

## **WYBRANE MOLEKULARNE METODY IDENTYFIKACJI MIKROORGANIZMÓW W KOLEKCJACH KULTUR DROBNOUSTROJÓW**

**Ewelina Jaroszewska, Anna Misiewicz**

Institut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego  
Zakład Mikrobiologii  
Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa  
ewelina.jaroszewska@ibprs.pl

### **Streszczenie**

Szybko postępujący rozwój metod biologii molekularnej przyczynia się do usprawnienia procesu identyfikacji mikroorganizmów. Ma to duże znaczenie w kolekcjach kultur drobnoustrojów, ponieważ możliwość dokładnego i szybkiego rozpoznawania drobnoustrojów jest dla nich kluczowa. Podstawy identyfikacji molekularnej, polegające na sekwencjonowaniu genów 16S rRNA, opracował Carl Woese. W ostatnich kilku latach dzięki wykorzystaniu jego odkryć opracowano metody pozwalające na dokładną i rutynową identyfikację drobnoustrojów. Metoda PCR/ESI-MS stanowi połączenie reakcji PCR genów, m.in. 16S rRNA, i spektroskopii masowej, a technika MALDI-TOF/MS wykorzystuje spektroskopię masową do określania profili białkowych drobnoustrojów. Obie techniki w najbliższym czasie mogą stać się podstawą pracy w laboratorium mikrobiologicznym.

**Słowa kluczowe:** identyfikacja mikroorganizmów, 16S rDNA, MALDI-TOF/MS, PCR/ESI-MS

### **NEW MOLECULAR METHODS FOR IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS USED IN MICROBIAL CULTURES COLLECTIONS**

#### **Summary**

Quickly advancing progress in the field of molecular biology methods contributes to the improvement of the process of microorganisms identification. This new developments are important in work in the microbial cultures collections, since the possibility of a thorough and rapid detection of microorganisms in them is crucial. Basic molecular method of identification by sequencing 16S rRNA genes has been established by Carl Woese. And in the last few years with the use of discoveries such his, methods, which give hope for accurate and routine identification of microorganisms, have been developing. PCR/ESI-MS is a combination of

PCR reactions of for example 16S rRNA genes and mass spectroscopy, and MALDI-TOF/MS uses mass spectroscopy to obtain protein profiles of microorganisms. Both techniques in the near future may rise to basic procedures in the microbiological laboratory.

**Key words:** identification of microorganisms, 16S rDNA, MALDI-TOF/MS, PCR/ESI-MS)

## **WSTĘP**

Tradycyjne metody identyfikacji mikroorganizmów, polegające na charakterystyce fenotypowej, są długotrwałe, wymagają dużego nakładu pracy i nie są tak dokładne jak metody analizy molekularnej. Dlatego też usprawnienie procesu identyfikacji, możliwe dzięki odkryciom naukowym – w szczególności związanym z pracą z DNA, jest bardzo pożądane, a postęp w tej dziedzinie zachodzi w bardzo szybkim tempie. Poniżej zaprezentowano przegląd nowych metod, rozpoczynając od przełomowej techniki zastosowanej przez Carla Woese i wsp., która doprowadziła do przeorganizowania i uporządkowania taksonomii całego świata żywego [Woese i in. 1977]. Następnie przedstawiono metody, które umożliwiają szybką i precyzyjną identyfikację bakterii dzięki wykorzystaniu ostatnich odkryć w dziedzinie biologii i usprawnień w technice spektroskopii masowej. Są one stosowane dopiero od kilku lat. PCR/ESI-MS stanowi połączenie reakcji PCR genów, m.in. 16S rRNA, i spektroskopii masowej, a MALDI-TOF/MS wykorzystuje spektroskopię masową do badania profili białkowych drobnoustrojów. W wielu laboratoriach prowadzi się badania z wykorzystaniem tych technik w celu zautomatyzowania pracy i przewiduje się, że w najbliższym czasie mogą one stanowić podstawę pracy w laboratorium mikrobiologicznym.

### **1. Sekwencjonowanie i porównywanie DNA genów rybosomalnych**

Gen 16S rRNA jest powszechnie wykorzystywany w mikrobiologii do badań filogenetycznych, ponieważ należy do grupy genów konserwatywnych ewolucyjnie, występujących u wszystkich gatunków bakterii. Pionierami wykorzystania tego genu, obejmującego 1500 par zasad, byli Carl Woese i George E. Fox. Gen ten jest przydatny do identyfikacji, ponieważ składa się z fragmentów DNA silnie konserwatywnych, na których projektuje się startery, oraz sekwencji zmiennych, które są charakterystyczne dla danego gatunku. Porównując sekwencje rejonów zmiennych ze wzorami znajdującymi się w bazie, można wyróżnić poszczególne gatunki. Z upływem czasu uzupełniano zasoby bazy o kolejne sekwencje 16S rDNA, co doprowadziło do odkrycia nowych grup taksonomicznych [Hugenholtz i in. 1998]. Sekwencjonowanie genu 16S rRNA pozwala odkrywać i opisywać gatunki, których środowisko życia jest niemożliwe do odtworzenia w warunkach

laboratoryjnych.

Powielanie sekwencji 16S rRNA można przeprowadzić z użyciem różnych starterów zwanych starterami uniwersalnymi. Startery te umożliwiają amplifikację całego genu 16S rRNA lub kolejnych krótszych fragmentów genu, które następnie łączy się w całość. Przez ostatnie 25 lat opracowano wiele starterów do amplifikacji rDNA [Baker i in. 2003]. Najbardziej popularną parę starterów opisali Weisburg i in. (1991) jako 27F and 1492R. Produkt reakcji z wykorzystaniem powyższych starterów składa się z około 1500 par zasad. Natomiast stosując parę starterów 27F-534R, otrzymuje się krótsze amplikony (o długości 500 pz, wygodniejsze do jednorazowych odczytów z sekwencjonowania).

Z czasem okazało się, że startery komplementarne do regionów konserwatywnych u grup mikroorganizmów w pierwotnym uniwersalnym drzewie filogenetycznym nie są komplementarne do analogicznych regionów u wszystkich grup mikroorganizmów. Na przykład nie da się powielić 16S rDNA archeonów *Nanoarchaeum* za pomocą standardowych, uniwersalnych starterów [Huber i in. 2002]. Dlatego zaprojektowano startery specyficzne dla taksonu. Obecnie uważa się, że żaden starter, uważany do tej pory za uniwersalny, nie gwarantuje amplifikacji u wszystkich prokariotów i dlatego nie stosuje się jednego zestawu starterów [Baker i in. 2003]. Ponieważ coraz więcej gatunków identyfikowanych jest na podstawie niewielkiej części genomu i tylko kilku cech fenotypowych, a minimalne różnice w 16S rDNA występują powszechnie, nawet w obrębie tego samego gatunku, w celu zmniejszenia ilości błędów zaleca się wykorzystywanie do identyfikacji kilku reakcji z różnymi zestawami starterów [Baker i in. 2003]. Można wykorzystać równolegle inne geny o konserwatywnej ewolucyjnie sekwencji, jak np. gen *rpoB* – kodujący podjednostkę polimerazy RNA [Adekambi i in. 2009], *hsp65* – kodujący białko szoku termicznego [Ringuet i in. 1999] lub *recA* – kodujący wielofunkcyjne białko biorące m.in. udział w naprawie DNA [Blackwood i in. 2000].

Pomimo precyzji techniki sekwencjonowania 16S rDNA jej stosowanie w dużych i referencyjnych laboratoriach nie upowszechniło się z powodu wysokich wymagań technicznych i kosztów, mimo że dostępny jest komercyjny test oparty na tej technice – MicroSeq (Applied Biosystem). Użytkownicy, wyrażając pozytywne opinie na temat specyficzności i dokładności identyfikacji tym testem, zwracają jednocześnie uwagę na duże wymagania techniczne, nakład pracy manualnej (izolacja DNA, reakcja PCR, oczyszczanie prób) i koszty związane z korzystaniem z tego rozwiązania [Cloud i in. 2002].

Stosowanie tej techniki ograniczone jest do oznaczania jednego gatunku mikroorganizmu

w próbce (izolatów). Kommedal i in. (2011) podjęli prace nad usprawnieniem metody, w których wykorzystali zestaw trzech par starterów przeznaczonych do identyfikacji bakterii w próbkach zawierających mieszaninę mikroorganizmów. Każdą parę starterów przeznaczono dla innej grupy mikroorganizmów. Po analizie próbek zawierających więcej niż jeden gatunek z tej samej grupy mikroorganizmów (DNA było powielane tą samą parą starterów) lub z różnych grup mikroorganizmów (DNA było powielane różnymi parami starterów) otrzymywano kilka nakładających się chromatogramów. Wyniki analizowano za pomocą specjalnie zaprojektowanej aplikacji RipSeq Mixed (iSentio, Norway), która interpretuje nakładające się chromatogramy pochodzące z trzech różnych gatunków.

Aby technika ta mogła być stosowana rutynowo w laboratoriach mikrobiologicznych, konieczne jest jednakże jej udoskonalenie poprzez automatyzację procesu i zmniejszenie kosztów.

## **2. MALDI-TOF/MS – spektrometria masowa z jonizacją laserem wspomagana matrycą i z analizatorem czasu przelotu**

Spektrometria masowa – technika, w której rozdział jest warunkowany różnicami w stosunku ładunku do masy cząsteczki, została po raz pierwszy opisana w 1912 roku. Technika ta stała się bardzo użyteczna do identyfikacji, określania ilości i detekcji małych cząsteczek chemicznych. Jednakże dopiero po odkryciu w 1998 roku jonizacji laserem wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) możliwy stał się rozdział dużych biomolekuł – dzięki krystalicznej matrycy, najczęściej składającej się z kwasów organicznych absorbujących światło UV.

Wykorzystując tę technikę do identyfikacji mikroorganizmów, traktujemy je jako mieszaninę biomolekuł, które zostają zapisane w postaci widma różnorodnych białek. Widmo stanowi rodzaj „odcisku palca” charakterystycznego dla danego organizmu, niezmiennego w kolejnych analizach. Nie ulega ono również zmianie pod wpływem różnych warunków hodowli organizmu, ponieważ badany zakres białek od 2–20 kDa obejmuje w większości białka rybosomalne, które ulegają konstytutywnej ekspresji w dużej ilości. Proces identyfikacji polega na pobraniu kolonii, następnie na jej krystalizacji i poddaniu działaniu lasera. Otrzymane widma masowe MALDI/TOF są analizowane przez program i porównywane z widmami referencyjnymi przechowywanymi w bazie. Ogromną zaletą przedstawionej techniki jest proste i szybkie wykonanie analizy. Przeprowadzone do tej pory doświadczenia wykazują, że MALDI/TOF jest odpowiednią i dokładną metodą do

identyfikacji bakterii [Bizzini. i in. 2010, Cherkaoui i in. 2010]. Identyfikacja drożdży również przynosi dobre rezultaty. Natomiast identyfikacja grzybów strzępkowych jest cały czas udoskonalana i daje duże nadzieje na przyszłość [Vermeulen i in. 2012].

System zaprojektowany przez firmę Bruker Daltonics pozwala identyfikować bezpośrednio kolonię lub w przypadku niektórych mikroorganizmów wymaga ekstrakcji. Bezpośrednia identyfikacja polega na pobraniu kolonii z szalki, wykonaniu rozmazu na płytce, dodaniu matrycy, czyli np. kwasu alfa-cyjano-4-hydroksycynamonowego rozpuszczonego w acetonitrylu, wysuszeniu, a następnie poddaniu analizie w spektrometrze masowym. Metodą tą można wykonać 24 analiz w ciągu godziny. Procedura ekstrakcji wymaga kilku etapów przygotowania kolonii, po czym próbka poddawana jest działaniu jonów i cząsteczki, w tym przypadku białka ulegają jonizacji, rozdzielaniu na podstawie współczynnika ładunku do masy oraz detekcji. Po detekcji tworzone jest widmo masowe, które porównuje się z widmami znajdującymi się w bazie.

W klinice Mayo w Minnesocie poddano analizie 305 izolatów należących do rodzajów: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Rothia*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Granulicatella*, *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Macroccoccus*, *Kocuria*, *Helcococcus*, *Arthrobacter*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Facklamia*. Wyniki były porównywane z testami fenotypowymi i z sekwencjonowaniem części genu 16S rRNA. Po procesie ekstrakcji udało się zidentyfikować 95% szczepów co do rodzaju, a 69% co do gatunku. Szczepy identyfikowane bezpośrednio z kolonii zostały zidentyfikowane w 56% co do rodzaju i w 20% co do gatunku [Patel 2012].

Seng i in. (2009) ocenili zastosowanie tej techniki do rutynowych badań izolatów klinicznych. Wykorzystali 1600 izolatów, które identyfikowali w spektrometrze masowym Autoflex II Bruker Daltonik. Profile białkowe porównywali z bazą Bruker bioTyper, wersja 2.0. Wyniki identyfikacji odnieśli do wyników otrzymanych konwencjonalnymi metodami fenotypowymi, a rozbieżności rozstrzygali za pomocą identyfikacji przez sekwencjonowanie genu 16S rRNA i *rpoB*. 95,4% analizowanych izolatów zostało prawidłowo zidentyfikowanych, z czego 84,1% zidentyfikowano z dokładnością do gatunku, a 11,3% z dokładnością do rodzaju.

Błędy w identyfikacji lub jej brak najczęściej spowodowane były brakiem profilu białkowego danego gatunku w bazie lub gdy dysponowano małą liczbą profili referencyjnych. Optymalne warunki identyfikacji uzyskiwano, jeśli w bazie znajdowało się 10 profili referencyjnych dla danej próbki. Do dobrej identyfikacji za pomocą MALDI-TOF konieczna jest kompletna baza danych. Technikę tę można zastosować również do odróżniania

szczepów antybiotykoopornych. *S.aureus* metycylinooporny różni się od *S.aureus* podatnego na metycylinę spektrum masowym o wielkości 500–3500 Da. W podobny sposób można odróżnić szczep *E.coli* oporny na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe od szczepów wrażliwych na te związki. Ponadto techniką MALDI-TOF można rozróżniać serotypy *Salmonella* i charakteryzować szczepy *Helicobacter pylori* [Nilson 1999; Park i in. 2006]. Średni czas niezbędny do identyfikacji jednego izolatu omawianą metodą to 6 minut, a koszt oznaczenia to 22–32% kosztów metod identyfikacji aktualnie stosowanych [Seng i in. 2009].

### **3. PCR/ESI-MS – PCR połączony ze spektrometrią masową z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym**

Jest to kolejna metoda identyfikacji mikroorganizmów wykorzystująca kombinację technik biologii molekularnej i spektrometrię masową. ESI-MS (Electrospray Ionisation Mass Spectrometry) polega na oznaczeniu mas amplikonów powstałych w kilkunastu reakcjach PCR, których celem jest amplifikacja różnych fragmentów genomu. Dzięki wykorzystaniu do analizy wielu genów możliwe jest uchwycenie różnic między gatunkami mikroorganizmów nawet blisko spokrewnionymi.

Do PCR stosowanych jest wiele par starterów: startery specyficzne dla całych grup mikroorganizmów (amplifikujące regiony zmienne pomiędzy gatunkami i szczepami), startery specyficzne dla gatunku lub szczepu oraz startery, których celem są geny oporności na antybiotyki albo geny odpowiedzialne za patogenność. Po otrzymaniu produktów PCR za pomocą ESI-MS oznaczane są masy molekularne otrzymanych fragmentów DNA. Masa molekularna oznaczana jest dla obu nici amplikonu (forward i reverse), a następnie korelowana ze składem poszczególnych zasad w amplikonie. Pomiar masy molekularnej możliwy jest z bardzo dużą dokładnością, dzięki wewnętrznej kalibracji, jaką uzyskuje się wskutek odwróconej komplementarności materiału genetycznego. Wyniki oznaczeń mas molekularnych amplikonów, a co za tym idzie składu ilościowego zasad amplikonu, dla kilkunastu genów ułożone tandemowo stanowią specyficzny dla danego gatunku kod – „odcisk palca”, który porównuje się z wynikami przechowywanymi w bazie.

Analizy wykorzystujące tę technikę przeprowadzono na próbkach krwi podejrzanych o zakażenie mieszaniną drobnoustrojów. Do tego celu użyto testu BAC (Abbott Molecular) składającego się z 16 par starterów powielających regiony DNA rybosomalnego, geny oporności na antybiotyki i geny specyficzne dla poszczególnych grup bakterii. Wyniki porównywano z otrzymanymi za pomocą testów Vitek 2 (bioMérieux). Stwierdzono zgodność na poziomie 98,7% co do rodzaju i 96,6% co do gatunku. W 29 próbkach wykryto mieszaniny

mikroorganizmów zawierające gatunki bakterii należących do tego samego rodzaju, jak również zawierające bakterie Gram-ujemne razem z bakteriami Gram-dodatnimi. Ukazuje to możliwości PCR/ESI-MS do jednoczesnej identyfikacji wielu organizmów w próbce bez potrzeby uzyskania oddzielnych kultur drobnoustrojów. Czas wykonania oznaczenia wynosił 5-6 godzin [Kaleta i in. 2011a].

W dalszych badaniach [Kaleta i in. 2011b] porównano technikę MALDI/TOF i PCR/ESI-MS w identyfikacji mikrobiologicznej próbek krwi. Stosując te techniki, otrzymano podobne wyniki pod względem dokładności identyfikacji. Przewagą techniki MALDI/TOF okazały się niskie koszty analizy, pełna automatyzacja i krótki czas potrzebny do nauki obsługi. Ponadto MALDI/TOF pozwala na oznaczenie pojedynczych prób, podczas gdy stosując PCR/ESI-MS, analizuje się jednorazowo najmniej 6 prób w 96-dółkowych płytkach (po 16 reakcji na jedno oznaczenie). Oprócz wymienionych zalet, MALDI/TOF ma pewne ograniczenia. Wymaga etapu izolacji czystych kultur, który wydłuża czas potrzebny do otrzymania ostatecznych wyników. Wynika to z faktu, iż nie ma możliwości identyfikacji mikroorganizmów w kulturach mieszanych i przy mniejszej ilości CFU niż  $10^4$ - $10^5$ . Biorąc pod uwagę zbliżoną dokładność obu technik, ich wady i zalety oraz przydatność zastosowania w odmiennych przypadkach, należy przypuszczać, że każda z nich odnajdzie własną niszę wśród narzędzi do szybkiej identyfikacji mikroorganizmów.

## PIŚMIENNICTWO

1. Adekambi T. i in. (2009). The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologist. Trends Microbiol., 17, 37-45
2. Baker G. i in. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. J. Microbiol. Meth., 55, 541-555
3. Blackwood K.S. i in. (2000). Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. J. Clin. Microbiol., 38, 2846-2852
4. Bizzini A. i in. (2010). Performance of matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J.Clin. Microbiol., 48, 1529-54
5. Cherkaoui A. i in. (2010). Comparison of two matrix – assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. J. Clin. Microbiol., 48, 1169-75
6. Cloud J.L. i in. (2002). Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. J. Clin. Microbiol., 40, 400-406
7. Huber H. i in. (2002). A New phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. Nature, 417, 63-67

8. Hugenholtz P. i in. (1998). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.*, 180, 366-376
9. Kaleta E.J. i in. (2011a). Use of PCR Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Rapid Identification of Bacterial and Yeast Bloodstream Pathogens from Blood Culture. *J. Clin. Microbiol.*, 49 (1), 345-353
10. Kaleta E.J. i in. (2011b). Comparative Analysis of PCR-Electrospray Ionization/Mass Spectrometry [MS] and MALDI-TOF/MS for the Identification of Bacteria and Yeast from Positive Blood Culture Bottles. *Clin. Chem.*, 57, 1057-1067
11. Kommedal Ø. i in. (2011). Characterization of polybacterial clinical samples using a set of group-specific broad-range primers targeting the 16S rRNA gene followed by DNA sequencing and RipSeq analysis. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 927-936
12. Nilson C.L. (1999). Fingerprinting of *Helicobacter pylori* strains by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 13, 1067-1071
13. Park J.W. i in. (2006). Quantitative analysis of representative proteome components and clustering of *Helicobacter pylori* clinical strains. *Helicobacter*, 11, 533-543
14. Patel R. (2012). Bacterial identification Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. <http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/hottopics/transcripts/2012/02-bact-id/index.html>
15. Ringuet H. i in. (1999). *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 852-857
16. Seng O. i in. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical infectious Diseases*, 49, 543-551
17. Vermeulen E. i in. (2012). Update on the evolving role of MALDI-TOF MS for laboratory diagnosis of fungal infections. *Adv. Diag. Inv. Fungal Inf.*, 6, 206-214
18. Weisburg W.G. i in. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173 (2), 697-703
19. Woese C.R. i in. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (11), 5088-5090