

Józef Kur¹, Alfred Samet², Jacek Juszczyk³, Andrzej Gładysz⁴

PCR – NOWA ERA W KLINICZNEJ DIAGNOSTYCE MIKROBIOLOGICZNEJ I BADANIACH EPIDEMIOLOGICZNYCH? (CZĘŚĆ II)

¹ Katedra Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej

² Pracownia Bakteriologiczna, Państwowego Szpitala Klinicznego 1 w Gdańsku

³ Klinika Chorób Zakaźnych

Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

⁴ Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych Akademii Medycznej we Wrocławiu

1. IDENTYFIKACJA DROBNOUSTROJU TECHNIKĄ PCR

1.1. Bakterie

Do identyfikacji drobnoustrojów, szczególnie w materiale klinicznym, stosuje się primery specyficzne gatunkowo. Regionem docelowym w reakcji PCR jest fragment DNA swoisty dla danego gatunku bądź kilku gatunków spokrewnionych o podobnym znaczeniu klinicznym. Przykładem praktycznego zastosowania specyficznych primerów, jest np. wykrywanie wewnątrzkomórkowych pasożytów *Chlamydia trachomatis*, gdzie docelowym amplifikowanym regionem jest fragment plazmidu kryptycznego, obecnego we wszystkich szczepach gatunku (63). Do wykrywania *Helicobacter pylori*, uważanego za jeden z czynników etiologicznych choroby wrzodowej i nieżytów żołądka, stosuje się np. amplifikację fragmentu genu *ureA* kodującego ureazę, specyficzną tylko dla tego gatunku (20). Element insercyjny IS 6110, występujący w kilku gatunkach prątków, jest regionem docelowym stosowanym do wykrywania *Mycobacterium tuberculosis* complex techniką PCR (28). Dla *Listeria monocytogenes*, fragment genu kodujący enzym listeriolizynę O, jest stosowany dla identyfikacji tej bakterii (88).

W praktyce, w mikrobiologii klinicznej, ważna jest nie tylko informacja z jakim patogenem mamy do czynienia, ale także informacja o oporności danej bakterii na antybiotyki. Przykładem jednoczesnego wykrywania określonej bakterii i badania jej oporności na grupę antybiotyków może być zastosowanie złożonego PCR (ang. *Multiplex PCR*) opracowanego dla metycyloopornych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA). Zastosowanie techniki PCR pozwala tu na stwierdzenie: (i) obecności *S. aureus* w badanym materiale (stosowanym regionem docelowym w reakcji PCR jest gen *nuc* specyficzny tylko dla tego gatunku; kodujący specyficzną nukleazę) oraz (ii) oporności badanego szczepu *S. aureus* na antybiotyki β -laktamowe (regionem docelowym jest gen *mecA* kodujący białko PBP2') (4, 5). Istota reakcji MPCR w zasadzie nie różni się od klasycznego PCR, aczkolwiek MPCR jest reakcją wyższego rzędu. Wcześniej opisane zasady reakcji PCR (część I tej pracy) dotyczą również MPCR, aczkolwiek muszą być przestrzegane bardziej rygorystycznie.

Ciekawym przykładem zastosowania techniki PCR w diagnostyce mikrobiologicznej jest wykrywanie czynnika etiologicznego choroby z Lyme jakim jest *Borrelia burgdorferi* (33, 64, 82, 83, 93). Wykrywa się tę bakterię zarówno z próbek pobranych od pacjentów jak i przeprowadza się badania obecności jej w kleszczach, które są naturalnym wektorem (przenosicielem) *B. burgdorferi*.

Diagnostyka kily jest także bardzo ułatwiona przez zastosowanie techniki PCR, ponieważ *Treponema pallidum* nie daje się hodować *in vitro* na sztucznych pożywkach (73). Stosuje się tu primery, które specyficznie amplifikują wysoce konserwatywny region kodujący specyficzny błonowy antygen o wielkości 47 kDa.

Stosując technikę PCR możemy także różróżnić toksykogenne szczepy *Clostridium difficile* od szczepów nietoksykogennych (58).

Tabela I. PCR w diagnostyce infekcji bakteryjnych.

Bakteria	Przykładowe piśmiennictwo
<i>Acinetobacter sp</i>	74, 75, 76, 77, 78
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	101
<i>Aeromonas hydrophila</i>	87
<i>Bacillus anthracis</i>	15
<i>Bordetella pertussis</i>	32,43
<i>Borrelia burgdorferi</i>	33, 64, 82, 83, 93
<i>Chlamydia trachomatis</i>	41, 63, 91
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	19
<i>Clostridium difficile</i>	50, 58
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	80
<i>Escherichia coli</i>	9,21,79
<i>Haemophilus influenzae</i>	111, 112
<i>Helicobacter pylori</i>	20, 86, 96, 105
<i>Legionella pneumophila</i>	107
<i>Leptospira sp</i>	42, 119, 120
<i>Listeria monocytogenes</i>	10, 46, 55, 56
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28, 38, 102
<i>Mycobacterium leprae</i>	39
<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>	104, 108
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	117
<i>Mycoplasma genitalium</i>	103
<i>Neisseria meningitidis</i>	57
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
<i>Rickettsia typhi</i>	114
<i>Treponema pallidum</i>	73
<i>Salmonella typhimurium</i>	90
<i>Shigella flexneri</i>	60
<i>Staphylococcus aureus</i>	4, 5, 8
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	118
<i>Yersinia pestis</i>	40
<i>Yersinia enterocolitica</i>	44, 122
<i>Vibrio cholerae</i>	100

Śledząc dane literaturowe, wydaje się, że nie ma już chyba żadnej bakterii, dla której nie podjęto próby zastosowania techniki PCR do specyficznego wykrywania. Lista przykładowych bakterii, dla których istnieją dobrze opracowane systemy identyfikacji techniką PCR, jest przedstawiona w tabeli I.

1.2. Wirusy

Lista wirusów, które mogą być wykrywane techniką PCR jest przedstawiona w tabeli II.

Tabela II. PCR w diagnostyce infekcji wirusowych.

Wirus	Przykładowe piśmiennictwo
<i>Herpesviridae</i>	
wirus <i>Herpes simplex</i>	14
wirus <i>Epsteina-Barr</i>	97
wirus cytomegalii	23, 30, 35, 112, 121
wirus <i>Varicella-zoster</i>	26
<i>Papovaviridae</i>	
ludzki wirus JC	1
ludzki wirus <i>papilloma</i>	66,98
<i>Flaviviridae</i>	
wirus <i>hepatitis C</i>	17
enterowirusy	94
<i>Hepadnaviridae</i>	
wirus <i>hepatitis B</i>	49, 99
<i>Retroviridae</i>	
HIV-1 i HIV-2	71, 81, 85, 95
HTLV-I i HTLV-II	18
HBLV	11
<i>Orthomyxoviridae</i>	
wirus <i>Influenza</i>	123
<i>Parvoviridae</i>	
ludzki <i>parvovirus B19</i>	54
<i>Adenoviridae</i>	
ludzki <i>adenovirus</i>	2
<i>Picornaviridae</i>	
wirus <i>hepatitis A</i>	45

Identyfikacja infekcji wirusem HBV polega na wykrywaniu specyficznych antygenów wirusowych (np. HBsAg), a także przeciwciał anti-HBV (np. anti-HBcIgM). Najczęściej stosuje się tu test ELISA. Jednakże, w niektórych przypadkach metody te mogą być zawodne. I tak np. HBsAg nie może być wykryty z powodu niskiego stężenia wirusa w surowicy (47, 48, 49, 99). Metoda PCR z użyciem specyficznych dla HBV primerów pozwala na selektywną amplifikację genów wirusowych przy czułości co najmniej 10-krotnie większej niż test ELISA. Wykrywanie innych wirusów *hepatitis* takich jak HCV i HDV jest również możliwe przez

zastosowanie specyficznych primerów w reakcji PCR (24, 25, 61). Oznaczenie HCV-RNA jest podstawową metodą potwierdzającą zakażenie wirusem C oraz klasyfikacji chorych do leczenia interferonem, a także w kontroli efektów leczenia (48).

Ponad 20 typów ludzkich wirusów *papilloma* (HPV) powoduje liczne schorzenia włączając w to nowotwory. Selektywne primery pozwalają na amplifikację i analizę różnicującą prawie wszystkich szczepów HPV (22, 34, 66, 98).

Jedną z chorób wirusowych u ludzi przenoszonych wertykalnie są zakażenia wirusem cytomegalii (CMV). Stosując primery amplifikujące zmienny region materiału genetycznego tego wirusa w kombinacji z analizą RFLP amplifikowanego regionu możliwe jest zidentyfikowanie CMV i jednocześnie zróżnicowanie między poszczególnymi szczepami (23, 30, 35, 106, 121).

Jednym z klasycznych już zastosowań PCR, jako wysoce czułego narzędzia diagnostycznego czynników zakaźnych, jest zdolność do wykrywania sekwencji wirusa HIV w bardzo wczesnych okresach zakażenia, o wiele wcześniej niż jest to możliwe przy zastosowaniu rutynowych metod serologicznych, co ma szczególne znaczenie u dzieci urodzonych z matek zakażonych HIV (95). Ilościowy PCR pozwala zarówno na określenie aktywności replikacji wirusa, jak i typu materiału genetycznego wirusa HIV (85).

1.3. Grzyby

Lista przykładowych grzybów, dla których istnieją dobrze opracowane systemy identyfikacji techniką PCR, jest przedstawiona w tabeli III. Najlepiej poznane są swoiste testy PCR dla gatunków rodzaju *Candida*, *Pneumocystis carinii* i gatunków rodzaju *Aspergillus*.

Tabela III. PCR w diagnostyce grzybic.

Grzyb	Przykładowe piśmiennictwo
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	7
<i>Candida albicans</i>	69
<i>Coccidioides immitis</i>	7
<i>Cryptococcus neoformans</i>	113
<i>Histoplasma capsulatum</i>	7
<i>Pneumocystis carinii</i>	52, 53
<i>Trichosporon beigeli</i>	51

1.4. Pasożyty

Metody oparte o technikę PCR umożliwiające wykrywanie i identyfikację różnych pierwotniaków pasożytniczych są przedstawione w tabeli IV. Metody te polegają na amplifikacji sekwencji nukleotydowych specyficznych dla tych organizmów i mogą być zastosowane do badania zarówno próbek klinicznych pochodzących od człowieka (np. krwi) jak i przenosicieli pasożytów, takich jak np. komary, muchy.

Tabela IV. PCR w diagnostyce zakażeń pasożytniczych.

Pasożyt	Przykładowe piśmiennictwo
<i>Babesia bigemina</i>	31
<i>Babesia bovis</i>	29
<i>Babesia microti</i>	84
<i>Entamoeba histolytica</i>	27, 72
<i>Giardia lamblia</i>	115
<i>Leishmania</i> sp.	62
<i>Naegleria fowleri</i>	68
<i>Plasmodium falciparum</i>	3, 124
<i>Toxoplasma gondii</i>	12, 37
<i>Trichomonas vaginalis</i>	92
<i>Trypanosoma</i> sp.	67, 70

Taka analiza przynosi duże korzyści, pozwalając na identyfikację zakażonych osób szybkimi i wysoce czułymi testami, a także kontrolę obszarów geograficznych, w których bytują owady – nosiciele pasożytów (np. *Plasmodium falciparum*).

2. PCR W BADANIACH TAKSONOMICZNYCH I EPIDEMIOLOGICZNYCH

2.1. Epidemiologia zakażeń bakteryjnych

W mikrobiologii klinicznej, oprócz identyfikacji drobnoustroju, duże znaczenie ma określanie identyczności szczepów ważne szczególnie dla badań epidemiologicznych, podczas których dąży się do ustalenia źródła zakażenia, dróg przenoszenia oraz określa się identyczność szczepów. Czynniki etiologiczne jest identyfikowany w ogólnym badaniu bakteriologicznym. Do określania identyczności szczepów stosuje się typowanie fagowe, bakteriocynowe, serologiczne, antybiogram. W obrazie epidemii bardzo istotne jest ustalenie rezerwuaru zarazka, źródeł zakażenia i dróg rozprzestrzeniania się, co pozwala na identyfikację szczepów epidemicznych i endemicznych. Opracowaniu epidemii służą metody typowania, uwzględniające specyfikę szczepów i niekiedy opracowane tylko dla zdefiniowanego szczepu (np.: dla *S. aureus* MRSA (109)). Metody epidemiologicznego typowania drobnoustrojów wykorzystywane są do określenia pokrewieństwa, na różnych płaszczyznach – w czasie i przestrzeni, między izolatami w obrębie jednego gatunku. Celem metod typowania, w rzeczywistości, jest ustalenie przynależności badanych szczepów do jednego klonu, czyli określanie ich identyczności. Zgodnie z „Małym słownikiem terminów stosowanych w genetyce molekularnej” Z. Porwit-Bóbr (89), klon, to pewna liczba pojedynczych komórek, cząsteczek lub fragmentów np. DNA, pochodzących z jednej. W badaniach epidemiologicznych definicję tę należy rozumieć w ten sposób, że klony to kultury bakteryjne, niezależnie wyizolowane z różnych źródeł, w różnych miejscach i w różnym czasie (109). Ich znaczne podobieństwo pod względem cech fenotypowych sugeruje ich wspólne pochodzenie. W schemacie postępowania epidemiologicznego

należy uwzględniać tylko te cechy, których ekspresja jest jednoznaczna i czytelna, a także takie, które nie występują u zbyt dużej liczby szczepów jednego gatunku. Techniki stosowane do oznaczenia powinny być powtarzalne, tzn. dawać ten sam wynik przy wykonaniu kolejnych powtórzeń oznaczeń. Nie można jednak zapominać przy tym o możliwości wpływu środowiska (procesów toczących się w organizmie gospodarza-chorego, nosiciela lub środowiska zewnętrznego) na ekspresję badanych cech. Przy określaniu epidemiczności szczepu (klonu) istotne jest, by dla drobnoustrojów izolowanych z zakażeń udokumentować ich chorobotwórczość.

Pierwsze schematy typowania np. szczepów *S. aureus* (109), opierały się na oznaczeniach cech morfologicznych i biochemicznych, np. wytwarzaniu barwnika, aktywności lipolitycznej wobec wybranych substratów, typu wzrostu na podłożu z fioletem krystalicznym, oporności na wybrane związki organiczne itp. (109). Oznaczanie wzorów fagowych dla *S. aureus*, składające się z 23 fagów pogrupowanych w trzy grupy podstawowe i grupę fagów dodatkowych stało się podstawowym zestawem do typowania, jednak ze względów technicznych ograniczonym do stosowania w ośrodkach referencyjnych. Kolejną, tradycyjną metodą typowania jest badanie wzorów oporności na antybiotyki, często uzupełniane innymi eksperymentami. Rozwój technik elektroforetycznych i ich zastosowanie do typowania pozwolił na doskonalenie metod typowania epidemiologicznego. Wykorzystuje się wyniki rozdziału elektroforetycznego białek komórkowych, serotypowanie przy zastosowaniu techniki immunoblotingu.

Wymienione powyżej metody odnoszą się do określania cech fenotypowych badanych szczepów. Z powodu natury cech fenotypowych, wyniki tych metod nie zawsze pozwalają na wiarygodną identyfikację szczepu epidemicznego.

Rozwój genetyki umożliwił stworzenie metod analizy epidemiologicznej, opartej na badaniach DNA porównywanych szczepów (genotypowanie). Niewątpliwą zaletą tych technik jest łatwość ich zastosowania, bowiem nie potrzeba przygotowywać np. specjalnych surowic, analizowany materiał DNA jest trwały oraz można zastosować uniwersalną technikę w laboratoriach dla bardzo wielu drobnoustrojów.

Pierwsze techniki genotypowania opierały się na analizie plazmidowego DNA, polegającej na porównywaniu wzorów plazmidowych, tj. podobieństwa między izolatami na podstawie występowania w ich komórkach plazmidów o określonej wielkości, analizowanych elektroforetycznie. Ograniczenia tej techniki wynikały z możliwości utraty przez szczep plazmidowego DNA, nabycia takiego samego plazmidu przez inny szczep, możliwości detekcji plazmidu o takiej samej bądź podobnej wielkości w innych szczepach itp. Niektóre z niedogodności typowania plazmidowego zostały rozwiązane poprzez wprowadzenie analizy restrykcyjnej wyizolowanych plazmidów (RFLP).

Kolejnym krokiem w kierunku doskonalenia metod genotypowania było analizowanie chromosomalnego DNA po trawieniu enzymami restrykcyjnymi i po rozdzielaniu fragmentów metodą elektroforezy pulsowej. Analiza wzorów restrykcyjnych uzyskiwanych w elektroforezie pulsowej, uznawana jest za jeden z najlepszych systemów typowania epidemiologicznego chorobotwórczych drobnoustrojów. W wyniku tej procedury uzyskuje się czytelne, powtarzalne i łatwe do porównania wzory. Dla uproszczenia obrazu wykorzystuje się sondy molekularne do identyfikacji fragmentów zawierających określone geny. Przykładem może być metoda rybotypowania, polegająca na analogicznych zasadach, w której sonda genetyczna identyfikuje fragmenty restrykcyjne, zawierające geny kodujące rRNA.

Obserwowany w ostatnich latach rozwój techniki PCR dał impuls do konstruowania nowych systemów genotypowania bakterii.

2.2. Przykłady zastosowań techniki PCR w epidemiologii

Szerokie stosowanie techniki PCR w mikrobiologii, pozwalające zidentyfikować drobnoustroj do gatunku, a następnie różnicować szczepy w jego obrębie (przedstawione w poprzednich rozdziałach), znalazło zastosowanie również w epidemiologii zakażeń. Najdogodniejszą odmianą metody PCR w tego typu badaniach jest metoda ang.: DNA „*fingerprinting*” (DAF) (110). Technika tą można zidentyfikować szczep odpowiedzialny za dane zakażenie, określić jego źródło i drogi szerzenia (36, 110). Przykładowo zastosowano metodę „PCR fingerprinting” z dowolnymi primerami dla identyfikacji 49 szczepów *A. baumannii* izolowanych od 13 pacjentów z jednego oddziału intensywnej opieki medycznej Charité Hospital w Berlinie (36). Czterdzieści pięć szczepów wyhodowanych od 12 pacjentów reprezentowało ten sam wzór prążków powstałych w reakcji PCR, co wskazuje na epidemiologiczne powiązanie tych szczepów. Cztery szczepy reprezentowały inny wzór, co oznacza, że są to inne szczepy *A. baumannii*. Spośród wyizolowanych szczepów tego gatunku, przyczyną zakażenia szpitalnego był szczep charakteryzujący się znaczną liczbą izolatów i jednym, wspólnym wzorem „PCR fingerprinting” (36). Inni autorzy Marcos i wsp. (65) różnicowali izolaty *A. baumannii* z zastosowaniem techniki AP-PCR. Kolejnym przykładem może być identyfikacja szczepów *Clostridium difficile*, odpowiedzialnych za zakażenie szpitalne. Wykorzystano tutaj amplifikację regionu polimorficznego między genami kodującymi 16S i 23S rRNA (PCR rybotypowanie) (16). Zmodyfikowane warunki reakcji amplifikacji (obniżona temperatura dołączania primerów) pozwoliły na użycie tego układu jako typowej reakcji „PCR fingerprinting””. Znamiennym przykładem tego typu badań było wykazanie techniką RAPD *fingerprinting*, że szczepy *Helicobacter pylori* (powodujące zakażenia żołądka) wykazują dużą różnorodność genotypową w izolatach pozyskanych nawet od jednego pacjenta (110, 111).

Technika PCR staje się potencjalnym narzędziem w badaniu większości klinicznie ważnych mikroorganizmów. Rozwój metod (odmian) tej techniki pozwala na wykrywanie i typowanie drobnoustrojów (110).

2.3. Łączne użycie techniki PCR i RFLP w diagnostyce mikrobiologicznej i epidemiologii

Uzyskane produkty amplifikacji PCR można poddać trawieniu enzymami restrykcyjnymi. W metodach diagnostycznych opartych na technice PCR produkt amplifikacji można poddać analizie restrykcyjnej. W wyniku restrykcyjnego cięcia produktów PCR otrzymuje się specyficzny polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych dla badanego DNA (ang.: *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP). Końcowym efektem cięcia produktów PCR jest różnicowanie poszczególnych szczepów, zależnie od wybranego układu.

Większość sekwencji genomu bakterii, stosowanych jako regiony docelowe targety w reakcji PCR, jest znana. Uzyskany w ten sposób swoisty produkt PCR może być analizowany restrykcyjnie przez cięcie restryktazami. Wynikiem tego jest otrzymanie odcinków DNA o zdefiniowanej długości. Analiza polimorfizmu długości

fragmentów restrykcyjnych (RFLP) produktów amplifikacji daje większą swoistość niż sam produkt PCR. Połączenie obu technik (PCR i RFLP) ma zastosowanie m.in. do różnicowania blisko spokrewnionych organizmów bądź szczepów. Wybór enzymu restrykcyjnego jest podyktowany przez charakter samego produktu.

W przypadku, gdy sekwencja nukleotydowa produktu PCR nie jest znana, to częstotliwość cięć dla danego DNA jest trudna do przewidzenia. Statystycznie, w przypadku DNA z zawartością par GC około 50%, 4-nukleotydowa sekwencja rozpoznania powinna występować co 256 par zasad, 6-nukleotydowa co 4 tys. par zasad, a 8-nukleotydowa sekwencja co 65 tys. par zasad. Produkty PCR zwykle mają długość do około 2 tys. par zasad, stąd też wybór restryktaz z 4-nukleotydową sekwencją rozpoznania jest najbardziej uzasadniony. Jednak o ostatecznej, diagnostycznej przydatności danego enzymu decydują wyniki eksperymentów.

Przedstawione w tej pracy odmiany reakcji PCR, o różnych nazwach podawanych w piśmiennictwie, spowodowały ogromny nieład w nazewnictwie. Bardzo często różni autorzy odmiennie nazywają tą samą odmianę techniki PCR bądź wprowadzają dla niej kilka nazw (13, 116). Stąd należy zwracać uwagę na cel zastosowania reakcji PCR (tzn. co chcemy osiągnąć), a nie na nazewnictwo, które niestety do tej pory nie zostało uporządkowane.

3. ROZWÓJ METOD OPARTYCH NA TECHNICIE PCR W ŚRODOWISKU GDAŃSKIM

Od trzech lat w Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej projektujemy i kontrolujemy testy diagnostyczne oparte na technice PCR dla celów medycznych, weterynaryjnych i rolniczych. Współpracujemy w różnym zakresie z lokalnymi pla-

Tabela V. Testy diagnostyczne oparte na technice PCR opracowane w Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej.

Testy dignostyczne	Uwagi
<i>Zestawy gotowe</i>	
<i>Helicobacter pylori</i>	Wykrywanie obecności bakterii w biopatach żołądka i wykrywanie genu <i>cagA</i> kodującego cytotosynę
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Wykrywanie obecności bakterii w płwocinie i innych próbkach klinicznych
<i>Staphylococcus aureus</i>	Wykrywanie bakterii w różnych materiałach biologicznych oraz identyfikacja szczepów metycylinoopornych
<i>Acinetobacter</i> sp.	Określanie gatunku oraz genotypowanie
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Wykrywanie obecności bakterii w moczu
<i>Leptospira</i> sp.	Wykrywanie gatunków patogennych w moczu i we krwi
<i>Listeria monocytogenes</i>	Wykrywanie w próbkach klinicznych i produktach żywnościowych
<i>Entamoeba histolytica</i>	Wykrywanie ameb w kale
<i>Zestawy testowane</i>	
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Wykrywanie w kleszczach i próbkach klinicznych
wirus hepatitis B	Wykrywanie w surowicy
wirus hepatitis C	Wykrywanie w surowicy

cówkami medycznymi między innymi z Pracownią Bakteriologiczną PSK1 w Gdańsku, Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Lekarskiej AMG, Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni, Kliniką Chorób Zakaźnych w Gdańsku oraz szpitalem rejonowym w Wejherowie. Testy diagnostyczne przedstawione w tabeli V, opracowane i będące w trakcie przygotowywania przez Katedrę Mikrobiologii PG, są do dyspozycji dla każdej placówki pragnącej wdrożyć technikę PCR do badań diagnostycznych.

J. Kur, A. Samet, J. Juszczyk, A. Gładysz

PCR – A NEW ERA IN CLINICAL MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS AND EPIDEMIOLOGICAL STUDIES? (PART II)

SUMMARY

Examples of PCR application in identification of microorganisms and in epidemiological studies are described.

PIŚMIENNICTWO

1. *Aksamit A.J., Proper J.*: Ann. Neurol., 1991, 30, 313. – 2. *Allard A., Girones R., Juto P., Wadell G.*: J. Clin. Microbiol., 1990, 28, 2659. – 3. *Barker, R.H., Jr., Banchongaksorn T., Courval J.M., et al.*: Am. J. Trop. Med. Hyg., 1992, 46, 416. – 4. *Barski P., Piechowicz L., Galiński J., Kur, J.*: Book of Abstracts. 3rd International Students' Scientific Conference. May 11–14, 1995, 14. – 5. *Barski P., Kur, J.*: Materiały Sympozjum Naukowego pt. Choroby odzwierzęce człowieka związane z zatruciami pokarmowymi. Szczecin, 23–24. listopad 1995, 108. – 6. *Birkenmeyer L., Bringer W., Armstrong A.*: Abstr. 92 Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992, 455. – 7. *Bowman B.H.*: Clin. Immunol. Newsl., 1992, 12, 65. – 8. *Brakstad O.G., Aasbakk K., Maeland J.A.*: J. Clin. Microbiol., 1992, 30, 1654. – 9. *Brian M.J., Frosolono M., Murray B.E., et al.*: J. Clin. Microbiol., 1992, 30, 1801. – 10. *Bubert A.S., Köhler S., Goebel W.*: Appl. Environ. Microbiol., 1992, 58, 2625.
11. *Buchbinder A.S., Josephs S.F., Ablashi D., et al.*: J. Virol. Methods, 1988, 21, 191. – 12. *Burg J.L., Grover C.M., Pouletty P., Boothroyd J.C.*: J. Clin. Microbiol., 1989, 27, 1787. – 13. *Caetano-Anolle's G.*: In PCR Methods and Applications. Cold Spring Harbour Laboratory Press ISSN, 1993, 85–94. – 14. *Cao M., Xiao X., Egbert B., et al.*: J. Invest. Dermatol., 1989, 92, 391. – 15. *Carl M., Hawkins R., Coulson N., Lowe J., Robertson D.L., Nelson W.M., Titball R.W., Woody J.N.*: J. Infect. Dis., 1992, 165, 1145. – 16. *Cartwright Ch.P., Stock F., Beekmann S.E., et al.*: J. Clin. Microbiol., 1995, 33, 184. – 17. *Cha T.A., Kolberg J., Irvine B. et al.*: J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 2528. – 18. *Chadburn A., Athan E., Wiczorek J.K., Knowles D.M.*: Blood, 1991, 77, 2419. – 19. *Class H.C.J., Wagenvoort J.H.T., Niesters H.G.M., et al.*: J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 42. – 20. *Clayton C.L., Kleanthous H., Coates P.J., Morgan D.D., Tabaqchali S.*: J. Clin. Microbiol., 1992, 30, 192.
21. *Cleuziat P., Robert-Baudouy J.*: FEMS Microbiol. Lett., 1990, 60, 315. – 22. *Contorni M., Leoncini P.*: J. Virol. Methods, 1993, 41, 29. – 23. *Cotte L., Drouet E., Bissuel F., et al.*: J. Clin. Microbiol., 1993, 31, 2066. – 24. *Cristiano K., Di Bisceglie A.M., Hoofnagle J.H., et al.*: Arch. Virol. Suppl., 1992, 4, 172. – 25. *Deny P., Lecot C., Jeantils V., et al.*: J. Med. Virol., 1993, 39, 214. – 26. *Długosz D., Eis-Hubinger A.M., Klein J.P. et al.*: J. Med. Virol., 1991, 35, 136. – 27. *Edman U., Meraz M.A., Rausser S., et al.*: J. Exp. Med., 1990, 172, 879. – 28. *Eisenach K.D., Cave D.M., Rausser S., et al.*: J. Exp. Med., 1990, 172, 879. – 28. *Eisenach K.D., Cave D.M., Bates J.H.,*

Crawford J.T.: J. Inf. Dis., 1990, 161, 977. – 29. *Fahrimal Y.W., Goff W.L., Jasmer D.P.*: J. Clin. Microbiol., 1992, 30, 1374. – 30. *Fenner T.E., Garweg J., Hufert F.T., et al.*: J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 2621.

31. *Figueroa J.V., Chieves L.P., Johnson G.S., Buening G.M.*: J. Clin. Microbiol., 1992, 30, 2576. – 32. *Glare E.M., Paton J.C., Premier R.R., Lawrence A.J., Nisbet I.T.*: J. Clin. Microbiol., 1990, 28, 1982. – 33. *Goodman J.L., Jurkovich J.L., Kramber J.M., Johnson C.V.*: Infect. Immun., 1991, 59, 269. – 34. *Gopalkrishna V., Francis A., Sharma J.K., et al.*: J. Virol. Methods, 1992, 36, 63. – 35. *Gozlan J., Salord J.M., Chouaid C., et al.*: J. Clin. Microbiol., 1993, 31, 1943. – 36. *Grasser Y., Klare I., Halle E., Gantenberg R., Buchholz P.*: J. Clin. Microbiol., 1993, 31, 2417. – 37. *Grover C.M., Thulliez P., Remington J.S., Boothroyd J.C.*: J. Clin. Microbiol., 1990, 28, 2297. – 38. *Halissos A., Chomel J.C., Grandjouan S., et al.*: Nucleic Acid Res., 1989, 17, 8093. – 39. *Hartskeeri R.A., De Wit M.Y.L., Liatsier P.R.*: J. Gen. Microbiol., 1989, 135, 2357. – 40. *Hinnebusch J., Schwan T.G.*: J. Clin. Microbiol., 1993, 31, 1437.

41. *Holland S.M., Gaydos C.A., Quinn T.C., et al.*: J. Infect. Dis., 1990, 162, 984. – 42. *Hookey J.V.*: FEMS Microbiol. Lett., 1992, 69, 267. – 43. *Houard J.V., Hackel C., Herzog A., Bollen A.*: Res. Microbiol., 1989, 140, 477. – 44. *Ibrahim A., Liesack W., Stackebrandt E.*: J. Clin. Microbiol., 1992, 30, 1942. – 45. *Jansen R.W., Siegl G., Lemon S.M.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 2867. – 46. *Jaton K., Sahli R., Bille J.*: J. Clin. Microbiol., 1992, 30, 1931. – 47. *Juszczyk J.*: Hepatitis B, Warszawa 1995, 41. – 48. *Juszczyk J.*: Hepatitis C, Warszawa 1994, 62. – 49. *Kaneko S., Miller R.H., Di Bisceglie A.M., et al.*: Gastroenterology, 1990, 99, 799. – 50. *Kato N., Ou C.Y., Kato H., et al.*: J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 33.

51. *Kemker B.J., Lechmann P.F., Lee J.W., Walsh T.J.*: J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 1677. – 52. *Kitada K., Oka S., Kimura S., et al.*: J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 1985. – 53. *Kitada K., Oka S., Kimura S., et al.*: J. Protozool., 1991, 38, 90. – 54. *Koch W.C., Adler S.P.*: J. Clin. Microbiol., 1990, 28, 65. – 55. *Kotłowski R., Sachadyn P., Kur J.*: Materiały XXVI Sesji Naukowej Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN. Łódź, 12–13 wrzesień 1995, 292. – 56. *Kotłowski R., Kur J.*: Materiały Sympozjum Naukowego pt. Choroby odzwierzęce człowieka związane z zatruciami pokarmowymi. Szczecin, 23–24 listopad 1995, 107. – 57. *Kristiansen B.E., Ask E., Jenkins A., et al.*: Lancet, 1991, 337, 1568. – 58. *Kuhl S.J., Tang Y.I., Navarro L., et al.*: Clin. Infect. Dis., 1993, 4, 234. – 59. *Kur J., Burkiewicz A., Zabłocka A., Gospodarek E.*: Acta Microbiol. Polon., 1995, 44, 111. – 60. *Lampel K.A., Jagow J.A., Trucksess, et al.*: Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56, 1536.

61. *Lecot C., Jeantils V., Ovaguimian L., et al.*: Proc. Clin. Biol. Res., 1993, 382, 329. – 62. *Lopez M., Inga R., Cangalaya M., et al.*: Am. J. Trop. Med. Hyg., 1993, 49, 348. – 63. *Lucotte G., Petit M.-Ch., Francoic M.-H., Réveilleau S.*: Mol. and Cell. Probes, 1992, 6, 89. – 64. *Malloy D.C., Nauman R.K., Paxton H.*: J. Clin. Microbiol., 1990, 28, 1089. – 65. *Marcos J.V.A., Llovet T., Coll T., Jimenez de Anta T.*: J. Med. Microbiol., 1994, 41, 244. – 66. *Margall N., Matias-Guiu X., Chillón M., et al.*: J. Clin. Microbiol., 1993, 31, 924. – 67. *Masiga D.K., Smyth A.J.,*

Hayes P., et al.: Int. J. Parasitol., 1992, 22, 909. – 68. *McLaughlin G.L., Vodkin M.H., Huizinga H.W.*: J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 227. – 69. *Miyakawa Y., Mabuchi T., Kagaya K., Fukazawa Y.*: J. Clin. Microbiol., 1992, 30, 894. – 70. *Moser D.R., Cook G.A., Ochs D.E., et al.*: Parasitology, 1989, 99, 57.

71. *Murakawa G.J., Zaia J.A., Spallone P.A., et al.*: DNA, 1988, 7, 287. – 72. *Myjak P., Kur J.*: European Conference on Tropical Medicine, Hamburg, Germany, 22–26 October 1995, 120. – 73. *Norgard M.V., Radolf J.D.*: J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 62. – 74. *Nowak A., Gospodarek E., Kur J.*: Med. Dośw. Mikrobiol., 1993, 45, 469. – 75. *Nowak A., Burkiewicz A., Kur J.*: FEMS Microbiol. Lett., 1995, 126, 181. – 76. *Nowak A., Kur J., Burkiewicz A., Gospodarek E.*: 3rd International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*. Edynburgh, Scotland, 14th–16th September 1994, 6. – 77. *Nowak A., Kur J.*: FEMS Microbiol. Lett., 1995, 130, 327. – 78. *Nowak A., Kur J.*: Przyjęte do Mol. Cell. Probes. – 79. *Olive D.M.*: J. Clin. Microbiol., 1989, 27, 261. – 80. *Pallen M.J.*: J. Clin. Pathol., 1991, 44, 1025.

81. Perrin L.H., Yerly S., Adami N., et al.: *Blood*, 1990, 76, 641. – 82. Persing D.H., Telford III S.R., Rys N., et al.: *Science*, 1990, 249, 1420. – 83. Persing D.H., Telford III S.R., Spielman A., Barthold S.W.: *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28, 566. – 84. Persing D.H., Mathiesen D., Marshall W.F., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30, 2097. – 85. Piatak M., Luk K.C., Williams B., et al.: *Biotechniques*, 1993, 14, 70. – 86. Pladzyk R., Kur J., Szychlińska I, et al.: *Book of Abstracts. 3rd International Students' Scientific Conference. May 11–14, 1995*, 48. – 87. Pollard D.R., Johnson W.M., Lior H., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28, 2477. – 88. Portnoy D.A., Charkraborty T., Goebel W., Cossart P.: *Inf. Immunity*, 1992, 60, 1263. – 89. Porwit-Bóbr Z.: *Mały Słownik terminów stosowanych w genetyce molekularnej*. Wyd. Księgarni Akademickiej, Kraków, 1992. – 90. Rahn K., De Grandis S.A., Clarke R.C., et al.: *Mol. Cell. Probes*, 1992, 4, 271.
91. Ratti G., Moroni A., Cevenini, et al.: *J. Clin. Pathol.*, 1992, 45, 92. – 92. Riley D.E., Roberts M.C., Takayama T., Krieger J.N.: *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30, 465. – 93. Rosa P.A., Schwan T.G.: *J. Infect. Dis.*, 1989, 160, 1018. – 94. Roibart H.A.: *Clin. Microbiol. Rev.*, 1991, 4, 156. – 95. Rudin C., Senn H.P., Berger R., et al.: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1991, 10, 146. – 96. Sachadyn P., Kur J.: *Basic and Clinical Aspects of Helicobacter pylori infection*. *J. Physiol. Pharmacol.*, 1995, 46, 66. – 97. Saito I., Serenius B., Campton T., et al.: *J. Exp. Med.*, 1989, 169, 2191. – 98. Schiffman M.H., Bauer H.M., Lorincz A.T., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29, 573. – 99. Shibata H., Yamashita K., Otsuka N., et al.: *Kansenshogaku Zasshi*, 1993, 67, 609. – 100. Shirai H., Nishibuchi M., Ramamurthy T., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29, 2517.
101. Sirois M., Lemire E.G., Levesque R.C.: *J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29, 1183. – 102. Sjobring U., Mecklenburg M., Anderson A.B., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28, 2200. – 103. Skov J.J., Uldum S.A., Sondergard-Anderson J., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29, 46. – 104. Sritharan V., Iralu J.V., Barker Jr. R.H.: *Mol. Cel. Probes*, 1995, 9, 71. – 105. Szychlińska I., Galiński J., Pladzyk R., Kur J., et al.: *Basic and Clinical Aspects of Helicobacter pylori infection*. *J. Physiol. Pharmacol.*, 1995, 46, 73. – 106. Stanier P., Kitchen A.D., Taylor D.L., et al.: *Mol. Cell. Probes*, 1992, 6, 51. – 107. Starnbach M.N., Falkow S., Tompkins L.S.: *J. Clin. Microbiol.*, 1989, 27, 1257. – 108. Thierry D., Matsiota-Bernard P., Nauciel C., Guesdon J.L.: *Mol. Cel. Probes*, 1994, 8, 469. – 109. Trzciński K., Hryniewicz W.: *Mikrobiologia Medycyna*, 1995, 2/3, 12. – 110. van Belkum A.: *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994, 7, 174.
111. van Belkum A., Duim B., Regelink A., et al.: *J. Med. Microbiol.*, 1994, 41, 63. – 112. van Ketel R.J., de Wever B., van Alphen L.: *J. Med. Microbiol.*, 1990, 33, 271. – 113. Vilgalys R., Hester M.: *J. Bacteriol.*, 1990, 172, 4238. – 114. Webb L., Carl M., Malloy D.C., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28, 530. – 115. Weiss J.B., van Keulen H., Nash T.E.: *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992, 54, 73. – 116. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V.: *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18, 6531. – 117. Williamson J., Marmion B.P., Worswick D.A., et al.: *Epidemiol. Infect.*, 1992, 109, 519. – 118. Willoughby J.J., Russell W.C., Thirkell D., Burdon M.G.: *Infect. Immun.*, 1991, 59, 2692. – 119. Witkowska M., Kocik T., Burkiewicz A., Kur J.: *Book of Abstracts. 3rd International Students' Scientific Conference. May 11–14, 1995*, 59. – 120. Witkowska M., Kocik T., Kur J.: *Materiały Sympozjum Naukowego pt. Choroby odzwierzęce człowieka związane z zatruciami pokarmowymi*. Szczecin, 23–24. listopad 1995, 109.
121. Wolf D.G., Sector S.A.: *Transplantation*, 1993, 56, 330. – 122. Wren B.W., Tabaqchali S.: *Lancet*, 1990, 336, 693. – 123. Zhang W., Evans D.H.: *J. Virol. Methods*, 1991, 33, 165. – 124. Zolig J.W., Chen G.X., Plitt J.R.: *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1990, 39, 257.

Adres: Katedra Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej,
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk