

Beata Krawczyk

Katedra Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej  
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk  
Wpłynęło w kwietniu 2007 r.

1. Wstęp. 2. Metody genotypowe różnicowania drobnoustrojów. 2.1. Analiza restrykcyjna chromosomalnego DNA połączona z elektroforezą pulsową (REA-PFGE). 2.2. Analiza profili plazmidowych. 2.3. Hybrydyzacja DNA-DNA. 2.4. Metody oparte o amplifikację DNA techniką PCR. 2.4.1. Amplifikacja znanych regionów genomu połączona z analizą restrykcyjną (PCR-RFLP). 2.4.2. Wykorzystanie sekwencji repetytywnych w genotypowaniu bakterii. 2.4.3. PCR fingerprinting. 2.4.4. Sekwencjonowanie genów. 2.5. Techniki oparte o ligację adaptorów oligonukleotydowych. 2.5.1. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). 2.5.2. IRS-PCR (Infrequent Restriction Site PCR). 2.5.3. ADSRRS (Amplification of DNA Surrounding Rare Restriction Sites). 2.6. Metody oparte na właściwościach topnienia DNA. 2.6.1. Elektroforeza w gradiencie denaturującym (DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; TGGE – Temperature Gradient Gel Electrophoresis). 2.6.2. Technika SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). 2.6.3. PCR MP (PCR Melting Profiles). 2.6.4. Real-time PCR. 3. Wnioski końcowe

### Molecular diagnostic in hospital infections

**Abstract:** In this review, we have compared some of the most current technologies for genotyping with regard to the principles of the methods and their reproducibility, discrimination power, ease of use and cost. Macrorestriction analysis of genomic DNA followed by pulsed-field gel electrophoresis (REA-PFGE) has become the “gold standard” for molecular typing. However, REA-PFGE is time-consuming and labor-intensive and can be performed only in reference laboratories with skillful technicians. Due to these drawbacks, this typing method is not ideal for health departments undertaking routine analysis of large numbers of isolates. A variety of PCR-based methods for displaying DNA sequence polymorphism have been developed. Some of the methods such as RAPD, AFLP and ADSRRS regarded as alternative to REA-PFGE, are useful systems for molecular typing of microorganisms.

1. Introduction. 2. Genotyping methods for the differentiation of microorganisms. 2.1. Macrorestriction analysis of DNA-fragments using pulsed-field gel electrophoresis (REA-PFGE). 2.2. Plasmid profile analysis. 2.3. DNA-DNA hybridization. 2.4. Methods based on PCR amplification. 2.4.1. Amplification of known DNA regions with restriction analysis (PCR-RFLP). 2.4.2. Usefulness of repetitive sequences in genotyping. 2.4.3. PCR fingerprinting. 2.4.4. Sequencing. 2.5. Techniques based on oligonucleotide adapters ligation. 2.5.1. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). 2.5.2. IRS-PCR (Infrequent Restriction Site PCR). 2.5.3. ADSRRS (Amplification of DNA Fragments Surrounding Rare Restriction Sites). 2.6. Methods based on melting properties of DNA. 2.6.1. Electrophoresis in denaturing gradient (DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; TGGE – Temperature Gradient Gel Electrophoresis). 2.6.2. SSCP technique (Single Strand Conformation Polymorphism). 2.6.3. PCR MP (PCR Melting Profiles). 2.6.4. Real-time PCR. 3. Summary

---

**Słowa kluczowe:** epidemiologia, diagnostyka molekularna, epidemia, genotypowanie, PCR

**Key words:** epidemiology, molecular diagnostic, outbreak, genotyping, PCR

---

## 1. Wstęp

Zakażenia szpitalne są przyczyną wielu zgonów, przedłużonego leczenia i rekonwalescencji, co pochłania ogromne ilości pieniędzy. Dane oparte na prospektywnych badaniach sugerują, że bezpośrednia umieralność pacjentów z zakażeniami szpitalnymi wynosi 10%, a pośrednia 30%. Według danych Polskiego Towarzystwa Zakażeń Szpitalnych procent zakażeń szpitalnych w Polsce wynosi 3–7%.

W erze przedantybiotykowej główne problemy w zakażeniach szpitalnych stwarzały ziarenkowce Gram-dodatnie: *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus*. Kumulacja problemów związanych z gronkowcem złocistym wystąpiła w latach 1940–1950 i ogarnęła cały świat. W latach 70-tych do nabrały znaczenia

pałeczki Gram-ujemne, szczególnie *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterobacteriaceae*. W końcu lat 80-tych i na początku 90-tych do użycia weszło wiele skutecznych leków o aktywności przeciw pałeczkom Gram-ujemnym. W tym okresie nasilił się problem zakażeń wywoływanych przez metycylooporne gronkowce złociste (MRSA) i wankomycylooporne enterokoki (VRE). W latach 90-tych trzy powszechnie występujące ziarenkowce Gram-dodatnie (*Staphylococcus aureus*, koagulazo-ujemne gronkowce i enterokoki) były odpowiedzialne za 34% infekcji szpitalnych. Do najczęstszych patogenów Gram-ujemnych należą: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. oraz *Klebsiella pneumoniae* (32% zakażeń szpitalnych).

Duży problem stanowią infekcje szpitalne wywołane przez szczepy wielooporne, których leczenie jest

utrudnione ze względu na ograniczone możliwości terapeutyczne. Wśród ziarenkowców Gram-dodatnich główny problem stanowią metycylinooporne gronkowce złociste. Częstość ich występowania w polskich szpitalach jest wysoka, 5–20%. Niedawno pojawiły się szczepy o obniżonej wrażliwości na wankomycynę. Może to doprowadzić do sytuacji, w której brak będzie jakichkolwiek możliwości leczenia infekcji gronkowcowych. Wśród pałeczek Gram-ujemnych główny problem stanowią pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* wytwarzające enzymy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) oraz wielooporne szczepy *P. aeruginosa*, a także *Acinetobacter baumannii*. ESBL pojawiły się po raz pierwszy w Europie Zachodniej w latach 80-tych. Pierwotnie wyizolowano je ze szczepów *E. coli* oraz *K. pneumoniae*. Dziś obserwuje się je u większości gatunków pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, a także u pałeczek niefermentujących. Dodatkowym problemem jest wzrost zakażeń oportunistycznych wywoływanych przez drobnoustroje o niewielkiej wirulencji, występujących u osób z upośledzoną odpornością i innymi czynnikami ryzyka zakażenia. Jest to problem w skali światowej i zdecydowanie pozostaje w związku z typem wykonywanych procedur diagnostycznych leczniczych, specyfiką oddziału i reżimem sanitarnym [12, 19].

Ważnym elementem ograniczania zakażeń szpitalnych jest prowadzenie programów ich kontroli mających na celu szczegółowe poznanie dróg rozprzestrzeniania się infekcji oraz potencjalnych rezerwuarów mikroorganizmów patogennych. Zwiększenie intensywności badań mikrobiologicznych pacjentów i kontroli aseptyczności sprzętu medycznego oraz rygorystyczne przestrzeganie zasad higieny pracy przez personel szpitalny to jedynie niektóre ze sposobów zmniejszenia zagrożenia zakażeniem wywołanym przez różnego typu patogeny. Ważną rolę w ograniczaniu zakażeń szpitalnych odgrywa diagnostyka mikrobiologiczna, której celem jest jak najszybsza izolacja czynnika etiologicznego, określenie jego wrażliwości na leki i mechanizmów oporności, a także weryfikacja wyniku w odniesieniu do stanu klinicznego pacjenta. Laboratorium mikrobiologiczne dostarcza także danych o występowaniu zagrożeń epidemicznych. Znajomość najczęściej występujących mikroorganizmów na danym oddziale i ich wrażliwości na antybiotyki jest niezwykle cenną wskazówką leczniczą, gdyż umożliwia zastosowanie z dużym prawdopodobieństwem skutecznego i jednocześnie możliwie taniego antybiotyku już w momencie postawienia diagnozy zakażenia bez konieczności oczekiwania na wynik badania mikrobiologicznego.

Stały monitoring środowiska szpitalnego nie jest możliwy bez zastosowania metod diagnostycznych gwarantujących jednoznaczną identyfikację czynnika chorobotwórczego.

Obecnie w diagnostyce mikrobiologicznej znajdują zastosowanie klasyczne metody typowania drobnou-

ustrojów oparte na analizie ich cech fenotypowych (metody fenotypowe) oraz metody oparte na analizie ich materiału genetycznego, wykorzystujące nowoczesne techniki biologii molekularnej (metody genotypowe).

Metody fenotypowe różnicowania drobnoustrojów opierają się na obserwacji zewnętrznych efektów ekspresji informacji genetycznej. Problem z jednoznaczną, a zarazem szybką identyfikacją drobnoustrojów chorobotwórczych za pomocą tych metod jest związany z powszechnym zjawiskiem zmienności fenotypowej. Z tego względu szuka się nowych, bardziej jednoznacznych metod klasyfikacji drobnoustrojów. Szczególny nacisk kładzie się na techniki typowania mikroorganizmów oparte o analizę materiału genetycznego. Materiał genetyczny jest unikalny i stały dla każdego organizmu (niezmienny w porównaniu do cech fenotypowych). Metody genotypowe znajdują coraz szersze zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej (wykrywaniu, identyfikacji, różnicowaniu), a w szczególności w badaniach epidemiologicznych [56]. Niewątpliwą zaletą metod genotypowych jest to, iż nie są ograniczone do ściśle określonej liczby organizmów; nadają się do badania wszystkich organizmów, także tych, których hodowla laboratoryjna jest niezmiernie trudna lub wręcz niemożliwa. Zaletą technik molekularnych w porównaniu z metodami klasycznymi jest również skrócenie czasu wykonywanych analiz, często także zmniejszenie kosztów, pracochłonności oraz uniwersalność stosowanej aparatury i odczynników.

## 2. Metody genotypowe różnicowania drobnoustrojów

Różnice pomiędzy genomami szczepów należących do tego samego gatunku mogą być wynikiem rekombinacji genetycznych czy też mutacji zachodzących podczas replikacji. Zmienność genetyczna może być badana za pomocą różnych technik biologii molekularnej. Tworzone są nowe, coraz bardziej dokładne metody analizy materiału genetycznego, ale równocześnie dąży się do uproszczenia istniejących już metod diagnostycznych przy jednoczesnym zwiększaniu ich czułości, wiarygodności, powtarzalności i mocy dyskryminacyjnej. Poniżej przedstawiono krótkie opisy molekularnych metod różnicowania mikroorganizmów, zarówno już uznanych i szeroko stosowanych w badaniach epidemiologicznych, jak i stosunkowo nowych, z dużymi perspektywami stosowania w przyszłości.

### 2.1. Analiza restrykcyjna chromosomalnego DNA połączona z elektroforezą pulsową (REA-PFGE)

Pośród wszystkich metod typowania mikroorganizmów na szczególną uwagę zasługują metody genotypowe oparte na analizie całego materiału genetycznego zawartego w komórce. W chwili obecnej za „złoty standard” metod typowania drobnoustrojów uważa się tech-

nikę REA-PFGE (Restriction Enzyme Analysis – Pulsed Field Gel Electrophoresis). Liczba i wielkość fragmentów DNA uzyskanych w wyniku cięcia enzymem restrykcyjnym zależy od długości sekwencji rozpoznania dla zastosowanego enzymu oraz charakteru trawionego DNA (% składu par zasad GC). Stąd, najczęściej do trawienia używa się endonukleaz rzadko tnących. Otrzymuje się fragmenty DNA o wielkości od ok. 0,5 kbp do 1000 kbp, które następnie rozdzielają się elektroforetycznie w zmiennym (pulsacyjnym) polu elektrycznym. Rozdział polega na wymuszonej w zależności od wielkości zmianie kierunku wędrówki cząsteczek DNA pod wpływem zmieniającego się pola elektrycznego. Dzięki trawieniu całego genomowego DNA, uzyskuje się wzory, będące odzwierciedleniem strukturalnej organizacji chromosomu bakteryjnego. Potencjał różnicujący metody jest niezwykle wysoki [88,89]. Zaletą tej metody jest także to, że wszystkie szczepy namnażane *in vitro* mogą być tą metodą typowane. Natomiast wadą jest częste zachodzenie i pokrywanie się fragmentów DNA o zbliżonej wielkości, co tworzy trudny do zinterpretowania obraz elektroforetyczny. Wzory REA mogą być również zaburzone fragmentami plazmidowego DNA, izolującego się łącznie z chromosomem.

PFGE znalazło zastosowanie do różnicowania między innymi szczepów (izolatów) *E. coli* [3], wankomycynoopornych enterokoków [6], *S. aureus* [80, 83], *P. aeruginosa* [32], *Mycobacterium avium* [4] i szczepów kompleksu *Acinetobacter calcoaceticus* – *A. baumannii* [61].

Powszechne użycie techniki REA-PFGE ograniczają jednak wysokie koszty wykonania (droga aparatura i odczynniki) i długi czas analizy (2–3 dni).

## 2.2. Analiza profili plazmidowych

Analiza profili plazmidowych (PPA – Plasmid Profile Analysis) jest metodą genotypowania polegającą na izolacji DNA plazmidowego z komórek bakteryjnych i jego rozdzieleniu elektroforetycznym w żelu agarozowym [81]. W zależności od wielkości i ilości plazmidów w komórce bakteryjnej otrzymuje się charakterystyczne wzory plazmidowe. Trawienie DNA plazmidowego przy użyciu komercyjnie dostępnych restryktaz pozwala na dalsze różnicowanie szczepów na podstawie uzyskanej różnorodności plazmidowych wzorów restrykcyjnych (REAP – Restriction Enzyme Analysis of Plasmid DNA). Wadą opisywanej metody genotypowania jest jej mała uniwersalność. Szczepy bakteryjne, które nie posiadają plazmidów nie podlegają różnicowaniu. Ograniczeniem zastosowania analizy profili plazmidowych w dochodzeniach epidemiologicznych jest dodatkowo zachodzący w środowisku szpitalnym szybki transfer informacji genetycznej na drodze koniugacji. Powoduje on zasadnicze zmiany

w otrzymanym obrazie profili plazmidowych, co może prowadzić do postawienia błędnej diagnozy.

Metoda ta znalazła zastosowanie w badaniu rozprzestrzeniania się lekooporności wśród szczepów różnych bakterii oraz w epidemiologii zakażeń szpitalnych [87].

## 2.3. Hybrydyzacja DNA-DNA

Podstawową metodą określania przynależności badanego drobnoustroju do genotypu, opartą na ilościowych podobieństwach w chromosomalnym DNA, jest technika hybrydyzacji DNA-DNA. Gdy zdenaturowane DNA pochodzące z dwóch organizmów podda się wspólnej inkubacji w odpowiednich warunkach obserwuje się tworzenie duplesu hybrydowego. Dla takiego duplesu możliwe jest określenie podobieństwa sekwencji nukleotydowej na podstawie jego stopnia reasocjacji lub stabilności termicznej. Hybrydyzacja DNA-DNA jest standardem rekomendowanym dla badań filogenetycznych. Jako genotyp w badaniach hybrydyzacyjnych definiuje się grupę szczepów bakteryjnych, dla których poziom reasocjacji duplesu DNA-DNA wynosi przynajmniej 70% lub różnica stabilności termicznej jest mniejsza niż 5°C.

Technika hybrydyzacji DNA-DNA jest metodą bardzo czułą i dlatego może być stosowana w badaniach dotyczących różnicowania szczepów bakteryjnych na poziomie genomogatunku [68]. Wykorzystuje się ją głównie w badaniach naukowych i nie znalazła jak dotąd powszechnego zastosowania w rutynowych badaniach laboratoriów diagnostycznych.

## 2.4. Metody oparte o amplifikację DNA techniką PCR

Od ponad 10 lat w rutynowej diagnostyce chorób infekcyjnych oraz w badaniach epidemiologicznych wzrasta zastosowanie testów opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych techniką PCR. W naukach medycznych stosowane są dwie podstawowe strategie wykrywania polimorfizmu pomiędzy badanymi drobnoustrojami wykorzystujące technikę PCR: (1) analiza zmienności genowej oraz (2) analiza zmienności genomowej. Czułość, specyficzność i łatwość wykonania sprawiają, iż różne warianty techniki PCR powoli stają się standardowym narzędziem laboratoriów diagnostyki medycznej.

### 2.4.1. Amplifikacja znanych regionów genomu połączona z analizą restrykcyjną (PCR-RFLP)

Istotą metody jest amplifikacja regionu DNA, o znanej i specyficznej dla danego gatunku sekwencji nukleotydowej (PCR) lub równoczesnej amplifikacji dwóch lub większej liczby różnych fragmentów DNA w jednej mieszaninie reakcyjnej (multiplex-PCR). Jako

cel molekularny amplifikacji wybiera się najczęściej geny specyficzne dla danego gatunku drobnoustroju. Następnie produkty reakcji PCR poddaje się trawieniu enzymami restrykcyjnymi, dobranymi w oparciu o znajomość sekwencji powielonego DNA. Dzięki temu wykrywa się charakterystyczny dla badanego drobnoustroju polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism) wykrywany metodą elektroforezy żelowej. W przypadku, gdy sekwencja nukleotydowa produktu PCR nie jest znana, częstotliwość cięcia enzymatycznego dla danego DNA jest trudna do przewidzenia. Statystycznie, w przypadku DNA z zawartością par GC około 50%, 4-nukleotydowa sekwencja rozpoznania powinna występować, co 256 pz, 6-nukleotydowa co 4 kpz, a sekwencja 8-nukleotydowa co 65 kpz. Produkty PCR zwykle mają wielkość do około 2 kpz, stąd wybór restryktaz z 4-nukleotydową sekwencją rozpoznania jest najbardziej uzasadniony. O diagnostycznej przydatności danego enzymu restrykcyjnego decydują ostatecznie wyniki otrzymane na podstawie przeprowadzonych eksperymentów.

Techniką PCR-RFLP można różnicować drobnoustroje na poziomie gatunków lub podgatunków, np. *Xanthomonas campestris* [59], *P. aeruginosa* [9], *Streptococcus defectives* [10], *Streptococcus adjacens* [10], *Listeria* [39], *Borrelia* [5], *Campylobacter* [37], czy *Acinetobacter* [50, 71, 72]. Metoda ta jest użyteczna również do różnicowania pomiędzy szczepami jednego gatunku w badaniach epidemiologicznych.

Najbardziej użyteczną odmianą techniki PCR-RFLP jest rybotypowanie, czyli analiza genów kodujących rybosomalne RNA, zlokalizowanych w operonach *rrn*, obecnych we wszystkich organizmach bakteryjnych. Sekwencja nukleotydowa tych genów charakteryzuje się wysokim stopniem zakonserwowania ewolucyjnego. Geny kodujące poszczególne rodzaje rRNA rozdzielone są regionami polimorficznymi, które charakteryzują się wysokim zróżnicowaniem pod względem sekwencji i wielkości. Te cechy genów rDNA czynią z nich znakomity zegar molekularny do studiów nad pokrewieństwem filogenetycznym nawet odległych od siebie organizmów.

W badaniach diagnostycznych stosuje się kilka metod rybotypowania wykorzystujących różne regiony operonu *rrn* jako cele molekularne w reakcji PCR: (1) amplifikację polimorficznego regionu pomiędzy genami kodującymi 16S i 23S rRNA, (2) amplifikację zmiennego regionu wewnątrz genu kodującego 16S rRNA, (3) amplifikację regionu zawierającego geny kodujące 16S i 23S rRNA oraz fragmentu polimorficznego pomiędzy nimi, (4) amplifikację regionu kodującego tRNA, (5) analizę sekwencyjną genu kodującego 16S rRNA. Amplifikacja techniką PCR łączona jest bardzo często z analizą restrykcyjną (ARDRA – Ampli-

fied Ribosomal DNA Restriction Analysis), co dodatkowo zwiększa możliwości różnicujące metody. Identyfikacja drobnoustrojów dzięki zastosowaniu ARDRA staje się relatywnie prosta i nie wymaga kosztownej aparatury. Rybotypowanie zostało wykorzystywane m.in. do różnicowania szczepów (izolatów) takich bakterii jak: *Acinetobacter* [17, 28, 49, 82, 94, 98,], *P. aeruginosa* [32], *Enterococcus faecium* [33, 55], *Serratia marcescens* [7], *Listeria monocytogenes* [39].

W typowaniu i dochodzeniach epidemiologicznych zakażeń szpitalnych można wykorzystać również odmianę metody PCR-RFLP opartą o amplifikację fragmentu genu *recA* i cięciu produktów reakcji enzymami restrykcyjnymi (*recA*-PCR/RFLP). Sekwencja nukleotydowa genu *recA* poznana jest u szerokiej gamy drobnoustrojów. Metoda ta znalazła zastosowanie do identyfikacji genotypów bakterii z rodzaju *Acinetobacter* [50, 52, 57]. Metoda *recA*-PCR/RFLP ze względu na szybkość, łatwość wykonania i szerokie spektrum różnicowania genotypów *Acinetobacter* spp. okazuje się być najlepszym spośród obecnie znanych diagnostycznych testów identyfikacyjnych opisanych dla tego rodzaju.

#### 2.4.2. Wykorzystanie sekwencji repetytywnych w genotypowaniu bakterii

Różnice w wielkości oraz liczbie kopii repetytywnych fragmentów DNA są podstawą różnicowania metodą Rep-PCR. Regiony takie najwcześniej zostały odkryte i opisane u *Enterobacteriaceae*. Przykłady stanowią 38-nukleotydowe sekwencje REP (ang. Repetitive Extragenic Palindromic Elements) u *E. coli* lub 126-nukleotydowe sekwencje ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), charakterystyczne dla genomów bakterii Gram-ujemnych [30, 38, 86]. Amplifikacja ze starterami (jednego, pary lub kilku par) komplementarnymi do powtarzających się elementów DNA, pozwala na otrzymanie dużej ilości produktów o zróżnicowanych długościach. Rep-PCR ze starterami opartymi na sekwencjach REP i ERIC z powodzeniem zostało wykorzystane do różnicowania szczepów *Bartonella* [78], *Bacillus subtilis* [97], *Citrobacter diversus* [34], *Enterobacter aerogenes* [27], *Rhizobium meliloti* [13], metycyliny-opornych *S. aureus* [14], *Streptococcus pneumoniae* [96], *A. baumannii* [16], *Legionella pneumophila* [26], *Helicobacter pylori* [58], *Neisseria gonorrhoeae* [73], *N. meningitidis* [99].

W minionych latach dzięki sekwencjonowaniu genomów dokonał się znaczący postęp w typowaniu drobnoustrojów z wykorzystaniem sekwencji VNTR (Variable Number Tandem Repeat) [92]. Są to krótkie sekwencje nukleotydowe, powtarzające się wiele razy, a ich liczba w danym regionie VNTR jest indywidualną cechą mikroorganizmu. Przy pomocy techniki PCR poddaje się amplifikacji te regiony DNA (z użyciem

odpowiednio dobranych starterów – flankujących sekwencję VNTR), otrzymując dla badanych izolatów charakterystyczne profile elektroforetyczne produktów PCR [35]. Na tej podstawie opracowano nowe metody różnicowania drobnoustrojów, takich jak np.: *S. aureus* [76], *Bacillus anthracis* [45], *H. pylori* [63], *Yersinia pestis* [48,1], *Haemophilus influenzae* [91], *Mycobacterium tuberculosis* [25] czy *Francisella tularensis* [22]. Okazuje się też, że liczba powtórzeń w pewnych sekwencjach VNTR ma wpływ na patogenność bakterii, która wzrastać może z ilością powtarzających się podjednostek [24, 67]. Istotny jest również fakt wysokiej konserwatywności regionów VNTR. Sekwencje te wykazują podatność na zmiany mutacyjne. Delecje i duplikacje powtarzających się podjednostek oraz mutacje punktowe spowodowały obserwowaną obecnie różnorodność sekwencji VNTR [85].

W odpowiedzi na panującą epidemię wielolekoopornej gruźlicy na świecie i związaną z nią liczbę zgonów (ok. 2 mln ludzi rocznie, dane WHO) widoczny jest znaczący postęp w opracowaniu nowych metod genotypowania *M. tuberculosis* complex, użytecznych w badaniach epidemiologicznych gruźlicy prowadzonych na skalę światową. Do największych osiągnięć zaliczyć należy metody oparte o analizę sekwencji powtarzających się typu DR (Direct Repeats). Sekwencje powtarzające się typu DR występujące na przemian z sekwencjami zmiennymi o stałej długości 25 nukleotydów po raz pierwszy opisano w pracy Groenena i wsp. [31]. W oparciu o nie, Kamerbeek i wsp. [41] opracowali metodę genotypowania *M. tuberculosis* complex o nazwie „spoligotyping”, wzorując się na technice Reverse Line Blot (RLB) Hybridisation [43]. Metoda „spoligotyping” charakteryzuje się wysoką prostotą wykonania i wysoką powtarzalnością, co ma zasadnicze znaczenie w zbiorczej analizie wyników genotypowania *M. tuberculosis* complex w referencyjnych ośrodkach w kraju i na świecie [54]. W metodzie tej wykorzystuje się dwie sekwencje starterowe Dra i Drb specyficzne do sekwencji powtarzającej się, z których jedna znakowana jest biotyną. Po reakcji PCR możliwe jest wykrywanie rejonów zmiennych z użyciem metody hybrydizacji w połączeniu z detekcją metodą chemiluminescencji, tzw. sekwencji zmiennych występujących pomiędzy powtarzającą się sekwencją typu DR.

#### 2.4.3. PCR fingerprinting

Istnieje wiele różnorodnych metod określanych wspólną nazwą PCR fingerprinting, ale zasadniczo wszystkie posiadają jeden cel – powielenie polimorficznych regionów DNA w reakcji PCR z zastosowaniem starterów o zwykle dowolnej sekwencji lub starterów racjonalnie zaprojektowanych. Startery w sposób spe-

cyficzny hybrydują w komplementarnych regionach DNA matrycowego. Jeśli przyłączenie pary starterów nastąpi w odpowiedniej orientacji i odpowiedniej odległości następuje amplifikacja produktu charakterystycznego dla badanego gatunku lub szczepu.

Techniki PCR fingerprinting charakteryzuje duża różnorodność rozwiązań technicznych. W typowaniu dużej liczby drobnoustrojów zastosowanie znalazły takie odmiany techniki PCR fingerprinting jak RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AP-PCR (Arbitrary Primed PCR) oraz DAF (DNA Amplification Fingerprinting). Wymienione metody różnią się od siebie tylko długością stosowanych starterów, która dla RAPD wynosi 9–10 nt, dla AP-PCR 18–32 nt, a dla DAF 5–15 nt. Krótkie startery o dowolnie dobranej sekwencji przyłączają się w sposób mało specyficzny w różnych miejscach chromosomalnego DNA. Najbardziej efektywnie związane z matrycą pary starterów konkurują ze sobą w procesie amplifikacji, dzięki czemu otrzymuje się tzw. odcisk palca (fingerprint), złożony z różnej ilości i wielkości produktów PCR (od kilku do ponad 100, w zakresie od ok. 100 do 2000 pz). Elektroforetyczny rozdział produktów w żelu poliakrylamidowym pozwala na uwidocznienie różnic pomiędzy badanymi szczepami drobnoustrojów w postaci różnic w profilach elektroforetycznych.

Spośród wszystkich wspomnianych technik określanych wspólną nazwą PCR fingerprinting najchętniej i najczęściej stosowaną w diagnostyce jest RAPD. Dzięki szybkości i prostocie wykonania, dużej czułości i mocy dyskryminacyjnej RAPD znalazła zastosowanie w monitoringu epidemii i infekcji wywołanych przez endemiczne szczepy drobnoustrojów chorobotwórczych. Niestety okazuje się, iż metoda ta jest bardzo podatna na subtelne zmiany takich czynników jak: stężenie starterów, stężenie i jakość matrycowego DNA, warunki elektroforezy oraz rodzaj używanej polimerazy termostabilnej. Skutkiem tego zjawiska jest mała powtarzalność przeprowadzanych eksperymentów, w szczególności w skali międzylaboratoryjnej.

Technikę PCR-fingerprinting wykorzystano do różnicowania między innymi *A. baumannii* [75], *H. pylori* [2], *P. mirabilis* [7], *Haemophilus somnus* [70], *Leptospira* sp. [74], *S. aureus* [80], *L. pneumophila* [90], *E. faecium* [79] i *Serratia marcescens* [53], *Histoplasma capsulatum* [46], *Candida albicans* [60].

#### 2.4.4. Sekwencjonowanie genów

Określenie sekwencji nukleotydowej genów wielokrotnie powtórzonych w genomie bakteryjnym dla różnych szczepów jest niezawodną i łatwą w interpretacji metodą, ale wymaga odpowiedniego warsztatu laboratoryjnego. Znaczenie analizy sekwencyjnej jako metody typowania szybko wzrasta ze względu na szybko

rozwoj metod sekwencjonowania. Przypuszcza się, iż w przyszłości sekwencjonowanie genów stanie się techniką stosowaną rutynowo w laboratoriach diagnostycznych zajmujących się badaniami epidemiologicznymi.

Jedną z najnowszych metod sekwencyjnych – MLST (Multi Locus Sequence Typing), polega na sekwencjonowaniu fragmentów najczęściej siedmiu genów niezbędnych do utrzymania metabolizmu komórkowego (housekeeping genes) [62]. Dużą zaletą tej metody jest możliwość stworzenia bazy danych sekwencyjnych, która pozwoli laboratoriom na całym świecie weryfikować otrzymane wyniki.

Metodę MLST zastosowano między innymi do różnicowania szczepów i badania zależności klonalnych *N. meningitidis* [62] *Campylobacter* sp. [66] i *S. pneumoniae* [21]. Sekwencjonowanie genów znalazło również zastosowanie w typowaniu *Staphylococcus aureus*. Dzięki MLST rozróżnia się szczepy MRSA i MSSA [20], a sekwencjonowanie 3'-końcowego regionu genu *coa*, kodującego koagulazę, wykorzystuje się w badaniach nad ustalaniem dróg rozprzestrzeniania szczepów metycyloopornych w środowisku szpitalnym [42].

## 2.5. Techniki oparte o ligację adaptorów oligonukleotydowych

Metody oparte na analizie całego materiału genetycznego poprzez amplifikację fragmentów restrykcyjnych z dołączonymi do nich adaptorami oligonukleotydowymi znajdują coraz szersze zastosowanie w badaniach epidemiologicznych. Do amplifikacji używa się starterów specyficznych do sekwencji adaptorów (linkera). W ten sposób wszystkie fragmenty DNA, które są związane z oligonukleotydowymi linkerami mogą być potencjalnie amplifikowane.

Do metod wykorzystujących adaptory w reakcji PCR należą: AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), IRS-PCR (Infrequent Restriction Site PCR), ADSRRS (Amplification of DNA Fragments Surrounding Rare Restriction Sites) oraz PCR MP (PCR Melting Profiles). Każda z tych metod oparta jest na selektywnej amplifikacji ograniczonej reprezentacji genomu bakteryjnego.

### 2.5.1. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP jest techniką analizy całego genomowego DNA opartą na selektywnej amplifikacji PCR odpowiednio przygotowanych fragmentów otrzymanych na drodze enzymatycznego trawienia DNA genomowego. Strategia metody złożona jest z czterech podstawowych etapów: (1) trawienia całkowitego DNA komórkowego z zastosowaniem dwóch racjonalnie dobranych enzymów restrykcyjnych, (2) reakcji ligacji otrzymanych

fragmentów z odpowiednio zaprojektowanymi adaptorami, (3) selektywnej amplifikacji produktów ligacji z zastosowaniem dwóch starterów homologicznych do sekwencji adaptor-miejsce restrykcyjne, (4) elektroforezy produktów amplifikacji i autoradiografii otrzymanych rozdzielów elektroforetycznych. Startery użyte do amplifikacji zawierają sekwencję DNA homologiczną do adaptorów i zawierają od jednej do dwóch selektywnych zasad na końcu 3'. Te selektywne nukleotydy pozwalają na wybiórczą amplifikację tylko pewnej puli fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA. AFLP okazuje się być znakomitym narzędziem różnicowania mikroorganizmów, charakteryzującym się wysoką powtarzalnością dużą siłą dyskryminacji badanych mikroorganizmów. Dzięki swojej uniwersalności, powtarzalności i stosunkowo prostemu wykonaniu metoda AFLP znalazła duże zastosowanie w genotypowaniu blisko spokrewnionych szczepów bakteryjnych [16, 29, 40, 49]. Modyfikacje AFLP zmierzają w kierunku uproszczenia procedury badawczej – SE-AFLP (Single Enzyme AFLP) [95], zwiększenia mocy dyskryminacyjnej metody – TE-AFLP (Three Enzyme AFLP) [93] oraz ułatwienia sposobu wizualizacji otrzymywanych wyników – FB-AFLP (Fluorescence-Based AFLP) [49].

### 2.5.2. IRS-PCR (Infrequent Restriction Site PCR)

Metoda IRS-PCR wykorzystuje do analizy całe genomowe DNA, powstałe w wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi: rzadko tnącym – pozostawiającym 5' wiszące końce i często tnącym, pozostawiającym 3' wiszące końce (w metodzie AFLP obie restryktazy dają 5' wiszące końce). Stosuje się adaptory oligonukleotydowe, które są ligowane do lepkich końców fragmentów restrykcyjnych. Każdy z nich składa się z oligonukleotydu pomocniczego i ligowanego. W technice IRS-PCR amplifikacja fragmentów restrykcyjnych uzależniona jest od obecności miejsca wiązania dla starterów. Dodatkowo redukcja liczby amplifikowanych fragmentów jest osiągnięta przez dodanie jednego selektywnego nukleotydu do startera. Technika znalazła zastosowanie m.in. w różnicowaniu klinicznych izolatów *A. baumannii* i *S. marcescens* [100], *L. pneumophila* [77], *L. monocytogenes* [23]. IRS-PCR jest powtarzalna i porównywalna z PFGE, ale jednocześnie szybsza i łatwiejsza w wykonaniu [77]. Potencjał różnicujący tej metody w niektórych przypadkach może być wyższy niż osiągnięty metodą RAPD [23].

### 2.5.3. ADSRRS (Amplification of DNA Surrounding Rare Restriction Sites)

ADSRRS jest metodą genotypowania opartą na amplifikacji wybranych fragmentów DNA otaczających miejsca restrykcyjne dla enzymów restrykcyjnych rzad-

ko tnących i zjawisku supresji reakcji PCR [15, 64]. W wyniku supresji PCR powstaje znacznie zredukowana liczba produktów amplifikacji. Jest to możliwe dzięki racjonalnie zaprojektowanej sekwencji użytych starterów oraz odpowiednio przygotowanej do reakcji PCR matrycy. Całkowite DNA genomowe poddaje się trawieniu dwoma enzymami restrykcyjnymi pozostawiającymi lepkie końce. Dla jednego z nich sekwencja rozpoznania występuje setki razy w badanym genomie (restryktaza często tnąca), a dla drugiego kilkadziesiąt razy rzadziej (restryktaza rzadko tnąca). W wyniku trawienia enzymatycznego otrzymuje się mieszaninę produktów, w której największy jest udział produktów zakończonych z obu stron lepkimi końcami powstałymi na skutek trawienia genomu enzymem często tnącym. Drugą, co do liczebności grupę produktów stanowią fragmenty genomowego DNA zakończone dwoma różnymi, lepkimi końcami, z których jeden powstał w wyniku trawienia enzymem często tnącym, a drugi rzadko tnącym. Trzecią, najmniej liczną grupę, stanowią produkty trawienia enzymatycznego powstałe w wyniku cięcia genomu enzymem rzadko tnącym. Następnie otrzymane produkty trawienia enzymatycznego poddaje się reakcji ligacji z odpowiednio zaprojektowanymi adaptorami oligonukleotydowymi. Stosuje się dwa rodzaje adaptorów o różnej długości (adaptor „krótki” i adaptor „długi”), a każdy z nich jest zbudowany z dwóch oligonukleotydów: pomocniczego i ligowanego. W wyniku reakcji ligacji otrzymuje się trzy typy fragmentów DNA, z przyłączonymi na 5’ końcu: (1) dwoma adaptorami „krótkimi” (przy miejscach cięcia enzymu rzadko tnącego), (2) dwoma adaptorami „długimi” (przy miejscach cięcia enzymu często tnącego), (3) dwoma różnymi adaptorami. Produkty reakcji ligacji poddaje się następnie amplifikacji PCR z zastosowaniem odpowiednio zaprojektowanych starterów. Pierwszym etapem reakcji PCR jest wypełnianie 3’ końców produktów reakcji ligacji przez termostabilną polimerazę DNA. Po etapie wypełniania przeprowadza się kilkanaście cykli reakcji PCR. Produkty reakcji ligacji zawierające sekwencję adaptoru „długiego” na jednym końcu i sekwencję komplementarną na drugim nie ulegają amplifikacji ze względu na preferowaną wewnątrz cząsteczkową hybrydyzację fragmentów homologicznych. Tworzy się tzw. „struktura rakiety tenisowej”. W ten sposób ograniczony zostaje proces zewnątrz cząsteczkowej hybrydyzacji ze starterem. Amplifikacji ulegają natomiast cząsteczki DNA zakończone dwoma różnymi adaptorami oraz dwoma identycznymi, krótkimi adaptorami. W pierwszym przypadku hybrydyzacja wewnątrz cząsteczkowa odcinków DNA nie następuje ze względu na brak możliwości tworzenia „struktury rakiety tenisowej”. W drugim przypadku powstaje „struktura rakiety tenisowej”, która jest jednakże niestabilna w temperaturze

reakcji i zachodzi prawidłowy proces amplifikacji. W wyniku opisanych procesów, amplifikacji ulega tylko niewielka część populacji produktów znajdujących się w mieszaninie reakcyjnej. Otrzymane produkty poddaje się rozdziałowi elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym. Dzięki niewielkiej liczbie generowanych produktów łatwa staje się interpretacja otrzymanego elektroforogramu. Metoda ADSRRS posiada kilka zalet, do których zaliczyć należy: (1) nie wymaga znajomości analizowanej sekwencji, (2) uzyskane wyniki mogą być łatwo przeanalizowane na żelu poliakryloamidowym po wybarwieniu bromkiem etydyny, (3) raz ustalony adaptor i enzym może być stosowany do analizy DNA gatunków spokrewnionych ze sobą, (4) produkt PCR może być bezpośrednio izolowany z żelu poliakryloamidowego i sekwencjonowany. Opierając się na dotychczasowych badaniach można uznać, że metoda ta łączy w sobie siłę dyskryminacyjną metod PFGE oraz AFLP, jednakże jest mniej kosztowna i łatwiejsza technicznie. Metoda ta została z powodzeniem zastosowana do badań epidemiologicznych zakażeń szpitalnych *A. baumannii*, *E. faecium* [51] oraz *S. marcescens* [53].

## 2.6. Metody oparte na właściwościach topnienia DNA

### 2.6.1. Elektroforeza w gradiencie denaturującym

(DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis;  
TGGE – Temperature Gradient Gel Electrophoresis)

Powielone techniką PCR fragmenty DNA nanosi się na żel poliakryloamidowy, w którym uformowany jest rosnący gradient czynnika denaturującego (mocznik, formamid) lub temperatury [69]. Jednoniciowe cząsteczki DNA charakteryzują się zredukowaną ruchliwością elektroforetyczną (retardacja) po osiągnięciu swojego punktu denaturacji. Pozwala to na rozdział fragmentów DNA, które w formie dwuniciowej mają jednakową ruchliwość, ale różnią się w właściwościach topnienia. Metoda ta pozwala na różnicowanie nawet takich fragmentów DNA, których różnica dotyczy pojedynczych zasad analizowanej sekwencji (np. wykrywanie obecności mutacji punktowych).

### 2.6.2. Technika SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Produkty PCR są poddawane denaturacji i szybko chłodzone (powstają jednoniciowe cząsteczki DNA-ssDNA)), a następnie poddawane elektroforezie na niedenaturującym żelu poliakryloamidowym. Cząsteczki ssDNA o takiej samej długości mogą tworzyć różne struktury II rzędowe, wynikające z różnic w sekwencji nukleotydowej, co objawia się różną szybkością ich migracji elektroforetycznej. Ograniczeniem tej metody

jest rozmiar analizowanego produktu do 400 pz. SSCP może mieć zastosowanie do analizy mutacji oporności na antybiotyki [11]. Metoda jest powtarzalna, ale charakteryzuje się niższym potencjałem różnicującym niż AFLP czy PFGE [36]. Charakteryzuje się również wysokim stopniem trudności wykonania i wysokimi kosztami.

### 2.6.3. PCR MP (PCR Melting Profiles)

Metoda PCR MP oparta jest na ligacji adaptora dla wykreowania miejsc wiążących starter w reakcji PCR i na różnicach w temperaturach topnienia DNA amplifikowanych fragmentów restrykcyjnych. Procedura składa się z czterech etapów: (1) trawienia genomowego DNA jednym enzymem restrykcyjnym dającym końce wiszące 5', (2) ligacji adaptora, (3) wypełnienia końców 5' fragmentów niosących potencjalne miejsca wiązania startera oraz (4) reakcji PCR. Ograniczoną reprezentację genomu w postaci produktów PCR uzyskuje się poprzez selektywną amplifikację tylko tych fragmentów DNA, które ulegają denaturacji przy zadanej temperaturze etapu denaturacji reakcji PCR. Liczba amplifikowanych fragmentów DNA w PCR MP zależy od zastosowanej temperatury na etapie denaturacji. Otrzymane profile z zastosowaniem PCR MP pozwalają na porównanie wewnętrznego profilu w reakcji PCR dla pojedynczego szczepu, bądź różnicowanie szczepów bakteryjnych na bazie wystandaryzowanej temperatury denaturacji w reakcji PCR [65].

### 2.6.4. Real-time PCR

Technika Real-time PCR jest obecnie bardzo popularną techniką detekcji kwasów nukleinowych, w szczególności w wykrywaniu mutacji, w genotypowaniu oraz w analizie ilościowej. Podczas reakcji Real-time PCR ilość amplifikowanego DNA monitorowana jest przez użycie różnych technik fluorescencyjnych. Pozwala to na wykrycie już na początku reakcji PCR pojedynczych cząsteczek matrycy, co w innych technikach PCR nie jest możliwe. Wiele barwników fluorescencyjnych (np. Sybr Green I) bardzo silnie wiąże się do dwuniciowego DNA i kiedy wzrasta ilość produktów PCR następuje jednocześnie wzrost fluorescencji. Sybr Green nie wiąże się do zdenaturowanej matrycy, dopiero po przyłączeniu startera i utworzeniu struktury dwuniciowej pojawia się fluorescencja, a wzmacnianie się fluorescencji następuje w miarę wydłużania produktu PCR. Aby uniknąć problemu kontaminacji wyznacza się krzywą topnienia dla matrycy oraz dla kontroli negatywnej ( $T_m$  zależy ściśle od składu zasad oraz długości badanej cząsteczki DNA, jest więc charakterystyczna dla wybranej matrycy). Można również zmierzyć denaturację amplifikowanego DNA; gdy tem-

peratura stopniowo rośnie dwuniciowe cząsteczki topią się, a barwnik Sybr Green I jest usuwany i sygnał fluorescencji obniża się [18]. Urządzenia, jak Light Cycler i Opticon, mogą funkcjonować jako fluorometr umożliwiający wyznaczenie profilu topnienia DNA. Nie jest konieczna analiza produktów PCR na żelach elektroforetycznych.

Gdy zależy nam na detekcji specyficznych sekwencji amplifikowanego DNA do znakowania należy użyć oligonukleotydów znakowanych fluorescencyjnie. Wykorzystuje się wówczas zjawisko zwane FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) [84]. Zjawisko to polega na przekazywaniu energii z jednej cząsteczki fluoroforu (donora) do drugiej (akceptora). Jeżeli donor (reporter) i akceptor znajdują się w niewielkiej odległości, wówczas akceptor tłumi fluorescencję (quencher – wygaszacz). Fluorescencja pojawi się dopiero, gdy wygaszacz i reporter znajdą się w pewnej odległości. Istnieją też cząsteczki akceptorowe (TAMRA, DABACYL), które działają na odwrót. Fluoryzują po pobraniu energii od sąsiadującego akceptora, a nie wykazują świecenia, jeżeli ich odległość od akceptora jest duża.

Real-time PCR jest metodą bardzo czułą, wymaga niewielkich ilości DNA do analizy. Poprzez właściwy wybór celu molekularnego amplifikacji można zróżnicować odległe taksonomicznie jednostki, jak również przeprowadzić różnicowanie na poziomie szczepu [44, 47].

## 3. Wnioski końcowe

Dzięki dynamicznemu rozwojowi technik biologii molekularnej trwa ciągły proces rozwoju i doskonalenia metod typowania molekularnego. Niestety, wśród opisanych w literaturze i stosowanych rutynowo metod różnicowania drobnoustrojów trudno jest znaleźć metodę idealną. Można jedynie pokusić się o ustalenie cech, jakimi powinna się ona charakteryzować. Są to takie cechy jak: (1) duża moc dyskryminacyjna (uniwersalność, a zarazem specyficzność metody), (2) jednoznaczność otrzymywanego wyniku, (3) prostota wykonania (brak potrzeby stosowania wyrafinowanej aparatury), (4) szybkość analizy (relatywnie krótki czas analizy), (5) odtwarzalność wyników w skali międzylaboratoryjnej. Porównanie najczęściej stosowanych metod różnicowania drobnoustrojów pod względem kryteriów ich przydatności do badań epidemiologicznych przedstawiono w Tabeli I.

W chwili obecnej za „złoty standard” wśród metod typowania drobnoustrojów uważa się technikę PFGE oraz metody oparte na hybrydyzacji DNA-DNA. Jednakże ze względu na trudności techniczne i kosztowność przeprowadzanych eksperymentów poszukuje się

Tabela I

Porównanie najczęściej stosowanych metod różnicowania drobnoustrojów

Metoda	Potencjał różnicujący	Powtarzalność między-laboratoryjna	Powtarzalność wewnątrz-laboratoryjna	Łatwość w zastosowaniu	Łatwość w interpretacji wyników	Czas wykonania (dni)	Koszty całkowite	Koszty jednostkowe testu
<b>PFGE</b>	wysoki	wysoka	wysoka	średnia	średnia	3	wysokie	wysokie/średnie
<b>PCR-RFLP</b>	średni	wysoka	wysoka	łatwy	łatwy	1	średnie	niskie
<b>Rep-PCR</b>	wysoki	średnia	wysoka	łatwy	łatwy	1	średnie	niskie
<b>RAPD</b>	wysoki	niska	średnia	łatwy	średnia	1	średnie	niskie
<b>AFLP</b>	wysoki	wysoka	wysoka	średnia	średnia	1–2	wysokie	średnie
<b>IRS-PCR</b>	wysoki	wysoka	wysoka	średnia	łatwa	1–2	średnie	nieokreślono
<b>ADSRRS</b>	wysoki	wysoka	wysoka	średnia	łatwa	1–2	średnie	nieokreślono
<b>DGGE, TGGE</b>	średni	nieokreślono	wysoka	średnia	średnia	1	średnie/wysokie	nieokreślono
<b>SSCP</b>	wysoki	nieokreślono	wysoka	średnia	średnia	2	średnie/wysokie	średnie
<b>PCR-MP</b>	wysoki	nieokreślono	wysoka	średnia	łatwa	2	średnie	nieokreślono
<b>Real-time PCR</b>	średni	nieokreślono	wysoka	średnia	średnia	1	wysokie	wysokie/średnie

ciągle nowych rozwiązań. Bardziej powszechne i dostępne okazują się być oparte na technice PCR metody RAPD i AFLP. Charakteryzują się one dużą mocą dyskryminacyjną, jednakże, stosunkowo mała powtarzalność w skali między-laboratoryjnej (RAPD) i często trudna analiza otrzymanych wyników (AFLP) skłania do poszukiwania nowych rozwiązań, pozbawionych wspomnianych wad. Najczęściej modyfikacje zmierzają w kierunku udoskonalania sprawdzonych, wiarygodnych metod analizy lub stosowania tzw. technik łączonych, co ma służyć zwiększeniu mocy różnicowania, a tym samym uniwersalności stosowanej metody. Przykładem tego typu techniki jest ADSRRS. Łączy on w sobie siłę dyskryminacyjną metod PFGE oraz AFLP. Wybiórcza amplifikacja, będąca wynikiem supresji PCR, prowadzi do generacji niewielkiej liczby produktów, co pozwala na łatwą interpretację otrzymanych wyników. Możliwa dzięki zastosowaniu tej techniki kompleksowa, wiarygodna i jednoznaczna identyfikacja patogenu na poziomie szczepu (izolatu) może znaleźć szerokie zastosowanie w badaniach czynników etiologicznych wywołujących zakażenia szpitalne, a w szczególności w monitorowaniu infekcji endemicznych.

## Piśmiennictwo

- Adair D.M., Worsham P.L., Hill, K.K., Klevytska A.M., Jackson P.J., Friedlander A.M., Keim P.: Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1516–1519 (2000)
- Akopyanz N., Bukanov N.O., Westblom T.U., Kresovich S., Berg D.E.: DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5137–5142 (1992)
- Arbeit R.D., Arthur M., Dunn R.D., Kim C., Selander R.K., Goldstein R. Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. *J. Infect. Dis.* **161**, 230–235 (1990)
- Arbeit R.D., Slutsky A., Barber T.W., Maslow J.N., Niemczyk S., Falkinham J.O., O'Connor G.T., von Reyn C.F.: Genetic diversity among strains of *Mycobacterium avium* causing monoclonal and polyclonal bacteremia in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* **167**, 1384–1390 (1993)
- Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J.C., Assous M., Grimont P. A.: Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 378–383 (1992)
- Barbier N., Saulnier P., Chachaty E., Dumontier S., Andre-mont A.: Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 106–109 (1996)
- Bingen E., Boissinot C., Desjardins P., Cave H., Lambert-Zechovsk N., Denamur E., Blot P., Elion J.: Arbitrary primed polymerase chain reaction provides rapid differentiation of *Proteus mirabilis* isolates from a pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1055–1059 (1993)
- Bingen E.H., Mariani-Kurkdjian P., Lambert-Zechovsky N.Y., Desjardins P., Denamur E., Aujard Y., Vilmer E. and Elion J.: Ribotyping provides efficient differentiation of nosocomial *Serratia marcescens* isolates in a pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* **30**, (8), 2088–2091 (1992)
- Blanc D.S., Siegrist H.H., Sahli R., Francioli P.: Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa*: discriminatory power and usefulness as a tool for epidemiological studies. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 71–77 (1993)
- Bouvet A., Grimont P.A.D.: Intraspecies variations in nutritionally variant streptococci: rRNA gene restriction patterns of *Streptococcus defectivus* and *Streptococcus adjacens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 483–486 (1991)
- Cockerill F.R.: Genetic methods of assessing Antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **43**, 199 (1999)
- Dąbrowiecki S., Waszak B.: Skuteczność procesu dezynfekcji endoskopów elastycznych. *Przegl. Epidemiol.* **49**, 1–2 (1995)
- De Bruijn F. J.: Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus)

- sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2180–2187 (1992)
14. Del Vecchio V.G., Petroziello J.M., Gress M.J., McClesky F.K., Melcher G.P., Crouch H.K., Lupski J.R.: Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore enhanced repetitive-sequence PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2141–2144 (1995)
  15. Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E. D., Siebert P. D.: Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6025–6030 (1996)
  16. Dijkshoorn L., Aucken H.M., Gerner-Smidt P., Janssen P., Kaufman M.E., Garaizar J., Ursing J., Pitt T.L.: Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1519–1525 (1996)
  17. Dijkshoorn L., Van Harsselaar B., Tjernberg I., Bouvet J.M.: Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *System Appl. Microbiol.* **21**, 33–39 (1998)
  18. Edwards K.J., Kaufmann M.E., Saunders N.A.: Rapid and accurate identification of coagulase-negative staphylococci by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3047 (2001)
  19. Emmerson A.M.: The impact of surveys on hospital infection. *J. Hosp. Infect.* **30** (Suppl), 421–440 (1995)
  20. Enright M., Spratt B.G.A.: Multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*, **144**, 3049–3060 (1998)
  21. Enright M.C., Day N.P.J., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G.: Multilocus Sequence Typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1008–1015 (2000)
  22. Farlow J., Smit, K.L., Wong J., Abrams M., Lytle P., Keim P.: *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3186–3192 (2001)
  23. Franciosa G., Tartaro S., Wedell-Neergaard C., Aureli P.: Characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in invasive and non-invasive listeriosis outbreaks by PCR-based fingerprinting techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1793–1799 (2002)
  24. Frenay H.M.E., Theelen J.P.G., Schouls L.M., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Verhoef J., van Leeuwen W.J., Mooi F.R.: Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 846–847 (1994)
  25. Fronthingham R., Meeker-O'Connell W.A.: Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable number of tandem DNA repeats. *Microbiology*, **144**, 1189–1196 (1998)
  26. Georghiou P.R., Doggett A.M., Kielhofner M.A., Stout J.E., Watson D.A., Lupski J.R., Hamill R.J.: Molecular fingerprinting of *Legionella* species by repetitive element PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2989–2994 (1994)
  27. Georghiou P.R., Hamill R.J., Wright C.E., Versalovic J., Koeuth T., Watson D.A., Lupski J.R.: Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: identification of hospital-associated strains by molecular techniques. *Clin. Infect. Dis.* **20**, 84–94 (1995)
  28. Gerner-Smidt P.: Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2680–2685 (1992)
  29. Gibson J.R., Slater E., Xery J., Tompkins D.S., Owen R.J.: Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2580–2585 (1998)
  30. Gilson E., Perrin D., Hofnung M.: DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to *E. coli* palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3941–3952 (1990)
  31. Groenen P.M., Bunschoten A.E., van Soolingen D., van Embden J.D.: Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol.* **10**, 1057–1065 (1993)
  32. Grundmann H., Schneider C., Hartung D., Daschner F.D., Pitt T.L.: Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 528–534 (1995)
  33. Hammerum A.M., Füssing V., Aarestrup F.M., Wegener H.C.: Characterization of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* isolates from humans, chickens and pigs by ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 677–680 (2000)
  34. Harvey B.S., Koeuth T., Versalovic J., Woods C.R., Lupski J.R.: Vertical transmission of *Citrobacter diversus* documented by DNA fingerprinting. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **16**, 564–569 (1995)
  35. Heath D.D., Iwarana G.K., Devlin R.H.: PCR primed with VNTR core sequences yields species specific patterns and hypervariable probes. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5782–5785 (1993)
  36. Hein I., Mach R.L., Wagner M.: Application of single-strand conformation polymorphism and denaturing gradient gel electrophoresis for *fla* sequence typing of *Campylobacter jejuni*. *J. Microbiol. Methods*, **52**, 305 (2003)
  37. Hernandez J., Owen R.J., Fayos A.: Biotypes and DNA ribo-patterns of thermophilic campylobacters from faeces and seawater in eastern Spain. *Lett. Appl. Microbiol.* **13**, 207–211 (1991)
  38. Hulton C.S.J., Higgins C.F., Sharp P. M.: ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and other enterobacteri. *Mol. Microbiol.* **5**, 825–834 (1991)
  39. Jacquet C., Bille J., Rocourt J.: Typing of *Listeria monocytogenes* by restriction polymorphism of the ribosomal ribonucleic acid gene region. *Zentralbl. Bakteriol.* **276**, 356–365 (1992)
  40. Janssen P., Coopman R., Huys G., Swings J., Bleeker M., Vos P., Zabeau M., Kersters K.: Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*, **142**, 1881–1893 (1996)
  41. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., van Embden J.: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 907–914 (1997)
  42. Kanemitsu K., Yamamoto H., Takemura H., Kaku M., Shimada J.: Characterization of MRSA transmission in an emergency medical center by sequence analysis of the 3'-end region of coagulase gene. *J. Infect. Chemoter.* **7**, 22–27 (2001)

43. Kaufhold A., Podbielski A., Baumgarten G., Blokpoel M., Top J., Schouls L.: Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 19–25 (1994)
44. Ke D., Menard Ch., Picard F.J., Boissinot M., Ouellette M., Roy P.H., Bergeron M.G.: Development of conventional and real-time PCR assay for the rapid detection of group B streptococci. *Cl. Chemistry*, **46**, 324 (2000)
45. Keim P., Price L. B., Klevytska A M., Smith K. L., Schupp J. M., Okinaka R., Jackson P. J., Hugo-Jones M. E.: Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **182**, 2928–2936 (2000)
46. Kersulyte D., Woods J.P., Kreath E.J., Goldman W.E., Berg D.E.: Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.* **174**, 7075–7079 (1992)
47. Klaschik S., Lehmann L.E., Raads A., Book M., Hoefl A., Stuber F.: Real-time PCR for detection and differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4304 (2002) erratum in: *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2799 (2003)
48. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P.L., Wong J., Keim P.: Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3179–3185 (2001)
49. Koeleman J.G.M., Stoof J., Biesmans D.J., Savelkoul P.H.M., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E.: Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2522–2529 (1998)
50. Krawczyk B., Lewandowski K., Kur J.: Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. *Mol. Cell Probes*, **16**, 1–11 (2002)
51. Krawczyk B., Lewandowski K., Bronk, M., Samet, A., Myjak, P., Kur J.: Evaluation of novel method based on amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (ADSRRS-fingerprinting) for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Microbiol. Methods*, **52**, 341–351 (2003)
52. Krawczyk B., Lewandowski K., Kur J.: Filogeneza bakterii z rodzaju *Acinetobacter*. *Post. Mikrobiol.* **39**, 291–301 (2000)
53. Krawczyk B., Naumiuk L., Lewandowski K., Baraniak A., Gniadkowski M., Samet A., Kur J.: Evaluation and comparison of random amplification of polymorphic DNA, pulsed-field gel electrophoresis and ADSRRS-fingerprinting for typing *Serratia marcescens* outbreaks. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **38**, 241–248 (2003)
54. Kremer K., van Soelingen D., Frothingham R., Haas W.H., Hermans P.W., Martin C., Palittapongarnpim P., Plikaytis B.B., Riley L.W., Yakrus M.A., Musser J.M., van Embden J.D.: Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2607–2618 (1999)
55. Kühn I., Burman L.G., Heggman S., Tullus K., Murray B.E.: Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2812–2817 (1995)
56. Kur J., Krawczyk B.: Comparison of DNA-based typing methods of microbial organisms for epidemiological studies. *Adv. Agric. Sci.* **8** (1), 7–20 (2002)
57. Kur J., Lewandowski K., Krawczyk B., Samed A.: Metody genotypowania bakterii z rodzaju *Acinetobacter*. *Post. Mikrobiol.* **39**, 271–290 (2000)
58. Kwon D.H., El-Zaatari F.A.K., Woo J.S., Perng C.L., Graham D.Y., Goo M.F.: Rep-PCR fragments as biomarkers for differentiating gastroduodenal disease-specific *Helicobacter pylori*. *Dig. Dis. Sci.* **43**, 980–987 (1998)
59. Lazo G.R., Roffey R., Gabriel D.W.: Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 214–221 (1987)
60. Lehmann P.F., Lin D., Lasker B.A.: Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* using random amplified polymorphic DNA. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 3249–3254 (1992)
61. Liu P.Y., Wu W.L.: Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 19–28 (1997)
62. Maiden M.C. i wsp. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3140–3145 (1998)
63. Marshall D.G., Coleman P.C., Sullivan, D.J., Xia H., O'Morain C.A., Smyth C.J.: Genomic DNA fingerprinting of clinical isolates of *Helicobacter pylori* using short oligonucleotide probes containing repetitive sequences. *J. Appl. Bacteriol.* **81**, 509–517 (1996)
64. Masny A., Płucienniczak A.: Fingerprinting of bacterial genomes by amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites. *BioTechniques*, **31**, 930–936 (2001)
65. Masny A., Płucienniczak A. Ligation mediated PCR performed at low denaturation temperatures-PCR melting profiles. *Nucleic Acids Res.* **31**, 114 (2003)
66. Miller W.G., On S.L.W., Wang G., Fontanoz S., Lastovica A.J., Mandrell R.E.: Extended Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. helveticus*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2315–2329 (2005)
67. Montesinos I., Salido E., Delgado T., Cuervo M., Sierra A.: Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2119–2125 (2002)
68. Murray R., Brenner D., Colwell R.: Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 213–215 (1990)
69. Muyzer G., Smalla K.: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 127 (1998)
70. Myers L.E., Silva S.V.P., Procunier J.D., Little P.B.: Genomic fingerprinting of “*Haemophilus somnus*” isolates by using a random-amplified polymorphic DNA assay. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 512–517 (1993)
71. Nowak A., Kur J.: Genomic species typing of acinetobacters by polymerase chain reaction amplification of the *recA* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **130**, 327–332 (1995)

72. Nowak A., Kur J.: Differentiation of seventeen genospecies of *Acinetobacter* by multiplex polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Mol. Cell Probes*, **10**, 405–411 (1996)
73. Poh C.L., Ramachandran V., Tasall J.W.: Genetic diversity of *Neisseria gonorrhoeae* IB-2 and IB-6 isolates revealed through whole-cell repetitive element sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 292–295 (1996)
74. Ralph D., McClelland M., Welsh J., Baranton G., Perolat P.: *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes. *J. Bacteriol.* **175**, 973–981 (1993)
75. Reboli A.C., Houston E.D., Monteforte J.S., Wood C.A., Hamill R.J.: Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2635–2640 (1994)
76. Rice K., Peralta R., Bast D., de Azavedo J., McGavin M.: Description of staphylococcus serine protease (ssp) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of sspA-encoded serine protease. *Infect. Immunol.* **69**, 159–169 (2001)
77. Riffard S., Lopresti F., Vandenesch F., Etienne J.: Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 161–167 (1998)
78. Rodriguez-Barradas M.C., Hamill R.J., Houston E.D., Georgiou P.R., Clarridge J.E., Regnery R.L., Koehler J.E.: Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1089–1093 (1995)
79. Samet A., Bronk M., Hellmann A., Kur J.: Isolation and epidemiological study of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from patients of a Haematological Unit in Poland. *J. Hosp. Infect.* **41**, 137–143 (1999)
80. Saulnier P., Bourneix C., Prevost G., Andremont A.: Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 982–985 (1993)
81. Schaberg D.R., Tompkins L.S., Falkow S.: Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **13**, 1105–1110 (1981)
82. Scheinert P., Krausse R., Ullmann U.: Molecular differentiation of bacteria by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer. *J. Microbiol. Meth.* **26**, 103–117 (1996)
83. Schlichting C., Branger C., Fournier J.M.: Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing resolution of clonal relationships. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 227–232 (1993)
84. Selvin P.R.: Fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol.* **246**, 300 (1995)
85. Shopsis B., Gomez M., Montgomery S.O., Smith D.H., Waddington W., Dodge D.E., Bos D.A., Riehm M., Naidich S., Kreiswirth B.N.: Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3556–3563 (1999)
86. Stern M.J., Ames G.F.L., Smith N.H., Robinson E.C., Higgins C.F.: Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*, **37**, 1015–1026 (1984)
87. Tenover F.C.: Plasmid fingerprinting: a tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community-acquired infections. *Clin. Lab. Med.* **5**, 413–436 (1985)
88. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2233–2239 (1995)
89. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V.: How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America Infect Control Hosp Epidemiol.* **18**, 426–439 (1997)
90. Tram C., Simonet M., Nicolas M.H., Offredo C., Grimont F., Lefevre M., Ageron E., Debure A., Grimont P.A.D.: Molecular typing of nosocomial isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 3. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 242–245 (1990)
91. van Belkum A., Scherer S., van Alphen L., Verbrugh H.: Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 275–293 (1998)
92. van Belkum A., Scherer S., van Leeuwen W., Willemse D., van Alphen L., Verbrugh H.: Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immunol.* **65**, 5017–5027 (1997)
93. Van Der Wurff A.W., van Straalen N.M., Schouten J.: TE-AFLP: combining rapidity and robustness in DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **28**, E 105 (2000)
94. Vaneechoutte M., Dijkshoorn L., Tjernberg I.: Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 11–15 (1995)
95. Velappan N., Snodgrass J.L., Hakovirta J.R., Marrone B.L., Burde S.: Rapid identification of pathogenic bacteria by single-enzyme amplified fragment length polymorphism analysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **39**, 77–83 (2001)
96. Versalovic J., Kapur V., Mason E.O., Shah U., Koeuth T., Lupski J.R., Musser J.: Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains recovered in Houston: identification and molecular characterization of multiple clones. *J. Infect. Dis.* **167**, 850–856 (1993)
97. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R.: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6823–6831 (1991)
98. Vila J., Marcos M.A., Jimenez de Anta M.T.: A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* complex. *J. Med. Microbiol.* **44**, 482–489 (1996)
99. Woods C.R., Koeuth T., Estabrook M.M., Lupski J.R.: Rapid determination of outbreak-related strains of *Neisseria meningitidis* by repetitive element-based polymerase chain reaction genotyping. *J. Infect. Dis.* **174**, 760–767 (1996)
100. Yoo J.H., Choi J.H., Shin W.S., Huh D.H., Cho Y.K., Kim M.Y., Kang M.W.: Application of infrequent-restriction-sites PCR to clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3108–3112 (1999)