Praca oryginalna

Identyfikacja gatunkowa prątków z rodzaju Mycobacterium na podstawie analizy polimorfizmu genu hsp-65 z użyciem techniki PCR-RFLP.

Identification of Mycobacteriaceae species based on the hsp-65 gene polymorphism analysis by PCR – RFLP.

Adam Fangrat, Renata Walkiewicz, Aleksandra Safianowska, Hanna Grubek – Jaworska, Ryszarda Chazan

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, AM w Warszawie
Kierownik: Prof. dr hab. med. R. Chazan

Summary: The polymorphism of the short fragment of the heat shock protein 65 encoding gene was evaluated by the PCR – RFLP technique described by Telenti and further developed by Devallois for identification of mycobacterial species in routine laboratory work. We analysed 58 strains representing 25 different mycobacterial species (24 reference strains and 34 clinical isolates). The results obtained by PCR-RFLP and HPLC identification techniques were highly concordant The results were compatible for 87,5% (21 / 24) reference strains and for 97,1% (33/34) clinical isolates. The PCR – RFLP method allowed for accurate identification mycobacterial species, especially pathogenic strains. Restriction patterns obtained for 25 species of Mycobacteriaceae genus could help in constructing the data base and algorithms used in routine laboratory practice.

Pneumonol. Alergol. Pol. 2006, 74, 95:100

Key words: tuberculous mycobacteria, atypical mycobacteria, PCR – RFLP, HPLC.

Wstęp

Większość prątków z rodzaju *Mycobacterium*, z wyjątkiem *M. tuberculosis* tj. prątka gruźlicy, obecnych w glebie i w wodzie zaliczano do niedawna do drobnoustrojów saprofitycznych, niechorobotwórczych dla człowieka. Przez wiele lat izolowane z materiałów klinicznych prątki niegruźlicze traktowane były jako zanieczyszczenia środowiskowe. To stanowisko uległo zmianie wraz z udoskonaleniem metod wykrywania, hodowli i identyfikacji gatunków oraz coraz częstszą izolacją prątków niegruźliczych od chorych z klinicznymi objawami chorób płuc. Dzisiaj wiadomo, że wiele gatunków prątków należących do grupy szybko lub wolnorosnących jest typowymi patogenami oportunistycznymi, które są przyczyną zakażeń w momencie wystąpienia zaburzeń mechanizmów odpornościowych gospodarza. Na zwiększoną częstość zakażeń prątkami atypowymi niewątpliwie ma wpływ epidemia zakażeń wirusem HIV oraz rosnąca grupa pacjentów leczonych preparatami immunosupresyjnymi. Warto pamiętać, że prątki niegruźlicze różnią się znacznie wrażliwością na antybiotyki od prątków z grupy *M. tuberculosis* complex, dlatego duże znaczenie ma opracowanie i wprowadzenie szybkich i precyzyjnych metod diagnostycznych. Należą do nich między innymi metody molekularne oraz techniki analizy chromatograficznej kwasów mikolowych. Z technik biologii molekularnej szczególnie przydatne są metody pozwalające na jednoczesną identyfikację kilkunastu do kilkudziesięciu gatunków prątka (21).

W pracy analizowano fragment genu kodującego białko szoku termicznego (heat shock protein – hsp65) techniką PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism) wg Telenti (16, 26, 29,) i Devallois (6) w celu zaadaptowania tej metody w identyfikacji gatunkowej prątków z rodzaju *Mycobacterium* w rutynowej diagnostyce. Konserwatywny gen kodujący hsp65 jest obecny we wszystkich mikobakteriach i wykazuje duże zróżnicowanie międzygatunkowe, co ma znaczenie przy identyfikacji niektórych gatunków prątków szybko rosnących (16). Uzyskane wyniki typowania gatunków odniesiono do wyników otrzymanych przy pomocy wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (high performance liquid chromatography – HPLC), którą traktowano jako metodę referencyjną.

Materiały i Metody

Przeanalizowano 58 izolatów bakteryjnych obejmujących 25 gatunków prątków. W pracy wykorzystano 23 szczepy referencyjne rodzaju *Mycobacterium* z kolekcji American Type Culture Collection (ATCC), jeden szczep wzorcowy M. tuber-

culosis H37Rv oraz 34 izolaty kliniczne. Referencyjne szczepy ATCC otrzymano z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. Spośród 34 izolatów klinicznych 22 uzyskano od pacjentów leczonych w Centralnym Szpitalu Klinicznym AM w Warszawie. Szczepy wyodrębniono z następujących materiałów klinicznych: BAL – 5, popłuczyny oskrzelowe – 3, plwocina – 10, płyn z opłucnej – 2, płyn z torbieli płuca – 2. Ponadto 2 izolaty uzyskano z przesłanych do diagnostyki materiałów klinicznych (BAL) z lecznicy Dantex. Pozostałych 10 izolatów pochodziło z innych laboratoriów klinicznych, przysyłających wyizolowane szczepy do precyzyjnej identyfikacji do gatunku. Materiał uzyskany od chorych opracowano standardową techniką dekontaminacji z N-acetylo-L-cysteiną z ługiem sodowym Hodowle każdego szczepu prowadzono na podłożach stałych Loewensteina-Jensena (L-J).

Do izolacji DNA z komórek bakteryjnych wykorzystano odczynniki firmy Roche, z zestawu Amplicor MTB zgodnie z zaleceniami producenta. Wyizolowany DNA został oczyszczony metodą fenolowo-chloroformową (11). W reakcji amplifikacji DNA wykorzystano primery klasy (5OD) zamówione w firmie DNA-Gdańsk o następującej sekwencji nukleotydów opublikowanych przez Telenti i wsp. (26): TB11 – 5' ACCAACGATGGTGTGTCCAT oraz TB12 – 5' CTTGTCGAACCGCATACCCT.

Amplifikację DNA przeprowadzono zgodnie z opublikowanymi wcześniej protokołami (6,29), wykorzystując do amplifikacji DNA Platinum Taq DNA Polimerase (Gibco BRL). Produkt reakcji PCR poddawano elektroforezie w 2% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny. Wyraźny pojedynczy prążek o długości ok. 453 par zasad wg markera interpretowano jako wynik dodatni. Otrzymany produkt amplifikacji trawiono enzymami restrykcyjnymi: BstEII (Sigma – Aldrich), 60 min., 60°C oraz HaeIII (Sigma – Aldrich) 60 min., 37°C.Rozdział produktów trawienia wykonano na 3,5% żelu Agarose 1000 (Sigma) wybarwionym bromkiem etydyny. Analizę HPLC przeprowadzono zgodnie metodyką przedstawioną przez Butler'a (4) i według wcześniej szczegółowo opisanej procedury (17).

Wyniki

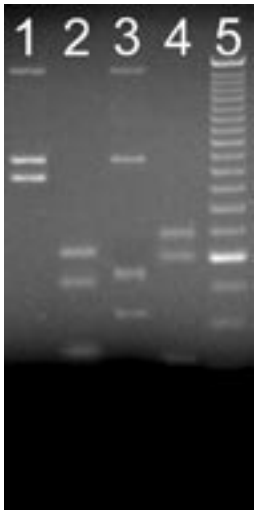
Analizując polimorfizm fragmentów restrykcyjnych, prawidłowo określono gatunek 21 szczepów, spośród zbadanych 24 szczepów referencyjnych. Nie uzyskano wzoru restrykcyjnego dla szczepu referencyjnego *M. kansasii* ATCC 12478, szczepu *M. tokaiense* ATCC 27282 oraz *M. chelonae* ATCC 14472. Względna zgodność wyników dla szczepów referencyjnych wynosiła 87,5% (21/24).

Spośród 34 szczepów klinicznych poprawnie określono gatunek 33 szczepów. Zestawienie wyników uzyskanych metodami PCR-RFLP i HPLC przedstawiono w Tabeli 1. Poprawnie zidentyfikowano wszystkie szczepy *M tuberculosis* complex – 7, wszystkie szczepy *M. gordonae* (3 typu I, 5 typu III, wg odnośnik), wszystkie szczepy *M. kansasii* (7 typu I, wg Smole – 19), wszystkie szczepy *M. avium* (3 typu II wg Smole – 19), wszystkie szczepy *M. xenopi* – 4, oraz jedyny szczep *M. intracellulare.* Spośród trzech szczepów klinicznych określonych metodą HPLC jako *M. fortuitum complex*, w analizie PCR-RFLP jeden wytypowano jako *M. fortuitum*, zaś dwa jako *M. peregrinum*, co jest wynikiem bardziej precyzyjnym, ale nie jest sprzeczne z referencyjną metodą HPLC (por. Omówienie wyników). Przy pomocy PCR – RFLP nie udało się określić gatunku jednego szczepu zidentyfikowanego przy pomocy HPLC jako *M. scrofulaceum*.

Podsumowując, względna zgodność wyników uzyskanych obydwoma metodami dla izolatów klinicznych wynosiła 97,1% (33/34).

Omówienie wyników i wnioski

Techniki biologii molekularnej oparte na reakcji PCR zyskują zdecydowaną przewagę nad innymi metodami typowania prątków, ponieważ jak wykazali Taylor i wsp. (25) – identyfikacja jest możliwa już w momencie stwierdzenia wzrostu bakterii na podłożu, bez czekania, czasem nawet kilku tygodni, na uzyskanie odpowiedniej ilości masy bakteryjnej koniecznej do oznaczenia HPLC. Przy podejmowaniu decyzji o wyborze sekwencji DNA i techniki molekularnej wykorzystywanej do identyfikacji gatunków prątków brano pod uwagę przede wszystkim możliwość identyfikacji jak największej liczby gatunków prątków podczas przeprowadzenia pojedynczej analizy. W badaniach taksonomicznych autorzy posługiwali się sekwencjągenu kodującego



Ryc 1 Fragmenty restrykcyjne dla gatunków *M. avium i M. fortuitum*

Fig 1 Restriction fragment length polymorphism for *M. avium and M. fortuitum*

Ścieżka 1: *M. avium*, trawienie enzymem BstE II
Ścieżka 2: *M. avium*, trawienie enzymem Hae III
Ścieżka 3: *M. fortuitum*, trawienie enzymem BstE II
Ścieżka 4: *M. fortuitum*, trawienie enzymem Hae III
Ścieżka 5: Wzorzec masy molekularnej 25 bp.

Line 1: *M. avium*, digestion by BstEII
Line 2: *M. avium*, digestion by Hae III
Line 3: *M. fortuitum*, digestion by BstE II
Line 4: *M. fortuitum*, digestion by Hae III
Line 5: 25 bp molecular weight standard

Tabela 1 Porównanie zgodności wyników identyfikacji izolatów klinicznych do gatunku przy zastosowaniu metody HPLC i PCR-RFLP.
Table 1 The comparison of results obtained by mycobacterial species identification techniques HPLC and PCR-RFLP for clinical strains.

Lp.	Numer szczepu klinicznego	Gatunek określony metodą HPLC	Gatunek określony metodą PCR-RFLP	Wzór restrykcyjny uzyskany po trawieniu enzymem BstEII	Wzór restrykcyjny uzyskany po trawieniu enzymem Hae III
1	9272	M. tuberculosis complex	M. tuberculosis complex	232 / 113 / 83	153 / 128 / 70
2	9354	M. tuberculosis complex	M. tuberculosis complex	231 / 118 / 83	154 / 128 / 70
3	9456	M. tuberculosis complex	M. tuberculosis complex	235 / 116 / 84	150 / 128 / 68
4	9692	M. tuberculosis complex	M. tuberculosis complex	236 / 116 / 85	153 / 129 / 69
5	9512	M. tuberculosis complex	M. tuberculosis complex	234 / 116 / 85	153 / 129 / 69
6	9550	M. tuberculosis complex	M. tuberculosis complex	233 / 116 / 84	151 / 129 / 69
7	9802	M. tuberculosis complex	M. tuberculosis complex	237 / 117 / 85	151 / 128 / 70
8	9168	M. gordonae	M. gordonae typ I	235 / 119 / 86	165 / 105 / 61
9	9139	M. gordonae	M. gordonae typ I	234 / 118 / 84	163 / 110 / 61
10	1450/01	M. gordonae	M. gordonae typ III	240 / 123 / 106	126 / 108
11	1389/01	M. gordonae	M. gordonae typ III	248 / 125 / 108	128 / 112
12	1388/01	M. gordonae	M. gordonae typ III	252 / 125 / 107	131 / 115
13	1150/01	M. gordonae	M. gordonae typ III	248 / 122 / 103	131 / 113
14	1131/01	M. gordonae	M. gordonae typ III	244 / 120 / 105	130 / 112
15	961/01	M. gordonae	M. gordonae typ I	239 / 123 / 86	160 / 114 / 61
16	9610	M. kansasii	M. kansasii typ I	240 / 214	132 / 105
17	9801	M. kansasii	M. kansasii typ I	225 / 200	125 / 100 / 77
18	9931	M. kansasii	M. kansasii typ I	247 / 217	129 / 103 / 78
19	10103	M. kansasii	M. kansasii typ I	247 / 217	129 / 104 / 78
20	10235	M. kansasii	M. kansasii typ I	247 / 219	130 / 103 / 78
21	10379	M. kansasii	M. kansasii typ I	248 / 218	126 / 101 / 76
22	2049/02	M. kansasii	M. kansasii typ I	244 / 215	126 / 98 / 73
23	9054	M. avium	M. avium	235 / 208	127 / 105 / 62
24	9352	M. avium	M. avium	233 / 210	128 / 103 / 61
25	74	M. avium	M. avium	241 / 215	130 / 103 / 61
26	9376	M. xenopi	M. xenopi	234 / 115 / 88	157 / 102 / 63
27	9390	M. xenopi	M. xenopi	236 / 116 / 87	160 / 104 / 61
28	9704	M. xenopi	M. xenopi	240 / 117 / 88	161 / 106 / 60
29	9966	M. xenopi	M. xenopi	240 / 114 / 88	162 / 101
30	9047	M. fortuitum complex	M. peregrinum	235 / 210	143 /137 / 97
31	10262	M. fortuitum complex	M. peregrinum	232 / 206	139 / 128 / 98
32	3342	M. fortuitum complex	M. fortuitum	245 / 120	149 / 126
33	9987	M. scrofulaceum	Nie zidentyfikowany	234 / 116 / 98	128 / 111 / 60
34	10364	M. intracellulare	M. intrecellulare	238 / 119 / 101	146 / 130 / 60

16S rRNA. Analiza polimorfizmu tego genu znalazła zastosowanie przy identyfikacji drobnoustrojów wolnorosnących (9, 10, 13, 27). Jednak stosunkowo mała zmienność w obrębie tego genu obserwowana wśród prątków szybkorosnących nie pozwala na wykorzystanie sekwencji 16S rRNA dla różnicowania zbliżonych genetycznie gatunków takich jak *M. chelonae* i *M. abscessus*. (9,12), nawet przy wykorzystaniu techniki sekwencjonowania DNA. Z tego względu zdecydowaliśmy się na wybór innej sekwencji, występującej we wszystkich gatunkach prątków tj. gen hsp-65 kodujący białko szoku termicznego o masie 65kDa, który charakteryzuje się większą zmiennością sekwencji niż 16S rRNA i dlatego też jest przydatny do analizy blisko spokrewnionych szczepów. Ta zmienność genu hsp65 została wykorzystana do opracowania metod identyfikacji gatunków zarówno szybko, jak i wolno rosnących prątków (15, 22, 25,28).

Analizując polimorfizm hsp65 dla szczepów referencyjnych w trzech przypadkach uzyskaliśmy rozbieżności pomiędzy spodziewaną, a otrzymaną długością fragmentów restrykcyjnych. Dotyczyły one szczepu *M. tokaiense* ATCC 27282, opublikowane dotychczas sekwencje dwóch izolatów dzikich różniły się długością spodziewanych fragmentów restrykcyjnych zarówno dla enzymu BstEII jak i HaeIII.

Rozbieżności dotyczyły również szczepu *M. chelonae* ATCC 14472, dla którego układ fragmentów restrykcyjnych odpowiadał gatunkowi M. abscessus typ II, wg Devallois (6). W przypadku szczepu ATCC 14472 opublikowano dwie sekwencje dla fragmentu genu hsp65, który ulegał amplifikacji po zastosowaniu primerów TB11 i TB12. Sekwencja opublikowana w 1996 roku przez Bascuana (2) zawiera dodatkowe miejsce restrykcyjne dla enzymu HaeIII w pozycji 144 (licząc od 1 zasady sekwencji amplifikowanej przez primer TB11). Dlatego w wyniku trawienia enzymem HaeIII uzyskuje się fragmenty o długościach 144, 69, 58, 52, 48, 42, 23, 6 par zasad, a w wyniku trawienia enzymem BstE II 230 / 211 par zasad. Opublikowana później przez Ringuet'a sekwencja dla tego samego szczepu ATCC 14472, (opisanego już jako M. abscesuss) nie posiada dodatkowego miejsca restrykcyjnego w pozycji 144, w związku z czym w wyniku użycia enzymu BstEII i HaeIII uzyskuje się fragmenty restrykcyjne o długościach odpowiednio 230 / 211 par zasad oraz 196, 69, 58 par zasad (po odrzuceniu fragmentów krótszych niż 50 par zasad). Tej długości fragmenty restrykcyjne uzyskałno po trawieniu posiadanego w naszej kolekcji szczepu ATCC 14472 *M. chelonae*. Takie same fragmenty restrykcyjne uzyskuje się analizując sekwencję dzikiego szczepu M. abscessus, która została opublikowana przez Brunnello w 2001 (3). Należy dodać, że w bazie danych ATCC szczep o numerze 14472 nadal figuruje jako *M. chelonae*. Przytoczone powyżej dane wskazują na duże trudności jakie można napotkać przy identyfikacji bliskich filogenetycznie gatunków jakimi są *M. abscessus* i *M. chelonae*. Wydaje się, że ostateczne przyporządkowanie do gatunku może być wykonane na podstawie analizy porównawczej sekwencji nie jednego, ale kilku genów.

Z kolei w przypadku referencyjnego szczepu *M. kansasii* ATCC 12478, uzyskano produkt amplifikacji o długości ok. 2000 par zasad, a wiec znacznie dłuższy od oczekiwanego. Pomimo ponownej izolacji DNA, modyfikacji warunków reakcji PCR nie udało się uzyskać amplifikatu o przewidywanej długości. Z powodu nieswoistej amplifikacji odstąpiono od dalszej analizy PCR-RFLP. Bez analizy sekwencji tego szczepu trudno określić przyczynę, z powodu której nie uzyskano produktu reakcji. Jeśli chodzi o szczepy zaliczane do gatunku *M. kansasii*, to na podstawie wielu wcześniej opublikowanych prac wyodrębniono kilka podgatunków, różniących się fenotypowo, genotypowo, a także zjadliwością (1, 14, 24). Przedstawione przez Devallois i Brunello (3, 6) wyniki badania polimorfizmu genu hsp-65 również wykazały obecność pięciu typów szczepów, co wskazuje na ich dużą wewnątrzgatunkową zmienność. Powyższe obserwacje wprawdzie nie tłumaczą przyczyny nieswoistej amplifikacji, jednak pozwalają przypuszczać, że trudności związane ze szczepem *M. kansasii* wynikać mogą z dużego zróżnicowania tego gatunku.

W pracy analizowano 34 dzikie izolaty, których identyfikacja do gatunku została najpierw przeprowadzona przy użyciu techniki HPLC. Oceniając metody identyfikacji gatunku prątków przede wszystkim należy ocenić możliwość odróżnienia prątków gruźlicy od prątków atypowych. Siedem przeanalizowanych w naszej pracowni szczepów klinicznych M. tuberculosis complex charakteryzowało się bardzo stabilnym układem fragmentów restrykcyjnych. Po trawieniu enzymami BstEII i HaeIII różnice długości poszczególnych fragmentów restrykcyjnych pomiędzy poszczególnymi szczepami wynosiły nie więcej niż 6 par zasad dla BstEII oraz nie więcej niż 4 pary zasad dla enzymu HaeIII. Tej wielkości odchylenia mogą wynikać z jakości żelu i błędów pomiaru wielkości fragmentów restrykcyjnych, zwłaszcza tych o długości większej niż 200 par zasad. Uzyskany układ fragmentów restrykcyjnych pozwala na łatwe odróżnienie gatunku *M. tuberculosis* complex od

innych gatunków, co jest niezwykle cenne. Podobne obserwacje dotyczące stabilności sekwencji hsp65 dla M. tuberculosis complex poczynili inni autorzy (3, 5, 6, 26). Analiza polimorfizmu sekwencji hsp-65 amplifikowanej przy pomocy primerów TB11 i TB12 nie pozwala na rozróżnienie gatunków w obrębie grupy M. tuberculosis complex, ponieważ poszczególne gatunki wykazują praktycznie 100% homologię tego regionu (porównanie sekwencji w bazie danych BLAST).

Do grupy *M. fortuitum* complex zaliczane są m.in. następujące gatunki prątków: *M. fortuitum s. acetamidolyticum, M. fortutium s. fortuitum, M. peregrinum*. Spośród trzech dzikich szczepów, których gatunek techniką HPLC został określony jako *M. fortuitum* complex, dwa szczepy zidentyfikowano metodą PCR-RFLP jako *M. peregrinum* o długościach fragmentów restrykcyjnych 233 / 206 par zasad dla enzymu BstEII oraz 141/133/98 par zasad dla enzymu HaeIII. Analizując dziki szczep 3342/02 uzyskano fragmenty o długościach 245/120 i 149 / 126 par zasad odpowiednio dla enzymu BstEII i Hae III, które odpowiadają gatunkowi *M. fortuitum s. fortuitum*. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy (3, 6, 26). Metody molekularne umożliwiły w tym przypadku bardziej precyzyjną identyfikację badanych gatunków prątków, niż technika HPLC

Drobnoustroje zaliczane do grupy *M. avium-intracellulare* complex stanowią złożoną grupę drobnoustrojów, sprawiają trudności przy precyzyjnej identyfikacji do gatunku (23). Trzy przeanalizowane szczepy kliniczne z gatunku *Mycobacterium avium*, charakteryzowały się stabilnym układem fragmentów restrykcyjnych, który odpowiadał typowi II według Smole (19), jednak z uwagi na niewielką liczbę przebadanych szczepów, trudno wyciągnąć wnioski co do przydatności w różnicowaniu gatunków grupy MAC. Część testów komercyjnych opartych na technice hybrydyzacji pozwala na rozróżnienie do gatunku, jednak w praktyce często izolowane są szczepy, które reagują z sondą wspólną dla całej grupy i wówczas opisywane są jako MAC (18). Takie szczepy mogą odpowiadać nowo zidentyfikowanym gatunkom jak, np. *M. lentiflavum* (20). Jak wynika z przedstawionych przez Smole wyników badań dużej grupy szczepów o różnorodnym pochodzeniu z grupy *MAC complex*, szczepy te charakteryzują się dużą różnorodnością sekwencji hsp-65. Dla *M. avium* opisano 3 warianty fragmentów restrykcyjnych, dla M. intracellulare – 2 warianty, natomiast dla dużej grupy szczepów zidentyfikowanych jako MAC opisano 10 wariantów (19), przy czym uzyskane wzorce nie były swoiste dla poszczególnych gatunków. Dlatego opierając się na opublikowanych danych, w przypadku szczepów dla których w wyniku analizy PCR-RFLP genu hsp-65 uzyska się wzór odpowiadający MAC, wówczas w celu precyzyjnej identyfikacji gatunku należałoby wykonać dodatkowe badania, np. oceniające obecność swoistej sekwencji dla *M. avium* – IS 1245 (7).

Spośród 34 przeanalizowanych szczepów klinicznych w przypadku jednego szczepu, którego gatunek techniką HPLC opisano jako *M. scrofulaceum*, uzyskano układ fragmentów restrykcyjnych, który nie odpowiadał żadnej z opublikowanych sekwencji. Bez zsekwencjonowania, fragmentu hsp-65 nie można określić, czy uzyskany wzór odpowiada kolejnemu wariantowi hsp-65, czy jest to tylko mutacja punktowa dotycząca tego szczepu.

Podstawową zaletą rutynowego wykorzystania techniki identyfikacji prątków metodą PCR-RFLP jest stosunkowo niewielki koszt, pozwalający na identyfikację ponad 50 gatunków prątków (3). Metoda może być wykorzystana w laboratoriach, które wykorzystują metodę PCR w rutynowej diagnostyce, ponieważ nie wymaga zakupu drogiego sprzętu lub przeprowadzenia specjalistycznych szkoleń. Każde laboratorium powinno stworzyć własny algorytm identyfikacji prątków. Algorytm powinien opierać się na szczepach, których sekwencje zostały dobrze poznane. Porównując wyniki uzyskane w niniejszej pracy do wyników opublikowanych wcześniej widać duże różnice w stosunku do pierwszych opublikowanych algorytmów (6, 26). Wynika to przede wszystkim z dokładności, z jaką określa się długość uzyskanych fragmentów restrykcyjnych. Przy tworzeniu własnego algorytmu należy również określić minimalną długość fragmentów restrykcyjnych branych pod uwagę przy identyfikacji, tak aby nie interpretować jako fragmentu restrykcyjnego prążka powstałego w wyniku łączenia primerów. Wpływ na jakość wyników ma również rodzaj zastosowanej elektroforezy. Precyzyjnie można określić długość fragmentów restrykcyjnych wykonując elektroforezę w żelu poliakrylamidowym (3) lub elektroforezę kapilarną (8).

Przedstawione badania są pierwszą w Polsce próbą typowania gatunku Mycobacterium coraz powszechniej stosowaną na świecie techniką z zakresu biologii molekularnej (PCR-RFLP) w oparciu o fragment genu hsp65. Wyniki świadczą o wysokiej zgodności (54/58) tej metody i uznanej za referencyjną techniki HPLC i mogą być podstawą wprowadzenia jej do rutynowej diagnostyki.

Piśmiennictwo

1. Alcaide F i wsp. Heterogeneity and clonality among isolates of Mycobacterium kansasii: implications for epidemiological and pathogenicity studies. J Clin Microbiol. 1997;35: 1959-1964.
2. Bascunana,C.R. and Belak,K. Detection and identification of mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested PCR and restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 1996;34:2351-2355.
3. Brunello F. i wsp. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp-65 gene. J Clin Micriobiol 2001;39:2799-2806.
4. Butler W.R. i wsp.: Standardized method for HPLC identyfication of mycobacteria. US Department of Health and Human Services 1996, http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/TB/hplc.pdf
5. da Silva Rocha A, i wsp. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. J Microbiol Methods. 1999;37:223-229.
6. Devallois A., Goh K.S., Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to dfferentiate 34 mycobacterial species. J Clin Microbiol 1997;35:2969-2973.
7. Guerrero C. i wsp. A novel insertion element from Mycobacterium avium, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. J Clin Microbiol 1995;33:304-307.
8. Hernandez S.M., i wsp. Identification of Mycobacterium species by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses using fluorescence capillary electrophoresis. J Clin Microbiol 1999;37:3688-3692.
9. Kirschner P. i wsp. Genetic heterogenecity within Mycobacterium fortuitum complex species: genotyping criteria for identification. J. Clin Microbiol 1992;30: 2772 – 2775.
10. Kirschner P., i wsp. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year expierience in clinical laboratory. J Clin Microbiol 1993;31:2882-2889.
11. Kur J. Podstawy inżynierii genetycznej. Teoria, ćwiczenia, testy. Politechnika Gdańska 1994.
12. Kusunoki S., Ezaki T. Proposal of Mycobacterium peregrinum sp. nov., nom. rev., and elevation of Mycobacterium chelonae subsp. abscessus (Kubica et al.) to species status: Mycobacterium abscessus comb. nov. Int J Syst Bacteriol 1992; 42:240-245.
13. Patel S., Yates M., Saunders A. PCR-enzyme linked immunosorbent assay and partial rRNA gene sequencing: a rational approach to identifying mycobacteria. J Clin Microbiol 1997; 35:2375 – 2380.
14. Picardeau M, i wsp. Genotypic characterization of five subspecies of Mycobacterium kansasii. J Clin Microbiol. 1997;35:25-32.
15. Plikaytis B.B. i wsp. Differentiation of slowly growing Mycobacterium species, including Mycobacterium tuberculosis, by gene amplfication and restriction fragment length polymorphism analysys. J Clin Microbiol 1992; 30:1815 – 1822.
16. Ringuet H., i wsp. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 852-857.
17. Safianowska A. i wsp. Analiza kwasów mikolowych różnych gatunków z rodzaju Mycobacterium metodą cieczowej chromatografii wysokociśnieniowej. Pneumonol. Alergol. Pol. 2002, 70, 130-138
18. Saito H. i wsp. Identification and partial characterisation of Mycobacterium avium and Mycobacterium intarcellulare by using DNA probes. J. Clin Microbiol. 1989;27:994-997.
19. Smole SC, i wsp. Clinical and epidemiological correlates of genotypes within the Mycobacterium avium complex defined by restriction and sequence analysis of hsp65. J Clin Microbiol. 2002;40:3374-3380.
20. Soini H., Eerola E., Viljanen M.K. Genetic diversity among Mycobacyterium avium complex Accuprobe-positive isolates. J clin Microbiol. 1996;34:5-57.
21. Soini H., Musser J.M. Molecular diagnosis of mycobacteria.Clin Chem. 2001;47:809-814.
22. Steingrube V.A. i wsp. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol 1995; 33:149 – 153.
23. Swanson D.S. i wsp. Subspecific differentiation of Mycobacterium avium complex strain by automated sequencing of region of the gene (hsp65) encoding a 65-kilodalton heat schock protein. Int J Syst Bacteriol 1997;47:414-419.
24. Taillard C. i wsp. Clinical implications of Mycobacterium kansasii species heterogeneity: Swiss National Survey. J Clin Microbiol. 2003;41:1240-4.
25. Taylor T.B i wsp. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria in liquid media. J. Clin Microbiol 1997; 35:79 – 85.
26. Telenti A, i wsp. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 1993;31:175-178.
27. Vaneechoutte M., i wsp. Identification of Mycobacterium species by using amplified ribosomal Dann restriction analysis. J Clin Microbiol 1993; 31:2061 – 2065.
28. Wilson R.W. i wsp. Clinical application of PCR-restriction enzyme pattern analysis for rapid identification of aerobic actinomycete isolates. J Clin Microbiol 1998;36:148 – 152.
29. Wong DA, i wsp. Simple and rational approach to the identification of Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium complex species, and other commonly isolated mycobacteria. J Clin Microbiol. 2001;39: 3768-3771.

email: fangrat@amwaw.edu.pl