

Janusz Fiett, Krzysztof Trzciański, Waleria Hryniewicz i Marek Gniadkowski

## ZASTOSOWANIE METOD BIOLOGII MOLEKULARNEJ DO TYPOWANIA SZCZEPÓW *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IZOLOWANYCH Z ZAKAŻEŃ SZPITALNYCH

Centralne Laboratorium Surowic i Szczepionek w Warszawie

Dyrektor: prof. dr hab. med. W. Hryniewicz

*W pracy oceniono metody typowania molekularnego (rybotypowanie, analizę makrorestrykcyjną i RAPD) na szczepach Pseudomonas aeruginosa izolowanych z zakażeń w polskich szpitalach. Za metodę o największej rozdzielczości uznano analizę RAPD przy użyciu dwóch różnych starterów PCR. Ustalono relacje pokrewieństwa w populacjach szczepów pochodzących z czterech różnych szpitali.*

### WSTĘP

W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny rozwój zastosowań technik genetyki molekularnej w badaniach epidemiologicznych (6, 16). Ogół genetycznych metod typowania sprowadzić można do dwóch podstawowych strategii. Pierwsza z nich oparta jest na analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA (RFLP) i może dotyczyć całości chromosomu bakteryjnego (RFLP genomowego DNA/analiza makrorestrykcyjna/PFGE) (9), plazmidowego DNA (REAP) (15) lub poszczególnych loci (np. locus *rRNA* – rybotypowanie (2, 11), gen *mecA* MRSA (3), gen *spa* MRSA (4)). Druga strategia opiera się na analizie produktów łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) uzyskanych z użyciem starterów o arbitralnie wybranej sekwencji (AP-PCR, RAPD) (18). Liczne warianty obu tych strategii wykorzystuje się z powodzeniem w analizie epidemiologicznej drobnoustrojów chorobotwórczych.

Pomimo nagromadzenia wielu danych i doświadczeń występuje potrzeba ciągłej oceny przydatności i wiarygodności poszczególnych metod molekularnych w odniesieniu do konkretnych drobnoustrojów i określonych środowisk ich występowania. Wynika to z możliwości lokalnego rozprzestrzenienia się szczepów o charakterze endemicznym, wobec których stosowane wcześniej metody mogą wykazywać niedostateczną moc dyskryminacyjną. *Pseudomonas aeruginosa* jako jeden z głównych drobnoustrojów powodujących zakażenia zarówno wewnątrz-, jak i pozaszpitalne był obiektem licznych analiz epidemiologicznych (1, 8, 11). Wśród metod molekularnych stosowano m.in. rybotypowanie (z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych takich jak *PvuII*, *EcoRI*, *BamHI*, *ClaI*), analizę RFLP genomowego DNA (elektroforeza pulsacyjna produktów trawienia genomu restryktazami *XbaI*, *SpeI*, *DraI*) (7, 10, 14),

RAPD (z zastosowaniem wielu rodzajów starterów) (10, 12). Jako metody o wysokiej czułości wskazywano najczęściej analizę makrorestrykcyjną oraz RAPD, rybotypowanie zaś polecano do ogólniejszych analiz pokrewieństwa szczepów (7, 12).

Celem tej pracy było ustalenie wiarygodnego schematu typowania epidemiologicznego szczepów *P. aeruginosa* izolowanych w polskich szpitalach i zweryfikowanie go w badaniach populacji tego drobnoustroju w czterech wybranych środowiskach szpitalnych, w tym trzech szpitalach pediatrycznych.

## MATERIAŁ I METODY

**Izolaty bakteryjne.** Badania obejmowały trzy szpitale pediatryczne położone w Warszawie, Łodzi i Olsztynie, oraz szpital w Siemianowicach Śląskich. W okresie od stycznia do czerwca 1996 roku zbierano kolejne izolaty *P. aeruginosa*, zgodnie z zasadą: 1 izolat – 1 chory. Uzyskano łącznie 111 izolatów: 39 z Warszawy, 24 z Łodzi, 20 z Olsztyna i 28 z Siemianowic Śląskich. Wszystkie izolaty z Siemianowic pochodziły z oddziału oparzeniowego. Wśród pozostałych – zebranych w szpitalach pediatrycznych – dominowały izolaty od chorych z oddziałów intensywnej opieki medycznej (24), chirurgii (18) oraz internistycznych (16). Wśród 39 izolatów ze szpitala warszawskiego 24 pochodziły od leczonych ambulatoryjnie chorych z mukowiscydozą. Badane szczepy izolowano z różnych źródeł, głównie z ran oparzeniowych (31), rurek tracheostomijnych (22), gardła (20), płwociny (15) i ran pooperacyjnych (9).

**Izolacja DNA.** Genomowy DNA izolowano z 200  $\mu$ l nocnej hodowli bakterii, prowadzonej w 5 ml bulionu tryptozowo-sojowego (Oxoid) w 37°C. Do izolacji używano zestawu Genomic DNA Prep Plus (A & A Biotechnology).

**Rybotypowanie (RT).** Rybotypowanie przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną wcześniej (5). Preparaty całkowitego DNA analizowanych izolatów trawiono enzymami restrykcyjnymi *EcoRI* i *HindIII* oraz *PvuII* (MBI Fermentas).

**RAPD.** Analizę RAPD prowadzono z wykorzystaniem starterów AP-7 (17) i AP-4 (18) według procedury przedstawionej wcześniej (5) dla startera AP-7. Reakcje ze starterem AP-4 przebiegały w tych samych warunkach co AP-7, przy czym we wszystkich 35 cyklach w drugiej fazie stosowano temperaturę 35°C.

**Analiza makrorestrykcyjna (PFGE).** W analizie makrorestrykcyjnej użyto preparatów genomowego DNA zatopionego w bloczkach z 1% agarozy (InCert Agarose, FMC Bioproducts) i trawionego enzymem *XbaI* (MBI Fermentas). Preparaty DNA otrzymywano zmodyfikowaną metodą opisaną przez Grundmanna i wsp. (7). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w 1% żelu agarozowym (Pulsed Field-Certified, Bio-Rad) w aparacie CHEF DR II (Bio-Rad). Elektroforezę prowadzono przez 26 h w temperaturze 14°C, w gradiencie potencjału 6 V/cm, przy długości impulsu rosnącej od 1 s do 20 s.

## WYNIKI

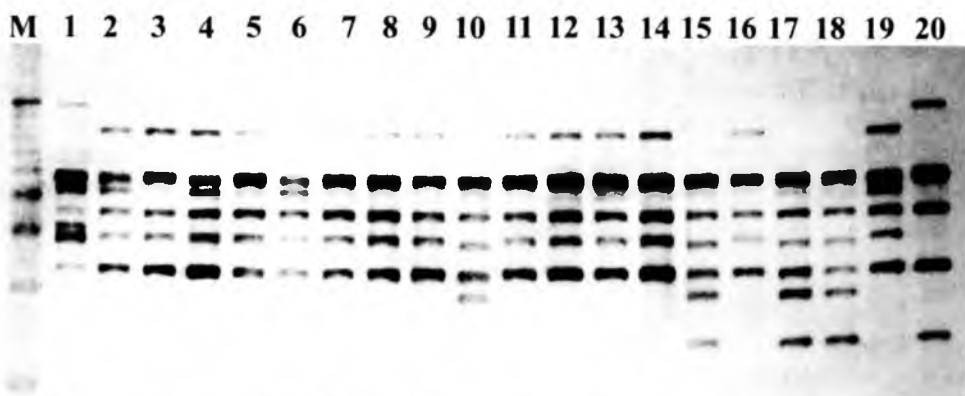
Grupa 20 izolatów z Olsztyna posłużyła jako materiał do porównania mocy dyskryminacyjnej trzech metod typowania molekularnego. Wyniki zostały przedstawione w tabeli I i na rycinach 1, 2, 3 i 4. Rybotypowanie (RT) z użyciem kombinacji enzymów

Tabela I. Zestawienie wyników typowania izolatów pochodzących ze szpitala w Olsztynie

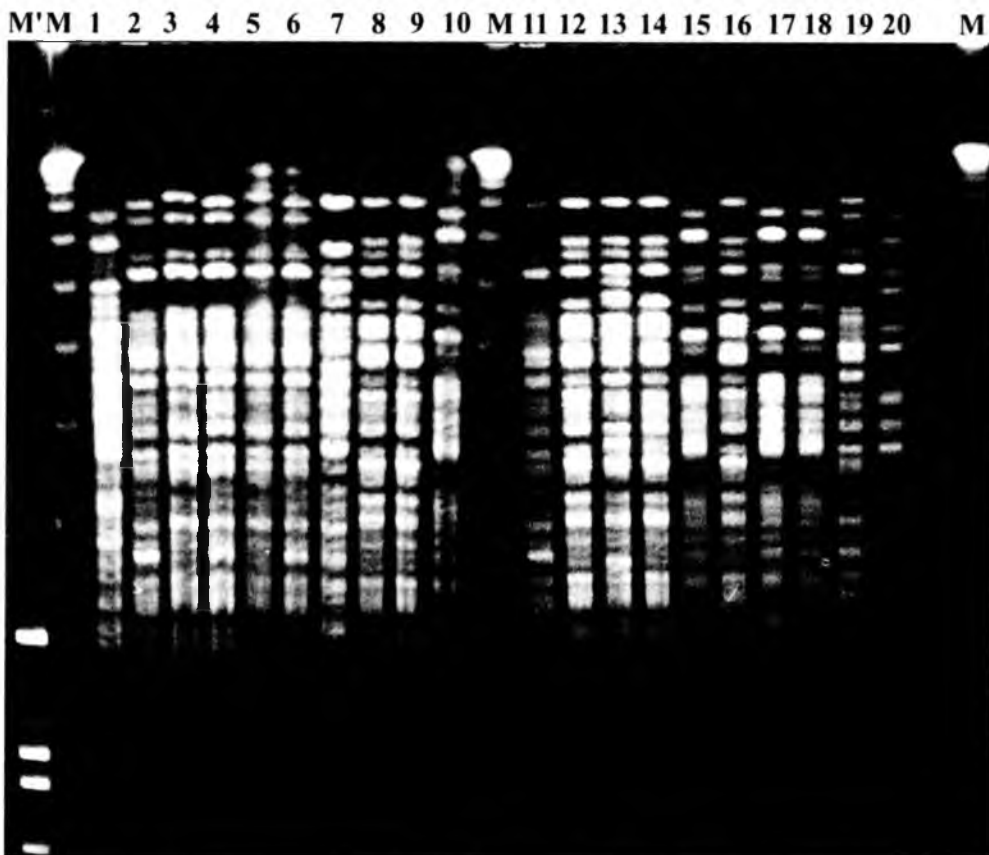
## Typy RAPD AP4

		I	II	III	IV	V	VI	VII
Typy RAPD AP7	A		$\alpha_1$					
	B	PvuII-a	PvuII-b	$\beta$ 19 2 4 6				
	C				11 13		EcoRI + HindIII-A	EcoRI + HindIII-B
	D	PvuII-c		$\delta$ 3 5				
	E			$\epsilon$ 7 $\phi$ 14 $\lambda$ 8 12 9 16				
	F					PvuII-d		
	G					$\kappa$ 20		PvuII-e 10 15 17 18

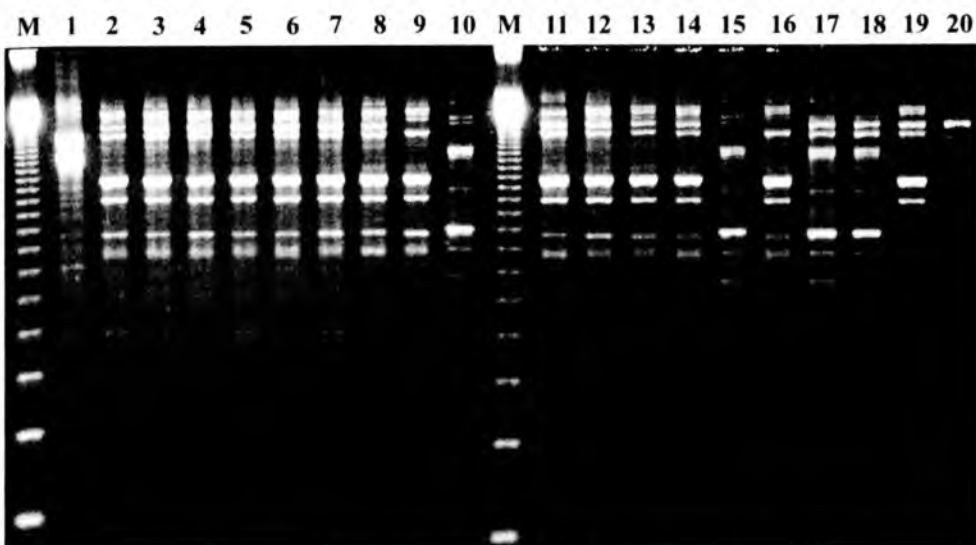
Wiersze tabeli odpowiadają typom AP-7 (oznaczonym cyframi arabskimi), kolumny zaś typom AP-4 (oznaczonym cyframi rzymskimi). Pięć owali symbolizuje rybotypy PvuII, a duże prostokąty – rybotypy EcoRI + HindIII. Małe ramki oznaczone literami greckimi odpowiadają typom PFGE. Liczby od 1 do 20 stanowią skrótowe oznaczenia szczepów OL-1 – OL-20. Ich pozycja w tabeli wskazuje na przynależność izolatów do poszczególnych typów.



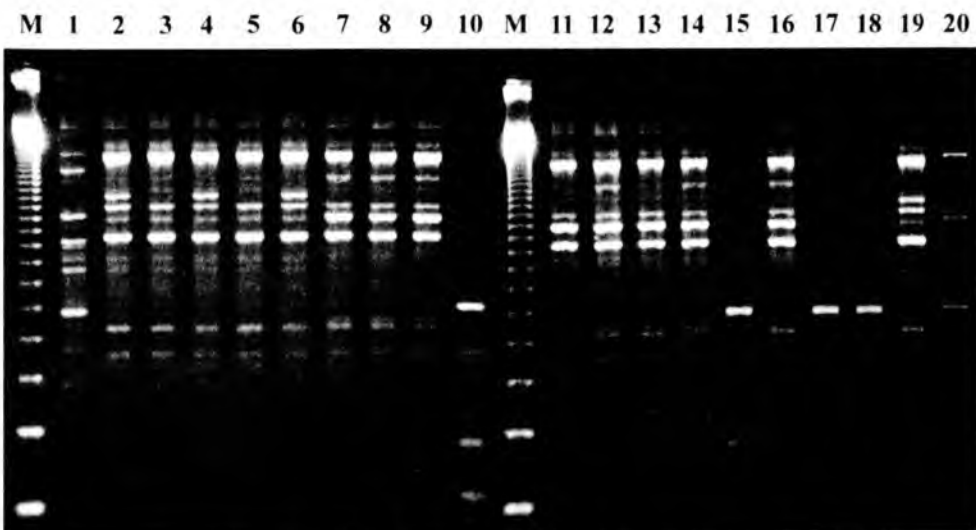
Ryc. 1. Rybotypowanie kolekcji *P. aeruginosa* ze szpitala w olsztynie z użyciem restryktazy *PvuII*.  
M – standard wielkości liniowych fragmentów DNA (1kb ladder – GIBCO BRL)



Ryc. 2. Analiza makrorestrykcyjna z użyciem restryktazy *XbaI* kolekcji izolatów *P. aeruginosa* ze szpitala w Olsztynie. Standardy wielkości liniowych fragmentów DNA:  
M' –  $\lambda$ /*BstEII* (Kucharczyk T.e.), M – lambda ladder (BIO-RAD)



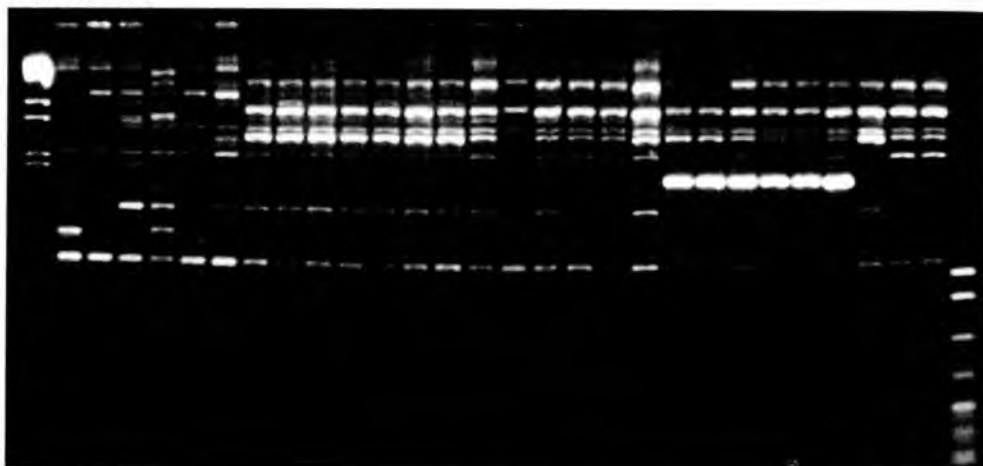
Ryc. 3. Analiza RAPD (starter AP-4) kolekcji izolatów *P. aeruginosa* ze szpitala w Olsztynie.  
M – standard wielkości liniowych fragmentów DNA (123 bp ladder – GIBCO BRL)



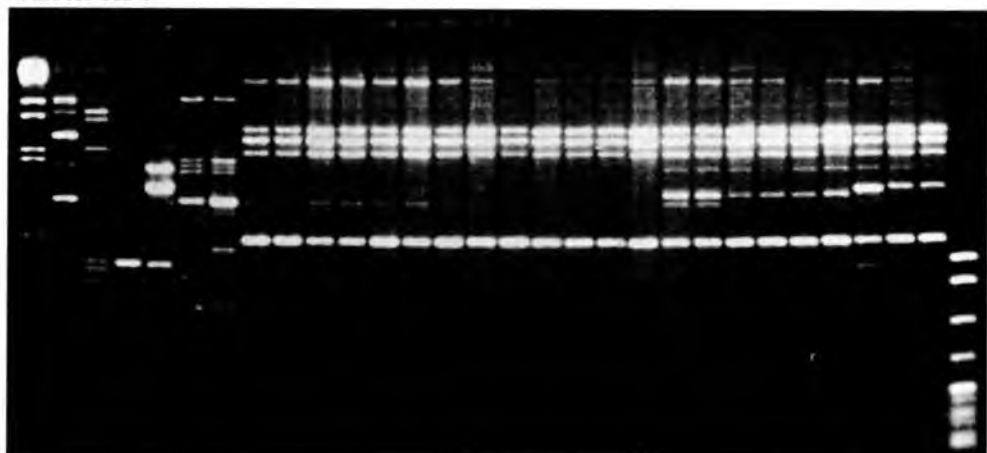
Ryc. 4. Analiza RAPD (starter AP-7) kolekcji izolatów *P. aeruginosa* ze szpitala w Olsztynie.  
M – standard wielkości liniowych fragmentów DNA (123 bp ladder – GIBCO BRL)

restrykcyjnych *EcoRI* i *HindIII* pozwoliło wyróżnić jedynie 2 typy izolatów (oznaczone jako RT *EcoRI*+*HindIII*/A i B), natomiast użycie restryktazy *PvuII* (ryc. 1) ujawniło 5 odrębnych typów w badanym materiale (oznaczonych jako RT *PvuII*/a, b, c, d, e). Warto zauważyć, że typ RT *EcoRI*+*HindIII*/B w pełni pokrywał się

M 1 9 11 22 3 24 2 4 6 7 8 10 14 15 21 23 26 27 28 5 12 16 17 19 25 13 18 20 M'  
 Starter AP4



Starter AP4



Ryc. 5. Analiza RAPD (startery AP-4 i AP-7 kolekcji izolatów *P. aeruginosa* ze szpitala w Siemianowicach Śląskich. Standardy wielkości liniowych fragmentów DNA: M –  $\lambda$ /*BstEII*, M' – pBR322/*MSPI*

z typem RT *PvuII*/e (izolaty OL-10, -15, -17 i -18), typ RT *EcoRI*+*HindIII*/A zaś, rozpadł się na typy RT *PvuII*/a, b, c i d. Typy RT *PvuII*/a i d zawierały po jednym izolacie; odpowiednio OL-1 i OL-20.

W wyniku analizy makrorestrykcyjnej (PFGE) z użyciem enzymu *XbaI* (ryc. 2) otrzymano 9 wzorów restrykcyjnych różniących się od siebie co najmniej jednym prążkiem. Wyraźnie odrębną grupę stanowiły izolaty typu PFGE/ $\rho$ , który pokrywał się z typami RT *EcoRI*+*HindIII*/B i RT *PvuII*/e. Pojedyncze izolaty typów RT *PvuII*/a i d charakteryzowały się również unikatowymi wzorami PFGE (typy PFGE/ $\alpha$  i  $\pi$ ). Wśród 14 izolatów ujętych typami RT *PvuII*/b i c można było wyróżnić 6 wzorów PFGE (PFGE/ $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\varphi$  i  $\lambda$ ).

Oba oligomery starterowe zastosowane w analizie RAPD (ryc. 3 i 4) wykazały podobną rozdzielczość – każdy z nich wyróżnił w analizowanym materiale siedem grup izolatów. Wyniki typowania z użyciem startera AP-4 nie pokrywały się jednak w pełni z otrzymanym przy użyciu startera AP-7. Obie wersje RAPD pozwoliły wyróżnić jako unikatowe szczepy *OL-1* i *OL-20* (podobnie jak RT *PvuII* i PFGE). Grupa izolatów *OL-10*, *-15*, *-17* i *-18* (typ RT *PvuII/e* i PFGE/ $\rho$ ) pozostała nierozróżnialna w typowaniu AP-7 (typ RAPD-7/6), natomiast rozdzielona na 2 typy przy użyciu startera AP-4 (typy RAPD-4/VI i RAPD-4/VII). W grupie 14 izolatów należących do typów RT *PvuII/b* i *c* analizy AP-4 i AP-7 dokonały podziałów przenikających się wzajemnie, które też niezupełnie pokrywały się z typami PFGE i RT. Łączne wykorzystanie danych pochodzących z typowania RAPD przy użyciu obu starterów pozwoliło na wyróżnienie w badanym materiale 10 grup izolatów.

Izolaty z Łodzi, Warszawy i Siemianowic Śląskich analizowane były tylko metodą RAPD z użyciem starterów AP-7 i AP-4. Oznaczenia literowe typów RAPD stosowano niezależnie dla każdej kolekcji szczepów. Wśród 24 izolatów z Łodzi (tabela II) pierwszy z nich pozwolił wyróżnić 18, drugi zaś 19 różnych wzorów amplifikacji. Kombinacja danych dzieli materiał na 20 typów z dwoma zawierającymi po trzy izolaty (typy

Tabela II. Zestawienie wyników typowania izolatów pochodzących ze szpitala w Łodzi

Izolat	RAPD-4	RAPD-7
LD-1	I	A
LD-2		
LD-3	II	
LD-4	III	B
LD-5		
LD-6		
LD-7	II	
LD-8	III	B
LD-9	I	A
LD-10	III	B
LD-11		
LD-12	I	A
LD-13		
LD-14		A
LD-15		
LD-16		A
LD-17		
LD-18		
LD-19		
LD-20		
LD-21		
LD-22		
LD-23		
LD-24		

Oznaczenia nadano jedynie typom złożonym z co najmniej 2 izolatów.

Tabela III. Zestawienie wyników typowania izolatów pochodzących od chorych ze szpitala w Warszawie

Isolate	RAPD-4 type	RAPD-7 type
WAIII-1		C
WAIII-5		
WAIII-13		
WAIII-16		
WAIII-20	IV	
WAIII-24		C
WAIII-25	IV	
WAIII-27		
WAIII-28		
WAIII-30	V	D
WAIII-33		
WAIII-35		
WAIII-36	V	D
WAIII-38		
WAIII-40		

Oznaczenia nadano jedynie typom złożonym z co najmniej 2 izolatów.

Tabela IV. Zestawienie wyników typowania izolatów pochodzących od chorych na mukowiscydozę leczonych ambulatoryjnie w szpitalu w Warszawie

Izolat	RAPD-4	RAPD-7
WAIII-2		A
WAIII-3		
WAIII-6		
WAIII-7		
WAIII-8	I	
WAIII-9	I	
WAIII-11	II	
WAIII-12	II	
WAIII-14		
WAIII-15		
WAIII-17		
WAIII-18		B
WAIII-19		
WAIII-21		
WAIII-22		
WAIII-23		
WAIII-26		
WAIII-29		
WAIII-31		
WAIII-32	III	A
WAIII-34		B
WAIII-37		
WAIII-39	III	A
WAIII-41		

Oznaczenia nadano jedynie typom złożonym z co najmniej 2 izolatów.



Tabela V. Zestawienie wyników typowania izolatów pochodzących ze szpitala w Siemianowicach Śląskich

Izolaty	RAPD-4	RAPD-7
SI-1		
SI-2	I	A
SI-3	II	B
SI-4	I	A
SI-5	III	C
SI-6	I	A
SI-7	I	A
SI-8	I	A
SI-9		
SI-10	I	A
SI-11		
SI-12	III	C
SI-13	I	F
SI-14	I	A
SI-15	I	A
SI-16	III	D
SI-17	III	D
SI-18	IV	E
SI-19	III	D
SI-20	IV	E
SI-21	I	A
SI-22		
SI-23	I	A
SI-24	II	B
SI-25	III	D
SI-26	I	A
SI-27	I	A
SI-28	I	A

Oznaczenia nadano jedynie typom złożonym z co najmniej 2 izolatów.

RAPD-4/RAPD-7: I/A i III/B). Do typu RAPD-7/A należały ponadto 2 inne szczepki, jeszcze inne 2 reprezentowały pojedynczy typ RAPD-4 (typ RAPD-4/II).

Wśród dwudziestu czterech izolatów pochodzących od chorych na mukowiscydozę leczonych ambulatoryjnie w szpitalu warszawskim (tabela IV) ujawniono przy użyciu każdego ze starterów po 21 różnych wzorów, łącznie zaś – 23 wzory. Typowanie za pomocą startera AP-4 ujawniło trzy pary izolatów o identycznych wzorach, z użyciem startera AP-7 zaś – jedną parę i jedną grupę trzech izolatów o jednakowych wzorach. Zaledwie jedna para izolatów miała identyczne obydwa wzory RAPD (typ III/A). Piętnaście izolatów od chorych hospitalizowanych w tym samym szpitalu (tabela III) dało się podzielić każdą z wersji RAPD na 13 typów, kombinacja metod zaś, rozdzieliła wszystkie izolaty z wyjątkiem jednej pary (typ V/D).

Wśród 28 izolatów z Siemianowic Śląskich metoda RAPD z użyciem startera AP-4 pozwoliła podzielić ogół izolatów na 8 typów, z użyciem startera AP-7 zaś – na 10 typów (tabela V, rycina 5). Łącznie wyróżniono 10 typów RAPD. Dla 4 izolatów (SI-1, -9, -11 i -22) stwierdzono unikatowe wzory produktów RAPD przy użyciu obu

starterów. Kolejne dwa (*SI-3* i *SI-24*) były nie do rozróżnienia obydwoma wersjami RAPD (typ II/B). Grupa pozostałych 22 izolatów charakteryzowała się wzorami RAPD obejmującymi dużą liczbę jednakowych prążków, zarówno dla startera AP-4 (rycina 4), jak i AP-7. W jej ramach wyróżnić można było 3 typy RAPD-4 i 5 typów RAPD-7 i typowanie obydwoma wersjami RAPD dało bardzo zbieżne rezultaty. Najliczniejszy typ RAPD-4/I grupował 14 izolatów, z których 13 stanowiło jednocześnie typ RAPD-7/A (łącznie typ I/A). Reprezentowany przez 6 izolatów typ RAPD-4/III rozpadał się na typy RAPD-7/C i RAPD-7/D (typy III/C i III/D). Zawierający dwa izolaty typ RAPD-4/IV był tożsamy z typem RAPD-7/E (typ IV/E).

## OMÓWIENIE

Celem analiz epidemiologicznych jest ustalenie stopnia pokrewieństwa pomiędzy izolatami danego gatunku drobnoustroju. W badaniach takich warto jest dysponować wiarygodnymi metodami typowania o zróżnicowanej czułości. Metody genetyczne o wysokiej rozdzielczości dają możliwość wykrywania nawet znikomych zmian w DNA i są w związku z tym bardzo użyteczne w dochodzeniach epidemiologicznych, zwłaszcza w opracowywaniu epidemii lokalnych i dopiero rozpoczynających się. Z kolei, metody o niższej czułości wykrywają z reguły jedynie poważne różnice genetyczne, pozwalając śledzić ewentualne pokrewieństwo szczepów, dla których czas dywergencji ewolucyjnej mógł być stosunkowo długi. Nadają się wobec tego do charakteryzowania populacji drobnoustrojów występujących w większych regionach geograficznych lub populacji szczepów danego gatunku „zasiedziały” w danym środowisku.

Spośród metod wykorzystanych do typowania szczepów *P. aeruginosa* z Olsztyna wysoką czułością charakteryzowała się analiza PFGE (9 wzorów) i metoda RAPD, zwłaszcza oparta na kombinacji danych uzyskanych z użyciem dwóch różnych starterów (10 typów). Niższą czułość wykazywało rybotypowanie przy użyciu restryktazy *PvuII* (5 typów). Wersja rybotypowania z wykorzystaniem kombinacji enzymów *EcoRI* + *HindIII* (2 typy) okazała się praktycznie nieprzydatna, co szczególnie uwidoczniło się w braku wyróżnienia szczepów *OL-1* i *OL-20*, których unikatowość wykazały wszystkie inne metody. Uzyskane wyniki są zasadniczo zgodne z publikowanymi wcześniej wynikami badań epidemiologicznych. Wskazywały one na wysoką moc dyskryminacyjną analizy makrorestrikcyjnej (7). Metoda RAPD często dorównywała jej rozdzielczością (13) przy jednocześnie mniejszej pracochłonności i czasochłonności. Rybotypowanie jedynie w wyjątkowych przypadkach wykazywało czułość podobną do analizy RFLP genomowego DNA (1) znajdując raczej zastosowanie do badania zasadniczego pokrewieństwa i struktury populacji *P. aeruginosa* (13).

Obydwa schematy typowania oparte na metodach o wysokim stopniu czułości mają swoje wady i zalety. Analiza PFGE góruje nad RAPD powtarzalnością. We wzorach produktów RAPD często pojawiają się prążki o niskiej intensywności, których amplifikacja może być niepowtarzalna. Interpretacja dwóch wzorów RAPD różniących się takimi prążkami staje się subiektywna i przykłady takiej sytuacji wystąpiły w niniejszych badaniach. Dla metody PFGE istnieją ponadto powszechnie akceptowane kryteria ustalania stopnia pokrewieństwa między analizowanymi wzorami (izolatami). W przypadku jednak badań szczepów *P. aeruginosa*, których DNA

trawiony jest restryktazą *Xba*I, dokładna analiza podobieństw wzorów jest praktycznie niewykonalna ze względu na nagromadzenie dużej liczby stosunkowo niewielkich fragmentów DNA (maksymalnie 350 kb). W związku z tym, w niniejszej pracy, jako typy PFGE przyjmowano wzory różniące się w jakimkolwiek stopniu od pozostałych. Z kolei, wielką zaletą RAPD w konfrontacji z PFGE jest łatwość i krótki czas wykonania analizy. Wzięcie pod uwagę wyników badań izolatów z Olsztyna, oraz wszystkich omówionych aspektów technicznych spowodowało, że w prezentowanych badaniach połączoną analizę RAPD uznano za optymalną metodę typowania *P. aeruginosa* o wysokiej czułości i dlatego posłużono się nią wyłącznie w badaniach szczepów z pozostałymi ośrodków.

Wnikliwa analiza szczepów pochodzących ze szpitala w Olsztynie pozwoliła sądzić, że od dłuższego czasu występują tam dwie subpopulacje *P. aeruginosa*, które już w środowisku szpitalnym uległy dywergencji ewolucyjnej w stopniu pozwalającym na wykrycie metodami typowania molekularnego. Spójną grupę stanowią izolaty *OL-10*, *OL-15*, *OL-17* i *OL-18* (typ RT *Pvu*II/e), które zróżnicowano jedynie w przypadku typowania z użyciem startera AP-4 (2 typy). Izolaty te z pewnością były bardzo blisko spokrewnione i należy sądzić, że wywodziły się z jednego szczepu pochodzenia szpitalnego. Drugą grupę, o mniejszym stopniu wewnętrznego spokrewnienia, stanowiło 14 izolatów typów RT *Pvu*II/b i c. O ile wszystkie zastosowane metody typowania łącznie pozwoliły podzielić *P. aeruginosa* z Olsztyna na grupy liczące co najwyżej 3 izolaty, to jednak przenikanie się (a nie nakładanie) grup wyróżnionych poszczególnymi metodami sugeruje wyraźnie istnienie pokrewieństwa pomiędzy nimi. Najprawdopodobniej więc, izolaty te są pochodną pojedynczego szczepu *P. aeruginosa*, od dawna obecnego w środowisku omawianego szpitala, który zdążył ulec znacznej dywergencji ewolucyjnej. Wyraźnie można wyodrębnić szczepy *OL-1* i *OL-20* jako nie spokrewnione wzajemnie ani z pozostałymi izolatami. Jedynie rybotypowanie z użyciem kombinacji restryktaz *Eco*RI i *Hind*III nie pozwoliło na ich odróżnienie od części pozostałych szczepów.

Wśród 24 szczepów pochodzących z Łodzi jedynie 2 grupy po 3 izolaty typowały się identycznie z użyciem obu starterów (typy I/A i III/B), co oznacza, że w szpitalu łódzkim klonalne rozprzestrzenianie się *P. aeruginosa* nie jest istotnym źródłem zakażeń wywołanych przez ten drobnoustrój. Wśród 39 szczepów uzyskanych ze szpitala warszawskiego 24 izolaty pochodziły od chorych na mukowiscydozę leczonych ambulatoryjnie. Chorzy tacy bardzo często cierpią na przewlekłe zakażenia *P. aeruginosa*, przy czym szczepy je wywołujące zwykle są pochodzenia środowiskowego (10, 13). Tylko dwa izolaty miały identyczne wzory RAPD (typ III/A). Pozostałych 15 izolatów pochodziło z zakażeń szpitalnych. Każda z wersji RAPD ujawniła dwie pary identycznych wzorów, przy czym tylko jedna z par (typ V/D) była wspólna dla obu wersji. Tak więc zarówno w populacji chorych na mukowiscydozę, jak i wśród osób hospitalizowanych, jedynie sporadycznie wystąpiły pary szczepów nierozróżnialnych wykorzystaną metodą. Obydwie populacje szczepów były więc bardzo heterogenne i nie można było wskazać na istnienie szpitalnego szczepu *P. aeruginosa* rozprzestrzenionego w tym środowisku.

W przypadku szpitala siemianowickiego uwagę zwróciła grupa 22 izolatów (na 28 wszystkich), charakteryzująca się bardzo podobnymi wzorami produktów RAPD (typy I/A, I/F, III/C, III/D, IV/E). Obecność we wzorach amplifikacji dużej liczby jednakowych prążków (rycina 5) wskazała na możliwe pokrewieństwo wewnątrz całej

grupy. Można wobec tego twierdzić, że w środowisku szpitala siemianowickiego dominuje stosunkowo jednorodna populacja *P. aeruginosa*, przy czym jest ona tam obecna na tyle długo, że doszło już do dywergencji poszczególnych szczepów, możliwej do wykrycia metodami typowania molekularnego. Istnienie grupy 13 nierozróżnialnych izolatów (typ I/A) wykazało także okresowe występowanie zjawisk rozprzestrzeniania klonalnego (epidemii) szczepów *P. aeruginosa* mających swój początek w rezerwarze drobnoustrojów stale obecnych w środowisku szpitalnym. Zjawiska te są o tyle prawdopodobne, że analiza dotyczy oddziału oparzeniowego, na którym szczególnie łatwo może dochodzić do szerzenia się zakażeń, utrzymywania się szczepów drobnoustrojów i selekcji szczepów opornych na leki. Warto zauważyć, że izolaty *P. aeruginosa* z Siemianowic w zdecydowanej większości charakteryzowały się opornością na wiele leków przeciwbakteryjnych (z grup  $\beta$ -laktamów, aminoglikozydów i chinolonów), oraz, że uzyskane wyniki typowania bardzo dobrze korelowały z profilami wrażliwości na szeroki zestaw antybiotyków i chemioterapeutyków (dane nie prezentowane).

## WNIOSKI

Podsumowując należy uznać, że spośród wysoko rozdzielczych metod typowania *P. aeruginosa*, najbardziej racjonalna w warunkach polskich jest kombinowana metoda RAPD z użyciem starterów AP-4 i AP-7. Rybotypowanie przy użyciu restryktazy *PvuII*, ze względu na mniejszą moc dyskryminacyjną, może okazywać się przydatne do charakteryzowania populacji *P. aeruginosa* w badaniach o większym zasięgu terytorialnym lub prowadzonych przez dłuższy czas. W dwóch spośród analizowanych szpitali (Warszawa, Łódź) zakażenia wywoływane przez *P. aeruginosa* jedynie sporadycznie miały charakter rozprzestrzenienia klonalnego. W szpitalach w Olsztynie i Siemianowicach Śląskich stwierdzono obecność szczepów *P. aeruginosa* wyraźnie wykazujących pokrewieństwo, co wskazuje na utrzymywanie się od dłuższego czasu szpitalnej populacji tego drobnoustroju.

## PODZIĘKOWANIA

Autorzy serdecznie dziękują Państwu: mgr Teresie Cieplińskiej, mgr Krystynie Nowakowskiej, mgr Ewie Tomanek i prof. Eugeniuszowi Małafiejowi za zebranie szczepów do badań. Badania przedstawione w niniejszej pracy finansowane były przez grant naukowy Glaxo Wellcome Polska, oraz grant KBN 4PO5 E8210.

*J. Fielt, K. Trzeciński, W. Hryniewicz and M. Gniadkowski*

## MOLECULAR TYPING OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS RECOVERED FROM NOSOCOMIAL INFECTIONS CAUSED BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

### SUMMARY

Different methods of molecular typing (ribotyping, genomic DNA RFLP and RAPD) were tested on *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in Polish hospitals in order to elaborate a reliable typing scheme for epidemiological investigations. The combined RAPD analysis with the use of two

different primers, RAPD-4 and RAPD-7, was found to have the highest discriminatory power which considering also the easiness and low time – consumption has suggested its high usefulness in studies of outbreaks caused by *P. aeruginosa*. Ribotyping was shown to be the least discriminatory, however, especially with the use of the *PvuII* restriction enzyme, this method can be very useful in revealing the genetic structure of *P. aeruginosa* populations persisting in hospital environments over longer periods. Clonal relations within populations of strains isolated in four different hospitals were revealed. In two of the hospitals *P. aeruginosa* populations demonstrated a very high diversity which suggested that infections had been caused by strains of different origins, probably introduced from other environments. *P. aeruginosa* strains from two remaining hospitals were found to form some clonally related clusters what revealed that in these hospitals epidemic strains of this microorganism have been circulating for prolonged periods and infecting predisposed patients.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bennekov T, Colding H, Ojeniyi B i in. Comparison of ribotyping and genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1996, 34(1): 202–204.
2. Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD i in. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1981, 148(2): 107–127.
3. de Lencastre H, Couto I, Santos I i in. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in a Portuguese hospital: characterization of clonal types by a combination of DNA typing methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994, 13(1): 64–73.
4. Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996, 15(1): 60–64.
5. Gniadkowski M, Schneider I, Pałucha A. Ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from three Polish hospitals: identification of three novel TEM- and SHV-5-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* 1998, 42: 514–520.
6. Goering RV. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993, 14(10): 595–600.
7. Grundmann H, Schneider C, Hartung D i in. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1995, 33(3): 528–534.
8. Gruner E, Kropec A, Huebner J i in. Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from surgical intensive care patients. *J Infect Dis* 1993, 167(5): 1216–1220.
9. Kaufmann ME, Pitt TL. Rozdział w książce: Pulsed-field gel electrophoresis of bacterial DNA. W: „Methods in practical laboratory bacteriology” pod redakcją. Chart H. CRC Press, London. 1994: 83–92.
10. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J i in. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996, 34(5): 1129–1135.
11. Nociari MM, Catalano M, Torrero M. I in. *Pseudomonas aeruginosa* ribotyping: stability and interpretation of ribosomal operon restriction patterns. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996, 25(1): 27–33.
12. Renders N, Romling Y, Verbrugh H i in. Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J Clin Microbiol* 1996, 34(12): 3190–3195.
13. Renders N, van Belkum A, Barth A i in. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: phenotyping versus genotyping. *Clin. Microbiol and Inf* 1996.1: 261–265

14. Talon D, Cailleaux V, Thouverez M. i in. Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect* 1996, 32(2): 135–145.
15. Trilla A, Nettleman MD, Hollis RJ i in. Restriction endonuclease analysis of plasmid DNA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: clinical application over a three-year period. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993, 14(1): 29–35.
16. van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev* 1994, 7(2): 174–184.
17. van Belkum A, Kluytmans J, van Leeuwen W Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1995, 33(6): 1537–1547.
18. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990, 18(22): 6531–6535.

Adres autora:

dr Marek Gniadkowski

Centralne Laboratorium Surowic i Szczepionek

ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

tel. (22) 651 46 70, fax (22) 41 29 49

e-mail: marekg@ibbrain.ibb.waw.pl