

Sposób jednoczesnej detekcji bakterii i grzybów w preparacie biologicznym metodą PCR, startery oraz zestaw do detekcji bakterii i grzybów

Przedmiotem wynalazku jest sposób jednoczesnej detekcji bakterii i grzybów w próbce materiału biologicznego metodą PCR, startery do detekcji bakterii i grzybów oraz zestaw do wykrywania tych drobnoustrojów w próbce materiału biologicznego. Wynalazek dostarcza sposobu do realizacji jednoczesnej detekcji DNA bakterii Gram ujemnych, Gram dodatnich, grzybów drożdżowych i grzybów pleśniowych w próbce materiału biologicznego, np. ślinie czy krwi pacjenta.

Zakażenia wywoływane przez bakterie i grzyby od zawsze stanowiły poważny problem medyczny. Najgroźniejszym z nich są zakażenia ogólnoustrojowe czyli sepsy. Mimo postępów w ich leczeniu osiągniętych głównie dzięki zastosowaniu antybiotykoterapii oraz wprowadzenia do praktyki medycznej technologii pozwalających na długotrwałe podtrzymywanie czynności życiowych u pacjentów znajdujących się w stanie krytycznym, nadal nie udaje się utrzymać przy życiu wielu chorych. Paradoksalnie, w miarę rozwoju wiedzy medycznej i wprowadzaniu do lecznictwa coraz to nowszych procedur terapeutycznych, zapadalność na sepsę się zwiększa. Lever i wsp. donoszą że w USA w ciągu roku na sepsę zapada 750 000 osób i jest ona przyczyną ponad 215 000 zgonów. W Unii Europejskiej z powodu ciężkiej sepsy umiera rocznie 146 tys. chorych, w samej tylko Wielkiej Brytanii śmiertelność z jej powodu waha się w przedziale 30 do 50 /100 000 w ciągu roku, co plasuje sepsę w czołówce dziesięciu najczęstszych przyczyn śmierci. W krajach rozwiniętych sepsa rozwija się u 2-4/1000 żywo urodzonych dzieci i jest ona główną przyczyną ich śmierci. W Polsce brak jest dokładnych danych epidemiologicznych, ale Zieliński i wsp. podają że w 2005 roku z powodu sepsy nastąpiło 967 zgonów w tym 43 zgony dzieci. Zwiększająca się śmiertelność z powodu sepsy jest skutkiem narastającej oporności na antybiotyki, stosowania inwazyjnych metod leczenia oraz starzenia się społeczeństwa. Sepsa jest największym zagrożeniem dla osób z obniżoną odpornością, zwłaszcza kiedy są one długotrwałe hospitalizowane, głównie na oddziałach intensywnej opieki medycznej. Dotyka ona zwłaszcza pacjentów ze schorzeniami nowotworowymi, poddawanych immunosupresji, chorych oparzonych, osób w podeszłym wieku oraz dzieci.

W leczeniu zakażeń krwi najważniejszym i najtrudniejszym problemem decydującym o skuteczności terapii i w konsekwencji o kosztach i czasie hospitalizacji jest skuteczna diagnostyka czynników wywołujących ogólnoustrojową odpowiedź zapalną w przebiegu

sepsy. Oznaczenie czynnika etiologicznego (mikroorganizm: grzyb lub bakteria) pozwala na zastosowanie skutecznej, celowanej antybiotykoterapii. Materiałem poddawanym badaniu diagnostycznemu jest korzystnie krew pobrana od pacjenta manifestującego objawy kliniczne sepsy np. tachykardię, bradykardię, podwyższoną lub obniżoną ciepłotę ciała, spadek ciśnienia tętniczego krwi, i in.

Krew jako materiał do badań mikrobiologicznych stawia największe wyzwania spośród wszystkich materiałów biologicznych. Największą trudność sprawia to, że mikroorganizmy odpowiedzialne za zakażenie znajdują się we krwi w bardzo niskich ilościach, lub też następuje tylko ich okresowy wysiew do krwi.

Mimo to, obecnie standardem diagnostycznym są hodowle krwi prowadzone na specjalnych podłożach, najlepiej w systemach hodowli automatycznej (np. BACTEC - BectonDickinson). Do zalet tych metod należy ich prostota oraz względnie niski koszt wykonania badania. Słabą stroną metody opartej na hodowli krwi jest jej czasochłonność, sięgająca nawet 5 dni (do czasu wydania wyniku badania) oraz niska czułość, która powoduje że jedynie w ok. 15-20% hodowli udaje się uzyskać wzrost mikroorganizmów. Wskutek tego w zdecydowanej większości przypadków lekarz może stosować jedynie antybiotykoterapię empiryczną z powodu braku uzyskania wzrostu mikroorganizmów odpowiedzialnych za infekcję. Sytuację dodatkowo pogarsza fakt poddawania pacjentów antybiotykoterapii zanim dojdzie do pobrania próbek krwi na posiew - chorzy są często leczeni antybiotykami zanim dojdzie do manifestacji objawów sepsy. Hodowle krwi w takim wypadku są bardzo utrudnione z uwagi na to, iż znajdują się w niej antybiotyki hamujące wzrost mikroorganizmów. Aby zwiększyć szansę na wykrycie czynników mikrobiologicznych we krwi, podejmowane są próby oparcia ich detekcji na metodach serologicznych np. na wykrywaniu lipopolisacharydu (LPS) bakterii Gram ujemnych czy galaktomannanu grzybów.

Innym celem molekularnym, który umożliwia skuteczną, precyzyjną i szybką diagnostykę zakażeń krwi są kwasy nukleinowe drobnoustrojów będących czynnikami etiologicznymi infekcji. Zarówno DNA, jak i RNA każdego organizmu zawiera sekwencje unikalne dla niego, stanowiące swoisty „odcisk palca”. Dzięki znajomości tych sekwencji możliwe jest zastosowanie metod biologii molekularnej, takich jak PCR czy hybrydyzacja do oznaczania obecności mikroorganizmów we krwi. Czułość metod molekularnych znacznie przewyższa czułość metody hodowlanej. Poza tym wcześniejsze zastosowanie antybiotykoterapii nie wpływa na wynik badania z uwagi na to, że nie ma potrzeby

uzyskania wzrostu bakterii czy grzybów na podłożu hodowlanym, a jedynie wykrycie ich sekwencji DNA czy RNA.

Liczne zgłoszenia i opisy patentowe, jak przykładowo EP2547782, EP2087134, EP1978111 czy EP2009118, ujawniają zastosowanie metod PCR do detekcji specyficznych mikroorganizmów w oparciu o zaprojektowane startery.

Zgłoszenie EP2547782 ujawnia detekcję mikroorganizmów z grupy *Staphylococcus* w systemie multiplex PCR w oparciu o zaprojektowane sondy i startery, jednakże bez zastosowania systemu Nested PCR.

Istotą wynalazku jest sposób detekcji bakterii i grzybów w próbce materiału biologicznego, w którym DNA zawarte w próbce materiału biologicznego poddaje się amplifikacji w reakcji PCR w czasie rzeczywistym w systemie multipleksowym, przy czym reakcję amplifikacji prowadzi się dwuetapowo z zastosowaniem w pierwszym etapie starterów specyficznych dla bakterii i starterów specyficznych dla grzybów, a następnie produkt pierwszej amplifikacji wykorzystuje się jako matrycę w drugim etapie - amplifikacji z zastosowaniem starterów i sond różnicujących grzyby na grupę grzybów pleśniowych i drożdżopodobnych i bakterie na Gram dodatnie i Gram ujemne.

Jako startery specyficzne dla bakterii stosuje się startery specyficzne dla sekwencji 16S rRNA bakterii, korzystnie oligonukleotydy o następujących sekwencjach:

oligonukleotydy	Sekwencja 5' – 3'
NEST_BAC_F	GGCGGACGGGTGAGTAA
NEST_BAC_R	CGCATTTACCGCTA

Jako startery specyficzne dla grzybów stosuje się startery specyficzne dla sekwencji 18S rRNA grzybów, korzystnie oligonukleotydy o następujących sekwencjach :

oligonukleotydy	Sekwencja 5' – 3'
NEST_FUN_F	AATTGACGGAAGGGCACC
NEST_FUN_R	TTCCTCGTTGAAGAGCAA

Zgodnie ze sposobem według wynalazku w drugim etapie amplifikacji do wykrywania i identyfikacji bakterii stosuje się startery o sekwencjach:

oligonukleotydy	Sekwencja 5' – 3'
GN/GP_F	GACTCCTACGGGAGGC
GN/GP_R	GCGGCTGCTGGCAC

i sondy o sekwencjach:

oligonukleotydy	Sekwencja 5' – 3'
GP_Probe	Hex- CTGAy _{ss} AGCAACGCCGCG -TAMRA (Q)
GN_Probe	Cy5 –CCTGAy _s CAGCmATGCCGCG- BHQ-2

natomiast do amplifikacji do wykrywania i identyfikacji grzybów stosuje się startery o sekwencjach:

oligonukleotydy	Sekwencja 5' – 3'
FUN_F	TTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
FUN_R	TCTAAGGGCATCACAGACCTG

i sondy o sekwencjach:

oligonukleotydy	Sekwencja 5' – 3'
Candid_probe	FAM-TTAACCTACTAAATAGTGCTGCTAGC-BHQ1
Asperg_probe	TexasRed-TCGGCCCTTAAATAGCCCGTCCGC-Eclipse

Korzystnie, w sposobie według wynalazku detekcję bakterii i grzybów prowadzi się w próbce materiału biologicznego izolowanego z pacjenta, korzystnie z krwi pacjenta z objawami sepsy.

Wynalazek obejmuje także oligonukleotydy o sekwencji:

oligonukleotydy	Sekwencja 5' – 3'
NEST_BAC_F	GGCGGACGGGTGAGTAA
NEST_BAC_R	CGCATTTCACCGCTA

do stosowania jako startery w reakcji PCR do wykrywania bakterii.

Wynalazek obejmuje ponadto oligonukleotydy o sekwencji:

oligonukleotydy	Sekwencja 5' – 3'
NEST_FUN_F	AATTGACGGAAGGGCACC
NEST_FUN_R	TTCCTCGTTGAAGAGCAA

do stosowania jako startery w reakcji PCR do wykrywania grzybów.

Przedmiotem wynalazku jest także zestaw do detekcji bakterii i grzybów w próbce materiału biologicznego metodą nested-multiplex-real time PCR, zawierający następujące oligonukleotydy:

do detekcji bakterii startery specyficzne dla 16S rRNA bakterii:

oligonukleotydy	Sekwencja 5' – 3'
NEST_BAC_F	GGCGGACGGGTGAGTAA
NEST_BAC_R	CGCATTTCACCGCTA

i

oligonukleotydy	Sekwencja 5' – 3'
GN/GP_F	GACTCCTACGGGAGGC
GN/GP_R	GCGGCTGCTGGCAC

oraz sondy specyficzne dla 16S rRNA bakterii o sekwencjach:

oligonukleotydy	Sekwencja 5' – 3'
GP_Probe	Hex- CTGAy _{ss} AGCAACGCCGCG -TAMRA (Q)
GN_Probe	Cy5 –CCTGAy _s CAGCmATGCCGCG- BHQ-2

oraz

do detekcji grzybów startery specyficzne dla 18S rRNA grzybów:

oligonukleotydy	Sekwencja 5' – 3'
NEST_FUN_F	AATTGACGGAAGGGCACC
NEST_FUN_R	TTCCTCGTTGAAGAGCAA

i:

oligonukleotydy	Sekwencja 5' – 3'
FUN_F	TTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT
FUN_R	TCTAAGGGCATCACAGACCTG

oraz sondy specyficzne dla 18S rRNA grzybów o sekwencjach:

oligonukleotydy	Sekwencja 5' – 3'
Candid_probe	FAM-TTAACCTACTAAATAGTGCTGCTAGC-BHQ1
Asperg_probe	TexasRed-TCGGCCCTTAAATAGCCCGGTCCGC-Eclipse

Zastrzegany sposób detekcji bazuje na reakcji PCR w czasie rzeczywistym (real time) w systemie multiplex, z możliwą jednoczesną amplifikacją co najmniej dwóch sekwencji DNA. Ponadto, sposób według wynalazku realizuje metodę multiplex PCR w systemie Nested tj. reakcję dwustopniowej amplifikacji, co zwiększa znacznie czułość detekcji.

Zastrzegany sposób umożliwia detekcję wszystkich gatunków grzybów oraz bakterii (z różnicowaniem na bakterie Gram dodatnie, Gram ujemne, grzyby drożdżowe i grzyby pleśniowe) w próbkach DNA izolowanych z krwi pacjentów manifestujących objawy sepsy. Możliwe jest wykorzystanie metody do wykrywania tylko bakterii lub tylko grzybów, ale równocześnie zaletą sposobu jest możliwość wykorzystania do jednoczesnego wykrywania zarówno grzybów jak i bakterii, co wpływa na obniżenie kosztów badania.

Detekcja produktów PCR I amplifikacji nie jest wymagana, bowiem ostateczny wynik badania diagnostycznego jest widoczny w II amplifikacji. Jeśli w I amplifikacji nie uda się uzyskać namnożenia DNA przy wykorzystaniu zaprojektowanych starterów, to podczas II etapu amplifikacji także otrzymamy wynik negatywny (brak drobnoustrojów w próbce materiału biologicznego). Nie wyklucza to jednak przeprowadzenia po zakończeniu I amplifikacji detekcji produktu z zastosowaniem elektroforezy DNA w żelu, ewentualnie z zastosowaniem metod spektrofotometrycznych.

Detekcja i identyfikacja produktów PCR etapu II amplifikacji następuje już w trakcie trwania procesu namnażania DNA. Zastosowane sondy GP_probe, GN_probe, Candid_probe, Asperg_probe przyłączają się specyficznie do powstających produktów namnażania sekwencji DNA typowych dla bakterii Gram dodatnich, Gram ujemnych, grzybów drożdżowych i grzybów pleśniowych i emitują światło fluorescencyjne rejestrowane przez detektor w trakcie amplifikacji. Każda z czterech sond wyposażona jest w znacznik fluoryzujący o ściśle określonej, typowej dla danej sondy długości emisji fali światła, co pozwala na zróżnicowanie pomiędzy konkretnymi czterema grupami mikroorganizmów.

Wynalazek obejmuje nowe, specyficzne startery uniwersalne dla bakterii i nowe startery uniwersalne dla grzybów, których zastosowanie do amplifikacji materiału genetycznego próbek metodą PCR pozwala na objęcie całości panelu mikroorganizmów bakteryjnych i grzybiczych (z różnicowaniem na bakterie Gram ujemne, Gram dodatnie, grzyby drożdżowe i grzyby pleśniowe) lecz bez typowania konkretnych gatunków. Taka informacja jest dla lekarza bardzo przydatna w dobraniu odpowiedniego leczenia, zanim dotrze wynik identyfikacji z laboratorium mikrobiologicznego określający gatunek bakterii czy grzybów.

Obecnie stosowane systemy nie posiadają wskazanej uniwersalności. Stosowane systemy (np. SeptiFast - Roche) umożliwiają wykrywanie kilkunastu konkretnych gatunków drobnoustrojów, lub (jak SeptiTest - Molzym) pozwalają na detekcję teoretycznie każdego możliwego gatunku, ale wymagane jest sekwencjonowanie produktu PCR, co zwiększa koszty oraz wydłuża czas oczekiwania na wynik.

Sposób według wynalazku wykorzystujący techniki multiplex real-time PCR pozwala na jednoczesną detekcję bakterii i grzybów w czasie rzeczywistym, bez oczekiwania na wyniki elektroforezy DNA, jak ma to miejsce w przypadku klasycznej metody PCR. Dodatkowo, zastosowanie systemu Nested pozwala na zwiększenie czułości metody detekcji o dwa rzędy wielkości w porównaniu do PCR jednostopniowego. Nie jest także konieczne zastosowanie sekwencjonowania produktu PCR w celu identyfikacji konkretnego gatunku mikroorganizmu.

Sposób według wynalazku pozwala na szybkie wykrywanie wszystkich gatunków grzybów (z rozróżnieniem na drożdżowe i pleśniowe) oraz wszystkich gatunków bakterii (z rozróżnieniem na Gram ujemne i Gram dodatnie), bez identyfikacji konkretnych gatunków. Sposób detekcji pozwala szybko, z dużą czułością potwierdzić obecność zakażenia, przewyższając wady komercyjnie dostępnych metod, które wymagają więcej czasu i całego spektrum eksperymentów wycelowanych w konkretne, najczęściej występujące gatunki.

W zastrzeżonym sposobie wytypowanie konkretnego gatunku drobnoustroju jest również możliwe po sekwencjonowaniu produktu PCR uzyskanego w amplifikacji I lub II, jednakże do wstępnej diagnozy nie jest to wymagane.

W korzystnych przykładach wykonania wynalazek przedstawiony został na rysunku, na którym:

Fig. 1 przedstawia sekwencje 18S rRNA grzybów z zaznaczonymi zaprojektowanymi starterami NEST_FUN_F, NEST_FUN_R (szara ramka) oraz znanymi z publikacji starterami FUN_F, FUN_R (przezroczysta ramka) –sekwencje znajdują się na jednej nici DNA, zatem zaznaczona w szarej ramce sekwencja końcowa jest odwrócona i komplementarna w stosunku do zsyntetyzowanego odpowiednika R;

Fig. 2 przedstawia sekwencje 16S rRNA bakterii z zaznaczonymi zaprojektowanymi starterami NEST_BAC_F, NEST_BAC_R (szara ramka) oraz znanymi z publikacji starterami GN/GP_F, GN/GP_R (przezroczysta ramka) –sekwencje znajdują się na jednej nici DNA, zatem zaznaczona w szarej ramce sekwencja końcowa jest odwrócona i komplementarna w stosunku do zsyntetyzowanego odpowiednika R;

Fig. 3 przedstawia porównanie odsetek wyników pozytywnych uzyskanych z badania sposobem według wynalazku 102 próbek krwi pochodzących od pacjentów z klinicznymi objawami sepsy: systemowo oraz z rozbiciem na cztery grupy mikroorganizmów; natomiast

Fig. 4 przedstawia porównanie odsetek wyników pozytywnych w badaniu 102 próbek krwi od pacjentów z klinicznymi objawami sepsy przy użyciu metody posiewu w systemie BACTEC oraz zgodnie ze sposobem według wynalazku.

Część eksperymentalna

Metodyka amplifikacji DNA drobnoustrojów zrealizowana została na matrycy DNA wyizolowanego z krwi ludzkiej.

Amplifikacja w systemie Nested (gniazdowym) była prowadzona w dwóch oddzielnych etapach amplifikacji oznaczonych rzymskimi literami I i II. W etapie I użyte zostały zaprojektowane nowe startery specyficzne dla *Procarvota* (bakterie) oraz *Eucaryota* (grzyby), specyficzne dla sekwencji jednostki 16S rRNA (bakterie) i 18S rRNA (grzyby). Następnie, produkt pierwszej (I) amplifikacji PCR został wykorzystany jako matryca w procesie drugiej (II) amplifikacji, gdzie zastosowanie znalazły znane z literatury startery i sondy różnicujące grzyby na grupę grzybów pleśniowych i drożdżopodobnych oraz bakterie na bakterie Gram dodatnie i bakterie Gram ujemne. Zastosowanie systemu Nested PCR pozwala na zwiększenie czułości metody.

W sposobie według wynalazku zastosowano startery oraz sondy TaqMan znane z literatury, przy czym w projekcie opracowano system multipleks, pozwalający połączyć je w jednej reakcji.

Startery dla I amplifikacji projektowano i testowano *in silico* przy wykorzystaniu bazy BLAST/NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), co ilustruje Fig. 1. W celu oznaczenia czułości metody przeprowadzono izolację DNA z próbek krwi (pochodzących od zdrowych wolontariuszy), które sztucznie zakażano drobnoustrojami wzorcowymi: bakterie Gram ujemne – *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection); bakterie Gram dodatnie – *Staphylococcus aureus* ATCC 33497; grzyby drożdżopodobne - *Candida albicans* ATCC 10231, grzyby pleśniowe - *Aspergillus fumigatus* ATCC 14110, tak aby wytworzyć gradient ich liczby we krwi. Wyizolowane DNA wykorzystywano do przeprowadzenia zaprojektowanej amplifikacji multiplex PCR w systemie Nested. Wyniki oznaczenia czułości metody zamieszczono w Tabeli 1. Tabela 1 zawiera również dane porównawcze dla amplifikacji z pominięciem systemu Nested, w którym zastosowano zaprojektowane startery, jednakże zmniejszeniu ulega wówczas czułość metody.

Tabela 1. Czułość detekcji bakterii oraz grzybów we krwi przy pomocy metody real-time PCR w odmianie NESTED multiplex PCR oraz multiplex PCR z zaprojektowanymi starterami.

Grupy mikroorganizmów / gatunek	Czułość metody multiplex real-time PCR [CFU/ml]	
	NESTED multiplex PCR	Multiplex PCR
Grzyby pleśniowe (<i>A. fumigatus</i>)	$4,0 \times 10^2$	$3,25 \times 10^4$
Grzyby drożdżowe (<i>C. albicans</i>)	$2,0 \times 10^1$	$9,5 \times 10^2$
Bakterie Gram (-) (<i>E. coli</i>)	$6,5 \times 10^2$	$5,2 \times 10^3$
Bakterie Gram (+) (<i>S. aureus</i>)	$6,0 \times 10^2$	$5,1 \times 10^3$

Sekwencje stosowanych oligonukleotydów (sond i starterów) zestawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Sekwencje wykorzystanych starterów i sond

oligonukleotyd	Sekwencja 5' – 3'	Sekwencje docelowe
NEST_BAC_F *	GGCGGACGGGTGAGTAA	16S rRNA
NEST_BAC_R *	CGCATTTACCCGCTA	16S rRNA
NEST_FUN_F *	AATTGACGGAAGGGCACC	18S rRNA
NEST_FUN_R *	TTCCTCGTTGAAGAGCAA	18S rRNA
FUN_F	TTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT	18S rRNA
FUN_R	TCTAAGGGCATCACAGACCTG	18S rRNA
Candid_probe	FAM-TTAACCTACTAAATAGTGCTGCTAGC-BHQ1	18S rRNA
Asperg_probe	TexasRed-TCGGCCCTTAAATAGCCCGTCCGC-Eclipse	18S rRNA
GN/GP_F	GACTCCTACGGGAGGC	16S rRNA
GN/GP_R	GCGGCTGCTGGCAC	16S rRNA
GP_Probe	Hex- CTGAyssAGCAACGCCGCG -TAMRA (Q)	16S rRNA
GN_Probe	Cy5 –CCTGAysCAGCmATGCCGCG- BHQ-2	16S rRNA

* Nowe sekwencje starterów zaprojektowane dla potrzeb wynalazku

Skład mieszanin reakcyjnych multiplex PCR oraz multiplex PCR w systemie Nested podano w Tabeli 3, gdzie dodatkowo umieszczono stosowane odczynniki oraz profile termiczne amplifikacji.

Tabela 3. Skład mieszanin reakcyjnych, użyte odczynniki oraz profile termiczne reakcji PCR.

NESTED multiplex PCR		Multiplex PCR [objętość końcowa 40 µl]
I amplifikacja [objętość końcowa 25 µl]	II amplifikacja [objętość końcowa 10 µl]	

1. Woda	6,7 μ l	1. Woda	2,08 μ l	1. Woda	0,4 μ l
2. Bufor B	2,5 μ l	2. Bufor B	1,0 μ l	2. Bufor B	5,0 μ l
3. NEST_BAC_F	0,125 μ l	3. GN/GP_F	0,2 μ l	3. GN/GP_F	1,0 μ l
4. NEST_BAC_R	0,125 μ l	4. GN/GP_R	0,2 μ l	4. GN/GP_R	1,0 μ l
5. NEST_FUN_F	0,125 μ l	5. GP_probe	0,05 μ l	5. GP_probe	0,25 μ l
6. NEST_FUN_R	0,125 μ l	6. GN_probe	0,05 μ l	6. GN_probe	0,25 μ l
7. dNTP`s	2,5 μ l	7. FUN_F	0,2 μ l	7. FUN_F	1,0 μ l
8. MgCl ₂	2,5 μ l	8. FUN_R	0,2 μ l	8. FUN_R	1,0 μ l
9. Polimeraza	0,3 μ l	9. Asperg_prob	0,05 μ l	9. Asperg_prob	0,25 μ l
10. Perpetual <i>Taq</i>		10. Candid_probe	0,05 μ l	10. Candid_probe	0,25 μ l
11. DNA	10 μ l	11. dNTP`s	1,0 μ l	11. dNTP`s	5,0 μ l
		12. MgCl ₂	1,8 μ l	12. MgCl ₂	9,0 μ l
		13. Polimeraza	0,12 μ l	13. Polimeraza	0,6 μ l
		Perpetual <i>Taq</i>		Perpetual <i>Taq</i>	
		14. DNA	3,0 μ l	14. DNA	25,0 μ l
		(produkt I amplifikacji)			
<ul style="list-style-type: none"> • Bufor B 10x (EURx) • dNTP`s 2mM (EURx) • MgCl₂ mM (DNAGdansk) • Polimeraza Perpetual <i>Taq</i> 2,5 U/μl (EURx) • *NEST_BAC_F 10 μM (Genomed) – starter Nested do wykrywania bakterii • *NEST_BAC_R 10 μM (Genomed) – starter Nested do wykrywania bakterii • *NEST_FUN_F 10 μM (Genomed) – starter Nested do wykrywania grzybów • *NEST_FUN_R 10 μM (Genomed) – starter Nested do wykrywania grzybów • GN/GP_F 20μM (Genomed) – starter Nested do wykrywania bakterii • GN/GP_R 20μM (Genomed) – starter Nested do wykrywania bakterii • GP_probe 20μM (Genomed) – sonda do wykrywania bakterii Gram ujemnych • GN_probe 20μM (Genomed) – sonda do wykrywania bakterii Gram dodatnich • FUN_F 20μM (Genomed) – starter do wykrywania grzybów • FUN_R 20μM (Genomed) – starter do wykrywania grzybów • Asperg_prob 20μM (Genomed) – sonda do wykrywania grzybów pleśniowych • Candid_probe 20μM (Genomed) – sonda do wykrywania grzybów drożdżowych 					
95 ^o C – 5 min	} 30 x	95 ^o C – 5 min	} 40 x	95 ^o C – 5 min	} 40 x
95 ^o C – 20 sec		95 ^o C – 15 sec		95 ^o C – 15 sec	
46 ^o C – 20 sec		65 ^o C – 1 min		65 ^o C – 1 min	
72 ^o C – 30 sec					

* Sekwencje zaprojektowanych starterów

Przykład 1

Nested-multiplex-real time PCR do równoczesnej detekcji bakterii i grzybów.

Przeprowadzono badanie z wykorzystaniem zaprojektowanej metody Nested-multiplex-real time PCR na 102 próbkach DNA izolowanego z krwi pacjentów manifestujących objawy kliniczne sepsy w celu detekcji bakterii Gram dodatnich, Gram ujemnych, grzybów drożdżowych i grzybów pleśniowych. Pierwszą amplifikację pobranego DNA przeprowadzono w objętości końcowej 25 μ l w obecności nowo zaprojektowanych starterów NEST_BAC_F, NEST_BAC_R, NEST_FUN_F, NEST_FUN_R o sekwencjach podanych w Tabeli 1, stosując Polimerazę Perpetual *Taq*, realizując 30 cykli o parametrach temperatury i czasu podanych w Tabeli 4. Następnie 3 μ l mieszaniny z I etapu amplifikacji zawierającej namnożone DNA wykrywanego drobnoustroju, poddano II amplifikacji w objętości końcowej 10 μ l mieszaniny opisanej w Tabeli 4, realizując 40 cykli termicznych.

Tabela 4. Skład mieszanin reakcyjnych, użyte odczynniki oraz profile termiczne reakcji PCR

NESTED multiplex PCR			
I amplifikacja		II amplifikacja	
[objętość końcowa 25 μ l]		[objętość końcowa 10 μ l]	
1. Woda	6,7 μ l	1. Woda	2,08 μ l
2. Bufor B	2,5 μ l	2. Bufor B	1,0 μ l
3. NEST_BAC_F	0,125 μ l	3. GN/GP_F	0,2 μ l
4. NEST_BAC_R	0,125 μ l	4. GN/GP_R	0,2 μ l
5. NEST_FUN_F	0,125 μ l	5. GP_probe	0,05 μ l
6. NEST_FUN_R	0,125 μ l	6. GN_probe	0,05 μ l
7. dNTP`s	2,5 μ l	7. FUN_F	0,2 μ l
8. MgCl ₂	2,5 μ l	8. FUN_R	0,2 μ l
9. Polimeraza Perpetual <i>Taq</i>	0,3 μ l	9. Asperg_prob	0,05 μ l
10. DNA	10 μ l	10. Candid_probe	0,05 μ l
		11. dNTP`s	1,0 μ l
		12. MgCl ₂	1,8 μ l
		13. Polimeraza Perpetual <i>Taq</i>	0,12 μ l
		14. DNA (produkt	3,0 μ l

	I amplifikacji)
95 °C – 5 min	95 °C – 5 min
95 °C – 20 sec } 30 x	95 °C – 15 sec } 40 x
46 °C – 20 sec }	65 °C – 1 min
72 °C – 30 sec }	

Detekcję i identyfikację produktów PCR II amplifikacji prowadzono w trakcie trwania procesu namnażania DNA. Zastosowane sondy GP_probe, GN_probe, Candid_probe, Asperg_probe, po przyłączeniu specyficznemu do powstających produktów namnażania sekwencji DNA typowych dla bakterii Gram dodatnich, Gram ujemnych, grzybów drożdżowych i grzybów pleśniowych emitowały światło fluorescencyjne rejestrowane przez detektor w trakcie amplifikacji, umożliwiające identyfikację namnożonego produktu.

Uzyskane wyniki porównano z dostępnymi wynikami z posiewów tych samych 102 próbek krwi, uzyskanych z klasycznej metody diagnostyki sepsy, opartej na hodowli w systemie automatycznym BACTEC (BectonDickinson). We wszystkich próbkach potwierdzono rezultaty uzyskane z posiewu oraz dodatkowo uzyskano pozytywne wyniki na obecność bakterii i grzybów w części próbek ujemnych w posiewie. Potwierdza to wysoką czułość nowej metody. Szczegółowe wyniki przedstawiono na fig. 3 i 4.

Przykład 2.

Nested-multiplex-real time PCR do detekcji bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych

Detekcję przeprowadzono analogicznie do metody stosowanej w Przykładzie 1, stosując startery NEST_BAC_F i NEST_BAC_R do amplifikacji DNA bakterii, w warunkach opisanych w Tabeli 5.

Tabela 5. Skład mieszanin reakcyjnych, użyte odczynniki oraz profile termiczne reakcji PCR do detekcji bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych.

NESTED multiplex PCR	
I amplifikacja	II amplifikacja
[objętość końcowa 25 µl]	[objętość końcowa 10 µl]

1) Woda	6,95 μ l	1) Woda	2,58 μ l
2) Bufor B	2,5 μ l	2) Bufor B	1,0 μ l
3) NEST_BAC_F	0,125 μ l	3) GN/GP_F	0,2 μ l
4) NEST_BAC_R	0,125 μ l	4) GN/GP_R	0,2 μ l
5) dNTP`s	2,5 μ l	5) GP_probe	0,05 μ l
6) MgCl ₂	2,5 μ l	6) GN_probe	0,05 μ l
7) Polimeraza	0,3 μ l	7) dNTP`s	1,0 μ l
8) Perpetual Taq		8) MgCl ₂	1,8 μ l
9) DNA	10 μ l	9) Polimeraza	0,12 μ l
		10) Perpetual Taq	
		11) DNA	3,0 μ l
		(produkt I amplifikacji)	
95 °C – 5 min		95 °C – 5 min	
95 °C – 20 sec	} 30 x	95 °C – 15 sec	} 40 x
46 °C – 20 sec		65 °C – 1 min	
72 °C – 30 sec			


Przykład 3.

Metoda Nested-multiplex-real time PCR do detekcji grzybów drożdżowych i grzybów pleśniowych.

Detekcję przeprowadzono analogicznie do metody stosowanej w Przykładzie 1, stosując w I amplifikacji startery NEST_FUN_F i NEST_FUN_R do detekcji grzybów, w warunkach opisanych w Tabeli 6, a następnie prowadząc II amplifikację w mieszaninie opisanej w tabeli, realizując zdefiniowane tam cykle termiczne.

Tabela 6. Skład mieszanin reakcyjnych, użyte odczynniki oraz profile termiczne reakcji PCR do detekcji grzybów drożdżowych i grzybów pleśniowych

NESTED multiplex PCR	
I amplifikacja	II amplifikacja
[objętość końcowa 25 μ l]	[objętość końcowa 10 μ l]

1) Woda 6,95 μ l 2) Bufor B 2,5 μ l 3) NEST_FUN_F 0,125 μ l 4) NEST_FUN_R 0,125 μ l 5) dNTP`s 2,5 μ l 6) MgCl ₂ 2,5 μ l 7) Polimeraza 0,3 μ l 8) Perpetual Taq 9) DNA 10 μ l		1) Woda 2,58 μ l 2) Bufor B 1,0 μ l 3) FUN_F 0,2 μ l 4) FUN_R 0,2 μ l 5) Asperg_prob 0,05 μ l 6) Candid_probe 0,05 μ l 7) dNTP`s 1,0 μ l 8) MgCl ₂ 1,8 μ l 9) Polimeraza 0,12 μ l 10) Perpetual Taq 11) DNA 3,0 μ l (produkt I amplifikacji)
95°C – 5 min 95°C – 20 sec } 46°C – 20 sec } 30 x 72°C – 30 sec		95°C – 5 min 95°C – 15 sec } 65°C – 1 min } 40 x