

# Metody genotypowe różnicowania patogennych szczepów *Escherichia coli* stosowane w epidemiologii molekularnej\*)

JACEK OSEK

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Osek J.

## Genotyping methods for differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains used in molecular epidemiology

### Summary

The application of molecular techniques for the identification and differentiation of *E. coli* strains has provided a powerful set of new tools that allow more sensitive and specific determination of both the source of infection and mode of transmission of these pathogens. New molecular biology methods used for epidemiological characterization of *E. coli* also make it possible to distinguish the pathogenic strains from the large background of nonpathogenic isolates and to determine that the pathogen is associated with the disease. Numerous methods which are based on DNA analyses have been developed and used in molecular epidemiology studies. These techniques include analyses of both plasmid and chromosomal DNA. Among them, PFGE as well as RAPD and ERIC PCR tests provide quick and reproducible results which may be analyzed by different computer programs. The manner in which the typing results are interpreted and applied is as important as particular typing method employed.

**Keywords:** *E. coli*, DNA analyses, molecular epidemiology.

Używane do tej pory metody klasyfikacji i różnicowania mikroorganizmów, zwłaszcza tych, które są odpowiedzialne za wystąpienie schorzeń epidemiologicznych, nie zawsze pozwalają na postawienie szybkiej i jednoznacznej diagnozy jak również często nie pozwalają na właściwe określenie źródła i/lub drogi szerzenia się infekcji. Szczególne znaczenie posiada odróżnienie izolowanych z przypadków chorobowych szczepów *E. coli* od występujących powszechnie szczepów niechorobotwórczych, będących składnikiem normalnej flory jelitowej, jak również od tych, które będąc potencjalnie patogenne, nie biorą bezpośredniego udziału w badanym schorzeniu epidemiologicznym. Stosowane metody fenotypowe, np. typowanie serologiczne, pozwalają na oznaczenie obecności pewnych grup serologicznych *E. coli*, uważanych za patogenne lub potencjalnie chorobotwórcze. Klasycznym przykładem może być tu izolacja szczepów grupy O157 z przypadków krwawej biegunki u ludzi lub serotypów O138:K81, O139:K82 i O141:K85 w przebiegu choroby obrzękowej świń (25, 33, 45). Wykazanie szczepów tych charakterystycznych serotypów wskazuje z dużym prawdopodobieństwem na ich udział w etiolo-

gii ww. schorzeń. Metoda typizacji serologicznej, stosunkowo szybka i łatwa do wykonania, posiada jednak szereg istotnych ograniczeń, związanych np. z dostępnością do swoistych przeciwciał. Często również izolowanych z przypadków chorobowych szczepów *E. coli* nie udaje się zaliczyć do żadnej ze znanych grup serologicznych, gdyż nie reagują one z używanymi surowicami diagnostycznymi lub wykazują efekt autoaglutynacji.

Trudności z użyciem niektórych testów fenotypowych do identyfikacji szczepów *E. coli* oraz rozwój szeroko rozumianej biologii molekularnej, a zwłaszcza technik opartych na analizie kwasu DNA, wpływają na coraz szersze wprowadzanie do praktyki mikrobiologicznej nowoczesnych metod genotypowych, pozwalających na dokładniejszą charakterystykę badanych szczepów bakteryjnych jak też na określenie ich stopnia pokrewieństwa klonalnego. W pracy tej przedstawiono i krótko scharakteryzowano obecnie najczęściej używane do tego celu techniki.

### Analiza profilu plazmidowego

Jest to historycznie pierwsza z metod genotypowych, użytych w badaniach mikrobiologicznych i epidemiologicznych patogennych szczepów *E. coli*. Opisana w latach 70-tych przez Meyersa i wsp. (37) technika ta doczekała się szeregu modyfikacji (1, 15, 17, 23, 26,

\*) Praca finansowana przez KBN w ramach projektu badawczego 5 PO6K 027 11.



28, 47, 65, 66). Oryginalna metoda Meyersa i wsp. (37) pozwalała na izolację całego bakteryjnego kwasu nukleinowego, z którego następnie oddzielano plazmidowy DNA wirowaniem w gradiencie chlorku cezu – bromku etydy (CsCl-EtBr). Była to trudna i czasochłonna technika, ograniczająca liczbę badanych izolatów bakteryjnych. Obecnie, dla rutynowej analizy profilu plazmidowego, większość laboratoriów używa prostych metod, pozwalających na uzyskanie wystarczającej do badań ilości DNA, pochodzącej z 1 ml bulionowej hodowli bakteryjnej (metody mini-prep) (1, 49). Są one szybkie, powtarzalne i umożliwiają równoczesną analizę wielu izolowanych szczepów *E. coli*. Metody te oparte są zwykle na lizie alkalicznej komórek bakteryjnych, opisanej po raz pierwszy przez Birnboim i Doly (5). Izolowany materiał genetyczny zawiera przede wszystkim plazmidowy DNA, znajdujący się w formie zamkniętych i skręconych cząstek CCC (Covalently Closed Circular), a więc takich, jakie są obecne w testowanych komórkach bakteryjnych *in vivo* (3, 13, 14). W procesie ekstrakcji materiału genetycznego, chromosomalny DNA ulega natomiast liniowej fragmentacji i przez to staje się możliwy do separacji od badanych cząstek plazmidowych. Podobne założenia teoretyczne izolacji plazmidowego DNA znajdują się u podstaw innej, często stosowanej metody wg Kado i Liu (32). Wyosobnione w obu metodach plazmidy poddawane są następnie separacji w procesie elektroforezy agarozowej celem oznaczenia ich liczby i masy molekularnej (15, 20, 44, 60).

Analiza profilu plazmidowego, niewątpliwie najprostsza z metod genotypowej typizacji szczepów *E. coli*, posiada jednak szereg ograniczeń. Nie znajduje m.in. zastosowania do oznaczania szczepów nie posiadających plazmidów (które np. utraciły je w trakcie izolacji lub pasażowania) lub tych, u których stwierdza się tylko jeden lub dwa plazmidy (36). Nie można również różnicować szczepów posiadających plazmidowy DNA o tej samej masie molekularnej, który jednak nie jest często identyczny pod względem sekwencji nukleotydowej (60). Niektóre plazmidy, zwłaszcza kodujące oporność na antybiotyki (plazmidy R) cechują się też zdolnością szybkiej utraty lub nabywania nowych fragmentów DNA (transpozonów), przez co ich zachowanie się w trakcie elektroforezy może być bardzo zmienne (18).

Celem bliższego różnicowania plazmidów izolowanych z różnych szczepów *E. coli*, poddaje się je trawieniu przy użyciu enzymów restrykcyjnych (endonukleaz). Enzymy te są zdolne do cięcia cząstek DNA (zarówno plazmidowego jak i chromosomalnego) w specyficznych dla nich miejscach łańcucha, określonych zwykle przez 4 do 6 nukleotydów (8). Długość rozpoznawanej przez endonukleazę sekwencji DNA ma zasadniczy wpływ na otrzymaną liczbę liniowych fragmentów kwasu nukleinowego, a tym samym liczbę prążków widocznych w żelu agarozowym. Jako

generalną zasadę przyjmuje się, iż enzym rozpoznający 4-zasadową sekwencję (np. BspI43I działający na GATC) przecina DNA częściej niż enzym mający zdolność rozpoznawania sekwencji 6-zasadowej (np. NotI działający na GGCCGC); w tym pierwszym przypadku liczba otrzymanych w wyniku trawienia fragmentów DNA będzie większa niż w drugim (8).

Enzymy restrykcyjne, rozpoznające swoiste sekwencje nukleotydowe w cząstkach CCC plazmidowego DNA, przecinają obie komplementarne nici kwasu nukleinowego, powodując powstanie szeregu liniowych fragmentów, których liczba zależy od ilości, specyficznych dla danej endonukleazy, sekwencji danego materiału genetycznego (41). Na przykład, plazmidowy kwas nukleinowy posiadający dwa swoiste dla enzymu EcoRI miejsca restrykcyjne, zostanie przecięty na dwa liniowe fragmenty, których wielkość będzie od położenia tych sekwencji na trawionym DNA. Jeśli miejsca te są blisko siebie wtedy jeden z uzyskanych fragmentów będzie relatywnie mały a drugi duży. W praktyce, sekwencji restrykcyjnych dla określonego enzymu może być na jednym plazmidzie wiele, a powstający w wyniku reakcji profil często niewyraźny, tzn. posiadający zbyt wiele prążków. Aby temu zapobiec, do trawienia plazmidowego DNA *E. coli* stosuje się tzw. rzadko tnące enzymy, tzn. takie, które rozpoznają stosunkowo rzadko występujące sekwencje nukleotydowe, np. NotI, XbaI (8, 20, 40, 50, 60).

### Analiza restrykcyjna chromosomalnego DNA

W metodzie tej do trawienia enzymatycznego używa się izolowanego chromosomalnego DNA, który jest następnie cięty przy użyciu wybranych endonukleaz (18, 36). Wynikiem reakcji enzymatycznej jest powstanie dużej liczby (często ponad 100) liniowych fragmentów DNA o wielkości od 0,5 do 50 tysięcy par zasad (bp). Fragmenty te są z kolei rozdzielane przy stałym napięciu prądu w żelu agarozowym, barwione bromkiem etydy i fotografowane w świetle UV. Różne szczepy gatunku *E. coli* posiadają różne profile restrykcyjne, będące wynikiem ilości i rozmieszczenia w chromosomie specyficznych dla endonukleaz sekwencji nukleotydowych. Podstawowym ograniczeniem tej metody są trudności w ocenie uzyskanego obrazu elektroforetycznego, będące wynikiem ogromnej liczby widocznych prążków jak też możliwość obecności w obrazie linii, pochodzących z trawienia towarzyszącego DNA plazmidowego. Metoda ta, rzadko stosowana do analizy epidemiologicznej *E. coli*, znalazła nieco szersze zastosowanie w ocenie szczepów *Campylobacter*, *Clostridium*, *Candida* (12, 21, 29).

Jak wspomniano, obraz elektroforetyczny, uzyskany przy trawieniu chromosomalnego DNA, jest zwykle bardzo złożony oraz trudny do analizy i oceny. Znacznym ułatwieniem jest wprowadzenie do tej techniki różnych sond DNA, będącymi specyficznymi se-



kwencjami nukleotydowymi, znakowanymi radioizotopem lub digoksygeniną (36, 58, 59). W metodzie, określonej nazwą analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), DNA trawiony jest określoną endonukleazą, a następnie powstałe fragmenty liniowe kwasu nukleinowego przenoszone są na membrany nitrocelulozowe lub nylonowe i poddawane hybrydyzacji z sondą molekularną. Test ten określany jest również terminem Southern blot, od nazwiska autora, który pierwszy opisał wym. technikę (52). Używając znakowanych sond DNA można łatwo oznaczyć w chromosomie bakteryjnym liczbę i położenie fragmentów restrykcyjnych, zawierających homologiczne sekwencje nukleotydowe do sekwencji zastosowanej sondy.

Jednym z pierwszych czynników patogenności szczepów *E. coli*, oznaczonych testem Southern blot, było typowanie obecności genów kodujących wytwarzanie enterotoksyn – LT (ciepłochwiejnej) i ST (ciepłostątej), a następnie na tej podstawie – klonalne różnicowanie badanych izolatów (38). Początkowo, do testów RFLP używano sond molekularnych, będących dość dużymi fragmentami genowymi. Obecnie stosuje się przeważnie krótkie sekwencje nukleotydowe, stanowiące zwykle syntetyczne oligonukleotydy wytwarzane np. metodą PCR (36). Podstawowym warunkiem jaki musi być spełniony, aby sonda DNA wykazywała skuteczne działanie, jest jej unikalna sekwencja nukleotydowa, kodująca konserwatywny fragment kwasu nukleinowego badanych szczepów *E. coli*. Taką sekwencję zawiera np. operon odpowiedzialny za syntezę rybosomalnego RNA (rRNA). Szczepy *E. coli* posiadają zwykle kilka (od 5 do 7) rybosomalnych operonów, a uzyskany w procesie hybrydyzacji obraz, zwanym rybotypem (ribotyping), składa się z 10-15 prążków, pozwalających na stosunkowo łatwą analizę i interpretację (36, 54). Szczepy *E. coli*, należące do tych samych klonów, a izolowane z różnych źródeł, dają ten sam rybotyping przez co identyfikacja ich pokrewieństwa nie sprawia trudności.

Elektroforeza pulsacyjna (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) została wprowadzona celem separacji dużych fragmentów chromosomalnego DNA, powstałych w wyniku cięcia przez endonukleazy, których nie można było rozdzielić tradycyjną elektroforezą agarozową. PFGE pozwala na analizę cząstek DNA o masie powyżej 40-50 kb aż do fragmentów o wielkości nawet powyżej 10 000 kb (10 mb) (2, 22, 24, 35, 55, 64). W technice tej wykorzystano dwa zjawiska: 1) zmiany konfiguracji przestrzennej cząstek DNA pod wpływem przyłożonego napięcia prądu oraz 2) możliwością powrotu do pierwotnego ułożenia po usunięciu tego napięcia (9, 11). W przeciwieństwie do klasycznej elektroforezy, w której przepływ prądu następuje w jednym kierunku, w PFGE występuje ciągła zmiana przyłożenia elektrody dodatniej. Pod wpływem takich warunków, cząstki DNA zmieniają swoją kon-

figurację przestrzenną i kierunek przemieszczania się w żelu agarozowym. Wprowadzenie impulsów elektrycznych o zmiennej długości wpływa bezpośrednio na reorientację fragmentów DNA o różnej wielkości, tzn. dłuższe pulsy przyspieszają przemieszczanie się większych cząstek, krótsze natomiast – mniejszych fragmentów pociętego przez endonukleazę chromosomalnego kwasu nukleinowego (35). Programując odpowiednio kierunek i czas przepływu prądu (pulsu), PFGE pozwala na separację fragmentów restrykcyjnych o różnej masie molekularnej (22). Używane obecnie odmiany PFGE, oparte na powyższym założeniu teoretycznym, różnią się przede wszystkim sposobem przyłożenia i zmiany pulsującego pola elektrycznego. Najczęściej stosuje się metodę odwróconego pola elektrycznego (Field Inversion Gel Electrophoresis, FIGE) (9) lub sześciokątne jednorodnego pola elektrycznego (Contour Clamped Homogenous Electric Field, CHEF) (11). FIGE, wykorzystuje klasyczną komorę elektroforetyczną, w której okresowo zmieniane jest przyłożenie elektrody dodatniej o 180°. Dobierając odpowiednio częstotliwość zmiany pola elektrycznego oraz czas przepływu prądu (pulsu) uzyskuje się różną ruchliwość fragmentów DNA zależną od ich wielkości. W przypadku aparatu CHEF, geocentryczna konfiguracja elektrod determinuje kąt reorientacji przepływu DNA na 120°, który ma istotny wpływ na rozdział i ruchliwość cząstek w żelu agarozowym. Przyłożone na końcach każdej z elektrod odpowiednio dobrane napięcie pozwala na uzyskanie jednorodnego pola elektrycznego niezbędnego do liniowego rozdziału dużych fragmentów chromosomalnego DNA (22, 35).

Pierwszym etapem analizy szczepów *E. coli* przy użyciu techniki PFGE jest izolacja całego chromosomalnego kwasu nukleinowego. Ponieważ tak duża cząstka DNA jest niezwykle wrażliwa na mechaniczne uszkodzenie (np. w trakcie pipetowania), izolację i trawienie materiału genetycznego wykonuje się w blockach agarozowych, zawierających zawiesinę bakteryjną badanego szczepu. Agarozę ta, stanowiąc materiał osłonowy, utrzymuje chromosomalny DNA w nieuszkodzonym stanie, pozwalając jednocześnie na swobodne przemieszczanie się czynników używanych do lizy ścian, błon komórkowych i białek cytoplazmatycznych komórek bakteryjnych (proteinaza K, lizozym) (28, 35, 36). Uzyskany DNA jest następnie cięty *in situ* na liniowe fragmenty przy pomocy rzadko tnących enzymów restrykcyjnych. Wykorzystuje się tu informację, że większość bakterii gramujemnych, w tym *E. coli*, posiada chromosomalny DNA z przewagą guaniny (G) i cytozyny (C) w stosunku do adeniny (A) i tyminy (T) (6). Dobierając endonukleazy, rozpoznające sekwencje bogate w nukleotydy A i T lub też takie, które są względnie długie (np. 6-8 nukleotydowe), uzyskuje się stosunkowo niewielką liczbę fragmentów restrykcyjnych (zwykle < 20), które można następnie analizować metodą PFGE. W przypadku

molekularnych badań epidemiologicznych szczepów *E. coli* używane są zwykle enzymy restrykcyjne NotI i XbaI (56). Ten pierwszy rozpoznaje sekwencje GC↓GGCCGC, a efektem jego działania jest powstanie 12-15 fragmentów o masie 10-1000 kb podczas gdy XbaI przecina DNA w sekwencji T↓CTAGA, prowadząc do generacji ok. 20 prążków o masie 10-500 kb. Porównując profile DNA uzyskane przy badaniu różnych szczepów *E. coli*, poddanych działaniu tego samego enzymu restrykcyjnego, można określić ich pokrewieństwo genotypowe. Interpretacja uzyskanych wyników jest niezwykle istotnym elementem testu PFGE. Analizując obrazy elektroforetyczne testowanych szczepów *E. coli*, można stwierdzić następujące zależności (56):

a) badane izolaty są identyczne gdy liczba prążków jest taka sama, a analogiczne prążki posiadają tę samą masę molekularną;

b) badane izolaty wykazują ściśle pokrewieństwo gdy obraz elektroforetyczny różni się w przypadku 2-3 uzyskanych fragmentów restrykcyjnych DNA. Może to być wynikiem np. mutacji punktowej chromosomu, która prowadzi do powstania dodatkowego miejsca restrykcyjnego. W miejsce jednego liniowego fragmentu DNA powstają wtedy dwa, których łączna masa molekularna stanowi równowartość masy cząstki pierwotnej. Taki obraz PFGE obserwuje się niekiedy w przypadku badania tych samych szczepów, z których jeden był szereg razy pasażowany *in vitro*;

c) badane izolaty wykazują prawdopodobne pokrewieństwo gdy uzyskany profil elektroforetyczny różni się 4-6 prążkami, których obecność jest efektem mutacji punktowej i/lub wprowadzenia (lub delecji) fragmentu DNA;

d) badane izolaty nie wykazują pokrewieństwa molekularnego gdy różnice w ilości i jakości uzyskanych fragmentów restrykcyjnych prowadzą do powstania 7 lub więcej różnych prążków elektroforetycznych.

Analiza otrzymanego w teście PFGE obrazu elektroforetycznego, uwzględniająca powyższe kryteria, jest stosunkowo trudna i często subiektywna. Celem standaryzacji wyników wprowadzono ostatnio szereg programów komputerowych, pozwalających na dokładną analizę liczby i masy molekularnej uzyskanych fragmentów DNA. Z ich wykorzystaniem możliwe jest szybkie i obiektywne określenie pokrewieństwa genotypowego testowanych izolatów bakteryjnych. Stopień tego pokrewieństwa, oznaczany najczęściej w procentach, jest następnie kalkulowany automatycznie i stanowi podstawę do kreślenia dendrogramów (56).

### Test polimerazowej reakcji łańcuchowej (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Opracowany został w latach 80-tych przez Mullisa i Faloona (39), a zastosowany po raz pierwszy w praktyce przez Saiki i wsp. (48). Polega on na syntezie *in vitro* wybranej sekwencji nukleotydomowej DNA. Jest to

niezwykle czuła, szybka i swoista molekularna metoda aplikacyjna, która znajduje szerokie zastosowanie zarówno w badaniach diagnostycznych, jak też w określaniu stopnia pokrewieństwa (identyczności) szczepów (klonów) bakteryjnych, w tym *E. coli*. Zasada testu została szczegółowo opisana w licznych publikacjach przeglądowych, w tym również w języku polskim (4, 19, 30, 31, 43, 51). W obecnym opracowaniu zostanie więc tylko przedstawione zastosowanie testu PCR w badaniach związanych z epidemiologią molekularną.

W latach 90-tych wprowadzono odmianę tego testu, zwaną RAPD PCR (Random Amplified Polymorphic DNA), określaną także terminem AP PCR (Arbitrary Primer) (62, 63). Oparta jest ona, analogicznie jak klasyczny test PCR, na polimerazowej amplifikacji fragmentów DNA *in vitro*. W metodzie RAPD PCR używa się zwykle starterów długości około 8-12 nukleotydów, o dowolnej sekwencji, która jest komplementarna do losowo ułożonych odcinków chromosomalnego DNA. Pozwala to w konsekwencji na amplifikację fragmentów kwasu nukleinowego o różnej długości (7). W wyniku przeprowadzonych 30-40 cykli PCR, powstają produkty, które są następnie rozkładane w procesie elektroforezy agarozowej i uwidaczniane przez barwienie bromkiem etydydy. Układ powstałych prążków jest charakterystyczny dla poszczególnych szczepów (klonów) bakteryjnych i nie zależy od wybranej sekwencji nukleotydomowej starterów. Jest to metoda stosunkowo prosta, szybka i powtarzalna, a jej dodatkową zaletą jest minimalna ilość materiału wyjściowego (szczep bakteryjny lub jego DNA) niezbędna do wykonania reakcji. W przypadku patogenych szczepów *E. coli* stosowane w metodzie RAPD PCR startery mają zwykle następujące sekwencje: CCGCAGCCAA; GTGGATGCGA; GCGGAAATAG, a uzyskana z ich udziałem liczba amplifikowanych fragmentów zawiera się w granicach 12-15, przez co jest łatwa do analizy wizualnej bez specjalnego i drogiego oprogramowania komputerowego (10, 42, 61). Metoda RAPD PCR jest też bardziej czuła niż inne techniki analizy chromosomalnego DNA (np. RFLP) i wydaje się mieć dużą przyszłość w epidemiologii molekularnej.

Odmianą testu PCR, wprowadzaną obecnie do badań pokrewieństwa genotypowego szczepów *E. coli*, jest ERIC PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (27, 57). W metodzie tej używa się pary starterów o dość długich sekwencjach nukleotydomowych, komplementarnych do określonego fragmentu genomu bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, nazwanych ERIC1R (ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA) oraz ERIC2 (AAGTAAGTGACTGGGGGTGAGCG) (57). Sekwencje te są wysoce konserwatywne ale ich rozmieszczenie w chromosomalnym DNA różni się w zależności od gatunku, a nawet szczepu (klonu) *E. coli* (16, 34). Używając testu ERIC-PCR możliwe jest



więc uzyskanie charakterystycznego obrazu fingerprinting, który jest używany do łatwego różnicowania poszczególnych szczepów. Jest to więc bardzo zbliżona w swoim założeniu metoda do opisanego wyżej testu RAPD PCR, różniąc się tylko specyficznym określeniem sekwencji starterów reakcji PCR. Wykazano, iż uzyskane przy użyciu opisanych starterów ERIC1R i ERIC2 profile elektroforetyczne cechują się stałością u tych samych szczepów (klonów) *E. coli*, badanych w różnym okresie czasu (34, 46). ERIC PCR jest więc niezwykle atrakcyjną metodą, która powinna wkrótce znaleźć szersze zastosowanie do molekularnej analizy różnych patogennych szczepów bakteryjnych, w tym *E. coli*.

Intensywny rozwój badań obejmujących biologię molekularną pozwala obecnie na wprowadzenie wielu metod genotypowych do identyfikacji różnicowania patogennych szczepów *E. coli*. Szereg używanych technik, opartych na analizie plazmidowego i/lub chromosomalnego DNA, daje szerokie możliwości szybkiej i dokładnej oceny cech chorobotwórczości izolowanych bakterii jak również pozwala na analizę stopnia ich pokrewieństwa, źródła zakażenia oraz dróg szerzenia się infekcji. Taka dokładna charakterystyka szczepów *E. coli* wymaga zwykle zastosowania równocześnie więcej niż jednej z przedstawionych metod typizacji genotypowej, których dopiero łączne wyniki pozwalają na ściśle określenie klonalnego charakteru badanych szczepów bakteryjnych. W oznaczaniu tych zależności istotną rolę odgrywa sposób interpretacji uzyskanych rezultatów. Niezwykle pomocne są w tym względzie coraz nowsze i dające większe możliwości programy komputerowe, pozwalające na automatyzację i obiektywną ocenę wyników oraz ich aplikację do celów rozwijającej się epidemiologii molekularnej.

## Piśmiennictwo

- Alter D., Subramanian K.: *BioTechniques* 7, 456, 1989.
- Arbeit R. D., Arthur M., Dunn R.: *J. Infect. Dis.* 161, 230, 1990.
- Barbour A., Garon C.: *Science* 237, 409, 1987.
- Bej A., Mahbubani H., Atlas R. M.: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26, 301, 1991.
- Birnboim H., Doly J.: *Nucl. Acids Res.* 7, 1513, 1979.
- Blatner F. R., Plunkett G. I., Block C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M.: *Science* 277, 1453, 1997.
- Brikun I., Suziedelis K., Berg D. E.: *J. Bacteriol.* 176, 1673, 1994.
- Brooks J. E.: *Methods Enzymol.* 152, 113, 1987.
- Carle G. F., Frank M., Olson M. V.: *Science* 232, 65, 1986.
- Cave H., Bingen E., Eliot J., Denamur E.: *Res. Microbiol.* 145, 141, 1994.
- Chu G., Vollnath D., Davis R. W.: *Science* 234, 1582, 1986.
- Clabots C. R., Johnson S., Olson M. M., Peterson L. R., Greding D. N.: *J. Infect. Dis.* 166, 561, 1992.
- Clewell D. B., Helinski D. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 1159, 1969.
- Clowes R. C.: *Bacteriol. Rev.* 36, 361, 1972.
- Couturier M., Bex F., Berruist P., Maas W.: *Microbiol. Rev.* 52, 375, 1988.
- Dalla-Costa L. M., Irino K., Rodriguez J., Rivera I. N., Trabulsi L. R.: *J. Med. Microbiol.* 47, 227, 1998.
- Eckhard T.: *Plasmid* 1, 584, 1978.
- Einstein B. I.: *J. Infect. Dis.* 161, 595, 1990.
- Erllich H. A., Gelfand D., Sninsky J. J.: *Science* 252, 1643, 1991.
- Farrar W. E.: *J. Infect. Dis.* 141, 1, 1983.
- Fox B. C., Mobley H. L. T., Wade J. C.: *J. Infect. Dis.* 159, 488, 1989.
- Goering R. V.: *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 14, 595, 1993.
- Guerry P., LeBlanc D. J., Falkow S.: *J. Bacteriol.* 116, 1064, 1973.
- Haertl R., Baundlow G.: *J. Clin. Microbiol.* 31, 128, 1993.
- Holland R. E.: *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 345, 1990.
- Holmes D., Quigley M.: *Anal. Biochem.* 114, 193, 1981.
- Hulton C. S. J., Higgins C. F., Sharp P. M.: *Mol. Microbiol.* 5, 825, 1991.
- Humphreys G. O., Willshaw G. A., Anderson E. S.: *Biochim. Biophys. Acta* 383, 457, 1975.
- Jackson C. J., Fox A. J., Wareing D. R. A., Hutchinson D. N., Jones D. M.: *Epidemiol. Infect.* 117, 233, 1996.
- Jenek J., Bryl M.: *Biotechnologia* 3, 69, 1996.
- Jungerman M., Słomski R.: *Post. Bioch.* 36, 14, 1990.
- Kado C., Liu S.: *J. Bacteriol.* 145, 1365, 1981.
- Levine M. M.: *J. Infect. Dis.* 155, 377, 1987.
- Lupski J. R., Weinstock G. M.: *J. Bacteriol.* 174, 4259, 1992.
- Maslow J. N., Slutsky A. M., Arbeit R. D.: *Application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology, [w:] Diagnostic molecular microbiology: principles and applications* ed. Persing D. H., Smith T. F., Tenover F. C., White T. J., ASM Press, 1993.
- Maslow J. N., Mulligen M. E., Arbeit R. D.: *Clin. Infect. Dis.* 17, 153, 1993.
- Meyers J. A., Sanchez D., Elwell L. P., Falkow S.: *J. Bacteriol.* 127, 1529, 1976.
- Moseley S. L., Huq I., Alim A. R., So M., Samadpour-Motalebi M., Falkow S.: *J. Infect. Dis.* 142, 892, 1980.
- Mullis K., Faloan F.: *Methods Enzymol.* 155, 335, 1987.
- Murray B. E., Singh K. V., Haeth J. D., Sharma B. R., Weinstock G. M.: *J. Clin. Microbiol.* 28, 2059, 1990.
- Nei M., Li W. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5269, 1979.
- Pacheco A. B. F., Guth B. E. C., Almeida D. F., Ferris L. C. S.: *Res. Microbiol.* 147, 175, 1996.
- Persing D. H.: *J. Clin. Microbiol.* 29, 1281, 1991.
- Revzin A.: *BioTechniques* 7, 346, 1989.
- Riley L. W., Remis R. S., Helgeson S. D., McGee H. B., Wells J. G., Davis B. R., Herbert R. J., Olcott E. S., Johnson L. M., Hargrett N. T., Blake P. A., Cohen M. L.: *New Engl. J. Med.* 308, 681, 1983.
- Rivera I. G., Chowdhury M. A. R., Huq A., Jackobs D., Martins M. T., Colwell R. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2898, 1995.
- Saha B., Saha D., Nigoyi S., Bal M.: *Anal. Biochem.* 176, 344, 1989.
- Saiki R. K., Schorf S., Faloan F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N.: *Science* 230, 1350, 1985.
- Serghini M., Roizenthaler C., Pinck L.: *Nucl. Acids Res.* 17, 3604, 1989.
- Shales D. M., Currie-McCumber C. A.: *Rev. Infect. Dis.* 8, 738, 1986.
- Słomski R., Chlebowska H., Reiss J.: *Post. Bioch.* 38, 75, 1992.
- Southern E. M.: *J. Mol. Biol.* 98, 503, 1975.
- Steffan R. J., Atlas R. M.: *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 137, 1991.
- Stull T. L., LiPune J. J., Edlind T. D.: *J. Infect. Dis.* 157, 280, 1988.
- Suzuki Y., Ishikara M., Funabashi M.: *J. Infect.* 27, 39, 1993.
- Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H., Swaminathan B.: *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233, 1995.
- Versalovic J., Koeith T., Lupski J. R.: *Nucl. Acids Res.* 19, 6823, 1991.
- Viering T. P., Fine D. P.: *J. Infect. Dis.* 160, 76, 1989.
- Wachsmuth K.: *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 6, 100, 1985.
- Wachsmuth K.: *Rev. Infect. Dis.* 8, 682, 1986.
- Wang G., Whittam T. S., Berg C. M., Berg D. E.: *Nucl. Acids Res.* 21, 5930, 1993.
- Welsh J., McClelland M.: *Nucl. Acids Res.* 18, 7213, 1990.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V.: *Nucl. Acids Res.* 18, 6531, 1990.
- Yan W., Taylor D. E.: *Gene* 101, 117, 1991.
- Zasloff M., Ginder G., Felsenfeld G.: *Nucl. Acids Res.* 5, 1139, 1978.
- Ziai M., Hamby C., Reddy R., Hayashibe K., Farrone S.: *Biochimiques* 7, 147, 1989.