

XXXII. OTDK Biológia Szekció

**Baktériumok és gombák multiplex detektálása Real-time PCR és
FRET technikával**

Vadovics Máté

Biológia szakos, első éves MSc. hallgató

Szegedi Tudományegyetem



Témavezető: Dr. Somogyvári Ferenc

Konzulens: Prof Dr. Vágvölgyi Csaba

2014

Tartalomjegyzék

Tartalom

1. Tartalmi összefoglaló.....	3
2. Bevezető.....	5
Fontosabb szepszist okozó baktériumok	6
Fontosabb szepszist okozó gombák	8
PCR (Polymerase Chain Reaction).....	9
Tenyésztés.....	13
Gombák	13
Baktériumok	13
DNS preparálás	14
Bakteriális és gomba primer tervezés.....	15
FRET próba.....	15
A baktériumok és gombák párhuzamos detektálása multiplex real-time PCR segítségével, faj specifikus azonosítás	16
A reakció érzékenységének vizsgálata a templát DNS koncentrációjának változtatásával.....	17
A reakció érzékenységének vizsgálata bakteriális DNS templáttal.....	17
A reakció érzékenységének vizsgálata gomba DNS templáttal	18
5.Eredmények	20
A baktériumok és gombák párhuzamos detektálása multiplex real-time PCR segítségével, faj specifikus azonosítás	20
A gombák, Gram negatív és Gram pozitív baktériumok elkülönítése	20
6. Megbeszélés.....	26
7. Összefoglalás.....	27
8. Irodalom jegyzék	28
9. Köszönetnyilvánítás	32

1. Tartalmi összefoglaló

A szepszisben részt vevő baktériumok és gombák identifikációja hagyományos tenyésztéses módszerrel időigényes, ami nagyban befolyásolhatja a fertőzés végkimenetelét. A PCR alapú technikák forradalmasították a patogén baktériumok és gombák gyors detektálását, továbbá a legújabb módszerek lehetővé teszik a faj szintű azonosítást is.

Kísérleteinkben –a detektálás mellett- sikerült elkülönítenünk a leggyakoribb szepszist is okozó gombákat és baktériumokat. Ez a módszer a LightCycler kapilláris real-time PCR készülék (Roche, Basel, Svájc) három detektáló csatornáján képes elkülöníteni a Gram negatív és Gram pozitív baktériumokat, valamint a gombákat multiplex módon. Az általunk kidolgozott FRET technikával az amplikon olvadási görbéjéből a 7 leggyakoribb *Candida*, az amplikon és a Gram specifikus próbák olvadási hőmérsékleteinek kombinációjából pedig a leggyakoribb baktériumok fajszerint azonosíthatóak.

A PCR érzékenységének megállapításához egészséges humán vérmintákat fertőztünk különböző koncentrációjú patogén templát DNS-el, majd kísérleteinkből megállapítottuk, hogy melyik az a legnagyobb hígítás ahol a baktériumok és gombák még detektálhatók.

A kimutatás ideje tovább csökkenthető a DNS preparálás esetleges elhagyásával. A legújabb, inhibitor toleráns polimerázok lehetővé teszik, hogy a megfelelő koncentrációjú vért illetve szérumot közvetlen, preparálás nélkül használhassuk a PCR-hez.. Mivel a vér hemoglobinja ilyenkor elfedi a fluoreszcens jeleket, a kórokozók csakis az amplikonok mérete alapján különíthetők el, így a fajszerintű azonosítás ezzel a módszerrel még nem lehetséges.

Munkánk további célja a faj szerinti identifikálás a DNS tisztítás nélküli reakcióval, illetve a két módszer egyesítése, a reakció idő további csökkentéséhez.

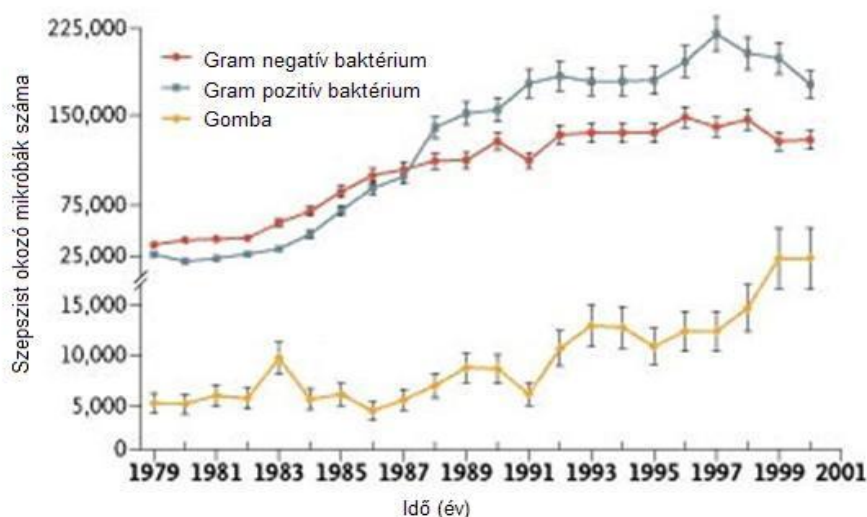
Kulcsszavak: RT PCR, Meltingpoint analízis, CFU

Rövidítések jegyzéke

BSA	Bovine Serum Albumin
bp	nukleotid bázispár
DNS	deoxiribonukleinsav
Σ dNTP	Deoxyribonukleotid-trifoszfát (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
CFU	Colonyforming unit
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
ITS	eukarióta rRNS-t kódoló DNS szakaszok közötti régió
LC	LightCycler 1.2 (Roche cég real-time PCR gépe)
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
PLK	prokarióta rRNS-t kódoló DNS szakasz
SDS	sodium-dodecyl-sulfate
TBE	Tris Borate EDTA
T _m	Oladási hőmérséklet (Melting point) : az a hőmérséklet, ahol a kettős szálú DNS fele denaturálódik

2. Bevezető

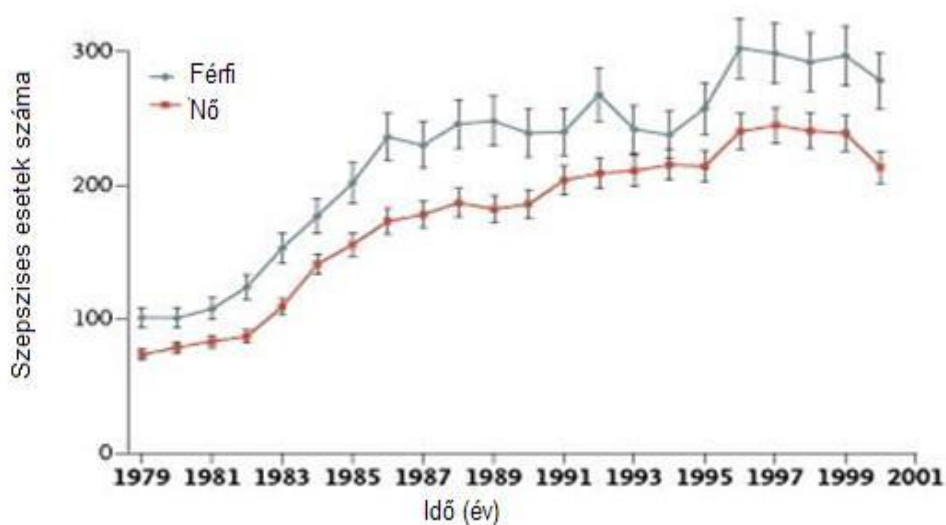
A szepszis a szervezetben fellépő immunválasz valamilyen vérárambeli fertőzés hatására melynek klinikai tünete lehet a Systemic Inflammatory Response Syndrome (szisztémás gyulladásos válasz szindróma) [1,2]. A vérárambeli fertőzés leggyakoribb kórokozói a baktériumok, illetve bakteriális endotoxinok, virulencia faktorok, továbbá kisebb mértékben okozhatják a fertőzést gombák, vírusok és protozoonok is. Világszerte gyűjtött adatok becslése alapján naponta 1400 szepszises megbetegedés végződik halállal, és évente 1,5 %-kal emelkedik a megbetegedések száma [3]. Az antibiotikumok alkalmazása előtt a leggyakoribb kórokozók a Gram pozitív baktériumok voltak. 1979-től 1987-ig a Gram negatív baktériumok kerültek előtérbe illetve a túlzott antibiotikum használat miatt kialakultak egyes antibiotikumokra rezisztens és multirezisztens törzsek. Az ezt követő években újra a Gram pozitív infekciók okozták a legtöbb vérárambeli fertőzést [4]. Az intenzív ellátást igénylő betegek közül a fertőzés kiváltó oka napjainkban, mintegy: 51,1%-ban a Gram pozitívak (G+), és 37,6%-ban a Gram negatívok (G-). Továbbá, fontos patogénként tartják számon a gombákat, bár a fertőzéseknek csak 4,6%-át teszik ki [4]. Annak ellenére, hogy a gombák ilyen kis számban vesznek részt a fertőzésben, mortalitási arányuk a legnagyobb. Szepszist okozó gombák száma 1979 és 2000 között 207%-al növekedett. Továbbá, polimikrobiális infekciók is előfordulhatnak mintegy 10-20%-ban [4].



1. ábra Szepszises esetek száma 1979-2001

(Forrás: Martin G S. et al., 2003)

A candidaemiák több mint 23% át a baktériumok és gombák általi kevert fertőzés okozza [5]. Epidemiológiai adatok alapján megállapítható, hogy a szepszis nagyobb számban érinti a férfiakat [3]. A szepszis kezdetén a mortalitás 10-15%, az idő előre haladásával pedig ez az arány folyamatosan nő [3]. Ezért rendkívül fontos a korai és megfelelő kezelés a legtöbb esetben, mert a korán elkezdett célzott antibakteriális és/vagy antifungális terápia nagyban elősegíti a páciens életben maradási esélyeit.



2. ábra szepszises esetek száma nemek szerint

(Forrás: Martin G S. et al., 2003)

Fontosabb szepszist okozó baktériumok

Az adatok alapján megállapítható, hogy a baktériumok a szepszis leggyakoribb kórokozói. Ezeknek a fertőzéseknek a halálozási aránya igen magas. Évente 135.000 halottat regisztrálnak Európában, és 215.000 esetet az Amerikai Egyesült Államokban [6].

Az egyik legfontosabb patogén baktérium Genus a *Staphylococcus*, mely bizonyos körülmények hatására válik kórokozóvá. A normál bőrfelület flórájának tagja, előfordulnak a felső légutakban, mukózus membránokon. Felületi sérüléseken gennykeltő kórokozóként vannak jelen, tüszős gyulladást (furunkulus) idézhetnek elő. Előfordulhat felső légúti

fertőzésekben, és felső hártvás gyulladásokban. Többféle exotoxinnal rendelkeznek, közülük négyféle hemolizin. Az exokoaguláz enzime a fibrinogént a vérben fibrinné alakítja, így egy védőburkot alakít maga köré mely megakadályozza a pfagocytosist [7]. A bőr nekrolízisét az általuk termelt toxin váltja ki. Az antibiotikus védekezést korlátozza a nagyfokú rezisztencia kialakulása. A bakteriális szepsziseket mintegy 35%-ban a *Staphylococcus* okozza.

A *Streptococcus* Genus kommenzalista baktérium törzs, melyek gyakran patogének. A *S. pyogenes* a legfontosabb humán kórokozó. Felületi sebfertőzésekben gyakran fordul elő, a torok tájék és a felső légutak heveny gyulladásának kiváltója. Húsevő baktériumnak is nevezik, mivel előszeretettel szaporodik el sebekben, gyulladt bőrterületen. A *Streptococcus agalatae* terhes anyáknál növeli a komplikáció esélyét, újszülötteknél pedig újszülött kori vérmérgezéshez vezethet. Ezen felül ízületi gyulladást és szívbetegséget okozhat a véráramba kerülést követően. Az *Enterococcusok* sokféle fertőzést okozhatnak. A bélből kikerülve húgyúti infekciót, tüdőgyulladást, bőrfertőzést, agyhártyagyulladást stb. idézhet elő.

A *Listeria* Genus sajátos hemolízissel rendelkezik. A leggyakoribb betegségeik a meningitisz, septikaemiaendocarditis, arthritis, és egyéb góctünetek, melyek legyengült immunrendszerű betegeknél jellemző. A *L. monocytogenes* képes a makrofágokat megtámadni, és bennük multiplikálódni. Csak a hemolizáló típusok patogén.

Az *Escherichia coli* baktérium a bélflóra természetes része. Jelenlétük kedvező, vitaminokat szolgáltatnak a gazdaszervezet számára. Ez a baktérium okozza a húgyúti fertőzések nagy részét. Húgyutakban nemkívánatos gyulladást okozhatnak.

A *Pseudomonas* a fő okozója két olyan enyhébb közönséges fertőzésnek, amelyek a különben egészséges embereket érintik: az úszók fülbajának és a forró-kád szőrtüsző-gyulladásnak. Multirezisztens törzsei nehezen azonosíthatók.

A *Klebsiella pneumoniae* főként tüdőgyulladást okoz legyengült immunitású embereknél. Továbbá szerepet játszik húgyúti fertőzésekben.

A *Proteus vulgaris* a gastrointestinalis rendszer normál flórájának tagja. Leggyakrabban húgyutakban és középfülben, égési sebekben okoz fertőzést, amely különböző gyulladással, gennyesedéssel járó folyamatokhoz vezet. Gyakran rezisztens az antibiotikum kezelésre.

A *Bacillus cereus* emberben hányással és hasmenéssel járó ételmérgezést okoz. Szemsérülés esetén súlyos fertőzést okozhat.

Fontosabb szepszist okozó gombák

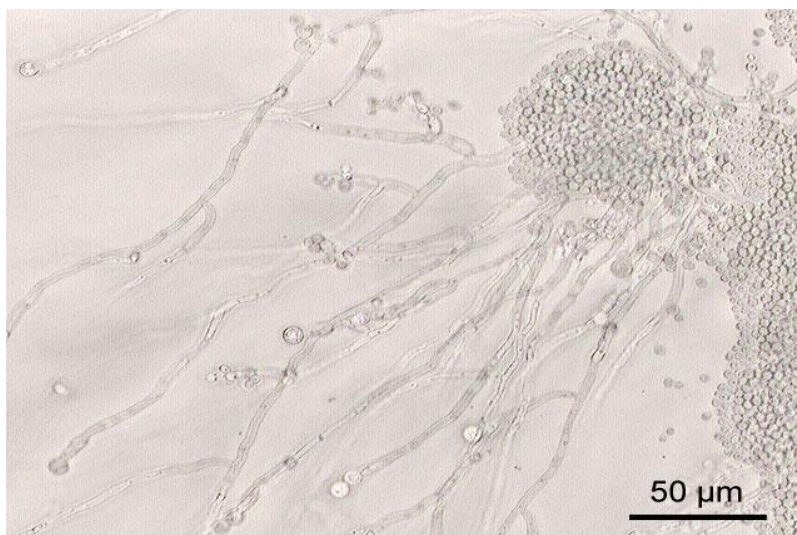
Habár a gombák mindössze 4%-ban fordulnak elő, mint a szepszis kórokozói, de mortalitási arányuk nagyobb, mint a baktériumoké [4].

A *Candida* fajok sokfelé előfordulnak a természetben. Egészséges ember szájüregében is megtalálhatók, továbbá előfordulnak a bélrendszerben és a hüvelyben, a normál humán flórának a tagja.

Jelenleg 100 féle *Candida* fajt írtak le, ezek közül legismertebb a *Candida albicans*, az emberi opportunisták leggyakoribb kórokozója (3. ábra).

A gombás fertőzéseknek 43%-át a *Candida* fajok okozzák. Immunhiányos betegeknél igen magas a candidosis előfordulása [4]. Ezért fontos a korai diagnózis és az antifungális terápia gyors megkezdése.

Az antifungális szereknek különböző az érzékenységek, emiatt fontos a fajszerűtől elkülönítés. A fajok taxonómiáját a fenotípusos határozóbélyegek illetve a biokémiai és molekuláris módszerek alapján állították fel. A fenotípusos bélyegek alapján történő elkülönítés sokszor nehézkes és pontatlan. A biokémiai módszerek közül a cukorasszimilációs módszerek bizonyultak hatékonyak a fajok meghatározásában.



3. ábra *Candida albicans*

(Forrás: http://hu.wikipedia.org/wiki/Candida_albicans)

PCR (Polymerase Chain Reaction)

A polimeráz láncreakció egyre inkább elterjedt az orvosi diagnosztikában. A molekuláris technikákkal történő szepszis diagnosztika is egyre népszerűbb, mivel ez a módszer sokkal megbízhatóbb és gyorsabb, mint hagyományos tenyésztési eljárás [8]. A PCR technika során egy meghatározott rövid DNS szakaszt, specifikus primer hozzáadásával mesterségesen amplifikálnak, többszörös replikációs cikluson keresztül. A mikroorganizmusok DNS-ének preparálásához különböző kereskedelmi forgalomban kapható preparáló kitek vannak [9].

A PCR a molekuláris technikák egyik legsikeresebb módszere. Az alap PCR technika logikája rendkívül egyszerű és érthető, bár a gyakorlati megvalósítás esetenként már nem is olyan könnyű, alapjaiban mégis egy rendkívül hatékony, egyszerű és jól reprodukálható módszer. A PCR-t tulajdonképpen a baktériumok/gombák klónozásnak tekinthetjük kémcsőben (élő sejtek nélkül), hiszen ezzel a módszerrel kiválaszthatunk és felszaporíthatunk egy komplex, sokféle DNS szekvenciát tartalmazó mintából egy, vagy néhány molekulát. A folyamat 3 fő lépésből áll, melyek különböző hőmérsékleten zajlanak:

- Denaturálás: 94-95°C-on, melynek során a kettős DNS szál egy szálúvá válik.
- Hibridizáció/annealing: a minta rövid oligonukleotid primerekkel (forward és reverse primer) hibridizál, ezáltal a polimerizáció kezdőpontját kijelöli. Ennek hőmérséklete függ a primerek T_m pontjától, de általában 50-60°C körül van.
- Polimerizáció: az enzim a primertől kiindulva megszintetizálja a komplementer láncot 5'-3' irányba. Ez a szakasz a polimeráz enzim optimális működési hőmérsékletén történik. Az általunk használt polimeráz enzim (Taq polimeráz) esetében ez a hőmérséklet 72°C.

A három lépés ciklusosan ismétlődik, általában 35 ciklus megy végbe egymás után. Annak érdekében, hogy a polimeráz enzim ne sérüljön és ne aktivizálódjon szobahőmérsékleten, egy gátló módszert alkalmaznak az ilyen típusú enzimeknél (hot-start polimeráz [32]). Az aktiválódásukhoz szükséges az első ciklus előtt egy elő denaturációs lépés, mely 5 percig, 94-95°C-on zajlik. A ciklusokban megszintetizált kettős szálú DNS mindkét szála a következő ciklusban templátként szolgál. Ebből adódik, hogy a termék mennyisége 2 hatványainak arányában növekszik. A reakcióelegy tartalmaz még $\Sigma dNTP$ -t és az enzim működéséhez szükséges ionokat. A reakció végterméke gélelektroforézissel vizsgálható.

A rendszer érzékeny, így a keresett szekvencia néhány DNS kópia jelenléte esetén is kimutatható és egyben univerzális is, tehát a mikroorganizmusok bármely mintában detektálhatóak. A PCR módszerek használata alapozza meg az érzékeny és gyors molekuláris

kimutatást célzó vizsgálatokat [10]. A Real-time PCR kvantitálhatóvá teszi a mintában jelen lévő nukleinsav mennyiségét. Alkalmazásához szükséges egy real-time PCR készülék vagy speciális kiegészítő feltétes PCR készülék. A mérést a kezdeti ciklusok során végzi a módszer, nem pedig a reakció végpontjánál (általában fluoreszcens jel detektálásával). Ekkor még a keletkező termék mennyisége egyenesen arányos a templát mennyiségével. Minél nagyobb a mintában a DNS tartalom, annál jobban erősödik a fluoreszcencia. A legelterjedtebb, interkalálódó aspecifikus fluoreszcens festék a SYBRGreen mely csak kettős szálú DNS-hez kötődik. Újabb próbák útján megvalósuló detektáló rendszerekben (TaqMan, MolecularBeacon, FRET, Scorpion) használhatunk nem interkalálódó fluoreszcens festékeket. Az interkalálódó festék és a próba együttes használatával akár több minta is mérhető egyszerre [9]. A PCR vizsgálat előnye, hogy ki tudja mutatni a candidosist, akkor is, ha a mintában nem található már életképes gomba [12]. A LigtCycler (Roche, Basel, Svájc) real-time PCR-t relatív könnyű kivitelezni, és elvégezhető egy kisebb laboratóriumban is. Ez egy ultragyors, on-line detektálású kvantitatív PCR rendszer. A FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) próbák használatával megvalósuló technika [13], mely távolságfüggő interakció két fluoreszcens molekula között. Amennyiben a fluoreszcens donor molekula a bázisok beépülése révén megfelelő közelségbe kerül az akceptor molekulához – gerjeszti azt – és ez által fényt bocsájt ki [14]. Az interkalálódó festék és a FRET egyidejű használata egy lehetséges módszer a Gram negatív és Gram pozitív baktériumok elkülönítésére [13]. Pontosabban meg lehet határozni a különböző baktériumokat a PCR termékek és a próba meltingpoint (T_m) hőmérsékletének kombinációjával. [15]. Ehhez a módszerhez mindössze 4 órára van szükség, beleértve a DNS preparálást és az eredmények kiértékelését is. A Real-timePCR-al történő detektálás végbe mehet nem kötött festék, vagy egy jelölt szekvencia specifikus próba által. A két módszer kombinációja lehetővé teszi az amplikonok detektálását, és a T_m meghatározását. Az általunk kidolgozott rendszerben az újdonsága SYBRGreen aspecifikus interkaláló festék használata donor molekulaként jelölt primer, vagy más rögzített specifikus próba helyett. Ezzel a módszerrel megvizsgálható a 3 legfontosabb infekciót okozó organizmus egy csatornán multiplex PCR-el.

3. Célkitűzések

- A bakteriális kórokozók azonosítása real-time PCR amplikonok és a FRET próbák olvadási hőmérséklete alapján.
- A gombák és a baktériumok párhuzamos detektálása multiplex real-time PCR segítségével.
- A reakció érzékenységének vizsgálata a templát DNS koncentrációjának változtatásával.

4. Anyagok és módszerek

A multiplex PCR beállításához a baktériumok közül a *Staphylococcus aureus*-t, a gombák közül pedig a *Candida albicans*-t használtuk. 17 klinikailag fontos szepszist okozó baktérium törzs ismeretes [16].

A módszer beállításához a következő gomba és baktérium törzseket használtuk:

1. Táblázat: A használt törzsek

Gomba törzsek	Baktérium törzsek
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 4893	<i>Staphylococcus epidermidis</i> OKI 80001
<i>Candida glabrata</i> ATCC138	<i>Streptococcus pyogenes</i> OKI 80002
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC22019	<i>Streptococcus agalactiae</i> OKI 80200
<i>Candida kefyr</i> ATCC 386	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
<i>Candida inconspicua</i> ATCC 180	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 4701
<i>Candida krusei</i> ATCC 573	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603
	<i>Proteus vulgaris</i> HNCMB 60076
	<i>Bacillus cereus</i> HNCMB 303228

Tenyésztés

Gombák

A *Candida* fajok tenyésztéséhez 16 mm átmérőjű, 20 cm-es kémcsöveket és 9 cm átmérőjű Petri-csészéket használtunk. A kémcsőbe öntött ferde agar (Sabouraud-féle) mennyisége 7 ml volt, így elkerülhető a táptalaj kiszáradása, és elegendő mennyiségű tápanyagot biztosít a gombák számára. A Petri-csészékbe kb. 20 ml táptalajt öntöttünk. A tenyésztés 37°C-on zajlott 1-2 napig. A kinőtt telepeket tartalmazó kémcsöveket és a Petri-csészéket az újabb átoltásig (1-2 hónapig) szobahőmérsékleten tároltuk.

Sabouraud agar összetétel:

Glükóz	20 g
Pepton	10 g
Agar	15 g
Desztillált víz	1000 ml-re kiegészíteni

Baktériumok

A baktériumokat véres táptalajon (Columbia blood agar base) [17] növesztettük 9 cm-es Petri-csészében. Az előre összeállított táptalaj alapból 42 g-ot oldottunk fel 950 ml desztillált vízben. 15 percig autoklávoztuk (121°C-on) majd 60°C-ra hűtöttük, és hozzáadtunk sterilen 5%-os defibrinált marhavért. 20 ml-enként steril Petri-csészékbe öntöttük szét.

Columbia agar base összetétele:

Pepton	23 g/l
Keményítő	1 g/l
Nátrium-klorid	5 g/l
Agar	13 g/l

DNS preparálás

- gombát/baktériumot felkevertük 1000 ml vízben
- 3 percig centrifugáltuk 10.000 g-vel
- eltávolítottuk a felülúszót
- papírvattával leitattuk a kémcsövet
- üledékhez adtunk: 80 µl 5x Proteináz K puffer, 20 µl 10 mg/ml Proteináz K, 40 µl 10%-os SDS, 220 µl víz
- inkubáltuk 55°C-on 30 percig keveréssel
- hozzáadtunk 150 µl 6M NaCl-t
- Kézzel erősen ráztuk 15 mp-ig
- centrifugáltuk 13.000 g-vel 3 percig
- felülúszót egy tiszta csőbe tettük
- centrifugáltuk 13.000 g-vel 3 percig
- felülúszót egy tiszta csőbe tettük
- 600 µl előhűtött izopropil alkoholt adtunk hozzá
- 5 percig döntögettük
- centrifugáltuk 13.000 g-vel
- leöntöttük a felülúszót
- 800 µl előhűtött 70%-os etanolt adtunk hozzá
- centrifugáltuk 13.000 g-vel 3 percig
- leöntöttük a felülúszót
- papírvattán lefelé tartva a csövet kiszárítottuk
- kiszáradt DNS-t 100 µl vízben felvettük

Bakteriális és gomba primer tervezés

Mind a bakteriális mind a gomba DNS multiplex amplifikálásához egy-egy primer párt (forward és reverse) használtunk.

Bakteriális primer pár: (5'-3')

- forward: PLK1 (TAC GGG AGG CAG CAG)
- reverse: PLK2 (TAT TAC CGC GGC TGC T)

Ezek a primerek a 16S rRNS-t kódoló DNS-s régióban található, ami rendkívül konzervált szekvencia a prokarióták különböző csoportjába.

Gomba primer pár: (5'-3')

- forward: ITS86 (GTG AAT CAT CGA ATC TTT GAA C)
- reverse: ITS 4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAG C)

A gomba primerek az ITS2 régióban helyezkednek el, ami egy rendkívül variábilis régió az 5,8S és a 28S rRNS szekvencia között, és 192-494 bp-t amplifikál [18]. Ezen variábilis régió által lehet elkülöníteni a legfontosabb humán patogén gomba fajokat [19].

FRET próba

Eredetileg a jelölt primer szolgál a Gram specifikus próbák gerjesztésére, de mi aspecifikus SYBRGreen festéket használtunk, ami mind a baktérium, mind a gomba amplikonok vizualizálására alkalmas. Ez a módszer alkalmas a Gram negatív és Gram pozitív osztályok elkülönítésére is [15].

Gram negatívpróba: (5'-3') LC Red 640-eljelölt

- ISN2 (CCG CAG AAT AAG CAC CGG CTA ACT CCG T)

Gram pozitív próba: (5'-3') Cy5.5-eljelölt

- ISP3 (CCT AAC CAG AAA GCC ACG GCT AAC TAC GTG)

A baktériumok és gombák párhuzamos detektálása multiplex real-time PCR segítségével, faj specifikus azonosítás

A baktériumok és gombák detektálását és faj szerinti identifikálását 10 µl végtérfogatban Roche LightCycler kapilláris PCR készüléken végeztük. A primerek bekötődési hőmérsékletének optimalizálását előző kísérleteink során elvégeztük.

Reakcióelegy:

IQ™ 2xSYBRGreenSupermix (BioRad, USA)	4 µl
PLK1	1 µl
PLK2	1 µl
ITS4	1 µl
ITS86	1 µl
BSA(10 mM)	0,2 µl
baktérium templát DNS	0,5 µl
gomba templát DNS	0,5 µl
Gram negatív próba	0,7 µl
Gram pozitív próba	0,7 µl

A reakció körülményei:

denaturáció 94°C 600 mp
40 ciklus

denaturáció 94°C 20 mp

annealing 55 °C 15 mp

extension 72°C 20 mp

A fluoreszcencia mérése minden annealing lépés után történt.

Az olvadási görbe vizsgálata:

95°C 10 mp

40°C 120 mp

0,2°C/mp hőmérsékletnövekedés 95°C-ig

A fluoreszcenciát folyamatosan lehet mérni a hőmérséklet emelkedése közben, ami grafikonon ábrázolható.

A reakció érzékenységének vizsgálata a templát DNS koncentrációjának változtatásával

A reakció érzékenységének vizsgálatához BioRad cfx96 hagyományos PCR készüléket használtunk. A baktériumok és gombák Bürker kamrában történő számolása után 5000 CFU töménységű kiindulási mennyiséget hígítottunk. A reakciót 100x-os, 200x-os, 1000x-es, 2000x-es és 5000x-es hígításban végeztük. A 100x-os hígítás 50 kópiát, a 200x-os 10 kópiát, az 1000x-es 5 kópiát, a 2000x-es 2 kópiát, az 5000x-es 1 kópiát tartalmazott.

A reakció érzékenységének vizsgálata bakteriális DNS templáttal

Három Gram negatív és három Gram pozitív baktériumot használtunk a kísérlethez. A Gram negatív baktériumok az *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, és a *Haemophilus influenzae* voltak. A Gram pozitív baktériumok az *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, és a *Streptococcus pyogenes* voltak. Minden baktériumnál 8-szor elvégeztük a kísérletet, és a kapott adatokból következtettünk a reakció érzékenységére.

Reakcióelegy:

SsoFast™ q PCR supermix (Bio-rad,Hercules CA,USA)	4 µl
PLK1	1 µl
PLK2	1 µl
templát DNS	1 µl
desztillált víz	3 µl

A reakció körülményei:

1. denaturáció	94°C	600 mp
35 ciklus		
2. denaturáció	94°C	20 mp
3. annealing	55 °C	40 mp
4. extension	72°C	30 mp
5. lezárás	72°C	420 mp
6. hűtés	4°C	∞

A reakció érzékenységének vizsgálata gomba DNS templáttal

A reakció érzékenységének vizsgálatához a *Candida albicans* és a *Candida tropicalis* sarjadzó gombákat használtuk. Minden gombánál 8-szor elvégeztük a kísérletet, és a kapott adatokból következtettünk a reakció érzékenységére.

Reakcióelegy:

SsoFast™ qPCRsupermix (Bio-rad)	4 µl
PLK1	1 µl
PLK2	1 µl
templát DNS	1 µl
desztillált víz	3 µl

A reakció körülményei:

1. denaturáció	94°C	600 mp
35 ciklus		
2. denaturáció	94°C	20 mp
3. annealing	55 °C	40 mp
4. extension	72°C	30 mp
5. lezárás	72°C	420 mp
6. hűtés	4°C	∞

1%-os agaróz gél készítése

Kimértünk 1g agarózt egy steril Erlenmeyer-lombikba. Ehhez hozzá öntöttünk 100 ml 1x-es TBE puffert. Ezt melegítettük addig, amíg teljesen homogén lett az oldat, és már nem látszottak az agaróz kristályok. A fluoreszcens festék hozzáadása után hűlni hagytuk, míg elérte az 50-60°C-os hőmérsékletet.

5.Eredmények

A baktériumok és gombák párhuzamos detektálása multiplex real-time PCR segítségével, faj specifikus azonosítás

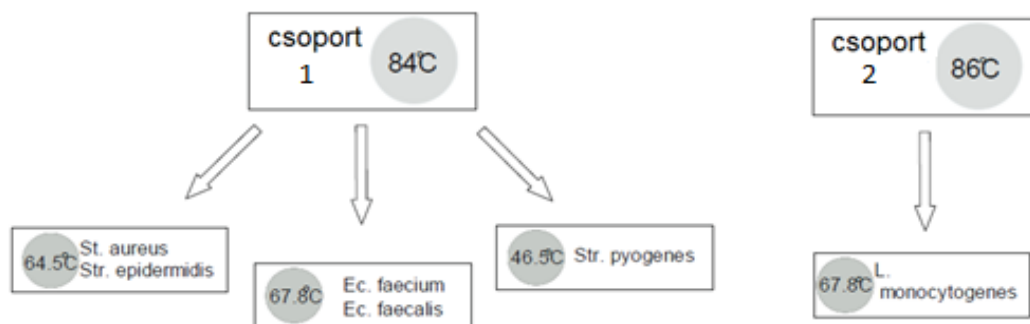
A gombák, Gram negatív és Gram pozitív baktériumok elkülönítése

Minden faj DNS-ét preparáltuk, majd mindegyikkel elvégeztük a kísérletet. 3 detektáló csatorna adhatott jelet, és tette lehetővé a gombák illetve Gram negatív és Gram pozitív baktériumok elkülönítését. Az F1 csatornán (540 nm) a gombák azonosítására alkalmas. Ha bekötődik valamelyik baktérium próba, akkor a másik két csatornán ad jelet, ebből következik, hogy ha az F1-es csatornán jelet adó fertőző ágens mindenképpen gomba. Az F2 (640 nm) csatorna a Gram negatív baktériumok detektálására szolgál. Ha a Gram negatív próba köt be, akkor a SYBRGreen interkalálódó festék annak adja át a gerjesztettséget, az fog jelet adni az F2-es csatornán. Az F3 (705 nm) csatorna a Gram pozitív baktériumok azonosítására szolgál.

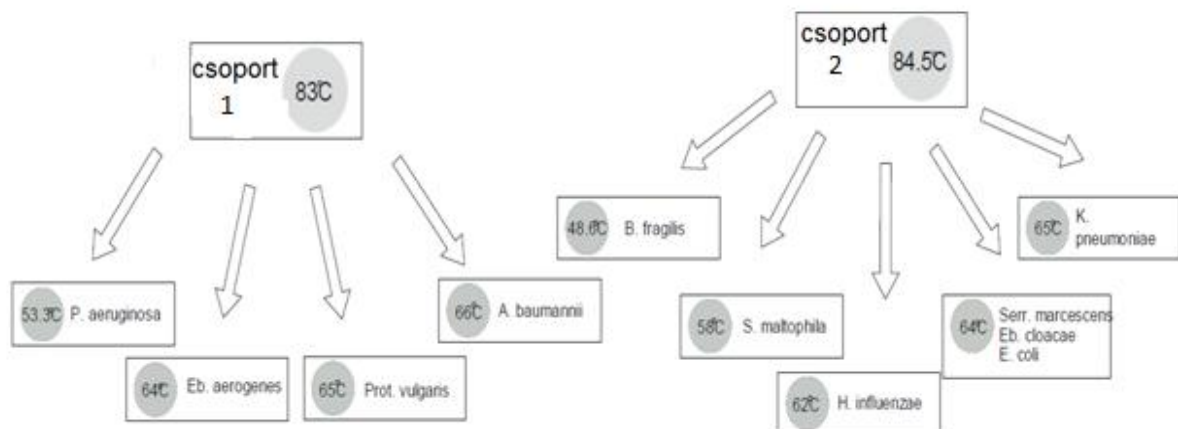
Faj szerinti identifikálás

Ezután a próbák meltingpoint (T_m) és a teljes PCR termék analízisével lehet faj szerint identifikálni 4 G⁺ és 9 G⁻ baktérium alcsoportot. A gomba patogének közül 14-et lehetet elkülöníteni az ITS szekvencia segítségével [20].

Gram pozitív baktériumok

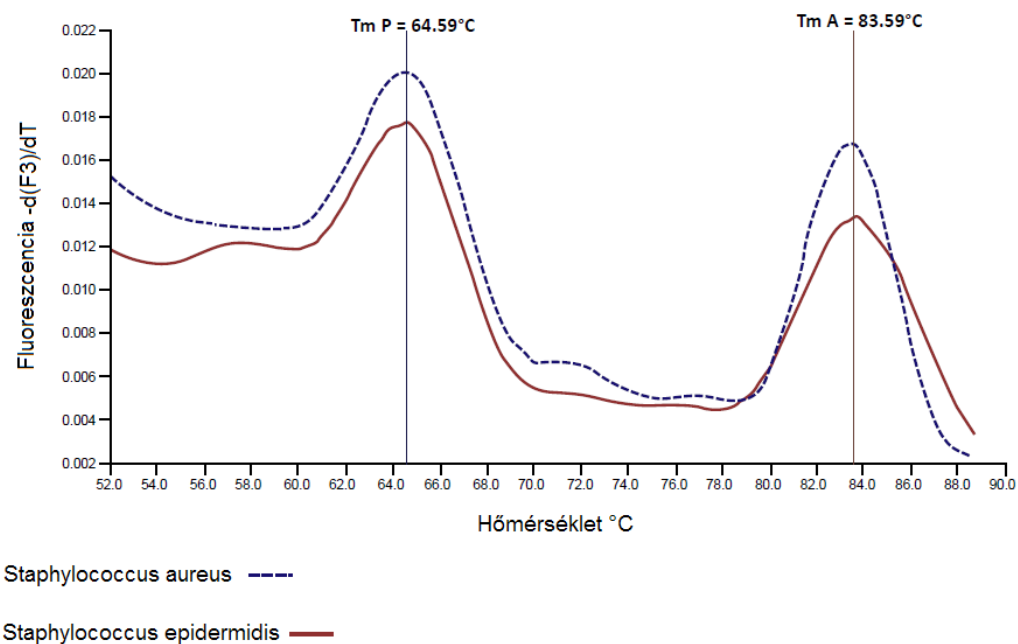


Gram negatív baktériumok



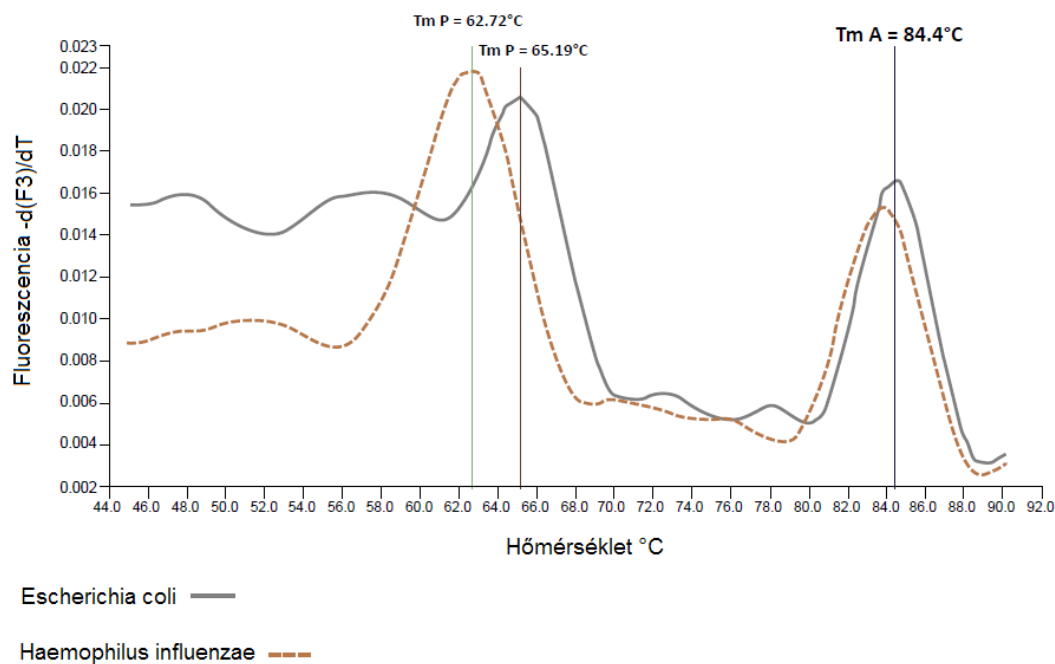
4.ábra Baktérium patogének identifikálása T_m alapján. A csoportok a patogének teljes T_m pontját jelzi, míg az alcsoportok hőmérséklete a hibridizációs próbákra vonatkoznak.

(Forrás: Horváth Á. et al., 2013)



5. ábra A *Staphylococcus aureus* és a *Staphylococcus epidermidis* T_m -je

Ezekből az adatokból arra lehet következtetni, hogy a *Staphylococcus aureus* és a *Staphylococcus epidermidis* közel fekvő meltingpointjuk miatt nem különíthetők el a 16S RNS szekvencia alapján. Ezen klinikailag jelentős fajok azonosítása antibiotikum rezisztenciával végezhető [21]. A két *Enterococcus* faj esetében sem sikerült a faj szintű azonosítás [22].



6. ábra *Escherichia coli* és *Haemophilus influenzae* elkülönítése T_m alapján

A két baktériumnak igen közel van a 16S RNS szekvencia T_m pontja, ez alapján nem lehet elkülöníteni, viszont a próbák T_m pontja alapján egyértelműen identifikálható a két faj. Azaz a real-time PCR amplikonok és a próbák olvadási hőmérsékletének a kombinációjából lehet faj specifikusan azonosítani a Gram negatív baktériumokat az F3 csatornán. Ugyanígy lehetséges azonosítani a Gram pozitív baktériumokat az F2 csatornán.

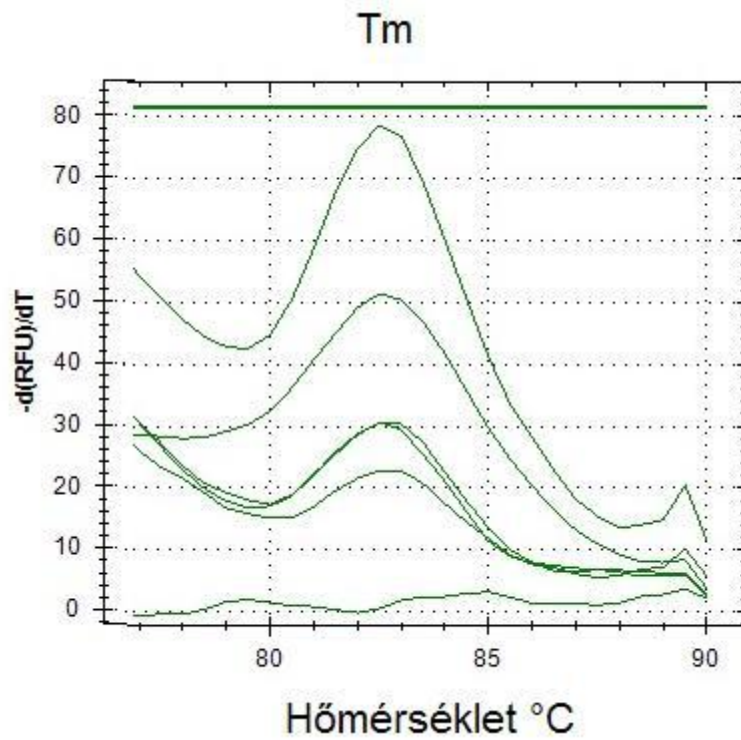
A reakció érzékenysége vizsgálat a templát DNS koncentrációjának változtatásával

2. táblázat A PCR érzékenysége

Mikroba törzsek	A pozitív PCR-ek száma (%)				
	50 CFU	10 CFU	5 CFU	2 CFU	1 CFU
Gram pozitív (G+)					
<i>Enterococcus faecalis</i>	8(100)	8(100)	5(62.5)	2(25)	0(0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	8(100)	8(100)	7(87.5)	3(37.5)	0(0)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	8(100)	8(100)	5(62.5)	5(62.5)	0(0)
Gram negatív (G-)					
<i>Enterobacter aerogenes</i>	8(100)	8(100)	5(62.5)	2(25)	0(0)
<i>Escherichia coli</i>	8(100)	8(100)	6(75)	1(12.5)	0(0)
<i>Haemophilus influenzae</i>	8(100)	7(87.5)	4(50)	0(0)	0(0)
Gomba					
<i>Candida albicans</i>	8(100)	8(100)	5(62.5)	0(0)	0(0)
<i>Candida tropicalis</i>	8(100)	8(100)	6(75)	1(12.5)	0(0)

A reakció érzékenysége vizsgálatához 3 Gram negatív, 3 Gram pozitív és két gomba fajt használtunk. Egészséges vért fertőztünk különböző koncentrációjú templátokkal. Az adatokból látszik, hogy a 100x-os hígítású mintáknál mind a 8 reakció sikeres volt mindegyik mikrobánál. 200x-os hígításnál egy reakció híján mindegyik sikeres volt. 1000x-es hígításnál nagyjából a fele PCR volt sikeres. 2000x-es hígításnál kevesebb, mint a fele sikerült. 5000x-esnél pedig egyáltalán nem amplifikálódott fel a templát DNS.

Ezekből az adatokból megállapítható, hogy a reakció érzékenysége 5 CFU.



7. ábra *Streptococcus pyogenes* olvadási hőmérsékletének vizsgálatából kapott melting görbék
Ebben a kísérletben a templát DNS-t hígítottuk különböző mértékben. 100x-os, 200x-os, 1000x-es, 2000x-es és 5000x-es hígításban végeztük el a reakciót.
Ebből a grafikonból megállapítható, hogy nem csak detektálni, hanem azonosítani is lehetséges a meltingpoint alapján a baktériumot, még a legnagyobb hígításban is.

6. Megbeszélés

Valós idejű PCR segítségével hatásosan ki lehet mutatni és identifikálni lehet a leggyakoribb szepszist okozó gomba és baktérium fajokat. Hagyományos tenyésztéses módszerrel rendkívül időigényes a fertőző ágensek kimutatása és azonosítása, ehhez a módszerhez viszont kevesebb, mint 4 óra elegendő. A módszer a baktériumoknál a 16S rRNS szekvencián alapul, mivel ez egy rendkívül konzervált szekvencia. Gombáknál az 5,8S és a 28S rRNS szekvencia közötti variábilis régiót lehet amplifikálni, és ez alapján meghatározni a gombafajt. A gombák és baktériumok elkülönítése eredményének az ellenőrzésére gélelektroforézis [23,24] vagy meltingpoint analízis [25] használható. A bakteriális DNS amplifikálásához PLK1 és PLK2 primer párt alkalmazva 187 bp hosszúságú DNS szakaszt lehet felszokszorosítani. Gombáknál az ITS4 és ITS86 primer pár alkalmas a fent említett variábilis régió amplifikálásához, ami egy 192-494bp hosszúságú szakasz. A LightCycler (Roche, Basel, Svájc) készülék felhasználásával alkalmazni lehet a FRET technikát a korokozók detektálásához és azonosításához. A LC 3 csatornán képes detektálni. A FRET technikával egy aspecifikus interkalálódó festék segítségével gerjeszteni lehet a különböző baktérium próbákat, ez által a 3 csatornán detektálni lehet a Gram pozitív, Gram negatív baktériumokat és a gombákat. A patogének identifikálása meltingpoint analízis segítségével valósulhat meg, kihasználva a különböző kórokozók és a próbák különböző melting pontjait. Az antibiotikum rezisztencia nem állapítható meg ezzel a prototípus rendszerrel, ehhez sajnos egy másik PCR szükséges [26].

A patogének mennyisége általában a szepszises vérben 3 CFU és 100 CFU között van [27,28]. Kísérleteink alapján megállapítható, hogy az általunk kidolgozott rendszer érzékenysége 5 CFU. Ebből következik, hogy megfelelő DNS preparálással lehetséges a mikrobák kimutatása, és azonosítása ezzel a módszerre.

Összefoglalva a szepszist okozó ágensek kimutatása és identifikálása kevesebb, mint 4 óra alatt lehetséges, ami lehetővé teszi a korai célzott terápiát. Ezzel szemben a hagyományos tenyésztéses módszer időigénye 24-72 óra [6,29].

7. Összefoglalás

- Lehetséges a bakteriális kórokozók azonosítása real-time PCR amplikon és FRET próbák olvadási hőmérsékletei alapján.
- Sikeresen lehet gombákat és a baktériumokat párhuzamos detektálni multiplex real-time PCR segítségével.
- A reakció érzékenysége vizsgálatával megállapítható, hogy 5 CFU az érzékenysége az általunk kidolgozott rendszernek.

8. Irodalom jegyzék

1. Danai PA, Moss M, Mannino DM, Martin GS (2006) *The epidemiology of sepsis in patients with malignancy. Chest* 129: 1432-1440.
2. Bone, RC, Balk RA, Cerra, FB, et al (1992) *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis: the ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest* 101,1644-1655.
3. Ludwig E., Szalka A. (2009): *Infektológia. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest.*
4. Martin G S, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003) *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med*, 348:1546–1554.
5. Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke PN (2007) *Polymicrobial bloodstream infections involving Candida species: analysis of patients and review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis* 59: 401-406.
6. Tissari P, Zumla A, Tarkka E, Mero S, Savolainen L, Vaara M, Aittakorpi A, Laakso S, Lindfors M, Piiparinen H, Mäki M, Carder C, Huggett J, Gant V (2010) *Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study, PMID: 20004964.*
7. Gergely Lajos (1999): *Orvosi mikrobiológia, Semmelweis Kiadó, Budapest.*
8. Leggieri N, Rida A, François P, Schrenzel J (2010) *Molecular diagnosis of bloodstream infections: planning to (physically) reach the bedside. Curr Opin Infect Dis* 23: 311-319.
9. Rozgonyi F., Kristóf K., Dobay O. (2006): *Laboratóriumi munka-in: Rozgonyi F. (ed): Klinikai: járóbeteg szakorvosi és házi orvosi mikrobiológiai gyorsdiagnosztika, I. kötet: Bakteriális fertőzések diagnosztikája – HOM-IR Kft, Budapest, 357-420.*

10. Gomez-Lopez A., Martin-Gomez M. T., Martin-Davila P., Lopez-Onrubia P., Gavalda J., Fortun J., Pahissa A., Rodriguez-Tudela J., L., Cuenca-Estrella M., (2006): *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 56;387-393.
11. Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, Duchateau V, Rodriguez-Villalobos H, Aoun M, Crokaert F (2003): *Rapid detection of Candida albicans in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. J Clin Microbiol.*; 41(7):3293-8.
12. Bolehovska R, Pliskova L, Buchta V, Cerman J, Hamal P (2006) *Detection of Aspergillus spp. in biological samples by real-time PCR - Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*; 150(2):245-8.
13. Didenko VV (2001) *DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. Biotechniques* 31: 1106-1116, 1118, 1120-1.
14. Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, Book M, Hoeft A, et al. (2002) *Real-time PCR for detection and differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria. J Clin Microbiol* 40: 4304-4307.
15. Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, Book M, Gebel J, et al. (2004) *Detection and differentiation of in vitro-spiked bacteria by real-time PCR and melting-curve analysis. J Clin Microbiol* 42: 512-517.
16. Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, et al. (2011) *Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. J Clin Microbiol* 49: 2252-2258.
17. Ellner PD, Stoessel CJ, Drakeford E, Vasi F. (1966) *A new culture medium for medical bacteriology*; 45(4):502-4.
18. Lott TJ, Kuykendall RJ, Reiss E (1993) *Nucleotide sequence analysis of the 5.8S rDNA and adjacent ITS2 region of Candida albicans and related species. Yeast* 9: 1199-1206.

19. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, et al. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 6241-6246.

20. Somogyvari F, Serly J, Doczi I, Nagy E (2005) Molecular differentiation of most frequent *Candida* species causing blood-stream infection. *Mycoses* 2: S198.

21. Kilic A, Basustaoglu AC (2011) Doubletriplexreal-time PCR assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus haemolyticus* and determination of their methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. *Res Microbiol* 162: 1060-1066.

22. Maheux AF, Bissonnette L, Boissinot M, Bernier JL, Huppé V, et al. (2011) Method for rapid and sensitive detection of *Enterococcus* sp. and *Enterococcus faecalis/faecium* cells in potable water samples. *Water Res* 45: 2342-2354.

23. Ferrer C, Colom F, Frasés S, Mulet E, Abad JL, et al. (2001) Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol* 39: 2873-2879.

24. Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM (1999) Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J Clin Microbiol* 37: 1846-1851.

25. Khan Z, Mustafa AS, Alam FF (2009) Real-time LightCycler polymerase chain reaction and melting temperature analysis for identification of clinically important *Candida* spp. *J Microbiol Immunol Infect* 42: 290-295.

26. Waldeisen JR, Wang T, Mitra D, Lee LP (2011) A real-time PCR antibiogram for drug-resistant sepsis. *PLoS One* 6: e28528.

27. Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagmeyer L, et al. (2000) Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the lightcycler system. *J Clin Microbiol* 38: 586-590.

28. Bouza E, Sousa D, Rodríguez-Créixems M, Lechuz JG, Muñoz P (2007) Is the volume of blood cultured still a significant factor in the diagnosis of bloodstream infections? *J Clin Microbiol* 45: 2765-2769.
29. Cleven BE, Palka-Santini M, Gielen J, Meembor S, Krönke M, et al. (2006) Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. *J Clin Microbiol* 44: 2389-2397.
30. Somogyvari F, Horvath A, Serly J, Majoros H, Vagvolgyi C, Peto Z. (2012) Detection of invasive fungal pathogens by real-time PCR and high-resolution melting analysis. *Nov-Dec; 26(6):979-83.*
31. Ádám Horváth, Zoltán Pető², Edit Urbán³, Csaba Vágvolgyi⁴ and Ferenc Somogyvári (2013) A novel, multiplex, real-time PCR-based approach for the detection of the commonly occurring pathogenic fungi and bacteria 10.1186/1471-2180-13-300.
32. N. Paul, J. Shum, and T. (2010) LeHot start PCR, *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ, vol. 630, pp. 301–318,

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Burián Katalin Docensasszonynak, az Orvosi Mikrobiológiai és Immunológiai Intézet vezetőjének, hogy munkámat az intézetében végezhettem.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Somogyvári Ferenc docensnek és Dr. Horváth Ádámnak az önzetlen segítségükért TDK dolgozatom elkészítésében.

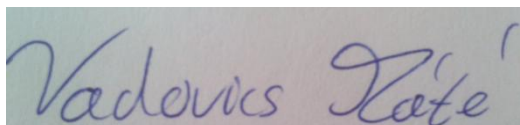
Hálásan köszönöm Müllerné Deák Györgyinek a munkám során nyújtott technikai segítségét.

Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Vadovics Máté a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- referencia törzsek leoltását, tenyésztését
- a mikroorganizmusok koncentrációjának beállítását Bürker kamrás számlálás segítségével
- real-time PCR összeméréseit
- agaróz gélelektroforézis kivitelezését

végeztem el.



.....
aláírás

Szeged, 2014. június 20