

METODY GENOTYPOWE I FENOTYPOWE WYKORZYSTYWANE W TYPOWANIU DROBNOUSTROJÓW DO CELÓW EPIDEMIOLOGICZNYCH

Marcin Brzozowski¹, Paweł Kwiatkowski¹, Danuta Kosik-Bogacka²,
Joanna Jursa-Kulesza^{1*}

¹Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Katedra Mikrobiologii, Immunologii i Medycyny Laboratoryjnej,
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

²Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Wpłynęło w kwietniu 2017 r.
Zaakceptowano w maju 2017 r.

1. Wstęp. 2. Metody fenotypowe. 2.1. Biotypowanie. 2.2. Typowanie fagowe. 2.3. Analiza profili lekowrażliwości. 2.4. Metody analizy białek. 2.5. Spektroskopia mas. 3. Metody genotypowe. 3.1. Genotypowanie bez wykorzystania sekwencjonowania. 3.1.1. REA-PFGE. 3.1.2. RFLP i PCR-RFLP. 3.1.3. AFLP. 3.1.4. RAPD. 3.1.5. Mikromacierze (CHIP DNA). 3.1.6. MLVA. 3.2. Metody genotypowe wykorzystujące sekwencjonowanie. 3.2.1. Technologie sekwencjonowania. 3.2.2. MLST i SLST. 3.2.3. WGS – wgSNP, cgMLST, wgMLST. 3.2.4. Zalety i wady WGS. 4. Popularność metod typowania bakterii w badaniach biomedycznych na podstawie analizy bazy PubMed. 5. Podsumowanie

The application of genotyping and phenotyping techniques for epidemiological analysis of microorganisms

Abstract: The research on similarity between bacteria in outbreak investigations enables the identification of bacterial strain responsible for infections, their source and modes of transmission. These investigations are also necessary for the analysis of spreading of bacteria, not only locally, e.g. in a hospital in a specific country, but also internationally and globally. Therefore, it is of great importance to have the most up to date knowledge regarding different methods used in bacterial typing. This review discusses and compares methods facilitating bacterial typing at a strain level. Phenotyping methods analysed in this article are: Biotyping, Antimicrobial Susceptibility Typing, Phage Typing and protein-based methods. Genotyping techniques reviewed in this article are based on digestion of genomic DNA, methods using amplification of DNA, and based on sequencing DNA. This would include Multilocus Sequence Typing (MLST) and Whole Genome Sequencing (WGS). Methods used in identification of bacterial strains are being constantly improved, and gaining more in depth knowledge and familiarising with their effectiveness enables better analysis and control of epidemiological situation e.g. in hospitals.

1. Introduction. 2. Phenotyping methods. 2.1. Biotyping. 2.2. Phage typing. 2.3. Antimicrobial susceptibility typing. 2.4. Protein-based methods. 2.5. Mass spectrometry. 3. Genotyping methods. 3.1. Genotyping without DNA sequencing. 3.1.1. REA-PFGE. 3.1.2. RFLP and PCR-RFLP. 3.1.3. AFLP. 3.1.4. RAPD. 3.1.5. Microarrays. 3.1.6. MLVA. 3.2. Genotyping using DNA sequencing. 3.2.1. Sequencing technologies. 3.2.2. MLST and SLST. 3.2.3. WGS – wgSNP, cgMLST, wgMLST. 3.2.4. Advantages and disadvantages of WGS. 4. Popularity of typing methods in biomedical research – PubMed database analysis. 5. Conclusions

Słowa kluczowe: dochodzenie epidemiologiczne, metody fenotypowe, metody genotypowe, typowanie drobnoustrojów, sekwencjonowanie
Key words: bacterial strain typing, epidemiological surveillance, genotyping methods, phenotyping methods, sequencing

1. Wstęp

Typowanie szczepów bakterii w epidemiologii umożliwia wykrycie epidemii, ustalenie jej źródła, sposobu transmisji i określenie obszaru na którym występuje. Narastająca wirulencja i oporność szczepów bakterii na antybiotyki oraz środki dezynfekcyjne, jak i możliwość modyfikacji bakterii w celach bioterrorystycznych powoduje, że typowanie szczepów staje się coraz ważniejszym badaniem we współczesnej mikrobiologii [53]. Typowanie bakterii na poziomie szczepu szczególnie pomocne jest w przypadku wykrywania zakażeń i epidemii szpitalnych [88]. Wykrycie epidemii na oddziałach leczniczych może okazać się niemożliwe przy stosowaniu rutynowej diagnostyki [43]. W Unii Europejskiej (UE) zakażenia w zakładach opieki zdrowotnej są bezpośrednią przyczyną około 37 tysięcy zgo-

nów rocznie. Bezpośrednie koszty wynikające z zakażeń szpitalnych wynoszą około 7 miliardów dolarów rocznie [23, 99]. W krajach rozwijających się odsetek pacjentów chorujących w wyniku zakażeń szpitalnych wynosi 15,5%, co stanowi wartość co najmniej dwukrotnie wyższą niż w krajach UE [1]. Jednym z czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych jest pałeczka ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*), która posiada cechy pozwalające jej przetrwać w różnych środowiskach. Zasiadła ona przeważnie wilgotne środowiska, w tym urządzenia sanitarne oraz rurki intubacyjne hospitalizowanych pacjentów [27, 70]. W przypadku zakażeń dróg oddechowych u osób chorych na mukowiscydozę usunięcie jej jest praktycznie niemożliwe [27]. Oporne na karbapenemy szczepy bakterii *Pseudomonas*, *Acinetobacter* i *Enterobacteriaceae* odpowiedzialne za wywoływanie zakażeń szpitalnych zostały

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Katedra Mikrobiologii, Immunologii i Medycyny Laboratoryjnej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin; tel. 91 466 16 52; e-mail: asiaju@pum.edu.pl

uznane w 2017 roku przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) jako te, dla których potrzeba opracowania nowych antybiotyków jest największa [100].

Do tej pory opisano wiele metod typowania bakterii. Techniki te różnią się od siebie głównie nakładem pracy niezbędnym do przeprowadzenia badania, kosztem, stopniem trudności wykonania, umiejętnością rozróżniania szczepów bakterii (dyskryminacja) [35] i prawidłowym zaklasyfikowaniem do jednego szczepu bakteryjnego wszystkich epidemicznie powiązanych izolatów odpowiedzialnych za znane ognisko epidemiczne (Epidemiologic Concordance) [86]. Stwierdzono, że metody typowania bakterii uznaje się za użyteczne w dochodzeniu epidemiologicznym, jeżeli posiadają wystarczająco dużą siłę dyskryminacji i epidemiologicznej konkordancji, są proste w użyciu, pozwalają na typowanie wszystkich izolatów, a uzyskane wyniki są powtarzalne wewnątrzlaboratoryjnie. Dobra metoda powinna być również wystandaryzowana, aby można było uznać ją za odtwarzalną w innych laboratoriach. W przypadku typowania szczepów bakterii używane są zarówno metody fenotypowe, jak i genotypowe [29, 58].

Przedstawiona praca przeglądowa omawia wybrane metody typowania bakterii na podstawie najnowszych danych z piśmiennictwa.

2. Metody fenotypowe

W diagnostyce epidemiologicznej stosowane są metody fenotypowe, które klasyfikują bakterie na podstawie cech fenotypowych mikroorganizmów. Do tych metod zalicza się biotypowanie, serotypowanie, typowanie bakteriofagowe, ocena profili lekowrażliwości oraz metody analizy białek [29].

W związku z tym, że mikroorganizmy mają zdolność do zmian ekspresji genów w zależności od środowiska, dwa genetycznie identyczne organizmy mogą fenotypowo być rozpoznawane jako różne. Poza tym istnieje możliwość powstania pojedynczych mutacji punktowych, insercji lub delecji, wśród izolatów jednego szczepu, co może wpłynąć na zmianę fenotypu [58]. Przykładem może być szczep gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) ludzko-specyficznego, u którego mutacja punktowa zmieniała jego tropizm na króliczo-specyficzny [92] lub mutacje insercyjne w genie *oprD*, które spowodowały brak wrażliwości bakterii *P. aeruginosa* na karbapenemy [98].

2.1. Biotypowanie

Biotypowanie polega na określeniu biotypu lub wariantu ekologicznego bakterii [59]. Termin wariant ekologiczny używany jest w odniesieniu do biotypu, który jest powiązany z danym gatunkiem zwierzęcia [20]. Biotypowanie bakterii polega na ich klasyfikacji na podstawie cech biochemicznych oraz na oce-

nie typu wzrostu kolonii bakteryjnej [20, 59]. Koszt wykonania biotypowania nie jest wysoki, a do wykonania badań można wykorzystać różne testy automatyczne (VITEK, Phoenix) lub manualne (API) systemy oznaczania cech biochemicznych [16, 19, 61]. Istnieje również możliwość oznaczenia biotypu za pomocą prostych testów biochemicznych, w tym wytwarzania H₂S, produkcji DNaz oraz test na ureazę. Biotypowanie nie wymaga konieczności posiadania specjalistycznego sprzętu oraz jest łatwe w przeprowadzeniu. Mimo niskiego potencjału różnicującego metoda w niektórych laboratoriach wciąż jest wykorzystywana ze względu na jej niewielki koszt [8]. Badania przeprowadzone przez Minharro i wsp. [25] wykazały przydatność łączenia biotypowania z metodą genotypową jednoczesnej amplifikacji wielu loci o zróżnicowanej liczbie tandemowych powtórzeń (Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis, MLVA). W badaniu za pomocą biotypowania scharakteryzowano szczep *Brucella abortus* MLVA16. Badania te przyczyniły się także do lepszego zrozumienia epidemiologii i transferu szczepów *B. abortus* w Brazylii.

2.2. Typowanie fagowe

Bakteriofagi są wirusami, które mogą powodować lizę bakterii. Właściwość tą wykorzystano do opracowania metody fenotypowej polegającej na podziale szczepów bakterii ze względu na to, czy ulegają one lizie wywołanej przez specyficzne bakteriofagi [96]. Technika ta była przez wiele lat metodą referencyjną, wykorzystywaną w badaniach epidemiologicznych gronkowca złocistego oraz pałeczek salmonelli [2, 6]. Do fagotypowania używa się sprawdzonych w badaniach epidemiologicznych zestawów bakteriofagów [6]. Siła dyskryminacji tej metody zależy od doboru zestawu fagów oraz badanych bakterii [96]. W badaniu nie wykorzystuje się drogiego specjalistycznego sprzętu, co stanowi zaletę tej metody [5]. Natomiast metoda wymaga doświadczenia pracowników oraz pomocy ośrodków referencyjnych w celu utrzymania i unowocześniania systemu, co stanowi jej wadę. Najnowsze badania wykazały, że stare zestawy bakteriofagów wykorzystywane do badań epidemiologicznych mogą dziś już nie działać w taki sam sposób jak dawniej. Wykazano, że DNA fagów referencyjnych rekombinowało z DNA fagów, które występowały naturalnie w badanych szczepach bakterii, mogło to zmienić ich specyficzność względem badanych szczepów [78]. Wykazano również, że wykorzystanie tylko tej techniki może być niewystarczające do zidentyfikowania szczepu i źródła odpowiedzialnego za epidemię. W Danii w latach 2007–2008 fagotypowanie wykorzystano do badań epidemiologicznych pałeczek *Salmonella* Typhimurium. W ciągu roku stwierdzono 1300 nowych zakażeń, jednak zastosowanie tej metody nie przyczyniło się do wykrycia źródła

zakażenia. Dokonanie pełnej identyfikacji epidemii było możliwe po zastosowaniu dwóch innych metod: MLVA oraz elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (Restriction Enzyme Analysis Pulse Field Gel Electrophoresis, REA-PFGE) [5].

2.3. Analiza profili lekowrażliwości

Jedną z fenotypowych metod typowania bakterii jest badanie profilu oporności na antybiotyki. Założono, że identyczne bakterie odpowiedzialne za powstawanie epidemii charakteryzują się identyczną lub podobną wrażliwością na antybiotyki. Metoda ta jest prosta oraz tania ze względu na rutynowość wykonywania antybiogramów [91]. Zaletą jest powszechne standaryzowanie wykonywania testów wrażliwości na antybiotyki [24]. Użyteczność tej metody zależy od stabilności oporności na leki mikroorganizmów. Brak stabilności może powodować, że wykorzystanie analizy profilu lekowrażliwości może być nieprzydatne nawet we wstępnym różnicowaniu szczepów bakterii [91]. Na podstawie najnowszych badań wykazano brak korelacji pomiędzy profilami oporności a wynikami badań genotypowych bakterii *Lactobacillus* [101], *Listeria monocytogenes* [41] oraz *Klebsiella pneumoniae* [80], co może wskazywać na niewielką przydatność tej metody w typowaniu szczepów. Sugeruje się stosowanie analizy profilu oporności w połączeniu z innymi technikami genotypowymi. [80].

Udowodniono, że stosowanie analizy profilu lekowrażliwości bakterii w połączeniu z analizą bioinformatyczną może podnieść efektywność wykrywania epidemii. Badania programu statystycznego WHO-NET-SaTScan (WS) wykazują możliwość weryfikacji występowania epidemii szpitalnych na podstawie profilu oporności izolatów i danych klinicznych. Metoda wykorzystująca program WS charakteryzuje się wyższą czułością w wykrywaniu epidemii szpitalnych niż rutynowe metody oparte na sumowaniu przypadków izolacji różnych bakterii od pacjentów w określonym czasie. Dodatkowo wykorzystanie programu WS pozwala na analizę występowania epidemii w czasie rzeczywistym. Przeprowadzenie takiego badania jest proste i mało czasochłonne. Potencjał różnicujący w porównaniu do metody referencyjnej REA-PFGE jest wciąż niski, dlatego sugeruje się wykorzystanie tej techniki we wstępnym rozpoznawaniu epidemii szpitalnych [34, 84].

2.4. Metody analizy białek

Metody analizy białek obecnie podzielono na metody wykorzystujące elektroforezę oraz na nowe metody identyfikujące białka za pomocą spektroskopii masowej. Jedną z metod typowania opartych na rozdziale elektroforetycznym badających białka jest MLEE (Multi-Locus Enzyme Electrophoresis). Szczepy w metodzie MLEE

różnicuje się w oparciu o ruchliwość elektroforetyczną izoenzymów komórkowych rozpuszczalnych w buforach wodnych. Ruchliwości izoenzymów zależy od ich składu aminokwasowego oraz ułożenia przestrzennego. Nośnikami elektroforetycznymi są zwykle żele skrobiowe lub poliakryloamidowe. W celu uwidocznienia badanych enzymów na żelu dokonuje się jego reakcji ze specyficznym dla niego związkiem substratowym. Uzyskane wzory izoenzymów komórkowych są charakterystyczne dla danego szczepu [10, 81].

Metoda ta jest wykorzystywana do analizy bakterii, grzybów i pierwotniaków [10]. Siła dyskryminacji techniki MLEE jest uznawana za wysoką, jednakże jest niższa niż metod molekularnych, takich jak MLST i PFGE [37]. Technika ta była wykorzystywana w typowaniu szczepów m.in. *Mycobacterium tuberculosis* lub *S. aureus* [13, 26]. Niższa siła różnicowania szczepów może być spowodowana przez identyczną ruchliwość elektroforetyczną różnych wariantów enzymów oraz z powodu braku zmian w sekwencji aminokwasowej enzymu w przypadku niewielkich substytucji w genach je kodujących [56].

2.5. Spektroskopia mas

Od pewnego czasu prowadzone są badania nad wykorzystaniem spektroskopii masowych (MS) do typowania szczepów bakteryjnych. MS wykorzystuje się do identyfikacji bakterii z użyciem aparatów MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time-of-Flight Mass Spectrometry). Przydatność tej metody do określenia szczepu bakterii była przedmiotem badań w ostatnich latach. Wyniki tych badań wskazują, że wykorzystanie aparatów MALDI-TOF-MS w przyszłości może być przydatne do typowania szczepów. Badanie przy użyciu tego aparatu określono jako proste, szybkie oraz tanie [77]. Za pomocą MALDI TOF przeprowadzono retrospektywne badania izolowanych od bydła bakterii *Mannheimia haemolytica*, w których wykazano istnienie dwóch głównych genotypów, co było zgodne z wynikiem uzyskanym na podstawie sekwencjonowania całego genomu [55]. W innych badaniach, w których do typowania szczepów *Enterococcus faecalis* użyto metody ADSRRS (Amplification of DNA Fragments Surrounding Rare Restriction Sites) oraz MALDI-TOF MS wykazano, że obydwie techniki mogą być wykorzystywane do identyfikacji szczepów mikroorganizmów [64]. Wyższą siłą dyskryminacji charakteryzowała się technika MALDI-TOF MS. Zaobserwowano także różnice w podziale izolatów na szczepy w zależności od zastosowanej metody. Według autorów spowodowane było to przez różnice w metodologii. W metodzie ADSRRS badane są polimorfizmy miejsc restrykcyjnych, a w przypadku MALDI-TOF MS białka „housekeeping” [64].

Najnowsze dane z piśmiennictwa naukowego dotyczące narzędzi do analiz szczepów wskazują na możliwości wykorzystania w przyszłości tandemowych spektrometrów mas (MS/MS) o wysokiej rozdzielczości do analizy wielu tysięcy białek w krótkim czasie (Shotgun Proteomics). Do badań wykorzystuje się strawione białka wcześniej pozyskane z lizatów komórkowych. Najnowsze analizatory MS/MS różnicują białka różniące się nawet jednym aminokwasem [82]. Badania białek przy użyciu nowoczesnych aparatów MS nazywane są proteomiką następnej generacji [3]. Analizy wykorzystujące spektrometr MS/MS mogą zostać przeprowadzone w ciągu jednego dnia [22]. Ocena przydatności tej metody w typowaniu bakterii jest obecnie w trakcie badań. Pierwsza publikacja naukowa z wykorzystaniem chromatografu cieczonego (MS/MS) wskazuje na przydatność tej metody nie tylko w typowaniu bakterii, ale również w badaniach białek bakteryjnych. Określenie dokładnej przydatności tej techniki w typowaniu szczepów wymaga dalszych badań [82].

3. Metody genotypowe

Metody genotypowe pozwalają na typowanie bakterii na podstawie różnic w ich genomach. Występowanie tych różnic może być spowodowane rekombinacjami genetycznymi lub mutacjami powstałymi podczas replikacji. Stwierdzono, że im więcej różnic w DNA mikroorganizmów tym są one mniej spokrewnione. Metody genotypowe często charakteryzują się większą siłą dyskryminacji oraz konkordancji od metod fenotypowych. Spowodowane jest to zmiennością fenotypową bakterii w zależności od środowiska oraz występowaniem zależności cech fenotypowych od genotypowych, niewielkie zmiany w genotypie mogą odpowiadać dużym zmianom fenotypowym. Zmiana cech fenotypowych może również wystąpić w wyniku horyzontalnego transferu genów pomiędzy mikroorganizmami, a transfer genów nie musi wpływać na wynik z badania genotypowego.

W prezentowanej pracy metody genotypowe podzielono na dwie główne grupy. Do pierwszej z nich zaliczono metody, w których nie wykorzystuje się sekwencjonowania DNA, w tym: REA-PFGE, RFLP, PCR-RFLP, AFLP, RAPR, MLVA i typowanie przy pomocy CHIPów-DNA. Natomiast do drugiej grupy zaliczono metody wykorzystujące odczyt kolejności nukleotydów w DNA.

3.1. Genotypowanie bez wykorzystania sekwencjonowania

3.1.1. REA-PFGE

Metoda REA-PFGE (Restriction Enzyme Analysis – Pulsed Field Gel Electrophoresis) została opracowana

w 1984 roku i po wielu modyfikacjach została uznana za „złoty standard” w typowaniu molekularnym drobnoustrojów [79]. Technika ta używana jest w laboratoriach badawczych do analiz szczepów bakteryjnych wyizolowanych z środowisk szpitalnych i pozaszpitalnych [43, 87]. Metoda REA-PFGE jest przydatnym narzędziem w wykrywaniu lokalnych endemii lub epidemii wywołanych przez jeden szczep bakteryjny oraz w celu określenia źródła pochodzenia nowych zakażeń. Jednak metodę tą trudno jest stosować w wielośrodkowej diagnostyce epidemiologicznej ze względu na jej złożoność, czasochłonność i brak standaryzacji procedur stosowania [97]. Pomimo tych wad wykorzystano metodę PFGE w międzynarodowych badaniach epidemiologicznych prowadzonych przez PulseNet (International Molecular Subtyping Network for Food-borne Disease Surveillance) [95]. Analiza makrorestrykcyjna genomowego DNA w połączeniu z elektroforezą w zmiennym polu elektrycznym wymaga izolacji i trawienia DNA rzadko tnącym enzymem restrykcyjnym. Pofragmentowane DNA umieszczone w żelu agarozowym poddawane są elektroforezie w pulsowym polu elektrycznym. Pulsacja pola elektrycznego polega na okresowej zmianie kierunku tego pola o określony kąt. Wymusza to zmianę konformacji i reorientację cząsteczek co jest niezbędne do ich migracji w żelu. Czas wymagany do reorientacji (zwiniecie, obrót i relaksacja) zależy od wielkości molekuł DNA. Dłuższe cząsteczki DNA wymagają dłuższego czasu na reorientację, co powoduje ich wolniejszą migrację w żelu. Na szybkość migracji fragmentów kwasów nukleinowych wpływają również inne czynniki, w tym wartość natężenia pola elektrycznego, czas trwania elektroforezy, kąt zmiany kierunku pola elektrycznego, skład użytego żelu agarozowego, temperatura oraz skład buforu użytego do elektroforezy [30]. W zależności od rozmieszczenia elektrod w komorach do elektroforezy wyróżnia się kilka odmian techniki PFGE. Najbardziej znanymi odmianami tej techniki są elektroforeza w zmiennym, homogenym polu o kształcie sześciokąta foremnego (Contour Clamped Homogenous Electric Field Electric Electrophoresis, CHEF), w której dwa pola elektryczne skierowane są do siebie pod kątem 120°, system PACE (Programmable Autonomously Controlled Electrodes) oparty na CHEF, w którym wszystkie elektrody kontrolują każdy parametr elektroforezy oraz elektroforeza w odwracalnym polu elektrycznym (Field Inversed Gel Electrophoresis, FIGE), w której kierunek pola elektrycznego jest co pewien czas zmieniany o 180° [66]. Wynikiem rozdziału elektroforetycznego jest charakterystyczny dla danego szczepu układ prążków DNA na żelu. Do analizy pokrewieństwa szczepów na podstawie wzorów DNA na żelu wykorzystuje się programy komputerowe lub metodę analizy zaproponowaną przez Tenover i wsp. [89]. W metodzie tej określa się stopień

pokrewieństwa poszczególnych szczepów bakterii na podstawie ilości tak samo ułożonych prążków. Izolaty, których układ prążków jest identyczny uznawane są jako nie do odróżnienia, w przypadku różnic od 2 do 3 prążków blisko spokrewnione, a od 4 do 6 możliwe spokrewnione. W przypadku gdy pomiędzy izolatami występuje więcej niż 7 różnic w ułożeniu prążków takie izolaty uważane są jako szczepów niespokrewnione.

3.1.2. RFLP i PCR-RFLP

Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (Restriction Fragments Length Polymorphism, RFLP) jest techniką wykorzystywaną w typowaniu bakterii i polega na analizie różnic w długości fragmentów DNA powstałych w wyniku trawienia genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi często tnącymi. Uzyskane w ten sposób fragmenty DNA poddaje się elektroforezie i przenosi na specjalną membranę, a następnie DNA jest hybrydyzowane z wyznakowanymi sondami. Połączenie sond z DNA powoduje powstanie wzoru prążków na membranie charakterystycznych dla różnych klonów bakteryjnych [31, 53]. Metoda RFLP jest często wykorzystywana do typowania szczepów *M. tuberculosis* oraz *Yersinia pseudotuberculosis* [31, 94].

PCR-RFLP jest modyfikacją podstawowej wersji techniki RFLP. Pierwszym etapem analizy PCR-RFLP jest amplifikacja znanego genu lub fragmentu DNA, który następnie poddawany jest działaniu odpowiedniego enzymu. Uzyskane fragmenty DNA po rozdzieleniu elektroforetycznym dają różne wzory restrykcyjne, wynikające z polimorfizmu amplifikowanej sekwencji i umożliwiają identyfikację różnych szczepów mikroorganizmów. Zaletami techniki PCR-RFLP jest szybkość, prostota wykonania oraz niski koszt badania [65]. Potencjał różnicujący tej techniki jest niezbyt wysoki, co jest wynikiem analizy jedynie miejsc restrykcyjnych dla badanego amplikonu, a nie całego genomu. Na siłę różnicującą metody wpływa również wybór amplifikowanej sekwencji oraz odpowiednich enzymów. Metoda ze względu na swoją niską siłę dyskryminacji nie jest zalecana do stosowania w długoterminowych badaniach epidemiologicznych. W przypadku konieczności stosowania tej techniki do typowania bakterii izolowanych w długich odstępach czasu należy zastosować jej odmianę PCR-RFLP dla wielu locus (Multi-Locus PCR-RFLP). Jednakże badanie wielu miejsc w genomie wiąże się ze wzrostem kosztów i pracochłonności metody oraz większą trudnością w interpretacji wyników [68].

3.1.3. AFLP

Metoda AFLP-PCR (Amplified Fragment Length Polymorphism) po raz pierwszy została opisana w 1995 roku [93]. W technice tej wykorzystuje się dwa enzymy restrykcyjne jeden często (np. *MspI*) i drugi

średnio (np. *EcoRI*) tnący dające tzw. lepkie końce 5'. Polega na połączeniu krótkich dwuniciowych fragmentów DNA (adaptorów) za pomocą enzymu ligazy z lepкими końcami pofragmentowanego wcześniej DNA. Po ligacji następuje amplifikacja selektywna. PCR przeprowadza się z zastosowaniem starterów o sekwencji identycznej do sekwencji oligonukleotydu ligowanego adaptora, wydłużonych na końcu 3' o sekwencję miejsca restrykcyjnego oraz od jednego do czterech nukleotydów selekcyjnych. Amplifikacja fragmentu DNA zachodzi tylko w sytuacji pełnej komplementarności końca 3' startera do fragmentu restrykcyjnego. W przypadku badania dużych genomów (grzyby, pasożyty) przed PCR selektywnym dodatkowo stosuje się amplifikację wstępną. Sekwencje starterów do preamplifikacji w porównaniu do użytych w amplifikacji selektywnej są wydłużone na końcu 3' o jeden selektywny nukleotyd [93, 21].

W pierwotnej wersji metody AFLP jeden ze starterów wykorzystywanych do amplifikacji selektywnej był znakowany izotopowo. W udoskonalonej wersji tej metody do znakowania używa się barwników fluorescencyjnych. Znakowanie starterów stosuje się w celu odczytania wyników po elektroforezie. Fluorescencyjne wyznakowanie umożliwia również analizę wyników za pomocą automatycznych sekwenatorów kapilarnych. Ze względu na złożoność uzyskiwanych wyników badania wymagana jest ich analiza za pomocą programów komputerowych [21, 74]. Zaletami metody AFLP jest wysoki współczynnik dyskryminacji porównywalny do techniki PFGE i losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), możliwość korzystania z niewielkich ilości matrycy DNA, wysoka powtarzalność wyników oraz prostota ich archiwizacji, natomiast wadą tej techniki jest dość wysoki koszt badania oraz duża pracochłonność [45, 74]. Metoda AFLP zaliczana jest do technik opartych o ligację adaptorów oligonukleotydowych. Do metod wykorzystujących adaptory w reakcji PCR należą: ADSRRS, IRS-PCR (Infrequent Restriction Site PCR), PCR-MP (PCR Melting Profiles) [48], LM PCR/Shifter (Ligation-Mediated PCR) [47].

3.1.4. RAPD

Metoda RAPD generuje profile genetyczne z użyciem dużej liczby losowych krótkich starterów o długości od 8 do 12 nukleotydów. Metoda ta nie wymaga znajomości sekwencji badanego DNA. Krótkie startery łączą się podczas reakcji PCR z wieloma komplementarnymi fragmentami DNA. Powstałe podczas amplifikacji fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie, a uzyskany układ prążków DNA na żelu jest charakterystyczny dla różnych szczepów bakterii [49].

Metoda wykorzystująca arbitralne startery (Application of Polymerase Chain Reaction with Arbitrary

Primer, AP-PCR) jest jedną z wersji techniki RAPD. W wielu badaniach nie rozróżnia się tych metod. W technice AP-PCR amplifikacja składa się z trzech etapów, pierwszy etap przebiega w warunkach reakcji, umożliwiających starterom przyłączenie się do matrycy w wielu niespecyficznych miejscach. Natomiast w kolejnych etapach amplifikacji ustala się warunki blokujące niekomplementarne połączenia starterów z DNA [74]. Zaletami metody RAPD jest brak konieczności znajomości sekwencji DNA w celu przeprowadzenia badania, niski koszt i łatwość wykonania. Wadą metody jest niska powtarzalność wyników zależna od wielu czynników, w tym jakości matrycy DNA, użytych odczynników oraz warunków reakcji PCR co stwarza trudności w wykorzystaniu tej techniki do badań wielośrodkowych [49, 74]. W porównaniu do PFGE metoda RAPD charakteryzuje się niższym współczynnikiem dyskryminacji, przy czym RAPD wykazuje się większą typowością szczepów [4].

3.1.5. Mikromacierze (CHIP DNA)

Mikromacierze są płytkami z regularnie ułożonymi polami z przytwierdzonym do nich DNA. Każde pole zawiera inną znaną sekwencję DNA tzw. sondę. Zastosowanie mikromacierzy umożliwia ilościowe wykrywanie danych sekwencji DNA w genomach dzięki hybrydyzacji sond z badanym materiałem genetycznym. Procedura badania polega na wyznakowaniu wyizolowanego DNA. Do znakowania wykorzystuje się różne znaczniki m.in. fluorescencyjne, chemiluminescencyjne lub radioizotopy. Następnie wyznakowane DNA poddaje się hybrydyzacji z sondami DNA na macierzy. Niehybrydyzowane fragmenty DNA są usuwane. Sygnał pochodzący z wyznakowanego DNA połączonego z sondami jest odczytywany za pomocą skanera. Uzyskane dane są następnie analizowane przy użyciu specjalistycznego oprogramowania [12]. Od kilkunastu lat trwają badania nad mikromacierzami, które eliminowałyby konieczność znakowania badanego DNA oraz co się z tym wiąże zakupu aparatury do odczytu. W tym celu zaproponowano wykorzystanie elektronicznych sensorów, które wykrywałyby sekwencje DNA łączące się do sond [7]. Najnowsze wyniki badań wykazały wysoką efektywność 2D-grafenowych tranzystorów polowych (FET) i specjalnych sond dwuniciowych w wykrywaniu polimorfizmów pojedynczych nukleotydów na macierzy. Podczas łączenia się badanego DNA do sondy mierzono ładunek elektrycznym układu. Na podstawie wartości zmian ładunku analizowano jaka sekwencja łączyła się z sondą [36].

Wprowadzone w ostatnich latach mikromacierze o wysokiej gęstości pól dochodzących nawet do setek tysięcy umożliwiają wykrywanie bardzo dużej ilości sekwencji [46]. Do typowania bakterii wykorzystuje się mikromacierze typu CHIP-DNA. Umożliwiają

one identyfikację szczepów oraz uzyskanie informacji dotyczących ekspresji genów i oporności na antybiotyki [17]. Sekwencje, które nie znajdują się na macierzy nie mogą być wykryte [74]. Prowadzone są badania z użyciem chipów DNA do określenia serotypów szczepów bakterii *Escherichia coli* wytwarzających shiga-toksyny, które są nietypowe lub częściowo typowe za pomocą klasycznych zestawów surowic [28].

Przydatność mikromacierzy do typowania bakterii została wykazana w wielu wcześniejszych badaniach, w których stwierdzono wysoką konkordancję chipów DNA z sekwencjonowaniem całego genomu (Whole Genome Sequencing, WGS) [40, 85]. Jednak ilość informacji dostarczana za pomocą WGS jest znacznie większa od uzyskanych przy użyciu mikromacierzy. Obecnie koszt chipów DNA jest porównywalny z kosztem typowania za pomocą WGS. W przyszłości może to spowodować zastąpienie metod typowania bakterii za pomocą hybrydyzacji, sekwencjonowaniem całego genomu [85].

3.1.6. MLVA

MLVA to technika molekularna typowania mikroorganizmów różnicująca bakterie na podstawie zmiennej liczby powtórzeń tandemowych (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) w ich DNA. Duża zmienność VNTR w obrębie mikroorganizmów umożliwia identyfikację szczepów bakterii. Badanie MLVA polega na amplifikacji sekwencji VNTR oraz określeniu ich długości. Na podstawie pomiaru długości różnych sekwencji VNTR mikroorganizmy dzielone są na szczepy [63].

Metodę wykorzystuje się do identyfikacji szczepów bakterii szybko ewoluujących, których różnicowanie może być niemożliwe przy zastosowaniu innych metod molekularnych, w tym PFGE. W sieci PulseNet technika MLVA wykorzystywana jest jako metoda uzupełniająca dla PFGE i umożliwia różnicowanie bakterii posiadających podobny wzór PFGE [14]. Zaobserwowany w badaniach brak różnorodności pulsotypów bakterii *E. coli* O157:H7 izolowanych w Kanadzie, spowodował problemy w różnicowaniu przypadkowych pojedynczych zakażeń od potencjalnych epidemii. Dopiero połączenie stosowania metod MLVA i PFGE pozwoliło na optymalne różnicowanie szczepów *E. coli* O157:H7 [72].

Wysoki współczynnik dyskryminacji metody spowodowany jest szybkimi zmianami w regionach o zmiennej liczbie tandemowych powtórzeń. Duża dynamika zmian w regionach VNTR bakterii rzeczywiście spokrewnionych może być przyczyną błędnego zaklasyfikowania ich do bakterii niespokrewnionych [67]. W porównaniu do metody PFGE procedura MLVA jest dużo prostsza i szybsza, a samą metodę łatwiej jest standaryzować. Ze względu na brak standaryzacji dla wielu bakterii, protokoły jej wykonania są udoskonalane [54].

3.2. Metody genotypowe wykorzystujące sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie jest coraz częściej wykorzystywanym narzędziem do typowania bakterii. Spowodowane jest to stałym spadkiem kosztów wykonania badania, a także ulepszaniem sekwenatorów oraz metod sekwencjonowania przez naukowców i koncerny biotechnologiczne. Postęp, który dokonał się w ostatnich latach w tym obszarze nauki jest ogromny.

3.2.1. Technologia sekwencjonowania

W 1977 roku powstała pierwsza powszechnie używana technika sekwencjonowania, zwana metodą Sangera. Pierwsze aparaty wykorzystywane do automatycznego sekwencjonowania DNA odczytywały sekwencję o długości do 1000 pz. W przypadku badań z zastosowaniem dłuższych sekwencji nukleotydowych stosowano metodę „shotgun” polegającą na sekwencjonowaniu fragmentów DNA nachodzących na siebie. Uzyskane sekwencje DNA następnie są łączone w całość. Jedną z technik, która była kamieniem milowym w rozwoju sekwencjonowania było pirosekwencjonowanie pozwalające na odczyt kolejności nukleotydów w czasie rzeczywistym [33]. Do rozwoju sekwencjonowania przyczyniło się wprowadzenie nowych sekwenatorów tzw. drugiej generacji umożliwiających szybki odczyt milionów sekwencji DNA. Ogromną popularność zyskał system wprowadzony przez firmę Solexa produkowany później przez firmę Illumina. W technice tej badane oligonukleotydy łączone są za pomocą adaptorów do stałego podłoża, a następnie amplifikowane i sekwencjonowane. Podczas przyłączania kolejnych zasad zachodzą barwne reakcje wskazujące, który nukleotyd został przyłączony do badanej sekwencji [33, 37]. Wykorzystując tę technologię firma Illumina jako pierwsza stworzyła aparat HiSeqX, który jest w stanie zsekwencjonować ludzki genom za kwotę mniejszą niż 1000\$ [38].

Jedną z najnowszych metod sekwencjonowania jest sekwencjonowanie pojedynczych cząsteczek DNA w czasie rzeczywistym (Single Molecule Real Time Sequencing, SMRT). Firmą produkującą tego typu sekwenatory jest Pacific Biosciences. Metoda opracowana przez tę firmę rozpoczyna się od immobilizacji badanego DNA z polimerazą na powierzchni specjalnego falowodu optycznego o wielkości w skali nano (Zero-Mode Waveguides, ZMW). Podczas amplifikacji do DNA wbudowywane są nukleotydy wyznakowane barwnikami fluorescencyjnymi o różnym spektrum emisyjnym. Powoduje to powstawanie sygnałów świetlnych, które są wyłapywane za pomocą falowodu ZMW [33, 71, 90].

Do najnowszych technik sekwencjonowania kolejnej generacji należy również odczyt sekwencji DNA przy wykorzystaniu nanoporów. Sekwencjonowanie przy użyciu tej technologii przypomina w działaniu licznik

Coultera lub technologię TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing), które stosowane są do mierzenia wielkości cząsteczek w skali mikro lub nano. Sekwencjonowanie przeprowadza się w komorach z roztworami elektrolitów oddzielonych membraną, na której znajduje się por o wielkości nie większej niż kilka nanometrów. W każdej komorze zlokalizowane są również elektrody. Podłączenie napięcia elektrycznego do komory wymusza ruch jonów roztworu przez nanopor. Podczas przechodzenia ujemnie naładowanej nici DNA przez nanopor następuje częściowe zablokowanie przepływu elektrolitów. Ze względu na różnice w wielkości nukleotydów, każdy z czterech nich powoduje inną zmianę w przepływie jonów. Na podstawie zmian w przepływie jonów można określić kolejność wbudowanych nukleotydów w nici DNA [32]. Pierwszą firmą, która opracowała sekwenatory w technologii nanoporów jest Oxford Nanopore Technologies. Obecnie oferowany przez tę firmę aparat MinION, wielkością przypomina telefon komórkowy. Urządzenie to nie jest drogie, najtańszy zestaw startowy z aparatem MinION kosztuje około 1000\$ [62]. Wadą tych sekwenatorów jest duży odsetek błędów (kilkadziesiąt procent) podczas odczytu kolejności nukleotydów DNA. Stwierdzono, że ilość błędów zmniejsza się wraz z pojawianiem się nowszych, udoskonalonych sekwenatorów wykorzystujących nanopory [44].

3.2.2. MLST i SLST

Metody MLST (Multi-Locus Sequence Typing) i SLST (Single-Locus Sequence Typing) to metody typowania służące do identyfikacji szczepów mikroorganizmów na podstawie różnic w sekwencjach ich genów. W technice MLST bada się sekwencje genów niezbędnych do przeżycia mikroorganizmów tzw. housekeeping [74]. Geny te są uważane za reprezentatywne dla całego genomu. Zazwyczaj sekwencjonuje się 6–7 genów o długości od 450 do 500 pz [67]. Natomiast w metodzie SLST sekwencjonowaniu podlega jeden fragment DNA. Często stosowaną techniką SLST jest typowanie *spa*, w której badany jest polimorficzny region genu kodującego białko A bakterii *S. aureus*. Technika ta pomimo niższego potencjału różnicującego niż PFGE, jest bardzo często wykorzystywana do różnicowania szczepów *S. aureus*. Metoda ta charakteryzuje się niskim kosztem, jest łatwa i szybka w przeprowadzeniu oraz wysoce powtarzalna [74]. Wyniki uzyskane z wykorzystaniem metody MLST są powtarzalne i łatwo porównywalne pomiędzy laboratoriami. Technika ta jest głównie wykorzystywana do globalnych badań epidemiologicznych, jednakże może być stosowana do badań szczepów na małym obszarze [54, 74]. W wielośrodkowych badaniach epidemiologicznych z użyciem metody MLST pomocne są globalne bazy danych sekwencji i typów sekwencyjnych (ST), których adresy internetowe

zamieszczone są w bibliografii [39, 60, 69]. Bazy danych zapewniają również dostęp do instrukcji wykonania badań techniką MLST ponad stu mikroorganizmów [39, 74]. Wadami MLST są wysoki koszt oraz pracochłonność w porównaniu do innych technik. Jednakże według niektórych autorów zastosowanie najnowszych sekwencjatorów może obniżyć koszty i czas wykonania badania prawie dziesięciokrotnie w porównaniu do standardowego badania MLST. Badanie przeprowadzone przez Chen i wsp. [15] wykazały, że przy wykorzystaniu jednego z najnowszych sekwencjatorów (PacBio RS II) do typowania grzybów *Cryptococcus neoformans* średni koszt analizy w porównaniu do konwencjonalnego MLST, opartego o sekwencjonowanie Sangera, jest mniejszy około dziewięciokrotnie, a w przypadku pirosekwencjonowania w aparacie Roche 454 pięciokrotnie (~9\$ za jeden genom).

Obok klasycznej metody MLST stosowane są również jej rozwinięcia, w tym eMLST (extended MLST), rMLST (ribosomal MLST), cgMLST (core genome MLST) i wgMLST (whole genome MLST). Badanie eMLST jest to rozszerzenie standardowej metody o badanie dodatkowych miejsc w genomie lub wydłużenie długości badanych sekwencji [15, 103]. Technika rMLST polega na badaniu różnic w 53 genach kodujących podjednostki białek rybosomalnych [42]. Metody te charakteryzują się większą siłą dyskryminacji niż konwencjonalny MLST. W technikach cgMLST i wgMLST do przeprowadzenia typowania niezbędne są informacje dotyczące całego genomu, dlatego omówiono je w podrozdziale dotyczącym WGS.

Wraz ze wzrostem wydajności i spadkiem kosztów sekwencjonowania bezpośrednio badanie DNA w próbkach środowiskowych (metagenomika) staje się efektywną metodą charakterystyki mikroorganizmów. Zaletą metagenomiki jest pominięcie etapu izolacji i hodowli, co znacznie przyspiesza przeprowadzenie badania. Metoda MLST znalazła również zastosowanie w metagenomice. Zolfo i wsp. [103] wykazali możliwość efektywnego typowania bakterii z próbek środowiskowych przy użyciu programu MetaMLST. Autorzy ci stwierdzili, że metoda umożliwia identyfikację 96% badanych typów sekwencyjnych (ST) w metagenomach, przy 100% specyficzności. Metoda ta została wykorzystana do analizy setek metagenomów skóry, jamy ustnej i przewodu pokarmowego. Ponadto zastosowanie MetaMLST umożliwiło poznanie szczepu bakterii *Helicobacter pylori* pozyskanego z mumii, której wiek szacuje się na 5300 lat [103].

3.2.3. WGS- wgSNP, cgMLST, wgMLST

Seqwencjonowanie całych genomów jest coraz częściej wykorzystywaną techniką w typowaniu mikroorganizmów. W porównaniu do innych technik ilość informacji dostarczonych jako wynik sekwencjono-

wania całego genomu jest dużo większa. Z jednego badania można uzyskać informacje pozwalające na różnicowanie bakterii na podstawie ich całego DNA jak i danych umożliwiających przeprowadzenie analiz MLST, rMLST oraz typowania spa [11]. Wyróżniono kilka głównych koncepcji w opisywaniu różnic w sekwencji DNA pomiędzy mikroorganizmami: (1) metodę, w której porównuje się polimorfizm pojedynczych nukleotydów (whole genome Single-Nucleotide Polymorphism, wgSNP), (2) metodę, w której porównuje się polimorfizm typu insercja-lub-delecja oraz (3) podejście tzw. „gene-by-gene”.

Analiza wgSNP polega na różnicowaniu badanych sekwencji na podstawie występowania różnych wariantów SNP w DNA. Stwierdzono, że im więcej różnic SNP pomiędzy dwoma organizmami tym są one mniej spokrewnione. W przeszłości dużym problemem w przypadku tej metody była konieczność posiadania referencyjnych genomów, do których badane sekwencje SNP były porównywane. Jednakże dostępne dziś nowe narzędzia bioinformatyczne według badań pozwalają na rozwiązanie tego problemu [9, 52]. W porównaniu do metod cgMLST i wgMLST metoda ta charakteryzuje się minimalnie większą siłą dyskryminacji.

Inną metodą analizy różnic w sekwencji DNA jest analiza polimorfizmu typu insercja-lub-delecja (indel). Niewiele wiadomo na temat występowania indeli i mechanizmów ich ewolucji u mikroorganizmów. Wielkość mutacji indel może wahać się od 1 pz do nawet kilkumilionów. Wyróżnia się indele małe o długości do 100 pz oraz duże o długości ≥ 100 pz [83, 102]. W przypadku dużych indeli występuje często problem z ich identyfikacją za pomocą narzędzi bioinformatycznych. Steglich i wsp. [83] wykazali możliwości efektywnego wykrywania indeli długich o wielkości do 2 321 pz za pomocą programu ScanIndel, który wykrywał długie indele z czułością 97%.

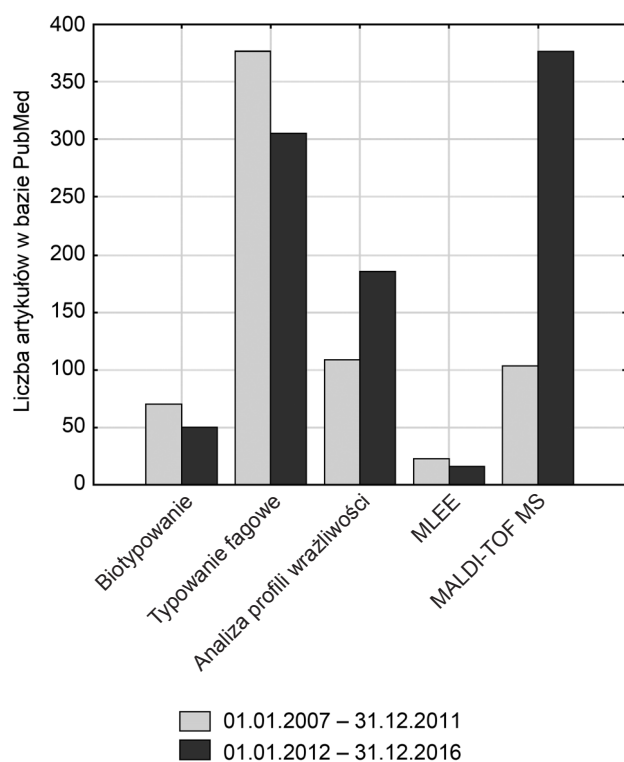
Metody cgMLST i wgMLST są coraz częściej stosowanymi metodami różnicowania typowania mikroorganizmów. W metodach tych badane sekwencje porównuje się z sekwencjami genów referencyjnych. Sposób ten nazywany jest podejściem „gene-by-gene”. Identyczne podejście stosowane jest w metodzie MLST, badane sekwencje „house-keeping gene” porównywane są z genami referencyjnymi. W technice cgMLST badane są sekwencje genów zakonserwowanych ewolucyjnie dla danego gatunku, które występują np. u 95% wszystkich szczepów z danego gatunku. W metodzie wgMLST oprócz genów konserwatywnych badane są dodatkowo geny pomocnicze. Technika ta może być badaniem całogenomowym pod warunkiem poszerzenia badania o międzygenowe regiony DNA oraz pseudogeny. W odróżnieniu od metod analizy SNP, w analizach „gene-by-gene” oznacza się ujawnione allele, które następnie porównuje się pomiędzy badanymi mikroorganizmami [18, 56, 73].

3.2.4. Zalety i wady WGS

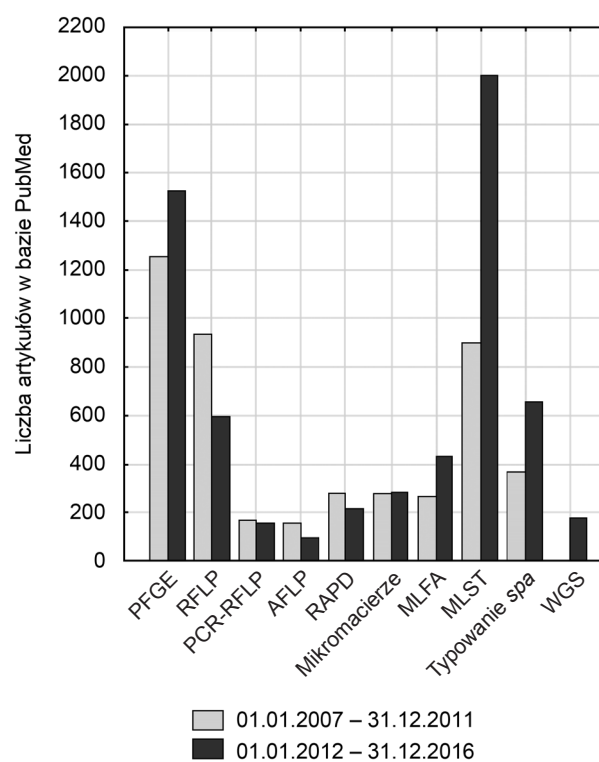
Współczynnik dyskryminacji WGS jest nieporównywalny z innymi technikami. Za pomocą badań wgSNP wykazano, że w genomie *S. aureus* opornego na metycylinę musi nastąpić średnio 467 pojedynczych mutacji, żeby różnica była wykrywana przy pomocy metody PFGE. Ponadto w badaniach z użyciem WGS udowodniono, że niektóre szczepy badane za pomocą metody PFGE uznawane za identyczne były w rzeczywistości różne [76]. Uzyskane za pomocą sekwencjonowania informacje są wysoce powtarzalne, a różnice pomiędzy szczepami mogą być dokładnie mierzone za pomocą programów bioinformatycznych [51]. Kolejną zaletą WGS jest możliwość odczytywania informacji z sekwencji nukleotydowej dotyczących cech wirulencji oraz wrażliwości na antybiotyki badanych bakterii. Jednakże obecność sekwencji kodującej dany czynnik nie zawsze musi oznaczać, że bakteria będzie go wytwarzać [50, 76].

Metoda typowania WGS nie jest pozbawiona wad. Ilość informacji generowanych podczas sekwencjonowania jest ogromna, przez co występuje problem z ich cyfrowym przechowywaniem. Pomimo, że pojemność nośników danych w komputerach wzrosła w ciągu ostatnich dwudziestu lat 10 000-krotnie, to badacze obawiają się, że jest to zbyt mało. Ilość informa-

cji generowanych podczas sekwencjonowania narasta dziś znacznie szybciej niż możliwość przechowywania danych. Dużym problemem jest również szybkość analizy badanych sekwencji. Jeżeli ilość informacji z sekwencjonowania będzie przyrastać w obecnym tempie lub szybciej, to nawet najszybsze komputery nie będą w stanie przetwarzać ich w efektywny sposób. Również dużym problemem jest wizualizacja wyników sekwencjonowania. Na diagramach, wykresach oraz grafikach niemożliwe będzie przedstawienie wszystkich informacji uzyskanych w skutek sekwencjonowania genomu. Koszt przeprowadzenia typowania WGS dzięki rozwojowi sekwenatorów nowych generacji jest coraz mniejszy. Jednak w przypadku wdrożenia techniki do rutynowej diagnostyki epidemiologicznej koszty WGS prawdopodobnie byłyby wciąż zbyt wysokie, ponieważ wiele małych i średnich laboratoriów medycznych nie posiada wystarczających środków na zakup tak drogiej aparatury. Kolejnym dużym problemem jest złożoność typowania WGS i obecnie niewielka ilość specjalistów potrafiących wykonać badanie oraz prawidłowo zinterpretować wyniki [51, 74]. Jednak ze względu na stały rozwój technologii sekwencjonowania uważa się, że w przyszłości sekwencjonowanie całego genomu może stać się „złotym standardem” nie tylko w typowaniu szczepów bakteryjnych, ale również w diagnostyce mikroorganizmów.



Rys. 1. Publikacje naukowe wykorzystujące metody fenotypowe
Analiza liczby publikacji naukowych dla metod fenotypowych wykorzystywanych w typowaniu bakterii na podstawie danych zawartych w bazie PubMed w dwóch podanych przedziałach czasowych.



Rys. 2. Publikacje naukowe wykorzystujących metody genotypowe
Analiza liczby publikacji naukowych dla metod genotypowych wykorzystywanych w typowaniu bakterii na podstawie danych zawartych w bazie PubMed w dwóch podanych przedziałach czasowych.

4. Popularność metod typowania bakterii w badaniach biomedycznych na podstawie analizy bazy PubMed

W celu sprawdzenia częstości wykorzystania różnych metod typowania bakterii w ostatnich 10 latach w badaniach biomedycznych wykorzystano bibliograficzną bazę danych z dziedziny medycyny i nauk pokrewnych (PubMed). W wyszukiwarce bazy w opcjach zaawansowanych wpisano kombinacje słów kluczowych na podstawie pracy Sabat i wsp. [74]. Wykorzystano następujące kombinacje słów kluczowych dla metod fenotypowych: biotyping [AND] typing, serotyping [AND] typing, phage typing, susceptibility profile [AND] typing, MLEE [AND] typing, MALDI-TOF MS [AND] typing; oraz dla metod genotypowych: PFGE [AND] typing, RFLP [AND] typing, PCR-RFLP [AND] typing, AFLP [AND] typing, RAPD [AND] typing, microarray [AND] typing, MLVA [AND] typing, MLST [AND] typing, SLST [AND] typing

oraz WGS [AND] typing. Przyjęto, że zainteresowanie daną metodą rośnie, gdy liczba publikacji naukowych w danym przedziale czasowym jest większa niż w poprzednim przedziale czasowym. Przeanalizowano wszystkie typy publikacji naukowych w dwóch przedziałach czasowych: od 01.01.2007 do 31.12.2011 roku oraz od 01.01.2012 do 31.12.2016 roku.

Ilości wyników uzyskanych podczas przeszukiwania bazy PubMed świadczą, że metody genotypowe były częściej opisywane w publikacjach niż metody fenotypowe. Na podstawie analizowanych publikacji naukowych dla metod fenotypowych w typowaniu bakterii stwierdzono, że w latach 2007–2011 i 2012–2016 w badaniach najczęściej opisywano odpowiednio metody typowania fagowego i MALDI-TOF MS (Rys. 1). Ponadto odnotowano wzrost zainteresowania metodami MALDI-TOF MS i analizą profili lekowrażliwości, natomiast spadek metodami MLEE i typowania fagowego. Jednakże w przypadku analizy profili lekowrażliwości według naszej analizy

Tabela I
Porównanie różnych metod wykorzystywanych w typowaniu mikroorganizmów

Metoda typowania szczepów	Potencjał różnicujący	Czas wykonania ¹ (dni)	Enzymy restrykcyjne (ERs)	Startery	Najważniejsza aparatura	Najważniejsze materiały lub odczynniki
Biotypowanie	niski	1	brak	brak	brak	testy biochemiczne
Analiza profili lekowrażliwości	niski	1	brak	brak	brak	krążki z antybiotykami, e-testy
Typowanie fagowe	średni	1	brak	brak	brak	zestaw fagów do typowania
MLEE	średni/wysoki	kilka dni	brak	brak	aparat do elektroforezy	bufory i roztwory barwiące
MALDI-TOF MS	wysoki	1	brak	brak	spektrometr MALDI-TOF MS	brak informacji
REA-PFGE	wysoki	2–4	rzadko tnące	brak	komora PFGE, moduły zasilający i chłodzący	ERs, proteazy
PCR-RFLP	średni	1	często tnące	startery flankujące wskazaną sekwencję	termocykler	ERs, startery, polimeraza
AFLP	wysoki	2	para dwóch różnych ERs	startery selektywne	termocykler	ERs, ligaza, adaptory, startery, polimeraza
RAPD	wysoki	1	brak	startery arbitralne (8–12 nt)	termocykler	startery, polimeraza
CHIP DNA	wysoki	1–2	często tnące	brak	stacja przygotowania DNA i odczytu mikromacierzy	zestaw do izolacji i znakowania DNA, CHIP-DNA
MLVA	wysoki	1	brak	startery flankujące sekwencję VNTR	termocykler	startery, polimeraza
MLST i SLST	wysoki	1–2	brak	startery flankujące sekwencję genów housekeeping	sekwenator	startery, polimeraza i zależne od używanego sekwenatora
WGS	bardzo wysoki	1–2	brak	brak	sekwenator	zależne od używanego sekwenatora

¹ Czas wykonania badania liczony od momentu wyhodowania bakterii na podłożu

duże zainteresowanie tą metodą wynika z faktu częstego wykorzystywania tej techniki do charakteryzowania szczepów, a nie ze względu na jej efektywność w typowaniu mikroorganizmów. Natomiast analizując wykorzystanie metod genotypowych w typowaniu bakterii zauważono, że w latach 2007–2011 i 2012–2016 najczęściej stosowano odpowiednio metody PFGE i MLST (Rys. 2). Stwierdzono także wzrost zainteresowania badaczy metodami genotypowymi w typowaniu bakterii, w tym metodami PFGE, MLST oraz WGS.

5. Podsumowanie

Typowanie szczepów mikroorganizmów jest szczególnie ważne w przypadku wykrywania epidemii, określenia dróg oraz wektorów umożliwiających szerzenie się patogenów. W ciągu ostatnich pięćdziesięciu lat opracowano wiele technik umożliwiających różnicowanie szczepów mikroorganizmów. Wśród technik typowania patogenów wyróżniono metody fenotypowe i genotypowe. Metody fenotypowe w porównaniu do metod molekularnych posiadają często dużo niższy wskaźnik dyskryminacji oraz konkordancji co może spowodować, że nie będą w stanie potwierdzić lub zaprzeczyć istnieniu epidemii na danym obszarze. Przewagą metod fenotypowych nad genotypowymi może być fakt, że obecność sekwencji kodujących dane białko nie musi oznaczać, że jest ono produkowane. Pomimo, że w wielu przypadkach metody fenotypowe nie są wystarczające do efektywnego przeprowadzenia dochodzenia epidemiologicznego, to wciąż mogą być przydatne w opisywaniu badanych epidemii. Metody genotypowe ze względu na dużą siłę różnicowania szczepów są dziś rutynowo używane w diagnostyce epidemiologicznej, jednak ich wykorzystanie wiąże się z wyższymi kosztami badania niż w przypadku innych technik. W tabeli I porównano omawiane metody typowania bakterii. Prawdopodobnie w przyszłości obecnie stosowane metody typowania zostaną zastąpione przez nowsze techniki, w tym analizę białek za pomocą spektroskopii masowej oraz sekwencjonowanie całych genomów bakteryjnych. Jednak wysoka cena urządzeń koniecznych do przeprowadzenia badań ogranicza jej przydatność w rutynowej diagnostyce. Prawdopodobnie problem ten w niedalekiej przyszłości zostanie wyeliminowany ze względu na spadek cen zarówno sekwencjonowania, jak i aparatury wykorzystywanej do tego celu.

Piśmiennictwo

- Allegranzi B., Pittet D. i wsp.: Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet*, **15**, 228–241 (2011)
- Anderson E.S., Ward L.R., Saxe M.J., de Sa J.D.: Bacteriophage-typing designations of *Salmonella* Typhimurium. *J. Hyg. (Lond)*, **78**, 297–300 (1977)
- Armengaud J.: Next-generation proteomics faces new challenges in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **38**, 174–182 (2016)
- Ashayeri-Panah M., Eftekhar F., Ghamsari M.M., Parvin M., Feizabadi M.M.: Genetic profiling of *Klebsiella pneumoniae*: comparison of pulsed field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA. *Braz. J. Microbiol.* **44**, 823–828 (2013)
- Baggesen D.L., Sgesen G., Nielsen E.M., Wegener H.C.: Phage typing of *Salmonella* Typhimurium – is it still a useful tool for surveillance and outbreak investigation? *Euro Surveill.* **15**, 19471 (2010)
- Bannerman T.L., Hancock G.A., Tenover F.C., Miller J.M.: Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 551–555 (1995)
- Barbaro M., Bonfiglio A., Raffo L., Alessandrini A., Facci P., Barak I.: Fully electronic DNA hybridization detection by a standard CMOS biochip. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **118**, 41–46 (2006)
- Barker R.M., Old D.C.: The usefulness of biotyping in studying the epidemiology and phylogeny of salmonellae. *J. Med. Microbiol.* **29**, 81–88 (1989)
- Berthouly-Salazar C., Mariac C., Couderc M., Pouzadoux J., Floc'h J.B., Vigouroux Y.: Genotyping-by-sequencing snp identification for crops without a reference genome: using transcriptome based mapping as an alternative strategy. *Frontiers in Plant Sci.* **7**, 777 (2016)
- Boerlin P., Bille J. i wsp.: Typing *Candida albicans* oral isolates from human immunodeficiency virus-infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1235–1248 (1996)
- Boughton P.: Whole genome MLST analysis. Scientistlive, <http://www.scientistlive.com/content/whole-genome-mlst-analysis> (09.03.2017)
- Bumgarner R.: DNA microarrays: Types, Applications and their future. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **101**, 22.1.1–22.1.11 (2013)
- Caierão J., Paiva J.A., Sampaio J.L., Silva M.G., Santos D.R., Coelho F.S., Fonseca Lde S., Duarte R.S., Armstrong D.T., Regua-Mangia A.H.: Multilocus enzyme electrophoresis analysis of rapidly-growing mycobacteria: an alternative tool for identification and typing. *Int. J. Infect. Dis.* **42**, 11–16 (2016)
- Centers for Disease Control and Prevention: Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (MLVA), <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/mlva.html> (02.01.2016)
- Chen Y., Yu Y. i wsp.: Development of an extended multilocus sequence typing for genotyping of *Brucella* isolates. *J. Microbiol. Methods*, **86**, 252–254 (2011)
- Colodner R., Bisharat N. i wsp.: Identification of the Emerging Pathogen *Vibrio vulnificus* Biotype 3 by Commercially Available Phenotypic Methods. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4137–4140 (2004)
- Coyne S., Guigon G., Courvalin P., Périchon B.: Screening and Quantification of the Expression of Antibiotic Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii* with a Microarray. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 333–340 (2010)
- de Been M., Willems R.J. i wsp.: Core genome multilocus sequence typing scheme for high-resolution typing of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 3788–3797 (2015)
- De La Higuera A., Gutiérrez J., Liébana J., Garcia-Mendoza A., Castillo A.: A new biotyping method for *Streptococcus mutans* with the API ZYM system. *Clin. Microbiol. Infect.* **5**, 88–91 (1999)

20. Devriese L.A.: A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *J. Appl. Bacteriol.* **56**, 215–220 (1984)
21. Duim B., Savelkoul P.: Typing of bacteria using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) analysis (w) Experimental approaches for assessing genetic diversity among microbial pathogens, red. A. van Belkum, B. Duim, J.P. Hays, WET, Wageningen, 2003, s. 83–84
22. Dworżański J.P.: Bottom-Up Proteomics Methods for Strain-Level Typing and Identification of Bacteria (w) Applications of Mass Spectrometry in Microbiology, red. P. Demirev, T.R. Sandrin, Springer International Publishing, Switzerland, 2016, s. 114
23. European Centre for Disease Prevention and Control: Healthcare-associated infections, http://ecdc.europa.eu/en/health-topics/Healthcare-associated_infections/Pages/index.aspx (29.11.2016)
24. European Centre for Disease Prevention and Control: Setting breakpoints, http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/eucast_setting_breakpoints/ (28.12.2016)
25. Minharmo S., Lage A.P. i wsp.: Biotyping and Genotyping (MLVA16) of *Brucella abortus* Isolated from Cattle in Brazil, 1977 to 2008. *PLoS ONE*, **8**, e81152 (2013)
26. Fitzgerald J.R., Meaney W.J., Hartigan P.J., Smyth C.J., Kapur V.: Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol. Infect.* **119**, 261–269 (1997)
27. Fothergill J.L., Walshaw M.J., Winstanley C.: Transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infections. *Eur. Respir. J.* **40**, 227–238 (2012)
28. Gangiredla J., Jackson S.A., Elkins C.A., Feng P. C.: Novel microarray design for molecular serotyping of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from fresh produce. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 4677–4682 (2014)
29. Giedrys-Kalemba S.: Typowanie molekularne w dochodzeniu epidemiologicznym (w) Zakażenia szpitalne podręcznik dla zespołów kontroli zakażeń, red P. B. Heczko, J. Wójkowska-Mach, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2009, s. 113–114
30. Goering R.V.: Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect. Genet. Evol.* **10**, 866–875 (2010)
31. Green E., Ob L.C., Okoh A.I., Nchabeleng M., Villiers B.E., Letsoalo T., Hoosen A.A., Bessong P.O., Ndip R.N.: IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains from Northeast South Africa. *JHPN*. **31**, 1–10 (2013)
32. Haquea F., Lib J., Wuc H.C., Liangd X.J.: Peixuan Guoa Solid-state and biological nanopore for real-time sensing of single chemical and sequencing of DNA. *Nano Today*, **8**, 56–74 (2013)
33. Heather J.M., Chain B.: The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, **107**, 1–8 (2016)
34. Huang S.S., Platt, R. i wsp.: Automated Detection of Infectious Disease Outbreaks in Hospitals: A Retrospective Cohort Study. *PLoS Medicine*, **7**, e1000238 (2010)
35. Hunter P.R., Gaston M.A.: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 2465–2466 (1988)
36. Hwang M.T., Landon P.B., Lee J., Choi D., Mo A.H., Glinsky G., Lal R.: Highly specific SNP detection using 2D graphene electronics and DNA strand displacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 7088–7093 (2016)
37. Illumina: Illumina Sequencing Technology, http://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf (02.01.2016)
38. Illumina: Illumina Sequencing Technology, <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/hiseq-x.html> (06.03.2017)
39. International Fungal Multi Locus Sequence Typing Database, mlst.mycologylab.org (02.01.2016)
40. Jackson S.A., Patel I.R., Barnaba T., LeClerc J.E., Cebula T.A.: Investigating the global genomic diversity of *Escherichia coli* using a multi-genome DNA microarray platform with novel gene prediction strategies. *BMC Genomics*, **12**, 349 (2011)
41. Jia J., Bi Z.W., Chen Y.Z., Hou P.B., Zhang M., Shao K., Bi Z.Q.: Antibiotic resistance and molecular typing of *Listeria monocytogenes* from foods in Shandong province from 2009 to 2010. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, **45**, 1065–1067 (2011)
42. Jolley K.A., Maiden M.C.J.: Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology*, **158**, 1005–1015 (2012)
43. Jursa-Kulesza J., Kordek A., Kopron K., Wojciuk B., Giedrys-Kalemba S.: Molecular studies of an impetigo bullosa epidemic in full-term infants. *Neonatology*, **96**, 61–68 (2009)
44. Karlsson E., Lärkeryd A., Sjödin A., Forsman M., Stenberg P.: Scaffolding of a bacterial genome using MinION nanopore sequencing. *Sci. Rep.* **5**, 11996 (2015)
45. 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)
46. Kostić T., Sessitsch A.: Microbial diagnostic microarrays for the detection and typing of food- and water-borne (bacterial) pathogens. *Microarrays*, **1**, 3–24 (2012)
47. Krawczyk B., Leibner-Ciszak J., Stojowska K., Kur J.: The new LM-PCR/shifter method for the genotyping of microorganisms based on the use of a class IIS restriction enzyme and mediated PCR. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 1366–1344 (2011)
48. Krawczyk B.: Diagnostyka Molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Post. Mikrobiol.* **46**, 367–378 (2007)
49. Kumari, N., Thakur S.K.: Randomly amplified polymorphic DNA-a brief review. *AJAVS*. **9**, 6–13 (2014)
50. Kwong J.C., McCallum N., Sintchenko V., Howden B.P.: Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*, **47**, 199–210 (2015)
51. Land M., Ussery D.W. i wsp.: Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct. Integr. Genomics*, **15**, 141–161 (2015)
52. Leggett R.M., MacLean D.: Reference-free SNP detection: dealing with the data deluge. *BMC Genomics*, **15**, S10 (2014)
53. Li W., Raoult D., Fournier P.E.: Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 892–916 (2009)
54. Lindstedt B.A., Åkerström S. i wsp.: Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries, 2012. *Euro Surveill.* **18**, 20385 (2013)
55. Loy J.D., Clawson M.L.: Rapid typing of *Mannheimia haemolytica* major genotypes 1 and 2 using MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*. **136**, 30–33 (2017)
56. Maiden M.C., Spratt, B.G. 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)
57. Maiden M.C.J., McCarthy N.D.: MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature Reviews Microbiology*, **11**, 728–736 (2013)
58. Microrao: Typing Methods, <http://microrao.com/micronotes/typing.pdf> (28.12.2016)
59. Międzobrodzki J., Małachowa N., Markiewski T., Białecka A., Kasprzowicz A.: Differentiation of *Staphylococcus aureus* isolates based on phenotypical characters. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **30**, 322–327 (2008)

60. MLST, www.mlst.net (02.01.2016)
61. Munson E.L., Doern G.V.: Comparison of Three Commercial Test Systems for Biotyping *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 4051–4053 (2007)
62. Nanoporetech: Store, <https://store.nanoporetech.com/devices.html> (02.03.2017)
63. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM): Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis, <http://www.mlva.net/> (02.01.2017)
64. Nowakiewicz A., Ziółkowska G., Zięba P., Gnat S., Trościańczyk A., Adaszek, Ł.: Characterization of Multidrug Resistant *E. faecalis* Strains from Pigs of Local Origin by ADSRRS-Fingerprinting and MALDI-TOF MS; Evaluation of the Compatibility of Methods Employed for Multidrug Resistance Analysis. *PLoS ONE*, **12**, e0171160 (2017)
65. Ota M., Asamura H., Oki T., Sada M.: Restriction enzyme analysis of PCR products. *Methods Mol. Biol.* **578**, 405–414 (2009)
66. Parizad E.G., Valizadeh A.: The Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis in Clinical Studies. *JCRD*, **10**, DE01-DE04 (2016)
67. Pérez-Losada M., Cabezas P., Castro-Nallar E., Crandall K.A.: Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* **16**, 38–53 (2013)
68. Pingault N.M., Riley T.V.: *Moraxella* (w) Molecular Typing in Bacterial Infections, red. I. Filippis, M.L. McKee, Springer, New Delhi, 2013, s. 214
69. Public databases for molecular typing and microbial genome diversity, www.pubmlst.org (02.01.2016)
70. Ramírez-Estrada S., Borgatta B., Rello J.: *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management. *Infect. Drug Resist.* **9**, 7–18 (2016)
71. Rhoads A., Au K.F.: PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **13**, 278–289 (2015)
72. Rumore J.L., Tschetter L., Nadon C.: The Impact of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis on PulseNet Canada *Escherichia coli* O157:H7 Laboratory Surveillance and Outbreak Support, 2008–2012. *Foodborne Pathog. Dis.* **13**, 255–261 (2016)
73. Sabat A.J., Budimir A., Nashev D., SheLeSh R., van Dijn J.M., Laurent F., Grundmann H., Friedrich A.W.: Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* **18**, 20380 (2013)
74. Sabat A.J., Friedrich A.W. i wsp.: Complete-genome sequencing elucidates outbreak dynamics of CA-MRSA USA300 (ST8-spa t008) in an academic hospital of Paramaribo, Republic of Suriname. *Sci. Rep.* **7**, 41050 (2017)
75. Saghrouni F., Ben Abdeljelil J., Boukadida J., Ben Said M.: Molecular methods for strain typing of *Candida albicans*: a review. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 1559–1574 (2013)
76. Salipante S.J., SenGupta D.J., Cummings L.A., Land T.A., Hoogstraal D.R., Cookson B.T.: Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 1072–1079 (2015)
77. Sandrin T.R., Goldstein J.E., Schumaker S.: MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom. Rev.* **32**, 188–217 (2013)
78. Schmieger H.: Molecular survey of the Salmonella phage typing system of Anderson. *J. Bacteriol.* **181**, 1630–1635 (1999)
79. Schwartz D.C., Cantor C.R.: Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, **37**, 67–75 (1984)
80. Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittam T.S.: Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 873–884 (1986)
81. Sękowska A., Gospodarek E., Kamińska D.: Antimicrobial susceptibility and genetic similarity of ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *Arch. Med. Sci.* **8**, 993–997 (2012)
82. Shao W., Zhang M., Lam H., Lau, S.C.K.: A peptide identification-free, genome sequence-independent shotgun proteomics workflow for strain-level bacterial differentiation. *Sci. Rep.* **5**, 14337 (2015)
83. Steglich M., Nübel U.: The challenge of detecting indels in bacterial genomes from short-read sequencing data. *J. Biotechnol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.02.026> (2017)
84. Stelling J., Platt, R. i wsp.: Automated use of WHONET and SaTScan to detect outbreaks of *Shigella* spp. using antimicrobial resistance phenotypes. *Epidemiol. Infect.* **138**, 873–883 (2010)
85. Straus L., Mellmann, A., i wsp.: Detecting *Staphylococcus aureus* Virulence and Resistance Genes: a Comparison of Whole-Genome Sequencing and DNA Microarray Technology. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 1008–1016(2016)
86. Struelens M.J.: Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **93**, 581–585 (1998)
87. Suffredini E., Lopez-Joven C., Maddalena L., Croci L., Roque A. (2011). Pulsed-field gel electrophoresis and PCR characterization of environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains of different origins. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6301–6304 (2011)
88. Sydnor E.R., Perl T.M.: Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 141–173 (2011)
89. Tenover F., Arbeit R., Goering R., Mickelsen P., Murray B., Pershing D., 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)
90. Thompson J.F., Milos, P.M. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. *Genome Biol.* **12**, 217 (2011)
91. Van Belkum A., Struelens M. i wsp.: Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 1–46 (2007)
92. Viana D., Penadés J.R. i wsp.: A single natural nucleotide mutation alters bacterial pathogen host-tropism. *Nat. Genet.* **47**, 361–366 (2015)
93. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Pot J., Peleman J., Kuiper M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4407–4414 (1995)
94. Voskresenskaya E., Savin C., Leclercq A., Tseneva G., Carniel E.: Typing and Clustering of *Yersinia pseudotuberculosis* Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Using Insertion Sequences. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 1978–1989 (2014)
95. Wasyl D., Elsedawy A., Lukinmaa S.: PulseNet Europe międzynarodowa sieć typowania molekularnego w nadzorze epidemiologicznym chorób szerszących się drogą pokarmową. *Medycyna Wet.* **64**, 123–126 (2008)
96. Williams M.L., LeJeune J.T.: Phages and bacterial epidemiology (w) Bacteriophages in health and disease, red. P. Hyman, S.T. Abedon, Centre for Agriculture and Bioscience International, Wallingford, 2012, s. 78
97. Wolska K., Szweda P.: Genotyping Techniques for Determining the Diversity of Microorganisms (w) Genetic Diversity in Microorganisms, red. M. Caliskan, InTech, 2012, 53–55 (2012)
98. Wolter D.J., Hanson N.D., Lister P.D.: Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **1**, 137–143 (2004)
99. World Health Organisation: Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide, A systematic review of the literature, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80135/1/9789241501507_eng.pdf (12.03.2017)

100. World Health Organisation: WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/> (12.03.2017)
101. Xu F.L., Guo Y.C., Wan H.X., Fu P., Zeng H.W., Li Z.G., Pei X.Y., Liu X.M.: PFGE genotyping and antibiotic resistance of *Lactobacillus* distributed strains in the fermented dairy products. *Ann. Microbiol.* **62**, 255–262 (2012)
102. Ziółkowski P.A., Babula-Skowrońska D., Kaczmarek M., Cieśla A., Sadowski J.: Sekwencjonowanie porównawcze genomów: generowanie markerów genetycznych typu INDEL i SNP. *Biotechnologia*, **4**, 53–68 (2010)
103. Zolfo M., Tett A., Jousson O., Donati C., Segata N.: MetaMLST: multi-locus strain-level bacterial typing from metagenomic samples. *Nucleic Acids Res.* **45**, e7 (2016)