

Opšti pregledi/
General reviews

PRIMENA MOLEKULARNIH METODA
U TIPIZACIJI MIKROORGANIZAMA

Correspondence to:

Dr sc. med. Zorica Lešanović, Molekularni
biolog Vojnomedicinske akademije, Viši naučni
saradnik Medicinskog fakulteta u Beogradu i
Vojno medicinske akademije,

Zorica Lepšanović

e-mail: zorilep@eunet.rs

Ključne reči/Key words

isolate of microorganism, outbreak, typing
methods

Abstract

Molecular typing is the means by which the epidemiologist is provided with the ability to discriminate between multiple isolates of microorganisms of the same species. It is important for tracking and blocking nosocomial outbreaks of infections, to identify the source of infection and the route of transmission, and also for the identification of clones that are extremely important in human disease. Many phenotypic and genotypic methods for typing of all clinically relevant bacterial species are available. Typing methods need to be reproducible, and data interpretation and communication between laboratories should be easy. At present, the PFGE represent the standard for many microbial species, but sequence-based strategies will prevail in near future.

UVOD

Unutar populacije mikroorganizama koji pripadaju istoj vrsti postoji fenotipska i genotipska varijabilnost koja je kod nekih vrsta više izražena, a kod nekih manje. Primenom molekularnih metoda tipizacije dobijaju se profili specifični za izolat, a na osnovu njih se određuje epidemiološka srodnost izolata. Metode tipizacije dizajnirane su tako da optimizuju diskriminaciju između srodnih i nesrodnih izolata, tako da oni koji potiču od istog klona imaju sličnije karaktere nego sojevi koji nisu srodni.

Mogućnost da se uoče razlike između pojedinih izolata bitna je za nekoliko disciplina u ispitivanju mikroorganizama: taksonomiju, ispitivanje mehanizama evolucije i filogenetskih odnosa, populacionu genetiku mikroorganizama i epidemiologiju mikroorganizama¹.

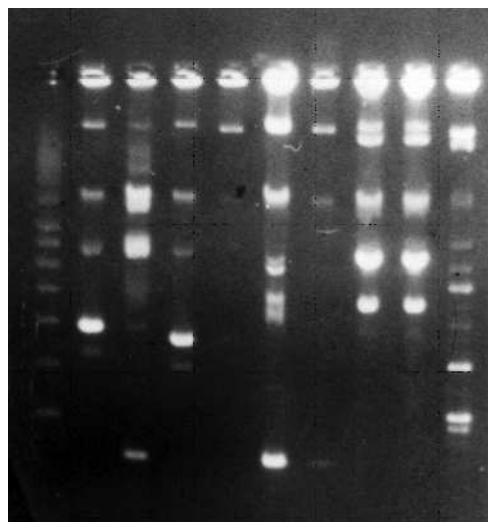
Primenom metoda tipizacije dobijaju se informacije korisne za epidemiološki nadzor nad infektivnim oboljenjima. Pojava samo dva izolata sa sličnim tipom predstavlja upozorenje da može doći do izbijanja epidemije i da treba preduzeti mere da se to spreči². Kada se pojavi epidemija, metode tipizacije pomažu da se identifikuje izvor ili izvori infekcije kao i put prenošenja. Pravilno primenjena tipizacija povećava efikasnost kontrolnih mera čiji je cilj zaustavljanje epidemije. Tipizacija pomaže i da se razjasni napredovanje infekcije kod jednog bolesnika. Primer je razlikovanje između egzogenih i endogenih infekcija³ i razlikovanje virulentnih od nevirulentnih sojeva. U oba slučaja tipizacija doprinosi pravilnom odabiru terapije.

METODE TIPIZACIJE

Procedure tipizacije su specifične za različite fenotipske ili genotipske parametre. Fenotipske metode koje se najčešće primenjuju su: osetljivost na antimikrobna sredstva, biotipizacija, serotipizacija, fagotipizacija, elektroforeza

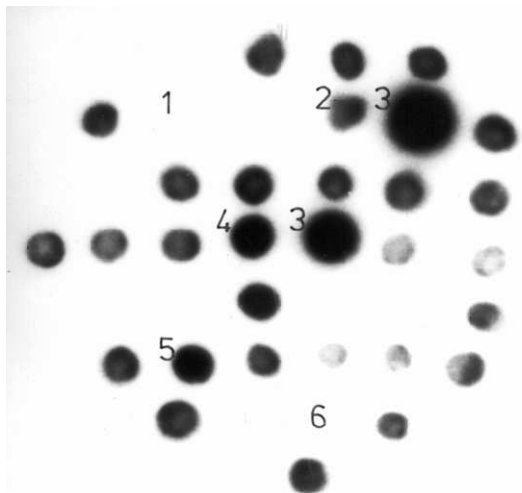
proteina na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE), elektroforeza multilokus-enzima (MLEE). Promene uslova sredine dosta utiču na promene u ekspresiji gena, time i na promene fenotipa, pa većina ovih metoda nema dobru reproducibilnost i teško ih je standardizovati. Po nekim kriterijumima za evaluaciju i validaciju metoda tipizacije, kao što su stabilnost markera, reproducibilnost i mogućnost tipizacije, SDS-PAGE i MLEE su približne genotipskim metodama.

Genotipske metode tipizacije mogu se grupisati u metode hibridizacije (DNK hibridizacija, ribotipizacija i Array hibridizacija), metode bazirane na detekciji fragmenata (plazmidski profil, RFLP - polimorfizam restrikcionih fragmenata, PFGE - gel elektroforeza u pulsirajućem polju, PCR tipizacija, VNTR - razlika u broju ponovljenih blokova identičnih sekvenci) i metode bazirane na sekvenciranju (SLST - sekvenciranje jednog lokusa i MLST - sekvenciranje više lokusa). Osim navedenih, postoje i brojne modifikacije kao i kombinacije ovih metoda koje se koriste u specifičnim slučajevima.



Slika 1. Plazmidski profil sojeva enterohemoragične *E. coli*.

Plazmidski profil označava broj i molekulska težinu plazmida prisutnih u bakterijskoj ćeliji⁴. Može se koristiti za tipizaciju mnogih vrsta bakterija, a najčešće salmonela, šigela, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* i dr. (Slika 1). Ova metoda je jedna od prvih genotipskih metoda primenjenih u epidemiologiji. Prema već navedenim kriterijumima za evaluaciju i validaciju metoda tipizacije i dodatnim, kao što je moć diskriminacije i epidemiološka podudarnost, ispitivanje plazmidskog profila ima nešto slabiju reproducibilnost i epidemiološku podudarnost od drugih genotipskih metoda, a mogućnost tipizacije je varijabilna⁵. Plazmidi se tokom procesa konjugacije mogu prenositi u druge bakterije iste, a ređe i srodne vrste. Zbog toga se ova metoda primenjuje za tipizaciju izolata bakterija iz jedne epidemije ili epidemija koje se dešavaju u kratkom vremenskom razmaku. Upoređivanje plazmidskih profila izolata koristi se za otkrivanje izvora i puteva širenja infekcije, za razlikovanje epidemijskog soja od izolata iz sporadičnih slučajeva oboljenja, za praćenje širenja infekcija. U kombinaciji s ispitivanjem osetljivosti na antibiotike koristi se za dobijanje podataka o tome da li se gen za rezistenciju nalazi na plazmidu i pomoću njega prenosi na druge bakterije⁶. U kombinaciji sa drugim metodama genotipizacije, ispitivanjem plazmidskog profila može se razlikovati širenje rezistentnog klonova od širenja plazmida rezistencije⁷.



Slika 2. Hibridizacija kolonija *E. coli* sa DNK probom za termolabilni toksin. Brojevima su označene pozitivne i negativne kontrole.

Primenom DNK hibridizacije detektuju se specifični redosledi nukleotida u genomu mikroorganizma pomoću DNK probe, a metodu je prvi primenio Southern, 1975. godine⁸. DNK probe su fragmenti DNK koji sadrže nukleotide specifične za deo nekog gena ili genoma kojeg želimo detektovati. Najčešće su dugačke nekoliko stotina nukleotida i tokom reakcije se vezuju (hibridizuju) sa komplementarnim redosledima nukleotida. DNK probe se koriste za detekciju gena za virulenciju (slika 2), gena za rezistenciju na antibiotik ili da se odredi priroda pokretnog genetičkog elementa na kojem se ovi geni nalaze⁹. Savremena tehnologija omogućila je razvoj micro-array metode kojom se može identifikovati veliki broj gena istovremeno pomoću DNK proba vezanih za mikroploču¹⁰.

DNK hibridizacija može da se kombinuje sa prethodnim sečenjem genoma pomoću enzima restrikcioni endonukleaza i razdvajanjem dobijenih fragmenata elektroforezom.

Ako se za hibridizaciju primene probe koje sadrže sekvence gena za rRNK, metoda se naziva ribotipizacija. Prvi put je opisana 1986. godine¹¹. Može se primeniti za analizu raznih mikroorganizama, a najčešće se primenjuje kao automatizovan test za analizu patogena značajnih u mikrobiologiji hrane¹². Razlike između izolata detektuju se na osnovu razlika u rasporedu fragmenata za koje su se vezale DNK probe. PFGE je još jedna metoda koja se bazira na detekciji fragmenata. I ovde se fragmenti dobijaju pomoću restrikcioni endonukleaza, ali se primenjuju enzimi koji režu DNK, pa se obično dobije do 30 fragmenata koji se mogu razdvojiti na specijalnoj elektroforezi u pulsirajućem polju. Uz pažljivu standardizaciju postiže se visoki nivo međulaboratorijske reproducibilnosti, pa je ova metoda za mnoge vrste bakterija zlatni standard u tipizaciji.

Razvijanjem automatskih metoda za sekvenciranje, one se sve češće primenjuju i za tipizaciju bakterija. Kada se sekvencira samo jedan genski lokus (SLST), on mora biti varijabilan. Tako se za tipizaciju *S. aureus* primenjuje sekvenciranje gena koji kodira protein A (spa gen). Ovaj gen sadrži grupe redosleda nukleotida koje se ponavljaju, pa se izolati razlikuju po broju ponovljenih grupa, kao i po sekvenci nukleotida¹³. Razvijanje kompjuterskog softvera omogućilo je automatizaciju procesa, pa ova metoda tipizacije ima visoku reproducibilnost, što omogućava upoređivanje rezultata između laboratorija.

Kod MLST analize sekvencira se nekoliko, obično 5-10 lokusa¹⁴. Biraju se geni koji se sporo menjaju, tzv. housekeeping geni. Zbog toga dobijeni rezultati imaju veći značaj u populacionoj genetici nego u epidemiologiji. Kada se za sekvenciranje biraju i geni koji nisu housekeeping, MLST se primenjuje i u epidemiološkoj tipizaciji¹⁵. Na osnovu MLST analize identifikuju se klonovi sa najčešćim sekvencama, kao i klonalni kompleksi koji imaju klinički značaj¹⁶.

ODABIR METODE TIPIZACIJE I INTERPRETACIJA REZULTATA

Više faktora utiče na to koja metoda da se primeni za tipizaciju. Ukoliko se analiziraju izolati iz jedne epidemije ili iz više epidemija koje se javljaju u istom ili približnom vremenskom periodu, koriste se metode koje detektuju promene koje se dešavaju u kratkom vremenskom periodu, npr. plazmidski profil, ribotipizacija, PFGE, SLST. Za analiziranje izolata u širem vremenskom periodu i za praćenje geografskog širenja sojeva, primenjuje se MLST analiza.

Odabir metode tipizacije zavisi i od bakterijske vrste. Pojedine metode razvijene su zahvaljujući odličnom prethodnom poznavanju strukture i funkcije genoma. Neke metode su prilagođene samo za određene vrste (VNTR, SLST, amplifikacija ponavljajućih sekvenci i dr.), dok se druge mogu primeniti na skoro sve vrste bakterija (ribotipizacija, PFGE).

Kada se prethodni uslovi zadovolje, na odabir metode utiče i dostupnost neophodnih aparata, obučenosť kadrova, cena, mogućnost međulaboratorijskog prenošenja i upoređivanja rezultata, interpretacija rezultata i dr.

Interpretacija rezultata tipizacije ponekad je kompleksna. Kod metoda koje se baziraju na detekciji fragmenata DNK, o sličnosti između izolata zaključuje se na osnovu procenta traka koje su slične između sojeva¹⁷. Pri tome se uzima u obzir evolucionni nivo mutacija kod vrste koja se

analizira, a stalno se moraju imati u vidu epidemiološki podaci. Veliku pomoć u analizi podataka pružaju kompjuterski programi dostupni za pojedine metode. Za metode koje se baziraju na sekvenci nukleotida postoje nacionalne i internacionalne baze podataka koje olakšavaju analizu i sadrže podatke za sve do sada analizirane izolate.

KLINIČKI ZNAČAJ TIPIZACIJE

U kliničkoj praksi podaci o tipizaciji naročito su korisni kod ispitivanja infekcija izazvanih najčešćim uzročnicima intrahospitalnih infekcija, a to su meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomicin rezistentan enterokok, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp.* i dr.¹⁸ Glavni cilj tipizacije ovih uzročnika je prevencija infekcije, a u nekim sredinama čak i prevencija kolonizacije i njenog širenja. Zbog toga rezultati tipizacije moraju biti gotovi u što kraćem vremenskom periodu. Nalaz identičnih tipova predstavlja alarm za pokretanje mera kontrole infekcije.

Bakterije, a naročito gram-negativni bacili, imaju sposobnost da steknu ili razviju rezistenciju na razne antibiotike, pa i nove koji se uvode u terapiju. Poslednji primer je pojava i širenje rezistencije na karbapeneme, koja se najčešće javlja kod kliničkih izolata *P. aeruginosa* i

*Acinetobacter spp.*¹⁹ Kako su karbapenemi jedini lek izbora koji se mogu koristiti za kontrolu infekcija izazvanih gram-negativnim bakterijama, otkrivanje bakterija koje produkuju metalo- β -laktamaze, enzime koji hidrolizuju karbapeneme, tipizacija gena koji kodiraju ove enzime i integrona na kojima se geni nalaze, je od velikog značaja²⁰.

ZAKLJUČAK

Tipizacija mikroorganizama, naročito bakterija, ima sve veći značaj. Globalno širenje multirezistentnih sojeva nametnulo je potrebu za internacionalnom saradnjom u praćenju i karakterizaciji izazivača infektivnih oboljenja. Zbog toga se velika pažnja poklanja standardizaciji metoda tipizacije kako bi se rezultati mogli upoređivati između laboratorija. Isto tako, metode koje se zasnivaju na detekciji traka sve više se zamenjuju metodama sekvenciranja, koje su objektivnije i čiji rezultati se jednostavnije prenose u elektronskoj formi između laboratorija.

Apstrakt

Molekularna tipizacija omogućava epidemiolozima da uoče razlike između izolata mikroorganizama koji pripadaju istoj vrsti. Bitna je za praćenje i sprečavanje širenja bolničkih infekcija, za identifikaciju izvora infekcije i puteva prenošenja, kao i za identifikaciju klonova koji su značajni kod oboljenja ljudi. Na raspolaganju su brojne fenotipske i genotipske metode za tipizaciju svih klinički značajnih bakterijskih vrsta. Ove metode moraju biti reproducibilne, a interpretacija rezultata jednostavna, čime bi komunikacija između laboratorija bila olakšana. Za sada PFGE predstavlja standard za tipizaciju mnogih vrsta mikroorganizama, ali metode koje se baziraju na sekvenciranju imaju sve veću ulogu.

LITERATURA

1. Van Belkum A, Struelens M, De Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 547-60.
2. Van Belkum A. High-throughput epidemiological typing in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 86-100.
3. Mermel LA, McCormick RD, Springman SR, Maki DG. The pathogenesis and epidemiology of catheter-related infection with pulmonary artery Swan-Ganz catheters: a prospective study utilizing molecular subtyping. *Am J Med* 1991; 91: 197S-205S.
4. Mayer LW. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 228-43.
5. Miljković-Selimović B, Lepšanić Z, Babić T, Kocić B, Randelović G. Primena analize plazmidskog profila u identifikovanju epidemijskih sojeva *Salmonella enterica* serotip Enteritidis. *Vojnosanit Pregl* 2008; 65: 303-7.
6. Wei ZQ, Chen YG, Yu YS, Lu WX, Li LJ. Nosocomial spread of multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* containing a plasmid encoding multiple beta-lactamases. *J Med Microbiol* 2005; 54: 885-8.
7. Tenover F, Arbeit RD, Archer G et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *S. aureus*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 407-15.
8. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-17.
9. Jansen WTM, Beitsma MM, Koeman CJ, Van Wamel WJB, Verhoef J, Fluit AC. Novel mobile variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2072-8.
10. Cui L, Lian J, Noeh H, Reyes E, Hiramatsu K. DNA micro-array based identification of genes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3404-13.
11. Grimont F, Grimont PA. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1986; 137B: 165-75.
12. Arvik T, Henick T, Gafner J. Automated genotyping of *Saccharomyces cerevisiae* using the riboprinter. *Int J Food Microbiol* 2005; 104: 35-41.
13. Harmsen D, Claus H, Witte W. Typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5442-8.
14. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3140-5.
15. Gaia V, Fry NK, Afshar B. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2047-52.
16. Libisch B, Poirer L, Lepšanić Z, Mirović V, Balogh B, Paszti J et al. Identification of PER-1 extended-spectrum beta-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 54: 330-8.
17. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
18. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to study of hospital infections. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 512-30.
19. Walsh TR, Toleman MA, Poirer L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306-25.
20. Lepšanić Z, Libisch B, Tomanović B, Nonković Z, Balogh B, Füzi M. Characterisation of the first VIM metallo-beta-lactamases-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Serbia. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2008; 55: 447-54.