badania (identyfikacja rodzajowa, gatunkowa, różnicowanie wewnątrzgatunkowe). Poniżej przedstawiłam zasady, według których należy kierować się projektując układ diagnostyczny oparty na metodzie ddLMS PCR.

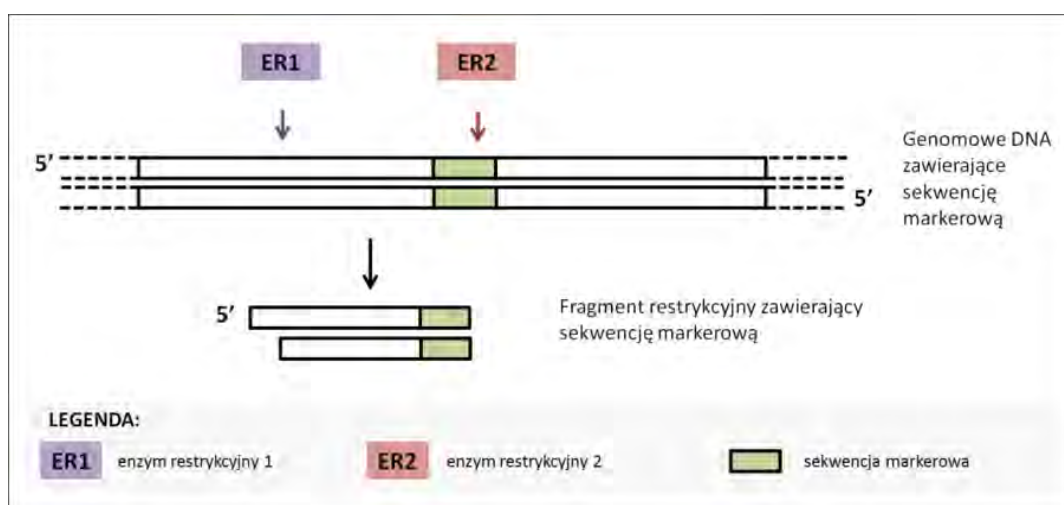
### 6.2.2.1. Sekwencja markerowa jako czynnik decydujący o specyficzności metody ddLMS PCR

Sekwencja markerowa to charakterystyczny dla badanej grupy drobnoustrojów (poziomu taksonomicznego), ewolucyjnie zakonserwowany fragment DNA, o znanej sekwencji, do której można zaprojektować starter specyficzny.

W genomie bakteryjnym można wyróżnić sekwencje DNA typowe dla wszystkich bakterii bądź charakterystyczne dla jednego rodzaju lub gatunku. Dobranie sekwencji występującej u szerszej grupy drobnoustrojów pozwoli stworzyć układ uniwersalny, różnicujący bakterie na wyższym poziomie taksonomicznym (np. w obrębie rodziny lub rodzaju). Przykładem takiej sekwencji jest np. gen kodujący podjednostkę 16S rRNA. Wybór sekwencji markerowej charakterystycznej tylko dla jednego gatunku pozwoli stworzyć układ specyficzny umożliwiający różnicowanie wewnątrzgatunkowe i jednoczesną identyfikację gatunkową.

### 6.2.2.2. Enzymy restrykcyjne jako czynnik decydujący o poziomie dyskryminacji metody ddLMS PCR

Metoda ddLMS PCR wymaga dobrania dwóch enzymów restrykcyjnych, generujących różne końce oraz dokonujących cięcia DNA w odpowiednim otoczeniu sekwencji markerowej (rys. 26).



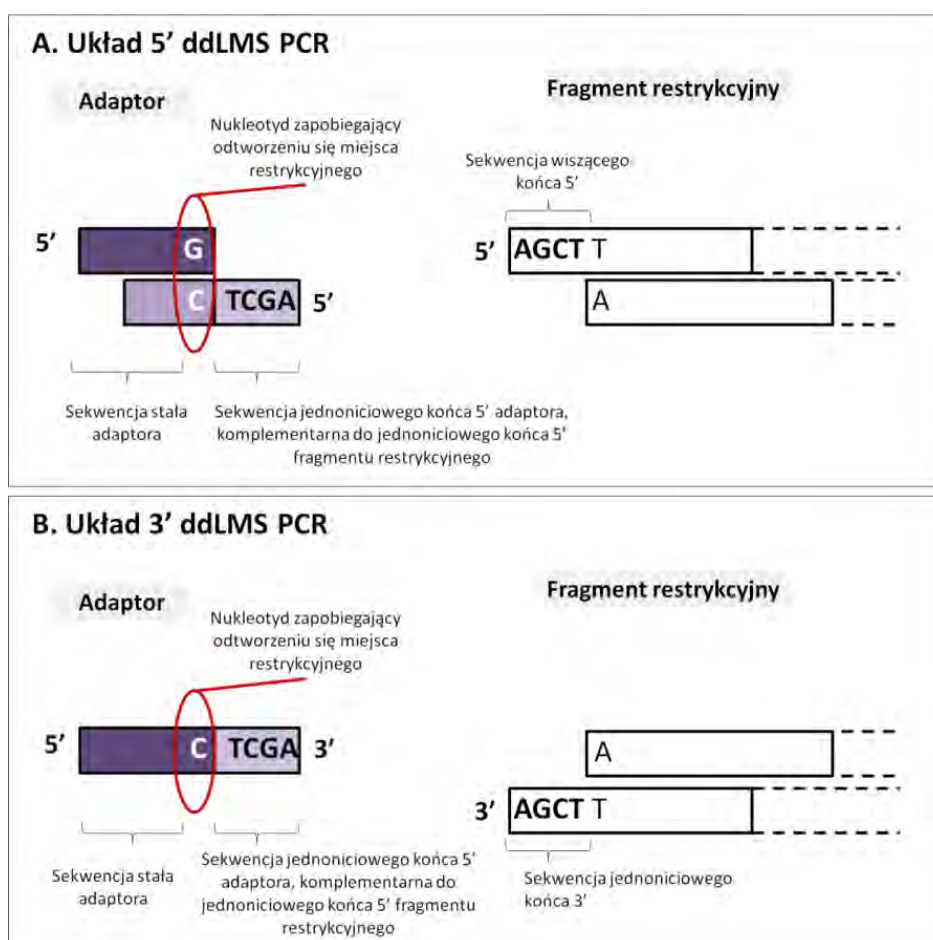
Ry. 26. Położenie miejsc cięcia enzymów restrykcyjnych wobec sekwencji markerowej w metodzie ddLMS PCR.

Enzym 1 (ER1), zwany dalej **zewnętrznym** lub **specyficznym** wpływa na poziom dyskryminacji metody i umożliwia różnicowanie drobnoustrojów w obrębie badanej grupy (poziomu taksonomicznego). Dokonuje on cięcia badanego DNA w obszarze poprzedzającym sekwencję markerową, pozostawiając jednoniciowe końce 5' lub 3' o zdefiniowanej sekwencji. Jeśli odległość miejsca cięcia od sekwencji markerowej jest stała dla wszystkich szczepów danej grupy drobnoustrojów, metoda ddLMS PCR ma charakter identyfikujący. Jeżeli natomiast odległość ta jest różna, to metoda ddLMS PCR pozwala różnicować drobnoustroje w obrębie danej grupy.

Enzym 2 (ER2) zwany dalej **wewnętrznym** lub **uniwersalnym**, dokonuje cięcia DNA w stałym miejscu dla wszystkich drobnoustrojów należących do badanej grupy, pozostawiając jednoniciowe lub tępe końce. Miejsce cięcia powinno znajdować się wewnątrz sekwencji markerowej, gdyż wtedy istnieje możliwość sprawdzenia jego obecności poprzez analizę PCR/RFLP.

### 6.2.2.3. Budowa adaptora

W metodzie ddLMS PCR można stosować dwa rodzaje adaptora w zależności od wybranego enzymu zewnętrznego. Jeżeli enzym pozostawia jednoniciowe końce 5' (układ **5' ddLMS PCR**) konieczne jest, aby adaptor składał się z dwóch oligonukleotydów, a sekwencja komplementarna do jednoniciowego końca fragmentu restrykcyjnego znajdowała się na końcu 5' oligonukleotydu pomocniczego (rys. 27A). Jeżeli



Rys. 27. Schemat przedstawiający budowę adaptora w układzie (A) 5' ddLMS PCR i (B) 3' ddLMS PCR.

wybrano enzym pozostawiający jednoniciowe końce 3' (układ **3' ddLMS PCR**), adaptor może składać się tylko z jednego oligonukleotydu (oligonukleotydu ligowanego), zawierającego na końcu 3' sekwencję komplementarną do jednoniciowego końca fragmentu restrykcyjnego (rys. 27B).

Oligonukleotydy adaptora zawierają sekwencję stałą oraz sekwencję zmienną na jednoniciowym końcu, która jest komplementarna do lepkich końców fragmentów restrykcyjnych i zależy od wybranego enzymu restrykcyjnego. Jeden lub dwa nukleotydy, znajdujące się tuż za sekwencją lepkiego końca powinny być tak dobrane, aby po ligacji adaptora z fragmentem restrykcyjnym nie było możliwe odtworzenie miejsca restrykcyjnego (rys. 27; zaznaczono czerwoną linią). Sekwencja stała oligonukleotydu ligowanego jest stosunkowo długa (ponad 30 nt), aby fragmenty obustronnie ligowane z adaptorem w wyniku wewnątrzcząsteczkowej hybrydyzacji tworzyły stabilną strukturę „rakiety tenisowej” i nie ulegały amplifikacji w reakcji PCR.

#### 6.2.2.4. Startery w reakcji PCR

Sekwencję startera komplementarnego do sekwencji markerowej, zwanego **starterem specyficznym**, należy dobrać w zależności od wybranej sekwencji markerowej wg ogólnych zasad projektowania starterów. Starter powinien być zorientowany w stronę końca 5' sekwencji markerowej, a miejsce jego hybrydyzacji powinno znajdować się pomiędzy końcem 5' sekwencji markerowej a miejscem cięcia dla enzymu wewnętrznego (ER2).

Sekwencja startera komplementarnego do adaptora, zwanego **starterem uniwersalnym**, jest identyczna z sekwencją końca 5' oligonukleotydu ligowanego. Jest to element stały metody ddLMS PCR, niezależny od układu diagnostycznego. Starter uniwersalny jest ponad dwa razy krótszy od sekwencji oligonukleotydu ligowanego (terminalnych sekwencji homologicznych), aby umożliwić utworzenie się struktury „rakiety tenisowej” i tym samym ograniczyć ilość amplifikowanych fragmentów DNA.

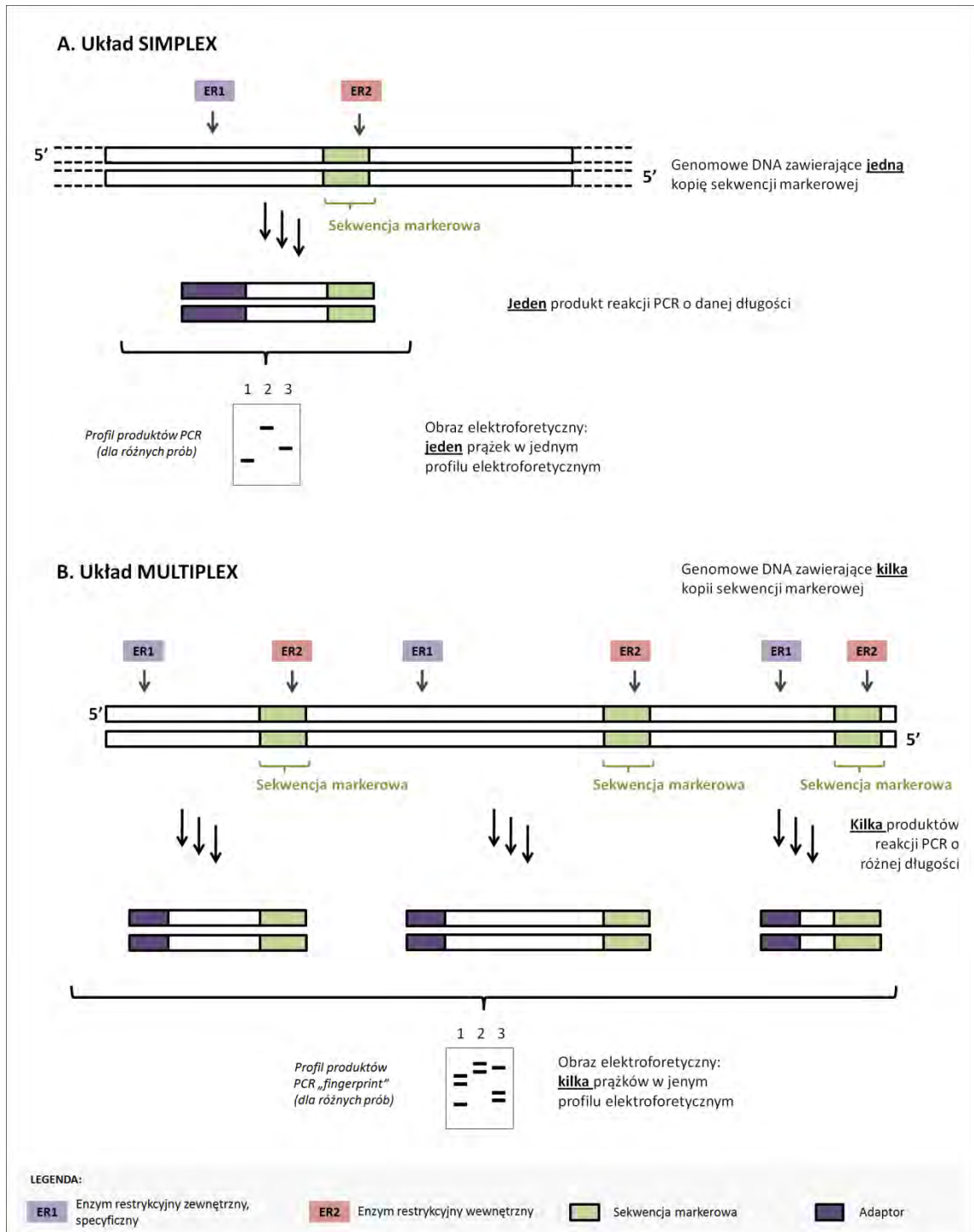
#### 6.2.2.5. Profil temperaturowo – czasowy reakcji PCR

W metodzie ddLMS PCR profil temperaturowo – czasowy reakcji PCR jest elementem stałym. Składa się z etapu wstępnej reakcji PCR (pre-PCR) oraz właściwej reakcji PCR, niezależnie od tego, czy jest to układ typu 5' ddLMS PCR czy 3' ddLMS PCR. Jedynym zmiennym elementem jest temperatura przyłączania starterów, która powinna być dobrana eksperymentalnie, tak aby zapewnić specyficzną i wydajną hybrydyzację startera specyficznego do sekwencji markerowej. Czas wydłużania w cyklach reakcji PCR został ustalony na 90 sekund. Jest to czas wystarczający dla komercyjnie dostępnych polimeraz *Pwo* i *Taq* do amplifikowania fragmentów o długości do 2000 pz (tab. 29). Może być on jednak wydłużony lub skrócony w zależności od długości fragmentu amplifikowanego i rodzaju stosowanej polimerazy DNA.

### 6.2.3. Rodzaje układów diagnostycznych ddLMS PCR

W zależności od liczby kopii sekwencji markerowej możliwe jest zaprojektowanie dwóch rodzajów układów diagnostycznych (rys. 28):

- A. **układ simplex** - gdy sekwencja markerowa występuje w genomie w jednej kopii.
- B. **układ multiplex** - gdy sekwencja markerowa występuje w genomie w kilku kopiach, a miejsce cięcia enzymu restrykcyjnego znajduje się w różnej odległości w kierunku 5' od każdej kopii sekwencji markerowej. Układ taki może funkcjonować jako swoistego rodzaju układ *fingerprinting*.



Rys. 28. Schemat układu LMS PCR typu (A) simplex oraz (B) multiplex.

## 6.2.4. Weryfikacja mechanizmu metody ddLMS PCR na modelu DNA faga $\lambda$

Założenia teoretyczne dotyczące mechanizmu molekularnego metody ddLMS PCR poddałam weryfikacji na DNA faga  $\lambda$ . Zaprojektowałam dwa układy modelowe różniące się typem enzymu specyficznego: (1) 5'  $\lambda$ -ddLMS PCR wykorzystujący enzym restrykcyjny *Bfal*, pozostawiający jednoniciowe końce 5' oraz (2) 3'  $\lambda$ -ddLMS PCR wykorzystujący enzym restrykcyjny *Maell*, pozostawiający jednoniciowe końce 3'. W obu układach wykorzystałam ten sam enzym wewnętrzny *RsaI*, pozostawiający tępe końce. Układ modelowy ma na celu sprawdzenie specyficzności amplifikacji fragmentów zawierających sekwencję markerową, a także zdolności eliminacji fragmentów niespecyficznych na etapie reakcji ligacji i reakcji PCR.

Oba układy modelowe zostały zaprojektowane w oparciu o specyficzną sekwencję (**sekwencję markerową**) o długości 777 pz, ograniczoną starterami 2F i 1R, występującą w DNA faga  $\lambda$  w jednej kopii. Starter specyficzny 3R jest komplementarny do końca 5' sekwencji markerowej. Miejsce trawienia enzymem *Bfal* (układ 5'  $\lambda$ -ddLMS PCR) znajduje się w odległości 170 pz od końca 5' sekwencji markerowej, natomiast miejsce trawienia enzymem *Maell* (układ 3'  $\lambda$ -ddLMS PCR) w odległości 6 pz. Fragment DNA obejmujący sekwencję markerową oraz fragment sekwencji poprzedzającej sekwencję markerową, w której znajdują się miejsca cięcia dla enzymów zewnętrznych, nazwałam **sekwencją analizowaną**. Sekwencja ta ma długość 1060 pz i jest ograniczona starterami 1F i 1R (tab. 31).

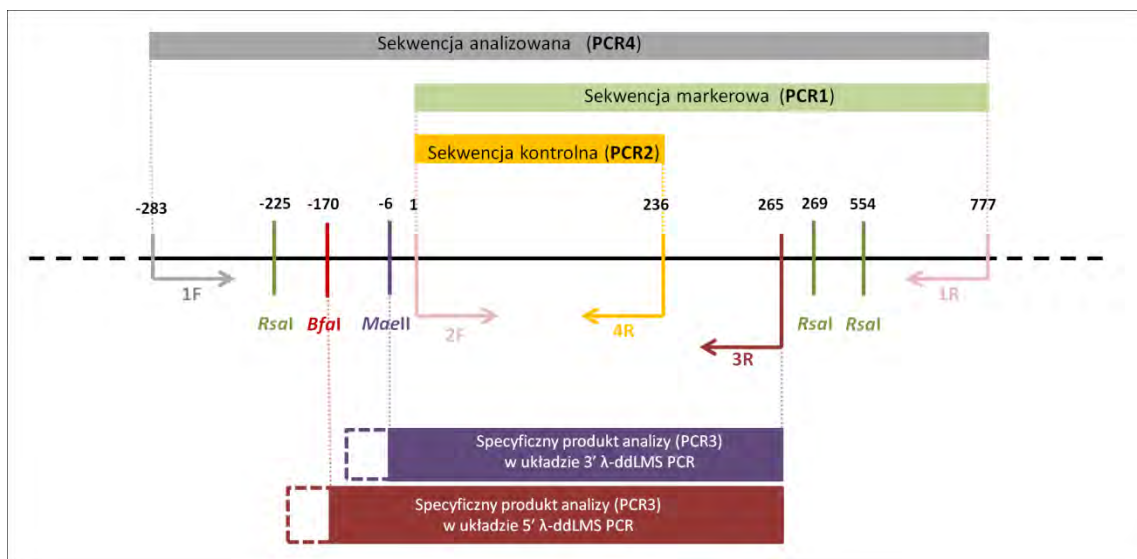
nazwa	starter	kierunek	Pozycja hybrydyzacji startera w DNA faga $\lambda$
1F	Starter ograniczający sekwencję analizowaną	->	26209 – 26239
2F	Starter ograniczający sekwencję markerową oraz sekwencję kontrolną	->	25934 – 25956
4R	Starter do sekwencji wewnętrznej REVERSE	<-	25720 – 25743
3R	Starter specyficzny REVERSE	<-	25691 – 25716
1R	Starter ograniczający sekwencję markerową i sekwencję analizowaną	<-	25179 – 25207

Tabela 31. Położenie i orientacja starterów zaprojektowanych do amplifikacji wybranych fragmentów DNA faga  $\lambda$ , w układzie modelowym  $\lambda$ -ddLMS PCR.

Spodziewany produkt amplifikacji (**produkt specyficzny**, oznaczony jako **PCR3**) w reakcji PCR to fragment DNA ograniczony starterem specyficznym 3R oraz miejscem cięcia dla enzymu *Bfal* (układ 5'  $\lambda$ -ddLMS PCR) lub *Maell* (układ 3'  $\lambda$ -ddLMS PCR), wydłużony o sekwencję oligonukleotydu ligowanego adaptora. Sekwencja ograniczona starterami 2F i 4R to **sekwencja kontrolna** (oznaczona jako **PCR2**). Zgodnie z założeniem miejsca cięcia dla enzymów *Bfal*, *Maell* i *RsaI* znajdują się poza sekwencją kontrolną, zatem sekwencja ta jest obecna zarówno na matrycy nietrawionego jak i trawionego DNA. Ponieważ znajduje się wewnątrz sekwencji specyficznej może być amplifikowana na matrycy produktu PCR3.

Schemat fragmentu DNA faga  $\lambda$  z zaznaczonymi pozycjami miejsc restrykcyjnych dla obu układów oraz miejsc hybrydyzacji starterów przedstawiłam na rysunku 29.





Rys. 29. Schemat przedstawiający fragment DNA faga λ; strzałkami zaznaczono pozycje hybrydyzacji starterów, liniami miejsca trawienia dla enzymów restrykcyjnych w stosunku do sekwencji markerowej; długość produktu specyficznego (PCR3) uwzględnia długość adaptor (zaznaczono linią przerywaną).

W układzie 5' λ-ddLMS PCR wykorzystałam adaptor typu 5', zawierający na jednoniciowym końcu 5'oligonukleotydu sekwencję 5'TA, natomiast w układzie 3' λ-ddLMS PCR wykorzystałam adaptor typu 3', zawierający na końcu 3' sekwencję 5'ACGT (wg pkt.6.2.2.3)

#### 6.2.4.1. Sprawdzenie specyficzności starterów

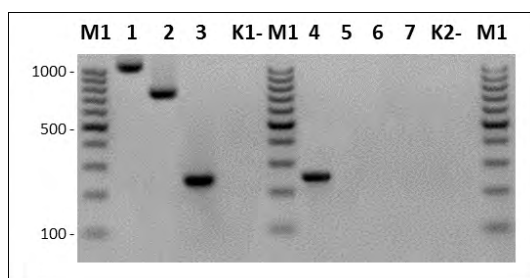
Przeprowadziłam szereg reakcji PCR na matrycy całego DNA faga λ z zastosowaniem różnych kombinacji starterów (tab. 32) aby sprawdzić specyficzność amplifikacji sekwencji markerowej, analizowanej i wewnętrznej oraz sprawdzić specyficzność startera uniwersalnego i specyficznego. Wyniki przedstawiłam na rysunku 30.

Oznaczenie	startery	cel amplifikacji	teoretyczna długość produktu PCR [pz]
1	1F – 1R	PCR 4 – amplifikacja sekwencji analizowanej	1060
2	2F – 1R	PCR 1 – amplifikacja sekwencji markerowej	777
3	2F – 4R	PCR 2 – amplifikacja sekwencji wewnętrznej	236
K1-	1F, 2F, 1R, 4R	kontrola ujemna reakcji PCR	brak produktu
4	2F – 3R	amplifikacja fragmentu sekwencji markerowej ograniczonej starterem specyficznym	265
5	3R	amplifikacja z wykorzystaniem startera specyficznego	brak produktu
6	stADP8	amplifikacja z wykorzystaniem startera uniwersalnego	brak produktu
7	3R – stADP8	amplifikacja z wykorzystaniem startera uniwersalnego i specyficznego	brak produktu
K2-	3R, stADP8	kontrola ujemna reakcji PCR	brak produktu PCR

Tabela 32. Startery stosowane w kolejnych mieszaninach reakcyjnych w reakcji PCR na matrycy DNA faga λ, spodziewane produkty amplifikacji.

Doświadczenie wykazało specyficzność amplifikacji sekwencji analizowanej PCR4, sekwencji markerowej PCR1 oraz sekwencji wewnętrznej PCR2, które są obecne w DNA faga λ w jednej kopii. Długość produktów PCR jest zgodna z założeniami teoretycznymi. Doświadczenie wykazało specyficzność amplifikacji sekwencji analizowanej PCR4, sekwencji markerowej PCR1 oraz sekwencji wewnętrznej PCR2,

które są obecne w DNA faga  $\lambda$  w jednej kopii. Długość produktów PCR jest zgodna z założeniami teoretycznymi. Obecność produktu amplifikacji fragmentu sekwencji markerowej z wykorzystaniem startera 3R i 2F (próbą 4) oraz brak produktu w próbie 5 świadczy o tym, że starter 3R specyficznie hybriduje tylko do końca 5' sekwencji markerowej. Brak produktów amplifikacji z wykorzystaniem startera uniwersalnego (próbą 5 i 6) oznacza, iż starter ten nie jest specyficzny względem DNA faga  $\lambda$  i nie łączy się z DNA, które nie zostało poddane wcześniejszej obróbce tj. trawieniu restrykcyjnemu i ligacji z odpowiednim adaptorem. Doświadczenie wykazało, iż zaprojektowane startery mogą być wykorzystane w układach  $\lambda$ -ddLMS PCR.



Rys. 30. Elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentów DNA faga  $\lambda$ ; M1-marker wielkości DNA 100-1000, K1- , K2- kontrole ujemne, 1-7 próby wg tabeli 32.

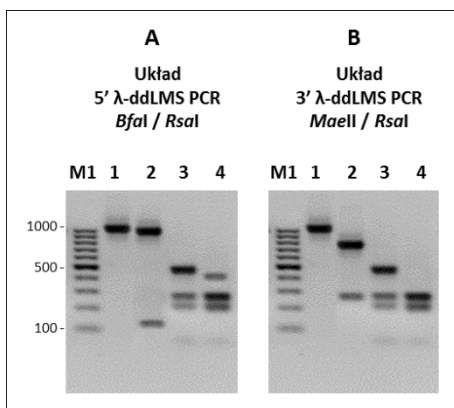
#### 6.2.4.2. Sprawdzenie specyficzności trawienia

Aby sprawdzić specyficzność trawienia enzymów restrykcyjnych dla wybranych układów  $\lambda$ -ddLMS PCR, zamplifikowany fragment sekwencji analizowanej (PCR4) poddałam trawieniu jednym lub dwoma enzymami restrykcyjnymi, zgodnie z opisem przedstawionym w tabeli 33. Wyniki przedstawiłam na rysunku 31.

Lp	OPIS	Ilość produktów	Teoretyczna długość fragmentów DNA[pz]
Układ 5' $\lambda$ -ddLMS PCR			
1	Produkt PCR4 (sekwencja analizowana)	1	1060
2	Trawienie produktu PCR4 enzymem <i>Bfal</i>	2	113, 947
3	Trawienie produktu PCR4 enzymem <i>RsaI</i>	4	58, 223, 285, 494
4	Trawienie produktu PCR4 enzymem <i>Bfal</i> / <i>RsaI</i>	5	55, 58, 223, 285, 439
Układ 3' $\lambda$ -ddLMS PCR			
1	Produkt PCR4 (sekwencja analizowana)	1	1060
2	Trawienie produktu PCR4 enzymem <i>Maell</i>	2	277, 783
3	Trawienie produktu PCR4 enzymem <i>RsaI</i>	4	58, 233, 285, 494
4	Trawienie produktu PCR4 enzymem <i>Maell</i> / <i>RsaI</i>	5	58, 215, 223, 279, 285

Tabela 33. Długość produktów trawienia fragmentu DNA, stanowiącego obszar analizowany PCR4 w różnych układach restrykcyjnych.

Doświadczenie wykazało 100% wydajności trawienia amplifikowanego produktu PCR4 (brak produktu PCR4 o długości 1060 pz w próbach 3, 4 i 5) oraz całkowitą specyficzność trawienia enzymami *Bfal*, *Maell* i *RsaI* (długość fragmentów restrykcyjnych zgodna z założeniami teoretycznymi).



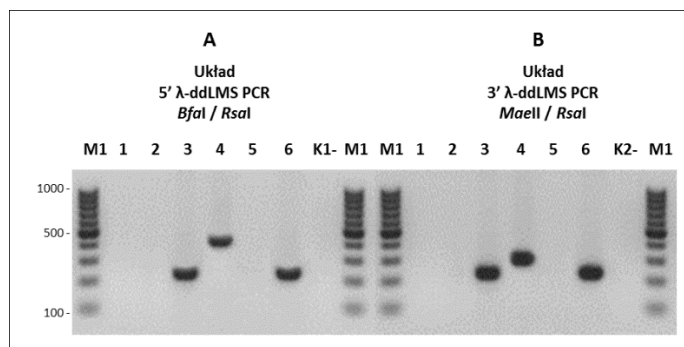
Rys. 31. Elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów trawienia fragmentu PCR4 w układzie (A) 5' λ-ddLMS PCR i (B) 3' λ-ddLMS PCR; M1 – marker wielkości DNA 100-1000; 1-5 kolejne próby wg tabeli 33

### 6.2.4.3. Amplifikacja fragmentu specyficznego

Przeprowadziłam pełną analizę DNA faga λ w układzie 5' λ-ddLMS PCR oraz 3' λ-ddLMS PCR wg procedury przedstawionej w pkt. 5.2.13. W reakcji PCR zastosowałam kombinacje różnych starterów (tab. 34) w celu zbadania obecności sekwencji analizowanej, markerowej i kontrolnej w poddanym obróbce DNA (DNA trawione restrykcyjnie i zligowane z adaptorem). Przeprowadziłam amplifikację specyficzną z udziałem startera specyficznego i uniwersalnego (próba 4) oraz amplifikację niespecyficzną z udziałem jedynie startera uniwersalnego (próba 5). Następnie przeprowadziłam amplifikację sekwencji kontrolnej na specyficznym produkcie PCR (PCR3). Wyniki doświadczenia przedstawiłam na rysunku 32.

	Matryca DNA	startery	cel amplifikacji	teoretyczna długość produktu PCR [pz]
układ 5' λ-ddLMS PCR				
1	mieszana fragmentów restrykcyjnych (DNA faga λ / <i>Bfal</i> / <i>RsaI</i> ) zligowanych z adaptorem ad <i>Bfal</i>	1F – 1R	PCR4 – amplifikacja sekwencji analizowanej	brak produktu
2		2F – 1R	PCR1 – amplifikacja sekwencji markerowej	brak produktu
3		2F – 4R	PCR2 – amplifikacja sekwencji kontrolnej	236
4		stADP8 - 3R	PCR3 - amplifikacja sekwencji specyficznego	467
5		stADP8	amplifikacja z udziałem startera uniwersalnego	brak produktów
6	oczyszczony produkt specyficznego PCR 3	2F – 4R	PCR2 – amplifikacja sekwencji kontrolnej	236
K1-	-	stADP8, 3R	kontrola ujemna reakcji PCR	brak produktów
układ 3' λ-ddLMS PCR				
1	mieszana fragmentów restrykcyjnych (DNA faga λ / <i>MaeIII</i> / <i>RsaI</i> ) zligowanych z adaptorem ad <i>MaeIII</i>	1F – 1R	PCR4 – amplifikacja sekwencji analizowanej	brak produktu
2		2F – 1R	PCR1 – amplifikacja sekwencji markerowej	brak produktu
3		2F – 4R	PCR2 – amplifikacja sekwencji kontrolnej	236
4		stADP8 - 3R	PCR3 - amplifikacja sekwencji specyficznego	303
5		stADP8	amplifikacja z udziałem startera uniwersalnego	brak produktów
6	oczyszczony produkt specyficznego PCR 3	2F – 4R	PCR2 – amplifikacja sekwencji kontrolnej	236
K2-	-	st ADP8, 3R	kontrola ujemna reakcji PCR	brak produktów

Tabela 34. Startery stosowane w kolejnych mieszaninach reakcyjnych w reakcji PCR na matrycy DNA faga λ trawionego restrykcyjnie i zligowanego z adaptorem, spodziewane produkty amplifikacji.



Rys. 32. Elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów amplifikacji w układach λ-ddLMS PCR; M1-marker wielkości DNA, K1-, K2- kontrole ujemne reakcji PCR, 1-7 próby wg tabeli 34.

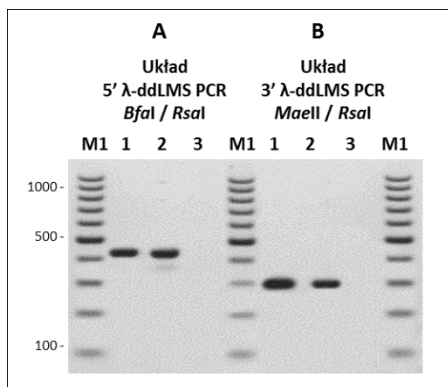
W wyniku analizy DNA faga λ metodą ddLMS PCR w układzie 5' λ-ddLMS PCR oraz 3' λ-ddLMS PCR uzyskałam jeden produkt specyficzny o długości zgodnej z założeniami teoretycznymi (próba 4). W reakcji PCR z wykorzystaniem startera uniwersalnego (próba 5) nie otrzymałam produktów niespecyficznych, zatem fragmenty DNA obustronnie zligowane z adaptorem nie są amplifikowane. Dowodzi to, iż długość adaptora (oligonukleotydu ligowanego) jest odpowiednia w stosunku do długości startera uniwersalnego, aby zaszła supresja w reakcji PCR. Brak produktów amplifikacji sekwencji analizowanej i markerowej w próbie 1 i 2 potwierdza 100% wydajność trawienia DNA faga λ w pierwszym etapie metody. Produkt specyficzny PCR3 zawiera wewnątrz sekwencję kontrolną, której obecność potwierdzono w reakcji PCR (próba 6), zatem jest to spodziewany produkt analizy λ-ddLMS PCR.

#### 6.2.4.4. Sprawdzenie wrażliwości metody λ-ddLMS PCR na kontaminację

Założeniem metody ddLMS PCR jest specyficzność w stosunku do badanego DNA oraz brak wrażliwości na kontaminację DNA. Sekwencja markerowa (PCR1) nie jest obecna ani w bakteryjnym DNA ani w DNA innych fagów, stosowanych w laboratoriach naukowych (sprawdziłam teoretycznie w oparciu o program BLAST na podstawie dostępnej bazy danych NCBI). Zatem układ λ-ddLMS PCR powinien wykazywać specyficzność tylko względem DNA faga λ, a inne DNA, jeżeli jest obecne w mieszaninie reakcyjnej, nie powinno mieć wpływu na wynik analizy. W celu sprawdzenia poprawności przyjętego założenia przeprowadziłam doświadczenie, w którym pełnej analizie poddałam czyste DNA faga λ, DNA faga λ zanieczyszczone mieszaniną bakteryjnego DNA oraz DNA bakteryjne nie zawierające DNA faga λ (tab. 35). Wyniki doświadczenia przedstawiłam na rysunku 33.

	matryca DNA	Obecność produktu specyficznego	Cel
1	Czyste DNA faga λ	+	Amplifikacja produktu specyficznego
2	DNA faga λ zanieczyszczone bakteryjnym DNA*	+	Sprawdzenie specyficzności i wydajności amplifikacji na matrycy DNA faga λ w obecności obcego DNA (kontaminacja)
3	Bakteryjne DNA*	-	Sprawdzenie możliwości amplifikacji produktu specyficznego z wykorzystaniem startera 3R na matrycy bakteryjnego DNA, stanowiącego zanieczyszczenie w próbie 2

Tabela 35. Wykaz matryc DNA poddanych analizie w kierunku badania specyficzności układów λ-ddLMS PCR; \* mieszanina genomowego DNA różnych bakterii.



Rys. 33. Elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów PCR uzyskanych metodą ddLMS PCR w układzie (A) 5'  $\lambda$ -ddLMS PCR oraz (B) 3'  $\lambda$ -ddLMS PCR, z zastosowaniem: (1) czystego DNA faga  $\lambda$  (2) DNA faga  $\lambda$  zanieczyszczonego bakteryjnym DNA, (3) bakteryjnego DNA; M1 – marker wielkości DNA 100-1000, 1-3 kolejne próby wg tabeli 35.

Wyniki doświadczenia wykazały specyficzność obu układów modelowych względem DNA faga  $\lambda$ . Produkty specyficzne otrzymałam tylko dla próby 1 i 2, gdzie DNA faga  $\lambda$  było obecne. W próbie 3 produktu nie otrzymałam, gdyż starter 3R nie jest specyficzny do żadnej sekwencji w bakteryjnym DNA. Wydajność amplifikacji produktu specyficznego jest zbliżona w przypadku próby czystej oraz próby zanieczyszczonej obcym DNA. Zatem zaprojektowane układy modelowe  $\lambda$ -ddLMS PCR w układzie enzymów *Bfal/RsaI* oraz *MaeII/RsaI* z wykorzystaniem startera 3R są specyficzne tylko dla DNA faga  $\lambda$  i nie są wrażliwe na kontaminację DNA.

#### 6.3.4.5. Układ modelowy ddLMS PCR - wnioski

Analiza dwóch układów modelowych 5' $\lambda$ -ddLMS PCR *Bfal/RsaI* oraz 3'  $\lambda$ -ddLMS PCR *MaeII/RsaI* wykazała, że mechanizm molekularny metody ddLMS PCR jest zgodny z założeniami teoretycznymi:

- ✓ w wyniku analizy otrzymuje się jeden, specyficznej długości produkt PCR, zawierający wewnątrz fragment sekwencji markerowej,
- ✓ ilość produktów PCR odpowiada ilości kopii sekwencji markerowej w obrębie badanego DNA,
- ✓ fragmenty restrykcyjne nie zawierające sekwencji markerowej, obustronnie ligowane z adaptorem nie ulegają amplifikacji mimo obecności startera uniwersalnego w mieszaninie reakcyjnej. Podczas reakcji PCR fragmenty te tworzą stabilną strukturę „rakiety tenisowej”, blokując miejsce hybrydyzacji dla startera uniwersalnego,
- ✓ amplifikacja produktu specyficznego, zawierającego wewnątrz sekwencję markerową, jest możliwa tylko na matrycy trawionego i ligowanego z adaptorem DNA, w obecności startera uniwersalnego (komplementarnego do adaptora) i specyficznego (komplementarnego do sekwencji markerowej),
- ✓ kontaminacja obcym DNA na każdym etapie analizy nie wpływa na wydajność i specyficzność amplifikacji produktu specyficznego pod warunkiem, że sekwencja markerowa oraz sekwencja startera specyficznego jest odpowiednio dobrana,
- ✓ dozwolone jest stosowanie egzonukleaz generujących 3' lub 5' końce. Konieczne jest dopasowanie odpowiedniego typu adaptora do wybranego enzymu zewnętrznego. Typ adaptora (3' lub 5') nie

wpływa na specyficzność i wydajność amplifikacji w reakcji PCR.

Sposób selekcji fragmentów DNA ulegających amplifikacji w metodzie ddLMS PCR jest wysoce specyficzny, zatem metoda ddLMS PCR może być z powodzeniem wykorzystana w układach diagnostycznych do specyficznego typowania mikroorganizmów.

### **6.2.5. Zasady projektowania układów diagnostycznych wykorzystujących metodę ddLMS PCR**

Etapy postępowania podczas projektowania układów diagnostycznych, wykorzystujących metodę ddLMS PCR powinny obejmować:

1. Określenie specyficzności układu tzn. układ ma być przeznaczony dla drobnoustrojów jednego gatunku/rodzaju czy dla szerszej grupy drobnoustrojów (np. wszystkich bakterii).
2. Wybór sekwencji markerowej – sekwencja markerowa odpowiada za specyficzność układu. Należy wybrać taką, która występuje u wszystkich drobnoustrojów w danej grupie, dla której przeznaczony jest układ diagnostyczny. Sekwencja nukleotydowa sekwencji markerowej powinna być znana, tak aby można było zaprojektować odpowiedni starter specyficzny.
3. Wybór enzymu wewnętrznego – miejsce cięcia dla enzymu wewnętrznego powinno się znajdować w obrębie sekwencji markerowej, w odcinku o wysokim stopniu zakonserwowania ewolucyjnego dla badanej grupy drobnoustrojów, oddalonym w kierunku 3' od miejsca hybrydyzacji startera specyficznego.
4. Określenie przeznaczenia układu tzn. czy układ ma służyć różnicowaniu czy identyfikacji drobnoustrojów na danym poziomie taksonomicznym.
5. Wybór enzymu zewnętrznego – enzym zewnętrzny odpowiada za poziom dyskryminacji metody; miejsce cięcia w zależności od zastosowania układu powinno znajdować się w różnej bądź tej samej odległości od sekwencji markerowej dla różnych drobnoustrojów badanej grupy.

### **6.2.6. Przykłady układów diagnostycznych opartych o metodę ddLMS PCR**

Projektowanie układów diagnostycznych do różnicowania i identyfikacji drobnoustrojów wymaga przeprowadzenia wstępnej analizy teoretycznej (jeśli dostępna jest sekwencja genomowego DNA) oraz przeprowadzenia szeregu wstępnych eksperymentów. Mechanizm molekularny metody ddLMS PCR pozwala selektywnie amplifikować wybrane fragmenty restrykcyjne pod warunkiem, że układ restrykcyjny oraz starter specyficzny są odpowiednio dobrane.

Zaprojektowałam trzy układy diagnostyczne w oparciu o metodę ddLMS PCR. Przedstawiłam zasady

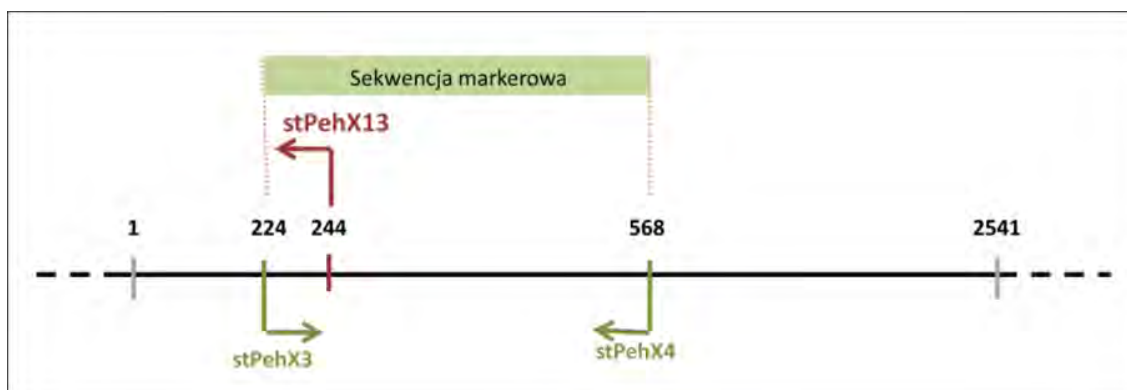
projektowania układów diagnostycznych w przypadku, gdy sekwencja genomowego DNA jest znana oraz w przypadku, gdy dostępna jest dla nas tylko sekwencja markerowa. Opisałam problemy oraz ograniczenia metody ddLMS PCR, które mogą wystąpić podczas projektowania układów diagnostycznych.

### 6.2.6.1. Układ *pehX*-ddLMS PCR do wewnątrzgatunkowego typowania *Klebsiella oxytoca*

Układ *pehX*-ddLMS PCR wykorzystuje polimorfizm sekwencji poprzedzającej gen *pehX* do wewnątrzgatunkowego różnicowania szczepów *K. oxytoca*. Spodziewanym wynikiem analizy jest jeden produkt PCR o długości charakterystycznej dla danego szczepu.

#### 6.2.6.1.1. Sekwencja markerowa i starter specyficzny

Gen *pehX* ma długość 2541 pz, a jego sekwencja wykazuje polimorfizm genetyczny w obrębie gatunku *K. oxytoca*. Sekwencją markerową jest fragment genu *pehX* o długości 344 pz ograniczony starterami stPehX3 i stPehX4, znajdujący się blisko końca 5' genu *pehX* (rys. 34). Sekwencja startera specyficznego (stPehX13) jest komplementarna do końca 5' sekwencji markerowej.

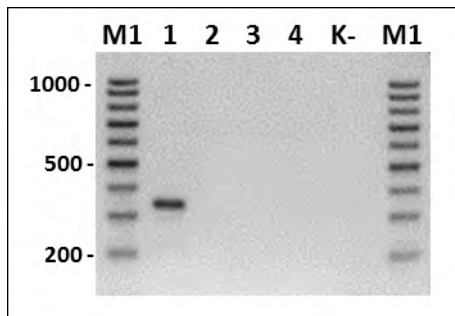


Rys. 34. Schemat przedstawiający położenie sekwencji markerowej oraz miejsc hybrydyzacji startera specyficznego w obrębie sekwencji genu *pehX* w układzie *pehX*-ddLMS PCR.

Aby sprawdzić czy starter specyficzny lub/i starter uniwersalny nie tworzą niespecyficznych produktów PCR, przeprowadziłam reakcję PCR na genomowym DNA jednego szczepu *K. oxytoca* (nr 1, tab. 3), wykorzystując różne kombinacje starterów (tab. 36). Wyniki przedstawiłam na rysunku 35.

	Startery	Cel	Długość produktu PCR [pz]
1	stPehX3 – stPehX4	Amplifikacja sekwencji markerowej fragmentu genu <i>pehX</i>	344
2	stPehX13	Amplifikacja z wykorzystaniem startera specyficznego	brak produktów
3	stADP8	Amplifikacja z wykorzystaniem startera uniwersalnego	brak produktów
4	stPehX13 – stADP8	Amplifikacja z wykorzystaniem startera uniwersalnego i specyficznego	brak produktów
K-	stPehX13 – stADP8	kontrola ujemna reakcji PCR (bez DNA)	brak produktów

Tabela 36. Startery stosowane w kolejnych mieszaninach reakcyjnych w reakcji PCR na matrycy genomowego DNA *K. oxytoca* oraz teoretyczna długość spodziewanych produktów PCR.

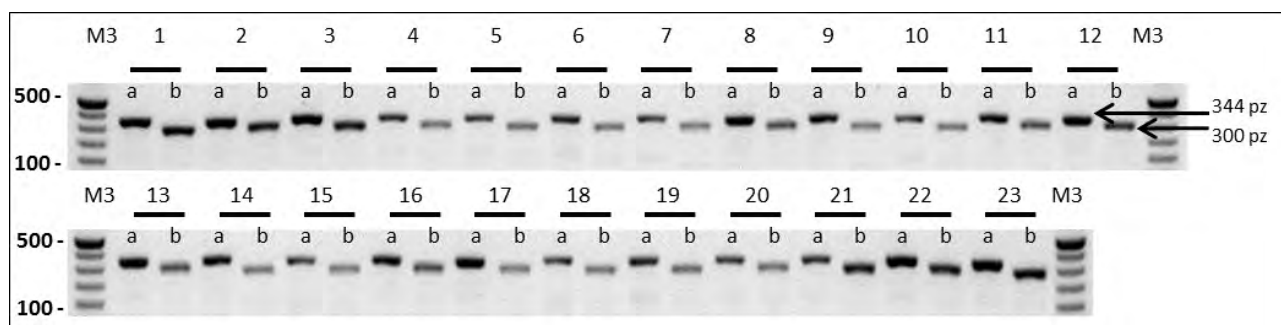


Rys. 35. Elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów amplifikacji w reakcji PCR fragmentu genu *pehX* na matrycy genomowego DNA *K. oxytoca*; M1 marker wielkości DNA 100-1000, K- kontrola ujemna reakcji PCR, 1-4 kolejne próby wg tabeli 36.

Starter specyficzny oraz starter uniwersalny nie tworzą niespecyficznych produktów PCR pomiędzy sobą oraz na matrycy genomowego DNA *K. oxytoca*, zatem mogą być wykorzystane w układzie *pehX*-ddLMS PCR.

### 6.2.6.1.2. Wybór enzymów restrykcyjnych

Układ restrykcyjny *AclI/BalI* został dobrany w oparciu o znaną sekwencję genu *pehX* szczepu *K. oxytoca* VN13 (GeneBank AY065648). Enzym wewnętrzny (*BalI*) dokonuje cięcia DNA w stałym miejscu w obrębie sekwencji markerowej (w odległości 44 pz od końca 5' sekwencji markerowej) dla wszystkich badanych szczepów *K. oxytoca*, co zostało potwierdzone metodą PCR/RFLP (rys. 36).



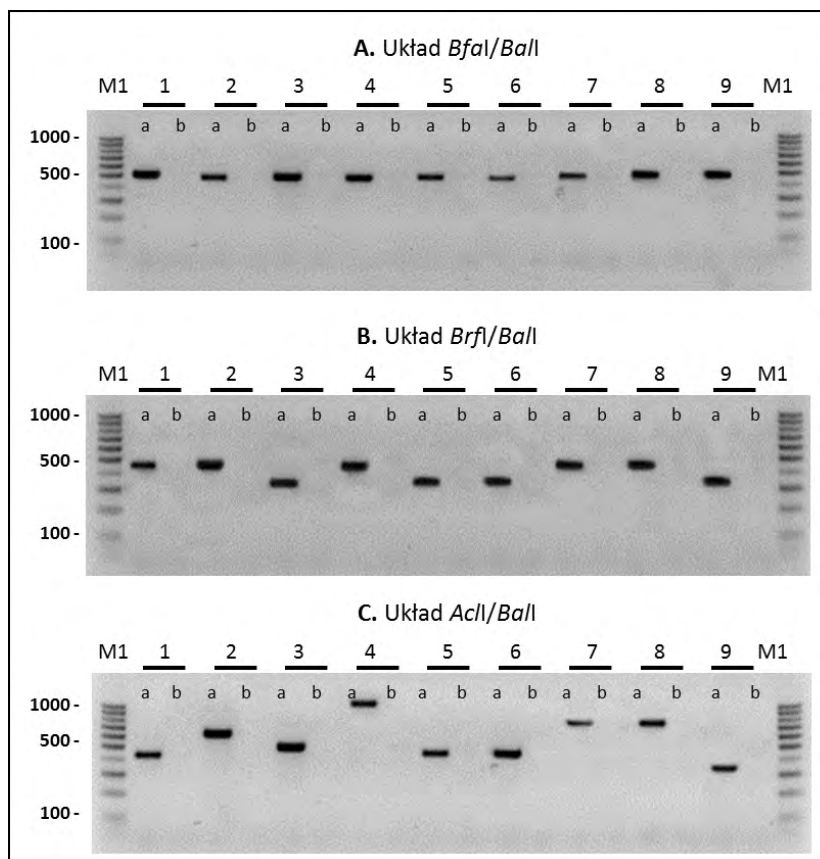
Rys. 36. Elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów trawienia restrykcyjnego amplifikowanego fragmentu genu *pehX* enzymem *BalI* (PCR/RFLP); (a) amplifikowany fragment genu *pehX* o długości 344pz (sekwencja markerowa), (b) fragment DNA o długości 300pz powstały po trawieniu fragmentu 344 pz enzymem *BalI* (drugi fragment o długości 44 pz ze względu na niewielki rozmiar jest niewidoczny na żelu), M3-marker wielkości DNA 100-500, 1-23 szczepy *K. oxytoca*.

Wybór enzymu zewnętrznego (*AclI*) w skutek braku znajomości sekwencji otaczającej gen *pehX* przeprowadziłam na drodze eksperymentalnej. W pierwszej kolejności wytypowałam enzymy, które rozpoznają sekwencję sześć- lub czteronukleotydomową, generują jednoniciowe końce i nie trawią DNA w obrębie sekwencji genu *pehX*. Następnie przeprowadziłam pełną analizę metodą *pehX*-ddLMS PCR dla jednego szczepu *K. oxytoca* (nr 1, tab. 3) w różnych układach restrykcyjnych (enzym *BalI* oraz wytypowany enzym zewnętrzny). Do dalszej analizy wybrałam te układy restrykcyjne, dla których otrzymałam produkt PCR: (1) *Bfal/BalI*, (2) *Bfri/BalI* i (3) *AclI/BalI*. Aby sprawdzić, który z wytypowanych enzymów zewnętrznych umożliwi wewnątrzgatunkowe różnicowanie szczepów *K. oxytoca* (tnie DNA w różnej odległości od końca 5' sekwencji markerowej dla różnych szczepów *K. oxytoca*) przeprowadziłam doświadczenie, w którym pełnej analizie w trzech układach restrykcyjnych poddałam 9 szczepów *K. oxytoca* (szczepy wzorcowe nr 1-9, tab. 3). Wyniki przedstawiłam na rysunku 37.

We wszystkich układach restrykcyjnych dla wszystkich badanych szczepów *K. oxytoca* otrzymano jeden, specyficzny produkt PCR. W pierwszym układzie *Bfal/BalI* długość produktu PCR jest stała (nie rozróżnialna klasycznymi technikami elektroforetycznymi) dla wszystkich szczepów i wynosi ok 300 pz.

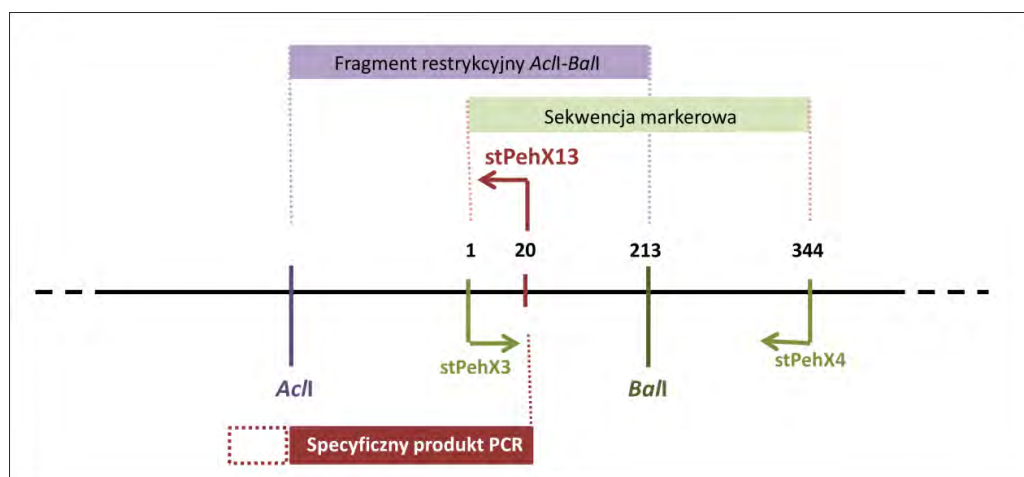


W drugim układzie *Bfrl/Ball* widoczne są produkty PCR o dwóch różnych długościach: ok. 330 i 470 pz. Układ trzeci *Acll/Ball* wykazuje najwyższy poziom dyskryminacji. Dla każdego szczepu otrzymałam innej długości produkt PCR, z wyjątkiem szczepów o tym samym genotypie (odwołując się do analizy PCR MP, rys. 15). Różnice w długości produktów są wystarczające, aby na ich podstawie różnicować szczepy *K. oxytoca*.



Rys. 37. Elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów PCR uzyskanych metodą *pehX*-ddLMS PCR w trzech układach restrykcyjnych (A) *Bfal/Ball*, (B) *Bfrl/Ball* i (C) *Acll/Ball*; M1 – marker wielkości DNA 100-1000, 1-9 szczepy wzorcowe *K. oxytoca* (wg tab. 3), (a) produkt reakcji PCR z udziałem startera specyficznego i uniwersalnego, (b) produkt reakcji PCR z udziałem startera uniwersalnego.

Do wewnątrzgatunkowego typowania *K. oxytoca* wybrałam układ restrykcyjny *Acll/Ball*, który przedstawiłam schematycznie na rysunku 38.



Rys. 38. Schemat przedstawiający położenie miejsc restrykcyjnych oraz miejsc hybrydyzacji starterów względem sekwencji markerowej w układzie *pehX*-ddLMS PCR *Acll/Ball*; w długości specyficznego produktu PCR uwzględniono długość adaptora (zaznaczono linią przerywaną).

### 6.2.6.1.3. Specyficzność układu *pehX*-ddLMS PCR

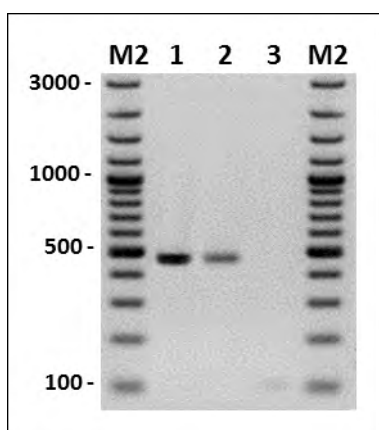
Badanie specyficzności metody *pehX*-ddLMS PCR w układzie *AclI/BalI* przeprowadziłam doświadczalnie na 30 szczepach należących do gatunków: *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. marcescens* (po 5 szczepów z każdego gatunku). Wynikiem analizy dla wszystkich szczepów jest brak produktu PCR (wynik negatywny), zatem układ ten jest specyficzny tylko względem *K. oxytoca*.

Mieszaninę genomowego DNA różnych szczepów bakteryjnych nie należących do gatunku *K. oxytoca*, mieszałam z genomowym DNA szczepu *K. oxytoca* (nr 1, tab. 3) w proporcji 1:1 i przeprowadziłam typowanie metodą *pehX*-ddLMS PCR w układzie *AclI/BalI*, sprawdzając wrażliwość metody na kontaminację (tab. 37). Wyniki przedstawiłam na rysunku 39.

Próba	Genomowe DNA dodane do etapu trawienia w metodzie <i>pehX</i> -ddLMS PCR		Spodziewany wynik analizy
	DNA <i>K. oxytoca</i>	mieszanina DNA bakterii różnych gatunków	
1	+	-	produkt ok 470 pz
2	+	+	produkt ok 470 pz
3	-	+	brak produktu PCR

Tabela 37. Genomowe DNA dodawane do kolejnych prób analizowanych metodą *pehX*-ddLMS PCR.

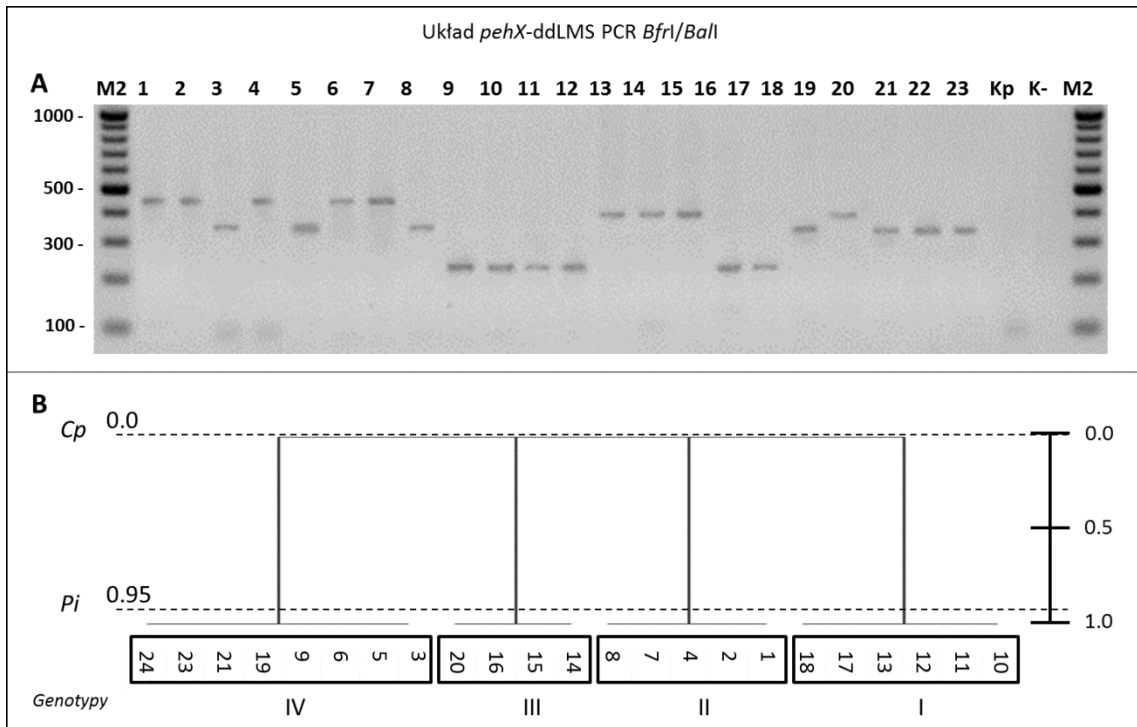
Wprowadzenie na etapie trawienia restrykcyjnego DNA innego gatunku bakterii nie wpływa na wynik analizy. Produkt specyficzny otrzymałam tylko dla próby 1 i 2, gdzie było obecne DNA *K. oxytoca*. Niższe stężenie produktu PCR w próbce 2 może wiązać się z tym, iż stężenie genomowego DNA *K. oxytoca* zostało dodane w objętości dwukrotnie mniejszej niż w próbce 1. Negatywny wynik analizy w próbce 3 potwierdza specyficzność układu *pehX*-ddLMS PCR względem *K. oxytoca*.



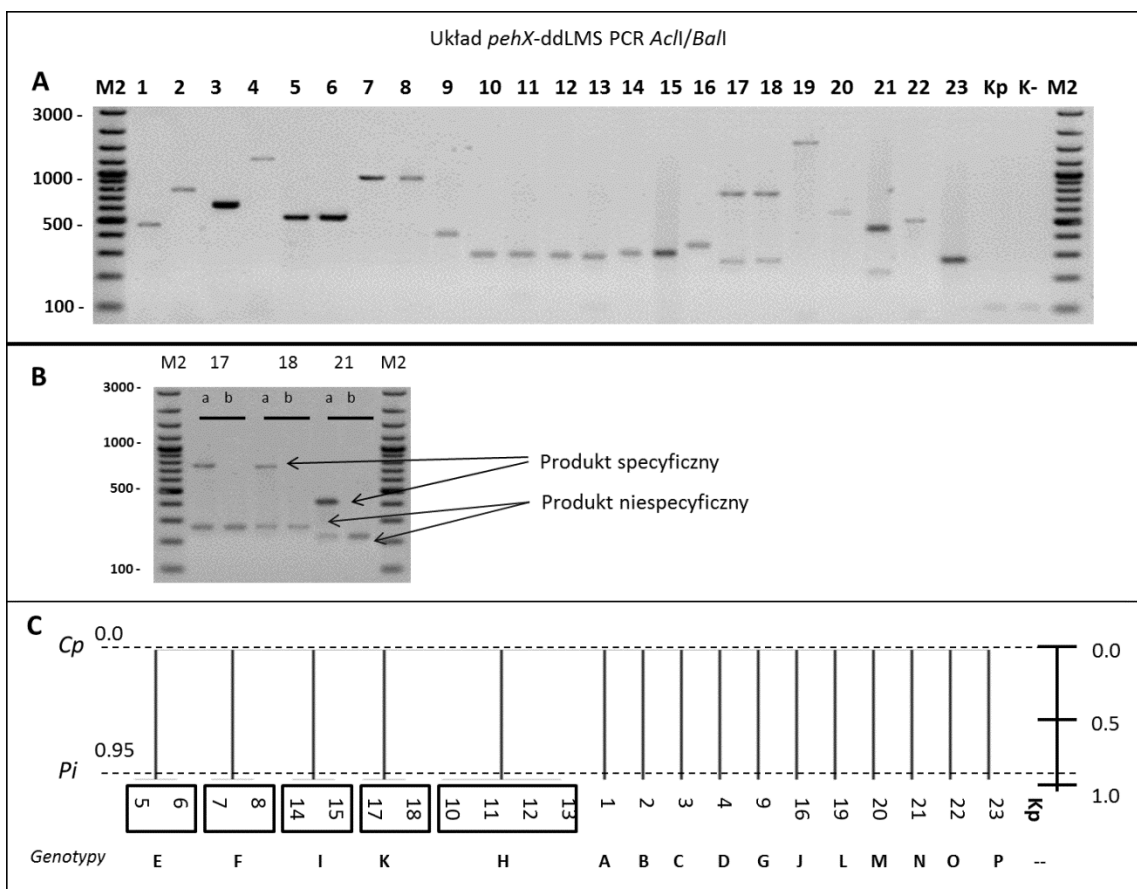
Rys. 39. Elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów PCR uzyskanych metodą *pehX*-ddLMS PCR dla prób zawierających genomowe DNA *K. oxytoca* oraz DNA innych bakterii; M2 – marker wielkości DNA 100-3000, 1-3 kolejne próby wg tabeli 37.

### 6.2.6.1.4. Typowanie *K. oxytoca*

Przeprowadziłam typowanie dla 23 szczepów *K. oxytoca* oraz szczepu *K. pneumoniae* metodą *pehX*-ddLMS PCR w układach: (1) *Bfal/BalI*, (2) *BfrI/BalI* oraz (3) *AclI/BalI*. Wyniki dla układu 2 i 3 przedstawiłam na rysunkach 40-41.



Rys. 40. Wynik typowania genetycznego metodą *pehX*-ddLMS PCR *BfrI/BalI* dla szczepów *K. oxytoca* i *K. pneumoniae*: (A) elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów PCR, (B) dendrogram podobieństwa genetycznego, wyznaczony z wykorzystaniem współczynnika Dice'a oraz metody UPGMA; M2 – marker wielkości DNA 100-3000, 1-23 szczepy *K. oxytoca*, Kp – *K. pneumoniae*, K- kontrola ujemna reakcji PCR, I - IV genotypy,  $C_p$  – całkowite podobieństwo,  $P_i$  – poziom identyczności.



Rys. 41. Wynik typowania genetycznego metodą *pehX*-ddLMS PCR w układzie *AcII/BalI* dla szczepów *K. oxytoca* i *K. pneumoniae*: (A) elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów PCR, (B) elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów PCR w (a) układzie specyficznym z udziałem startera specyficznego i uniwersalnego i (b) w układzie niespecyficznym z udziałem startera uniwersalnego, (C) dendrogram podobieństwa genetycznego, wyznaczony z wykorzystaniem współczynnika Dice'a oraz metody UPGMA; M2 – marker wielkości DNA 100-3000, 1-23 szczepy *K. oxytoca*, Kp – *K. pneumoniae*, K- kontrola ujemna reakcji PCR, A-P genotypy,  $C_p$  – całkowite podobieństwo,  $P_i$  – poziom identyczności.

W układzie 1 (*Bfal/BalI*) otrzymałam dla wszystkich szczepów *K. oxytoca* jeden, tej samej długości produkt PCR (ok 300 pz). Produkt ten, podobnie jak fragment genu *pehX* o długości 344 pz, jest specyficzny dla gatunku *K. oxytoca*. W układzie 2 (*BfrI/BalI*) wyodrębniłam cztery różnej długości produkty PCR: (I) 220, (II) 470, (III) 400 i (IV) 330 pz, odpowiadające czterem różnym genotypom (I-IV).

Długość produktów PCR otrzymanych w układzie 3 (*AccI/BalI*) jest różna dla różnych szczepów i waha się od 250 do prawie 2000 pz. Dla części szczepów (na rys. 41A: próba 17, 18, 21) uzyskałam więcej niż jeden produkt PCR. Aby zbadać źródło powstawania produktów niespecyficznych przeprowadziłam dla tych prób dodatkową reakcję PCR z pominięciem startera specyficznego, wykorzystując jedynie starter uniwersalny (rys. 41B, próba „b”, niespecyficzna). Doświadczenie wykazało, że niespecyficzne produkty są wynikiem amplifikacji krótkich fragmentów DNA obustronnie zligowanych z adaptorem. Fragmenty te są zbyt krótkie, aby mogły utworzyć stabilną strukturę „rakiety tenisowej”. Obecność produktów niespecyficznych nie wpływa jednak na zmianę ilości genotypów. Porównanie genotypów otrzymanych metodami *pehX*-ddLMS PCR i PCR MP dla wybranych szczepów *K. oxytoca* przedstawia tabela 38.

lp	szczep	Genotyp <i>pehX</i> -ddLMS PCR (długość produktu PCR [pz])			genotyp PCR MP
		(1) <i>Bfal/BalI</i>	(2) <i>BfrI/BalI</i>	(3) <i>AccI/BalI</i>	
1	<i>K. oxytoca</i> K26	I (300)	II (470)	A (474)	A
2	<i>K. oxytoca</i> K29		II (470)	B (802)	B
3	<i>K. oxytoca</i> K32		IV (330)	C (633)	C
4	<i>K. oxytoca</i> K41		II (220)	D (1275)	D
5	<i>K. oxytoca</i> K44		IV (330)	E (527)	E
6	<i>K. oxytoca</i> K65		IV (330)	E (527)	E
7	<i>K. oxytoca</i> K66		II (470)	F (954)	F
8	<i>K. oxytoca</i> K68		II (470)	F (954)	F
9	<i>K. oxytoca</i> K72		IV (330)	G (410)	G
10	<i>K. oxytoca</i> (1)		I (220)	H (295)	H
11	<i>K. oxytoca</i> (2)		I (220)	H (295)	H
12	<i>K. oxytoca</i> (3)		I (220)	H (295)	H
13	<i>K. oxytoca</i> (4)		I (220)	H (295)	H
14	<i>K. oxytoca</i> (5)		III (400)	I (315)	I
15	<i>K. oxytoca</i> (6)		III (400)	I (315)	I
16	<i>K. oxytoca</i> (7)		III (400)	J (345)	J
17	<i>K. oxytoca</i> (8)		I (220)	K (747*)	K
18	<i>K. oxytoca</i> (9)		I (220)	K (747*)	K
19	<i>K. oxytoca</i> (10)		IV (330)	L (1679)	L
20	<i>K. oxytoca</i> (11)		III (400)	M (595)	M
21	<i>K. oxytoca</i> (12)		IV (330)	N (450*)	N
22	<i>K. oxytoca</i> (13)		IV (330)	O (505)	O
23	<i>K. oxytoca</i> (14)		IV (330)	P (273)	P
Kp	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	R

Tabela 38. Wynik typowania genetycznego metodą PCR MP oraz *pehX*-ddLMS PCR w różnych układach restrkcyjnych; \*brano pod uwagę tylko produkt specyficzny

Poziom dyskryminacji metody *pehX*-ddLMS PCR w układzie *AccI/BalI* jest porównywalny z metodą PCR MP. W obu metodach typowanie pozwoliło wyróżnić 15 genotypów (A-P). Grupowanie szczepów do tego samego genotypu jest identyczne. Metodą *pehX*-ddLMS PCR odróżnia od metody PCR MP to, że dla

szczepu *K. pneumoniae* wynik analizy jest negatywny (brak produktu PCR we wszystkich układach restrykcyjnych). Stąd wniosek, że metoda *pehX*-ddLMS PCR w układzie *AclI/BalI* ma nie tylko wystarczający potencjał różnicujący do typowania genetycznego szczepów *K. oxytoca*, ale również potwierdza, że badane szczepy zostały prawidłowo przypisane do gatunku.

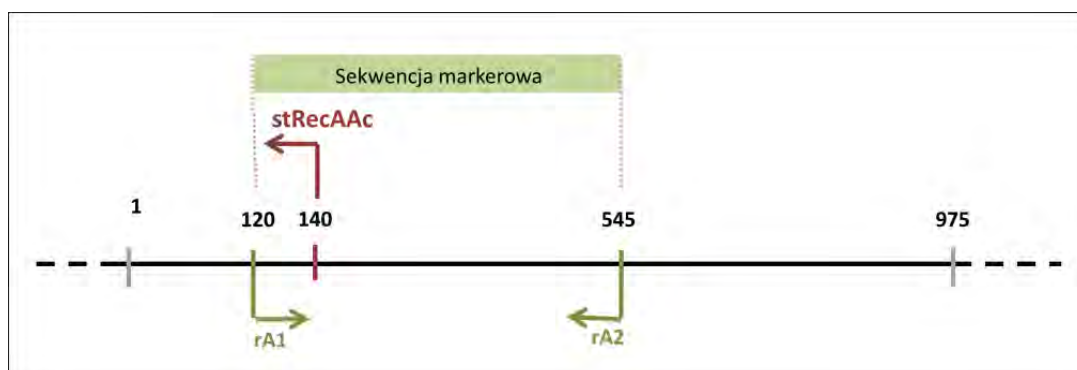
Wynik analizy metodą *pehX*-ddLMS PCR w układzie *AclI/BalI* jest czytelny i łatwy w interpretacji, jednak nie daje możliwości oceny podobieństwa genetycznego pomiędzy szczepami (oddalenie miejsca restrykcyjnego od końca 5' sekwencji markerowej nie jest proporcjonalne do stopnia podobieństwa szczepów). Możliwe jest jedynie wyznaczenie podobieństwa w konwencji binarnej, gdzie "0" oznacza różne genotypy, a "1" oznacza genotypy identyczne. Wyznaczenie względnego podobieństwa pomiędzy badanymi szczepami (grupowanie genotypów) jest możliwe tylko na podstawie porównania wyników typowania tej samej grupy szczepów w co najmniej dwóch układach o różnym stopniu dyskryminacji (np. *BfrI/BalI* i *AclI/BalI*).

#### 6.2.6.2. Układ *recA*-ddLMS PCR do typowania szczepów *Acinetobacter* sp.

Układ *recA*-ddLMS PCR wykorzystuje polimorfizm sekwencji poprzedzającej gen *recA* do genomogatunkowego różnicowania szczepów *Acinetobacter* sp. Spodziewanym produktem analizy jest produkt PCR o długości charakterystycznej dla danego genomogatunku *Acinetobacter*.

##### 6.2.6.2.1. Sekwencja markerowa i starter specyficzny

Gen *recA* *A. baumannii* ATCC 17978 ma długość 975 pz (Gene ID: 4918360), a jego sekwencja wykazuje polimorfizm genetyczny w obrębie *Acinetobacter* sp. Sekwencją markerową jest fragment genu *recA* o długości 425 pz ograniczony starterami rA1 i rA2 (rys. 42). Fragment ten jest zsekwencjonowany dla 43 szczepów należących do 23 różnych gatunków *Acinetobacter*. Sekwencja startera specyficznego (*stRecAAc*) jest komplementarna do końca 5' sekwencji markerowej.



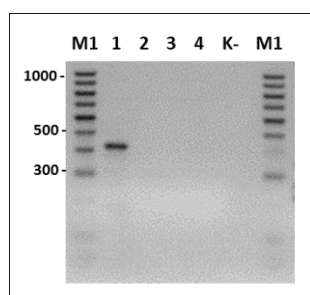
Rys. 42. Schemat przedstawiający położenie sekwencji markerowej oraz miejsce hybrydizacji startera specyficznego w obrębie sekwencji genu *recA* w układzie *recA*-ddLMS PCR

Aby sprawdzić czy starter specyficzny lub/i starter uniwersalny nie tworzą niespecyficznych produktów PCR, przeprowadziłam reakcję PCR na genomowym DNA referencyjnego szczepu *A. baumannii*

ATCC 17978 (nr1, tab. 1), wykorzystując różne kombinacje starterów (tab. 39). Wyniki przedstawiłam na rysunku 43.

	Startery	Cel	Długość produktu PCR [pz]
1	rA1 – rA2	Amplifikacja sekwencji markerowej fragmentu genu <i>recA</i>	425
2	stRecAAc	Amplifikacja z wykorzystaniem startera specyficznego	brak produktów
3	stADP8	Amplifikacja z wykorzystaniem startera uniwersalnego	brak produktów
4	stRecAAc – stADP8	Amplifikacja z wykorzystaniem startera uniwersalnego i specyficznego	brak produktów
K-	stRecAAc – stADP8	kontrola ujemna reakcji PCR (bez DNA)	brak produktów

Tabela 39. Startery stosowane w kolejnych mieszaninach reakcyjnych w reakcji PCR na matrycy genomowego DNA *A. baumannii* ATCC 17978 oraz teoretyczna długość spodziewanych produktów.

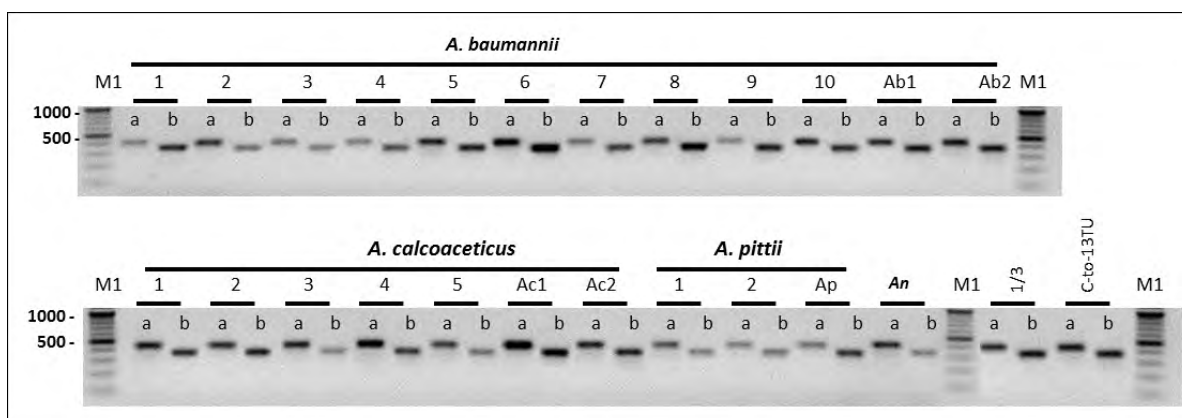


Rys. 43. Elektroforetyczny rozdział w 2% żeli agarozowym produktów amplifikacji w reakcji PCR fragmentu genu *recA* na matrycy genomowego DNA *A. baumannii* ATCC 17978; M1 - marker wielkości DNA 100- 1000, K- kontrola ujemna reakcji PCR, 1-4 kolejne próby wg tabeli 39.

Starter specyficzny oraz starter uniwersalny nie tworzą niespecyficznych produktów pomiędzy sobą oraz na matrycy genomowego DNA *A. baumannii*, zatem mogą być wykorzystane w układzie *recA*-ddLMS PCR.

### 6.2.6.2.2. Wybór enzymów restrykcyjnych

Układ restrykcyjny *Maell/RsaI* został dobrany na podstawie porównania sekwencji fragmentu genu *recA* dla 22 różnych gatunków *Acinetobacter* oraz na podstawie genomowego DNA dla 6 różnych szczepów *A. baumannii* oraz 1 szczepu *A. calcoaceticus*. Enzym wewnętrzny (*RsaI*) dokonuje cięcia DNA w stałym miejscu w obrębie sekwencji markerowej (w odległości 66 pz od końca 5' sekwencji markerowej) dla wszystkich szczepów *Acinetobacter*, co zostało potwierdzone metodą PCR/RFLP (rys. 44 – wynik dla wybranych szczepów należących do kompleksu ACB).



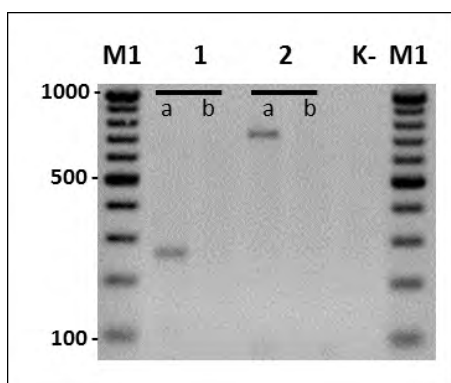
Rys. 44. Elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów trawienia restrykcyjnego amplifikowanego fragmentu genu *recA* enzymem *RsaI* (PCR/RFLP); (a) amplifikowany fragment genu *recA* o długości 425pz (sekwencja markerowa), (b) fragment DNA o długości 359 pz powstały po trawieniu fragmentu 425 pz enzymem *RsaI* (drugi fragment o długości 66 pz ze względu na niewielki rozmiar jest niewidoczny na żelu); M1-marker wielkości DNA 100-1000, 1-10 szczepy kliniczne *Acinetobacter* spp., Ab1, Ab2, Ac2, Ac2, Ap, An, 1/3, c-to13TU – szczepy referencyjne i wzorcowe (wg tab. 1,2).

Aby wybrać enzym zewnętrzny (*Maell*) przeprowadziłam teoretyczną analizę porównawczą sekwencji 7 szczepów *Acinetobacter*, dla których dostępna jest sekwencja genomowego DNA. Pod uwagę wzięłam sekwencję fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu genomowego DNA enzymem *RsaI*, zawierających wewnątrz sekwencję markerową (fragmenty *RsaI* - *RsaI*). Podobieństwo sekwencji poprzedzającej gen *recA* dla szczepów tego samego gatunku wynosi 99% (analiza porównawcza wykonana w programie VNTI, pkt.5.2.12). Wybrałam enzym *Maell*, który trawi DNA w różnej odległości od końca 5' sekwencji markerowej dla szczepów *A. baumannii* i *A. calcoaceticus* (tab. 40).

Lp	Gatunek	szczep	GenBank Ref	Teoretyczna długość produktu specyficznego (z uwzględnieniem długości adaptora)
1	<i>A. baumannii</i>	ATCC17978	NC_009085.1	244 (276)
2		AYE	NC_010410.1	
3		SDF	NC_010400.1	
4		ACICU	NC_010611.1	
5		AB0057	NC_011586.1	
6		AB307-0294	NC_011595.1	
7	<i>A. calcoaceticus</i>	PHEA-2	NC_016603.1	729 (761)

Tabela 40. Teoretyczna długość fragmentów specyficznych oraz produktów PCR dla referencyjnych szczepów *Acinetobacter* sp.

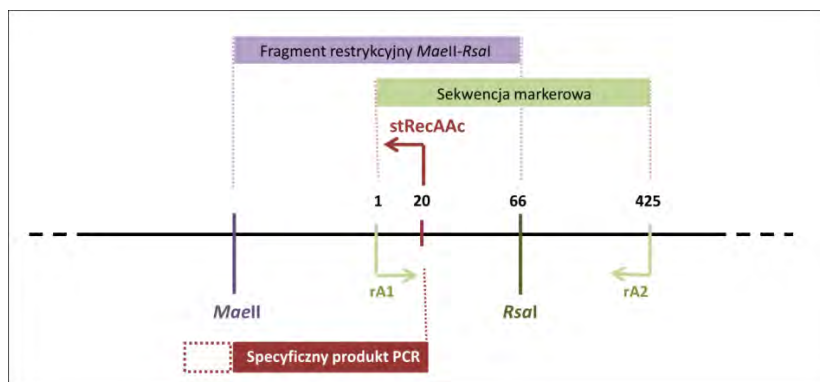
Przeprowadziłam pełną analizę metodą *recA*-ddLMS PCR w układzie *Maell/RsaI* dla dwóch szczepów referencyjnych: (1) *A. baumannii* i (2) *A. calcoaceticus*. Reakcję PCR przeprowadziłam w dwóch układach: (a) specyficznym, z zastosowaniem startera specyficznego i uniwersalnego oraz (b) niespecyficznym, z zastosowaniem jedynie startera uniwersalnego. Wyniki zostały przedstawione na rysunku 45.



Rys. 45. Elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów PCR metodą *recA*-ddLMS PCR dla dwóch referencyjnych szczepów (1) *A. baumannii* i (2) *A. calcoaceticus*, w dwóch układach: (a) specyficznym z udziałem startera specyficznego i uniwersalnego, (b) niespecyficznym, z udziałem startera uniwersalnego; M1 – marker wielkości DNA 100-1000, K- kontrola ujemna reakcji PCR.

Otrzymałam produkty specyficzne o długości zgodnej z wartością teoretyczną (tab. 40). Długość produktu dla *A. baumannii* znacząco różni się od produktu otrzymanego dla *A. calcoaceticus*, co ułatwia prawidłową identyfikację gatunkową. Wybrany układ enzymów *Maell/RsaI* nie generuje fragmentów niespecyficznych, o czym świadczy negatywny wynik reakcji PCR z wykorzystaniem wyłącznie startera uniwersalnego (próbna b).

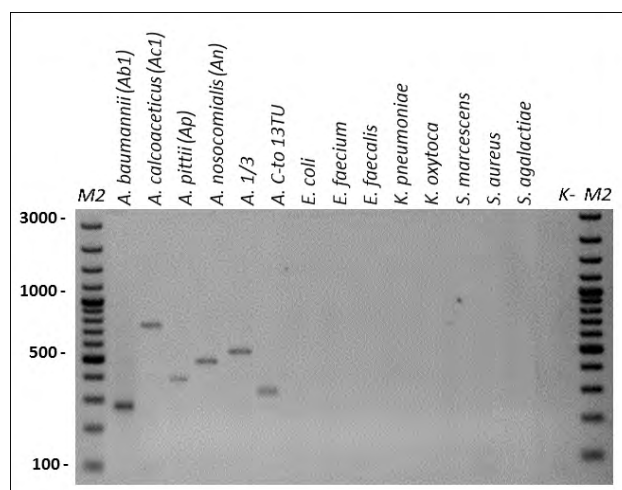
Układ *Maell/RsaI* do typowania genomogatkunków *Acinetobacter* przedstawiłam na rysunku 46.



Rys. 46. Schemat przedstawiający położenie miejsc restrykcyjnych oraz miejsc hybrydacji starterów względem sekwencji markerowej w układzie *recA*-ddLMS PCR *Maell/RsaI*; długość specyficznego produktu PCR uwzględnia długość adaptora (zaznaczono linią przerywaną).

### 6.2.6.2.3. Specyficzność układu *recA*-ddLMS PCR

Badanie specyficzności metody *recA*-ddLMS PCR w układzie *Maell/RsaI* przeprowadziłam doświadczalnie na 40 szczepach należących do gatunków: *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. marcescens*, *K. oxytoca* i *K. pneumoniae* (po 5 szczepów z każdego gatunku). Dla wszystkich wymienionych szczepów nie uzyskałam produktu PCR (wynik negatywny, rys. 47).



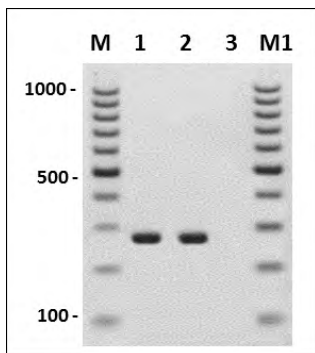
Rys. 47. Elektroforetyczny rozdziel w 1,5% żelu agarozowym produktów PCR uzyskanych metodą *recA*-ddLMS PCR dla szczepów *Acinetobacter* ACB oraz szczepów bakteryjnych nie należących do rodzaju *Acinetobacter*; M2 – marker wielkości DNA 100-3000, K- kontrola ujemna reakcji PCR.

Mieszaninę genomowego DNA różnych szczepów bakteryjnych nie należących do rodzaju *Acinetobacter*, zmieszałam z genomowym DNA referencyjnego szczepu *A. baumannii* ATCC 17978 (nr 1, tab. 4) w proporcji 1:1 i przeprowadziłam typowanie metodą *recA*-ddLMS PCR w układzie *Maell/RsaI*, sprawdzając wrażliwość metody na kontaminację (tab. 41). Wyniki przedstawiłam na rysunku 48.

próba	Genomowe DNA dodane do etapu trawienia w metodzie <i>recA</i> -ddLMS PCR		Spodziewany wynik analizy
	DNA <i>A. baumannii</i> ATCC 17978	mieszanina DNA bakterii innych gatunków	
1	+	-	produkt 276 pz
2	+	+	produkt 276 pz
3	-	+	brak produktu PCR

Tabela 41. Genomowe DNA dodawane do kolejnych prób analizowanych metodą *recA*-ddLMS PCR.



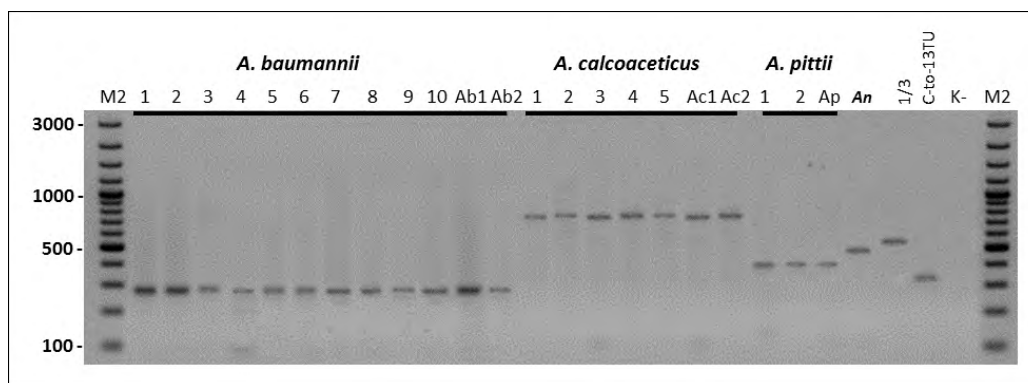


Rys. 48. Elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów PCR uzyskanych metodą *recA*-ddLMS PCR dla prób zawierających genomowe DNA *A. baumannii* ATCC 17978 oraz DNA innych bakterii; M1- marker wielkości DNA 100-1000, 1-3 kolejne próby wg tab. 41.

Wprowadzenie na etapie trawienia restrykcyjnego DNA innego gatunku bakterii nie wpływa na wynik analizy. Produkt specyficzny otrzymałam tylko dla próby 1 i 2, gdzie DNA *A. baumannii* było obecne. Wprowadzenie na etapie trawienia restrykcyjnego DNA innego gatunku bakterii (nie należącego do rodzaju *Acinetobacter*) nie wpływa na wynik analizy. Negatywny wynik w próbie 3 potwierdza specyficzność układu względem *Acinetobacter*.

#### 6.1.6.2.4. Typowanie *Acinetobacter* spp.

W celu sprawdzenia potencjału różnicującego metody *recA*-ddLMS PCR w układzie *Maell/RsaI* przebadalam 25 szczepów *Acinetobacter* należących do kompleksu ACB. Wyniki przedstawiłam na rysunku 49.



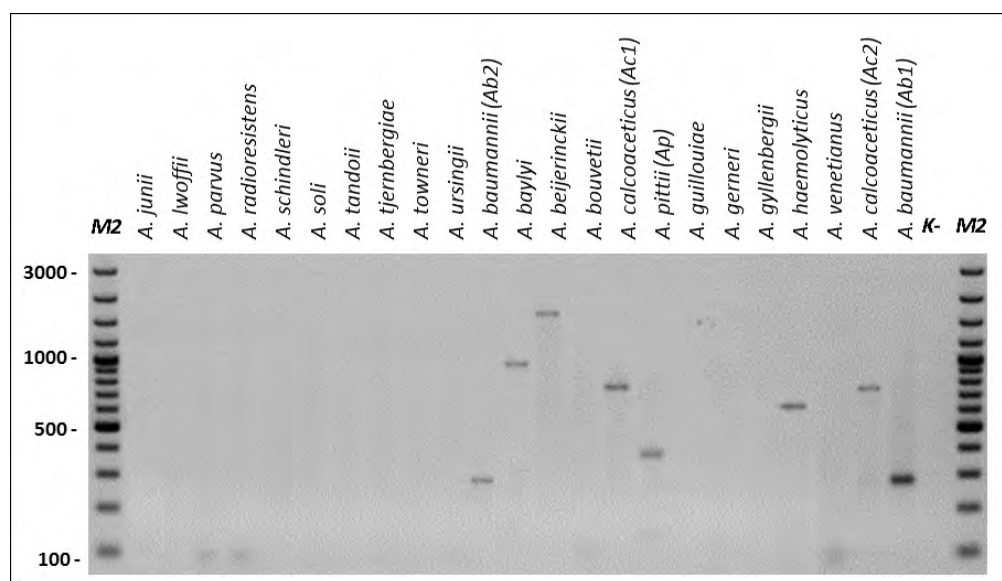
Rys. 49. Elektroforetyczny rozdział w 1% żelu agarozowym wyników typowania metodą *recA*-ddLMS PCR *Maell/RsaI* referencyjnych i klinicznych szczepów *Acinetobacter* z kompleksu ACB; M2 - marker wielkości DNA 100-3000, 1 -10 szczepy kliniczne i środowiskowe, Ab1, Ab2, Ac1, Ac2, Ap, An, 1/3, C-to-13TU – szczepy referencyjne i wzorcowe (wg tab. 1,2), K- kontrola ujemna reakcji PCR.

Wstępne badania wykazały, że metoda *recA*-ddLMS PCR z w układzie enzymów *Maell/RsaI* pozwala specyficznie typować szczepy *Acinetobacter* należące do kompleksu ACB. Dla wszystkich badanych szczepów otrzymałam jeden produkt PCR, którego długość (obliczona za pomocą programu Quantity One 4.3.1, pkt. 5.2.15) jest stała dla danego genomogatunku. (tab. 42).

Lp	Gatunek (symbol)	Wielkość produktów amplifikacji otrzymanych w wyniku typowania metodą <i>recA</i> -ddLMS PCR w układzie <i>Maell-RsaI</i> [pz]
1	<i>Acinetobacter baumannii</i> (Ab)	276
2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (Ac)	761
3	<i>Acinetobacter pittii</i> (Ap)	382
4	<i>Acinetobacter nosocomialis</i> (An)	444
5	<i>Acinetobacter</i> „between 1 and 3” (1/3)	553
6	<i>Acinetobacter</i> „close to 13TU” (c-to-13TU)	337

Tabela 42. Przybliżone długości produktów PCR otrzymanych w wyniku analizy szczepów *Acinetobacter* spp. metodą *recA*-ddLMS PCR w układzie *Maell/RsaI*.

Aby sprawdzić czy układ *recA*-ddLMS PCR jest użyteczny w typowaniu innych genomogatków *Acinetobacter* spp. przeprowadziłam doświadczenie, w którym pełnej analizie poddałam 23 referencyjne szczepy *Acinetobacter* należące do 21 genomogatków (tab. 1). Wyniki przedstawiłam na rysunku 50.



Rys. 50. Elektroforetyczny rozdział w 1% żelu agarozowym wyników typowania metodą *recA*-ddLMS PCR w układzie *MaeII/RsaI* referencyjnych szczepów *Acinetobacter* sp. (wg tab. 1); M2- marker wielkości DNA 100-3000, K- kontrola ujemna reakcji PCR.

Wynik pozytywny (produkt PCR) otrzymałam tylko dla 9 różnych genomogatków *Acinetobacter*, w tym 6 należących do kompleksu ACB. Dla pozostałych genomogatków wynik typowania jest negatywny (brak produktu PCR). Prawdopodobnie u tych genomogatków miejsce trawienia enzymem *RsaI* znajduje się bliżej końca 5' sekwencji markerowej, niż miejsce trawienia enzymem *MaeII* (w wyniku trawienia fragment restrykcyjny zawierający sekwencję markerową jest obustronnie trawiony enzymem *RsaI* i nie łączy się z adaptorem, w skutek czego nie może być amplifikowany w reakcji PCR).

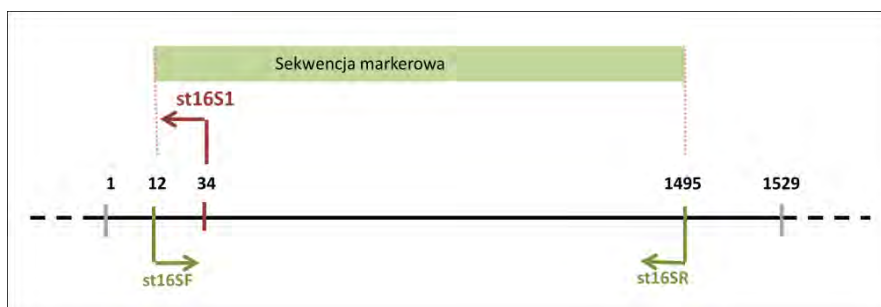
Metoda *recA*-ddLMS PCR daje czytelny wynik, dużo łatwiejszy w interpretacji, niż metoda *recA*-PCR/RFLP-*Tsp509I*. Zakres typowości obejmuje szczepy ważne pod względem klinicznym, których identyfikacja fenotypowa nastręcza wiele trudności. Brak produktu PCR nie wyklucza przynależności badanego szczepu do *Acinetobacter*, wyklucza natomiast szczep nie należący do kompleksu ACB.

### 6.2.6.3. Układ *rrn*-dLMS PCR do wewnątrzgatunkowego typowania *Acinetobacter baumannii*

Poziom zróżnicowania sekwencji poprzedzającej gen *recA* jest zbyt niski, by istniała możliwość zaprojektowania układu restrykcyjnego pozwalającego wewnątrzgatunkowo różnicować szczepy *Acinetobacter* spp. Do typowania *A. baumannii* zaprojektowałam układ typu multiplex (pkt. 6.2.3), wykorzystujący polimorfizm sekwencji poprzedzającej gen 16S rDNA, którą nazwałam *rrn*-ddLMS PCR. Spodziewanym wynikiem analizy *rrn*-ddLMS PCR jest elektroforetyczny profil 5-6 produktów PCR, charakterystyczny dla danego szczepu *A. baumannii*.

### 6.1.6.3.1. Sekwencja markerowa i starter specyficzny

Gen 16S rDNA *A. baumannii* ATCC 17978 ma długość 1529 pz (Gene ID: 5075449). Sekwencją markerową jest fragment o długości 1483 pz ograniczony starterami st16SF i st16SR (rys. 51). Sekwencja startera specyficznego (st16S1) jest komplementarna do końca 5' sekwencji markerowej. Ze względu na wysoki stopień podobieństwa końca 5' sekwencji markerowej dla rodzaju *Acinetobacter* specyficzność startera względem *A. baumannii* jest niewielka (tzn. że starter może hybrydyzować do DNA innych genomogatków *Acinetobacter*).

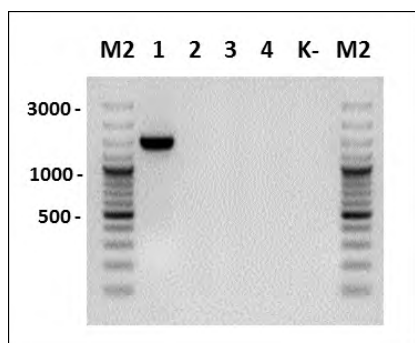


Rys. 51. Schemat przedstawiający położenie sekwencji markerowej oraz miejsc hybrydyzacji startera specyficznego w obrębie sekwencji genu 16S rDNA w układzie *rrn*-ddLMS PCR.

Aby sprawdzić czy starter specyficzny lub/i starter uniwersalny nie tworzą niespecyficznych produktów PCR, przeprowadziłam reakcję PCR na genomowym DNA referencyjnego szczepu *A. baumannii* ATCC 17978 (nr1, tab. 1), wykorzystując różne kombinacje starterów (tab. 43). Wyniki przedstawiłam na rysunku 52.

	Startery	Cel	Teoretyczna długość produktu PCR [pz]
1	st16SF – st16SR	Amplifikacja sekwencji markerowej fragmentu genu 16SrDNA	1483
2	st16S1	Amplifikacja z wykorzystaniem startera specyficznego	brak produktów
3	stADP8	Amplifikacja z wykorzystaniem startera uniwersalnego	brak produktów
4	st16S1 – stADP8	Amplifikacja z wykorzystaniem startera uniwersalnego i specyficznego	brak produktów
K-	st16S1 – stADP8	kontrola ujemna reakcji PCR (bez DNA)	brak produktów

Tabela 43. Startery stosowane w kolejnych mieszaninach reakcyjnych w reakcji PCR na matrycy genomowego DNA *A. baumannii* ATCC 17978 oraz teoretyczna długość spodziewanych produktów.



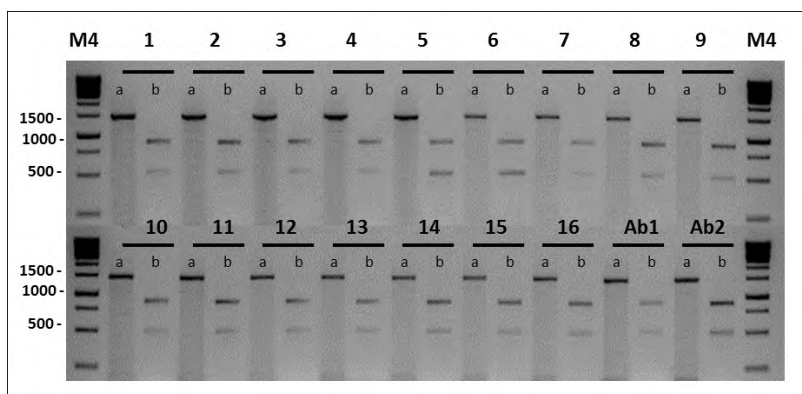
Rys. 52. Elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów amplifikacji w reakcji PCR fragmentu genu 16S rDNA na matrycy genomowego DNA *A. baumannii* ATCC 17978; M2 - marker wielkości DNA 100-3000, K- kontrola ujemna reakcji PCR, 1-4 kolejne próby wg tabeli 43.

Starter specyficzny oraz starter uniwersalny nie tworzą niespecyficznych produktów pomiędzy sobą oraz na matrycy genomowego DNA *A. baumannii*, zatem mogą być wykorzystane w

układzie *rrn*-ddLMS PCR.

### 6.2.6.3.2. Wybór enzymów restrykcyjnych

Układ restrykcyjny *HindIII/ApaI* został dobrany na podstawie porównania sekwencji genu 16S rDNA oraz sekwencji poprzedzającej operon *rrn* dla 6 różnych szczepów *A. baumannii* i 1 szczepu *A. calcoaceticus*. Enzym wewnętrzny (*ApaI*) dokonuje cięcia DNA w stałym miejscu w obrębie sekwencji markerowej (w odległości 905 pz od końca 5' sekwencji markerowej) dla wszystkich szczepów *A. baumannii*, co zostało potwierdzone metodą PCR/RFLP (rys. 53 – wynik dla 16 szczepów klinicznych i 2 referencyjnych *A. baumannii*).



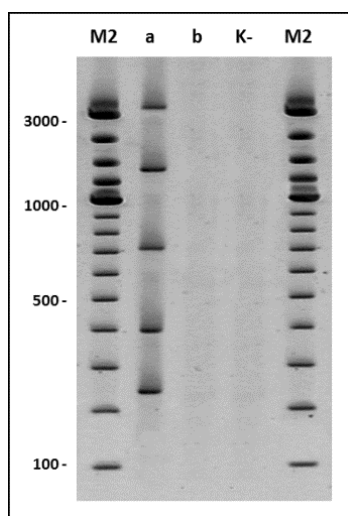
Rys. 53. Elektroforetyczny rozdział w 1,5 % żelu agarozowym produktów trawienia restrykcyjnego amplifikowanego fragmentu genu 16Sr DNA enzymem *ApaI* (PCR/RFLP); (a) amplifikowany fragment genu 16S rDNA o długości 1483 pz (sekwencja markerowa), (b) fragmenty DNA o długości 905 i 573 pz powstałe po trawieniu fragmentu 1483 pz enzymem *ApaI*; M4-marker wielkości DNA 1kb, 1-16 szczepy kliniczne *Acinetobacter* sp., Ab1, Ab2– szczepy referencyjne (wg tab. 1).

Wyboru enzymu zewnętrznego (*HindIII*) dokonałam w oparciu o analizę teoretyczną (analiza porównawcza wykonana w programie VNTI, pkt 5.2.15) dostępnych w bazie danych sekwencji 6 szczepów *A. baumannii*. Pod uwagę wzięłam sekwencję fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu genomowego DNA enzymem *RsaI*, zawierających wewnątrz sekwencję markerową (fragmenty *ApaI* - *ApaI*). Ilość kopii operonu *rrn* w genomie *A. baumannii* wynosi od 5 do 6. Podobieństwo sekwencji poprzedzającej gen 16SrDNA pomiędzy poszczególnymi kopiami operonu *rrn* w genomie jednego szczepu wynosi ok. 50%, natomiast pomiędzy różnymi szczepami *A. baumannii* ok. 70%. Wybrałam enzym *HindIII*, który trawi DNA w różnej odległości od końca 5' sekwencji markerowej dla różnych szczepów *A. baumannii* (tab. 44).

Lp	Gatunek	szczep	GenBank Ref	ilość produktów PCR	Teoretyczna długość produktów specyficznych (z uwzględnieniem długości adaptora)
1	<i>A. baumannii</i>	ATCC17978	NC_009085.1	5	3076 (3108), 1330 (1362), 669 (701), 373 (405), 222 (254)
2		AYE	NC_010410.1	5	3076 (3108), 1915 (1948), 631 (664), 515 (548), 222 (254)
3		SDF	NC_010400.1	6	3076 (3108), 1825 (1868), 1330 (1362), 631 (664), 515 (548), 222 (254)
4		ACICU	NC_010611.1	6	3076 (3108), 1915 (1948), 1695 (1728), 1585 (1628), 564 (607), 222 (254)
5		AB0057	NC_011586.1	5	3076 (3108), 1915 (1948), 750 (782), 515 (548), 256 (289)
6		AB307-0294	NC_011595.1	6	3076 (3108), (1915 (1948), 1825 (1868), 632 (664), 515 (548), 222 (254)

Tabela 44. Teoretyczna długość fragmentów restrykcyjnych oraz produktów PCR otrzymanych metodą *rrn*-ddLMS PCR dla różnych *A. baumannii*.

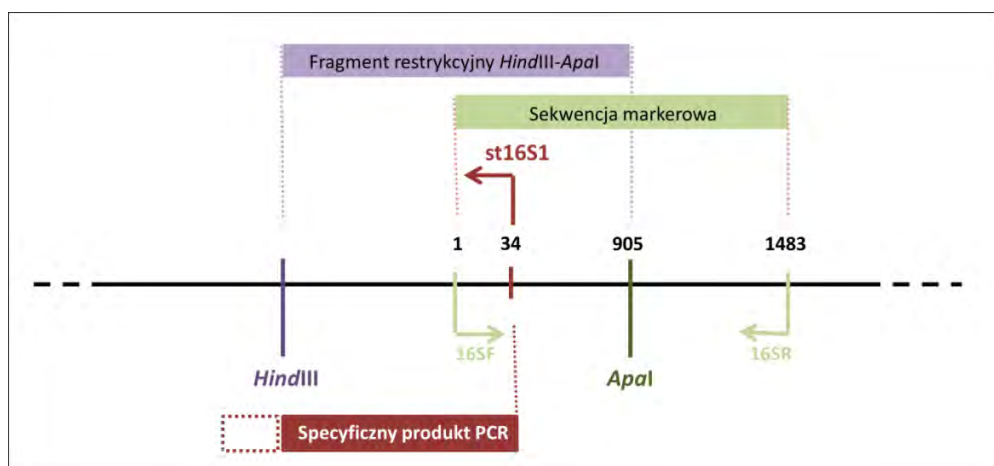
Przeprowadziłam pełną analizę metodą *rrn*-ddLMS PCR w układzie *Hind*III/*Apa*I dla jednego szczepu referencyjnego *A. baumannii* ATCC 17978 (tab. 1). Reakcję PCR prowadziłam w dwóch układach: (a) specyficznym, z zastosowaniem startera specyficznego i uniwersalnego oraz (b) niespecyficznym, z zastosowaniem jedynie startera uniwersalnego. Wyniki zostały przedstawione na rysunku 54.



Rys. 54. Elektroforetyczny rozdział w 4% żelu poliakryloamidowym produktów PCR uzyskanych metodą *rrn*-ddLMS PCR w układzie *Hind*III/*Apa*I dla referencyjnego szczepu *A. baumannii* ATCC 17978, w dwóch układach: (a) specyficznym z udziałem startera specyficznego i uniwersalnego, (b) niespecyficznym, z udziałem startera uniwersalnego. M2- marker wielkości DNA 100-3000, K- kontrola ujemna reakcji PCR.

Otrzymałam 5 produktów specyficznych o długości zgodnej z wartością teoretyczną (tab. 44). Wybrany układ enzymów *Hind*III/*Apa*I nie generuje fragmentów niespecyficznych, o czym świadczy negatywny wynik reakcji PCR z wykorzystaniem startera uniwersalnego (próbna b).

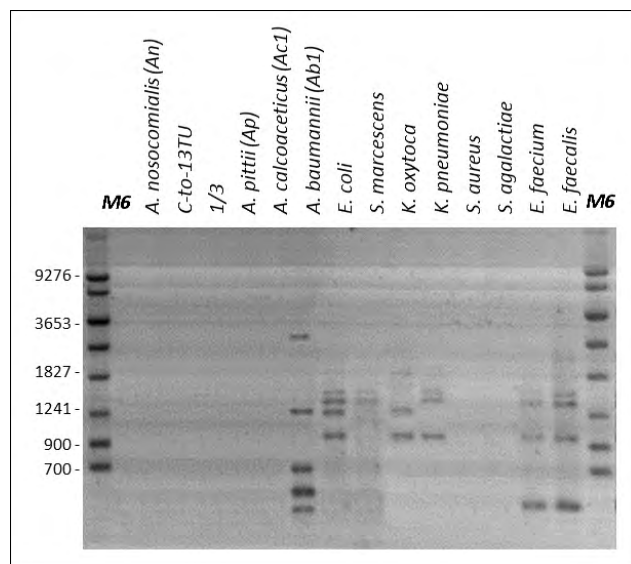
Układ *rrn*-ddLMS PCR *Hind*III/*Apa*I do wewnątrzgatunkowego typowania *A. baumannii* przedstawiłam na rys. 55.



Rys. 55. Schemat przedstawiający położenie miejsc restrykcyjnych oraz miejsc hybrydyzacji starterów względem sekwencji markerowej w układzie *rrn*-ddLMS PCR *Hind*III/*Apa*I; długość specyficznego produktu PCR uwzględnia długość adaptora (zaznaczono linią przerywaną).

### 6.1.6.3.3. Specyficzność układu *rrn*-ddLMS PCR

Badanie specyficzności metody *rrn*-ddLMS PCR w układzie *Hind*III/*Apa*I przeprowadziłam doświadczalnie na 40 szczepach należących do gatunków: *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. marcescens*, *K. oxytoca* i *K. pneumoniae* (po 5 szczepów z każdego gatunku) oraz 20 szczepach *Acinetobacter* należących do kompleksu ACB (z wyjątkiem *A. baumannii*). Wynik dla 15 szczepów przedstawiłam na rysunku 56.



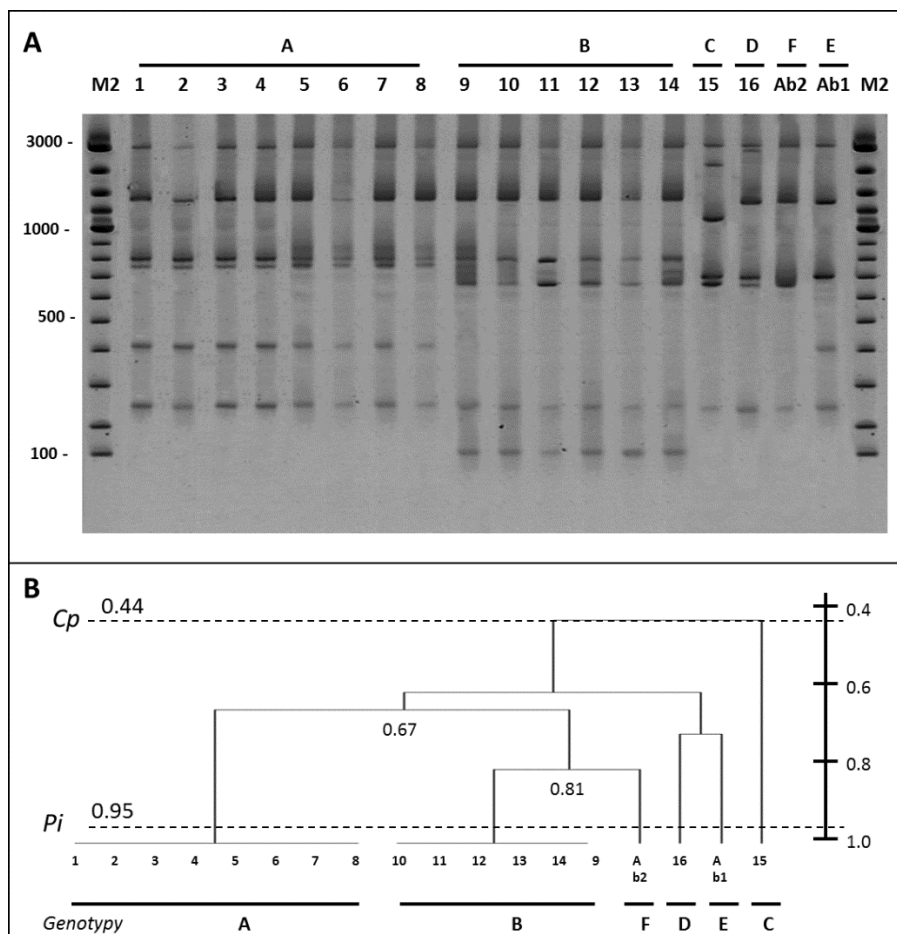
Rys. 56. Elektroforetyczny rozdział w 4% żelu poliakryloamidowym produktów PCR uzyskanych metodą *rrn*-ddLMS PCR w układzie *Hind*III/*Apa*I dla szczepów *Acinetobacter* ACB oraz szczepów bakteryjnych nie należących do rodzaju *Acinetobacter*; M6 – marker wielkości DNA IDEAL, An, Ap, Ac1, Ab1, 1/3, C-to-13TU – szczepy referencyjne i wzorcowe (wg tab. 1,2).

Analiza szczepów należących do kompleksu ACB dała wynik pozytywny tylko w przypadku szczepów *A. baumannii*. W przypadku pozostałych genomogatunków *Acinetobacter* z kompleksu ACB uzyskałam wynik negatywny (brak produktów PCR, prawdopodobnie na skutek braku miejsca trawienia dla enzymu *Apa*I w obrębie sekwencji markerowej). Produkty amplifikacji otrzymałam również dla szczepów nie należących do rodzaju *Acinetobacter*, co świadczy o zbyt niskiej specyficzności startera st16S1 względem *A. baumannii*. Gen kodujący podjednostkę 16S rRNA występuje u wszystkich bakterii i należy do grupy genów silnie zakonserwowanych ewolucyjnie. Ze względu na występowanie regionów polimorficznych stanowi podstawę do identyfikacji gatunkowej czy rodzajowej. Dobranie sekwencji startera wspólnej dla wszystkich szczepów jednego gatunku z jednoczesnym zachowaniem specyficzności gatunkowej może okazać się trudne. Optymalizacja reakcji PCR w celu podwyższenia specyficzności reakcji względem *A. baumannii* (podwyższenie temperatury przyłączania starterów, dobranie warunków buforowych, składu jonowego, aktywności polimerazy DNA) nie przyniosła oczekiwanych rezultatów.

#### 6.2.6.3.4. Typowanie *A. baumannii*

Potencjał różnicujący metody *rrn*-ddLMS PCR w układzie *Hind*III/*Apa*I sprawdziłam na 16 klinicznych i 2 referencyjnych szczepach *A. baumannii*. Wyniki przedstawiłam na rysunku 57.

W wyniku typowania genetycznego szczepów *A. baumannii* metodą *rrn*-ddLMS PCR otrzymałam sześć różnych wzorów elektroforetycznych odpowiadających sześciu genotypom (A-F), co jest zgodne z wynikami typowania techniką PCR MP (rys. 19). Całkowite podobieństwo szczepów wynosi 44%. Wydajność amplifikacji produktów PCR jest niewielka, mimo przeprowadzonej optymalizacji reakcji PCR. Rozdział produktów PCR w żelu agarozowym może sprawić trudność w detekcji krótkich fragmentów DNA, dlatego poleca się prowadzenie rozdziału w 4% żelu poliakryloamidowym.



Rys. 57. Wyniki typowania genetycznego szczepów *A. baumannii* metodą *rrn*-ddLMS PCR w układzie *HindIII/ApaI*; (A) elektroforetyczny rozdział w 4% żelu poliakryloamidowym produktów PCR, (B) dendrogram podobieństwa genetycznego wyznaczony z wykorzystaniem współczynnika Dice'a oraz metody UPGMA; M2 – marker wielkości DNA 100-3000, 1-16 szczepy kliniczne, Ab1, Ab2 – szczepy referencyjne (wg. tab. 1), A-F genotypy,  $C_p$  – całkowite podobieństwo,  $P_i$  – poziom identyczności.

Metoda *rrn*-ddLMS PCR w układzie *HindIII/ApaI* nadaje się do specyficznego, wewnątrzgatunkowego typowania szczepów *A. baumannii* w obrębie kompleksu ACB, czyli kompleksu szczepów trudno rozróżnialnych klasycznymi metodami fenotypowymi. Analiza prowadzi do uzyskania czytelnych i łatwych w interpretacji profili elektroforetycznych, składających się z 5 – 6 prążków, umożliwiających ocenę podobieństwa genetycznego szczepów.

### 6.3. Projektowanie układów diagnostycznych w oparciu o znane metody LM PCR do jednoczesnego typowania i identyfikacji gatunkowej drobnoustrojów

Techniki LM PCR stanowią kompleksowe połączenie podstawowych narzędzi molekularnych (enzymy restrykcyjne, ligazy i polimerazy DNA) oraz technik molekularnych (amplifikacja w reakcji PCR, elektroforetyczny rozdział fragmentów DNA), wykorzystywanych do badania zmian w sekwencji genomowego DNA. Umożliwiają amplifikację wybranych, krótkich (do ok. 3000 pz) fragmentów DNA, bez konieczności znajomości ich sekwencji. Co więcej, zmiana enzymu restrykcyjnego lub/i zmiana mechanizmu selekcji fragmentów amplifikowanych sprawia, że amplifikacji może być poddany dowolny fragment genomowego DNA.

Układy diagnostyczne oparte na metodach LM PCR, dzięki szerokiej gamie dostępnych enzymów restrykcyjnych oraz szeregu oferowanych mechanizmów selekcji fragmentów amplifikowanych mogą służyć nie tylko do typowania wewnątrzgatunkowego, ale także do identyfikacji gatunkowej. Uzyskany w wyniku typowania profil elektroforetyczny produktów PCR, stanowi niejako wizytówkę badanego drobnoustroju. W profilu tym, w zależności od tego, który region genomowego DNA uległ amplifikacji, mogą znaleźć się fragmenty specyficzne gatunkowo, fragmenty specyficzne tylko dla jednego szczepu oraz fragmenty typowe dla fenotypu danego drobnoustroju (np. świadczące o wirulencji szczepu).

Dobierając odpowiedni enzym/enzymy restrykcyjne oraz metodę selekcji fragmentów amplifikowanych można zaprojektować układ diagnostyczny pozwalający wewnątrzgatunkowo typować drobnoustroje i jednocześnie potwierdzać ich przynależność gatunkową. Układ taki powinien spełniać następujące warunki:

- ✓ wybrany enzym restrykcyjny (lub układ dwóch lub trzech enzymów) generuje fragmenty, z których co najmniej jeden ma długość stałą dla wszystkich szczepów tego samego gatunku i jest odpowiednio krótki by mógł być amplifikowany w reakcji PCR,
- ✓ wybrany system selekcji fragmentów amplifikowanych umożliwia amplifikację specyficznego gatunkowo fragmentu restrykcyjnego,
- ✓ całkowita liczba fragmentów amplifikowanych jest na tyle niska, by otrzymany profil elektroforetyczny był czytelny (produkty PCR wyraźnie rozdzielone, brak produktów niespecyficznych), a produkt specyficzny gatunkowo łatwy do wskazania
- ✓ liczba specyficznych dla szczepu produktów PCR jest wystarczająca do wewnątrzgatunkowego różnicowania szczepów.

Porównanie otrzymanych profili elektroforetycznych produktów amplifikacji i wskazanie produktu występującego u wszystkich szczepów tego samego gatunku umożliwia identyfikację gatunkową, natomiast wskazanie produktów charakterystycznych dla danego szczepu umożliwia wewnątrzgatunkowe różnicowanie badanych szczepów.

Poniżej przedstawiłam trzy układy diagnostyczne, stanowiące propozycję układów opartych na LM PCR do specyficznego typowania szczepów *Acinetobacter* spp. oraz *K. oxytoca*.

### **6.3.1. Układ LM PCR *simple/XhoI* do różnicowania i identyfikacji *A. baumannii***

Przeprowadziłam analizę restrykcyjną sekwencji genomowego DNA dla 6 referencyjnych szczepów *A. baumannii* i 1 szczepu *A. calcoaceticus*. Wybrałam enzym *XhoI*, który rzadko trawi genomowe DNA *Acinetobacter* spp., generuje do 200 fragmentów restrykcyjnych, w tym do 15-stu nie przekraczających długości 2000 pz (tab. 45)



	gatunek bakterii	całkowita ilość fragmentów restrykcyjnych	długość fragmentów restrykcyjnych o długości <2000 pz
1	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	174	67, <b>160</b> , 854, 987, 1042, 1092, 1358, 1729, 1832
2	<i>A. baumannii</i> AYE	169	<b>160</b> , 607, 666, 986, 1042, 1094, 1300, 1597, 1633, 1729
3	<i>A. baumannii</i> SDF	133	91, 108, <b>160</b> , 1081, 1513, 1729, 1967, 1992
4	<i>A. baumannii</i> ACICU	188	<b>160</b> , 836, 986, 1013, 1042, 1065, 1076, 1092, 1303, 1358, 1666, 1726, 1832, 1904, 1992
5	<i>A. baumannii</i> AB0058	174	<b>160</b> , 589, 607, 896, 1094, 1300, 1594, 1633, 1729, 1833, 1992,
6	<i>A. baumannii</i> AB307-294	168	<b>160</b> , 224, 607, 986, 1094, 1597, 1633, 1729, 1834, 1861, 1992,
7	<i>A. calcoaceticus</i> PHE-2	106	222, 942, 1045, 1227, 1392, 1726, 1727

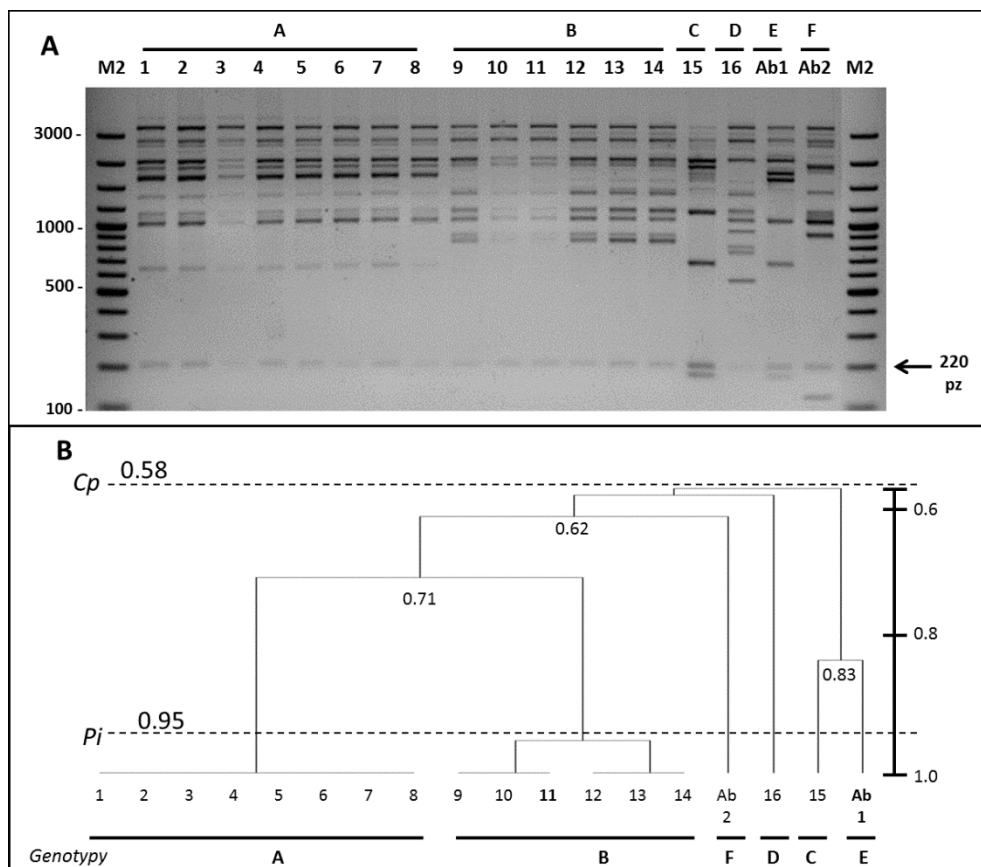
Tabela 45. Teoretyczna analiza restrykcyjna genomowego DNA *Acinetobacter* spp. trawionego enzymem *XhoI*.

Enzym restrykcyjny rzadko tnący genomowe DNA *A. baumannii* generuje niewielką ilość fragmentów restrykcyjnych, z czego większość to fragmenty o długości powyżej 5000 pz. Ze względu na ograniczoną procesywność polimeraz DNA, w reakcji PCR wydajnie amplifikowane będą tylko fragmenty krótkie, nie przekraczające ok. 3000 pz. Analiza restrykcyjna wykazała, że dla różnych szczepów *A. baumannii*, fragmenty DNA o długości <2000 pz mają różną długość (element wewnątrzgatunkowo różnicujący *A. baumannii*, tab. 45). Ponadto, u wszystkich *A. baumannii* obecny jest fragment restrykcyjny o długości 160 pz, nie występujący u *A. calcoaceticus* (element identyfikujący *A. baumannii*).

Przeprowadziłam doświadczenie, w którym typowaniu metodą LM PCR z wykorzystaniem enzymu *XhoI*, poddałam szczepy *A. baumannii* (wg procedury przedstawionej w pkt.5.2.12). Selekcję ilości amplifikowanych fragmentów DNA uzyskałam stosując enzym rzadko tnący badane DNA. Zastosowanie dodatkowych mechanizmów tj. obniżenie temperatury denaturacji w cyklach reakcji PCR lub wprowadzenie selektywnych nukleotydów na końcu 3' startera nie jest potrzebne, gdyż liczba krótkich fragmentów DNA mogących ulec amplifikacji jest niewielka (<20). Ze względu na prostotę metody, na potrzeby niniejszej rozprawy nazwałam ją LM PCR *simple*. Wyniki typowania przedstawiłam na rysunku 58.

Zgodnie z założeniami teoretycznymi dla każdego szczepu *A. baumannii* otrzymałam profil elektroforetyczny składający się z kilkunastu prążków, z których jeden, przedstawiający produkt PCR długości ok. 220, występuje w każdej próbce (produkt PCR jest większy od fragmentu restrykcyjnego o 64 pz – dwukrotna długość adaptora). Produkt ten nie występuje u innych gatunków *Acinetobacter* (dane nie przedstawione w rozprawie), zatem może stanowić element umożliwiający identyfikację *A. baumannii* (potwierdzenie prawidłowej identyfikacji gatunkowej).

Analiza sekwencji fragmentu restrykcyjnego charakterystycznego dla *A. baumannii* wykazała, że stanowi on fragment genu dehydrogenazy 3-hydroksyizomaślanu (GebeBank: CP000521.1 *A. baumannii* ATCC 17978), który jest specyficzny dla *Acinetobacter*. Ponieważ gen ten wykazuje polimorfizm sekwencji w obrębie rodzaju, fragment restrykcyjny o długości 160 pz powstały w wyniku trawienia genomowego DNA enzymem *XhoI* powstaje tylko u *A. baumannii*.



Rys. 58. Wyniki typowania szczepów *A. baumannii* metodą LM PCR *simple* w układzie enzymu *XhoI*; (a) elektroforetyczny rozdział produktów PCR w 1% żelu agarozowym, (B) dendrogram podobieństwa genetycznego wyznaczony z wykorzystaniem współczynnika podobieństwa Dice'a i metody UPGMA; M2- marker wielkości DNA 100-3000, 1-16 szczepy kliniczne *A. baumannii*, Ab1, Ab2- szczepy referencyjne (wg tab. 1), A-F genotypy,  $C_p$ -całkowite podobieństwo,  $P_i$ - poziom identyczności.

Stopień zróżnicowania profili elektroforetycznych uzyskanych metodą LM PCR *simple/XhoI* dla badanych szczepów *A. baumannii* jest wysoki ( $S_r = 1/3$ ). Na podstawie porównania profili elektroforetycznych wyodrębniłam 6 genotypów (A-F), co jest zgodne z wynikami typowania metodą PCR MP (rys. 19). Całkowity poziom podobieństwa genetycznego szczepów wynosi 58%.

Metoda LM PCR *simple* w układzie enzymu *XhoI* charakteryzuje się wysokim poziomem dyskryminacji (porównywalnym z metodą PCR MP). Umożliwia wewnątrzgatunkowe różnicowanie szczepów *A. baumannii*, potwierdzając jednocześnie na podstawie obecności charakterystycznego produktu PCR, prawidłową identyfikację gatunkową.

### 6.3.2. Układ LM PCR *simple/XbaI* do różnicowania i identyfikacji *Klebsiella oxytoca*

Ze względu na brak pełnej sekwencji genomowego DNA oraz wysoki stopień zróżnicowania genetycznego szczepów z gatunku *K. oxytoca* (zarówno w obrębie całego genomowego DNA jak i w obrębie genu *pehX*), dobranie enzymu restrykcyjnego, generującego charakterystyczny fragment DNA jest bardzo trudne.

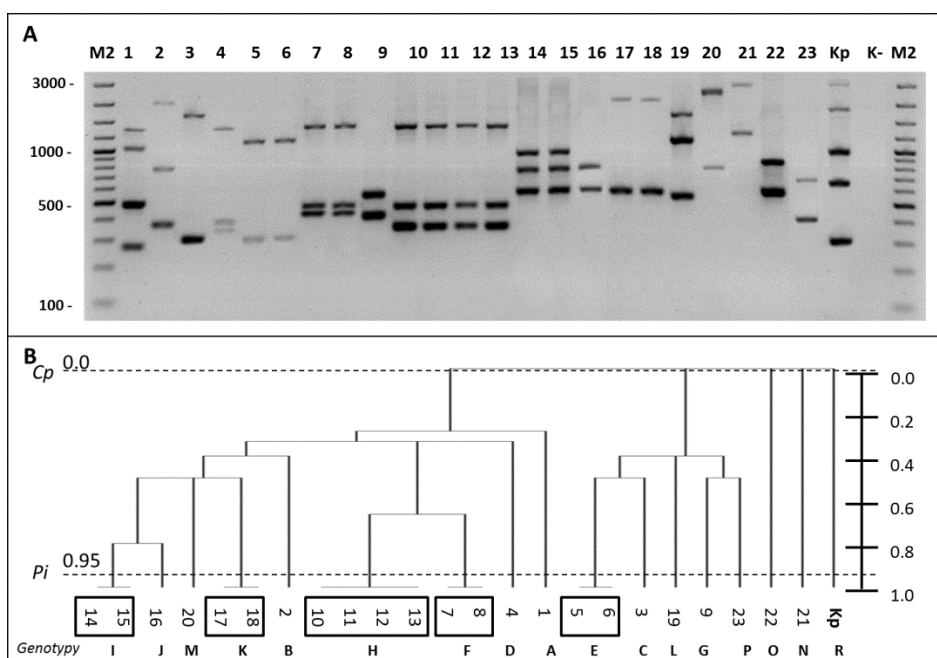
Aby dobrać układ restrykcyjny do typowania *K. oxytoca*, przeprowadziłam analizę restrykcyjną sekwencji genomowego DNA dla 3 referencyjnych szczepów *K. pneumoniae*. Wybrałam enzym *XbaI*, który

trawi genomowe DNA w 30-40 miejscach, generując do pięciu krótkich fragmentów DNA o długości nie przekraczającej 3000 pz. (tab. 46)

Lp	Gatunek bakterii	GenBank	całkowita ilość fragmentówrestrykcyjnych	Teoretyczna długość fragmentów restrykcyjnych o długości <3000pz
1	<i>K. pneumoniae</i> 342	NC_011283.1	33	883, 1420, 2054, 2511
2	<i>K. pneumoniae</i> MGH 78578	NC_009648.1	38	87, 99, 339, 376, 2474
3	<i>K. pneumoniae</i> NTUH – K2044	NC_012731.1	37	186, 333, 1267, 2589

Tabela 46. Teoretyczna analiza restrykcyjna genomowego DNA *K. pneumoniae*.

Przeprowadziłam doświadczenie, w którym typowaniu metodą LM PCR *simple* z wykorzystaniem enzymu *Xba*I poddałam 23 szczepy *K. oxytoca* (wg procedury przedstawionej w pkt.5.2.12). Selekcję ilości amplifikowanych fragmentów DNA uzyskałam stosując enzym rzadko tnący badane DNA. Podobnie jak w przypadku układu LM PCR *simple*/*Xho*I do typowania *A. baumannii*, nie zastosowałam żadnych dodatkowych mechanizmów selekcji fragmentów amplifikowanych. Wyniki przedstawiłam na rysunku 59.



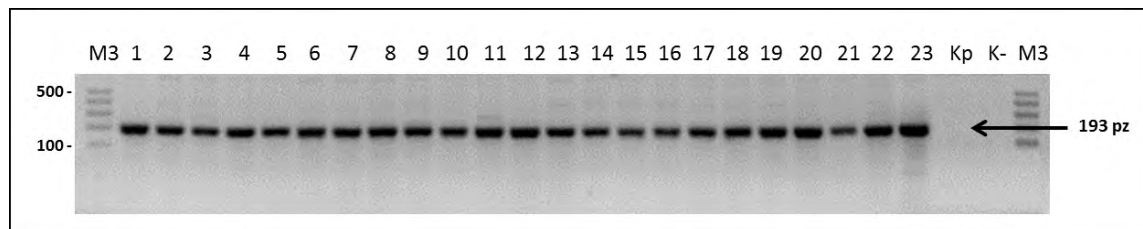
Rys. 59. Wyniki typowania szczepów *K. oxytoca* i *K. pneumoniae* metodą LM PCR *simple* w układzie enzymu *Xba*I; (A) elektroforetyczny rozdziel w 1% żelu agarozowym produktów PCR, (B) dendrogram podobieństwa genetycznego szczepów; M2 – marker wielkości DNA 100-3000, 1-23 szczepy *K. oxytoca*, Kp – szczep *K. pneumoniae*, K- kontrola ujemna reakcji PCR, Cp-całkowite podobieństwo, Pi-poziom identyczności, A-R genotypy.

Dla każdego szczepu otrzymałam profil elektroforetyczny zawierający od 2 do 4 prążków. Długość produktów waha się od 270 do 3000 pz. Ilość produktów PCR jest wystarczająca do identyfikacji szczepów klonalnie zależnych i różnicowania szczepów niespokrewnionych. Wyodrębniłam 17 genotypów (A-R), co jest zgodne z wynikami typowania metodą PCR MP (rys. 15). Całkowite genetyczne podobieństwo  $C_p$  szczepów wynosi 0%. Liczba prążków (cech porównywanych) jest niewielka, a przy tak dużym stopniu różnorodności genetycznej istnieje możliwość uzyskania profilu elektroforetycznego, zawierającego prążki, nie występujące u innych szczepów, stąd tak niski poziom podobieństwa.

Układ LM PCR *simple*/*Xba*I nie jest specyficzny względem *K. oxytoca*. Porównując profile elektroforetyczne nie można wskazać produktu gatunkowo specyficznego, występującego we wszystkich

próbach. Aby zwiększyć specyficzność układu LM PCR *simple/XbaI*, wprowadziłam do analizy dodatkową amplifikację fragmentu genu *pehX*.

Na podstawie sekwencji genu *pehX*, zaprojektowałam odpowiednie startery (stPehX1 i stPehX8) do amplifikacji specyficznego fragmentu DNA o długości 193 pz. Specyficzność starterów zbadałam na 200 szczepach *K. oxytoca* oraz 20 *K. pneumoniae*. Wyniki amplifikacji dla 24 szczepów przedstawiłam na rys. 60.



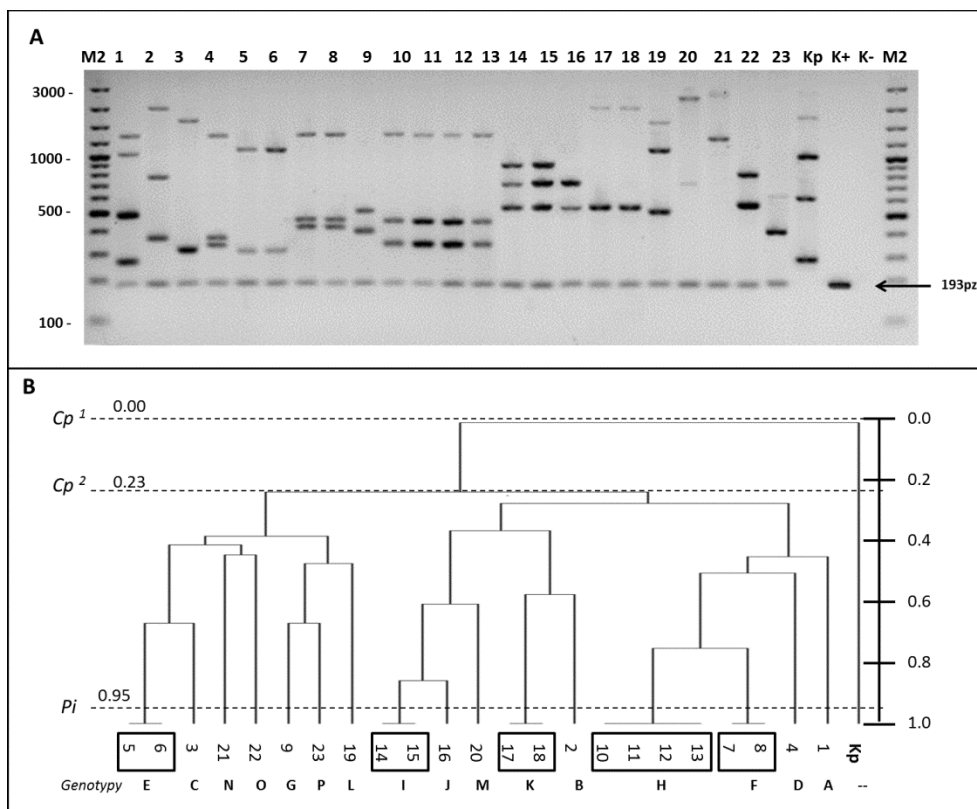
Rys. 60. Badanie specyficzności starterów stPehX3 i stPehX8; elektroforetyczny rozdział w 2% żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu *pehX* o długości 193 pz na genomowym DNA *K. oxytoca*.

Fragment genu *pehX* o długości 193 pz (sekwencja markerowa) jest obecny we wszystkich próbach dla szczepów *K. oxytoca*. Brak produktu PCR w próbce dla *K. pneumonie* oraz brak produktów niespecyficznych w pozostałych próbach, świadczy o specyficzności zaprojektowanych starterów dla *K. oxytoca*.

Oczyszczony produkt PCR został poddany analizie restrykcyjnej enzymem *XbaI* (doświadczenie przeprowadziłam dla 23 szczepów *K. oxytoca*, przedstawionych na rys. 60). W obrębie sekwencji markerowej nie stwierdziłam obecności sekwencji rozpoznawanej przez enzym *XbaI*, gdyż w wyniku trawienia otrzymałam fragment DNA o niezmienionej długości w stosunku do fragmentu wyjściowego. Oznacza to, że sekwencja ta może być amplifikowana na matrycy trawionego enzymem *XbaI* i zligowanego z adaptorem DNA.

Przeprowadziłam pełną analizę metodą *pehX*-LM PCR *simple* w układzie enzymu *XbaI*. W reakcji PCR zastosowałam trzy startery: starter komplementarny do adaptora (stXbaI), umożliwiający amplifikację krótkich fragmentów restrykcyjnych obustronnie ligowanych z adaptorem oraz dwa startery komplementarne do fragmentu genu *pehX*, umożliwiające amplifikację sekwencji markerowej (stPehX1 i stPehX8). Wykonałam dodatkowo amplifikację fragmentu genu *pehX* na matrycy genomowego DNA *K. oxytoca* (kontrola dodatnia amplifikacji sekwencji markerowej, K+). Wyniki dla 23 szczepów *K. oxytoca* i 1 szczepu *K. pneumoniae* przedstawiłam na rysunku 61.

Dla każdego szczepu *K. oxytoca* otrzymałam profil elektroforetyczny zawierający charakterystyczny prążek przedstawiający fragment DNA o długości ok 200 pz, który obecny jest także w kontroli dodatniej (K+), a nieobecny w profilu elektroforetycznym dla *K. pneumoniae*. Obecność tego produktu potwierdza przynależność badanego szczepu do gatunku *K. oxytoca*. Porównując wyniki typowania uzyskane w poprzednim doświadczeniu (rys. 59), liczba produktów PCR różnicująca szczepy *K. oxytoca* nie zmieniła się. Mimo dodatkowej pary starterów, krótkie fragmenty obustronnie ligowane z adaptorem nadal są wydajnie amplifikowane. Nie powstają też żadne dodatkowe niespecyficzne produkty PCR.



Rys. 61. Wynik typowania szczepów *K. oxytoca* i *K. pneumoniae* metodą *pehX*-LM PCR *simple* w układzie enzymu *Xba*I; (A) elektroforetyczny rozdziel w 1% żelu agarozowym produktów PCR, (B) dendrogram podobieństwa genetycznego szczepów; M2 – marker wielkości DNA 100 -3000, 1-23 szczepy *K. oxytoca*, Kp – szczep *K. pneumoniae*, K+ kontrola dodatnia aplikacji fragmentu genu *pehX*, K- kontrola ujemna reakcji PCR, A-P genotypy, Cp1 – Całkowite podobieństwo szczepów *K. oxytoca* i *K. pneumoniae*, Cp2 – atkowitz podobieństwo szczepów *K. oxytoca*, Pi- poziom identyczności.

Metoda *pehX*-LM PCR *simple*/*Xba*I charakteryzuje się wysokim poziomem dyskryminacji (porównywalnym z metodą PCR MP). Umożliwia wewnątrzgatunkowe różnicowanie szczepów *K. oxytoca*, potwierdzając jednocześnie na podstawie obecności charakterystycznego produktu PCR, prawidłową identyfikację gatunkową.

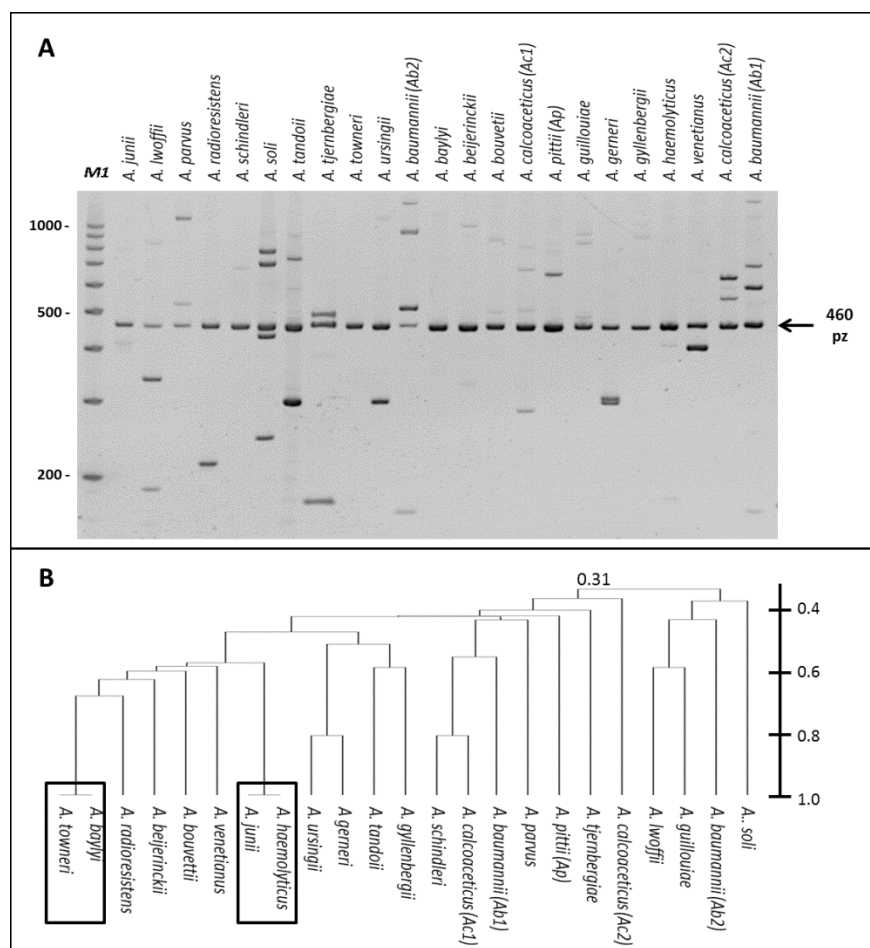
### 6.3.3. Układ LM PCR/*Shifter* do typowania *A. baumannii* i identyfikacji rodzaju *Acinetobacter*

Charaktrystyczną cechą metody LM PCR/*Shifter* jest wykorzystanie na etapie trawienia restrykcyjnego enzymu klasy IIS, który dokonuje cięcia DNA w pewnej, stałej odległości od rozpoznawanej sekwencji (patrz pkt.4.2.2.2.2, rys.10). Powstałe fragmenty restrykcyjne mają nieznaną sekwencję na lepkich końcach. Selekcja fragmentów ulegających amplifikacji zachodzi na etapie ligacji i etapie reakcji PCR.

W zaprojektowanym w Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej układzie diagnostycznym do typowania bakterii, wykorzystuje się enzym *Alw26*I oraz adaptor zawierający dwa zdegenerowane nukleotydy na czternukleotydowym jednoniciowym końcu 5' adaptoru (5'- NGCN). Na etapie ligacji liczba fragmentów restrykcyjnych mogących ulec amplifikacji w reakcji PCR zmniejsza się statystycznie prawie 16 razy. Poziom dyskryminacji (ilość fragmentów amplifikowanych) metody można regulować poprzez sekwencję końca 5' adaptoru na etapie ligacji oraz sekwencję końca 3' starterów bezpośrednio w reakcji

PCR. Adaptor zawierający na końcu 5' sekwencję NGCN, daje możliwość zastosowania szesnastu różnych starterów (różne kombinacje sekwencji NGCN, gdzie w miejsce „N” wstawiony jest specyficzny nukleotyd). Teoretycznie w jednej mieszance reakcyjnej można zastosować od jednego do szesnastu różnych starterów, co daje ponad 100 000 kombinacji.

Przeprowadziłam typowanie metodą LM PCR/*Shifter* (wg procedury przedstawionej w pkt. 5.2.11) dla 23 referencyjnych szczepów *Acinetobacter sp.* (tab. 1), stosując w reakcji PCR starter o sekwencji AGCT na końcu 3'. Wyniki doświadczenia przedstawiłam na rysunku 62.



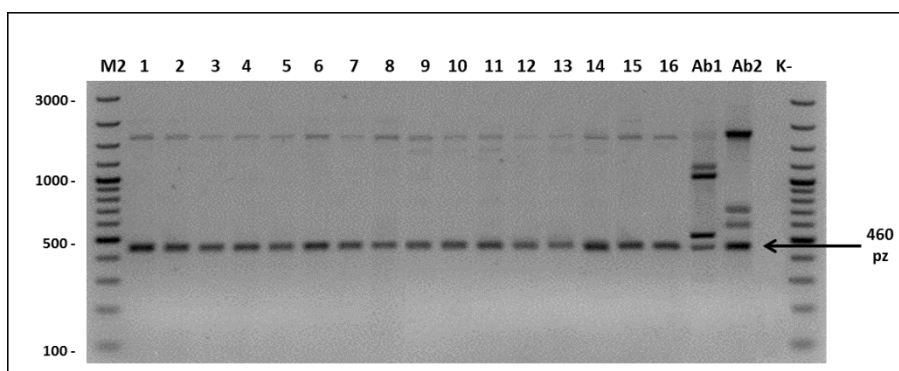
Rys. 62. Wyniki typowania referencyjnych szczepów *Acinetobacter sp.* metodą LM PCR/*Shifter* z wykorzystaniem startera stAGCT w reakcji PCR; (A) elektroforetyczny rozdział w 6% żelu poliakrylamidowym produktów PCR; M1 – marker wielkości DNA 100- 1000, (B) dendrogram podobieństwa genetycznego wyznaczony z wykorzystaniem współczynnika podobieństwa Dice'a oraz metody klasteryzacji UPGMA; ramką zaznaczono szczepy o tym samym genotypie.

Dla każdego szczepu otrzymałam profil elektroforetyczny, zawierający od 1 do 6 prążków, z których jeden jest stały dla wszystkich prób (produkt PCR o długości ok 460 pz). Porównałam wyniki typowania *Acinetobacter sp.* z wynikami uzyskanymi dla bakterii należących do innych rodzajów (*E. coli*, *K. oxytoca*). Produkt ten nie pojawiał się w profilach elektroforetycznych i dlatego wydaje się być przypisany wyłącznie do rodzaju *Acinetobacter*.

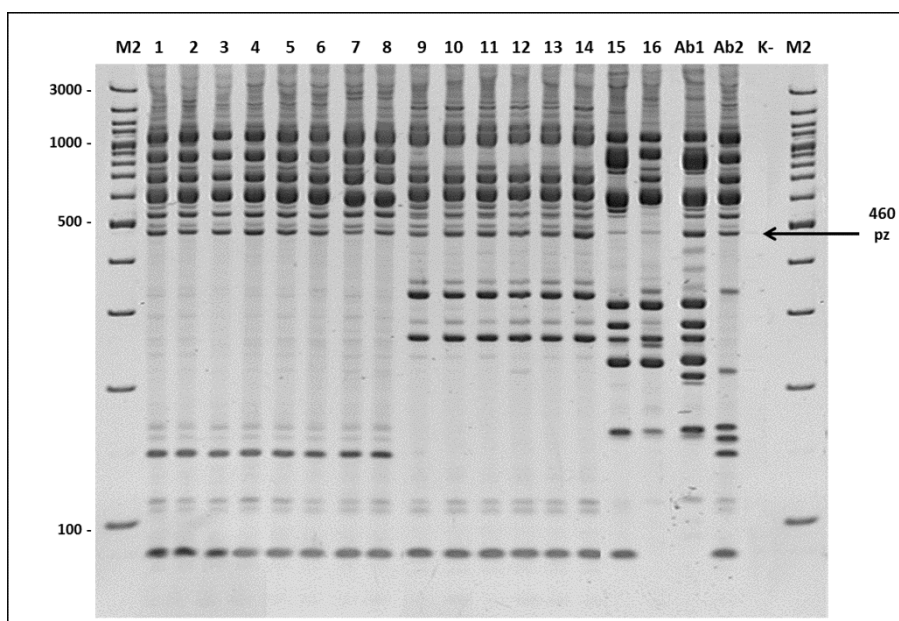
Metoda LM PCR/*Shifter* w układzie adaptora NGCN i startera AGCT może być wykorzystana do identyfikacji rodzaju *Acinetobacter sp.* na podstawie obecności charakterystycznej długości produktu PCR, jednakże nie powinna być wykorzystywana do typowania szczepów w obrębie rodzaju, gdyż grupowanie

genotypowe nie jest zgodne z podziałem gatunkowym szczepów *Acinetobacter*. Dla szczepów *A. baylyi* i *A. towneri* oraz *A. haemoliticus* i *A. junii* otrzymałam takie same profile elektroforetyczne (na rys. 62 zaznaczono ramką), natomiast dla szczepów należących tego samego gatunku (szczepy *A. baumannii* oraz szczepy *A. calcoaceticus*) otrzymałam różne profile elektroforetyczne. Poziom podobieństwa szczepów tego samego gatunku jest niższy niż dla szczepów różnych gatunków.

Przeprowadziłam typowanie dla 18 szczepów *A. baumannii*, stosując w reakcji PCR dwie kombinacje starterów: (1) jeden starter zawierający sekwencję AGCT na końcu 3' oraz (2) mieszaninę czterech starterów zawierających odpowiednio sekwencję NGCA, NGCC, NGCT, NGCG na końcu 3'. Wyniki przedstawiłam na rysunkach 63 i 64.



Rys. 63. Wyniki typowania szczepów *A. baumannii*, metodą LM PCR/Shifter w układzie startera stAGCT; M2 – marker wielkości DNA 100-3000, 1-16 kliniczne szczepy *A. baumannii*, Ab1, Ab2 – referencyjne szczepy *A. baumannii* (tab. 1), K- kontrola ujemna reakcji PCR.



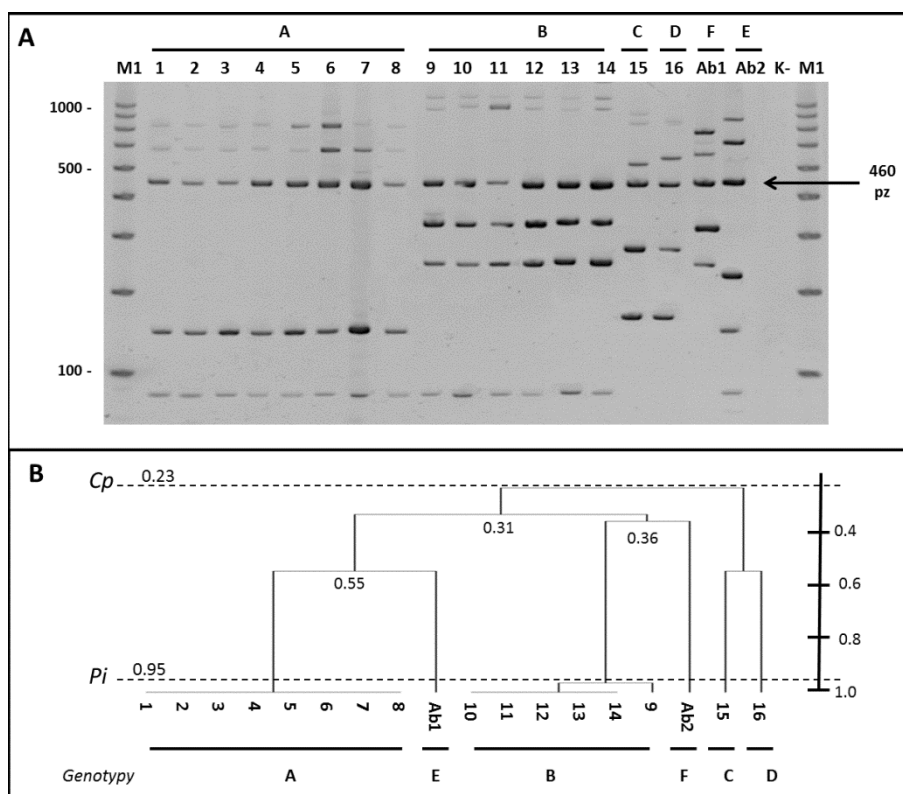
Rys. 64. Wyniki typowania szczepów *A. baumannii*, metodą LM PCR/Shifter w układzie startera stNGCN; M2 – marker wielkości DNA 100-3000, 1-16 kliniczne szczepy *A. baumannii*, Ab1, Ab2 – referencyjne szczepy *A. baumannii* (tab. 1), K- kontrola ujemna reakcji PCR.

Przeprowadzając reakcję PCR z udziałem startera AGCT w metodzie LM PCR/Shifter, otrzymałam 3 różne profile elektroforetyczne, w których wyróżnić można jeden charakterystyczny prążek o długości ok. 460 pz, specyficzny dla rodzaju *Acinetobacter* (porównanie z wynikami przedstawionymi na rys. 62). Drugi prążek o długości ok 1700 pz wydaje się być specyficzny dla gatunku *A. baumannii*, jednak dodatkowe

badania wykazały, że produkt ten występuje także u niektórych szczepów *A. pittii* (dane nie przedstawione w niniejszej rozprawie).

Typowanie z udziałem startera NGCN (układ zapewniający wysoki potencjał różnicujący), różnicuje szczepy na 6 genotypów, co jest zgodne z wynikami typowania metodą PCR MP (rys. 19). Liczba prążków w otrzymanych w profilach elektroforetycznych jest jednak zbyt wysoka, by móc prawidłowo wskazać prążek specyficzny dla rodzaju *Acinetobacter*.

Aby stworzyć układ, który poza typowaniem genetycznym szczepów, pozwalałby na wyodrębnienie produktu rodzajowo specyficznego, przeprowadziłam reakcję PCR z zastosowaniem kombinacji różnych starterów, w tym startera o sekwencji AGCT na końcu 3'. Do typowania *A. baumannii* wybrałam układ dwóch starterów: o sekwencji AGCT i NGCA na końcu 3'. Wyniki przedstawiłam na rysunku 65.



Rys. 65. Wyniki typowania szczepów *A. baumannii* metodą LM PCR/*Shifter* w układzie starterów stAGCT i stNGCA; (A) elektroforetyczny rozdział produktów PCR w 6% żeli poliakrylamidowym, (B) dendrogram podobieństwa genetycznego wyznaczony z wykorzystaniem współczynnika Dice'a oraz metody UPGMA; M1 – marker wielkości DNA 100-1000, K- kontrola ujemna reakcji PCR, 1-16 szczepy kliniczne, Ab1, Ab2 – szczepy referencyjne *A. baumannii* (wg. tab. 1).

Typowanie w układzie dwóch starterów: stAGCT oraz stNGCA łączy w sobie zalety układu stAGCT oraz stNGCN. Ograniczona liczba prążków w profilu elektroforetycznym, umożliwia wskazanie rodzajowo-specyficznego produktu PCR, jednocześnie zachowując odpowiednią do typowania wewnątrzgatunkowego moc dyskryminacji. Całkowity poziom podobieństwa genetycznego szczepów badanych w wynosi 23%. Wśród 18 szczepów wyróżniłam 6 genotypów (A-F), co jest zgodne z typowaniem metodą PCR MP oraz LM PCR/*Shifter* w układzie startera stNGCN. Obecność produktu PCR o długości ok 460 pz. potwierdza prawidłową identyfikację szczepu (przypisanie do rodzaju *Acinetobacter*).



## 6.4. Porównanie metod LM PCR – zastosowanie i ocena przydatności w badaniach epidemiologicznych

Metody z grupy LM PCR zostały zaprojektowane do wewnątrzgatunkowego typowania drobnoustrojów. Jak większość technik typowania genetycznego, ograniczają się one do analizy wybranych fragmentów DNA, których selekcja jest typowa dla danej metody. Wzory *fingerprinting* przedstawiają zmienność sekwencji w dowolnym miejscu w genomie. Zmiany genetyczne wynikające z rekombinacji i mutacji podczas replikacji zachodzą z różną częstością w różnych miejscach w genomie. Ich identyfikacja za pomocą technik LM PCR zachodzi wtedy, jeśli wpłyną one na zmianę liczby i rozmieszczenia miejsc restrykcyjnych oraz na zmianę sekwencji otaczającej te miejsca. Ponieważ metody LM PCR wykorzystują różne metody selekcji fragmentów amplifikowanych oraz różne układy diagnostyczne (enzymy, sekwencje adaptorów i starterów), mogą w różny sposób opisywać podobieństwo genetyczne pomiędzy tymi samymi szczepami.

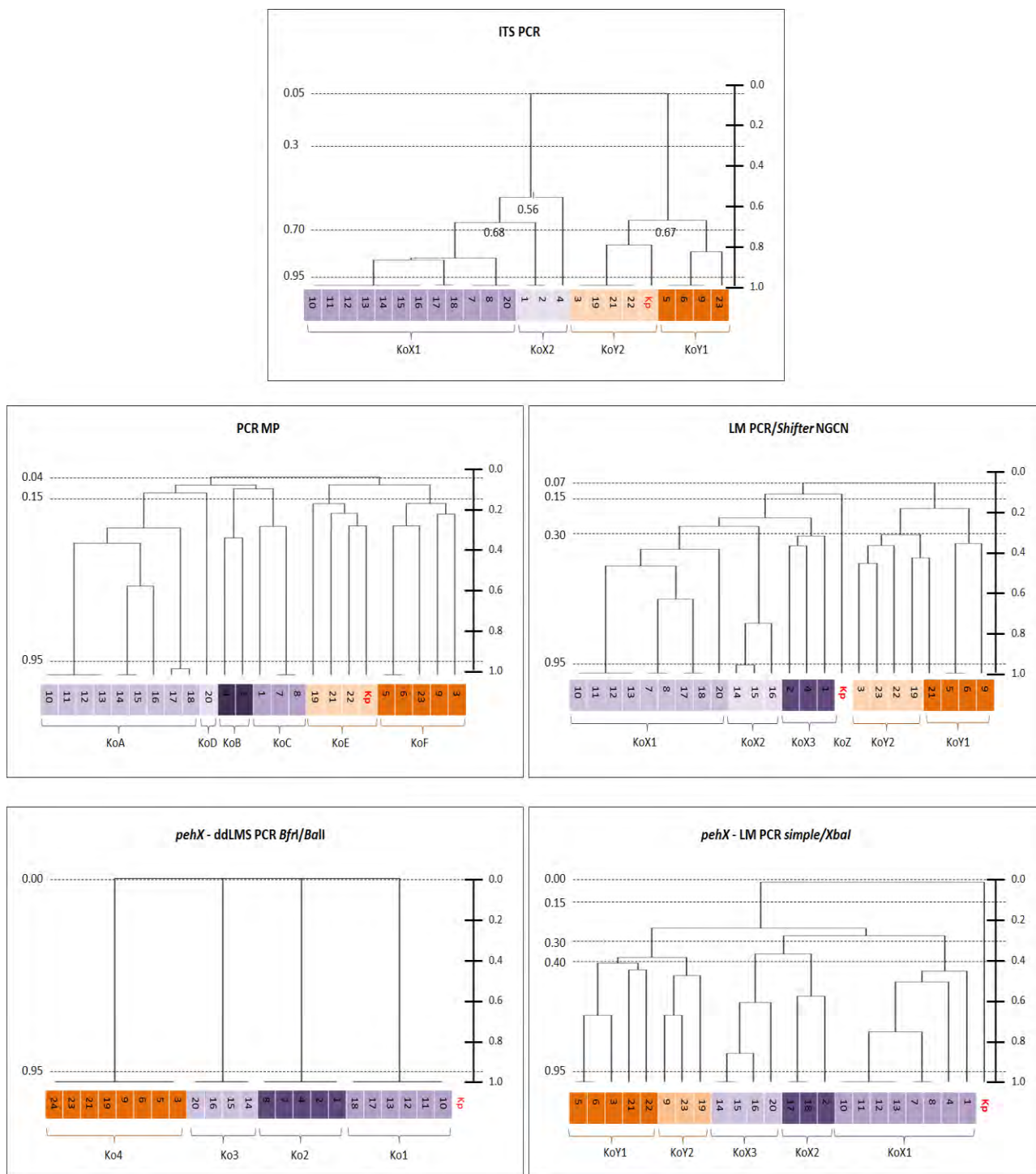
Porównałam wyniki typowania 23 szczepów *K. oxytoca* i 1 szczepu *K. pneumoniae* uzyskane metodami PCR MP, LM PCR *Shifter* (z wykorzystaniem startera o sekwencji NGCN na końcu 3'), *pehX*-LM PCR *simple/XbaI* oraz *pehX*-ddLMS PCR w układzie *AclI/BalI* i *BfrI/BalI* oraz ITS PCR (metoda porównawcza, nie należąca do grupy LM PCR). Dla potrzeb analizy wyznaczyłam punkty odcięcia ( $P_o$  – ustalona wartość podobieństwa genetycznego) pozwalające dzielić szczepy na grupy i podgrupy genotypowe (tab. 47).

Metoda	$P_i$ poziom identyczności (podział na genotypy)	$C_p$ Całkowite podobieństwo	$P_o1$ Punkt odcięcia 1 (podział na grupy genotypowe)	$P_o2$ Punkt odcięcia 2 (podział na podgrupy genotypowe)
ITS PCR	0.95	0.05	0.3	0.7
PCR MP	0.95	0.04	0.15	0.3
LM PCR/ <i>Shifter</i>	0.95	0.07	0.15	0.3
<i>pehX</i> -LM PCR <i>simple/XbaI</i>	1.00	0.00/ 0.28*	0.3	0.4
<i>pehX</i> -ddLMS PCR <i>BfrI/BalI</i>	1.00	0.00/0.00*	-	-

Tabela 48. Analiza wyników typowania różnymi metodami; \* tylko szczepy *K. oxytoca*.

Dla żadnej z wymienionych wyżej metod nie ustalono kryterium interpretacji danych. Analiza wyników zależy w głównej mierze od osoby przeprowadzającej doświadczenie. Wartość punktu/ów odcięcia ( $P_o$ ) jest pojęciem bardzo płynnym. Punkty te ustala się na podstawie dendrogramu, uzyskanego w wyniku analizy podobieństwa genetycznego. Punkty odcięcia są pomocne przy szukaniu pewnych zależności pomiędzy badanymi szczepami a danymi epidemiologicznymi. Nie są to wartości z góry założone, zatem wyniki nie powinny być porównywane międzylaboratoryjnie. Wartości  $P_o$  przedstawione w tabeli 47 zostały przeze mnie wyznaczone na poziomie umożliwiającym porównanie metod LM PCR. Celem nie było ustalenie ilości grup genotypowych, tzn. różnorodności genetycznej szczepów, lecz znalezienie pewnego schematu podziału szczepów. Stąd też dla różnych metod, wartości  $P_o$  są różne. Wyniki analizy

podobieństwa genetycznego dla 24 szczepów wykonane na podstawie porównania profili elektroforetycznych uzyskanych różnymi metodami LM PCR oraz ITS PCR przedstawiam na rysunku 66 oraz w tabeli 48. .



Rys. 66. Dendrogramy podobieństwa genetycznego szczepów *K. oxytoca* i *K. pneumoniae* wyznaczone na podstawie profili elektroforetycznych uzyskanych metodą ITS PCR oraz metodami LM PCR ; 1-23 szczepy *K. oxytoca*, Kp – szczep *K. pneumoniae*, KoX1, KoX2, KoX3, KoY1, KoY2, Ko1, Ko2, Ko3, Ko4, KoA, KoB, KoC, KoD, KoE, KoF – podgrupy genotypowe.

Lp.	gatunek	Podgrupa genotypowa				
		ITS PCR	PCR MP	LM PCR/Shifter NGCN	pehX-LM PCR simple/XbaI	pehX ddLMS PCR BfrI/BalI
1	<i>K. oxytoca</i>	KoX2	KoC	KoX3	KoX1	Ko2
2		KoX2	KoB	KoX3	KoX2	Ko2
3		KoY2	KoF	KoY2	KoY1	Ko4
4		KoX2	KoB	KoX3	KoX1	Ko2
5		KoY1	KoF	KoY1	KoY1	Ko4
6		KoY1	KoF	KoY1	KoY1	Ko4
7		KoX1	KoC	KoX1	KoX1	Ko2
8		KoX1	KoC	KoX1	KoX1	Ko2
9		KoY1	KoF	KoY1	KoY2	Ko4
10		KoX1	KoA	KoX1	KoX1	Ko1
11		KoX1	KoA	KoX1	KoX1	Ko1
12		KoX1	KoA	KoX1	KoX1	Ko1
13		KoX1	KoA	KoX1	KoX1	Ko1
14		KoX1	KoA	KoX2	KoX3	Ko3
15		KoX1	KoA	KoX2	KoX3	Ko3
16		KoX1	KoA	KoX2	KoX3	Ko3
17		KoX1	KoA	KoX1	KoX2	Ko1
18		KoX1	KoA	KoX1	KoX2	Ko1
19		KoY2	KoE	KoY2	KoY2	Ko4
20		KoX1	KoD	KoX1	KoX3	Ko3
21		KoY2	KoE	KoY1	KoY1	Ko4
22		KoY2	KoE	KoY2	KoY1	Ko4
23		KoY1	KoF	KoY2	KoY2	Ko4
Kp	<i>K. pneumoniae</i>	KoY2	KoE	KoZ	Kp	-
stopień zróżnicowania		4/24	6/24	6/24	6/24	4/23

Tabela 48. Wyniki genotypowania szczepów *K. oxytoca* i *K. pneumoniae* różnymi metodami z grupy LM PCR oraz ITS PCR.

W wyniku typowania metodą ITS PCR podzieliłam szczepy *Klebsiella* na dwie grupy genotypowe: KoX i KoY. Podział ten ma odzwierciedlenie w wynikach typowania dla metod LM PCR (tab. 49).

linie genetyczne	ITS PCR	PCR MP	LM PCR/Shifter NGCN	pehX-LM PCR simple/XbaI	pehX-ddLMS PCR BfrI/BalI
1	KoX (15)	KoA (9), KoB (2), KoC (3), KoD (1)	KoX1 (9), KoX2 (3), KoX3 (3)	KoX1 (8), KoX2 (3), KoX3 (4)	Ko1 (6), Ko2 (5), Ko3 (4)
2	KoY (8+1*)	KoE (3+1*), KoF (5)	KoY1 (3), KoY2 (3)	KoY1 (5), KoY2 (3),	Ko4 (8)
odstępstwa			KoZ (1*)	Kp (1*)	

Tabela 49. Grupowanie szczepów *K. oxytoca* i *K. pneumoniae*; \* szczep *K. pneumoniae*; (w nawiasach podano ilość szczepów o danym genotypie).

W wyniku typowania metodą PCR MP wyróżniłam 6 grup genotypowych, z czego cztery (KoA-KoD) odnoszą się do grupy KoX ITS PCR, a dwie (KoE-F) do grupy KoY ITS PCR. W wyniku typowania metodą *pehX*-ddLMS PCR w układzie *BfrI/BalI* wyróżniłam cztery różne grupy genotypowe, stanowiące jednocześnie cztery genotypy. Trzy z nich Ko1-3 odnoszą się do grupy KoX ITS PCR, natomiast jedna grupa Ko4 do grupy KoY ITS PCR. Dla pozostałych metod LM PCR (LM PCR/Shifter oraz *pehX*-LM PCR *simple/XbaI*) widać wyraźny podział na dwie grupy genotypowe KoX i KoY. Wyniki typowania 209 szczepów *K. oxytoca* potwierdzają zgodność grupowania dla metod LM PCR i ITS PCR (dane nie przedstawione w rozprawie).

Podział na podgrupy jest różny dla różnych metod, zarówno pod względem ilości podgrup jak i ilości szczepów wchodzących w skład jednej podgrupy. Różni się także stopień podobieństwa pomiędzy poszczególnymi szczepami. Przykładowo, szczepy nr 14, 15 i 16 są wg metody PCR MP i ITS PCR bardziej podobne do szczepów nr 10-13, a wg metod LM PCR/*Shifter*, *pehX*-LM PCR *simple/XbaI* oraz *pehX*-ddLMS PCR *BfrI/BalI* wraz ze szczepem nr 20 stanowią odrębną podgrupę (w tabeli 49 szczepy w odrębnych podgrupach zaznaczone są różnymi kolorami). Szczepy blisko spokrewnione zawsze grupowane są razem (np. szczep 14 i 15 ze szczepem 16).

Wszystkie metody LM PCR mają podobny stopień dyskryminacji (uwzględniając metodę *pehX*-ddLMS PCR w układzie *AclI/BalI*, rys. 41) i umożliwiają identyfikację szczepów będących w relacji klonalnej (szczepów o tym samym genotypie) (tab. 50).

Lp	gatunek	Genotyp			
		PCR MP	LM PCR/ <i>Shifter</i> NGCN	<i>pehX</i> -LM PCR <i>simple/XbaI</i>	<i>pehX</i> ddLMS PCR <i>AclI/BalI</i>
1	<i>K. oxytoca</i>	A	A	A	A
2		B	B	B	B
3		C	C	C	C
4		D	D	D	D
5		E	E	E	E
6		E	E	E	E
7		F	F	F	F
8		F	F	F	F
9		G	G	G	G
10		H	H	H	H
11		H	H	H	H
12		H	H	H	H
13		H	H	H	H
14		I	I	I	I
15		I	I	I	I
16		J	J	J	J
17		K	K	K	K
18		K	K	K	K
19		L	L	L	L
20		M	M	M	M
21		N	N	N	N
22		O	O	O	O
23		P	P	P	P
Kp	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	-	-

Tab. 50. Genotypy *K. oxytoca* i *K. pneumoniae* wyznaczone metodami LM PCR.

W wyniku analizy metodami PCR MP oraz LM PCR/*Shifter* otrzymuje się profile elektroforetyczne bogate w prążki o różnej intensywności (różne stężenie poszczególnych produktów PCR). W analizie porównawczej profili elektroforetycznych bierze się pod uwagę tylko obecność lub brak produktu PCR o danej długości (obecność prążka na danej wysokości w profilu elektroforetycznym). W przypadku, gdy prążek ma bardzo niską intensywność, może on zostać uznany za produkt niespecyficzny, artefakt albo tło. Decyzja o włączeniu lub wyłączeniu go z analizy porównawczej zależy od osoby prowadzącej badanie.

Trafność oceny zależy natomiast od doświadczenia oraz znajomości charakterystyki epidemiologicznej szczepów. Analiza metodami LM PCR oraz ddLMS PCR prowadzi do uzyskania profilu elektroforetycznego, zawierającego jeden lub kilka produktów PCR, o podobnym stężeniu. Dzięki temu analiza i interpretacja danych, w tym identyfikacja szczepów klonalnie zależnych jest dużo łatwiejsza.

Niestety, im mniejsza liczba prążków w profilu elektroforetycznym tym mniejsza ilość cech, na podstawie których wyznaczany jest stopień podobieństwa pomiędzy szczepami. W wyniku analizy LM PCR *simple* (bez dodatkowej, specyficznej reakcji PCR) podobieństwo pomiędzy niektórymi szczepami *K. oxytoca* wynosiło 0%. Szczepy te obok *K. pneumoniae* zostały uznane za szczepy innego gatunku. Te same szczepy typowane metodą PCR MP wykazywały podobieństwo co najmniej 4%. Typowanie metodą ddLMS PCR nie daje możliwości oceny podobieństwa szczepów, pozwala za to wyznaczyć szczepy klonalnie zależne lub klonalnie niezależne (system binarny). Pewnej informacji o pokrewieństwie dostarcza typowanie w kilku układach diagnostycznych (układach enzymów) o różnym stopniu dyskryminacji, jednak wiąże się to z wykonywaniem kilku analiz dla jednego szczepu, co w przypadku badań epidemiologicznych nie jest wskazane (wysoki koszt i czas analizy).

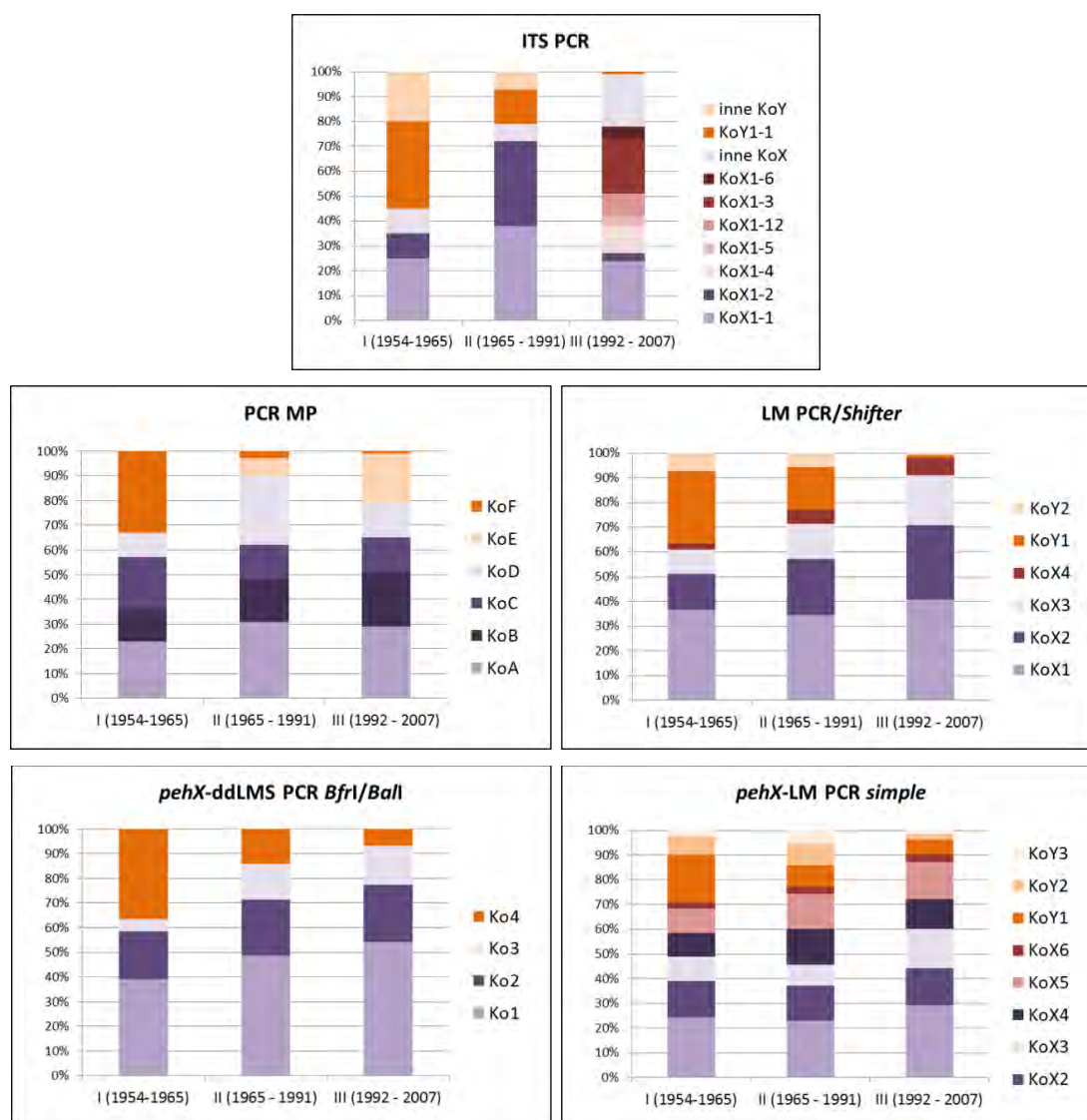
Niewątpliwą zaletą metod LM PCR *simple* oraz ddLMS PCR jest ich specyficzność względem badanego gatunku lub danej cechy (np. oporności na antybiotyki). W przypadku metody LM PCR *simple* obecność lub brak charakterystycznego produktu PCR (dodatkowa amplifikacja fragmentu specyficznego lub charakterystyczny gatunkowo fragment restrykcyjny) pozwala potwierdzić przynależność badanego szczepu do grupy badanej lub odrzucić próbę (albo skierować do powtórnego badania). W metodzie ddLMS PCR świadectwem przynależności badanego szczepu do grupy badanej jest sama obecność produktu PCR. Szczepy błędnie zidentyfikowane lub nie posiadające danej cechy będą automatycznie odrzucane na podstawie negatywnego wyniku analizy.

W analizie porównawczej duży problem może sprawiać ocena położenia prążka w profilu elektroforetycznym. Wysokie stężenie produktu PCR powoduje, iż w profilu elektroforetycznym prążek się „rozmywa” i jego położenie w stosunku do prążków w porównywanych profilach jest nieokreślone. Stwierdzenie, czy produkt ten jest identycznej długości co produkt w innej próbce jest oceną subiektywną. W przypadku analizy PCR MP czy LM PCR/*Shifter* zmniejszenie ilości próby nakładanej na żel (rozdzielanej elektroforetycznie) w celu zmniejszenia stężenia niektórych produktów może powodować, że inne produkty będą niewidoczne, zatem wynik badania będzie niepełny i może doprowadzić do błędnej oceny szczepów badanych. W przypadku metody ddLMS PCR położenie prążka względem prążków innych prób ma kluczowe znaczenie w interpretacji wyników. Jeśli produkty PCR różnią się o 10 – 20 pz różnica ta może zostać niezauważona i szczepy uznane za genetycznie identyczne. W rzeczywistości szczepy te mogą należeć do dwóch różnych linii genetycznych (różnica w długości produktów PCR nie ma przełożenia na odległość genetyczną między szczepami). Dlatego konieczne jest prowadzenie rozdziału elektroforetycznego w stałych warunkach, a w razie problemów z oszacowaniem długości produktów PCR, wykorzystać odpowiedni program komputerowy.

## Wykorzystanie metod LM PCR w typowaniu dalekiego zasięgu

Metody LM PCR ze względu na to, że charakteryzują się bardzo dużym poziomem dyskryminacji są rzadko stosowane do badań podobieństwa genetycznego szczepów izolowanych w długim okresie czasu. Zmiany w genomowym DNA nagromadzone przez lata nie mają przełożenia liniowego na zmiany w profilu elektroforetycznym. Szczepy izolowane w odstępie 10 lat mają podobnie niski poziom podobieństwa co szczepy izolowane w odstępie 30 lat. Metody LM PCR dają możliwość badania różnorodności genotypowej w krótkim przedziale czasu, umożliwiają identyfikację genotypu lub grupy genotypów dominujących w danym okresie i na danej przestrzeni.

Zestawiłam wyniki typowania 209 szczepów *K. oxytoca* metodami LM PCR i ITS PCR [142] wg czasu izolacji. Szczepy izolowane były w latach 1950 – 2007 (>50 lat) od pacjentów hospitalizowanych w różnych ośrodkach w całej Polsce. Aby ułatwić analizę rozkładu genotypów w czasie, podzieliłam cały okres badawczy na trzy części: I (1954 – 1964), II (1965 – 1991) i III (1992 – 2007) (rys. 67). Na podstawie wyników typowania szczepy zostały podzielone na grupy genotypowe i podgrupy (wg tab. 47 oraz grupowania przedstawionego dla 23 szczepów *K. oxytoca* – rys. 66).



Rys. 67. Wykresy przedstawiające rozkład genotypów *K. oxytoca* w czasie, wyznaczonych metodą ITS PCR oraz metodami LM PCR.

Przyglądając się wynikom typowania metodami LM PCR wydaje się, że zróżnicowanie szczepów *K. oxytoca* utrzymywało się względnie na stałym poziomie. Ilość grup genotypowych w każdym okresie badanym jest taka sama. Zmienia się nieznacznie ilość szczepów w danej grupie genotypowej w różnych okresach badawczych.

Na przedstawionych wykresach można zauważyć podobny schemat rozkładu genotypów w czasie. Grupy genotypowe KoY (ITS PCR, LM PCR/*Shifter*, LM PCR simple), Ko4 (ddLMS PCR) i KoF w pierwszym okresie badawczym reprezentowane były przez prawie połowę szczepów, natomiast w ostatnim okresie jedynie przez pojedyncze szczepy. Liczba szczepów należąca do grupy KoX (ITS PCR, LM PCR/*Shifter*, LM PCR simple), Ko1-3 (ddLMS PCR) i KoA-D (PCR MP) stopniowo rosła, aż do prawie całkowitej dominacji w okresie trzecim.

Poziom zróżnicowania szczepów w obrębie grup genotypowych jest wysoki i utrzymuje się względnie na stałym poziomie. Wg danych ITS PCR liczba genotypów w trzecim okresie badawczym znacznie wzrosła (wyodrębniłam 12 nowych podgrup genotypowych), jednak to nie wpłynęło na zmianę liczby grup genotypowych LM PCR. Metody LM PCR analizują losowe zmiany w całym genomie bakterii. Wśród szczepów o tak dużym stopniu zróżnicowania kolejne zmiany genetyczne wpływają na zmianę profilu genetycznego, jednak nie na stopień pokrewieństwa, który i tak jest już bardzo niski. Z tego też względu stosowanie metod LM PCR do analizy szczepów izolowanych w długim okresie czasu, daje jedynie pogląd na zmiany stopnia zróżnicowania genetycznego. Ocena pokrewieństwa pomiędzy szczepami, badanie dywergencji genotypów powinna być określana przy współudziale metod o niższym stopniu pokrewieństwa, jak na przykład wykorzystana w pracy metoda ITS PCR.

### **Wykorzystanie metod LM PCR w typowaniu bliskiego zasięgu**

Metody LM PCR ze względu na wysoki poziom dyskryminacji i wysoką czułość, nadają się znakomicie do identyfikacji szczepów klonalnie zależnych, a tym samym do identyfikacji ognisk epidemicznych i zakażeń szpitalnych. Dostarczają informacji na temat charakteru epidemii, umożliwiają ustalenie genotypu szczepu dominującego na danym oddziale oraz czasu jego pojawienia się. Metody te mogą być również zastosowane w analizie sytuacji epidemicznych i identyfikacji transmisji bakteryjnych u poszczególnych pacjentów.

Analizie metodami LM PCR poddałam grupę szczepów izolowanych od pacjentów hospitalizowanych w jednej jednostce medycznej na terenie Oddziału Noworodków Szpitala Miejskiego w Warszawie w 1992 roku (tab. 51) [152].

Analiza szczepów *K. oxytoca* izolowanych od 8 pacjentów w zbliżonym okresie, hospitalizowanych na tym samym oddziale Szpitala Miejskiego, metodami LM PCR oraz ITS PCR 14 wykazała obecność dwóch genotypów. Stopień podobieństwa genetycznego wyznaczony metodą ITS PCR wynosi >80%, co wskazuje na wspólne źródło pochodzenia.

sLp	Materiał badany	Pacjent	Genotyp PCR MP	Genotyp ITS - PCR	Genotyp LM PCR/Shifter NGCN	pehX-LM PCR/XbaI	pehX-ddLMS PCR AclI/BalI
101	b.d.	P1	KoX1-1	KoA-1	KoX1-1	KoX1-1	352pz
103	b.d.	P2	KoX1-1	KoA-1	KoX1-1	KoX1-1	352pz
104	gardło - wymaz	3	KoX1-1	KoA-1	KoX1-1	KoX1-1	352pz
105	Kał		KoX1-1	KoA-1	KoX1-1	KoX1-1	352pz
106	gardło - wymaz	P4	KoX1-1	KoA-1	KoX1-1	KoX1-1	352pz
107	mocz		KoX1-1	KoA-1	KoX1-1	KoX1-1	352pz
108	pępek - wymaz ropy		KoX1-1	KoA-1	KoX1-1	KoX1-1	352pz
109	gardło - wymaz		KoX1-1	KoA-1	KoX1-1	KoX1-1	352pz
110	kał		KoX1-1	KoA-1	KoX1-1	KoX1-1	352pz
102	mocz	P5	KoX1-3	KoC-1	KoX2-1	KoX2-1	284 pz
111	mocz	P6	KoX1-3	KoC-1	KoX2-1	KoX2-1	284 pz
112	mocz	P7	KoX1-3	KoC-1	KoX2-1	KoX2-1	284 pz
113	mocz	P8	KoX1-3	KoC-1	KoX2-1	KoX2-1	284 pz
114	stolik do przewijania niemowląt		KoX1-3	KoC-1	KoX2-1	KoX2-1	284 pz

Tabela 59. Wykaz szczepów *K. oxytoca* izolowanych na terenie Oddziału Noworodków Szpitala Miejskiego w Warszawie w 1992r.

### A. Identyfikacja zakażenia szpitalnego

Obecność tego samego genotypu u różnych pacjentów może wskazywać na zakażenie szpitalne. Ponieważ szczep izolowany z powierzchni stolika do przewijania niemowląt charakteryzuje się tym samym genotypem, co szczepy izolowane od pacjentów P4, P5, P6, P7 i P8 pozwala sądzić, że jest on źródłem zakażenia wymienionych pacjentów.

Jedną z przyczyn występowania zakażeń szpitalnych jest duży stopień nosicielstwa drobnoustrojów patogennych u pacjentów i personelu szpitalnego. Pracownicy medyczni ulegają kolonizacji przez szpitalną mikroflorę bakteryjną i jako bezobjawowi nosiciele stanowią potencjalne zagrożenie, związane z możliwością przeniesienia drobnoustroju podczas zabiegów pielęgnacyjnych i leczniczych na hospitalizowanych chorych. Źródłem zakażenia w takim przypadku jest najczęściej pierwszy pacjent, u którego zidentyfikowano szczep o charakterystycznym genotypie (genotyp dominujący w danym okresie, odpowiedzialny za wystąpienie zakażenia).

Częstość występowania zakażeń szpitalnych pozostaje w ścisłym związku ze stosowaniem inwazyjnych technik diagnostycznych i leczniczych (cewniki, rurki dotchawicze, wenflony) oraz z otaczającym pacjentów środowiskiem (meble, sanitariaty). Analiza genotypowa szczepów izolowanych z różnych powierzchni, aparatury, narzędzi medycznych pozwala wykryć źródło zakażenia.

### B. Analiza zakażenia u pojedynczego pacjenta

Analiza różnych szczepów izolowanych od pacjenta może być pomocna w określeniu charakteru zakażenia (nawrotowe, przewlekłe) oraz jego zasięgu (ogólnoustrojowe, lokalne). Na przykładzie podanym w tabeli 51, analiza genotypowa szczepów izolowanych od jednego pacjenta (P4 oraz P3) z różnych źródeł (mocz, kał, wymazy z gardła, pępka) wykazała obecność szczepu o tym samym genotypie – co wskazuje na



ogólnoustrojowe zakażenie jednym szczepem bakteryjnym. Przyczyną kolonizacji wielonarządowej tym samym szczepem bakteryjnym, mogła być transmisja tego drobnoustroju wewnątrz organizmu pacjenta.

W przypadku analizy szczepów izolowanych od jednego pacjenta w różnych odstępach czasu można określić czy zakażenie ma charakter przewlekły (długotrwałe zakażenie tym samym szczepem bakteryjnym), czy nawracający (wielokrotne, ustępujące zakażenia genetycznie identycznymi ustrojami). Zakażenie przewlekłe jest najczęściej wynikiem niewłaściwego leczenia, stąd w organizmie pacjenta mimo stosowanej antybiotykoterapii przez długi czas utrzymuje się ten sam szczep bakteryjny. Zakażenia nawracające są wynikiem wielokrotnych zakażeń i mogą być spowodowane nadmierną ekspozycją pacjenta na to samo źródło zakażenia lub wskazywać na to, że patogen przechodzi w stan utajenia (nie podlega całkowitej erydykacji z organizmu pacjenta).

Do analizy sytuacji epidemiologicznej, w celu identyfikacji szczepów genetycznie identycznych można zastosować dowolną metodę LM PCR. W celu szybkiego oznaczenia prób (określenia czy dane genotypy są idenyczne czy nie) najłatwiej użyć metod specyficznych, wymagających krótszego czasu analizy, np. LM PCR *simple* czy ddLMS PCR (w wielu przypadkach nawet piętnasto minutowy rozdział w żelu agarozowym wystarczy aby ocenić wyniki). Jeśli celem badania jest określenie drogi transmisji zakażenia konieczne jest zastosowanie metod np. PCR MP, LM PCR/*Shifter* czy LM PCR *simple*, które pozwalają oszacować podobieństwo pomiędzy szczepami. Zastosowanie LM PCR *simple* ze specyficzną reakcją PCR umożliwi dodatkowo kontrolę czystości szczepu i prawidłowego przypisania do gatunku.

## 7. Wnioski końcowe

Gwałtowny rozwój biologii molekularnej, otworzył nowe możliwości dla diagnostyki mikrobiologicznej. Molekularne metody genotypowe, oparte na analizie materiału genetycznego, umożliwiają dokładniejszą identyfikację, wykrywanie i różnicowanie drobnoustrojów. Coraz szersze zastosowanie w badaniach epidemiologicznych znajdują metody oparte na selektywnej amplifikacji fragmentów restrykcyjnych z dołączonymi do nich oligonukleotydowymi adaptorami (LM PCR). Metody te to kompleksowy zbiór podstawowych narzędzi i technik molekularnych, które pozwalają badać zmiany w sekwencji genomowego DNA. Dzięki szerokiej gamie dostępnych enzymów restrykcyjnych oraz znajomości mechanizmów selekcji fragmentów amplifikowanych, można projektować układy LM PCR o różnym stopniu dyskryminacji i o różnym przeznaczeniu. Metody LM PCR można w dowolny sposób modyfikować, wprowadzając nowe elementy (np. dodatkową amplifikację fragmentu specyficznego), nowe mechanizmy lub kombinację kilku obecnie znanych mechanizmów selekcji fragmentów amplifikowanych (np. zastosowanie specyficznych starterów oraz wewnątrzcząsteczkowej hybrydyzacji fragmentów zawierających terminalne sekwencje homologiczne). Dzięki temu metody te można wykorzystać do różnych celów, zarówno do wewnątrzgatunkowego typowania, jak i do identyfikacji gatunkowej czy rodzajowej badanych drobnoustrojów.

Zaproponowana przeze mnie nowa metoda ddLMS PCR, należy do grupy metod LM PCR. Umożliwia ona typowanie drobnoustrojów z uwzględnieniem ich przynależności gatunkowej lub rodzajowej, gdyż opiera się na amplifikacji fragmentów restrykcyjnych, zawierających wewnątrz znaną, specyficzną dla danego gatunku lub rodzaju drobnoustroju sekwencję markerową. W wyniku typowania otrzymuje się produkt PCR, którego obecność potwierdza przynależność do danego poziomu taksonomicznego, natomiast jego długość pozwala różnicować szczepy w obrębie tego poziomu. Dobranie odpowiedniej sekwencji markerowej oraz układu restrykcyjnego, pozwala zaprojektować układ o dowolnym stopniu specyficzności i dowolnym poziomie dyskryminacji. Metodę ddLMS PCR można wykorzystać zarówno do różnicowania wewnątrzgatunkowego (np. układ *pehX*-ddLMS PCR dla *K. oxytoca*) z zachowaniem specyficzności względem gatunku, a także do identyfikacji gatunkowej (np. układ *recA*-ddLMS PCR dla *Acinetobacter*), z zachowaniem specyficzności względem rodzaju lub rodziny. Można zaprojektować układ typu simplex, w którym wynik analizy w postaci jednego, charakterystycznej długości produktu PCR w sposób łatwy i czytelny pozwoli zidentyfikować gatunek (układ *recA*-ddLMS PCR) lub wskazać szczepy klonalnie zależne (genetycznie identyczne, np. układ *pehX*-ddLMS PCR). Można także zaprojektować układ typu multiplex (*rrn*-ddLMS PCR), w którym wynik analizy w postaci profilu elektroforetycznego o kilku, różnej długości produktach PCR (w ilości zależnej od ilości kopii sekwencji markerowej w genome badanego drobnoustroju) umożliwi ocenę stopnia pokrewieństwa genetycznego badanych szczepów.

Metoda ddLMS PCR w odróżnieniu od pozostałych metod z grupy LM PCR, wydaje się nie być wrażliwa na kontaminację obcym DNA. Dzięki temu istnieje możliwość wykorzystania jej do analizy DNA

wprost z materiału klinicznego, bez konieczności izolacji czystej kultury bakteryjnej i wstępnej identyfikacji gatunkowej, co znacznie skróciłoby czas analizy. Takie postępowanie mogłoby przyczynić się do usprawnienia monitoringu i kontroli zakażeń szpitalnych oraz identyfikacji miejscowych epidemii.

Ponieważ metoda ddLMS PCR bada zmienność sekwencji w konkretnym regionie genomowego DNA (w obszarze poprzedzającym sekwencję markerową), stopień zmienności genetycznej w tym regionie może nie odzwierciedlać stopnia zmienności w całym genomowym DNA. Poziom dyskryminacji danego układu diagnostycznego, może być niewystarczający do wewnątrzgatunkowego typowania wybranych drobnoustrojów, dlatego wyniki uzyskane metodą ddLMS PCR należy zweryfikować uznanymi metodami o wysokim potencjale różnicującym np. PCR MP, PFGE.

Profil elektroforetyczny produktów PCR uzyskany w wyniku typowania metodami LM PCR zawiera fragmenty amplifikowane z różnych regionów genomowego DNA. Mogą być to fragmenty specyficzne dla rodzaju, gatunku lub specyficzne dla danego izolatu. Uzyskany wzór jest unikalny i stanowi pewnego rodzaju wizytówkę badanego mikroorganizmu. Stosując kombinację enzymów restrykcyjnych oraz różne mechanizmy selekcji amplifikowanych fragmentów można zaprojektować układ, w którym uzyskuje się ograniczoną liczbę produktów PCR, z których co najmniej jeden występuje u wszystkich drobnoustrojów danego poziomu taksonomicznego. Obecność tego produktu może wskazywać przynależność gatunkową lub rodzajową (np. układ LM PCR *simple/XhoI* lub LM PCR/*Shifter* w układzie starterów stAGCT i stNGCA dla *A. baumannii*). Pozostałe produkty PCR w profilu elektroforetycznym, specyficzne dla danego szczepu, umożliwiają różnicowanie wewnątrzgatunkowe.

W przypadku, gdy wyróżnienie fragmentu gatunkowo/rodzajowo specyficznego nie jest możliwe, ze względu na wysokie zróżnicowanie genetyczne szczepów, specyficzność metody LM PCR można podnieść, wprowadzając do analizy dodatkową, amplifikację charakterystycznego dla danej grupy (gatunku) drobnoustrojów fragmentu DNA. Obecność tego dodatkowego produktu (o stałej, znanej wielkości) w profilu elektroforetycznym potwierdza przynależność gatunkową szczepów (np. układ *pehX*-LM PCR *simple/XbaI*).

Przedstawione w pracy układy diagnostyczne oparte na metodach LM PCR charakteryzuje wysoki stopień dyskryminacji oraz wysoki stopień specyficzności względem wybranych gatunków drobnoustrojów. Mogą być one wykorzystane do różnicowania szczepów na różnych poziomach taksonomicznych oraz do identyfikacji szczepów klonalnie zależnych. Dodatkowo, układy te umożliwiają wykrycie błędów związanych z identyfikacją gatunkową, dzięki czemu uzyskane wyniki typowania są bardziej wiarygodne, zwłaszcza dla drobnoustrojów o wysokim naturalnym stopniu zróżnicowania genetycznego. Mogą być one z powodzeniem wykorzystane w badaniach epidemiologicznych i w diagnostyce mikrobiologicznej, a także w badaniu różnorodności genetycznej wybranych gatunków drobnoustrojów.

## 8. Piśmiennictwo

1. Szewczyk EM. Diagnostyka bakteriologiczna. Wydawnictwo PWN, Warszawa 2005
2. Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. J Clin Microbiol 1989;27:731-4
3. Cantón R, Pérez-Vázquez M, Oliver A, et al. Evaluation of the Wider System, a New Computer-Assisted Image-Processing Device for Bacterial Identification and Susceptibility Testing. J Clin Microbiol 2000;38:1339-46
4. Bochner BR. Sleuthing out bacterial identities. Nature 1989;339:157-8
5. Frasch CE. Serogroup and serotype classification of bacterial pathogens. Methods Enzymol 1994;235:159-74
6. Petts DN. Evaluation of a modified nitrous acid extraction latex agglutination kit for grouping beta-hemolytic streptococci and enterococci. J Clin Microbiol 1995;33:1016-8
7. Sloos JH, Horrevorts AM, Van Boven CP and Dijkshoorn L. Identification of multiresistant *Staphylococcus epidermidis* in neonates of a secondary care hospital using pulsed field gel electrophoresis and quantitative antibiogram typing. J Clin Pathol 1998;51:62-7
8. Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, et al. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. J Clin Microbiol 1996;34:1519-25
9. Gray JW, Stewart D and Pedler SJ. Species identification and antibiotic susceptibility testing of enterococci isolated from hospitalized patients. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:1943-5
10. Kuhnen E, Richter F, Richter K and Andries L. Establishment of a typing system for group D streptococci. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A] 1988;267:322-30
11. Kuhnen E, Rommelsheim K and Andries L. Combined use of phage typing, enterococcinotyping and species differentiation of group D streptococci as an effective epidemiological tool. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A] 1987;266:586-95
12. Goerke C, Matias y Papenberg S, Dasbach S, et al. Increased frequency of genomic alterations in *Staphylococcus aureus* during chronic infection is in part due to phage mobilization. J Infect Dis 2004;189:724-34
13. Godovannyi BA, Litinskii Iu I and Gerok GI. The role of colicins in infectious pathology (review of the literature). Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 1974:76-80
14. Weller TM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? J Hosp Infect 2000;44:160-72
15. Holmes B, Costas M and Wood AC. Typing of *Proteus mirabilis* from clinical sources by computerized analysis of electrophoretic protein patterns. J Appl Bacteriol 1991;71:467-76
16. Dijkshoorn L, Van Vianen W, Degener JE and Michel MF. Typing of *Acinetobacter calcoaceticus* strains isolated from hospital patients by cell envelope protein profiles. Epidemiol Infect 1987;99:659-67
17. Teixeira LM, Facklam RR, Steigerwalt AG, Pigott NE, Merquior VL and Brenner DJ. Correlation between phenotypic characteristics and DNA relatedness within *Enterococcus faecium* strains. J Clin Microbiol 1995;33:1520-3
18. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN and Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl Environ Microbiol 1986;51:873-84
19. Tomayko JF, Murray BE. Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 1995;33:2903-7
20. Frasch CE. Serogroup and serotype classification of bacterial pathogens. Methods Enzymol 1994;235:159-74
21. Petts DN. Evaluation of a modified nitrous acid extraction latex agglutination kit for grouping beta-hemolytic streptococci and enterococci. J Clin Microbiol 1995;33:1016-8
22. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell. 1984; May;37(1):67-75
23. Taylor DN, Wachsmuth IK, Shangkuan YH, Schmidt EV, Barrett TJ, Schrader JS, Scherach CS, McGee HB, Feldman RA, Brenner DJ. Salmonellosis associated with marijuana: a multistate outbreak traced by plasmid
24. Tenover F.C. Plasmid fingerprinting. A tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community-acquired infections. Clin Lab Med. 1985 Sep;5(3):413-36.
25. Taylor DN, Wachsmuth IK, Shangkuan YH, Schmidt EV, Barrett TJ, Schrader JS, Scherach CS, McGee HB, Feldman RA, Brenner DJ. Salmonellosis associated with marijuana: a multistate outbreak traced by plasmid fingerprinting. N Engl J Med. 1982 May 27;306(21):1249-53.
26. Eisgruber H., Wiedmann M., Stolle A. Use of plasmid profiling as a typing method for epidemiologically related *Clostridium perfringens* isolates from food poisoning cases and outbreaks. Lett Appl Microbiol. 1995 May;20(5):290-4.
27. Liu P.Y., Shi Z.Y., Lau Y.J., Hu B.S., Shyr J.M., Tsai W.S., Lin Y.H., Tseng C.Y. Use of restriction endonuclease analysis of plasmids and pulsed-field gel electrophoresis to investigate outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis. 1996 Jan;22(1):86-90.

28. Donabedian SM, Thal LA, Hershberger E, Perri MB, Chow JW, Bartlett P, Jones R, Joyce K, Rossiter S, Gay K, Johnson J, Mackinson C, Debess E, Madden J, Angulo F, Zervos MJ. Molecular characterization of gentamicin-resistant Enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J Clin Microbiol.* 2003 Mar;41(3):1109-13.
29. Krawczyk B, Lewandowski K, Kur J. Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. *Mol Cell Probes.* 2002 Feb;16(1):1-11.
30. Karahan M, Cetinkaya B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *Vet J.* 2007 Sep;174(2):428-31. Epub 2006 Aug 9.
31. Overmann J, Coolen MJ, Tuschak C. Specific detection of different phylogenetic groups of chemocline bacteria based on PCR and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene fragments. *Arch Microbiol.* 1999 Aug;172(2):83-94.
32. Matussek A, Stark L, Dienus O, Aronsson J, Mernelius S, Löfgren S, Lindgren PE. Analyzing multiclonality of *Staphylococcus aureus* in clinical diagnostics using spa-based denaturing gradient gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 2011 Oct;49(10):3647-8. Epub 2011 Aug 10.
33. Li J, Xin J, Zhang L, Jiang L, Cao H, Li L. Rapid Detection of *rpoB* Mutations in Rifampin Resistant *M. tuberculosis* from Sputum Samples by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Int J Med Sci.* 2012;9(2):148-56. Epub 2012 Jan 11.
34. Riesner D, Steger G, Zimmat R, Owens RA, Wagenhöfer M, Hillen W, Vollbach S, Henco K. Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions. *Electrophoresis.* 1989 May-Jun;10(5-6):377-89.
35. Henco K, Harders J, Wiese U, Riesner D. Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for the detection of polymorphic DNA and RNA. *Methods Mol Biol.* 1994;31:211-28.
36. Yasuda M, Shiaris MP. Differentiation of bacterial strains by thermal gradient gel electrophoresis using non-GC-clamped PCR primers for the 16S-23S rDNA intergenic spacer region. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Feb 1;243(1):235-42.
37. Newcombe J, Dyer S, Blackman L, Cartwright K, Palmer WH, McFadden J. PCR-single-stranded confirmational polymorphism analysis for non-culture-based subtyping of meningococcal strains in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1997 Jul;35(7):1809-12.
38. Al-Adhami BH, Huby-Chilton F, Blais BW, Martinez-Perez A, Chilton NB, Gajadhar AA. Rapid discrimination of *Salmonella* isolates by single-strand conformation polymorphism analysis. *J Food Prot.* 2008 Oct;71(10):1960-6.
39. Edwards KJ, Kaufmann ME, Saunders NA. Rapid and accurate identification of coagulase-negative staphylococci by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001 Sep;39(9):3047-51.
40. Motoshima M, Yanagihara K, Fukushima K, Matsuda J, Sugahara K, Hirakata Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. Rapid and accurate detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis targeting *gyrB* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 May;58(1):53-8. Epub 2007 Mar 26.
41. Clarke SC. Nucleotide sequence-based typing of bacteria and the impact of automation. *Bioessays.* 2002 Sep;24(9):858-62.
42. Yehezkel TB, Linshiz G, Shapiro E. De novo DNA synthesis using single-molecule PCR. *Methods Mol Biol.* 2012;852:35-47.
43. Hallin M, Friedrich AW, Struelens MJ. spa typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol.* 2009;551:189-202.
44. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3140-5
45. Platonov AE, Shipulin GA and Platonova OV. [Multilocus sequencing--a new method of genotyping bacteria and first results of its use]. *Genetika* 2000;36:597-605
46. Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 2003 Oct;11(10):479-87.
47. Aanensen D.M., Spratt B.G. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jul 1;33(Web Server issue):W728-33.
48. Jolley KA, Bliss CM, Bennett JS, Bratcher HB, Brehony CM, Colles FM, Wimalarathna HM, Harrison OB, Sheppard SK, Cody AJ, Maiden MC. Ribosomal Multi-Locus Sequence Typing: universal characterisation of bacteria from domain to strain. *Microbiology.* 2012 Jan 27. [Epub ahead of print]
49. Chan MS, Maiden MC and Spratt BG. Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics* 2001;17:1077-83
50. Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJM, Robinson DA, et al. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecalis* Reveals Hospital-Adapted Genetic Complexes in a Background of High Rates of Recombination. *J Clin Microbiol* 2006;44:2220-8
51. Sa-Leao R, Tomasz A and de Lencastre H. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* clones with unusual drug resistance patterns: genetic backgrounds and relatedness to other epidemic clones. *J Infect Dis* 2001;184:1206-10
52. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ and Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000;38:1008-15
53. Mehndiratta PL, Bhalla P. Typing of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: A technical review. *Indian J Med Microbiol.* 2012 Jan;30(1):16-23.
54. Tavanti A, Gow NA, Senesi S, Maiden MC and Odds FC. Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2003;41:3765-76

55. Kremer K, Arnold C, Cataldi A, et al. Discriminatory Power and Reproducibility of Novel DNA Typing Methods for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. *J Clin Microbiol* 2005;43:5628-38
56. van Deutekom H, Supply P, de Haas PEW, et al. Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Analysis, a More Accurate Method for Identifying Epidemiological Links between Patients with Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2005;43:4473-9
57. Lunel FV, Licciardello L, Stefani S, et al. Lack of consistent short sequence repeat polymorphisms in genetically homologous colonizing and invasive *Candida albicans* strains. *J Bacteriol* 1998;180:3771-8
58. Field D, Wills C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proc Biol Sci* 1996;263:209-15
59. Furuya D, Tsuji N, Kuribayashi K, Tanaka M, Hosono Y, Uehara N, Watanabe N. Evaluation of *spa* typing for the classification of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Jpn J Infect Dis*. 2010 Sep;63(5):364-7.
60. Melles DC, Schouls L, François P, Herzig S, Verbrugh HA, van Belkum A, Schrenzel J. High-throughput typing of *Staphylococcus aureus* by amplified fragment length polymorphism (AFLP) or multi-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) reveals consistent strain relatedness. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Jan;28(1):39-45. Epub 2008 Jul 29.
61. Obszanska K, Borek AL, Izdebski R, Hryniewicz W, Sitkiewicz I. Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) of *Streptococcus pyogenes*. *J Microbiol Methods*. 2011 Nov;87(2):143-9. Epub 2011 Sep 3.
62. Radtke A, Bruheim T, Afset JE, Bergh K. Multiple-locus variant-repeat assay (MLVA) is a useful tool for molecular epidemiologic analysis of *Streptococcus agalactiae* strains causing bovine mastitis. *Vet Microbiol*. 2012 Jan 8. [Epub ahead of print]
63. Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol*. 1993 Apr;59(4):945-52.
64. Shang SQ, Dong GP, Fu JF, Hong WL, Du LZ, Yu XL. Molecular diagnosis of the specific DNA patterns of 16S-23S rRNA gene of bacteria. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2003 Sep;41(9):692-6.
65. McDonald WL, Fry BN, Deighton MA. Identification of *Streptococcus* spp. causing bovine mastitis by PCR-RFLP of 16S-23S ribosomal DNA. *Vet Microbiol*. 2005 Dec 20;111(3-4):241-6. Epub 2005 Nov 10.
66. Schwartz DC, Saffran W, Welsh J, Haas R, Goldenberg M and Cantor CR. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983;47 Pt 1:189-95
67. Dawkins HJ, Ferrier DJ, Spencer TL. Field inversion gel electrophoresis (FIGE) in vertical slabs as an improved method for large DNA separation. *Nucleic Acids Res*. 1987 Apr 24;15(8):3634-5.
68. Gu H, Inselburg JW, Bzik DJ, Li WB. Plasmodium falciparum: analysis of chromosomes separated by contour-clamped homogenous electric fields. *Exp Parasitol*. 1990 Aug;71(2):189-98.
69. Ben Abdeljelil J, Saghrouni F, Emira N, Valentin-Gomez E, Chatti N, Boukadida J, Ben Saïd M, Del Castillo Agudo L. Molecular typing of *Candida albicans* isolates from patients and health care workers in a neonatal intensive care unit. *J Appl Microbiol*. 2011 Nov;111(5):1235-49. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05121.x. Epub 2011 Oct 6.
70. Ye QH, Lau Y, Liang B, Tian SF. Antimicrobial resistance, genotypic characterization and pulsed-field gel electrophoresis typing of extended spectrum  $\beta$ -lactamases-producing clinical *Escherichia coli* strains in Macao, China.
71. *Chin Med J (Engl)*. 2011 Sep;124(17):2701-7.
72. Runnegar N, Sidjabat H, Goh HM, Nimmo GR, Schembri MA, Paterson DL. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single institution over a 10-year period. *J Clin Microbiol*. 2010 Nov;48(11):4051-6. Epub 2010 Aug 25.
73. Elhani D, Ben Slama K, Bakir L, Boudabous A, Aouni M. Multilocus sequence typing compared to PFGE for molecular typing of extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2011 Nov-Dec;69(6):742-4.
74. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, et al. Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for Epidemiological Typing of Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a Single Approach Developed by Consensus in 10 European Laboratories and Its Application for Tracing the Spread of Related Strains. *J Clin Microbiol* 2003;41:1574-85
75. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9
76. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. 1990 Nov 25;18(22):6531-5.
77. Caetano-Anolles G. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods Appl* 1993;3:85-94
78. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA and Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6531-5
79. Caetano-Anolles G, Bassam BJ and Gresshoff PM. DNA amplification *fingerprinting* using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology (N Y)* 1991;9:553-7
80. Gzyl A, Augustynowicz E. Technical aspects of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique in genotyping of bacterial strains. *Acta Microbiol Pol* 1999;48:243-5

81. Issack MI, Power EG and French GL. Investigation of an outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *J Hosp Infect* 1996;33:191-200
82. Moschetti G, Blaiotta G, Villani F, Coppola S and Parente E. Comparison of Statistical Methods for Identification of *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium* from Randomly Amplified Polymorphic DNA Patterns. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:2156-66
83. Malorny B, Schroeter A, Bunge C, Hoog B, Steinbeck A and Helmuth R. Evaluation of molecular typing methods for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT104 isolated in Germany from healthy pigs. *Vet Res* 2001;32:119-29
84. Munoz MA, Welcome FL, Schukken YH and Zadoks RN. Molecular Epidemiology of Two *Klebsiella pneumoniae* Mastitis Outbreaks on a Dairy Farm in New York State. *J Clin Microbiol* 2007;45:3964-71
85. Naumiuk Ł, Baraniak A, Gniadkowski M, et al. Molecular Epidemiology of *Serratia marcescens* in Two Hospitals in Danzig, Poland, over a 5-Year Period. *J Clin Microbiol* 2004;42:3108-16
86. Finger SA, Velapatiño B, Kosek M, et al. Effectiveness of Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR and Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting for *Helicobacter pylori* Strain Differentiation. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:4713-6
87. Clemons KV, Feroze F, Holmberg K and Stevens DA. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. *J Clin Microbiol* 1997;35:1332-6
88. King D, Rhine-Chalberg J, Pfaller MA, Moser SA and Merz WG. Comparison of four DNA-based methods for strain delineation of *Candida lusitanae*. *J Clin Microbiol* 1995;33:1467-70
89. Lin D, Lehmann PF. Random amplified polymorphic DNA for strain delineation within *Candida tropicalis*. *J Med Vet Mycol* 1995;33:241-6
90. Lott TJ, Kuykendall RJ, Welbel SF, Pramanik A and Lasker BA. Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet* 1993;23:463-7
91. Schwab U, Chernomas F, Larcom L and Weems J. Molecular typing and fluconazole susceptibility of urinary *Candida glabrata* isolates from hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;29:11-7
92. Coleman D, Sullivan D, Harrington B, et al. Molecular and phenotypic analysis of *Candida dubliniensis*: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected and AIDS patients. *Oral Dis* 1997;3 Suppl 1:S96-101
93. Zeng S, Wu LC and Lehmann PF. Random amplified polymorphic DNA analysis of culture collection strains of *Candida species*. *J Med Vet Mycol* 1996;34:293-7
94. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995 Nov 11;23(21):4407-14.
95. Mazurek GH, Reddy V, Marston BJ, Haas WH, Crawford JT. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. *J Clin Microbiol.* 1996 Oct;34(10):2386-90.
96. Masny A, Plucienniczak A. Fingerprinting of bacterial genomes by amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites. *Biotechniques* 2001;31:930-4, 936
97. Masny A, Plucienniczak A. Ligation mediated PCR performed at low denaturation temperatures - PCR melting profiles. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e114
98. Krawczyk B, Leibner-Ciszak J, Stojowska K, Kur J. The new LM-PCR/ method for the genotyping of microorganisms based on the use of a class IIS restriction enzyme and ligation mediated PCR. *J Microbiol Biotechnol.* 2011 Dec;21(12):1336-44.
99. Mueller UG, Wolfenbarger LL. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol* 1999;14:389-394
100. van der Wurff AWG, Chan YL, van Straalen NM and Schouten J. TE-AFLP: combining rapidity and robustness in DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 2000;28:e105
101. Wroblewska MM, Dijkshoorn L, shifter Marchel H, et al. Outbreak of nosocomial meningitis caused by *Acinetobacter baumannii* in neurosurgical patients. *J Hosp Infect* 2004;57:300-7
102. Melles DC, Gorkink RF, Boelens HA, et al. Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2004;114:1732-40
103. Horvath R, Dendis M, Schlegelova J, Ruzicka F and Benedik J. A combined AFLP-multiplex PCR assay for molecular typing of *Escherichia coli* strains using variable bacterial interspersed mosaic elements. *Epidemiol Infect* 2004;132:61-5
104. Antonishyn NA, McDonald RR, Chan EL, et al. Evaluation of Fluorescence-Based Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis for Molecular Typing in Hospital Epidemiology: Comparison with Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing Strains of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2000;38:4058-65
105. Ball LM, Bes MA, Theelen B, Boekhout T, Egeler RM and Kuijper EJ. Significance of Amplified Fragment Length Polymorphism in Identification and Epidemiological Examination of *Candida* Species Colonization in Children Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation. *J Clin Microbiol* 2004;42:1673-9
106. Borst A, Theelen B, Reinders E, Boekhout T, Fluit AC and Savelkoul PHM. Use of Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis To Identify Medically Important *Candida* spp., Including *C. dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2003;41:1357-62
107. Tavanti A, Hensgens LAM, Ghelardi E, Campa M and Senesi S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* Clinical Isolates by Amplification Fragment Length Polymorphism Reveals Genetic Diversity among Independent Isolates and Strain Maintenance within Patients. *J Clin Microbiol* 2007;45:1455-62

108. Yoo JH, Choi JH, Shin WS, et al. Application of Infrequent-Restriction-Site PCR to Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Serratia marcescens*. *J Clin Microbiol* 1999;37:3108-12
109. Huang YC, Lee CY, Su LH, Chang LY and Lin TY. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in neonatal intensive care units: genotyping analysis and case-control study. *Acta Paediatr Taiwan* 2005;46:156-60
110. Chiang PC, Wu TL, Su JY, et al. Unusual increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* but not *Enterococcus faecalis* at a university hospital in Taiwan. *Chang Gung Med J* 2007;30:493-503
111. Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR and Weinstock GM. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J Clin Microbiol* 1990;28:2059-63
112. Huang YC, Su LH, Wu TL and Lin TY. Genotyping analysis of colonizing candidal isolates from very-low-birthweight infants in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2004;58:200-3
113. Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:6025-30
114. Krawczyk B, Naumiuk L, Lewandowski K, et al. 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;38:241-8
115. Krawczyk B, Lewandowski K, Bronk M, Samet A, Myjak P and Kur J. Evaluation of a 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
116. Krawczyk B, Samet A, Czarniak E, Szczapa J and Kur J. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit: control of an outbreak using a new ADSRRS technique. *Pol J Microbiol* 2005;54:105-10
117. Krawczyk B, Leibner J, Baranska-Rybak W, Samet A, Nowicki R and Kur J. ADSRRS-*fingerprinting* and PCR MP techniques for studies of intraspecies genetic relatedness in *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods* 2007;71:114-22
118. Stefanska I, Rzewuska M and Binek M. Evaluation of three methods for DNA *fingerprinting* of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from goats in Poland. *Pol J Microbiol* 2008;57:105-12
119. Krawczyk B, Samet A, Leibner J, Sledzinska A and Kur J. Evaluation of a PCR melting profile technique for bacterial strain differentiation. *J Clin Microbiol* 2006;44:2327-32
120. Krawczyk B, Leibner J, Stojowska K, Bronk M, Samet A and Kur J. PCR melting profile method for genotyping analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Hematological Unit patients. *Pol J Microbiol* 2007;56:65-70
121. Stojowska K, Krawczyk B, Kałuzewski S, Kur J. Retrospective analysis of the genetic diversity of *Klebsiella oxytoca* isolated in Poland over a 50-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Oct;28(10):1263-6. Epub 2009 Jun 28.
122. Stojowska K, Kałuzewski S, Krawczyk B. Usefulness of PCR melting profile method for genotyping analysis of *Klebsiella oxytoca* isolates from patients of a single hospital unit. *Pol J Microbiol*. 2009;58(3):247-53.
123. Krawczyk B, Leibner-Ciszak J, Mielech A, Nowak M, Kur J. PCR melting profile (PCR MP)--a new tool for differentiation of *Candida albicans* strains. *BMC Infect Dis*. 2009 Nov 11;9:177.
124. Leibner-Ciszak J, Dobrowolska A, Krawczyk B, Kaszuba A, Staczek P. Evaluation of a PCR melting profile method for intraspecies differentiation of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. *J Med Microbiol*. 2010 Feb;59(Pt 2):185-92. Epub 2009 Nov 5.
125. Krystynowicz A, Koziolkiewicz M, Wiktorowska-Jeziarska A, et al. Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of *Acetobacter xylinum*. *Acta Biochim Pol* 2005;52:691-8
126. Blanc DS. The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. *Infect Genet Evol* 2004;4:193-7
127. Foxman B, Zhang L, Koopman JS, Manning SD and Marrs CF. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol Perspect Innov* 2005;2:8
128. Grundmann H, Hahn A, Ehrenstein B, Geiger K, Just H and Daschner FD. Detection of cross-transmission of multiresistant Gram-negative bacilli and *Staphylococcus aureus* in adult intensive care units by routine typing of clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 1999;5:355-363
129. Everitt B. Cluster analysis. Arnold, Wyd., III, London 1993
130. Arjen van Ooyen. Theoretical aspects of pattern analysis. Elsevier, Amsterdam, 2001, pp. 31-45.
131. Grimont F, Grimont PA. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol*. 1986 Sep-Oct;137B(2):165-75.
132. Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, Vaneechoutte M, Brisse S, Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol*. 2011 May;162(4):393-404. Epub 2011 Feb 12.
133. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS*. 1989 Jul;97(7):595-605.
134. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, Verschraegen G.
135. Brooke MS. Further capsular antigens of *Klebsiella* strains. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1951;28(4):313-27.
136. The biochemical properties of *Klebsiella* strains with new capsular antigens. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1951;28(4):328-37.



137. Edmunds PN. Further *Klebsiella* capsule types. J Infect Dis. 1954 Jan-Feb;94(1):65-71.
138. Livermore DM, Yuan M. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe. J Antimicrob Chemother. 1996 Sep;38(3):409-24.
139. Dimri GP, Das HK. Cloning and sequence analysis of *gyrA* gene of *Klebsiella pneumoniae*. Nucleic Acids Res. 1990 Jan 11;18(1):151-6.
140. Mahl MC, Wilson PW, Fife MA, Ewing WH. Nitrogen fixation by members of the tribe *Klebsielleae*. J Bacteriol. 1965 Jun;89:1482-7.
141. Kovtunovych G, Lytvynenko T, Negrutska V, Lar O, Brisse S, Kozyrovska N. Identification of *Klebsiella oxytoca* using a specific PCR assay targeting the polygalacturonase *pehX* gene. Res Microbiol. 2003 Oct;154(8):587-92.
142. Stojowska K, Krawczyk B, Kałuzewski S, Kur J. Retrospective analysis of the genetic diversity of *Klebsiella oxytoca* isolated in Poland over a 50-year period. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 Oct;28(10):1263-6. Epub 2009 Jun 28.
143. Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. Ann Inst Pasteur Microbiol. 1987 Sep-Oct;138(5):569-78.
144. Dijkshorn L., Towner K., Struelens M. New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Elsevier, Amsterdam 2001
145. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev. 1996 Apr;9(2):148-65.
146. Lee YC, Huang YT, Tan CK, Kuo YW, Liao CH, Lee PI, Hsueh PR. *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genospecies 13TU and 3 bacteraemia: comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes. J Antimicrob Chemother. 2011 Aug;66(8):1839-46. Epub 2011 Jun 8.
147. Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. Nucleic Acids Res. 1995 Mar 25;23(6):1087-8.
148. Jeung JU, Cho SK, Shin JS. A partial-complementary adapter for an improved and simplified ligation-mediated suppression PCR technique. J Biochem Biophys Methods. 2005 Aug 31;64(2):110-20.
149. Chua EL, Young L, Wu WM, Turtle JR, Dong Q. Cloning of TC-1 (C8orf4), a novel gene found to be overexpressed in thyroid cancer. Genomics. 2000 Nov 1;69(3):342-7.
150. Strauss C, Mussgnug JH, Kruse O. Ligation-mediated suppression-PCR as a powerful tool to analyse nuclear gene sequences in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Photosynth Res. 2001;70(3):311-20.
151. Huang SH. Inverse polymerase chain reaction. An efficient approach to cloning cDNA ends. Mol Biotechnol. 1994 Aug;2(1):15-22.
152. Stojowska K, Kałuzewski S, Krawczyk B. Usefulness of PCR melting profile method for genotyping analysis of *Klebsiella oxytoca* isolates from patients of a single hospital unit. Pol J Microbiol. 2009;58(3):247-53.

## 9. Dorobek naukowy

### ZGŁOSZENIA PATENTOWE:

1. **Stojowska K.**, Krawczyk B. Nr P395727, Sposób genetycznego różnicowania i identyfikacji drobnoustrojów oraz zestaw diagnostyczny do genetycznego różnicowania i identyfikacji wybranych gatunków *Acinetobacter*.

data złożenia 21.07.2011,

### PUBLIKACJE

1. Krawczyk B., Leibner J., **Stojowska K.**, Bronk M., Samet A., Kur J. PCR Melting Profile Method for Genotyping Analysis of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Hematological Unit Patients. *Pol. J. Microbiol.* 2007. Vol.56, No 2, 65-70
2. Krawczyk B., **Stojowska K.**, Leibner – Ciszak J. Opracowanie zestawu diagnostycznego do genetycznego typowania szczepów bakteryjnych metodą PCR MP. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 2008, 60:139 – 154
3. **Stojowska K.**, Krawczyk B., Kałużewski S., Kur J. Retrospective analysis of genetic diversity of *Klebsiella oxytoca* isolated in Poland over a 50-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009 28:1263–1266
4. **Stojowska K.**, Krawczyk B., Kałużewski S. Usefulness of PCR Melting Profile Method for Genotyping Analysis of *Klebsiella oxytoca* Isolates from Patients of a Single Hospital Unit. *Pol. J. Microbiol.* 2009, Vol. 58, No 3 Krawczyk B., Leibner-Ciszak J.,
5. Krawczyk B., Leibner-Ciszak J., **Stojowska K.**, Kur J. *The New LM-PCR/Shifter Method for the Genotyping of Microorganisms Based on the Use of a Class IIS Restriction Enzyme and Ligation-Mediated PCR*; *J. Microbiol. Biotechnol.* 2011 Dec;21(12):1336-44.

### ARTYKUŁY:

1. Krawczyk B., **Stojowska K.** *Epidemiologia molekularna – możliwości i ograniczenia.* Aktualności bioMerieux. 2008, 45 06
2. Krawczyk B., **Stojowska K.** Metody molekularne w dochodzeniach epidemiologicznych zakażeń szpitalnych. *Badanie i diagnoza*, 2008 Vol.14(8/9)
3. Krawczyk B., **Stojowska K.** Wykorzystanie reakcji PCR do badania charakterystycznych obszarów genomu. *Badanie i diagnoza*, 2008 Vol.14(8/9)

## WYSTĄPIENIA USTNE:

1. **Stojowska K.** Zastosowanie nowych metod genotypowania, opartych na metodzie LM PCR (ang. Ligation – Mediated Polymerase Chain Reaction) do oznaczania szczepów wankomycyno – opornych *Enterococcus faecium* (VRE). VIII Ogólnopolskie Akademickie Seminarium Studentów Biotechnologii, Kraków, 17 - 19 listopada 2006
2. **Stojowska K.** Usefulness of PCR Melting Profile Method for Short-term Epidemiology Analysis (Użyteczność metody PCR MP w analizie krótkoterminowych epidemii). Konferencja Naukowa organizowana przez Urząd Marszałkowski w Gdańsku pt.: „Spotkania z Nauką”, 19 – 23 październik 2009.
3. **Stojowska K.** *Genetyczna różnorodność szczepów Klebsiella oxytoca izolowanych w Polsce w okresie 50 lat.* Posiedzenie Komitetu Mikrobiologii Wydziału II Nauk Biologicznych PAN, Gdańsk, 23 październik 2009.

## PLAKATY:

1. **Stojowska K.** Konstrukcja zestawu diagnostycznego w oparciu o technikę PCR MP do różnicowania bakterii *Enterococcus faecium*” III Krajowy Kongres Biotechnologii, Poznań 9-12 września 2007
2. **Stojowska K.,** Rybak B., Kałużewski S., Krawczyk B., Samet A., Kur J. Genotypowa charakterystyka szczepów *Klebsiella oxytoca* antybiotykowrażliwych, ESBL oraz wykazujących nadprodukcję chromosomalnej Beta-laktamazy K1. XXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów; „Drobnoustroje - wyzwania i nadzieje”; Szczecin, 4 - 7 września 2008
3. **Stojowska K.,** Krawczyk B. Evaluation of Ligation Mediated Suppression PCR (LMS – PCR) Technique Based on Ribosomal RNA (rrn) Operon for *Acinetobacter* Strain Differentiation. III Ogólnopolska Konferencja Naukowa BioMillenium 2009 “Biotechnologia molekularna”, 22-24 październik 2009.
4. **Stojowska K.,** Krawczyk B. Evaluation of Ligation Mediated Suppression PCR (LMS – PCR) Technique Based on recA Gene for *Acinetobacter* Strain Differentiation. III Ogólnopolska Konferencja Naukowa BioMillenium 2009 “Biotechnologia molekularna”, 22-24 październik 2009.
5. **Stojowska K.,** Krawczyk B. *Technika LM PCR Simplex – doskonałe narzędzie molekularne do genotypowania i identyfikacji genomogatkowej drobnoustrojów.* Seminarium Politechnika Gdańska - uniwersytet przedsiębiorczy XXI wieku, Gdańsk, 24-26 maja 2010
6. **Stojowska K.,** Krawczyk B., Kur J. ddLMS PCR double digestion Ligation Mediated Suppression PCR - a new technique for bacterial specific differentiation. IV Congress of polish Biotechnology and Eurobiotech 2011, 12-15 Październik 2011
7. Krawczyk B., **Stojowska K.,** Kur J., *The New LM-PCR/Shifter Method for the Genotyping of Microorganism,* IV Congress of polish Biotechnology and Eurobiotech 2011, 12-15 Październik 2011

## WYDAWNICTWA:

1. Krawczyk B., Kur J. Diagnostyka molekularna w mikrobiologii. Rozdział 15: Statystyczna analiza danych typowania genetycznego – **Stojowska K.** Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2008
2. Krawczyk B., Kotłowski R., **Stojowska K.**, Szemiako K. Podstawy techniki PCR – ćwiczenia laboratoryjne. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2012
3. Krawczyk B., Kotłowski R., **Stojowska K.**, Szemiako K. Diagnostyka Molekularna z zastosowaniem techniki PCR – ćwiczenia laboratoryjne. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2012

## PROJEKTY BADAWCZE:

1. **Grant własny MNiSW N N401 016036** - wykonawca projektu realizowanego w Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej pod kierownictwem dr hab. Beaty Krawczyk: *Opracowanie, optymalizacja i walidacja nowej metody typowania genetycznego drobnoustrojów w oparciu o technikę LM PCR z użyciem enzymów restrykcyjnych klasy IIS*; czas realizacji : 2009-2011; Grant MNiSW N N401 016036
2. **Grant promotorski N N401 101138** – wykonawca grantu – *Metoda LMS PCR (ang. Ligation Mediated Suppression PCR) jako nowa technika do genetycznego typowania Acinetobacter sp.*; czas realizacji: 1.04.2010-1.02. 2012

## WYRÓŻNIENIA:

1. Laureatka projektu stypendialnego InnoDoktorant – II edycja” ufundowanym przez Urząd Marszałkowski Województwa Pomorskiego, Departament Rozwoju Gospodarczego w roku akademickim 2009/2010
2. Laureatka Fulbright Junior Advanced Research Program 2010-11
3. Laureatka stypendium za osiągnięcia naukowe z projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” (Projekt InterPhd) w roku akademickim 2010/2011.