



Optymalizacja i walidacja metody *ADSRRS-fingerprinting* – konstrukcja zestawu diagnostycznego do różnicowania genetycznego drobnoustrojów

Beata Krawczyk, Krzysztof Lewandowski

Katedra Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

Optimization and validation of *ADSRRS-fingerprinting*

Summary

Macrorestriction analysis of genomic DNA followed by pulsed-field gel electrophoresis (REA-PFGE) has become the “gold standard” for molecular typing. In recent years, some alternative techniques have been successfully applied. However, there is still a need for a new method which may appear to be less complex, cheaper, and have a power of discrimination at least similar to that of REA-PFGE. Recently, we showed the performance and convenience of a novel assay, based on the fingerprinting of bacterial genomes by amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (*ADSRRS-fingerprinting*), for its potential usefulness in epidemiological investigations.

In this study, *ADSRRS-fingerprinting* method was optimized at each stage of the procedure. The modified method, named *ADSRRS-fingerprinting plus*, differs from the original technique in several points. The optimized method considerably shortens the time of experiment, offers good discriminatory power and also demonstrates excellent reproducibility. Next, *ADSRRS-fingerprinting plus* was validated. These experiments proved that the method is specific, selective and suitable for intended purpose and also confirmed its reliability, reproducibility and simplicity in the interpretation of the results. Optimized and validated procedure of *ADSRRS-fingerprinting plus* was used in the development of a diagnostic kit (*ADSRRS-KIT*) for strain differentiation of bacteria below the species level, using a simple set of ready-to-use reagents and standard equipment.

Adres do korespondencji

Beata Krawczyk
Katedra Mikrobiologii,
Wydział Chemiczny,
Politechnika Gdańska,
ul. Narutowicza 11/12,
80-952 Gdańsk.

Key words:

ADSRRS-fingerprinting, epidemiology, validation, diagnostic kit.

1. Wstęp

Zakażenia szpitalne są przyczyną wielu zgonów oraz generują ogromne koszty związane z przedłużonym leczeniem i rekonwalescencją. Zakażeń szpitalnych nie da się całkowicie wyeliminować. Niezbędne jest jednak dążenie do maksymalnego ich ograniczenia. Podstawowe dla zrozumienia problemu zakażeń szpitalnych staje się szczegółowe poznanie źródeł zakażenia, dróg rozprzestrzeniania się infekcji i monitorowanie różnorodności poszczególnych klonów w populacji pacjentów i w środowisku. Taka analiza jest możliwa przy zastosowaniu analitycznych metod diagnostycznych, gwarantujących jednoznaczną identyfikację czynnika chorobotwórczego na poziomie gatunku i szczepu.

Dla potrzeb diagnostyki medycznej można znaleźć wiele komercyjnych zestawów diagnostycznych, opartych na analizie DNA/RNA do wykrywania i identyfikacji gatunkowej mikroorganizmów. Natomiast, komercyjne zestawy diagnostyczne dla badań epidemiologicznych, stosowane do określania pokrewieństwa genetycznego w obrębie gatunku oraz różnicowania wewnątrzgatunkowego, są niedostępne. Opisane w licznych doniesieniach literaturowych metody molekularne stosowane do badań epidemiologicznych charakteryzuje często wysoki koszt doświadczeń, czasochłonność oraz stosunkowo niska powtarzalność otrzymywanych wyników. Brakuje uniwersalnych, charakteryzujących się wysokim potencjałem różnicującym testów pozwalających na precyzyjną i dokładną identyfikację drobnoustrojów na poziomie szczepu/izolatu. Możliwości praktycznego zastosowania nowoczesnych metod diagnostyki molekularnej zależą od kilku podstawowych parametrów: całkowitego czasu wykonania, kosztu wykonania uwzględniającego potrzebę wykorzystania specjalistycznej aparatury, trudności technicznych w wykonaniu, łatwości interpretacji otrzymywanych wyników oraz powtarzalności. Ponadto, metody diagnostyki molekularnej powinny być zoptymalizowane i zwalidowane, aby mogły być rutynowo stosowane w laboratoriach mikrobiologicznych.

Spśród wszystkich metod typowania mikroorganizmów na szczególną uwagę zasługują metody oparte na analizie całego materiału genetycznego zawartego w komórce. Jedną z nich jest stosunkowo nowa technika *ADSRRS-fingerprinting* (ang. *Amplification of DNA Fragments Surrounding Rare Restriction Sites*) (1). Na podstawie naszych badań można stwierdzić, że charakteryzuje się ona wysokim potencjałem różnicującym, wiarygodnością, powtarzalnością i łatwością interpretacji otrzymywanych wyników (2-5). W procedurze wykonania zakłada się również wykorzystanie nieskomplikowanej aparatury oraz podstawowych technik biologii molekularnej, które nie sprawiają trudności technicznych w wykonaniu. Mając to na uwadze, postanowiono skonstruować zestaw diagnostyczny dla typowania genetycznego szczepów z przeznaczeniem do rutynowych badań epidemiologicznych. Warunkiem opracowania takiego zestawu diagnostycznego jest pełna optymalizacja i walidacja proponowanej metody molekularnej, co było przedmiotem tej pracy.

2. Podstawy teoretyczne metody i jej podstawowe etapy

Metoda *ADSRRS-fingerprinting* opiera się na zjawisku supresji PCR, którego skutkiem jest generacja ograniczonej liczby produktów amplifikacji. Metoda ta po raz pierwszy została opisana przez Diatchenko i wsp. (6) jako narzędzie pozwalające na tworzenie bibliotek DNA. W 2001 r. Masny i Płucienniczak po raz pierwszy wykorzystali możliwości tej nowej techniki w różnicowaniu drobnoustrojów (1). Krawczyk i wsp. w latach 2003-2004 wykorzystali tę metodę w badaniach epidemiologicznych *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Serratia marcescens* i *Klebsiella pneumoniae* (2-5).

Procedura *ADSRRS-fingerprinting* składa się z czterech podstawowych etapów:

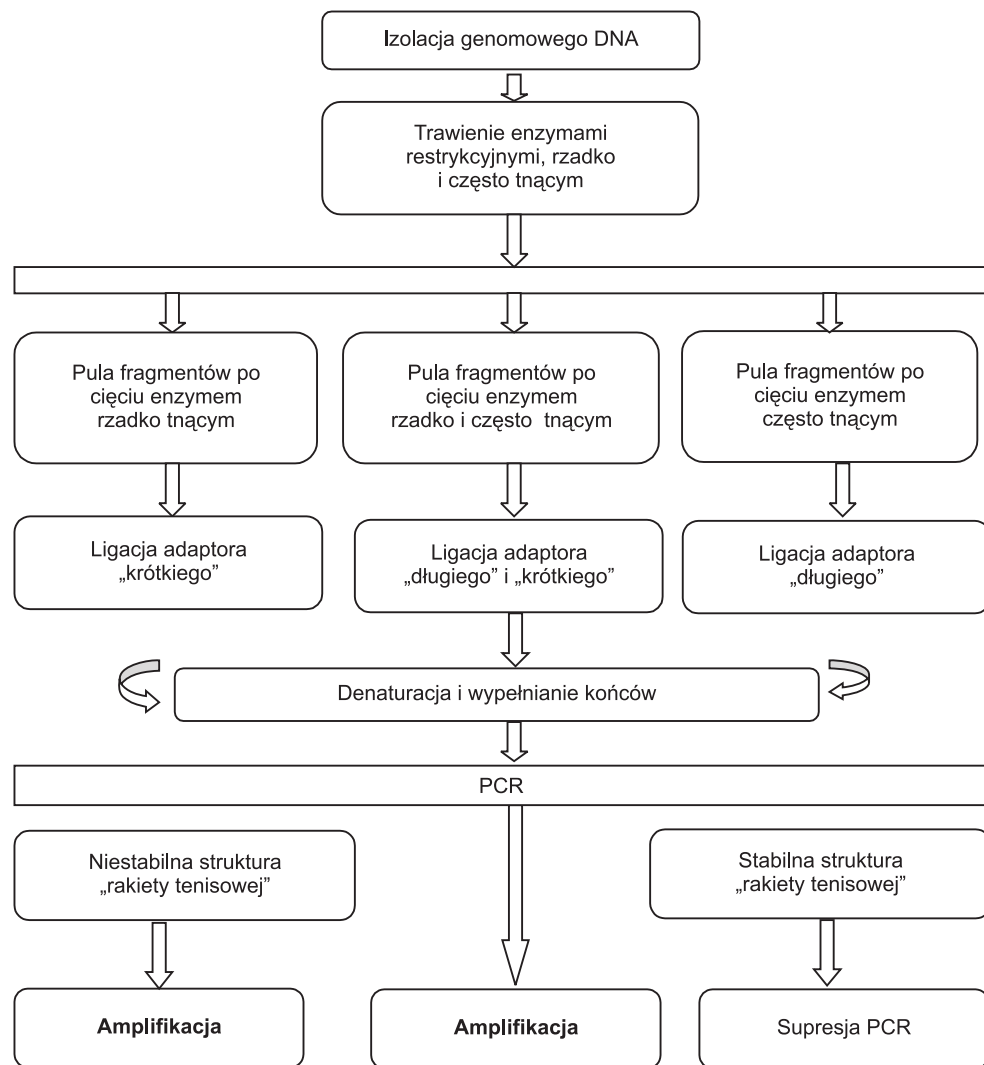
1) całkowite trawienie DNA genomowego z zastosowaniem dwóch racjonalnie dobranych enzymów restrykcyjnych (rzadko i często tnącego);

2) reakcja ligacji otrzymanych fragmentów restrykcyjnych z odpowiednio zaprojektowanymi adaptorami;

3) selektywna amplifikacja produktów ligacji z zastosowaniem dwóch starterów komplementarnych do sekwencji adaptorowych;

4) elektroforeza produktów amplifikacji w żelu poliakryloamidowym.

DNA genomowe poddaje się trawieniu dwoma enzymami restrykcyjnymi pozostawiającymi 5' lepkie końce. Dla jednego z nich sekwencja rozpoznania występuje setki razy w badanym genomie (restryktaza często tnąca), a dla drugiego kilkadziesiąt razy rzadziej (restryktaza rzadko tnąca). W wyniku trawienia enzymatycznego otrzymuje się mieszaninę produktów, w której największy jest udział produktów zakończonych z obu stron lepkimi końcami powstałymi na skutek trawienia genomu enzymem często tnącym. Następnie otrzymane produkty trawienia enzymatycznego poddaje się reakcji ligacji z odpowiednio zaprojektowanymi adaptorami oligonukleotydowymi. Stosuje się dwa rodzaje adaptorów o różnej długości (adaptor „krótki” i adaptor „długi”), a każdy z nich jest złożony z dwóch oligonukleotydów: pomocniczego i ligowanego. W wyniku ligacji otrzymuje się trzy typy fragmentów DNA z przyłączonymi na 5' końcu: 1) dwoma adaptorami „krótkimi” (przy miejscach cięcia enzymu rzadko tnącego), 2) dwoma adaptorami „długimi” (przy miejscach cięcia enzymu często tnącego), 3) dwoma różnymi adaptorami. Produkty reakcji ligacji poddaje się następnie amplifikacji PCR z zastosowaniem odpowiednio zaprojektowanych starterów. Istotą metody jest ograniczenie ilości powstających produktów PCR w wyniku zjawiska supresji PCR. Produkty reakcji ligacji zawierające sekwencję adaptoru „długiego” na jednym końcu i sekwencję komplementarną na drugim nie ulegają amplifikacji ze względu na preferowaną wewnątrzcząsteczkową hybrydyzację fragmentów homologicznych. Tworzy się stabilna struktura „rakiety tenisowej”. W ten sposób ograniczona zostaje hybrydyzacja takiego fragmentu DNA ze starterem. Amplifikacji ulegają natomiast cząsteczki DNA zakończone dwoma różnymi adaptorami oraz dwoma identycznymi adaptorami „krótkimi”. Uproszczony schemat metody pokazano na rysunku 1.

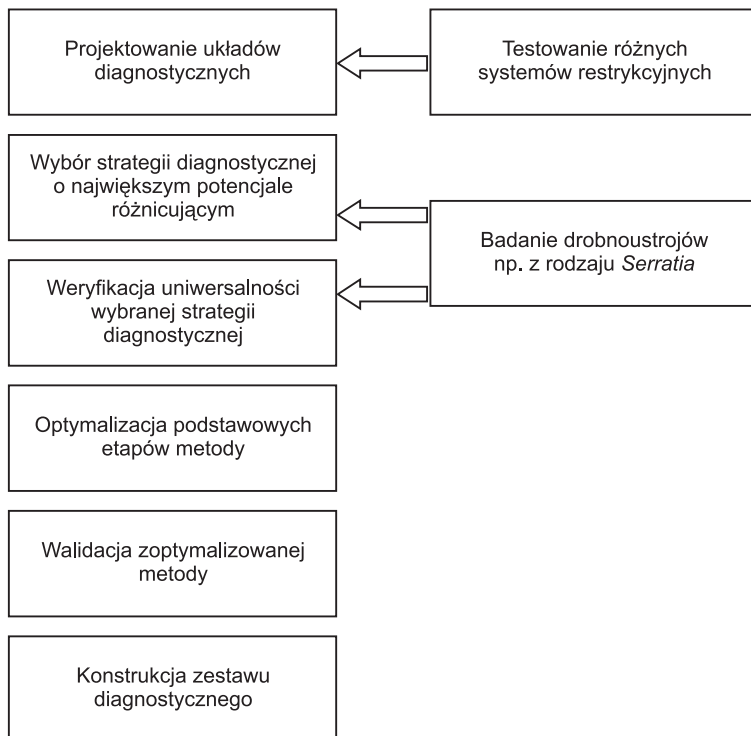


Rys. 1. Schemat metody ADSRRS-fingerprinting.

3. Etapy prac badawczych

W pracy przedstawiono zasadę opracowania zestawu diagnostycznego przeznaczonego do badań epidemiologicznych. Na rysunku 2 przedstawiono kolejne etapy badań, które doprowadziły do powstania zestawu diagnostycznego gotowego do użycia przez laboratoria diagnostyczne.

Pierwszym etapem było dobranie odpowiedniego modelu badawczego dla metody ADSRRS-fingerprinting, charakteryzującego się największą mocą dyskryminacyjną



Rys. 2. Etapy prac badawczych niezbędne do opracowania zestawu diagnostycznego.

(dobór enzymów restrykcyjnych, sekwencji adaptorów i starterów reakcji PCR). Następnie, wytypowany model badawczy poddano licznym doświadczeniom, które pozwoliły na określenie optymalnych parametrów poszczególnych etapów procedury (analiza krytycznych parametrów poszczególnych etapów procedury badawczej).

Kolejny etap dotyczył walidacji zoptymalizowanej metody, nazwanej *ADSRRS-fingerprinting plus*. W cyklu doświadczeń badano specyficzność, selektywność i granicę wykrywalności DNA. Ostatni etap prac stanowiła konstrukcja zestawu diagnostycznego opartego na technice *ADSRRS-fingerprinting plus* – *ADSRRS-KIT*. Efektywność zoptymalizowanej procedury *ADSRRS-fingerprinting plus* z wykorzystaniem zestawu diagnostycznego *ADSRRS-KIT* porównano do standardowej metody *ADSRRS-fingerprinting*. Etapy prac badawczych przedstawiono na modelu doświadczalnym dobrze uprzednio scharakteryzowanych epidemiologicznie szczepów *Serratia marcescens*.

3.1. Projektowanie układów diagnostycznych

Pierwszy etap projektowania układu badawczego był poświęcony właściwemu doborowi enzymów restrykcyjnych. W tym celu na podstawie przeglądu dostępnych

danych literaturowych oraz analizy sekwencji nukleotydowych wybranych genów *S. marcescens* opublikowanych w bazie danych NCBI (National Centre for Biotechnology Information), dobrano grupy enzymów restrykcyjnych pozostawiających po cięciu kohezyjne końce. Kryterium doboru enzymów restrykcyjnych stanowiły sekwencja nukleotydowa oraz długość sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny. Wybrano systemy restrykcyjne: XbaI/BshNI, XbaI/StyI, XbaI/BamHI, XbaI/BglII, HindIII/BglII i HindIII/StyI. Dla każdej z wybranych restryktaz zaprojektowano oligonukleotydy pomocnicze o odpowiedniej sekwencji nukleotydowej (oligonukleotydy ligowane oraz startery do reakcji PCR pozostają niezmienione bez względu na stosowany system restrykcyjny). Oligonukleotydy pomocnicze zostały zaprojektowane w ten sposób, że każdy z nich zawiera czteronukleotydową sekwencję komplementarną do 5' lepkich końców fragmentów restrykcyjnych otrzymanych przy użyciu odpowiedniej restryktazy oraz fragment komplementarny do sekwencji oligonukleotydu ligowanego. Zaprojektowane sekwencje umożliwiają hybrydyzację obydwu typów oligonukleotydów i utworzenie odpowiedniej struktury adaptora. Zastosowane enzymy restrykcyjne oraz odpowiednie do nich oligonukleotydy i startery przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Enzymy restrykcyjne, oligonukleotydy i startery stosowane w badaniach *S. marcescens*

Enzym restrykcyjny	Oligonukleotyd pomocniczy	Oligonukleotyd ligowany	Adaptor	Starter w PCR
HindIII	HindIII-P-krótki AGCTGTCGACGTT	L-krótki CTTCATCCACCAACGTCGAC	„krótki” (HindIII-P-krótki + L-krótki)	CCTTCATCCACCAACGTCGAC
XbaI	XbaI-P-krótki CTAGGTCGACGTT		„krótki” (XbaI-P-krótki + L-krótki)	
BamHI	BamHI-P-długi GATCCGTCGACAACGTTT CCTTCCTGTCTACCATCC	L-długi GGATGGTAGACGAAGGAACG CCGTTGTCGACG	„długi” (BamHI-P-długi + L-długi)	GGATGGTAGACGAAGGAACGC
BglII	BglII-P-długi GATCCGTCGACAACGTTT CCTTCCTGTCTACCATCC		„długi” (BglII-P-długi + L-długi)	
StyI	StyI-P-długi CWWGCGTCGACAACGTTT CCTTCCTGTCTACCATCC		„długi” (StyI-P-długi + L-długi)	
BshNI	BshNI-P-długi GyrCCGTCGACAACGTTT CCTTCCTGTCTACCATCC		„długi” (BshNI-P-długi + L-długi)	

3.2. Wybór optymalnej strategii diagnostycznej

Kolejną fazę badań stanowiło przeprowadzenie eksperymentów porównawczych, wykorzystujących wszystkie zaprojektowane systemy restrykcyjne. W tym celu standardową metodę *ADSRRS-fingerprinting* (1) zastosowano w stosunku do wybranych izolatów/szczepów bakterii *S. marcescens* (referencyjnych i klinicznych).

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wytypowano układ badawczy XbaI/BglII (tab. 2), charakteryzujący się największym potencjałem różnicującym dla poddanych analizie szczepów *S. marcescens*, pozwalający na prostą i jednoznaczną interpretację otrzymanych wyników.

Tabela 2

Adaptory i startery w systemie XbaI/BglII

Adaptory i startery	Sekwencja nukleotydowa adaptorów i starterów
XbaI adaptor „krótki”	5' – CTAGGTCGACGTT – 3' XbaI-P-krótki 3' – CAGCTGCAACCACCTACTTCC -5' L-krótki
BglII adaptor „długi”	5' – GATCCGTCGACAACGGCGTTCCTTCGTCTACCATCC – 3' BglII-P-długi 3' – GCAGCTGTTGCCGCAAGGAAGCAGATGGTAGG – 5' L-długi
XbaI starter „krótki” (= L-krótki)	CCTTCATCCACCAACGTCGAC
BglII starter „długi”	5'-GGATGGTAGACGAAGGAACGC-3'

3.3. Optymalizacja *ADSRRS-fingerprinting*

3.3.1. Model badawczy

Aby w należyty sposób przygotować się do zaplanowanego cyklu prac optymalizacyjnych należało wyizolować odpowiednio dużą ilość genomowego DNA jednego wybranego szczepu *S. marcescens*, wystarczającą do wszystkich eksperymentów optymalizacyjnych oraz skompletować niezbędne, pochodzące z jednej partii, odczynniki chemiczne, w celu uniknięcia dodatkowych źródeł błędów podczas interpretacji otrzymywanych wyników. Oznaczono stężenie wyizolowanego DNA genomowego (0,12 µg/µl) z zastosowaniem dwóch różnych metod analitycznych – spektrofotometrycznej i fluorymetrycznej.

Optymalizacja metody *ADSRRS-fingerprinting* wymagała określenia potencjalnych punktów krytycznych, a następnie wyróżnienia wszystkich głównych czynników dla każdego z etapów procedury, tzn. trawienia enzymatycznego, oczyszczania i precipitacji produktów reakcji trawienia, reakcji ligacji, oczyszczania i precipitacji produktów ligacji, reakcji amplifikacji i detekcji otrzymanych produktów PCR.

Proces optymalizacji metody *ADSRRS-fingerprinting* wymaga również określenia ilości i rodzaju stosowanych odczynników, czasu trwania oraz temperatury poszczególnych etapów.

3.3.2. Optymalizacja poszczególnych etapów metody *ADSRRS-fingerprinting*

W celu uproszczenia przeprowadzonej analizy wyróżniono trzy zasadnicze obszary wpływu zmian badanych parametrów: 1) wpływ na **jakość** otrzymanych wyników badania, 2) wpływ na **czas** trwania procedury, 3) wpływ na **koszt** procedury.

Wszystkie parametry, których zmiana powoduje pogorszenie jakości otrzymanych rezultatów, skrócenie czasu trwania procedury badawczej oraz zmniejszenie jej kosztów uznano za krytyczne dla metody *ADSRRS-fingerprinting*.

3.3.2.1. Optymalizacja parametrów etapu trawienia enzymatycznego

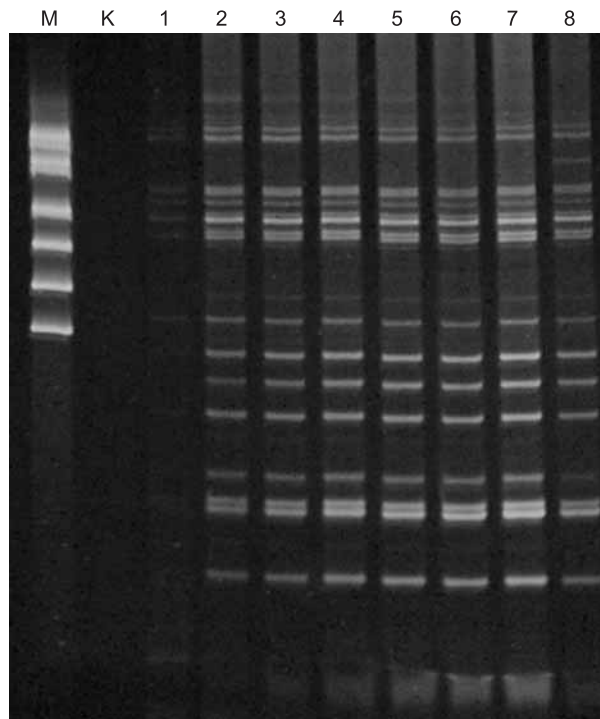
Optymalizacja parametrów etapu trawienia enzymatycznego polegała na oznaczeniu ilości DNA genomowego (fot. 1), ilości (aktywności) endonukleaz XbaI i BglII, czasu trwania reakcji (tab. 3). Na podstawie analizy wyników wskazuje się, że standardowe stężenie DNA stosowane w reakcji trawienia enzymatycznego można zmniejszyć dwukrotnie, ilość endonukleaz zmniejszyć dziesięciokrotnie, a czas trwania reakcji skrócić ośmiokrotnie.

3.3.2.2. Optymalizacja etapów oczyszczania i precypitacji DNA

W standardowej metodzie *ADSRRS-fingerprinting* zakłada się wykonanie dwóch etapów precypitacji DNA po zakończonych reakcjach enzymatycznych (po reakcji trawienia enzymem restrykcyjnym i reakcji ligacji adaptorów). Przeprowadzając optymalizację tego etapu ustalono, że zastosowanie różnych metod oczyszczania i precypitacji DNA nie wpływa w sposób istotny na jakość ostatecznych wyników. Jednakże, dwukrotna precypitacja DNA wpływa na czas wykonania testu. Zmiana standardowej procedury oczyszczania i precypitacji DNA po etapie trawienia enzymatycznego na inaktywację termiczną enzymów restrykcyjnych wpłynęła istotnie na skrócenie czasu trwania oznaczeń.

3.3.2.3. Optymalizacja parametrów etapu ligacji

Optymalizacja kolejnego etapu techniki *ADSRRS-fingerprinting*, reakcji ligacji, polegała na określeniu optymalnej ilości ligazy, ilości używanych adaptorów, czasu trwania i temperatury reakcji.



Fot. 1. Przykładowe wyniki optymalizacji *ADSRRS-fingerprinting* – badanie wpływu ilości DNA genomowego stosowanego w reakcji trawienia enzymatycznego. Rozdział w 6% żelu poliakrylamidowym.

M – marker wielkości DNA [1008, 883, 615, 517, 466 i 396 pz]; K – kontrola negatywna reakcji PCR; ścieżki od 1 do 8 – przedstawiają produkty reakcji PCR, dla różnych wyjściowych ilości DNA izolowanego z *S. marcescens* (kolejno 0,12; 0,24; 0,36; 0,6; 0,96; 1,20; 1,44; 1,80 µg) poddanych reakcji trawienia enzymatycznego; ustalono, że ilość DNA genomowego użytego w reakcji trawienia enzymatycznego powinna mieścić się w zakresie od 0,24 µg do 1,44 µg; za optymalną ilość DNA genomowego uznano 0,6 µg.

Na podstawie otrzymanych wyników ustalono, że temperatura reakcji ligacji stanowi krytyczny element metody *ADSRRS-fingerprinting*, wpływający w sposób istotny na jakość otrzymanych wyników. Zmiana pozostałych parametrów etapu ligacji może prowadzić do znacznego obniżenia kosztów stosowania metody i skrócenia czasu trwania całej procedury.

3.3.2.4. Optymalizacja parametrów PCR

Przeprowadzone doświadczenia polegały na określeniu optymalnych warunków PCR. Za parametry krytyczne, wpływające na jakość otrzymywanych wyników, uznano rodzaj stosowanego buforu reakcyjnego, ilość użytej w reakcji matrycy DNA, ilości starterów oraz liczbę zastosowanych cykli amplifikacji. W wyniku przeprowa-

dzonych badań można również stwierdzić, że możliwa jest redukcja kosztów analizy poprzez dwukrotne zmniejszenie ilości (aktywności) polimerazy DNA w badanym etapie. Analiza wyników badań optymalizacji PCR prowadzi do wniosku, że większość parametrów przewidzianych w metodzie standardowej została poprawnie ustalona na etapie badań wstępnych i nie wymaga dalszej zmiany.

3.3.3. Optymalizacja metody *ADSRRS-fingerprinting* – podsumowanie

Przeprowadzony w pracy cykl badań mających na celu optymalizację metody *ADSRRS-fingerprinting* pozwolił na określenie obszarów wpływu wszystkich poddanych analizie krytycznych parametrów poszczególnych etapów metody. Jakość otrzymywanych wyników uznano za najważniejszy obszar wpływu, a wszystkie parametry wpływające na jej pogorszenie określono jako krytyczne (tab. 3).

Analiza otrzymanych wyników umożliwiła ponadto ustalenie wartości optymalnych wszystkich badanych parametrów metody *ADSRRS-fingerprinting*. Przeprowadzone doświadczenia oparte były na analizie zmiany wartości tylko jednego z parametrów badanych przy jednoczesnym zachowaniu wartości pozostałych. Założono, że efekt jednoczesnej zmiany wszystkich wartości parametrów na określone na podstawie doświadczeń wartości optymalne jest synergistyczny i wprowadzenie modyfikacji do standardowej procedury badawczej pozwoli na skrócenie czasu trwania oraz obniżenie kosztów metody *ADSRRS-fingerprinting*, przy jednoczesnym zachowaniu jej mocy różnicującej, powtarzalności i łatwej interpretacji otrzymanych wyników.

Tabela 3

Parametry krytyczne etapów metody *ADSRRS-fingerprinting*

Etap	Nazwa etapu	Parametr krytyczny wpływający na jakość otrzymywanych wyników
I	trawienie enzymatyczne	ilość DNA genomowego
II	oczyszczanie i precypitacja produktów reakcji trawienia enzymatycznego	brak parametrów krytycznych
III	reakcja ligacji	temperatura reakcji
IV	oczyszczanie i precypitacja produktów reakcji ligacji	brak parametrów krytycznych
V	PCR	rodzaj buforu reakcyjnego ilość matrycy DNA ilość starterów liczba cykli
VI	elektroforeza poliakrylamidowa produktów PCR	nie analizowano
VII	detekcja i analiza produktów PCR	nie analizowano

3.4. Weryfikacja zoptymalizowanej metody – *ADSRRS-fingerprinting plus*

Dla potwierdzenia słuszności założeń zoptymalizowanej metody *ADSRRS-fingerprinting plus* niezbędne było wykonanie doświadczeń weryfikacyjnych. W tym celu przeprowadzono dwa cykle doświadczeń, które polegały na przygotowaniu kontroli negatywnych każdego z etapów procedury w celu wykluczenia możliwości otrzymania fałszywie negatywnych rezultatów i udowodnienia bezwzględnej potrzeby stosowania wszystkich, krytycznych składników procedury *ADSRRS-fingerprinting* dla otrzymania pożądaných wyników. Zoptymalizowaną metodę zastosowano do badania klinicznych izolatów *S. marcescens*. Wyniki doświadczeń optymalizacji parametrów metody *ADSRRS-fingerprinting* podsumowano w tabeli 4.

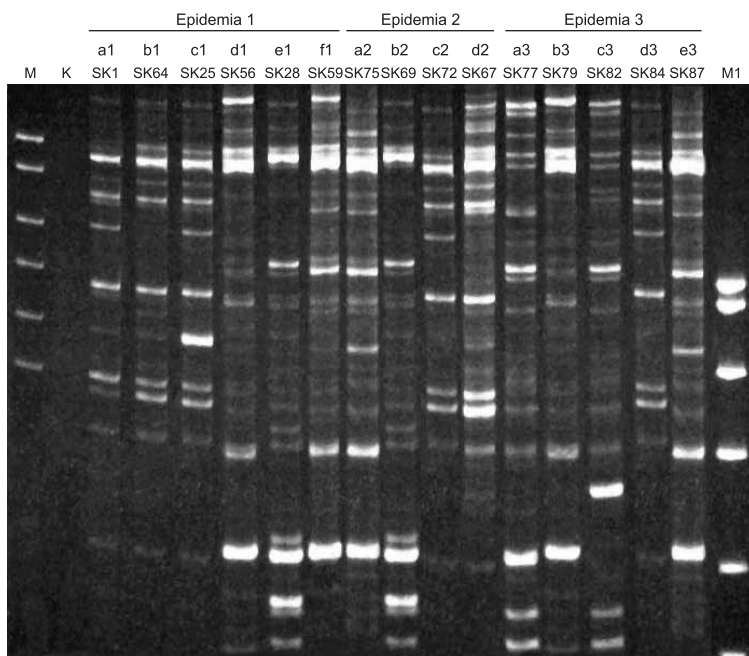
Zoptymalizowaną metodę *ADSRRS-fingerprinting* z powodzeniem udało się zastosować do różnicowania wybranych klinicznych szczepów *S. marcescens* i potwierdzić jej wysoki potencjał różnicujący (fot. 2). Uzyskano technikę diagnostyczną, nazwaną *ADSRRS-fingerprinting plus*, która charakteryzuje się: 1) zdecydowanie **lepszą jakością** otrzymanych wyników, 2) zdecydowanie **krótszym czasem** analizy, (3) zdecydowanie **niższymi kosztami** w porównaniu do metody standardowej.

Tabela 4

Wyniki optymalizacji parametrów metody *ADSRRS-fingerprinting*

Etap	Nazwa etapu	Parametr procedury	Standardowa wartość parametru	Optymalna wartość parametru
1	2	3	4	5
I	trawienie enzymatyczne	ilość DNA genomowego [µg]	1,2	0,6
		aktywność endonukleaz <i>Xba</i> I/ <i>Bgl</i> II [U]	5,0 / 5,0	0,5 / 0,5
		temperatura etapu [°C]	37	37
		czas trwania etapu [min]	120	15
II	oczyszczanie i precypitacja produktów reakcji trawienia enzymatycznego	metoda oczyszczania i precypitacji DNA	<i>oczyszczanie:</i> fenol, chloroform, alk. izoamylowy <i>precypitacja:</i> alk. etylowy, glikogen	Inaktywacja termiczna restryktaz
		temperatura etapu [°C]	pokojowa	65
		czas trwania etapu [min]	720	10
		aktywność ligazy [U]	2,0	0,1
III	reakcja ligacji	ilość adaptorów „krótki”/„długi” [pmol]	40,0 / 40,0	4,0 / 4,0
		temperatura reakcji [°C]	22	22
		czas trwania reakcji [min]	120	15

1	2	3	4	5
IV	oczyszczanie i precypitacja produktów reakcji ligacji	metoda oczyszczania i precypitacji DNA	<i>precypitacja:</i> alk. izopropylowy	brak etapu
		temperatura etapu [°C]	pokojowa	
		czas trwania etapu [min]	30	
V	PCR	rodzaj buforu reakcyjnego	standardowy	standardowy
		aktywność polimerazy DNA [U]	1,0	0,5
		ilość matrycy DNA [pg]	8,4	8,4
		ilość starterów XbaI „krótki”/BglII „długi” [pmol]	50,0 / 50,0	50,0 / 50,0
		temperatura przyłączenia starterów [°C]	60,0	60,0
		liczba cykli	22	22
		czas trwania etapu [min]	180	180
VI	elektroforeza poliakryloamidowa produktów PCR	stężenie żelu poliakryloamidowego	6%	6%
		warunki elektroforezy	170 V, 60 mA	170 V, 60 mA
		temperatura etapu [°C]	pokojowa	pokojowa
		czas trwania etapu [min]	180	180
VII	detekcja i analiza produktów PCR	stężenie bromku etydyny w roztworze wodnym	10 ng/ml	10 ng/ml
		czas trwania etapu [min]	30	30



Fot. 2. Przykład różnicowania klinicznych szczepów *S. marcescens* zoptymalizowaną metodą *ADSRRS-fingerprinting plus*. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 6% żelu poliakryloamidowym. M1, M2 – markery wielkości DNA, K – kontrola negatywna reakcji PCR, SK1 – SK87 – oznaczenia izolatów klinicznych, od a1 do e3 – produkty PCR charakterystyczne dla izolatów z poszczególnych epidemii. Wytypowane genotypy były identyczne do genotypów zidentyfikowanych metodą REA-PFGE.

3.5. Walidacja metody *ADSRRS-fingerprinting plus*

W definicji walidacji dowolnej metody, czy procesu badawczego mówi się, że jest to formalnie udokumentowana, a wcześniej zaplanowana weryfikacja mająca na celu udowodnienie, iż dana metoda (proces) jest odpowiednia dla zamierzonego celu i pozwala uzyskiwać prawidłowe wyniki.

Walidacja rozpatrywanej metody diagnostycznej została przeprowadzona zgodnie z wytycznymi ICH (*The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) oraz na podstawie wytycznych monografii EP (*European Pharmacopoeia*), określanych dla metod badawczych wykorzystujących techniki amplifikacji kwasów nukleinowych – NAT (ang. *Nucleic Acid Amplification Techniques*) (7,8). Ze względu na to, że stosowana w pracy metoda *ADSRRS-fingerprinting* nie ma cech testu ilościowego, przeprowadzone eksperymenty walidacyjne miały na celu weryfikację cech metody wskazanych w wytycznych ICH dla testów o charakterze jakościowym, tj. specyficzności, granicy wykrywalności oraz elastyczności. Dodatkowo, poddano analizie precyzję wyników otrzymanych dzięki zastosowaniu metody *ADSRRS-fingerprinting plus* ze względu na dużą wagę tego parametru w badaniach epidemiologicznych.

3.5.1. Specyficzność metody *ADSRRS-fingerprinting plus*

Za miarę specyficzności metody *ADSRRS-fingerprinting plus* przyjęto jej zdolność do oznaczania jedynie cząsteczek DNA w obecności pozostałych składników mieszaniny badawczej (tj. białka komórkowe, białka enzymatyczne, bufor). Otrzymanie pozytywnego wyniku było zdeterminowane obecnością DNA genomowego w próbce wyjściowej, a żaden z odczynników wykorzystywany w badaniu, nie wpływał na wynik fałszywie pozytywny.

3.5.2. Selektywność metody *ADSRRS-fingerprinting plus*

Za miarę selektywności rozpatrywanej metody uznano jej zdolność do rozróżniania szczepów drobnoustrojów należących do tego samego gatunku, tj. jej potencjał różnicujący.

Na podstawie przeprowadzonych badań na szczepach klinicznych *S. marcescens*, można stwierdzić, że metoda *ADSRRS-fingerprinting plus* jest wysoce selektywna i pozwala na różnicowanie szczepów należących do tego samego gatunku, ale do innych typów genetycznych (genotypów). Olbrzymi potencjał różnicujący omawianej metody decyduje o jej użyteczności.

3.5.3. Granica wykrywalności metody *ADSRRS-fingerprinting plus*

W definicji granicy wykrywalności (LOD) mówi się, że jest to najmniejsza ilość substancji badanej, którą można wykryć, ale niekoniecznie oznaczyć ilościowo.

W rozpatrywanym przypadku określenie granicy wykrywalności jest ściśle związane z wyznaczeniem tzw. punktu odcięcia. Punkt odcięcia jest definiowany jako minimalna ilość analizowanego DNA, która może być wykryta w 95% badań. Istotną rolę w wyznaczeniu punktu odcięcia odgrywa stosowana metoda wizualizacji końcowych produktów eksperymentu. Z tego względu, w omawianym przypadku za punkt odcięcia metody przyjęto taką ilość DNA używaną w początkowym etapie badań (trawienie restrykcyjne), dla której dzięki zastosowaniu metody barwienia żelu poliakrylamidowego roztworem bromku etydyny można okiem nieuzbrojonym zaobserwować obecność produktów PCR.

Na podstawie przeprowadzonych badań walidacyjnych stwierdzono, że minimalna ilość DNA, niezbędna do otrzymania możliwego do zaobserwowania nieuzbrojonym okiem wyniku, wynosi 0,24 µg. Wartość tę można uznać za granicę wykrywalności omawianej metody.

3.5.4. Elastyczność metody *ADSRRS-fingerprinting plus*

Elastyczność metody jest to miara odtwarzalności wyników badań przy niewielkich, ale zamierzonych zmianach w parametrach metody stanowiących dowód jej niezawodności w trakcie jej stosowania. Zgodnie z wytycznymi określanymi przez ICH badanie elastyczności metody powinno stanowić element fazy jej opracowywania. Dlatego też, w celu wstępnego określenia podatności stosowanej procedury na zmiany parametrów analizowano ilości użytych odczynników, czas i temperaturę poszczególnych etapów, oraz źródło pochodzenia użytych endonukleaz (różni producenci), objętość mieszaniny reakcyjnej w PCR, profil termiczny PCR oraz stabilność mieszaniny reakcyjnej do PCR.

Na podstawie analizy wyników przeprowadzonego cyklu doświadczeń wskazuje się na to, że źródło endonukleaz i buforów reakcyjnych stosowanych na etapie trawienia enzymatycznego oraz profil termiczny PCR stanowią parametry krytyczne metody *ADSRRS-fingerprinting plus*.

Zmiana profilu termicznego PCR wpływa zdecydowanie na jakość otrzymywanych wyników badania. W krytycznych przypadkach zmiana profilu termicznego może prowadzić do całkowitego zaniku produktów PCR, i co za tym idzie, może stanowić źródło wyników fałszywie negatywnych.

Objętości mieszaniny reakcyjnej w reakcji PCR uznano za parametr niekrytyczny rozpatrywanej procedury badawczej (w zakresie od 25 do 100 µl) i z tego względu może ona zostać zmniejszona nawet dwukrotnie bez wyraźnego pogorszenia jakości otrzymanych wyników.

3.5.5. Badanie stabilności mieszaniny reakcyjnej wykorzystywanej w PCR

Nie zaobserwowano zmian w obrazie elektroforetycznym podczas przechowywania gotowych do użycia mieszanin reakcyjnych PCR przez 12 tygodni. W rozważanym okresie temperatura inkubacji mieszanin reakcyjnych PCR nie jest krytycznym parametrem metody *ADSRRS-fingerprinting plus*. Mieszaniny reakcyjne PCR są trwałe w ciągu 12 tygodni niezależnie od zastosowanej temperatury przechowywania (+4°C lub -20°C).

3.5.6. Precyzja metody *ADSRRS-fingerprinting plus*

Mianem precyzji metody badawczej określa się stopień zgodności otrzymanych wyników, gdy dana procedura jest stosowana dla wielokrotnie powtórzonych, niezależnych oznaczeń jednorodnej próbki. Mówiąc o precyzji metody badawczej należy rozpatrywać trzy aspekty tego zagadnienia: powtarzalność, precyzja pośrednia i odtwarzalność.

Powtarzalność wyraża precyzję oznaczeń wykonanych przez tego samego analityka, w tych samych warunkach pracy, w ciągu stosunkowo krótkiego przedziału czasowego.

Precyzja pośrednia wyraża precyzję oznaczeń wykonanych w warunkach zmian wewnątrzlaboratoryjnych, obejmujących różne dni analizy, różnych analityków oraz wykorzystanie różnej aparatury badawczej (w naszym przypadku termocyklery różnych firm).

Najbardziej szerokim pojęciem jest odtwarzalność metody badawczej. Wyraża precyzję oznaczeń wykonanych w różnych laboratoriach badawczych.

Na podstawie analizy wyników przeprowadzonych badań stwierdzono, że stopień zgodności profili elektroforetycznych produktów PCR otrzymanych na drodze niezależnych badań tego samego szczepu *S. marcescens* jest bardzo wysoki. Wysoka powtarzalność otrzymywanych wyników charakteryzowała obydwa przeprowadzone eksperymenty (badanie powtarzalności i badanie precyzji pośredniej).

Na podstawie interpretacji wyników powtarzalności i precyzji pośredniej uznano, że metoda *ADSRRS-fingerprinting plus* jest precyzyjna.

3.6. Konstrukcja zestawu diagnostycznego i porównanie efektywności zastosowania zoptymalizowanej metody *ADSRRS-fingerprinting plus* z wykorzystaniem zestawu diagnostycznego *ADSRRS-KIT* oraz standardowej metody *ADSRRS-fingerprinting*

Na podstawie przeprowadzonych badań optymalizacyjnych i walidacyjnych skonstruowano zestaw do badań epidemiologicznych *ADSRRS-KIT*, wykorzystujący meto-

dę *ADSRRS-fingerprinting plus*. Zestaw opracowano z zamiarem szerszego wykorzystania taniej, wiarygodnej i uniwersalnej techniki genotypowania drobnoustrojów – *ADSRRS-fingerprinting* w badaniach epidemiologicznych. Umożliwia on przeprowadzenie badań różnicowania drobnoustrojów przy stosowaniu zestawu gotowych do użycia odczynników oraz podstawowej aparatury laboratoryjnej (tab. 5).

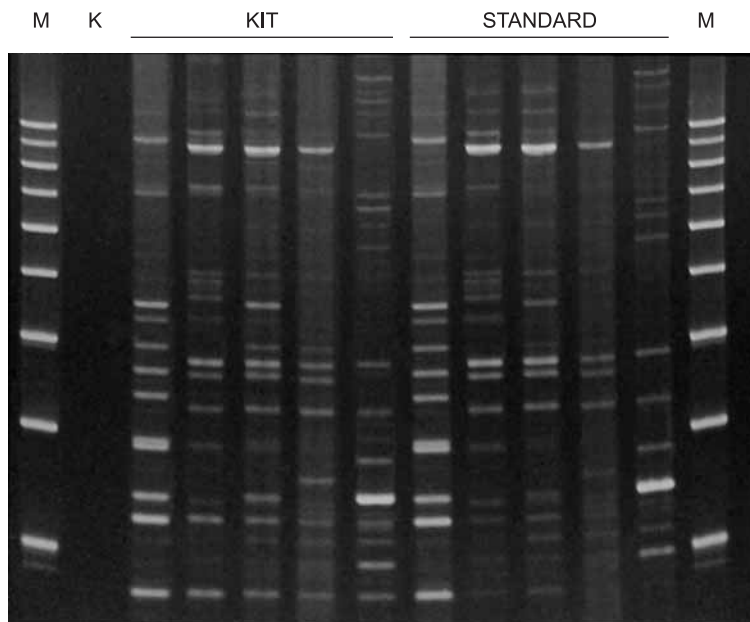
Tabela 5

Opis zestawu diagnostycznego *ADSRRS-KIT*

Oznaczenie próbówki	Kolor próbówki	Opis zawartości próbówki	Rodzaj odczynnika w próbówce
T	żółty	mieszanina składników reakcji trawienia enzymatycznego, stężenie $\times 10$	enzymy restrykcyjne bufor reakcyjny woda
L	zielony	mieszanina składników reakcji ligacji, stężenie $\times 10$	ligaza adaptory bufor reakcyjny woda
PCR1	różowy	mieszanina składników reakcji PCR, stężenie $\times 1$	startery do reakcji PCR bufor reakcyjny MgCl ₂ woda
PCR2 dNTP	niebieski	nukleotydy do reakcji PCR stężenie $\times 10$	mieszanina deoksyrybonukleotydów
PCR3 <i>Pwo</i> 2U/ μ l	biały z żółtym wieczkiem	polimeraza DNA do reakcji PCR 2U/ μ l	hipertermostabilna polimeraza DNA <i>Pwo</i>
MARKER 100-1000 pz 10 μ l/szczętkę 10 szczętek	biały z białym wieczkiem	marker wielkości DNA	marker wielkości DNA o wielkości prążków od 100 do 1000 pz
KP	biały z fioletowym wieczkiem	kontrola pozytywna metody <i>ADSRRS-fingerprinting</i>	DNA genomowe klinicznego szczepu <i>S. marcescens</i>

Przeprowadzono ostateczną weryfikację – porównano efektywności zastosowania zoptymalizowanej metody *ADSRRS-fingerprinting plus* z zestawem diagnostycznym *ADSRRS-KIT* oraz standardową metodą *ADSRRS-fingerprinting*.

Na podstawie analizy wyników przeprowadzonego doświadczenia można wnioskować, że zastosowanie zestawu diagnostycznego *ADSRRS-KIT*, wykorzystującego zoptymalizowaną metodę *ADSRRS-fingerprinting plus*, umożliwi uzyskanie wyników porównywalnych z otrzymanymi podczas zastosowania standardowej metody



Fot. 3. Porównanie efektywności zastosowania różnych procedur diagnostycznych wykorzystujących technikę *ADSRRS-fingerprinting*.

M – marker wielkości DNA [fragmenty: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 i 100 pz; DNA-Gdańsk II, (Polska)]; K – kontrola negatywna reakcji PCR; kolejne ścieżki przedstawiają produkty reakcji *ADSRRS-fingerprinting* z zastosowaniem zestawu diagnostycznego (KIT) i standardowej metody (STANDARD) dla tych samych szczepów *S. marcescens*.

ADSRRS-fingerprinting (fot. 3). Oznacza to, że proponowany zestaw do badań epidemiologicznych może z powodzeniem zostać zastosowany do różnicowania drobnoustrojów z rodzaju *Serratia* oraz innych, istotnych z klinicznego punktu widzenia szczepów drobnoustrojów, jak również w monitorowaniu środowiska szpitalnego oraz dochodzeniach epidemiologicznych.

Przeprowadzone badania pozwoliły również na kompleksową ocenę oraz porównanie zastosowanych procedur badawczych uwzględniających trzy zasadnicze elementy: jakość otrzymanych wyników, czas analizy oraz koszt jednostkowy badania (tab. 6). Za pomocą skonstruowanego zestawu diagnostycznego przeprowadzono genotypowanie szczepów o znanych genotypach, określonych standardową metodą *ADSRRS-fingerprinting* oraz metodą REA-PFGE i opublikowanych przez nas wcześniej dla *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter* sp. (2), *Serratia marcescens* (3). Otrzymano pełną zgodność genotypowania szczepów. Jakość otrzymanych wyników była również bardzo dobra, pomimo skrócenia czasu procedury i poczynionych oszczędności na odczynnikach chemicznych.

Tabela 6

Porównanie zastosowanych procedur diagnostycznych wykorzystujących metodę *ADSRRS-fingerprinting*

Parametr podlegający ocenie	Zastosowana procedura diagnostyczna	
	Zoptymalizowana metoda <i>ADSRRS-fingerprinting plus</i> z wykorzystaniem zestawu diagnostycznego <i>ADSRRS-KIT</i>	Standardowa metoda <i>ADSRRS-fingerprinting</i>
jakość otrzymanych wyników	bardzo dobra	bardzo dobra
czas analizy [godz.]	8	24
koszt analizy 1 próbki [PLN]	6,38¹	9,43¹
	0,35²	3,40²

¹ W kalkulacji wykorzystano następujące dane:

- cenę zestawu do izolacji DNA z katalogu firmy A&A Biotechnology 2005,
- ceny enzymów restrykcyjnych XbaI i BglII z katalogu firmy Sigma 2005,
- cenę ligazy z katalogu firmy Fermentas 2005,
- ceny syntezy oligonukleotydów wg Pracownia Sekwencjonowania DNA, IBB PAN,
- kurs waluty euro na dzień 01.09.2006 r.

² Tak jak w ¹, ale bez uwzględnienia w kalkulacji ceny zestawu do izolacji DNA, która w sposób zasadniczy wpływa na cenę analizy próbki.

4. Podsumowanie

ADSRRS-fingerprinting stanowi bardzo interesującą metodę o dużym potencjale rutynowego zastosowania w laboratoriach diagnostyki mikrobiologicznej w badaniach epidemiologicznych. W naszych wcześniejszych pracach pokazaliśmy przydatność tej metody w badaniach epidemiologicznych dla różnych gatunków bakterii (2-5).

Pierwszy etap doświadczeń opisanych w tej pracy poświęcono zaprojektowaniu różnych systemów diagnostycznych, wykorzystujących metodę *ADSRRS-fingerprinting*, pozwalających na różnicowanie *S. marcescens* na poziomie szczepu. Wytypowano jeden system diagnostyczny *ADSRRS-fingerprinting*, charakteryzujący się największym spośród badanych potencjałem różnicującym oraz uniwersalnością zastosowania. W kolejnym etapie prac przeprowadzono cykl badań mających na celu optymalizację wytypowanego systemu diagnostycznego *ADSRRS-fingerprinting*, który pozwolił na określenie obszarów wpływu wszystkich poddanych analizie krytycznych parametrów poszczególnych etapów metody. Jakość otrzymywanych wyników uznano za najważniejszy obszar wpływu, a wszystkie parametry wpływające na jej pogorszenie określono jako krytyczne (tj. ilość DNA w reakcji trawienia enzymatycznego, temperatura reakcji ligacji oraz rodzaj buforu reakcyjnego, ilość matrycy DNA, ilość starterów i liczba cykli w PCR). W wyniku przeprowadzonych doświadczeń można również ustalić wartości optymalnych wszystkich analizowanych parametrów metody *ADSRRS-fingerprinting*. Pozwoliło to na opracowanie w pełni zoptymalizowanej

metody nazwanej *ADSRRS-fingerprinting plus*, charakteryzującej się lepszą jakością otrzymanych wyników, krótszym czasem analizy i niższymi kosztami wykonania testu w porównaniu do standardowej metody.

Kolejny etap przedstawionych w tej pracy badań stanowiła walidacja zoptymalizowanej techniki *ADSRRS-fingerprinting plus*. Na podstawie przeprowadzonego cyklu doświadczeń stwierdzono, że omawiana procedura badawcza jest specyficzna, selektywna i charakteryzuje się granicą wykrywalności DNA w ilości 0,24 µg. Ponadto ustalono, że dodatkowymi, poza określonymi na etapie optymalizacji metody, krytycznymi czynnikami procedury badawczej są źródło stosowanych na etapie trawienia enzymatycznego odczynników oraz rodzaj zastosowanego w PCR profilu termicznego amplifikacji. W wyniku przeprowadzonych badań powtarzalności udowodniono, że procedurę *ADSRRS-fingerprinting plus* cechuje wysoka precyzja otrzymywanych wyników.

Na podstawie analizy wyników przeprowadzonych doświadczeń uznano, że metoda *ADSRRS-fingerprinting plus* jest odpowiednia do badań różnicowania szczepów drobnoustrojów i może być z powodzeniem stosowana w rutynowych badaniach epidemiologicznych.

Ostatni etap prac dotyczył konstrukcji zestawu diagnostycznego *ADSRRS-KIT*, wykorzystującego metodę *ADSRRS-fingerprinting plus*. Idea opracowania zestawu powstała w Katedrze Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Zestaw opracowano z zamiarem szerszego wykorzystania taniej, wiarygodnej i uniwersalnej techniki genotypowania drobnoustrojów w badaniach epidemiologicznych. Umożliwia on przeprowadzenie badań różnicowania drobnoustrojów przy użyciu prostego zestawu gotowych do użycia odczynników oraz podstawowej aparatury laboratoryjnej. Gotowe do użycia mieszaniny reakcyjne ograniczają ilość używanych w badaniu odczynników oraz ilość wykonywanych manipulacji, dzięki czemu, podczas przeprowadzanych eksperymentów, zmniejsza się zdecydowanie prawdopodobieństwo popełnienia błędu.

Literatura

1. Masny A., Płucienniczak A., (2001), *BioTechniques*, 31, 930-936.
2. Krawczyk B., Lewandowski K., Bronk M., Samet A., Myjak P., Kur J., (2003), *J. Microbiol. Methods*, 52(3), 341-351.
3. Krawczyk B., Naumiuk Ł., Lewandowski K., Baraniak A., Gniadkowski M., Samet A., Kur J., (2003), *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 38(3), 241-248.
4. Naumiuk Ł., Baraniak A., Gniadkowski M., Krawczyk B., Rybak B., Sadowy E., Samet A., Kur J., (2004), *J. Clin. Microbiol.*, 42 (7), 3108-3116.
5. Krawczyk B., Samet A., Czarniak E., Szczapa J., Kur J., (2005), *Polish J. Microbiol.*, 2, 103-108.
6. Diatchenko L., Lau Y. F., (1996), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93, 6025-6030.
7. *European Pharmacopoeia*, (2003), Method 2.6.21. Nucleic Acid Amplification Techniques.
8. *European Pharmacopoeia. Technical Guide*, (December 1999), Validation of analytical methods.