



Detekcja mastitis cz.2

Łukasz Kaczorowski¹, Paweł Cyplik², Jakub Czarny¹

¹Instytut Genetyki Sądowej w Bydgoszczy,
Aleje Adama Mickiewicza 3/3-5, 85-071 Bydgoszcz

²Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

pawel.cyplik@up.poznan.pl

Najbardziej skutecznym sposobem wykrywania mastitis, umożliwiającym celowane leczenie jest identyfikacja wywołującego je patogenu. Bezpośrednią metodą wykrywania drobnoustrojów chorobotwórczych są posiewy bakteryjne. Kolonie bakteryjne, które wyrosły na pożywce identyfikuje się dodatkowo testami biochemicznymi [1]. Jako test confirmacyjny od kilku lat stosuje się też technikę MALDI-TOF MS (Desorpcja/Jonizacja laserem wspomagana matrycą z pomiarem czasu przelotu jonów wraz ze spektrometrią mas). MALDI-TOF MS umożliwia identyfikację patogenów na podstawie unikatowego profilu badanych białek. Metoda ta jednak wymaga drogiej aparatury, a jej czułość jest zbyt niska aby z powodzeniem zastosować ją do identyfikacji drobnoustrojów bez wcześniejszej hodowli [1, 2]. Do niedawna hodowla bakteryjna była tzw. „złotym standardem” diagnostyki zakażeń w przebiegu zapalenia wymienia [3]. Metoda ta ma kilka zalet, m.in.: jest tania, nie wymaga dodatkowego sprzętu (poza koniecznym do ogólnej hodowli bakteryjnej) oraz umożliwia ocenę lekooporności. Niestety hodowla bakteryjna posiada też wiele minusów. Jednym z nich jest czas potrzebny do uzyskania wyniku, najczęściej jest to 24-48 h, w niektórych przypadkach nawet kilka dni [4]. Czasami występuje całkowity brak wzrostu bakterii, np. w wyniku inhibitorów lub pozostałości antybiotyków po terapii [3]. Dodatkowo nie w każdym przypadku identyfikacja jest możliwa ze względu na różnice fenotypowe między szczepami, przez co wynik jest niepełny [5]. Identyfikacja patogenów wywołujących mastitis metodami genotypowania rozwija się najbardziej dynamicznie i staje się obecnie standardem w diagnostyce. Dzięki wykorzystaniu sekwencji genetycznej drobnoustrojów z ogólnie dostępnych baz danych można zaadaptować techniki amplifikacji (powielania) wybranych fragmentów DNA (reakcja PCR) badanych patogenów w celu ich bezpośredniej identyfikacji z materiału klinicznego (w przypadku mastitis – mleka) [5]. W klasycznej reakcji PCR wykorzystuje się dwa krótkie fragmenty DNA (oligonukleotydy) tzw. startery, łączące się specyficznym znaną sekwencją DNA. Jeśli sekwencja DNA, do której zaprojektowano startery, znajduje się w mieszaninie reakcyjnej ulega ona wielokrotnemu powieleniu (w postępie logarytmicznym).



Po zakończeniu reakcji jej wynik można uwidocznic dzięki rozdzielaniu fragmentów DNA na specjalnych żelach w obecności prądu elektrycznego. Im krótszy fragment DNA tym szybciej przemieszcza się w żelu, co można zaobserwować w postaci charakterystycznych prążków, a dzięki użyciu markera wielkości (mieszaniny fragmentów DNA o znanej długości) możliwa jest ocena długości fragmentu co pozwala stwierdzić czy jest to szukany przez nas fragment [6, 7, 8]. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) dzięki swojej uniwersalności jest obecnie wykorzystywana w każdej dziedzinie biologii molekularnej, m.in.: diagnostyce medycznej patogenów, klonowaniu i sekwencjonowaniu genów, badaniu ekspresji genów, analizie mutacji itd. [8].

Reakcja PCR ma wiele zalet: jest szybka – może być wykonana w czasie około 2 h; nie wymaga znajomości sekwencji amplifikowanego fragmentu, a jedynie sekwencji go okalających; startery reakcji nie muszą być w 100% komplementarne do fragmentu DNA, z którym się wiążą, co umożliwia amplifikację, np. różnych szczepów tego samego gatunku drobnoustroju, różniącymi się zmianami pojedynczych nukleotydów; reakcja jest specyficzna oraz bardzo czuła w porównaniu do metod klasycznej diagnostyki [9].

Obecnie istnieje ponad dwadzieścia różnych odmian i wariantów reakcji PCR. W diagnostyce wykorzystuje się najczęściej: nested PCR (tzw. zagnieżdżony PCR), RT-PCR (PCR połączony z odwrotną transkrypcją), umożliwiającą amplifikację fragmentów RNA, dzięki przepisaniu ich na cDNA (komplementarny DNA), real-time PCR (PCR z analizą produktu w czasie rzeczywistym), który jest bardzo czuły i nie wymaga osobnej analizy produktu po zakończeniu reakcji [9, 10].

Real-time PCR został przedstawiony w literaturze po raz pierwszy w 1992 roku przez Higuchi i wsp. Zmodyfikowali oni reakcję dodając do niej bromek etydyny (barwnik przyłączający się do DNA – obecnie wyparty przez inne, ze względu na swoje mutagenne właściwości), dzięki czemu wraz ze wzrostem ilości produktu zwiększała się intensywność świecenia barwnika, co można obserwować po każdym cyklu reakcji PCR [11]. W reakcji real-time PCR dzięki użyciu różnych metod można ocenić stężenie produktu. Podstawowe z nich to: metoda absolutna, wykorzystująca krzywą rozcieńczeń standardu DNA o znanym stężeniu oraz metoda relatywna, wykorzystująca amplifikację genów o stałej ekspresji w komórkach, będących punktem odniesienia dla oceny stężenia genów przez nas ocenianych. Pierwsza metoda jest powszechna we wszystkich rodzajach badań, druga natomiast służy głównie ocenie ekspresji genów, np. w nowotworach. Na podstawie zastosowanych metod system może wyznaczyć ilość DNA, znajdującego się na początku reakcji [12, 13, 14]. Pod względem odczynnikowym reakcje real-time można podzielić na niespecyficzne oraz specyficzne. Reakcje niespecyficzne to te, do których wykorzystuje się barwnik SYBRGreen I (oraz jego liczne modyfikacje). Barwnik wiąże się z dwuniciowym DNA, więc po każdej rundzie reakcji PCR, otrzymując więcej produktu, uzyskujemy też zwiększenie intensywności fluorescencji co rejestruje aparat. Zaletami takiego rozwiązania są niski koszt odczynników oraz uniwersalność – SYBRGreen I może zostać wykorzystany do uwidocznienia jakiegokolwiek amplifikacji. System ten jednak nie jest pozbawiony wad. Niespecyficzność barwnika powoduje, że fluorescencja będzie wzrastała przy amplifikacji produktu, niezależnie od tego czy jest to pożądaný produkt reakcji, czy produkt powstający niespecyficjnie. Dodatkowo, zastosowanie fluorescencyjnego barwnika umożliwi śledzenie w jednej reakcji powstawanie wyłącznie jednego produktu.



W reakcjach specyficznych natomiast wykorzystuje się znakowane fluorescencyjnie sondy molekularne, które podobnie jak startery reakcji PCR, wiążą się specyficznie z komplementarnym dla nich fragmentem DNA. Fragment ten znajduje się w sekwencji amplifikowanego produktu reakcji PCR. Im więcej produktu, tym więcej sond się przyłączy i emisja fluorescencji jest wyższa. Wadą takiej reakcji jest jej koszt, ponieważ sonda musi być zaprojektowana i zakupiona dla każdej reakcji z osobna. Metoda ta jednak charakteryzuje się wieloma zaletami. Wysoka specyficzność umożliwia sondzie przyłączenie się wyłącznie do pożądanego produktu, dlatego też amplifikacja niewielkich ilości niespecyficznych produktów nie ma znaczenia. Drugą ważną zaletą jest możliwość multipleksowania, czyli amplifikacji kilku różnych produktów w jednej reakcji PCR. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu znaczników fluorescencyjnych umożliwiających emisję fluorescencji o różnej długości fali światła, dzięki czemu aparat może wychwycić fluorescencję kilku znaczników bez ich nakładania się. Zastosowanie systemów multipleksowych znacząco obniża koszty reakcji PCR oraz czasochłonność przygotowania, a ponadto dzięki zastosowaniu wielu potencjalnych celów reakcji PCR umożliwia bardziej kompleksową diagnostykę laboratoryjną [12, 13, 14].

Literatura

1. Adkins, P. R. F. i Middleton, J. R. (2018) „Methods for Diagnosing Mastitis”, *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 34(3), ss. 479–491. doi: 10.1016/j.cvfa.2018.07.003.
2. Cameron, M. i in. (2017) „Identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a direct transfer protocol”, *Journal of Dairy Science*, 100(3), ss. 2137–2147. doi: 10.3168/jds.2016-12020.
3. Ghorbanpur, M. i in. (2007) „Comparison of PCR and bacterial culture methods for diagnosis of dairy cattle’s subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*”, *Comparison of PCR and bacterial culture methods for diagnosis of dairy cattle’s subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus**, 1(1), ss. 87–91. doi: 10.22059/ijvm.2008.65738.
4. Koskinen, M. T. i in. (2010) „Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria”, *Journal of Dairy Science*, 93(12), ss. 5707–5715. doi: 10.3168/jds.2010-3167.
5. Duarte, C. M., Freitas, P. P. i Bexiga, R. (2015) „Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview”, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(6), ss. 665–672. doi: 10.1177/1040638715603087.
6. Orlando, C., Pinzani, P. i Pazzagli, M. (1998) „Developments in Quantitative PCR”, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 36(5). doi: 10.1515/CCLM.1998.045.
7. Raeymaekers, L. (2000) „Basic Principles of Quantitative PCR”, *Molecular Biotechnology*, 15(2), ss. 115–122. doi: 10.1385/MB:15:2:115.
8. Garibyan, L. i Avashia, N. (2013) „Polymerase Chain Reaction”, *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), ss. 1–4. doi: 10.1038/jid.2013.1.

9. Rajalakshmi, S. (2017) „Different Types of Pcr Techniques and Its Applications”, International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, 7(3), ss. 285–292. Dostępne na: https://www.researchgate.net/publication/266971527_a_critical_review_on_PCR_its_types_and_applications.
10. Jagtar Singh, Niti Birbian, S. S. and A. G. (2014) „A critical review on PCR, its types and applications”, International Journal of Advanced Research in Biological Sciences, 1(7), ss. 65–80
11. Higuchi, R. i in. (1992) „Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences”, Bio/Technology, 10(4), ss. 413–417. doi: 10.1038/nbt0492-413.
12. Pfaffl, M. W. (2004) „Quantification strategies in real-time PCR”, A-Z of quantitative PCR, 1, ss. 87–112. Dostępne na: <http://www.gene-quantification.de/chapter-3-pfaffl.pdf>.
13. Bustin, S. A. (2005) „Real-time PCR”, Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics, 10(1), ss. 111–117.
14. Fraga, D., Meulia, T. i Fenster, S. (2014) „Real-Time PCR”, Current Protocols in Essential Laboratory Techniques, 2014(1), ss. 10.3.1-10.3.40. doi: 10.1002/97804700



UNIwersytet
PRzyrodniczy
WE WROCLAWIU



SZKOŁA GŁÓWNA
GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO



UNIwersytet
ROLNICZY
W KRAKOWIE



UNIwersytet
PRzyrodniczy
W POZNANIU



UNIwersytet
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

Zadanie pn. „Sieć badawcza uczelni przyrodniczych na rzecz rozwoju polskiego sektora mleczarskiego - projekt badawczy”
finansowane jest w ramach dotacji celowej Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.