

Typizácia baktérií založená na analýze DNA

HANA DRAHOVSKÁ - TOMÁŠ KUČTA

SÚHRN. Prezentuje sa prehľad metód na typizáciu baktérií založených na analýze DNA, pričom dôraz sa kladie na metódy použiteľné v prípade potravinársky významných patogénov. Uvádzajú sa princípy, parametre a aplikovateľnosť analýzy plazmidov, metód založených na restrikcii chromozómovej DNA (polymorfizmus restrikčných fragmentov, RFLP; elektroforéza v pulzujúcom elektrickom poli, PFGE; RFLP-Southern blotting; ribotypizácia), metód využívajúcich polymerázovú reťazovú reakciu (génovošpecifická PCR; PCR-ribotypizácia; polymorfizmus náhodne amplifikovanej DNA, RAPD; PCR orientovaná na repetitívne sekvencie; polymorfizmus amplifikovanej DNA, AFLP) a typizácie sekvenovaním vybraných génov, MLST. Pozornosť sa venuje tiež spôsobom vyhodnotenia údajov získaných metódami DNA typizácie.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: polymerázová reťazová reakcia; polymorfizmus; restrikčný fragment; amplifikovaná DNA

Typizácia baktérií patrí k dôležitým úlohám aplikovanej mikrobiológie. V potravinárskej i lekárskej mikrobiológii je často potrebné zaradiť izolovaný bakteriálny kmeň nielen na taxonomickej úrovni druhu, prípadne poddruhu, ale aj zaradiť ho do skupín na nižšej úrovni. Typizácia bakteriálnych kmeňov je potrebná napríklad pri určovaní zdroja nákazy a sledovaní postupu alimentárnych alebo nozokomiálnych nákaz, pri zisťovaní recidívy ochorenia alebo pri štúdiu mechanizmu patogenézy.

Typizačné metódy musia spĺňať nasledujúce požiadavky [1]:

1. Typizovateľnosť väčšiny organizmov v rámci súboru.
2. Diskriminačná sila, čiže schopnosť odlíšiť potomkov jedného klonu od nepříbuzných kmeňov. Táto veličina je charakterizovaná pomocou Simpsonovho indexu diverzity (D , [2]), ktorý udáva pravdepodobnosť, že

RNDr. Hana DRAHOVSKÁ, PhD., Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava.

RNDr. Tomáš KUČTA, CSc., Oddelenie mikrobiológie a chémie, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, P. O. box 25, 824 75 Bratislava 26.

Korešpondujúci autor: RNDr. Hana DRAHOVSKÁ, PhD., e-mail: drahovska@fns.uniba.sk

dva nepříbuzné kmene budú zaradené do rôznych skupín. Jej hodnota by mala byť $>0,95$.

3. Reprodukovateľnosť, čiže zhoda výsledkov po opakovanej analýze. Táto je významná hlavne pri porovnávaní neznámych kmeňov s databázou známych kmeňov, pri dlhodobom sledovaní a pri medzilaboratórnych porovnávaniach.

Dodatočnými požiadavkami sú čo najväčšia jednoduchosť vyhodnotenia výsledkov, technická a materiálová nenáročnosť atď.

V súčasnej mikrobiologickej praxi sa najčastejšie používajú fenotypové typizačné metódy, pomocou ktorých sa baktérie typizujú na základe biochemickej aktivity (biotypizácia), reaktivity s protilátkami (sérotypizácia), reaktivity s baktériofágmi (fagotypizácia), citlivosti k antibiotikám a pod. (prehľad metód uvádza napríklad [3]). Fenotypové typizačné metódy sú vypracované pre mnohé skupiny baktérií, overené na veľkých súboroch kmeňov a je o nich dostatok informácií na základe ich rutinného používania v mnohých laboratóriách. Tieto metódy však majú niektoré nevýhody, predovšetkým obmedzenú schopnosť diskriminácie medzi kmeňmi, keďže počet vlastností, ktoré sa môžu analyzovať, je obmedzený. Zároveň výsledky typizácie môžu byť skreslené variabilnou expresiou vlastností vplyvom prostredia. Uvedené nevýhody je možné prekonať použitím genotypových typizačných metód, ktoré sú založené na priamej analýze DNA. Medzi výhody týchto metód patrí aj možnosť ich aplikácie na typizáciu nekultivovateľných baktérií.

Ideálnou metódou na genotypovú typizáciu baktérií je sekvenovanie celého genómu. Z technických príčin však v dnešnej dobe takýto prístup nie je reálny, ale začína sa už používať kompromisné riešenie, sekvenovanie vybraných génov (metóda MLST, viď ďalej). Väčšina genotypových typizačných metód, ktoré sú v súčasnosti k dispozícii, je založená na menej komplexnom prístupe. Rozdiely v sekvencii DNA sa zisťujú nepriamo pomocou štiepenia restriktívnymi endonukleázami, hybridizáciou so špecifickými DNA sondami, polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) alebo kombináciou týchto metód. V baktériách, ktoré obsahujú extrachromozomálnu DNA vo forme plazmidov, je možné použiť na typizáciu aj analýzu plazmidov. Rôznymi aspektami typizácie baktérií pomocou metód založených na analýze DNA a jej praktickými aplikáciami sa zaoberá niekoľko prehľadových článkov a monografií (napríklad [1, 4-7]).

Analýza plazmidov

Analýza plazmidov (plasmid profiling) patrí k prvým genotypovým typizačným metódam. Spočíva v zisťovaní prítomnosti a identifikácii plazmidov v bunke, tzv. plazmidového profilu. Jednotlivé plazmidy sa najprv identifikujú na základe veľkosti, stanovenej pomocou elektroforézy v agarózovom géli, a presnejšie sa môžu identifikovať napríklad pomocou restriktívnej analýzy. Metóda analýzy plazmidov je pomerne nenáročná a často sa používa napríklad pri štúdiu kmeňov salmonel [8,9]. Metódu je možné použiť len pre kmene, ktoré obsahujú plazmidy. Pri vyhodnotení výsledkov treba pritom brať do úvahy genetickú nestálosť plazmidov, ktoré sa môžu eliminovať pri subkultivácii bez straty životaschopnosti bunky a môžu sa tiež prenášať medzi nepríbuznými kmeňmi.

Metódy založené na restrikcii chromozómovej DNA

Metódy založené na restrikcii (špecifickom enzýmovom štiepení) chromozómovej DNA umožňujú typizáciu baktérií na základe polymorfizmu restriktívnych fragmentov (restriction fragment length polymorphism, RFLP). V prvom kroku sa chromozomálna DNA štiepi restriktívnou endonukleázou, čím vzniknú fragmenty rôznej veľkosti, ktoré je možné rozdeliť elektroforézou v agarózovom géli. V dôsledku polymorfického umiestnenia štiepných miest restriktívnych enzýmov vzniknú v rôznych bakteriálnych kmeňoch rôzne dlhé štiepne fragmenty. Touto metódou sa detegujú dva druhy zmien v organizácii DNA: zámeny báz v rozoznávacej sekvencii pre restriktívnu endonukleázu (čím buď vznikne, alebo zanikne restriktívne miesto) a väčšie zmeny ako inzercie, delécie, strata alebo získanie profága, transpozónu alebo iné prestavby chromozómu, čím sa zmení veľkosť fragmentu.

V prípade, keď sa štiepi celá chromozómová DNA, vzniká naraz veľké množstvo fragmentov, ktoré spravidla nie je možné účinne analyzovať jednoduchou elektroforézou v agarózovom géli. Dobré rozdelenie veľkých fragmentov DNA získaných restriktívnou analýzou umožňuje pulzná elektroforéza (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE). Pri použití RFLP v spojení s PFGE sa kultúra baktérií zmieša s tekutou agarózou a vyleje sa do formy. Výsledkom sú agarózové bloky, ktoré obsahujú celé bunky. DNA sa z baktérií uvoľní pôsobením detergentu a štiepi sa restriktívnym enzýmom (napr. *Sma*I, *Xho*I), ktorý má v bakteriálnom chromozóme málo rozoznávacích miest. Týmto postupom sa DNA rozdelí na menej ako 30 fragmentov s veľkosťou 10–800 kb. Potom sa agarózová zátka zaleje do agarózy a analy-

zuje sa elektroforézou v elektrickom poli, ktorého polarita sa mení v pravidelných intervaloch. Pulzujúce elektrické pole umožní účinnú separáciu veľkých fragmentov.

Metóda RFLP-PFGE sa vzhľadom na vysokú reprodukovateľnosť a diskriminačnú silu v súčasnosti považuje za „zlatý štandard“ metód genotypovej typizácie. Táto metóda sa často používa pri zisťovaní klonality kmeňov pri epidémiách. V prípade kmeňov salmonel bola zaznamenaná variabilita PFGE profilov medzi sérotypmi, ako aj v rámci jedného sérotypu [10-12]. Pomocou RFLP-PFGE bolo možné tiež rozlíšiť rôzne profily medzi kmeňmi *Salmonella* Typhimurium fágotypu DT104 [13,14].

Limitujúcim faktorom metódy je čas potrebný pre analýzu (výsledky sa získajú za 2–3 dni) a potreba špeciálnej aparatury na pulznú elektroforézu, ktoré redukujú možnosť analýzy väčších počtov kmeňov.

Inou možnosťou identifikácie restričných fragmentov je Southernova hybridizácia. V tomto prípade sa fragmenty DNA po elektroforéze v agarózovom géli prenesú na nitrocelulóзовú alebo nylonovú membránu a hybridizujú sa so značenou sondou. Enzýmovo alebo rádioaktívne označená sonda zviditeľní iba určité fragmenty, takže interpretácia výsledkov je jednoduchšia. Pre vyhľadávanie variability medzi geneticky príbuznými kmeňmi je vhodné využiť DNA sondy s vysokým stupňom polymorfizmu. Takými sú napríklad sondy odvodené od inzerčných sekvencií, ako je IS200 v salmonelách [15]. Pre každý bakteriálny druh je dôležitý výber a optimalizácia sekvencie sond, restričných enzýmov, elektroforézy a hybridizačných podmienok. Účinnosť tejto metódy je možné zvýšiť použitím väčšieho počtu rôznych DNA sond, restričných endonukleáz a ich vzájomných kombinácií. Táto metóda je komplikovaná, časovo náročná, vyžaduje špeciálnu techniku a zručnosť.

Jedným z variantov RFLP-Southern blottingu je ribotypizácia, v ktorej sa používajú hybridizačné sondy odvodené od rRNA operónu. Baktérie obsahujú niekoľko rRNA operónov, rozmiestnených po celej dĺžke chromozómu. Ich sekvencia je konzervatívna v rámci celej bakteriálnej ríše. Ribotypizácia je vhodná na diferenciáciu rôznych bakteriálnych druhov a považuje sa za reprodukovateľnú subtypizačnú metódu. Použila sa napríklad na typizáciu salmonel [10,16], listérií [17] a enterokokov [18]. Jej diskriminačná sila je nižšia ako pri PFGE-RFLP, na druhej strane ribotypy kmeňov sú pomerne stabilné a preto je táto metóda vhodná pre dlhodobé epidemiologické sledovania.

Metódy využívajúce polymerázovú reťazovú reakciu (PCR)

Génovošpecifická PCR

Pri tejto metóde sa zisťuje prítomnosť určitých sekvencií DNA (napríklad génov kódujúcich faktory virulencie, génov rezistencie na antibiotiká) pomocou génovošpecifických primérov. Pomocou multiplexnej PCR je možné analyzovať naraz prítomnosť viacerých génov. Okrem prítomnosti vybraných génov je možné študovať aj ich variabilitu, a to nasledujúcou restriktívnou analýzou alebo sekvenovaním. Uvedená metóda je pomerne rýchla a nenáročná, jej nevýhodou je pomerne nízka diskriminačná schopnosť.

PCR-ribotypizácia

PCR-ribotypizácia (PCR-ribotyping alebo ITS-PCR) je často používaná metóda, v ktorej sa amplifikujú 16-23S medzigénové oblasti rRNA operónu (ITS, internal transcribed spacer), pomocou primérov orientovaných na konzervatívne oblasti [19]. V chromozóme baktérií sa nachádza viacero rRNA operónov, ktoré sa čiastočne líšia dĺžkou a sekvenciou medzerníkovej oblasti. Pri ITS-PCR vzniká niekoľko produktov, ktoré je možné rozdeliť elektroforézou v polyakrylamidovom géli. Okrem homoduplexných produktov PCR sa často tvoria aj heteroduplexné. Heteroduplexné štruktúry vznikajú v prípade tvorby viacerých, čiastočne homologických amplifikačných produktov, ktoré navzájom hybridizujú. Heteroduplexy majú značne redukovanú elektroforetickú pohyblivosť v porovnaní s homoduplexnou DNA a zároveň ich pohyblivosť je citlivá na sekvenčné zloženie medzerníkovej oblasti. Preto prítomnosť heteroduplexných produktov zvyšuje diskriminačnú silu ITS-PCR typizácie. Mapovanie variability medzerníkových oblastí je metóda vhodná pre účely typizácie baktérií na úrovni druhov a často aj na nižšej fylogenetickú úrovni. Táto metóda sa použila napríklad na diskrimináciu kmeňov *Bacillus cereus* [20] a *Salmonella enterica* [21,22], pričom väčšina sérotypov salmonel mala jeden špecifický ITS-PCR profil.

Polymorfizmus náhodne amplifikovanej DNA

Táto metóda umožňuje typizáciu baktérií na základe polymorfizmu náhodne amplifikovanej DNA (random-amplified polymorphic DNA, RAPD; metóda sa tiež označuje arbitrarily-primed PCR, AP-PCR) [23,24]. Pri tejto metóde sa používajú náhodné priméry s veľkosťou 9–10 bp, ktoré hybridizujú s chromozómovou DNA pri nízkej anelačnej teplote. Ak dva priméry s aspoň čiastočnou homológiou hybridizujú vo vzdialenosti do niekoľkých kilobáz v opačnej orientácii, vznikne medzi nimi produkt PCR. Jednotlivé produkty PCR sa analyzujú elektroforeticky, pričom fragmenty DNA

vytvárajú profily špecifické pre jednotlivé bakteriálne kmene. Odlišnosti profilov spočívajú v prítomnosti alebo neprítomnosti určitého fragmentu DNA alebo v zmene jeho veľkosti. Absencia amplifikovaného fragmentu môže byť spôsobená zmenou nukleotidovej sekvencie v hybridizačnom mieste priméru, zmena veľkosti môže byť spôsobená inzerciou alebo deléciou v oblasti medzi dvoma primérmami [25].

RAPD je pomerne jednoduchá a rýchla metóda, vhodná na typizáciu mikroorganizmov bez predchádzajúcich znalostí sekvencie genómu. RAPD často umožňuje subtypizáciu kmeňov toho istého sérotypu a zároveň odlišenie kmeňov patriacich k rôznym druhom [16]. Veľkou nevýhodou tejto metódy je však jej nízka reprodukovateľnosť a problémy pri jej štandardizácii. Vo väčšine prípadov sa sekvencie primérov pre RAPD, ktoré generujú profily s najlepšou diskrimináciou, musia určiť empiricky. Samotný amplifikačný proces je extrémne citlivý aj na zmeny reakčných podmienok (použitie chemikálie, druh DNA polymerázy, anelačná teplota), preto už ich malé odchýlky vedú k variabilite profilu pri testovaní toho istého kmeňa [26].

Metódy PCR orientovanej na repetitívne sekvencie

Versalovic a kol. [27] vypracovali typizačnú metódu založenú na amplifikácii úsekov DNA medzi repetitívnymi sekvenciami. Je známych niekoľko typov bakteriálnych repetitívnych sekvencií: repetitívne extragénové palindrómy (REP) s veľkosťou 38 bp, enterobakteriálne repetitívne intergénové konsenzové sekvencie (ERIC) dlhé 126 bp a repetitívne sekvencie BOX. Funkcia jednotlivých repetitívnych sekvencií nie je známa, ale predpokladá sa, že zohrávajú úlohu v stabilizácii DNA a v génovej expresii. Typizačné metódy založené na PCR orientovanej na repetitívne sekvencie využívajú skutočnosť, že v rôznych baktériách sa medzi repetitívnymi sekvenciami nachádzajú rôzne dlhé úseky DNA. Vhodnosť týchto metód na typizáciu jednotlivých bakteriálnych rodov závisí na počte a rozmiestnení repetitívnych sekvencií v ich genóme. Najúspešnejšie sa tieto metódy použili na typizáciu enterobaktérií [28-30]. Výhodou metódy je jej relatívna rýchlosť a jednoduchosť, nevýhodou je jej nedostatočná reprodukovateľnosť [31]. Príčinou je pravdepodobne anelácia v podmienkach neúplnej homológie, takže niektorí autori považujú REP-PCR iba za špecifickejšiu formu RAPD [32].

Polymorfizmus amplifikovanej DNA

Polymorfizmus amplifikovanej DNA (amplified fragment length polymorphism, AFLP) je typizačná metóda založená na selektívnej amplifikácii fragmentov DNA, vzniknutých štiepením restriktívnymi endonukleázami [33]. Metóda je využiteľná na typizáciu širokého spektra organizmov a pritom

vyvíka vysokou diskriminačnou silou a reprodukovateľnosťou [34]. Pri typizácii bakteriálnych kmeňov metódou AFLP sa purifikovaná chromozómová DNA štiepi dvoma restričnými endonukleázami, z ktorých jedna je často štiepiaca s rozoznávacou sekvenciou dĺžky 4 bp (napr. *MseI*, *TaqI*), druhá je zriedka štiepiaca s rozoznávacou sekvenciou dĺžky 6 bp (napr. *EcoRI*). Štiepením vzniknú tri typy fragmentov (v tomto prípade *MseI*–*MseI*, *EcoRI*–*EcoRI*, *MseI*–*EcoRI*). Po štiepení sa k fragmentom DNA pripoja v ligačnej reakcii dvojvláknové adaptéry, čím sa zjednotia sekvencie na koncoch molekúl. Adaptéry sú navrhnuté tak, aby pri ligácii k fragmentu chromozómovej DNA došlo k zániku restričného miesta, čo umožňuje ligovať v prítomnosti restričných endonukleáz. Zároveň adaptéry nie sú fosforylované, a preto nedochádza k ich multimerizácii. V ďalšom kroku sa zmes po ligácii použije ako templát v PCR s dvomi primérmi komplementárnymi ku koncom molekúl. Hoci veľká väčšina (>90 %) fragmentov po štiepení je typu *MseI*–*MseI*, v PCR sa prednostne amplifikujú fragmenty *MseI*–*EcoRI*. Táto prednostná amplifikácia je pravdepodobne spôsobená nižšou teplotou topenia *MseI*-priméru oproti *EcoRI*-priméru, a tiež tým, že *MseI*–*MseI* fragmenty majú na koncoch inverzné opakovania, ktoré môžu počas anelácie vytvárať slučky a inhibovať PCR [33]. Priméry sa skladajú z jadrovej sekvencie komplementárnej k sekvencii adaptéru s časťou restričného miesta a z jedného až troch selektívnych nukleotidov na 3'-konci priméru.

Na počet amplifikovaných fragmentov vplýva počet selektívnych nukleotidov na 3'-konci primérov. Každý selektívny nukleotid zníži počet produktov PCR na štvrtinu, takže napríklad dva priméry s jedným selektívnym nukleotidom na 3'-konci amplifikujú iba jeden zo šiestnástich fragmentov. Táto redukcia počtu fragmentov je výhodná pre jednoduchšie vyhodnotenie vzniknutých profilov, pretože týmto spôsobom je možné dosiahnuť optimálny počet asi 50 fragmentov v jednom profile. Selektivita s jedným (+1 primér) alebo dvoma nukleotidmi na 3'-konci je optimálna, v prípade troch selektívnych nukleotidov je uspokojivá, ale pri použití štyroch selektívnych nukleotidov vedie k strate selektivity a k tolerancii nehomologických sekvencií [33].

V ďalšom kroku sa amplifikované fragmenty separujú elektroforézou v polyakrylamidovom géli v denaturačných podmienkach a detegujú pomocou rádioaktívne značených primérov. Lacnejšou alternatívou je farbenie gélov striebrom [35]. Inou možnosťou je použitie kapilárnej elektroforézy automatického sekvenátora [11,36], čím sa dosiahne citlivejšia detekcia a možnosť automatického vyhodnotenia výsledkov. Pre analýzu dát profilov jednotlivých bakteriálnych kmeňov sú dostupné komerčné aj voľne prístupné

počítačové programy. Pri vyhodnotení sa profily s homológiou 90–100 % pokladajú za identické bakteriálne kmene, homológia rôznych kmeňov v rámci jedného druhu sa pohybuje v rozmedzí 60–90 %.

Metóda AFLP sa ukázala ako vhodná na delenie kmeňov *Listeria monocytogenes* [37], *Salmonella enterica* [11] a *Salmonella Typhimurium* [12]. V posledných dvoch prípadoch boli výsledky porovnateľné s výsledkami získanými RFLP-PFGE typizáciou identických kmeňov. AFLP sa použila aj na typizáciu 71 kmeňov *Bacillus anthracis*, ktorý patrí medzi najviac monomorfické druhy. Každý kmeň sa analyzoval v 16 reakciách s použitím všetkých kombinácií +1 primérov, čím celkovo vzniklo 1221 rôznych fragmentov, z ktorých 1184 bolo monomorfických. Na základe zvyšných polymorfických fragmentov sa kmene rozdelili do dvoch genetických línií [38].

Na typizáciu niektorých baktérií sa vypracoval tiež zjednodušený variant AFLP s použitím iba jedného restriktčného enzýmu (*HindIII*) a jedného typu adaptéra. V tomto prípade vzniká menší počet fragmentov s väčšou molekulovou hmotnosťou, ktoré je možné rozdeliť elektroforézou v nativných agarózových géloch a jednoducho vyhodnotiť. Táto metóda sa použila napríklad na typizáciu listérií [39] a salmonel [40]. Diskriminačná sila tejto metódy je však pravdepodobne nižšia ako v prípade AFLP s dvomi restriktázami.

Metóda AFLP má praktické využitie pri typizácii rastlín, živočíchov a mikroorganizmov. Dajú sa ňou analyzovať zmeny spôsobené mutáciami v restriktčných miestach, zmeny v dĺžke restriktčných fragmentov, ale umožňuje tiež využívať zmeny v selektívnych nukleotidoch na 3'-konci primérov [34]. Metóda má dobrú reprodukovateľnosť a diskriminačnú silu. Je síce zložitejšia ako RAPD alebo PCR orientovaná na repetitívne sekvencie, ale pritom rýchlejšia ako RFLP-PFGE a pri použití automatického sekvenátora na vyhodnotenie profilov umožňuje automatizáciu.

Typizácia sekvenovaním vybraných génov

Typizácia sekvenovaním vybraných génov (multilocus sequence typing, MLST) je nová metóda, pri ktorej sa sekvenujú úseky niekoľkých reprezentatívnych génov v bakteriálnom genóme. Zámerom je získať výstižný pohľad na celogenómovú variabilitu typizovaných kmeňov. Metóda sa zaviedla na typizáciu patogénnych kmeňov *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Staphylococcus aureus* [41] a úspešne sa použila aj na typizáciu salmonel [42]. Výhodou MLST je vysoká reprodukovateľnosť, ľahká možnosť výmeny dát medzi laboratóriami a pri správnom výbere génov tiež výborná diskriminačná sila. Nevýhodou je ešte stále vysoká cena.

Vyhodnotenie údajov získaných metódami DNA typizácie

Pri typizácii malého počtu kmeňov je možné robiť vyhodnotenie vizuálnym porovnaním profilov jednotlivých kmeňov. Na vyhodnotenie väčších súborov je však potrebné použiť výpočtovú techniku a špecializovaný softvér, napríklad programy GelCompar a BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgicko), Taxotron (Taxolab, Institut Pasteur, Francúzsko) alebo Bio-Image Whole Band Analyzer (BioImage, AnnArbor, USA). Vstupným údajom programov sú spravidla obrázky vo formáte .tif, v ktorých sa identifikujú jednotlivé dráhy. Ďalším krokom je stanovenie molekulovej hmotnosti jednotlivých fragmentov porovnaním s interným alebo externým štandardom molekulových hmotností. Externý štandard sa elektroforeticky analyzuje oddelene od vzorky, interný štandard sa analyzuje spolu so vzorkou. Tento postup, nazývaný normalizácia, má za cieľ eliminovať rozdiely v elektroforetickej mobilite fragmentov DNA v jednotlivých dráhach gélu alebo v rôznych géloch. Následne sa identifikujú fragmenty, vytvoria sa profily pre jednotlivé typizované kmene a porovnávajú sa navzájom. Cieľom je určiť stupeň podobnosti medzi profilmi a zistiť vzájomnú príbuznosť typizovaných kmeňov.

Pri výpočte podobnosti medzi kmeňmi je možné použiť dva prístupy. Prvý je založený na porovnávaní prítomnosti a neprítomnosti jednotlivých fragmentov DNA v profiloch. Na výpočet indexu podobnosti sa používa Jacckardov koeficient:

$$S_{ij} = \frac{n_{ij}}{n_i + n_j - n_{ij}}$$

kde n_{ij} je počet spoločných fragmentov v profiloch i a j , n_i celkový počet fragmentov v profile i a n_j celkový počet fragmentov v profile j .

V prípade dvoch identických profilov je Jacckardov koeficient rovný 1, pre dva úplne rozdielne profily je rovný nule.

Alternatívne sa používa koeficient Diceho, ktorý pripisuje väčšiu váhu spoločným fragmentom:

$$S_{ij} = \frac{2n_{ij}}{n_i + n_j}$$

Druhou možnosťou pri vyhodnocovaní profilov je zahrnutie parametra kvantity fragmentu. Na výpočet sa používa Pearsonov korelačný koeficient, pomocou ktorého sa porovnáva intenzita signálu v zodpovedajúcich bodoch dráhy pre dva profily. Jeho hodnoty siahajú od 0 (žiadna podobnosť) po 1 (identita). Porovnávanie pomocou Pearsonovej korelácie sa používa v prípa-

doch, keď vznikajú fragmenty s rôznou intenzitou, prípadne pri vyhodnocovaní profilov obsahujúcich veľké množstvo fragmentov. Vo všeobecnosti sa však odporúča používať prvý prístup, koeficienty založené na porovnávaní prítomnosti fragmentov, pretože ich intragélková a intergélková reprodukovateľnosť je vyššia ako pri Pearsonovej korelácii.

Pri výpočte podobnosti je potrebné vhodne nastaviť parametre programu: optimalizačnú hodnotu a pozičnú toleranciu. Optimalizačná hodnota udáva maximálny povolený vzájomný posun dráh, keď sa dosahuje ich maximálny prekryv (praktická hodnota je 1 %). Pozičná tolerancia udáva maximálny povolený rozdiel vo veľkosti dvoch fragmentov, keď sa ešte považujú za identické (praktická hodnota je 1 %).

Vzájomným porovnaním všetkých profilov vznikne matica podobností profilov, ktorá obsahuje údaje o podobnosti (vyjadrené v percentách) medzi každými dvomi kmeňmi. Na jej základe je možné vypočítať stupeň príbuznosti medzi kmeňmi metódami klastrovej analýzy. Často sa používa metóda UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages). Skupiny kmeňov sa zaradia do skupín tak, že v každej skupine sa budú nachádzať kmene s určitou empiricky danou hodnotou podobnosti. Podrobnejšie údaje o metódach spracovania typizačných dát sú uvedené napríklad v práci [6].

Záver

Metódy založené na analýze DNA predstavujú významný prínos pre typizáciu baktérií, vrátane potravinársky významných patogénov. K dispozícii sú jednak rýchle a pomerne jednoduché metódy (napr. RAPD, REP-PCR), a tiež náročné a komplikované metódy s vysokou diskriminačnou silou a reprodukovateľnosťou (napr. RFLP-PFGE, AFLP). Do budúcnosti možno počítať s uplatnením typizačných metód využívajúcich sekvenovanie DNA.

Literatúra

1. MASLOW, J. - MULLIGAN, M. E.: Epidemiologic typing systems. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 17, 1996, s. 595-604.
2. HUNTER, P. R.: Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 1990, s. 1903-1905.
3. TOWNER, K. J. - COCKAYNE, A.: Conventional biological methods for microbial typing. In: *Molecular methods for microbial identification and typing*. London : Chapman and Hall, 1993, s. 3-15.

4. BUSCH, U. - NITSCHKO, H.: Methods for the differentiation of microorganisms. *Journal of Chromatography B*, 722, 1999, s. 263-278.
5. OLIVE, D. M. - BEAN, P.: Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1999, s. 1661-1669.
6. DIJKSHOORN, L. - TOWNER, K. J. - STRUELENS, M.: New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Amsterdam, London, New York, Oxford, Paris, Shannon, Tokyo : Elsevier, 2001. 372 s.
7. HEYNDRIKX, M. - RIJSENS, N. - HERMAN, L.: Molecular detection and typing of food-borne bacterial pathogens: A review. In: *Applied microbiology*. Ed. Durieux, A. - Simon, J. P. . Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 2001, s. 193-238.
8. MILLEMANN, Y. - LESAGE, M. C. - CHASLUS-DANCLA, E. - LAFONT, J. P.: Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1995, s. 173-179.
9. RYCHLÍK, I. - KARPÍŠKOVÁ, R. - FALDYNOVÁ, M. - ŠIŠÁK, F.: Computer-assisted restriction endonuclease analysis of plasmid DNA in field strains of *Salmonella enteritidis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 1998, s. 1183-1185.
10. RIDLEY, A. M. - THRELFALL, E. J. - ROWE, B.: Genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping and pulsed field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1998, s. 2314-2321.
11. LINDSTEDT, B. A. - HEIR, E. - VARDUND, T. - KAPPERUD, G.: Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2000, s. 1623-1627.
12. TAMADA, Y. - NAKAOKA, Y. - NISHIMORI, K. - DOI, A. - KUMAKI, T. - UEMURA, N. - TANAKA, K. - MAKINO, S. I. - SAMESHIMA, T. - AKIBA, M. - NAKAZAWA, M. - UCHIDA, I.: Molecular typing and epidemiological study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from cattle by fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2001, s. 1057-1066.
13. BAGGESEN, D. L. - SANDVANG, D. - AARESTRUP, F. M.: Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT104 isolates from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2000, s. 1581-1586.
14. MARKOGIANNAKIS, A. - TASSIOS, P. T. - LAMBIRI, M. - WARD, L. R. - KOUREA-KREMASTINO, J. - LEGAKIS, N. J. - THE GREEK NONTYPHOIDAL SALMONELLA STUDY GROUP - VATOPOULOS, A. C.: Multiple clones within multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2000, s. 1269-1271.
15. SCHIAFFINO, A. - BEUZÓN, C. R. - UZZAU, S. - LEORI, G. - CAPPUCINELLI, P. - CASADESÚS, J. - RUBINO, S.: Strain typing with IS200 fingerprints in *Salmonella abortusovis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1996, s. 2375-2380.
16. HILTON, A. C. - PENN, C. W.: Comparison of ribotyping and arbitrarily typed PCR for molecular typing of *Salmonella enterica* and relationships between strains on the basis of these molecular markers. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 1998, s. 933-940.
17. WIEDMANN, M.: Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International*, 85, 2002, s. 524-531.
18. ŠVEC, P. - SEDLÁČEK, I. - PANTÚČEK, R. - DEVRIESE, L. A. - DOŠKAŘ, J. V.: Evaluation of ribotyping for characterization and identification of *Enterococcus haemolyticus* and *Enterococcus moraviensis* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 203, 2001, s. 23-27.

19. JENSEN, M. A. - WEBSTER, J. A. - STRAUS, N.: Rapid identification of bacteria on basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1993, s. 945-952.
20. DAFFONCHIO, D. - CHERIF, A. - BORIN, S.: Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2000, s. 5460-5468.
21. LAGATOLLA, C. - DOLZANY, L. - TONIN, E. - LAVENIA, A. - MICHELE, M. - TOMMASINI, T. - MONTI-BRAGADIN, C.: PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1996, s. 2440-2443.
22. BAUDART, J. - LEMARCHAND, K. - BRISABOIS, A. - LEBARON, P.: Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2000, s. 1544-1552.
23. WELSH, J. - MCCLELLAND, M.: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18, 1990, s. 7213-7218.
24. WILLIAMS, J. G. - KUBELIK, A. R. - LIVAK, K. J. - RAFALSKY, J. A. - TINGEY, S. V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 1990, s. 6531-6535.
25. CAETANO-ANNOLES, G. - BASSAM, B. J. - GRESSHOFF, P. M.: DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*, 9, 1991, s. 553-557.
26. TOWNER, K. - GRUNDMAN, H.: Generation and analysis of RAPD fingerprinting profiles. In: *New approaches for the generation and analysis of microbial typing data*. Amsterdam, London, New York, Oxford, Paris, Shannon, Tokyo : Elsevier, 2001, s. 47-76.
27. VERSALOVIC, J. - KOEUTH, T. - LUPSKI, J. R.: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19, 1991, s. 6823-6831.
28. BEYER, W. - MUKENDI, F. M. - KIMMING, P. - BÖHM, R.: Suitability of repetitive DNA sequence based PCR fingerprinting for characterizing epidemic isolates of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1998, s. 1549-1554.
29. KOH-LUAR, S. I. - CHOO, G. H. B. - TAN, S. L. R. - TAN, C. W. K.: Genomic fingerprints of *Salmonella* species generated with repetitive element sequence based PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 1998, s. 17-22.
30. ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - PIKNOVÁ, L. - RIJPELS, N. - SATKO, J. - KUČHTA, T.: Typizácia salmonel polymerázovou reťazovou reakciou orientovanou na repetitívne extragénové palindrómy. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 37, 2001, s. 37-44.
31. PANGALLO, D. - KARPIŠKOVÁ, R. - TURŇA, J. - KUČHTA, T.: Typing of food-borne *Listeria monocytogenes* by the optimized repetitive extragenic palindrome-based polymerase chain reaction (REP-PCR). *New Microbiologica*, 24, 2002, s. 449-454.
32. GILLINGS, M. - HOLLEY, M.: Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using ERIC primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 1997, s. 17-21.
33. VOS, P. - HOGERS, R. - BLEEKER, M. - REIJANS, M. - VAN DE LEE, T. - HORNES, M. - FRIJTERS, A. - POT, J. - PELEMAN, J. - MUIPER, M. - ZABEAU, M.: AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 21, 1995, s. 4407-4414.
34. SAVELKOU, P. H. M. - AARTS, H. J. M. - DE HAAS, J. - DIJKSHOORN, L. - DUIM, B. - OTSEN, M. - RADEMAKER, J. L. W. - SCHOULS, L. - LENSTRA, J. A.: Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1999,

- s. 3083-3091.
35. SZITÁSOVÁ, I. - DRAHOVSKÁ, H. - TURŇA, J.: Distribution of virulence factors and AFLP typing of *Bacillus cereus* food isolates. *Biologia*, 57, 2002, s. 313-319.
 36. ANTHONISHYN, N. A. - McDONALD, R. R. - CHAN, E. L. - HORSMAN, G. - WOODMAN-SEE, C. E. - FALK, P. S. - MAYHALL, C. G.: Evaluation of fluorescence-based amplified fragment length polymorphism analysis for molecular typing in hospital epidemiology: comparison with pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2000, s. 4058-4065.
 37. AARTS, H. J. M. - HAKEMULDER, L. E. - VAN HOEF, A. M. A.: Genomic typing of *Listeria monocytogenes* strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprint patterns. *International Journal of Food Microbiology*, 49, 1999, s. 95-102.
 38. KEIM, P. - KALIF, A. - SCHUPP, J. - HILL, K. - TRAVIS, S. E. - RICHMOND, K. - ADAIR, D. M. - HUGH-JONES, M. - KUSKE, C. R. - JACKSON, P.: Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *Journal of Bacteriology*, 179, 1997, s. 818-824.
 39. RIPABELLI, G. - McLAUCHLIN, J. - THRELFALL, E. J.: Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. *Systematic and Applied Microbiology*, 23, 2000, s. 132-136.
 40. PETERS, T. M. - THRELFALL, E. J.: Single enzyme amplified fragment length polymorphism and its applicability for *Salmonella* epidemiology. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 2001, s. 400-404.
 41. ENRIGHT, M. C. - SPRATT, B. G.: Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology*, 7, 1999, s. 482-487.
 42. KOTETISHVILI, M. - STINE, O. C. - KREGER, A. - MORRIS, J. G. - SULAKVELIDZE, A.: Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 2002, s. 1626-1635.

Do redakcie došlo 18.11.2002.

Bacterial typing based on DNA analysis

DRAHOVSKÁ, H. - KUCHTA, T.: *Bull. potrav. Výsk.*, 41, 2002, p. 149-161.

SUMMARY. A review of DNA-based methods for bacterial typing is presented, being focused to methods applicable to food-borne pathogens. Principles, parameters and applicability are given for plasmid analysis, methods based upon the restriction of the chromosomal DNA (restriction fragment length polymorphism, RFLP; pulsed-field gel electrophoresis, PFGE; RFLP-Southern blotting; ribotyping), methods based upon the polymerase chain reaction (gene-specific PCR; PCR-ribotyping; randomly-amplified polymorphic DNA, RAPD; repetitive sequence-based PCR; amplified fragment length polymorphism, AFLP), and multilocus sequence typing, MLST. Attention is also paid to the evaluation of DNA typing results.

KEYWORDS: polymerase chain reaction; polymorphism; restriction fragment; amplified DNA