

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PRIMOŽ KULOVEC

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

LJUBLJANA, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PRIMOŽ KULOVEC

**UPORABNOST GENOTIPIZACIJSKE METODE PRI
INVAZIVNIH OKUŽBAH S *HAEMOPHILUS
INFLUENZAE***

**APPLICABILITY METHOD OF GENOTYPIZATION
BY INVASIVE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*
INFECTIONS**

DIPLOMSKA NALOGA

LJUBLJANA, 2009

Diplomsko delo sem opravljal na Oddelku za medicinsko mikrobiologijo Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije pod mentorstvom izr. prof. dr. JANJE MARC, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom dr. METKE PARAGI, univ. dipl. biol.. Vse analize sem opravil v laboratoriju za bakteriologijo Inštituta za varovanje zdravja RS.

Za nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. JANJI MARC, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorici dr. METKI PARAGI, univ. dipl. biol. Posebna zahvala gre mag. Tamari Kastrin za pomoč in usmerjanje pri analizah. Zahvalil bi se staršem, ki so me v času celotnega študija podpirali in spodbujali.

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. JANJE MARC, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom dr. METKE PARAGI, univ. dipl. biol.

PRIMOŽ KULOVEC

Vsebina

Povzetek	8
Seznam okrajšav	9
I UVOD	10
1 Bakterija <i>Haemophilus influenzae</i>	10
1. 1 Opis bakterije	10
1. 2 Patogenost	11
1. 2. 1 Sestava bakterije <i>H. influenzae</i>	13
1. 2. 2 Gen <i>ompP2</i>	13
1. 2. 3 Gen <i>bexA</i>	14
1. 3 Epidemiologija bakterije	14
1. 4 Zdravljenje okužb in zaščita	16
2 Bakterijska DNA	17
3 Mikrobiološka diagnostika	17
4 Izolacija bakterijske DNA	18
4. 1 Izolacija DNA z adsorpcijo na membrano	18
4. 2 Avtomatizirani postopek izolacije DNA	19
5 Pomnoževanje izolirane DNA	21
5. 1 PCR (verižna reakcija s polimerazo)	21
5. 2 Dokazovanje produktov PCR	23
6 Elektroforeza DNA na agaroznem gelu	24
II IZHODIŠČA IN NAMEN DELA	26
III MATERIALI IN METODE	27
1 Material	27
1. 1 Vzorci	27
1. 2 Laboratorijska oprema	27
2 Metode	28
2.1 Aglutinacijski in koaglutinacijski test	28
2. 2 Avtomatizirana izolacija DNA	29
2. 2. 1 Reagenti	29
2. 2. 2 Priprava vzorca	29
2. 2. 3 Postopek izolacije z aparatom MagNA Pure LC	30

2.3 Priprava reakcijske mešanice za PCR (»Master mix«)	30
2.3.1 Postopek	30
2.3.2 Začetni oligonukleotidi.....	32
2.4 PCR (verižna reakcija s polimerazo).....	33
2.5 Ocena produktov PCR.....	34
2.5.1 Reagenti in pripomočki	34
2.5.2 Postopek	34
6 Statistični test.....	35
6.1 Cohenov kappa test korelacije.....	35
IV REZULTATI IN RAZPRAVA	36
1 Dokazovanje in tipizacija okužb s <i>H. influenzae</i> z metodo aglutinacije na stekelcu ..	37
2 Dokazovanje in tipizacija okužb s <i>H. influenzae</i> z molekularno metodo PCR.....	38
3 Primerjava metod za dokaz in tipizacijo <i>H. influenzae</i>	42
V SKLEP	46
VI LITERATURA.....	47
PRILOGA 1	52

Slike

Slika 1: Bakterija <i>H. influenzae</i> barvana po Gramu	10
Slika 2: Shematski prikaz strukture celične stene bakterije <i>H. influenzae</i>	12
Slika 3: Bolezni, ki jih povzroča bakterija <i>H. influenzae</i>	12
Slika 4: Prikaz zgradbe bakterije <i>H. influenzae</i>	13
Slika 5: Genom bakterije <i>H. influenzae</i>	14
Slika 6: Kumulativna incidenca invazivnih obolenj povzročenih z bakterijami <i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> in <i>S. pneumoniae</i> pri otrocih.....	15
Slika 7: Kumulativna incidenca invazivnih obolenj povzročenih z bakterijami <i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> in <i>S. pneumoniae</i> pri odraslih	16
Slika 8: Struktura dvojnovijačne DNA molekule.....	17
Slika 9: Sistem MagNA Pure LC (B) ter notranjost inštrumenta MagNA Pure LC (A).....	20
Slika 10: Princip izolacije molekul DNA ali celokupnih nukleinskih kislin.....	20
Slika 11: Aparatura PCR	22
Slika 12: Shematski prikaz poteka PCR.....	23
Slika 13: Elektroforezna kadička.....	24
Slika 14: Shema agarozne elektroforeze	25
Slika 15: Prikaz pozitivne (levo) in negativne (desno) reakcije aglutinacije	38
Slika 16: Ugotavljanje prisotnosti gena <i>ompP2</i> v vzorcih	40
Slika 17: Ugotavljanje prisotnosti genov <i>cap a</i> in <i>cap b</i> v vzorcih.....	41

Preglednice

Preglednica I: Aparature, uporabljene pri izvajanju praktičnega dela.....	27
Preglednica II: Priprava reakcijske mešanice za PCR za en vzorec (33)	31
Preglednica III: Pozitivni kontrolni vzorci tipov bakterije <i>H. influenzae</i>	31
Preglednica IV: Začetni oligonukleotidi za določanje gena <i>bexA</i> (34)	32
Preglednica V: Začetni oligonukleotidi za določanje gena <i>ompP2</i> (35)	32
Preglednica VI: Začetni oligonukleotidi za določanje posameznih <i>cap</i> genov (36)	32
Preglednica VII: Temperaturno-časovni protokol pomnoževanja DNA.....	33
Preglednica VIII: Velikost genov	39
Preglednica IX: Rezultati tipizacije <i>H. influenzae</i> z metodo aglutinacije ter molekularno PCR pri 105 invazivnih izolatih	43
Preglednica X: Referenčne vrednosti koeficienta kappa (38)	44

Povzetek

Bakterija *Haemophilus influenzae* je po Gramu negativen bacil, ki ne tvori spor. Epidemiološko so najbolj pomembni sevi bakterije s kapsulo, zlasti *H. influenzae* serotipa b, ki povzroča hude invazivne bolezni (meningitis, sepsa, bakteriemija) in so najpogostejše pri otrocih do 5. leta. Namen diplomske naloge je bil primerjati dve metodi dokazovanja različnih seroloških tipov omenjene bakterije pri 105 invazivnih izolatih (invaziven pomeni, da bakterijo dokažemo v telesnih tekočinah, ki so sterilne; kri, likvor). Primerjali smo obe metodi: molekularno PCR, ki temelji na določanju genov *bexA*, *ompP2*, *cap*, ter klasično aglutinacijo na stekelcu, ki temelji na določanju antigenov na površini bakterije. Največji delež ujemanja rezultatov metod (77/77; 100 %), je bil pri vzorcih, ki so z metodo aglutinacije na stekelcu pokazali N.T. ter pri Hib (14/16; 87,5 %). S statističnim testom kappa smo ugotovili dobro ujemanje metod (kappa test 0,744) in zaključili, da se klasična aglutinacija, ki je cenejša in krajša metoda, uporablja kot presejalni test, molekularna PCR, ki je bolj specifična, pa se v referenčnih laboratorijih uporablja kot potrditveni test.

Seznam okrajšav

bp	bazni par (angl. base pair)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
<i>Hi</i>	bakterija <i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Hia</i>	bakterija <i>Haemophilus influenzae</i> tip a
<i>Hib</i>	bakterija <i>Haemophilus influenzae</i> tip b
<i>Hib-</i>	bakterija <i>Haemophilus influenzae</i> , ki ima gen <i>cap b</i> vendar nima gena <i>bexA</i>
<i>Hic</i>	bakterija <i>Haemophilus influenzae</i> tip c
<i>Hid</i>	bakterija <i>Haemophilus influenzae</i> tip d
<i>Hie</i>	bakterija <i>Haemophilus influenzae</i> tip e
<i>Hif</i>	bakterija <i>Haemophilus influenzae</i> tip f
N.T.	nekapsulirana (angl. nontypable) bakterija <i>Haemophilus influenzae</i>
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
TBE	puffer (tris borat, borova kislina, EDTA)
μM	mikromolarna koncentracija

I UVOD

1 Bakterija *Haemophilus influenzae*

1.1 Opis bakterije

Bakterija *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) je po Gramu negativen, majhen negibljiv bacil, ki ne tvori spor. Vsi tipi bakterije *Haemophilus* so fakultativni anaerobi (1). Bacil je obvezni parazit na sluznicah ljudi: najdemo ga na mukozni membrani zgornjega respiratornega trakta (1, 2), je pomemben povzročitelj invazivnih obolenj (bakteriemija, meningitis, sepsa) in drugih obolenj (vnetje srednjega ušesa, vnetje sinusov) pri otrocih in odraslih (3). Bakterijo je prvič izoliral Robert Pfeifer med pandemijo gripe leta 1890 iz sputuma bolnika (4). Ime *Haemophilus* je bakterija dobila, ker dobro raste na gojiščih z dodano krvjo, izhaja pa iz grške besede »haemophilus«, ki pomeni ljubiti kri. Ime »influenzae« pa izhaja iz napačne predpostavke, da je bakterija povzročiteljica gripe (4).



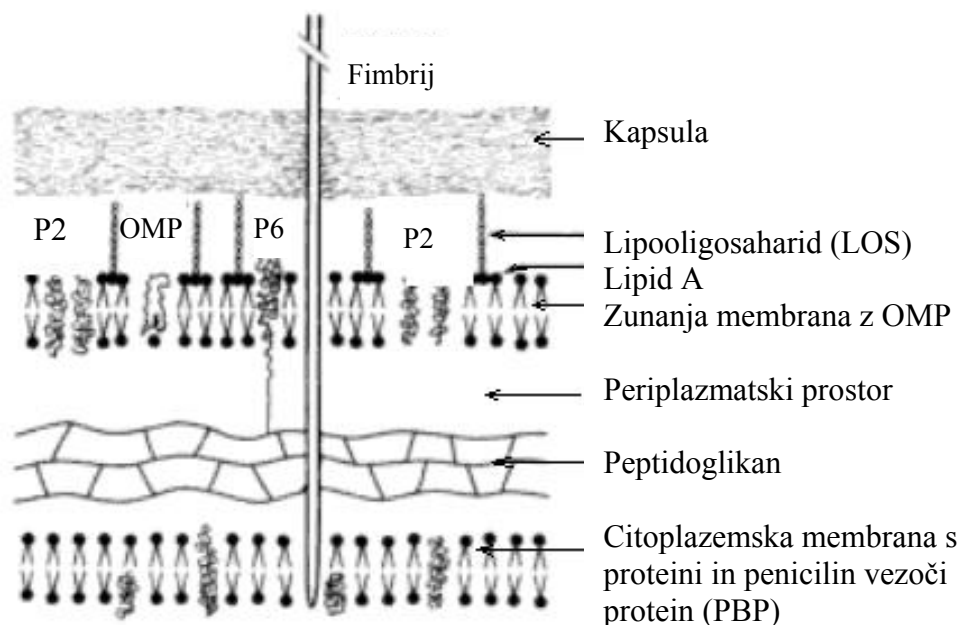
Slika 1: Bakterija *H. influenzae* barvana po Gramu

Bakterija *H. influenzae* ne raste na preprostih gojiščih. Za svojo rast potrebuje dva faktorja: faktor X (hemin) ter faktor V (NAD = nikotinamid adenin dinukleotid), ki je koencim (1, 3). Kužnino zasejemo na čokoladni ali krvni agar s stafilokoki in inkubiramo v 5 do 10 odstotnem CO₂, pri čemer zrastejo gladke in prosojne kolonije (2, 4). Običajno se kužnino nacepi poleg bakterije *Staphylococcus aureus* ki izločajo faktorja V in X, potrebna za rast bakterije *H. influenzae*. Kolonije zrastejo v 36–48 urah in so velike 1mm (3).

Leta 1930 je Margaret Pittman določila dve glavni kategoriji bakterij *H.influenzae*, in sicer kapsulirane ter nekapsulirane seve (5). Na podlagi biokemijskih lastnosti delijo bakterije *H. influenzae* na 8 različnih biotipov (I–VIII) (biotip je skupina mikroorganizmov, ki imajo enak ali zelo podoben genotip). Od teh biotipov meningitis povzroča predvsem biotip VIII. Na osnovi kapsularnih polisaharidov je s serološkimi metodami mogoče razlikovati 6 serotipov (a, b, c, d, e, f) (serotip pomeni, antigenska različica mikroorganizma iste vrste, dokazljiva s specifičnimi protitelesi). Polisaharidna kapsula bacila je velika 150 000 Da (3). Virulenca bacila je pri različnih biotipih različna. Določa jo kemijska sestava kapsule bacila. Virulentni sevi *H. influenzae* tipa b imajo v kapsuli poliribozaribitol fosfat (3). Protitelesa proti slednjemu pa varujejo pred obolenjem (6). Skoraj vse hude, invazivne okužbe pri ljudeh, so povezane s kapsularnim tipom b (2, 6). V zadnjih letih po uvedbi cepljenja proti bakteriji *H.influenzae* tipa b se pojavljajo pogosteje tudi ostali tipi bakterije, tudi nekapsulirani (1).

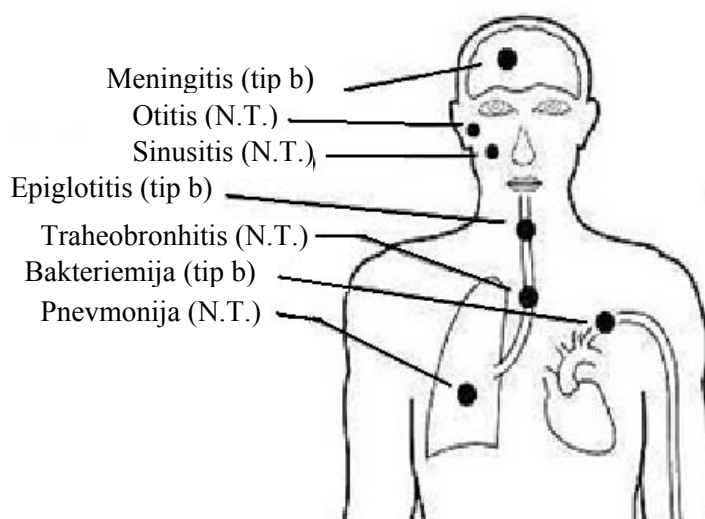
1.2 Patogenost

Bolezni, ki jih povzroča bakterija *H. influenzae*, so večinoma posledica kolonizacije zgornjih dihal (3). Bacil vsebuje vrsto virulentnih dejavnikov. Glavna virulentna dejavnika sta peptidoglikan in lipooligosaharid (slika 2), ki zavirata proteaze IgA1 in razkrajata IgA1 v sluznici nosno-žrelnega prostora. Na patogenost in imunost imajo velik prispevek tudi proteini zunanje membrane, fimbrije, različni adhezini. Nekapsulirani sevi bakterije so v nosnožrelnem prostoru prisotni pri 80 % zdravih otrok in odraslih. Bacilonoštvo za *Hib* pa so pri zdravih osebah ugotovili le v 3–5 % (6). Ostali kapsulirani sevi, vključno s tipom b, pa se nahajajo pri 10 % zdravih ljudi. Pri dojenčkih in majhnih otrocih (pod 5 let) *H.influenzae* tip b največkrat povzroča bakteriemije, epiglotitise meningitis (4,6), medtem ko nekapsulirani sevi *H. influenzae* navadno povzročajo vnetje ušes in sinusitis pri otrocih, ter pljučnico pri odraslih, otrocih in dojenčkih (slika 3) (4).



Slika 2: Shematski prikaz strukture celične stene bakterije *H. influenzae*

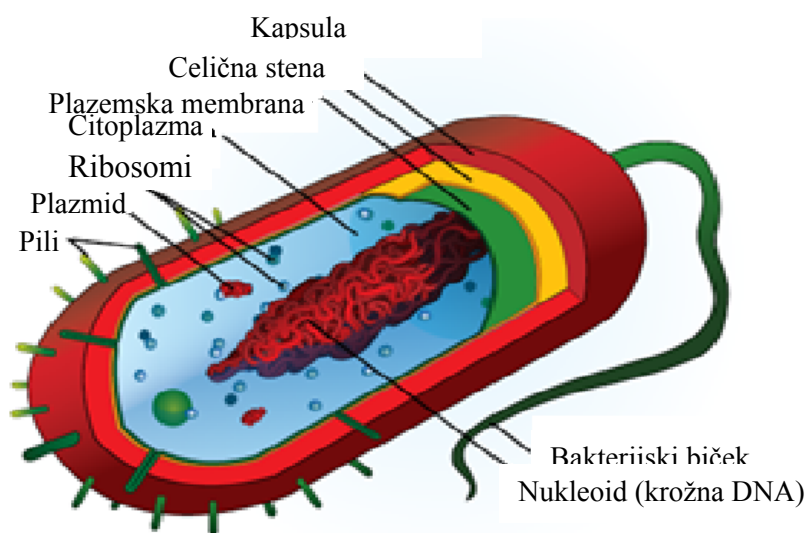
Bakterije najprej kolonizirajo epitelj nosno-žrelnega prostora ter vdrejo v krvne kapilare, s pomočjo kapsule se izognejo fagocitozi in delovanju komplementnega sistema (1, 3). Nekapsulirani sevi so manj invazivni, vendar pa zmožni povzročiti vnetni odziv, ki je vzrok bolezni. Bakterije, ki se izognejo fagocitozi ter komplementnemu sistemu, se pomnožujejo v krvnem obtoku in povzročijo invazivne bolezni. Okužbe lahko preprečimo s konjugiranim cepivom proti *H. influenzae* tipa b (4,20).



Slika 3: Bolezni, ki jih povzroča bakterija *H. influenzae*

1. 2. 1 Sestava bakterije *H. influenzae*

Bakterija *H. influenzae* se sestoji iz kapsule (kapsularni sevi), celične stene, plazemske membrane, citoplazme, krožne molekule DNA, ribosomov, pilov ter bakterijskega bička (slika 4). Vsebuje tudi različne površinske antigene: kapsularne polisaharide (kapsularni sevi), zunanje membranske beljakovine in lipopolisaharide (slika 2). Antigeni tipov a, b, c in f so tipa teihoične kisline, serotipa d in e pa polisaharidnega tipa. Serotip b je edini, ki vsebuje pentozni sladkor ribozo in ribitol fosfate. Ostali tipi vsebujejo heksozne sladkorje ali pa heksozamine (32).



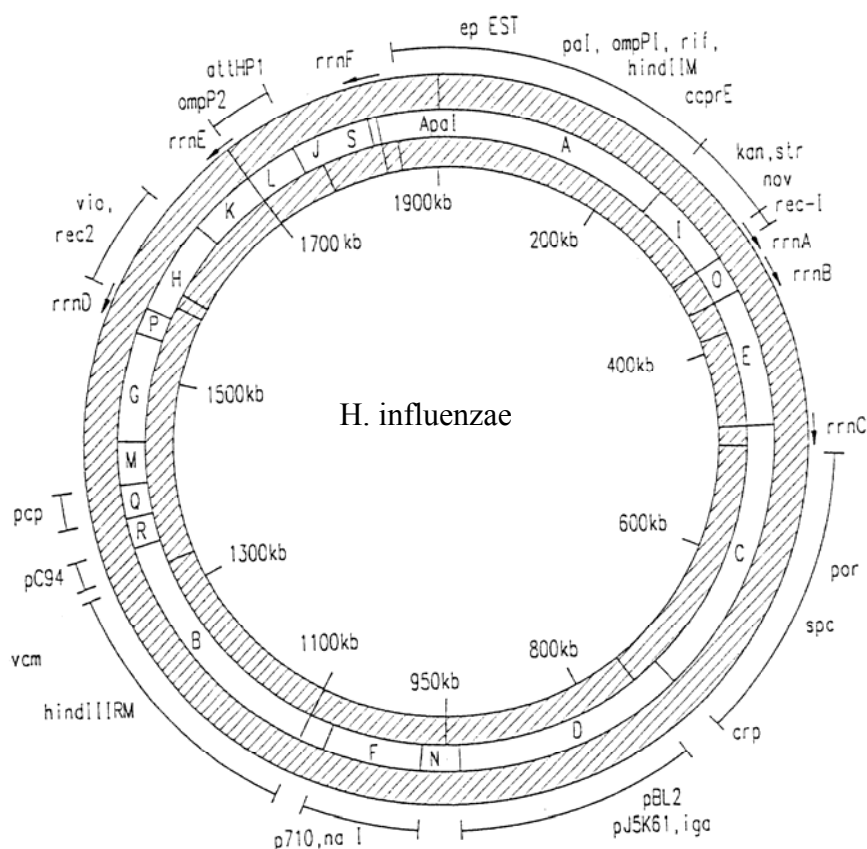
Slika 4: Prikaz zgradbe bakterije *H. influenzae*

1. 2. 2 Gen *ompP2*

OmpP2 je gen, kodira zapis za P2 (porin protein) prisoten na zunanji membrani bakterije *H. influenzae* (slika 5). Je antigen z najbolj razširjeno antigensko heterogenostjo. Prisoten je pri obeh, kapsuliranih in nekapsuliranih tipih bakterije. Pri molekularnih tehnikah PCR ta gen uporabljamo za identifikacijo bakterije *H. influenzae* (7).

1. 2. 3 Gen *bexA*

Tvorbo kapsule pri bakteriji kontrolirajo geni *cap*. Kromosom bakterije *H. influenzae* tipa b je navadno iz dveh genov *cap*, ki sta povezana z mostičkom, dolgim 1,3 kbp. Mostiček nosi majhen gen *bexA*, katerega funkcija je transport polisaharidov na površino celic (8). Nekapsulirani tipi bakterije nimajo niti gena *bexA* niti gena *cap*, medtem ko imajo kapsulirani oba gena.

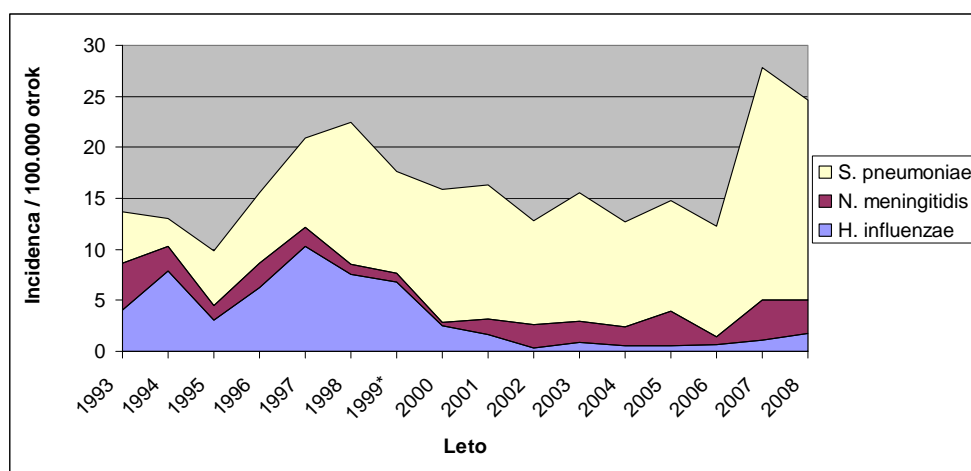


Slika 5: Genom bakterije *H. influenzae*

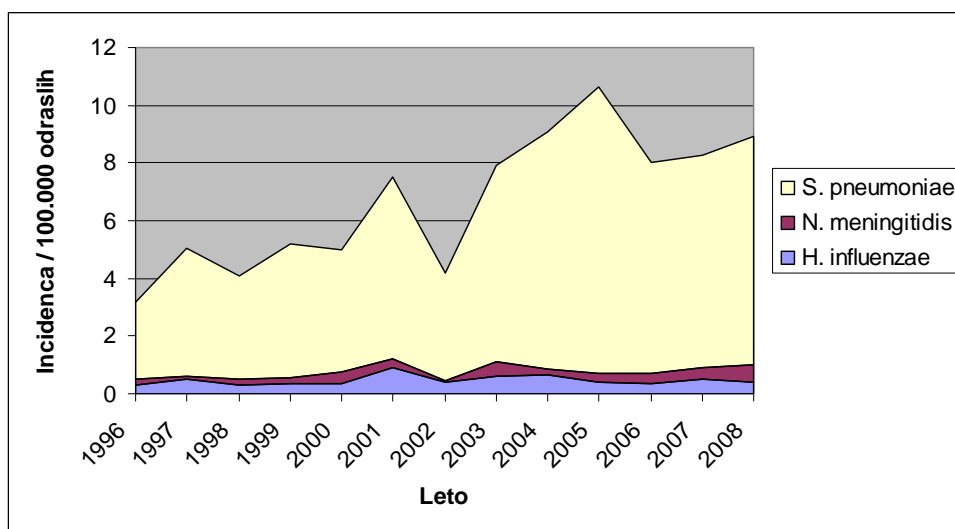
1. 3 Epidemiologija bakterije

Epidemiološko in klinično so pomembni sevi s kapsulo, zlasti tip b, ki povzroča sistemske okužbe (2). Tudi nekapsulirani sevi lahko povzročijo okužbe, vendar so te ponavadi omejene na zgornji del respiratornega trakta. S človeka na človeka se bakterije *H. influenzae* širijo kapljično (2), aerogeno posredno ali neposredno (6). Pri novorojenčkih je okužba redka zaradi materinih protiteles po 4. letu starosti zaradi lastnih protiteles (1, 4, 9

). *Hib* je najpogostejši povzročitelj meningitisa pri otrocih, starih od 6 mesecev do 4 leta. Pred uvedbo cepljenja je bilo približno 85 % invazivnih bolezni pri otrocih, mlajših od 5 let, povzročenih s *Hib* (5, 19). V ZDA je zbolelo od 20 do 60, v Franciji 27, na Finskem 26, na Švedskem 31, v Izraelu 34 in na Nizozemskem 22/100.000 otrok do 5. leta starosti (10,11). Zaradi uvedbe konjugiranega cepiva se je incidenca invazivne okužbe z bakterijo *Hib* drastično znižala, v nekaterih državah kar za 90–100 % (11). Zmanjšala se je tudi nosno-žrelna kolonizacija. Incidenca ostalih kapsularnih tipov (a, c, d, e, f) ter nekapsuliranih sevov bakterije pa se je zvišala (6, 12, 13). Beležiti smo pričeli tudi obliko tipa b, b-, ki sicer vsebuje zapis za kapsulo b, vendar ne vsebuje gena *bexA* za transport le-te na površino. Takih sevov ni mogoče določiti z običajnimi serotipizacijskimi tehnikami, kot je aglutinacija, temveč jih je treba določiti z genotipizacijskimi metodami (29). Pri nas so uvedli obvezno cepljenje otrok konec leta 1999. Incidenca invazivnih okužb povzročenih z bakterijo *H. influenzae* med otroki (0–14 let) je pred uvedbo cepiva znašala tudi 10,3/100.000. Leta 2000, je bila incidenca 2,5/100.000, leta 2001 pa 1,6/100.000 (14). Med letoma 1990 in 1999 je bilo prijavljenih povprečno 10 primerov *Hib* meningitisa letno. Največja zabeležena incidenca v Sloveniji je bila 1997 20/100.000 otrok do 5. leta starosti, najmanjša pa 2/100.000 leta 1993 (6, 15, 16). Četudi v Sloveniji incidenca ni dosegla incidence meningitisa v severnoevropskih državah, je bilo konec leta 1999, zaradi resnosti obolenj, uvedeno obvezno cepljenje proti *Hib* za otroke, mlajše od 5 let (6, 15, 16). Sliki 6 in 7 prikazujeta kumulativno incidenco invazivnih obolenj, povzročenih z bakterijami *H. influenzae*, *N. meningitidis* in *S. pneumoniae*, pri otrocih in odraslih v Sloveniji v letih od 1993 do 2008 (32).



Slika 6: Kumulativna incidenca invazivnih obolenj povzročenih z bakterijami *H. influenzae*, *N. meningitidis* in *S. pneumoniae* pri otrocih



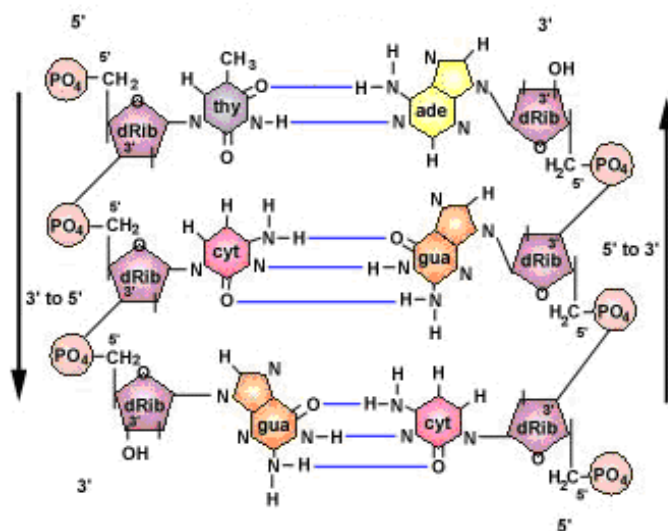
Slika 7: Kumulativna incidenca invazivnih obolenj povzročenih z bakterijami *H. influenzae*, *N. meningitidis* in *S. pneumoniae* pri odraslih

1. 4 Zdravljenje okužb in zaščita

Bakterija *H.influenzae* je občutljiva za številne antibiotike. Okužbe zdravijo s cefalosporini, ampicilinom, amoksicilinom, trimetoprimom, sulfametoksazolom ter drugimi antibiotiki (2, 17). Če bakterija izloča beta laktamazo in je odporna na penicilin, okužbe zdravijo s cefalosporini. Če beta laktamaze ne izloča, je za zdravljenje primeren ampicilin (2). Stiki z obolelimi zaradi *H. influenzae* tipa b za odrasle niso nevarni, so pa nevarni za necepljene otroke do 4. leta starosti. Z zdravljenjem je treba začeti čimprej in navadno traja od 7 do 10 dni (15, 16). Danes se okužbe zdravijo s cefalosporini tretje generacije. Taka sta na primer cefotaksin in ceftriakson (6, 15). Na ampicilin je odpornih že zelo veliko sevov (20 %), tako da se uporablja cefalosporine tretje generacije, če se dokaže, da je sev občutljiv na ta antibiotik (4, 6). Za zdravljenje so razvili konjugirana cepiva, pri katerih je del bakterijske ovojnice (npr. polisaharid) kemijsko vezan na beljakovinski nosilec, ki je bakterijskega izvora. Ta cepiva so bolj imunogena pri otrocih pod 2 letoma starosti in hkrati preprečujejo kolonizacijo bakterije v žrelu. Na tržišču je več konjugiranih *H. influenzae* tipa b polisaharidnih cepiv, pri katerih je beljakovinski nosilec bodisi toksoid davičnega toksina, bodisi toksoid tetanusovega toksina, bodisi beljakovina kompleksa zunanje ovojnice meningokoka (4, 6, 11, 20).

2 Bakterijska DNA

Pri večini bakterij je genetska informacija vsebovana v eni krožni dvojnovijačni molekuli DNA (slika 8). Ti organizmi imajo v genomu le po eno kopijo vsakega gena. Genom se nahaja v področju citoplazme, imenovanem nukleoid (slika 4). Za prokariotske genome je značilno da nimajo intronov in so v povprečju dolgi le 900 bp. Velika večina nukleotidnega zaporedja genomov (82-94 %) vsebuje zapise za proteine, ki so policistronski, kar omogoča, da se iz njih po prepisu hkrati sintetizirajo proteini z različnimi celičnimi funkcijami. Poleg kromosomske je pri večini bakterij prisotna tudi plazmidna DNA (21).



Slika 8: Struktura dvojnovijačne DNA molekule

3 Mikrobiološka diagnostika

Postopki identifikacije bakterije *H. influenzae* v različnih kužninah (18, 20)

- Mikroskopski preparat, barvan po Gramu: identificiramo gram negativne kratke pleomorfne bacile.
- Satelitni fenomen na krvnem agarju: izraz satelitni fenomen pomeni močnejšo rast bakterije *H. influenzae* ob koloniji bakterije *Staphylococcus aureus*, nanešeni na krvni agar s cepilno zanko.

- Rast na čokoladnem agarju, ki vsebuje dovolj faktorjev X in V, ki sta nujna za rast bakterij.
- Določanje β -laktamaze: Od tega je odvisno, s katerimi antibiotiki zdraviti okužbo. Ta encim hidrolizira β -laktamski obroč penicilinov in cefalosporinov in tako prepreči njihovo antibiotsko učinkovitost.
- Določanje serotipov (znanih je 6 antigenskih skupin a-f) z monovalentnimi in polivalentnimi protitelesi.

4 Izolacija bakterijske DNA

Genomsko DNA bakterij lahko izoliramo s številnimi metodami, ki se med seboj razlikujejo po stopnji čistosti in velikosti izoliranih molekul DNA ter po času, ki je potreben za njihovo izvedbo. Izbira metode je v veliki meri odvisna od količine izhodnega materiala, vrste vzorca in namene za katerega se bo izolirana DNA uporabila.

4.1 Izolacija DNA z adsorpcijo na membrano

Za izolacijo DNA iz bakterije *H. influenzae* smo uporabili komplet reagentov QIAamp[®] DNA Mini Kit. Komplet zagotavlja tudi hitro in enostavno metodo čiščenja celotne DNA za PCR. DNA lahko izoliramo iz različnih bioloških materialov, kot so npr. kri, celične kulture, različne vrste bakterij. Osnovne prednosti uporabe tega kompleta so hitra izolacija visokomolekularne in čiste DNA.

Princip metode je razgradnja celic v času inkubacije s *proteinazo K* ter selektivna vezava molekul DNA na membrano QIAamp. Vezane nukleinske kisline nato očistimo z večkratnim spiranjem z različnim pufri. Soli ter pogoji pH lizata omogočijo, da se proteini ter druge nečistoče sperejo na membrani. DNA se sprosti z membrane s pufrom nizke ionske jakosti, kateri poveča hidrofobne interakcije in posledično prekinitev šibkih vezi nastalih med DNA in membrano. Tako dobljena raztopina ima visoko koncentracijo DNA (23).

4.2 Avtomatizirani postopek izolacije DNA

Ročne metode izolacije molekule DNA iz različnih vzorcev so pogosto dolgotrajne in zahtevajo veliko ročnega dela. Pri postopku klasične izolacije je možnost kontaminacije velika, zato so razvili aparaturo, ki omogoča popolnoma avtomatizirano izolacijo nukleinskih kislin.

Princip izolacije molekule DNA z avtomatiziranim procesorjem MagNa Pure LC (slika 9B), temelji na selektivni adsorpciji DNA na steklene magnetne kroglice, iz katerih se nato DNA sprosti. Homogenizacija mikroorganizmov je ročna, tako da vzorcu dodamo bakterijski homogenizacijski pufer in *proteinazo K* ter inkubiramo pri višji temperaturi.

Sistem MagNA Pure LC na začetku postopka vzorcu doda določeno količino raztopine pufera in magnetne kroglice. Na silikonsko površje magnetnih kroglic se med mešanjem suspenzije vežejo molekule DNA. Z dodatkom vodnih pufrov DNA očistimo nečistot (proteinov, liofiliziranih celičnih membran, zaviralcev PCR). Ob dodatku elucijskega pufera in povišani temperaturi sistem sprosti očiščeno DNA z magnetnih delcev ter jo shrani v hladilnem bloku. Očiščeno DNA nato odpipetiramo v mikrocentrifugirke in jo uporabimo takoj ali jo shranimo v zamrzovalniku pri temperaturi med -15 °C in 25 °C (24).

Robot MagNa Pure (Roche Diagnostic, Nemčija) je povezan z računalnikom z ustrezno programsko opremo (slika 9A) in omogoča izjemno hitro, enostavno ter popolnoma avtomatizirano izolacijo DNA iz različnih vzorcev (kri, celične kulture, tkiva). V mikrobiologiji uporabljamo komplet »MagNa Pure LC DNA Isolation Kit III« (za bakterije in glive). Avtomatizirani procesor je pomemben za hitro in občutljivo odkrivanje mikroorganizmov z metodo PCR ter je v izjemno pomoč mikrobiološkemu laboratoriju. Inštrument omogoča istočasno izolacijo DNA iz 32 vzorcev in preprečuje navzkrižno kontaminacijo.



A



B

Slika 9: Sistem MagNA Pure LC (B) ter notranjost inštrumenta MagNA Pure LC (A)



Slika 10: Princip izolacije molekul DNA ali celokupnih nukleinskih kislin

A

B

C

D

E

F

G

H

A – vzorec (npr. celice, kri ali homogenat tkiva) se prenese v vdolbino nosilca; B in C – vzorcu se doda pufer za lizo celic in vezavo DNA ter *proteinazo K*; D–liziranemu vzorcu se doda magnetne steklene delce, na katere se vežejo molekule DNA; E–z magnetom na zunanji strani magnetnega nastavka se magnetni stekleni delci z adsorbirano DNA prenesejo v nastavek; F in G–iz molekul DNA se spirajo proteini, inhibitorji PCR ter ostale nečistote; H–očiščena DNA se sprostí z magnetnih delcev (31)

»Čistost genomske DNA, izolirane iz bakterije *Neisseria meningitidis* s klasično in avtomatizirano metodo, je zadostna za nadaljnje molekularne biološke analize. Po podatkih iz literature je vzorec DNA z vrednostjo razmerja absorpcij (260 nm/280 nm) 1,8 (in več), že dovolj čist. S klasično metodo so bile povprečne vrednosti izolirane genomske DNA 1,85, z avtomatizirano metodo pa 2,07. Uporaba inštrumenta MagNA Pure LC za izolacijo DNA je primerna, zlasti ko je na voljo manj izhodnega materiala in kadar izoliramo DNA iz velikega števila vzorcev. Pri izolaciji s klasično metodo je količina visokopolimerne genomske DNA večja kot pri avtomatiziranem postopku« (25).

5 Pomnoževanje izolirane DNA

5.1 PCR (verižna reakcija s polimerazo)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction) oz. verižna reakcija pomnoževanja DNA s termostabilno *DNA-polimerazo* je najstarejša in največkrat uporabljena metoda pomnoževanja nukleinskih kislin v cikličnem termostatu (slika 11) (26). S to metodo lahko v kratkem času pomnožimo določen odsek DNA v velikem številu kopij (26, 27). Leta 1983 je metodo izvedel in opisal Kary Mullis, za kar je deset let pozneje prejel Nobelovo nagrado za kemijo (27).

Termostabilna *DNA-polimeraza* je encim, ki so ga izolirali iz seva YT1 termofilne bakterije *Thermus aquaticus* iz vročih vrelcev. Optimalno deluje pri 72 °C, svojo aktivnost pa ohranja tudi pri kratkotrajnih segrevanjih nad 90 °C. Zato odtlej ni bilo več potrebno v vsakem ciklu dodati svežega encima, kar je omogočilo avtomatizacijo postopka (27).

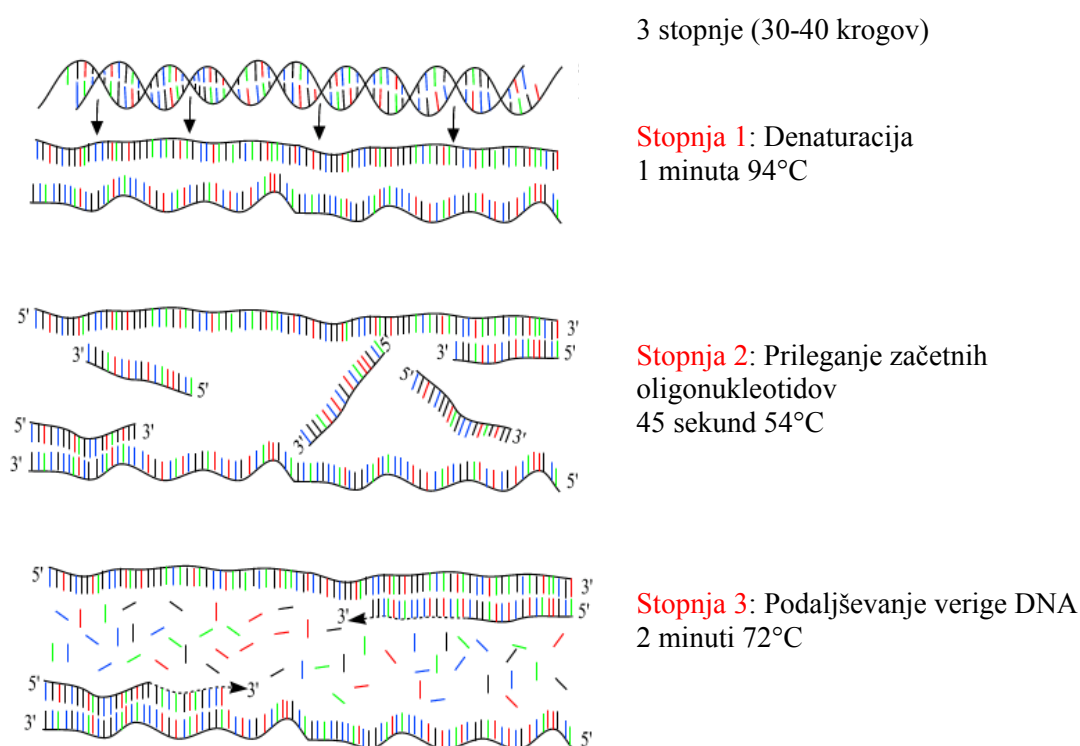
Glavni predpogoj za uspešno pomnoževanje s klasično metodo PCR je poznavanje nukleotidnega zaporedja vsaj enega dela genoma izbranega mikroorganizma. To nam omogoča pravilno izbiro dveh kratkih značilnih odsekov nukleinskih kislin, t.i. začetnih oligonukleotidov (angl. primers), ki sta komplementarna (imata prilegajoče se zaporedje baznih parov (bp)) mejnima deloma specifičnega odseka tarčnega genoma, ki ga želimo pomnožiti. Začetna oligonukleotida se spajata z nasproti ležečima vijačnicama tarčnega odseka DNA in sta obrnjena tako, da sinteza nove DNA poteka v smeri od 5' konca proti 3' koncu (slika 12). Velikost novonastale DNA je odvisna od medsebojne oddaljenosti med začetnima oligonukleotidoma (27).



Slika 11: Aparatura PCR

Iz biološkega vzorca najprej z ustrežno metodo izoliramo celotno DNA. Pripravimo reakcijsko mešanico, ki vsebuje vse štiri osnovne gradbene sestavine nukleinskih kislin-deoksinukleotid trifosfate (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) v enakem razmerju, par začetnih oligonukleotidov, ki omejujeta specifični odsek DNA, Mg^{2+} ion, temperaturno obstojni encim *DNA-polimerazo* ter posebno pripravljene pufer, ki omogoča potek encimske reakcije, ter DNA vzorca. Mešanico inkubiramo pri treh točno določenih temperaturah, kar pomeni en temperaturni cikel PCR. Prva je temperatura med 92 °C in 95 °C pri kateri poteka razdvajanje matrične DNA (angl. denaturation) v dve enoverižni molekuli DNA (ssDNA, angl. singlestranded DNA). Denaturacija traja med 15 in 60 sekundami. Sledi proces prileganja začetnih oligonukleotidov (angl. primer annealing) na komplementarna dela vzorčne DNA. Ta navadno poteka pri temperaturi med 45 °C in 75 °C, odvisno od nukleotidnega zaporedja. V zadnji stopnji se temperatura dvigne na optimalno območje za delovanje *DNA-polimeraze*, to je 72 °C. Med inkubacijo pride do podaljševanja začetnih oligonukleotidov (angl. primer extension) in s tem do sinteze komplementarne molekule DNA v smeri od 5' proti 3'-konca (slika 12). Temperaturni ciklusi se nato ponavljajo, dokler ne dobimo želene količine pomnožene DNA. Ponavadi dobimo zadostno količino pomnoženega dela tarčne DNA s 25 do 40 ponovitvami (28).

PCR- verižna reakcija s polimerazo



Slika 12: Shematski prikaz poteka PCR

5. 2 Dokazovanje produktov PCR

Po končani PCR je potrebno produkt dokazati. To sklepamo iz dokaza prisotnosti ali odsotnosti pomnoženega tarčnega odseka genoma mikroorganizma v reakcijski mešanici.

Tradicionalna metoda zaznavanja pomnožene DNA je elektroforeza nukleinskih kislin v gelu ob dodatku etidijevega bromida. Prednosti metode so enostavnost, hitrost in nizka cena, slabost pa je nizka specifičnost in izredno visoka kancerogenost etidijevega bromida. Princip elektroforeze je ločevanje različno velikih odsekov DNA (26).

Veliko natančnejše so metode hibridizacije. Med njimi najbolj hibridizacija po Southernu. Za zaznavanje pomnoženih pridelkov PCR uporabimo specifično označene oligonukleotidne sonde DNA, ki se vežejo na komplementarno zaporedje pomnoženega dela.

V zadnjem času se za potrditev specifičnosti produktov PCR uporablja sistem, ki temelji na uporabi encimskega oligonukleotidnega testa. Edina metoda, s katero najbolj natančno in

popolnoma potrdimo specifičnost produkta PCR, je določanje njegovega nukleotidnega zaporedja oz. sekvenčna analiza (26).

6 Elektroforeza DNA na agaroznem gelu

Agarozna je naravni polimer morskih alg, sestavljen iz D-galaktoze in 3,6-anhidro-L-galaktoze.

Ti dve osnovni sestavini se prepletata ter tvorita agarozni gel. Gel se uporablja za ločevanje molekul, velikih od 100 do nekaj 10 000 bp.

Gelska elektroforeza je separacijska metoda, pri kateri se med seboj ločujejo molekule pod vplivom enosmernega toka v nosilcu, potopljenem v specifičnem pufri. Vrednosti pH pufrov, ki se uporabljajo, so okoli 7. Pri takšnih vrednostih imajo nukleinske kisline negativen naboj ter potujejo proti anodi.

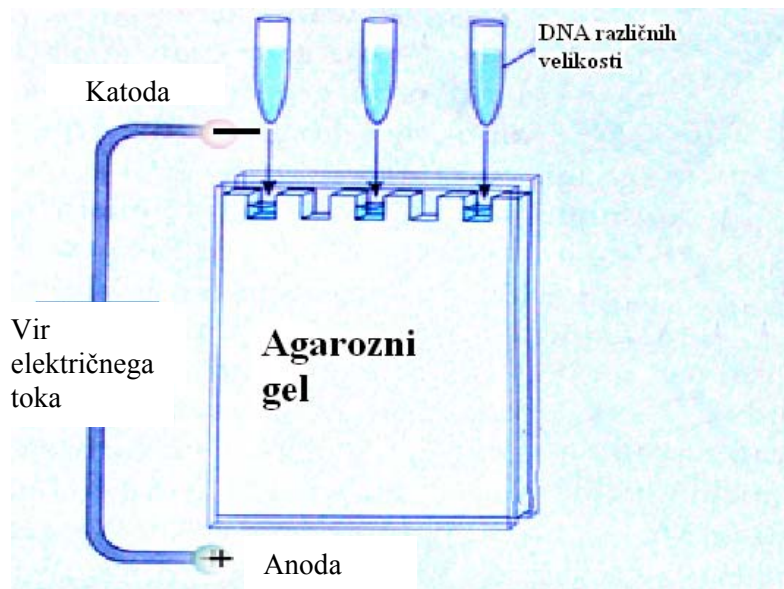
Hitrost potovanja molekul DNA je odvisna od velikosti, oblike, prisotnosti etidijevega bromida (EtBr) pri konstantnem električnem toku, koncentraciji gela ter ionski jakosti. Manjše molekule potujejo hitreje kot velike molekule DNA. Uporaba etidijevega bromida (fluorescentno barvilo) je potrebna za zaznavanje ločenih molekul DNA, čeprav njegova prisotnost zmanjša hitrost potovanja DNA skozi gel (30).



Slika 13: Elektroforezna kadička

Pri agarozni elektroforezi, ki smo jo uporabili pri izvedbi naloge za ločevanje fragmentov DNA, so se molekule ločevale med seboj na osnovi velikosti od katode proti anodi, kot je prikazano na sliki 14. Večje so potovale počasneje kot majhne, ker so slednje hitreje našle pot skozi mrežo gela in tako hitreje prišle do konca. S pomočjo agarozne elektroforeze smo dokazali, ali je iskani gen prisoten v genomu bakterije *H. influenzae*, ali ne.

Slika 14 prikazuje nanos vzorcev DNA različnih velikosti v žepke agaroznega gela in potovanje le teh od katode proti anodi s pomočjo električnega toka.



Slika 14: Shema agarozne elektroforeze

II IZHODIŠČA IN NAMEN DELA

Bakterijska invazivna obolenja, ki jih povzroča bakterija *H. influenzae* tipa b, so resna, neredko smrtna in velikokrat puščajo nevrološke posledice. Epidemiološko so pomembni sevi *H. influenzae* s kapsulo, zlasti tip b. Najpogostejše so okužbe s *H. influenzae* pri otrocih od 6. meseca do 4. leta starosti. Od uvedbe rednega cepljenja otrok v Sloveniji konec leta 1999 se je obolenje otrok za meningitisom, povzročenim s *H. influenzae* tipa b zelo zmanjšalo. Začeli pa so se pojavljati drugi kapsulirani in nekapsulirani tipi *H. influenzae*, vendar z blažjo klinično sliko.

Na Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije pošiljajo invazivne izolate (bakterija je prisotna v sterilnih telesnih tekočinah kot sta kri in likvor) bakterije *H. influenzae* odraslih in otrok, vsi mikrobiološki laboratoriji Zavodov za zdravstveno varstvo po Sloveniji. V mikrobiološkem laboratoriju najprej potrdijo identifikacijo, določijo serotip in antibiotično občutljivost. Nato jih zamrznejo pri temperaturi $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, za nadaljnje preiskave. Zaradi možnih nekaterih navzkrižnih reakcij metoda aglutinacije ni vedno dovolj jasna, da bi se lahko opredelili za določen serotip. Iz tega razloga so na Inštitutu hoteli uvesti metodo molekularne tipizacije PCR, s čimer bi lahko potrdili ali ovrgli rezultat aglutinacije na stekelcu.

Namen naloge je bil:

- ugotoviti primerljivost molekularne metode PCR z aglutinacijo na stekelcu z namenom izboljšati specifičnost tipizacij te bakterije,
- določiti izolate serotipa b-, kar je mogoče samo z metodo PCR.

S tem namenom bomo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) analizirali 105 vzorcev invazivnih izolatov *H. influenzae*, ki so bili predhodno že analizirani z metodo aglutinacije. Pri PCR bomo določali vrstno specifične gene *ompP2* in *bexA* ter tipno specifične gene *cap* a-f.

III MATERIALI IN METODE

1 Material

1.1 Vzorci

Na oddelku Medicinske mikrobiologije Inštituta za varovanje zdravja smo analizirali 105 invazivnih izolatov bakterije *H. influenzae* (od leta 2000 do 2008), izoliranih iz krvi ali likvorja odraslih ter otrok s sumom na invazivne bakterijske okužbe. 73 vzorcev *H. influenzae* je bilo izoliranih pri odraslih bolnikih in 32 pri otrocih.

V vseh izolatih je bil določen serotip bakterije z metodo koaglutinacije proizvajalca Phadebact in metodo aglutinacije na stekelcu proizvajalca Difco, ki se trenutno uporabljajo v rutinski praksi. Po tipizaciji so bili izolati shranjeni v zmrzovalniku na -70 °C.

1.2 Laboratorijska oprema

Za uspešno opravljanje praktičnega dela smo poleg aparatur, nanizanih v preglednici, uporabili osnovni laboratorijski pribor: čaše, erlenmajerice, vrečke za gospodinjstvo, zaščitno obleko in očala, destilirano vodo, stojala za epruvete, mikrocentrifugirke, pipete, pincete.

Preglednica I: Aparature, uporabljene pri izvajanju praktičnega dela

Aparatura PCR	Mastercycler EP GRADIENT S	Eppendorf, Nemčija
Aparatura za avtomatsko izolacijo nukleinskih kislin	MagNA Pure LC	Roche, Nemčija
Centrifuga	5417R	Eppendorf, Nemčija
Komora za pripravo reakcijske mešanice PCR	PCR6	Labcaire Systems Ltd.
Hladilnik in zamrzovalna omara	CE215/2 RS-2TS	Italija
Stresalnik z vrtinčastim mešanjem	EV-102 Vibromix 204EV	Tehtnica, Slovenija Tehtnica, Slovenija

Brezprašna komora z laminarnim pretokom zraka	M12 MVR	Iskra PIO, Slovenija Iskra PIO, Slovenija
Aparatura za elektroforezo	Standard Power Pack P25	Biometra, Nemčija
Aparatura za slikanje elektroforeznega gela	BIO-RAD Gel Doc XR	BIORAD, Nemčija
Stresalnik	Mix Mate	Eppendorf, Nemčija
Minicentrifuga	Mini Spin	Eppendorf, Nemčija

2 Metode

2.1 Aglutinacijski in koaglutinacijski test

Koaglutinacijski test se vedno izvede pred aglutinacijo in se ga uporablja za potrditev *H. influenzae* tipa b. Pri koaglutinacijskem testu so na celice bakterije *Staphylococcus aureus* vezana protitelesa, za katera iščemo antigen. Celice stafilokoka imajo na površini beljakovino A, ki se lahko direktno veže na regijo Fc protitelesa IgG. Test vsebuje dva reagenta, monovalentni serum za dokazovanje tipa b in polivalentni serum a, c, d, e, f za ostale tipe. Če serumu dodamo vzorec *H. influenzae*, se specifični antigeni bakterije vežejo na regijo Fab ustreznih protiteles seruma. Nastane koaglutinacija, ki jo lahko opazujemo s prostim očesom.

Aglutinacijski test temelji na zlepljanju delcev v skupke s specifičnimi antigeni oz. protitelesi pod določenimi kemičnimi pogoji. Antigen oz. protitelo je adsorbiran na površino določenih nosilcev. Serološko skupino bakterije *H. influenzae* določajo s specifičnimi monovalentnimi in polivalentnimi antiserumi.

Aglutinacijski test poteka v dveh stopnjah:

1. Reakcija med antigenom in protitelesom, imenovana senzitacija (je nevidna); tu nizka ionska jakost spodbuja vezavo protiteles na bakterijski kapsularni polisaharid (antigen), pri čemer nastanejo imunski kompleksi.
2. Vidna reakcija; zlepljanje imunskih kompleksov med seboj v skupke oziroma aglutinacija.

Za izvedbo naloge smo:

1. izolirali DNA bakterije *H. influenzae* iz invazivnih izolatov osamljenih iz krvi in likvorja v letih 2000-2008 z avtomatsko metodo, ki smo jo izvedli s kompletom »MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III« s pomočjo inštrumenta MagNA Pure LC.
2. z molekularno metodo PCR določili gena *ompP2* in *bexA* ter posamezne tipno specifične gene *cap a*, *cap b*, *cap c*, *cap d*, *cap e*, *cap f*.
3. izvedli predhodno aglutinacijo vseh izolatov za določitev serotipa.

2. 2 Avtomatizirana izolacija DNA

2. 2. 1 Reagenti

Za izvedbo avtomatizirane izolacije bakterijske DNA smo uporabili komplet MagNA Pure LC Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) in avtomatizirani procesor MagNA Pure LC. Avtomatizirani procesor lahko naenkrat izolira DNA iz 32 vzorcev. Komplet MagNA Pure vsebuje magnetne kroglice, elucijski pufer, bakterijski lizirajoči pufer, *proteinazo K* ter tri vrste pufrov za spiranje.

2. 2. 2. Priprava vzorca

Invazivni sevi bakterije *H. influenzae* so bili predhodno izolirani iz krvi likvorja ali krvi obolelih oseb. Sevi so bili zamrznjeni na gojišču pri temperaturi -70 °C. S sterilno cepilno zanko smo bakterije *H. influenzae* z gojišča prenesli na krvni agar in bakterije gojili v inkubatorju 24 ur pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂. Ves postopek je potekal v brezprašni komori z laminarnim pretokom zraka.

Nato smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 230 µL pufru za razgradnjo (angl. lysis buffer) bakterijskih celic, cepilno zanko 24-urne bakterijske kulture in 20 µL *proteinaze K*, ki je omogočila razgradnjo proteinov. Vse skupaj smo premešali, inkubirali 10 min pri 65 °C in 10 min pri 95 °C. Po inkubaciji smo vsebino kratko centrifugirali in ohlajeno prenesli v avtomatizirani procesor MagNA Pure LC (24).

2. 2. 3 Postopek izolacije z aparatom MagNA Pure LC

Vključili smo aparaturo MagNA Pure LC in njeno programsko opremo. Volumen pripravljene vzorca je znašal 100 μL , volumen elucijskega pufru pa 150 μL . V aparaturo smo postavili plastične posodice in posodice z reagenti, v katere smo odpipetirali izračunane volumne reagentov, po navodilih proizvajalca. Za preprečitev izhlapevanja reagentov smo posodice tesno zaprli in v aparat dodali steklene magnetne kroglice za vezavo DNA. Čas izolacije je odvisen od števila vzorcev: od 20 do 100 minut. Očiščeno DNA smo odpipetirali v epruvetko in jo do uporabe v PCR aparatu shranili v zamrzovalno omaro na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, oziroma v hladilnik na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (24).

2. 3 Priprava reakcijske mešanice za PCR (»Master mix«)

Pripravo reakcijske mešanice (»master mix«) izvajamo v dveh ločenih sobah, da zmanjšamo kontaminacijo.

2. 3. 1 Postopek

Iz hladilnika ($2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$) smo vzeli komplet *TopTaq* (proizvajalec Qiagen) polimeraze, ki vsebuje *TopTaq polimerazo*, PCR pufer, barvilo, raztopino Q in MgCl_2 . Zatem smo iz zamrzovalnika ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) vzeli začetne oligonukleotide, bidestilirano vodo in deoksiribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Vse zbrane reagente smo na sobni temperaturi s pipeto premešali. V zbiralno mikrocentrifugirko smo dodali ustrezno količino posameznih reagentov (Preglednica II). Pri pripravi reakcijske mešanice smo upoštevali tudi pozitivno in negativno kontrolo. Zaradi napake pri pipetiranju smo pripravili za en vzorec več reakcijske mešanice. Iz zbiralne mikrocentrifugirke smo odpipetirali 23 μL reakcijske mešanice v posamezne mikrocentrifugirke. V prvo, ki nam je služila kot negativna kontrola, smo dodali še 2 μL bidestilirane vode.

S postopkom smo nadaljevali v sobi za dodajanje izolatov bakterij, tako da smo v drugo mikrocentrifugirko dodali 2 μL pozitivne kontrole in v vsako naslednjo enako količino posameznega vzorca. Tako pripravljene reakcijske zmesi smo 30 sekund mešali na mešalniku, kratko centrifugirali in jih po mešanju vstavili v aparaturo za PCR.

Preglednica II: Priprava reakcijske mešanice za PCR za en vzorec (33)

Reagenti	Končna koncentracija	Volumen za en vzorec
Ultračista voda		17,8 µL
PCR pufer		2,5 µL
dNTP-ji (10 mM)	0,2 mM	0,5 µL
Barvilo CoralLoad Concentrate		2,5 µL
Ustrezni začetni obratnosmerni oligonukleotidi(»reverse primer«) (20 µM)	0,8 µM	1 µL
Ustrezni začetni istosmerni oligonukleotidi(»forward primer«) (20 µM)	0,8 µM	1 µL
<i>TopTaq</i> polimeraza		0,125 µL
Vzorčna ali kontrolna DNA		2 µL

Pozitivna kontrola

Uporabili smo DNA referenčnih sevov iz zunanje kontrole EU-IBIS (33)

Preglednica III: Pozitivni kontrolni vzorci tipov bakterije *H. influenzae*

Pozitivna kontrola	Tip bakterije <i>H. influenzae</i>
HA60 ATCC 9006	Hia
HA61 ATCC 10211	Hib
HA62 ATCC 9007	Hic
HA63 ATCC 9008	Hid
HA64 ATCC 8142	Hie
HA65 ATCC 9833	Hif
HA67 fb7132	Hib-
ATCC11931 in NCTC11315	NT (nekapsulirani »non typable«)

Negativna kontrola

Kot negativno kontrolo smo dodali namesto vzorca enako količino PCR- vode. Za vsakih 24 vzorcev smo naredili eno negativno kontrolo vode.

2.3.2 Začetni oligonukleotidi

Pripravili smo 1 $\mu\text{M/L}$ koncentracijo začetnih oligonukleotidov in jih dodali reakcijski mešanici master mix. Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje in dokazovanje genov *bexA*, *ompP2* ter posameznih genov *cap* (a-f) so prikazani v preglednicah.

Preglednica IV: Začetni oligonukleotidi za določanje gena *bexA* (34)

Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje (5'–3')
<i>bexA</i> / VK 1	CGT TTG TAT GAT GTT GAT CCA GACT
<i>bexA</i> / VK 2	TGT CCA TGT CTT CAA AAT GAT G

Preglednica V: Začetni oligonukleotidi za določanje gena *ompP2* (35)

Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje (5'–3')
<i>O 1</i>	ATA ACA ACG AAG GGA CTA ACG
<i>O 3</i>	ACC TAC ACC CAC TGA TTT TTC

Preglednica VI: Začetni oligonukleotidi za določanje posameznih *cap* genov (36)

Tip kapsule	Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje (5'–3')
a	a1	CTA CTC ATT GCA GCA TTT GC
	a2	GAA TAT GAC CTG ATC TTC TG
b	b1	GCG AAA GTG AAC TCT TAT CTC TC
	b2	GCT TAC GCT TCT ATC TCG GTG AA
c	c1	TCT GTG TAG ATG ATG GTT CA
	c2	CAG AGG CAA GCT ATT AGT GA

d	d1	TGA TGA CCG ATA CAA CCT GT
	d2	TCC ACT CTT CAA ACC ATT CT
e	e1	GGT AAC GAA TGT AGT GGT AG
	e2	GCT TTA CTG TAT AAG TCT AG
f	f1	GCT ACT ATC AAG TCC AAA TC
	f2	CGC AAT TAT GGA AGA AAG CT

2. 4 PCR (verižna reakcija s polimerazo)

S pomočjo verižne reakcije s polimerazo smo dokazovali dva gena, in sicer gen *ompP2*, ki služi kot kontrola in ga vsebujejo vsi tipi *H. influenzae* in kodira zapis za zunanji membranski protein P2, ter gen *bexA*, ki je vključen v prenos polisaharidne kapsule na površino bakterijske celice. V primeru dokaza gena *bexA* smo dodatno določili še posamezne gene *cap* (a-f) in tako ugotovili, za kateri tip bakterije *H. influenzae* gre.

Postopek pomnoževanja molekul DNA s *TopTaq* polimerazo je prikazan v preglednici VII.

Preglednica VII: Temperaturno-časovni protokol pomnoževanja DNA

		Število ciklov	Čas [s]	Temperatura [°C]
1.Začetna denaturacija		1	180	94
2.Pomnoževanje DNA	1.denaturacija		30	94
	2.prileganje začetnih oligonukleotidov	35	30	52
	3. podaljševanje verige		60	72
3.Podaljševanje		1	600	72
4.Hlajenje		1	/	40

2. 5 Ocena produktov PCR

Produkte smo ocenjevali glede na njihovo velikost v primerjavi s kontrolnim vzorcem DNA na agaroznem gelu.

2. 5. 1 Reagenti in pripomočki

- Agaroz (Abgene, Velika Britanija)
- raztopina etidijevega bromida: 10 mg/mL (Promega)*,
- pufer TBE pH 8 (89 mM Tris borat, 89 mM borova kislina, 2mM EDTA),
- zmes fragmentov DNA znanih velikosti: 100 bp DNA Ladder, 1 μ g/ μ L, (Invitrogen, Velika Britanija)
- elektroforezni nosilec in glavniček

2. 5. 2 Postopek

Pripravili smo agarozni gel (1 %), tako da smo v erlenmajerico zatehtali 1,2 g agaroze, jo raztopili v 120 mL pufru TBE in segrevali do vrenja v mikrovalovni pečici. Po ohlajanju smo raztopini agaroze dodali 6,5 μ L etidijevega bromida, premešali ter prelili v nosilec z glavničkom. Po nastanku agaroznega gela smo glavniček odstranili, pri čemer so nastale vdolbinice za nanos vzorcev. Strjeni agarozni gel smo skupaj z nosilcem potopili v pufer TBE v elektroforezni kadički tako, da je bil v celoti prekrit s pufrom. V vdolbinice smo nanašali po 15 μ L vzorca in kontrolnih vzorcev. V prvo vdolbinico smo odpipetirali 15 μ L zmesi fragmentov DNA znanih velikosti, nato dva kontrolna vzorca sledili so posamezni vzorci. Nanašalnega barvila pri nanosu na gel nismo dodali, ker ga vsebuje že sama reakcijska mešanica. Elektroforeza je potekala 45 minut pri toku 100 mA. Po končani elektroforezi smo agarozni gel presvetlili z UV-svetlobo ($\lambda=300$ nm). Opazovanje DNA je omogočal etidijev bromid, ki se je vgradil med baze DNA in fluoresciral svetlobo valovne dolžine okoli 460 nm. To je območje vidne svetlobe, zato fluorescenco vidimo s prostim očesom.

S pomočjo označevalca velikosti odsekov DNA, ki smo ga dodali v prvo vdolbinico, smo ocenili velikost ločenih odsekov DNA. Manjše molekule potujejo hitreje kot velike zaradi difundiranja v majhne pore gela, skozi katere velike molekule ne morejo in na ta način potujejo počasneje.

S kamero (Gel Doc XR, Nemčija) smo gel slikali in sliko prenesli v računalnik.

* Etidijev bromid je toksičen in mutagen, zato je potrebno previdno delo in je obvezna uporaba rokavic in skrb za odpadni material.

V vsaki sobi delo poteka v zaščitni mikrobiološki komori. Zaščitimo se tako, da pri delu uporabljamo rokavice, ki jih po potrebi menjamo in zaščitno haljo, ki jo po delu pustimo v laboratoriju. Odpadke odlagamo v vrečo, ki jo po delu zapremo in odnesemo v pomivalnico. Po končanem delu v vsaki sobi posebej vse površine in pipete obrišemo s 70 % alkoholom in v komori prižgemo UV-luč. Pred odhodom domov izklopimo UV-luč in komoro ter preverimo ali smo v vseh treh sobah izklopili aparate in počistili za seboj.

6 Statistični test

6.1 Cohenov kappa test korelacije

Za ugotovitev ujemanja metode aglutinacije na stekelcu in molekularne metode PCR smo izvedli Cohenov kappa test. Ta test se uporablja za primerjavo metod. S tem testom smo hoteli oceniti kako dobro je ujemanje naših metod. Kappa test smo izvedli v statističnem programu SPSS 13.0. Kappa koeficient ima vrednosti med 0 in +1, pri čemer 0 pomeni da ujemanja med dvema metodama ni, ena pa, da je ujemanje odlično (37). Vseh vzorcev je bilo 105. Pri izračunavanju kappa testa smo pri vseh vzorcih upoštevali še pozitivne kontrole, tako da je bilo končno število vzorcev pri izračunu 112.

IV REZULTATI IN RAZPRAVA

Nadzor nad boleznimi z invazivnimi sevi *H. influenzae* v obdobju cepiva *Hib* je pomemben tako za spremljanje učinkovitosti cepiva kot za spremljanje epidemiologije invazivnih sevov bakterije. Pred uvedbo konjugiranega cepiva je bila ta patogena bakterija pomemben povzročitelj hudih otroških invazivnih obolenj. Konjugirano cepivo prepreči nosno-žrelno kolonizacijo bakterije (11). V nekaterih državah poročajo o ponovnem pojavu *Hib* pri cepljenih otrocih. Nedavne študije omenjajo, da je sedaj za večino bolezni povzročenih s *H. influenzae* odgovorna nekapsulirana *Hi* (39). V Sloveniji, kjer živi približno 2 milijona ljudi (~ 280.000 otrok mlajših od 15 let) se epidemiološko stanje invazivnih bolezni povzročenih s *H. Influenzae* spremlja od leta 1993 (40).

Po Zakonu o nalezljivih boleznih je potrebno bolezni, ki jih lahko preprečimo s cepivom, obvezno javiti neposredno na Inštitut za varovanje zdravja. Vsi medicinski mikrobiološki laboratoriji v Sloveniji pošiljajo izolate v referenčne laboratorije inštituta, kjer izvedejo serotipizacijo izolatov in določijo občutljivost za antibiotike. Vse invazivne seve *H. influenzae* shranijo ter ovrednotene rezultate pošljejo nazaj v matični medicinski laboratorij.

Ker je nekapsulirana *Hi* postal pogost povzročitelj invazivnih bolezni, je narasla potreba po zanesljivih rezultatih serotipizacije. Podatki iz literature nam prikazujejo, da se je incidenca bakterije *H. influenzae* in njena epidemiologija po uvedbi cepiva izredno spremenila, in ravno zato je potrebno stalno spremljanje invazivnih sevov *H. influenzae* v državi, za kar pa potrebujemo ustrezne tipizacijske metode.

Zato smo v diplomski nalogi primerjali metodo aglutinacije na stekelcu in molekularno metodo PCR za dokazovanje tipov *H. influenzae* v vzorcih. Na Inštitutu za varovanje zdravja Republike Slovenije kot primarno metodo za tipizacijo invazivnih sevov bakterije *H. influenzae* uporabljajo metodo aglutinacije na stekelcu. Ta metoda je veliko hitrejša, cenejša in enostavnejša kot metoda PCR, vendar pri nekaterih sevih bakterije zaradi možnih navzkrižnih reakcij ni vedno dovolj jasna, da bi se lahko opredelili za določen serotip. Ima tudi druge pomankljivosti kot so manjša specifičnost kot molekularna metoda PCR ter nezmožnost določevanja serotipa b- (sicer ima zapis za kapsulo tipa b, ki pa je ne izraža).

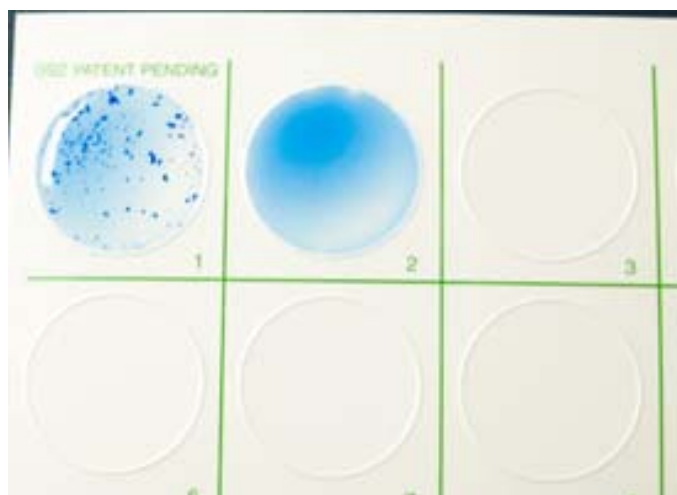
Želeli smo ugotoviti ujemanje metode aglutinacije na stekelcu z metodo molekularne PCR in v ta namen analizirali 105 vzorcev invazivnih izolatov bakterije *H. influenzae* (priloga 1).

1 Dokazovanje in tipizacija okužb s *H. influenzae* z metodo aglutinacije na stekelcu

Metodo aglutinacije na Inštitutu za varovanje zdravja uporabljajo kot rutinsko metodo za tipizacijo *H. influenzae*. Prednosti te metode so nizka cena, kratek čas analize ter enostavna izvedba, slabosti pa nizka občutljivost in specifičnost ter možnost navzkrižnih reakcij in avtoaglutinacije. To pomeni, da dobljeni rezultati niso dovolj zanesljivi. Zato so se odločili, da v rutinsko delo uvedejo še molekularno metodo PCR, katere prednost je visoka specifičnost in na ta način preverijo rezultate metode aglutinacije na stekelcu. Metoda PCR je precej dražja od metode aglutinacije, zato naj bi se s to metodo potrjevalo le rezultate aglutinacije, pri katerih le-ta ni bila dovolj, da bi se lahko opredelili za določen serotip.

Z metodo aglutinacije na stekelcu so predhodno analizirali 105 vzorcev bakterije *H. influenzae*, pridobljenih iz krvi ali likvorja. Vsakemu vzorcu so s pomočjo monovalentnih in polivalentnih protiteles določili tip bakterije a–f. Vzorce, ki niso aglutinirali so potrdili kot nekapsulirane.

Rezultati kažejo, da so od 105 vzorcev, v katerih je bila dokazana prisotnost bakterije *H. influenzae*, bila z metodo aglutinacije določena 2 vzorca tipa a, 16 vzorcev tipa b, 2 vzorca tipa c, 5 vzorcev tipa d, 3 vzorci tipa f in 77 vzorcev nekapsuliranih (Preglednica IX). *H. influenzae* tipa e ni bil določen v nobenem vzorcu.



Slika 15: Prikaz pozitivne (levo) in negativne (desno) reakcije aglutinacije

2 Dokazovanje in tipizacija okužb s *H. influenzae* z molekularno metodo PCR

Z namenom potrditve rezultatov aglutinacije na stekelcu so se odločili za uvedbo molekularne metode PCR v rutinsko delo. Ta metoda je dražja, daljša in zahtevnejša od aglutinacije vendar referenčni laboratorij je laboratorij kamor vzorce, z namenom tipizacije pošiljajo vsi mikrobiološki laboratoriji po Sloveniji, zato morajo biti dobljeni rezultati pravilni in predvsem zanesljivi.

105 vzorcev, predhodno tipiziranih z metodo aglutinacije, smo nato tipizirali še z molekularno metodo PCR. Iz vzorcev smo najprej izolirali bakterijsko DNA z avtomatizirano metodo za izolacijo DNA. V vseh izolatih smo nato dokazovali prisotnost genov *ompP2* in *bexA* ter posamezne tipno specifične gene bakterije *Hi*, in sicer *cap a-f*. Bakterijski izolat najprej testiramo na prisotnost gena *ompP2*, s čimer potrdimo, da gre za bakterijo *H. influenzae*. Gen *ompP2* vsebujejo vsi tipi bakterije *H. influenzae* in nam služi kot notranja kontrola. Nato izolat testiramo še na prisotnost gena *bexA*, s čimer dokažemo prisotnost kapsule na površini bakterije. Gen *bexA* vsebujejo le kapsulirane bakterije *H. influenzae*. Vse izolate testiramo tudi na prisotnost gena *cap b*, ki v primeru pozitivne reakcije dokazuje, da je to serotip b, v primeru negativne reakcije *bexA* pa, da je serotip b-. Vsem izolatom, ki so bili *bexA* pozitivni pa v nadaljevanju določimo serotip s posameznimi reakcijami PCR: *cap a*, *cap b*, *cap c*, *cap d*, *cap e*, *cap f* (Priloga 1).

Po končani reakciji PCR vzorce prenesemo na agarozni gel in izvedemo elektroforezo, da ugotovimo prisotnost ali odsotnost ustreznih produktov PCR, ki predstavljajo pomnožene odseke DNA zgoraj opisanih genov.

Primer rezultata metode PCR pri dokazovanju tipov *H. influenzae*

Po končani elektroforezi gel presvetlimo z UV-lučjo in na ta način ovrednotimo rezultat kot pozitiven oziroma negativen glede na prisotnost odsekov DNA ustrezne dolžine.

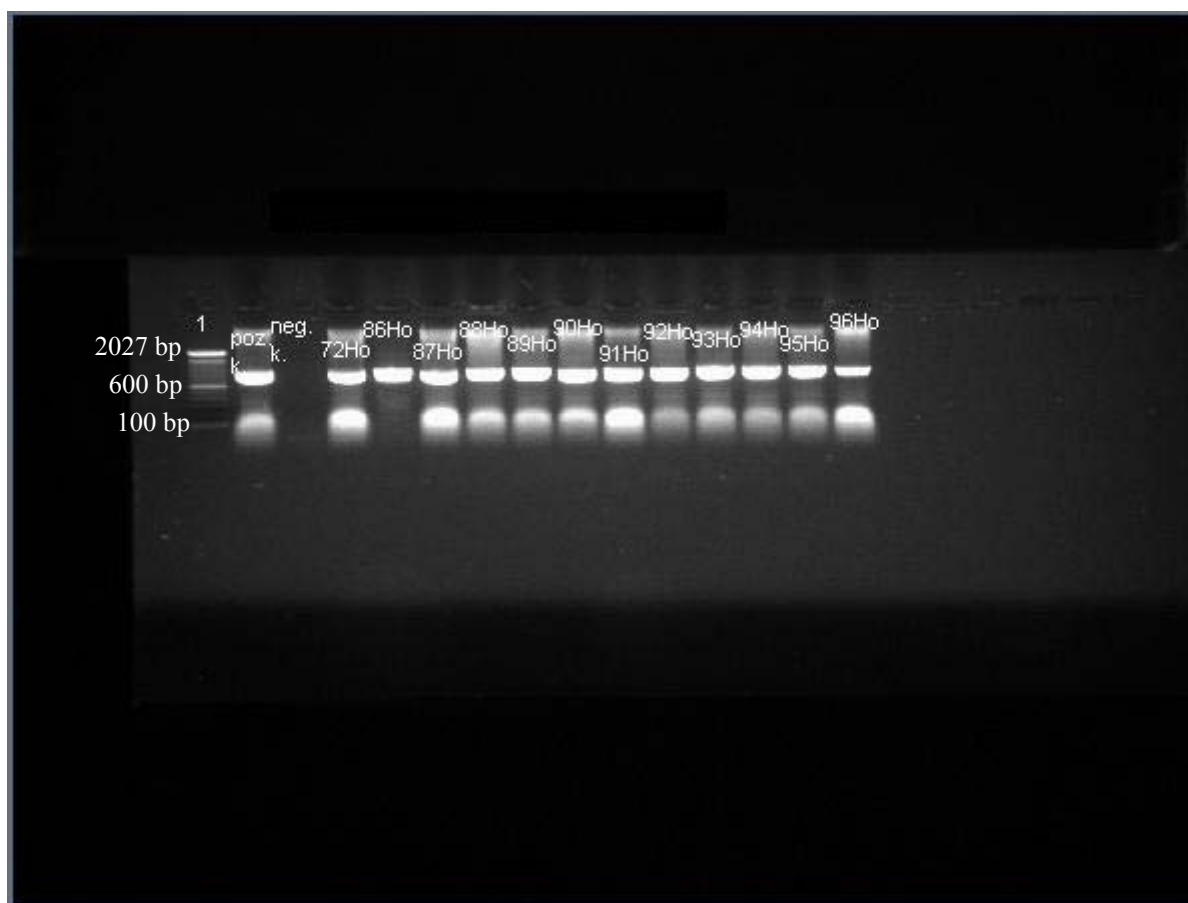
Pozitivna reakcija pomeni, da je v gelu viden pomnoženi odsek ustrezne dolžine.

V preglednici VIII so prikazani podatki o velikosti odsekov posameznih genov (33).

Preglednica VIII: Velikost genov

Gen	Dolžina odseka gena
<i>ompP2</i>	1000 bp
<i>bexA/VK</i>	345 bp
<i>cap a</i>	250 bp
<i>cap b</i>	480 bp
<i>cap c</i>	250 bp
<i>cap d</i>	150 bp
<i>cap e</i>	1350 bp
<i>cap f</i>	345 bp

- Določanje gena *ompP2*



Slika 16: Ugotavljanje prisotnosti gena *ompP2* v vzorcih

Legenda:

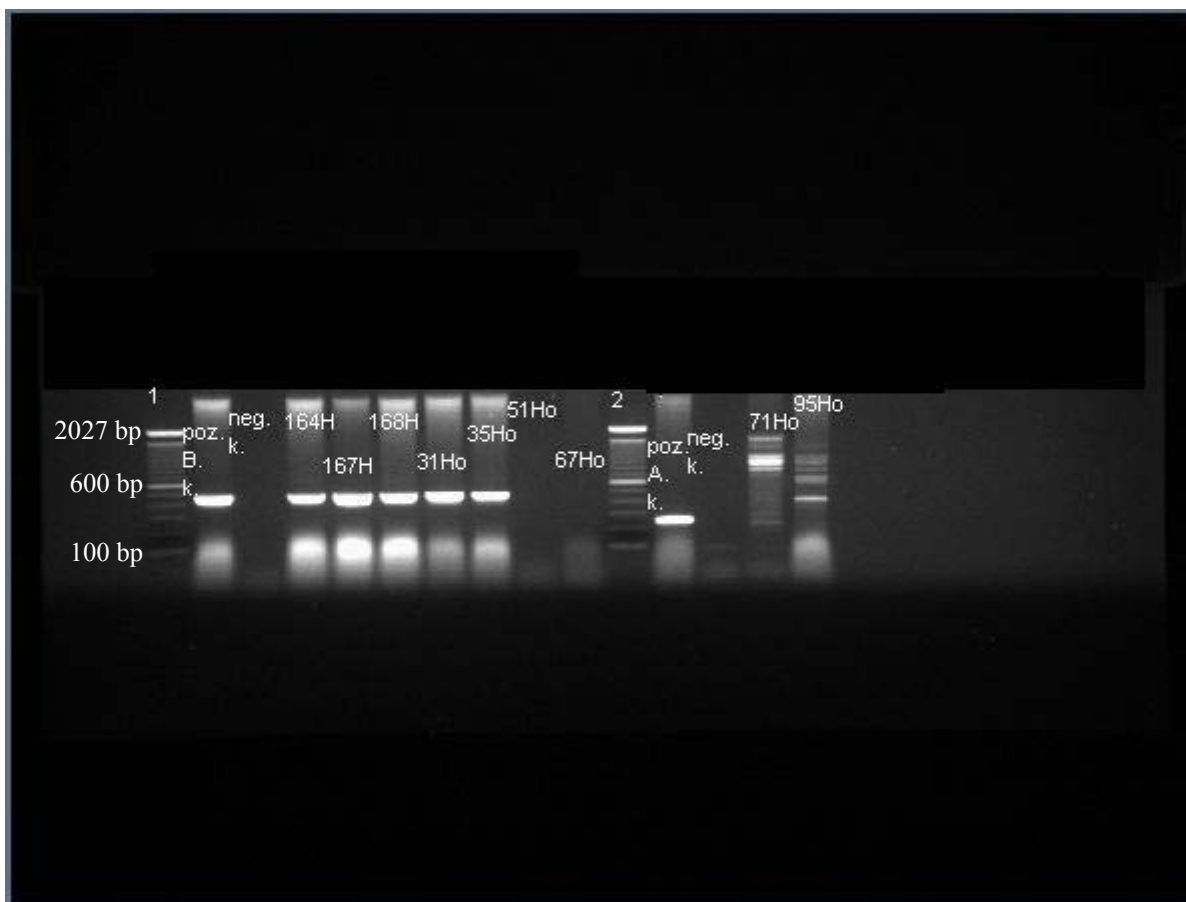
1– označevalec velikosti baznih parov

Poz. k.– pozitivna kontrola

Neg. k.– negativna kontrola

72 Ho-96Ho –vzorci

- Določanje gena *cap a* in *cap b*



Slika 17: Ugotavljanje prisotnosti genov *cap a* in *cap b* v vzorcih

Legenda:

1, 2 – označevalec velikosti baznih parov

Poz.B.k– pozitivna kontrola za *H. influenzae* tipa b

Poz. A.k – pozitivna kontrola za *H. influenzae* tipa a

Neg.k.– negativna kontrola

164H- 67 Ho– vzorci, ki jim določamo gen *cap b*

71 Ho- 95Ho– vzorca, ki jima določamo gen *cap a*

Pri pozitivni reakciji, kar pomeni prisotnost pomnoženega odseka ustreznega gena, pod UV-lučjo na gelu vidimo belo liso, ki je v isti višini kot pozitivni kontrolni vzorec, kar pomeni da gre za enako velik fragment DNA. Negativna reakcija pa pomeni, da lise ni, oziroma da lisa ni v isti višini kot lisa v pozitivnem kontrolnem vzorcu. V drugem primeru gre za nespecifično reakcijo PCR oziroma za pomnoževanje nespecifičnega odseka DNA. Pri določevanju gena *ompP2* vzorcem (slika 16) vidimo, da so vsi vzorci gen *ompP2* pozitivni. Tako pri pozitivnem kontrolnem vzorcu kot tudi pri vzorcih vidimo belo liso pri velikosti 1000 bp, kar ustreza velikosti odseka gena *ompP2*. Da lahko ocenimo velikost fragmentov DNA se na začetku gela dodaja označevalec velikosti fragmentov DNA (angl. DNA Ladder).

Slika 17 prikazuje ugotavljanje prisotnosti gena *cap a* in *cap b* v bakterijski DNA. Gen *cap b* je velik 480 bp, manjši gen *cap a* pa 250 bp. V prvem delu gela vidimo, da je bela lisa pri pozitivnem kontrolnem vzorcu in pri vzorcih 164H, 167H, 168H, 31Ho, 35Ho prisotna na isti višini, pri velikosti 480 bp. To pomeni, da je v vseh teh prisotna *H. influenzae* tipa b. Pri vzorcih 51Ho in 67Ho bele lise ni, kar pomeni da vzorca nista *H. influenzae* tipa b. V drugem delu gela je ponovno dodan označevalec velikosti fragmentov DNA ter pozitivni kontrolni vzorec *cap a*. Opazimo, da bela lisa ni prisotna v isti višini kot pozitivni kontrolni vzorec pri velikosti 250 bp, kar pomeni, da vzorci ne vsebujejo gena *cap a*.

V vseh 105 vzorcih smo z molekularno metodo PCR določili gen *ompP2*. Gen *bexA* je bil dokazan v 16 vzorcih, kar je 15,2 %. Tem smo določili še gene *cap a-f*. Od teh 16 vzorcev so bili vsi kapsulirani, 2 (12,5 %) določena kot *H. influenzae* tipa f in 14 (87,5 %) določenih kot *H. influenzae* tipa b. V nobenem od kapsularnih *H. influenzae* nismo določili tipov a, c, d ali e. Nato smo vzorcem, ki so bili *bexA* negativni, določevali še gen *cap b*, da smo preverili, če je kateri od njih tipa b-. Tipa b- z aglutinacijo na stekelcu ni moč določiti. V našem primeru ni bil noben vzorec tipa b-.

3 Primerjava metod za dokaz in tipizacijo *H. influenzae*

Zaradi nezadostne zanesljivosti rezultatov, nizke specifičnosti, možnih navzkrižnih reakcij ter avtoaglutinacije pri metodi aglutinacije smo hoteli v rutinsko delo uvesti, sicer precej dražjo, vendar zanesljivejšo in specifičnejšo metodo PCR. Naš namen je bil predhodno

primerjati in določiti ujemanje rezultatov obeh metod ter ugotoviti, v kolikšnem deležu bomo z novo (molekularno) metodo izboljšali tipizacijo bakterije *H. influenzae*. Primerjali smo rezultate metod, ki jih prikazuje preglednica IX.

Preglednica IX: Rezultati tipizacije *H. influenzae* z metodo aglutinacije ter molekularno PCR pri 105 invazivnih izolatih

PCR\aglutinacija	a	b	c	d	e	f	N.T.	Skupaj
a	0	0	0	0	0	0	0	0
b	0	14	0	0	0	0	0	14
c	0	0	0	0	0	0	0	0
d	0	0	0	0	0	0	0	0
e	0	0	0	0	0	0	0	0
f	0	0	0	0	0	2	0	2
N.T.	2	2	2	5	0	1	77	89
Skupaj	2	16	2	5	0	3	77	105

Test korelacije

Za ugotovitev ujemanja metode aglutinacije na stekelcu in molekularne metode PCR smo izvedli Cohenov kappa test, ki se uporablja za določanje ujemanja med metodami. S tem testom smo hoteli oceniti, kako dobro je ujemanje naših metod. Test kappa smo izvedli v statističnem programu SPSS 13.0. Koeficient kappa ima vrednosti med 0 in +1, pri čemer 0 pomeni da ujemanja med dvema metodama ni, ena pa, da je ujemanje odlično (37). Vseh vzorcev je bilo 105. Pri izračunavanju testa kappa smo pri vseh vzorcih upoštevali še pozitivne kontrole, tako da je bilo končno število vzorcev pri izračunu 112. Izračun koeficienta kappa je znašal 0,744 ($p < 0,0001$), kar pomeni dobro ujemanje, glede na referenčne vrednosti prikazane v preglednici X.

Iz preglednice IX je razvidno, da je bilo 77 izolatov določenih kot nekapsulirani *H. influenzae* tako z aglutinacijsko metodo kot z metodo PCR. To pomeni 100 % ujemanje nekapsuliranih *Hi*. Od 16 izolatov, ki jim je bil z aglutinacijo dokazan tip b, se jih je 87,5 % (14/16) ujemalo z metodo PCR, 2 izolata pa sta bila določena kot N.T. Do tega neujemanja je lahko prišlo zaradi nespecifičnosti protiteles pri aglutinacijski metodi.

Do popolnega neujemanja je prišlo pri tipih a, c, d. Z aglutinacijsko metodo določeni vzorci tipa a (2 vzorca), tipa c (2vzorca), tipa d (5 vzorcev) so bili z metodo PCR določeni kot *N.T.*. Neujemanje je bilo torej različno za različne tipe kapsuliranih genov, in sicer:

- 100 % (2/2) neujemanje za tipe a, c in d
- 33,3 % (1/3) neujemanje za tip f
- 12,5 % (2/16) neujemanje za tip b

V celoti gledano (ne glede na kapsularni tip) je bilo neujemanje rezultatov med aglutinacijsko metodo in metodo PCR 11,4 % oziroma 12 vzorcev je bilo z aglutinacijsko metodo napačno tipiziranih.

Posebej pomembno je neujemanje pri 2 izolatih tipa b, saj je bil le-ta v preteklosti najbolj pogost povzročitelj hudih invazivnih obolenj. Leta 1999 je bilo uvedeno obvezno cepljenje proti *H. influenzae* tipa b, zato velja pojav tega tipa za posebno pomembnega. Ostali kapsularni tipi se ne pojavljajo pogosto; od teh pa je najbolj izstopal *H. influenzae* tipa d, ki se v petih primerih ni ujema s PCR.

V članku (41) so primerjali metode PCR v realnem času, klasično metodo PCR ter metodo aglutinacije. Stopnja ujemanja med metodo PCR in aglutinacijo je bila 50 % (7/14). Do največjega neujemanja je pri njih prišlo pri *H. influenzae* tipa b 50 % (4/8).

Mislimo, da bi bilo treba aglutinacijo pri tipih, pri katerih je prišlo do popolnega neujemanja ponoviti. Možen vzrok za neujemanje bi lahko bila napačna izvedba aglutinacije, avtoaglutinacija ali navzkrižne reakcije protiteles, ki se pojavi ob nizki specifičnosti protiteles, uporabljenih pri aglutinacijski metodi.

Preglednica X: Referenčne vrednosti koeficienta kappa (38)

Kappa	Ujemanje
≤ 0	ni ujemanja
0,01–0,20	slabo ujemanje
0,21–0,40	šibko ujemanje
0,41–0,60	precejšnje ujemanje
0,61–0,8	dobro ujemanje
0,81–0,92	zelo dobro ujemanje
0,93–1,00	odlično ujemanje

Na osnovi statističnega Cohenovega testa kappa smo ugotovili, da je ujemanje naših metod dobro, kar dokazuje vrednost testa kappa 0,744.

S tem zaključujemo, da metoda aglutinacije na stekelcu, ki je cenejša in manj zahtevna metoda, lahko pa v 11,4 % (kot v našem primeru) daje lažne rezultate, zato predlagamo, da se uporablja v laboratorijih izključno kot presejalni test (angl. screening test), molekularna PCR, ki je bolj specifična, pa se v vseh referenčnih laboratorijih uporablja kot potrditveni test poleg aglutinacije. Menimo, da se metoda aglutinacije na stekelcu lahko izvaja v laboratorijih do meje, ko je pojav aglutinacije lepo viden, v primeru, ko pa so rezultati dvoumni, se take vzorce pošlje v laboratorije, kjer jih preverijo še z molekularno metodo PCR.

Ob tem je pomembno omeniti, da se je pojavnost *H. influenzae* tipa b po uvedbi cepljenja konec leta 1999 v Sloveniji močno spremenila. Ostalih kapsularnih tipov skorajda ni opaziti. Ugotovili so, da je uvedba cepiva *Hib* konec leta 1999 vodila v spremembe v epidemiologiji invazivnih sevov *H. influenzae*. Incidenca invazivnih sevov *H. influenzae* tipa b se je po uvedbi cepiva, pri otrocih, mlajših od 14 let, zmanjšala za 6- krat in dosegla vrednost 1,6/100.000 otrok na leto (14). Kot rezultat upadanja bolezni *Hib* zaradi uvedbe cepiva je postal najbolj pomemben povzročitelj invazivnih bolezni v Sloveniji nekapsulirani *Hi*. Pri spremljanju in nadzoru invazivnih sevov je zelo pomembno dobiti pravilne rezultate serotipizacije, posebno pri razlikovanju med *Hib* in ostalimi serotipi ali nekapsuliranimi *Hi*.

V SKLEP

Namen naloge je bil ugotoviti ujemanje metode aglutinacije na stekelcu in molekularne metode PCR za določevanje serotipov *H. influenzae*. Tipizirali smo 105 invazivnih izolatov bakterije *H. influenzae* in ugotovili, da:

1. je aglutinacija enostavnejša od PCR, hitrejša in cenejša;
2. sta obe metodi primerni za tipizacijo bakterije *H. influenzae*, vendar lahko dobimo z aglutinacijsko metodo napačne rezultate v 11,4 % (12/105);
3. je najslabše ujemanje med metodama pri tipih a, c in d (100 % neujemanje) in pri tipu f (33,3 % neujemanje);
4. je pri tipu b, ki je klinično najpomembnejši tip *H. influenzae*, neujemanje metod 12,5 % (2/16);
5. korelacijski koeficient kappa znaša 0,744, kar kaže na dobro ujemanje rezultatov.

Na osnovi rezultatov lahko priporočamo za tipizacijo bakterije *H. influenzae*, uporabo metode aglutinacije na stekelcu kot presejalni test, molekularno metodo PCR pa kot potrditveni test v referenčnih laboratorijih.

VI LITERATURA

1. Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Michael A. Pfaller, Robert H. Tenover: Manual of clinical microbiology, 8th ed., American society for microbiology, Washington, 2003, 623–632
2. Gubina M., Ihan A.: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 335-341, 167-170
3. Jawetz, Melnick & Adelberg`s: Medical microbiology, 18th ed., Appleton& Lange, East Norwalk, 1991, 237–239
4. Kenneth: Haemophilus influenzae and Hib meningitis (dostopano 23.8.2008) URL=«
<http://www.textbookofbacteriology.net/haemophilus.html>»
5. URL=<http://www.emedicine.com/ped/fulltopic/topic910.htm#section~Introduction>
(dostopano 20. 8. 2008)
6. Marica Marolt Gomišček, Alenka Radšel Medvešček: Infekcijske bolezni, Tangram, Ljubljana, 2002, 49–51
7. D J Sikkema and T F Murphy: Molecular analysis of the P2 porin protein of nontypeable Haemophilus influenzae, 1992, 60(12): 5204–5211.
8. Prozorov A.A.: Recombinational rearrangements in bacterial genome and bacterial adaptation to the environment, Microbiology, 2001, 70: 501-511
9. Howard A.J.: Haemophilus V: Medical microbiology: a guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control. Edinburg, Churchill Livingstone, 1996, 373-379
10. Kraigher A, Hočevar-Grom A, Klavs I, Sočan M et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2000, Zdrav. Var 2001, 40: suppl 4.

11. Peltola H.: Haemophilus influenzae tip b disease and vaccination in Europe; lessons learned. *Pediatr. infect. Dis.*, 1998, 17: S126-32
12. Adams W.G., K.A. Deaver, S.L. Cochl, B.D. Plikaytis, E.R. Zell, C.V. Broome and J.D. Wenger: Decline in childhood Haemophilus influenzae type b (Hib) disease in the Hib vaccine era, *JAMA*, 1993, 269: 221-226
13. Eskola J., H. Peltola, H. Kayhty, A.K. Takala and P.H. Makela: Finnish efficacy trials with Haemophilus influenzae type b vaccines, *J. Infect. Dis.*, 1992, 165 (Suppl. 1):137-381
14. Paragi M: Razširjenost serotipov pri invazivnih obolenjih, ki jih pri otrocih v Sloveniji povzročajo Haemophilus influenzae Neisseria meningitidis in Streptococcus pneumoniae. Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 1996.
15. Paragi M, Kraigher A, Čižman M. Pnevmonoki-epidemiologija in možnosti uporabe konjugiranih cepiv v Sloveniji, 2. slovenski kongres preventivne medicine, Portorož 1998.
16. Čižman M, Paragi M, Gubina M, Kuhar-Jovan N, Pokorn M in Slovenska skupina za preučevanje meningitisa. Epidemiologija invazivnih okužb s Haemophilus influenzae tip b pri otrocih v Sloveniji, 1993-1995. *Zdrav Var* 1997, 66: 469-72
17. Marica Marolt-Gomišček: Antibiotiki in kemoterapevtiki v vsakdanji praksi, Tangram, Ljubljana, 2002: 200-201
18. Bailey & Scott's: Diagnostic microbiology, 9th ed., Mosby, USA, 1994: 89, 226, 415-416, 28-30.
19. Haemophilus influenzae tip b URL=«
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs294/en/>« (dostopano 3. 9. 2008)

20. Haemophilus influenzae, Hib vaccine: Wikipedia
URL=http://en.wikipedia.org/wiki/Haemophilus_influenzae (dostopano 23. 8. 2008)
21. T.A. Brown: Genomes, 2nd ed., 2002; 33-5, 239-60, 340-6, 391-402
22. URL=<http://www.freepatentsonline.com/6528289-0-large.jpg> (dostopano 5. 4. 2009)
23. QIAamp[®] DNA Mini Kit and QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit Handboock. 2003. Hilden, QIAGEN.
24. MagNA Pure LC Operator's Manual Version 3.0., 2004. Mannheim, Roche Molecular Biochemicals
25. Petra Čuden: Kvantitativna in kvalitativna primerjava DNA izoliranih iz bakterije N.meningitidis s klasično in avtomatizirano metodo, diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2005: 36
26. Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K.: Verižna reakcija s polimerazo- nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji, Medicinski razgledi, Ljubljana, 1994, 33: 379-400
27. Verižna reakcija s polimerazo
URL=http://sl.wikipedia.org/wiki/Veri%C5%BEna_reakcija_s_polimerazo (dostopano 5. 4. 2009)
28. Srovin T: Razvoj nove diagnostične metode za hitro in zanesljivo ugotavljanje mutacije CCR5 Δ 32. Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2001, 20-6
29. Kroll, J.S., S. Ely, and E.R. Moxon: Capsular typing of Haemophilus influenzae with a DNA probe. Mol. Cell. Probes, 1991, 5: 375- 379
30. K.Breskvar, B.črešnar, V.Dolžan, A.Plemenitaš, D.Rozman, M.Žakelj Mavrič: Biokemija II, navodila za vaje; Ljubljana 2002, 65-68

31. Roche Molecular Biochemicals: MagNa Pure LC System, Version 1, Roche Diagnostic, Germany, Instruction manual, november 2002
32. Neobjavljeni podatki IVZ (Paragi, Kastrin)
33. Workshop EU-IBIS, 22.03.2006, delovna navodila
34. R.J. van Ketel, B. de Wever and L. van Alphen. Detection of Haemophilus influenzae in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. The Journal of Medical Microbiology, 1990, Vol. 33, Issue 4 271-276.
35. Hobson RP, Williams A, Rawal K, Pennington TH, Forbes KJ.: Incidence and spread of Haemophilus influenzae on an Antarctic base determined using the polymerase chain reaction., *Epidemiol. Infect.*, February, 1995; 114 (1): 93-103
36. T.J.Falla, D.W.Crook, L.N.Brophy, D.Maskell, J.S.Kroll and E.R.Moxon. PCR for capsular typing of Haemophilus influenzae, *J.Clin Microbiol.*, October, 1994, 32 (10): 2382-2386
37. Agreement between Categorical Measurements: Kappa Statistics
URL=<http://www.dmi.columbia.edu/homepages/chuangj/kappa/> (dostopano 15. 3. 2009)
38. Byrt T. How good is that agreement? *Epidemiology* 1996, 7:561
39. Bajanca P., M. Caniça, and the Multicenter Study Group. 2004. Emergence of Nonencapsulated and Encapsulated Non-b-Type Invasive Haemophilus influenzae Isolates in Portugal (1989-2001). *J Clin Microbiol.* 42:807–810.

40. Paragi M., J. Kolman, A. Kraigher, M. Cizman, M. Gubina and H. Ribic. 2003. Possibility of application of new pneumococcal conjugate vaccines in children in Slovenia. *Vaccine*. 21: 4708–14

41. Younes Maaroufi, Jean-Marc De Bruyne, Corine Heymans, francoise Crokaert: Real-Time PCR for Determining Capsular Serotypes of *Haemophilus influenzae*, july 2007, p.2305-2308, vol.45, No. 7, American Society for Microbiology

PRILOGA 1

Številka vzorca	Rezultat aglutinacije	Gen <i>ompP2</i>	Gen <i>bexA</i>	<i>cap a</i>	<i>cap b</i>	<i>cap c</i>	<i>cap d</i>	<i>cap e</i>	<i>cap f</i>
71Ho	a	+	-	-	-	-	-	-	-
95Ho	a	+	-	-	-	-	-	-	-
164H	b	+	+	-	+	-	-	-	-
165H	b	+	+	-	+	-	-	-	-
167H	b	+	+	-	+	-	-	-	-
168H	b	+	+	-	+	-	-	-	-
170H	b	+	+	-	+	-	-	-	-
171H	b	+	+	-	+	-	-	-	-
172H	b	+	+	-	+	-	-	-	-
31Ho	b	+	+	-	+	-	-	-	-
33Ho	b	+	+	-	+	-	-	-	-
34Ho	b	+	+	-	+	-	-	-	-
35Ho	b	+	+	-	+	-	-	-	-
38Ho	b	+	+	-	+	-	-	-	-
70Ho	b	+	+	-	+	-	-	-	-
78Ho	b	+	+	-	+	-	-	-	-
51Ho	b	+	-	-	-	-	-	-	-
67Ho	b	+	-	-	-	-	-	-	-
63Ho	c	+	-	-	-	-	-	-	-
69Ho	c	+	-	-	-	-	-	-	-
173H	d	+	-	-	-	-	-	-	-
177H	d	+	-	-	-	-	-	-	-
43Ho	d	+	-	-	-	-	-	-	-
73Ho	d	+	-	-	-	-	-	-	-
74Ho	d	+	-	-	-	-	-	-	-
193H	f	+	+	-	-	-	-	-	+
75Ho	f	+	+	-	-	-	-	-	+
54Ho	f	+	-	-	-	-	-	-	-
163H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
166H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
169H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
174H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
175H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
176H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
178H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
180H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
181H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
182H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
183H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
184H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
185H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
186H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-

Številka vzorca	Rezultat aglutinacije	Gen <i>ompP2</i>	Gen <i>bexA</i>	<i>cap a</i>	<i>cap b</i>	<i>cap c</i>	<i>cap d</i>	<i>cap e</i>	<i>cap f</i>
187H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
188H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
189H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
190H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
191H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
192H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
194H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
195H	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
36Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
37Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
39Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
41Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
42Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
44Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
45Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
46Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
47Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
48Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
49Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
50Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
53Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
55Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
56Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
57Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
58Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
59Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
61Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
62Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
64Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
65Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
66Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
68Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
72Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
76Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
77Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
79Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
80Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
81Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
82Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
83Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
84Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
85Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
86Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
87Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
88Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-

Številka vzorca	Rezultat aglutinacije	Gen <i>ompP2</i>	Gen <i>bexA</i>	<i>cap a</i>	<i>cap b</i>	<i>cap c</i>	<i>cap d</i>	<i>cap e</i>	<i>cap f</i>
89Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
90Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
91Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
92Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
93Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
94Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
96Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
97Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
98Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
99Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
100Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
101Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
102Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
103Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
104Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
105Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
106Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-
108Ho	N.T.	+	-	-	-	-	-	-	-

