

Aleksandra A. Zasada, Rafał Gierczyński, Magdalena Rzeczkowska, Kamila Formińska,  
Katarzyna Zacharczuk, Waldemar Rastawicki

## WYKRYWANIE I IDENTYFIKACJA WYSOCE PATOGENNYCH BAKTERII W RAMACH MIĘDZYNARODOWEGO PROJEKTU EQADeBa – CZĘŚĆ II: PRÓBKI ZAWIERAJĄCE INAKTYWOWANE PATOGENY

### DETECTION AND IDENTIFICATION OF HIGHLY PATHOGENIC BACTERIA WITHIN THE FRAMEWORK OF THE EQADeBa PROJECT – PART II: SAMPLES CONTAINING INACTIVATED PATHOGENS

Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny  
w Warszawie

#### STRESZCZENIE

**CEL.** Celem pracy była analiza zastosowanych metod oraz wyników wykrywania i identyfikacji *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Brucella* sp., *Bulkholderia mallei* i *B. pseudomallei* w próbkach zawierających inaktywowane patogeny otrzymanych w ramach trzeciego międzynarodowego sprawdzianu w projekcie „Establishment of Quality Assurances for Detection of Highly Pathogenic Bacteria of Potential Bioterrorism Risk (EQADeBa)”.

**MATERIAŁ I METODY.** Materiał do badań stanowiło 15 próbek w postaci skażonej wyżej wymienionymi bakteriami wody, surowicy cielęcej oraz mleka. Wykrywanie obecności wysoce patogennych bakterii oraz ich pełna identyfikacja zostały przeprowadzone w oparciu o technikę PCR.

**WYNIKI.** W badanych próbkach wykryto *Y. pestis*, *F. tularensis* ssp. *holarctica*, *B. anthracis*, *B. mallei* oraz *B. pseudomallei*. Najwięcej problemów przysporzyły próbki mleka, czego powodem mogły być hamujące PCR właściwości białek mleka i jonów wapnia oraz niewielka liczba komórek bakteryjnych zawartych w próbce.

**WNIOSKI.** Inaktywacja próbek skażonych wysoce patogennymi drobnoustrojami zapewnia bezpieczeństwo personelu, ale wymaga bardzo dokładnego doboru i sprawdzenia metodyki, według której mają być wykonywane badania, ze względu na możliwość uzyskiwania fałszywie ujemnych wyników. Wyniki międzynarodowego sprawdzianu potwierdziły kompetencje Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH w zakresie wykrywania i identyfikacji wysoce niebezpiecznych patogenów bakteryjnych objętych zakresem sprawdzianu.

**SŁOWA KLUCZOWE:** wysoce patogeniczne bakterie, projekt EQADeBa, dżuma, wąglik, tularemia

#### ABSTRACT

**THE AIM.** The aim of the studies was analysis of methods applied and results of detection and identification of *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Brucella* sp., *Bulkholderia mallei* and *B. pseudomallei* in inactivated samples obtained within the framework of the third external quality assessment exercise (EQAE) in the project „Establishment of Quality Assurances for Detection of Highly Pathogenic Bacteria of Potential Bioterrorism Risk (EQADeBa)”.

**MATERIAL AND METHODS.** Fifteen samples in the form of water, calf serum and milk spiked with bacteria mentioned above were investigated. Detection and identification of highly pathogenic bacteria were carried out using a PCR technique.

**RESULTS.** *Y. pestis*, *F. tularensis* ssp. *holarctica*, *B. anthracis*, *B. mallei* and *B. pseudomallei* were detected in the investigated samples. The most problematic were samples of milk, probably because of presence of PCR inhibitors such as milk proteins and calcium ions and a low number of bacterial cells contained in the samples.

**CONCLUSIONS.** Inactivation of samples spiked with highly pathogenic microorganisms ensure safety of labora-

tory workers, but investigation of such samples needs very precise selection and validation diagnostics methods due to possibility of obtaining false negative results. Results of the third international external quality assessment exercise have confirmed competences of laboratory of Department of Bacteriology NIZP-PZH in the area of detection and identification highly pathogenic bacteria covered by the EQAE.

**KEY WORDS:** *highly pathogenic bacteria, EQADeBa project, plague, anthrax, tularemia*

## WSTĘP

W maju 2008 roku rozpoczęła się realizacja finansowanego przez Unię Europejską projektu „Establishment of Quality Assurances for Detection of Highly Pathogenic Bacteria of Potential Bioterrorism Risk (EQADeBa)”. Założenia międzynarodowego projektu oraz metodykę badania i uzyskane w trzecim międzynarodowym sprawdzianie wyniki badania próbek zawierających żywe patogeny przedstawiono w pierwszej części pracy (Przeegl. Epidemiol. 2011; 65; 401-407). W niniejszej części zostanie przedstawiona metodyka badania oraz wyniki uzyskane w Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH dla próbek zawierających inaktywowane patogeny. Metodyka i uzyskane wyniki zostaną porównane z metodami stosowanymi w innych laboratoriach w Europie i uzyskanymi przez nie wynikami.

## MATERIAŁ I METODY

**Badane próbki.** Badano nadesłane 15 próbek zawierających inaktywowane bakterie, które obejmowały: 5 próbek skażonej wody, 5 próbek skażonego mleka oraz 5 próbek skażonej surowicy cielęcej. Wszystkie próbki zostały skażone określoną liczbą komórek bakteryjnych wynoszącą od 0 do  $10^9$ /ml. Dokładne informacje o patogenach zawartych w próbkach oraz ich liczbie przedstawiono w tabeli I.

Próbki zostały inaktywowane termicznie lub - w przypadku próbek skażonych *B. anthracis* - poprzez inkubację z kwasem nadctowym. Wszystkie próbki zostały przygotowane w Instytucie Roberta Kocha w Berlinie i przesłane do krajów uczestniczących w sprawdzianie w warunkach kontrolowanej temperatury 2-8°C.

**Próbki kontrolne.** Jako próbki kontrolne w badaniach zastosowano DNA wyizolowane z następujących szczepów wzorcowych otrzymanych z Instytutu Roberta Kocha w ramach projektu EQADeBa: *Yersinia pestis* NCTC 00570, *Yersinia pestis* 03-1506, *Yersinia pestis* EV76C, *Burkholderia mallei* NCTC 10245, *Burkholderia pseudomallei* ATCC 23343, *Brucella abortus* A-104-10, *Brucella melitensis* A104-13, *Brucella suis* A104-14, *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* A104-15, *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* Ft33, *Fran-*

*cisella tularensis* ssp. *novocida* Ft26, oraz ze szczepu *Bacillus anthracis* BL1 z kolekcji Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH.

**Izolacja DNA.** Izolację DNA prowadzono z objętości 100µl każdej próbki. Zastosowano porównawczo dwa zestawy komercyjne: DNeazy Blood and Tissue Kit (Qiagen) i NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel) zgodnie z instrukcjami producentów.

**Wykrywanie i identyfikacja wysoce niebezpiecznych patogenów metodami molekularnymi.** Zastosowano metodykę przedstawioną w I części pracy (1).

**Środowisko laboratoryjne oraz stosowane zabezpieczenia personelu.** Ze względu na to, że badane próbki były inaktywowane, nie stanowiły zagrożenia dla personelu i ich diagnostykę prowadzono w laboratorium drugiej klasy bezpieczeństwa biologicznego (BSL 2) z zachowaniem zasad właściwej pracy laboratoryjnej (2).

## WYNIKI

Poszukiwane patogeny wykryto i poprawnie zidentyfikowano w 8 badanych próbkach. Bakterie z gatunku *F. tularensis* zidentyfikowano z dokładnością do podgatunku, ze względu na różnice w ich chorobotwórczości, co zostało szerzej przedstawione w pierwszej części niniejszej pracy (1). W badanych próbkach wykryto *Y. pestis*, *F. tularensis* ssp. *holarctica*, *B. anthracis*, *B. mallei* oraz *B. pseudomallei*. Bezbłędnie wykryto i zidentyfikowano patogeny zawarte w próbkach klinicznych. W przypadku jednej próbki środowiskowej zawierającej *B. pseudomallei* błędnie zidentyfikowano gatunek wykrytego patogenu jako *B. mallei*. Najwięcej kłopotów w przeprowadzonych badaniach przysporzyły próbki mleka. Właściwy wynik uzyskano tylko dla 2 z 5 próbek z tej grupy. Prawdopodobną przyczyną tego jest fakt, iż składniki, takie jak białka mleka i jony wapnia mają silne właściwości hamujące PCR, co w połączeniu z niewielką liczbą komórek bakteryjnych w próbce mogło powodować uzyskanie fałszywie ujemnego wyniku badania (3, 4). Nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy próbkami DNA wyizolowanego zestawem DNeazy Blood and Tissue Kit (Qiagen) oraz NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel). Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli I wraz z zestawieniem wyników uzyskanych przez pozostałe laboratoria biorące udział

Tabela I. Wyniki identyfikacji wysoce niebezpiecznych patogenów bakteryjnych w próbkach zawierających inaktywowane patogeny, otrzymanych w ramach międzynarodowego sprawdzianu w projekcie EQADeBa finansowanym przez Unię Europejską

Table I. Results of identification highly pathogenic bacteria in samples containing inactivated pathogens, received within framework of the international test in the EQADeBa project financed by European Union

Rodzaj próbki	Oznaczenie	Patogen obecny w próbce*	Liczba bakterii/ml*	Patogen wykryty przez laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH	Wyniki we wszystkich 23 laboratoriach biorących udział w sprawdzianie*	
					Poprawne	Błędne lub niepełne**
Kliniczna	Clin-01	<i>F. tularensis ssp. holarctica</i>	10 <sup>5</sup>	<i>F. tularensis ssp. holarctica</i>	20	3
	Clin-02	<i>F. tularensis ssp. holarctica</i>	10 <sup>9</sup>	<i>F. tularensis ssp. holarctica</i>	20	3
	Clin-03	-	0	-	23	0
	Clin-04	<i>B. mallei</i>	10 <sup>6</sup>	<i>B. mallei</i>	22	1
	Clin-05	<i>B. mallei</i>	10 <sup>8</sup>	<i>B. mallei</i>	22	1
Środowiskowa	Env-01	<i>Y. pestis</i>	10 <sup>8</sup>	<i>Y. pestis</i>	23	0
	Env-02	-	0	-	22	1
	Env-03	<i>B. pseudomallei</i>	10 <sup>6</sup>	<i>B. pseudomallei</i>	23	0
	Env-04	<i>B. pseudomallei</i>	10 <sup>8</sup>	<i>B. mallei</i>	22	1
	Env-05	<i>Y. pestis</i>	10 <sup>5</sup>	<i>Y. pestis</i>	22	1
Żywność	Food-01	<i>B. anthracis</i>	10 <sup>4</sup>	-	19	4
	Food-02	<i>B. melitensis</i>	10 <sup>9</sup>	-	22	1
	Food-03	-	0	-	23	0
	Food-04	<i>B. anthracis</i>	10 <sup>6</sup>	<i>B. anthracis</i>	23	0
	Food-05	<i>B. melitensis</i>	10 <sup>7</sup>	-	19	4

\* Informacje przekazane przez organizatorów po zakończeniu sprawdzianu

\*\* identyfikacja tylko do rodzaju

w trzecim sprawdzianie EQADeBa w zakresie próbek inaktywowanych.

Wszystkie 23 laboratoria biorące udział w sprawdzianie bezbłędnie wykryły i zidentyfikowały patogeny obecne w 5 spośród 15 badanych próbek. Najwięcej problemów nastęrczyły cztery próbki: dwie próbki mleka, oznaczone jako Food-01 i Food-05, skażone odpowiednio *B. anthracis* i *B. melitensis* w ilości 10<sup>4</sup>/ml. W tym przypadku 4 laboratoria nie wykryły bakterii z gatunku *B. anthracis* i *B. melitensis*, podczas gdy przy zawartości tych patogenów w stężeniu 10<sup>6</sup>/ml ich detekcja nie stanowiła już takiego poważnego problemu. Trudności w identyfikacji czynnika kontaminującego sprawiły również dwie próbki surowicy, oznaczone Clin-01 i Clin-02, skażone *F. tularensis ssp. holarctica*. Trzy laboratoria nie dokonały prawidłowej identyfikacji podgatunku. Jedno laboratorium nie wykryło także *B. mallei* w próbkach Clin-04 i Clin-05.

Najmniej błędów zostało popełnionych w badaniu próbek środowiskowych. Dwa laboratoria nie wykryły patogenów w próbkach Env-04 i Env-05, a jedno laboratorium uzyskało wynik fałszywie dodatni w próbce Env-02 nie zawierającej czynnika kontaminującego.

## DYSKUSJA

W sprawdzianie obejmującym próbki inaktywowane wzięły udział 23 laboratoria z Europy – o trzy więcej

niż w badaniu próbek zawierających żywe patogeny. Wynika to z faktu, że wciąż jeszcze nie wszystkie kraje dysponują laboratoriami trzeciej klasy bezpieczeństwa biologicznego (BSL 3) i tym samym nie mogą prowadzić prac z wysoce niebezpiecznymi patogenami należącymi do III kategorii zagrożenia (5).

Zestaw stosowanych przez różne laboratoria testów do wykrywania i identyfikacji wysoce chorobotwórczych bakterii w próbkach inaktywowanych obejmował przede wszystkim metody molekularne, takie jak PCR, real-time PCR, LCR (*Ligase Chain Reaction*), sekwencjonowanie DNA. Trzy laboratoria, oprócz metod opartych na PCR, stosowały metody immunologiczne, takie jak DIFA (*Direct Immunofluorescence Assay*), IFA (*Immunofluorescence Assay*), cELISA (*capture enzyme-linked immunosorbent assay*), a jedno z laboratoriów zastosowało także barwienie metodą Grama przy poszukiwaniu *B. anthracis* w próbkach. Różnice w stosowanych metodach dotyczyły także metod izolacji DNA oraz objętości próbki użytej do izolacji, która w różnych laboratoriach wahała się od 100 µl do 1000 µl. Niektóre laboratoria wykrywając poszczególne patogeny określały także ich liczbę w próbce, jednak nie było to wymagane w sprawdzianie.

Inaktywacja próbek podejrzanych o skażenie wysoce niebezpiecznymi patogenami pozwala nie tylko na ich badanie w laboratoriach nieposiadających specjalnych zabezpieczeń, ale także na przesyłanie tego typu próbek bez specjalnych zabezpieczeń i zezwoleń,

jakie są wymagane w przypadku transportu materiału wysoce zakaźnego. Pozwala to znacząco obniżyć koszt przesyłania próbek do laboratorium, a nawet usprawnić transport takich próbek. Jednakże inaktywacja patogenów zawartych w próbce wiąże się z brakiem możliwości ich namnożenia. Niesie to ryzyko niewykrycia patogenu w badanej próbce ze względu na zbyt małą liczbę komórek bakteryjnych obecnych w próbce. Każda stosowana metoda ma określoną czułość analityczną, poniżej której nie można wykryć patogenu. Ponadto próbki, które nie stanowią czystej hodowli bakteryjnej zawierają różnego rodzaju inhibitory, które mogą hamować PCR uniemożliwiając wykrycie patogenu (6, 7, 8). Rozcieńczenie próbki DNA użytej jako matryca do PCR jest jedną z metod mających na celu zmniejszenie wpływu inhibitorów na reakcję. Jednak rozcieńczenie może również spowodować, że ilość poszukiwanego DNA w próbce będzie poniżej poziomu detekcji stosowanej metody.

Prawdopodobnie wpływ inhibitorów obecnych w próbkach mleka zadecydował o tak dużych problemach z wykryciem patogenów w tego typu próbkach w niniejszym sprawdzianie. Metodami, które mogą pomóc w rozwiązaniu tych problemów może być dobór odpowiedniej metody izolacji DNA, która umożliwi skuteczne usunięcie czynników mogących hamować PCR, dobór odpowiedniej polimerazy DNA, a także wzbogacenie mieszaniny reakcyjnej o odpowiednio dobrany czynnik umożliwiający przełamanie inhibicji (7). Przeprowadzone przez *Al-Soud* i *Rastrom* (9) badania wykazały, że komercyjnie dostępne polimerazy DNA mają różną wrażliwość na inhibitory PCR. Dlatego też wpływ inhibitorów zawartych w próbce na wynik PCR może zostać zredukowany poprzez odpowiedni dobór termostabilnej polimerazy DNA. Wśród czynników, które ułatwiają amplifikację DNA przy odpowiednim ich stężeniu są wymieniane m.in. białka, takie jak BSA i pg32 (10, 11), rozpuszczalniki organiczne, takie jak DMSO czy formamid (12, 13), detergenty niejonowe, np. Tween-20, Triton X (7), czynniki określane jako „biologicznie zgodne substancje rozpuszczone” (*biologically compatible solutes*), takie jak betaina i glicerol (13, 14) oraz polimery, np. PEG i dekstran (10, 12). Należy zwrócić uwagę, że wiele z tych czynników w różnych stężeniach wchodzi w skład buforów reakcyjnych różnych polimeraz DNA.

## PODSUMOWANIE

Podsumowując, należy jeszcze raz podkreślić, iż brak możliwości namnożenia patogenu obecnego w próbce może prowadzić do uzyskania fałszywie ujemnego wyniku. Jednak inaktywacja próbki zapewnia bezpieczeństwo personelu wykonującego badanie oraz

niweluje ryzyko skażenia środowiska laboratorium. Jak pokazały doświadczenia niniejszego sprawdzianu, konieczny jest bardzo dokładny dobór i sprawdzenie metodyki, według której mają być wykonywane badania próbek inaktywowanych, w szczególności próbek żywności, a uzyskany wynik negatywny nie powinien być nigdy traktowany jako pewny.

Wyniki trzeciego międzynarodowego sprawdzianu dotyczącego wykrywania wysoce patogennych bakterii potwierdziły kompetencje laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH w zakresie wykrywania i identyfikacji *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Brucella* sp., *Bulkholderia mallei* i *B. pseudomallei* zarówno w próbkach zawierających żywe patogeny, jak też w próbkach zawierających patogeny inaktywowane.

## PIŚMIENNICTWO

1. Zasada AA, Gierczyński R, Rzczkowska M, i in. Wykrywanie i identyfikacja wysoce patogennych bakterii w ramach międzynarodowego projektu EQADeBa – część I: Próbki zawierające żywe patogeny. *Przegl Epidemiol* 2011; 65: 401-407.
2. World Health Organization. Laboratory biosafety manual 3rd ed., Genewa 2004.
3. Bickley J, Short JK, McDowel DG, Parkes HC. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett Appl Microbiol* 1996; 22: 153-158.
4. Powell HA, Gording CM, Garret SD, i in. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 1994; 18: 59-61.
5. Dyrektywa 2000/54/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 września 2000 r. w sprawie ochrony pracowników przed ryzykiem związanym z narażeniem na działanie czynników biologicznych w miejscu pracy (siódma dyrektywa szczegółowa w rozumieniu art. 16 ust. 1 dyrektywy 89/391/EWG)
6. Demeke T, Jenkins GR. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem* 2010; 396: 1977-1990.
7. Rastrom P, Knutsson R, Wolffs, i in. Pre-PCR Processing. Strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol* 2004; 26: 133-146.
8. Rossen L, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen OF. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions.
9. Al-Soud AW, Radstrom P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3748-3753.