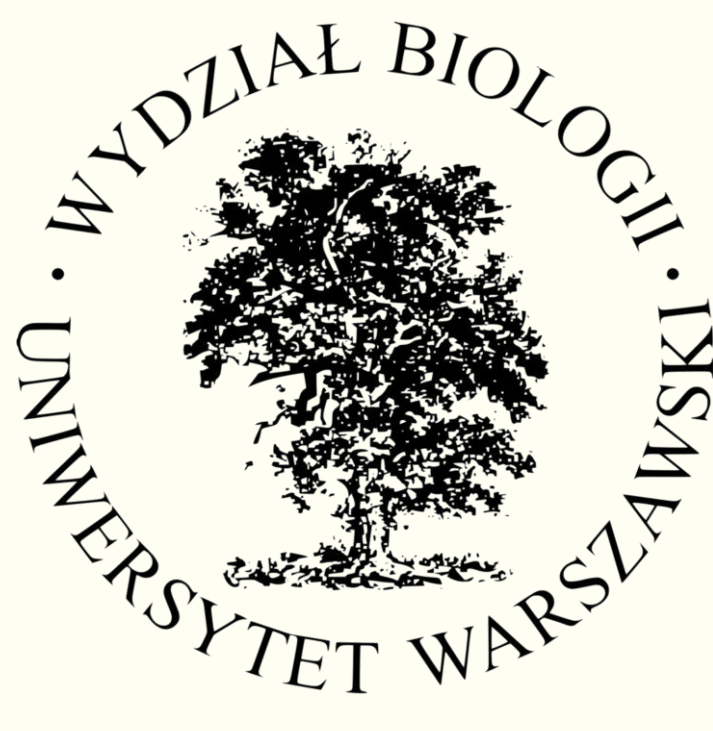




MULTIPLEX PCR JAKO NOWA METODA IDENTYFIKACJI GATUNKOWEJ
MYCOBACTERIUM KANSASII COMPLEX

W świetle najnowszych badań genomowych, dotychczasowe podtypy *Mycobacterium kansasii* (I-VI) zostały uznane za odrębne gatunki. Do kompleksu *Mycobacterium kansasii* (MKC) zalicza się obecnie 7 gatunków, tj.: *Mycobacterium kansasii* (dawny typ I), *Mycobacterium persicum* (typ II), *Mycobacterium pseudokansasii* (typ III), *Mycobacterium ostraviense* (typ IV), *Mycobacterium innocens* (typ V), *Mycobacterium attenuatum* (typ VI) i *Mycobacterium gastri* (**Ryc.1; Tab.1**). W identyfikacji gatunkowej MKC stosuje się zwykle analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych produktów PCR (polymerase chain reaction- restriction fragments length polymorphism, PCR-RFLP) fragmentów genów *tuf*, *hsp65* lub *rpoB*. Główną wadą tej metody jest niedostatecznie silny potencjał różnicujący, szczególnie w odniesieniu do *M. kansasii* oraz *M. persicum*.

Celem pracy było opracowanie nowej i nieskomplikowanej technicznie metody identyfikacji prątków MKC, o wysokiej zdolności różnicującej.



Tab. 1. Gatunki należące do MKC

gatunki MKC:	Dawne typy
<i>M. kansasii</i>	I
<i>M. persicum</i>	II
<i>M. pseudokansasii</i>	III
<i>M. ostraviense</i>	IV
<i>M. innocens</i>	V
<i>M. attenuatum</i>	VI
<i>M. gastri</i>	-

Metody

Do analizy *in silico* użyto 158 genomów *Mycobacterium* sp. zdeponowanych w bazie danych GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), z czego 67 reprezentowało prątki MKC, 60 – prątki atypowe (12 gatunków) spoza MKC, a 31 – prątki kompleksu *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Poszukiwano regionów, których amplifikacja dawałaby produkty o zróżnicowanej wielkości dla poszczególnych gatunków MKC, przy jednoczesnym braku produktu dla prątków atypowych i MTBC. Zaprojektowane pary starterów zostały zmapowane za pomocą programu Bowtie do wszystkich badanych genomów *Mycobacterium* sp., a wyniki filtrowano przy użyciu skryptów Python.

Ryc. 1. *M. kansasii* na podłożu Löwenstein–Jensen’a.

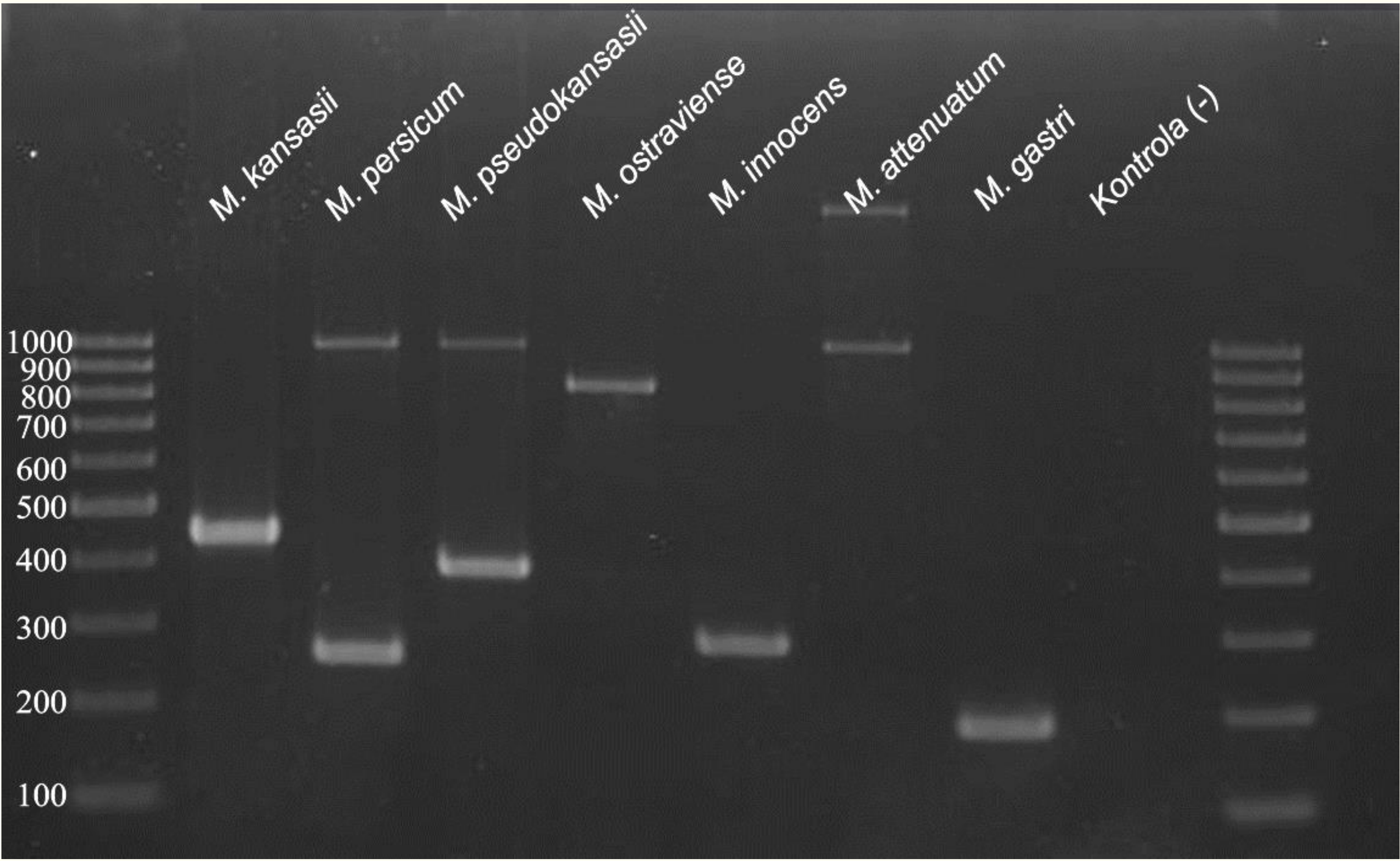
Wyniki

W oparciu o przedstawione kryteria zaprojektowano 3 zestawy starterów (po 4 startery w 1 reakcji). Każdy zestaw starterów testowano *in vitro* na 51 szczepach reprezentujących 23 gatunki *Mycobacterium* sp. (7 gat. MKC, 14 gat. prątków atypowych, 2 gat. MTBC). Tylko z wykorzystaniem jednego zestawu uzyskano charakterystyczny profil dla każdego gatunku MKC (**Ryc. 2; Tab.2**).

Tab. 2. Rozmiary produktów (pz) uzyskanych dla każdego z gatunku MKC za pomocą nowej metody multiplex-PCR.

Gatunek	I <i>M. kansasii</i>	II <i>M. persicum</i>	III <i>M. pseudokansasii</i>	IV <i>M. ostraviense</i>	V <i>M. innocens</i>	VI <i>M. attenuatum</i>	<i>M. gastri</i>
Produkt	450	260; 986	392; 985	830	287	999	188

Ryc. 2. Wzory prążków uzyskane za pomocą nowej metody multiplex-PCR dla szczepów typowych MKC.



Podsumowanie: Zaprojektowana metoda MPCR (multiplex- PCR) pozwala na identyfikację wszystkich gatunków należących do MKC, z pominięciem etapu trawienia restrykcyjnego. Jest więc prostsza, szybsza, a przede wszystkim bardziej wiarygodna niż dotychczasowa technika PCR-RFLP.