

OPRACOWANIE UKŁADU ZŁOŻONEJ REAKCJI PCR (ANG. MULTIPLEX PCR) DO WYKRYWANIA GENÓW KODUJĄCYCH WYBRANE CZYNNIKI WIRULENCJI *ESCHERICHIA COLI*



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY

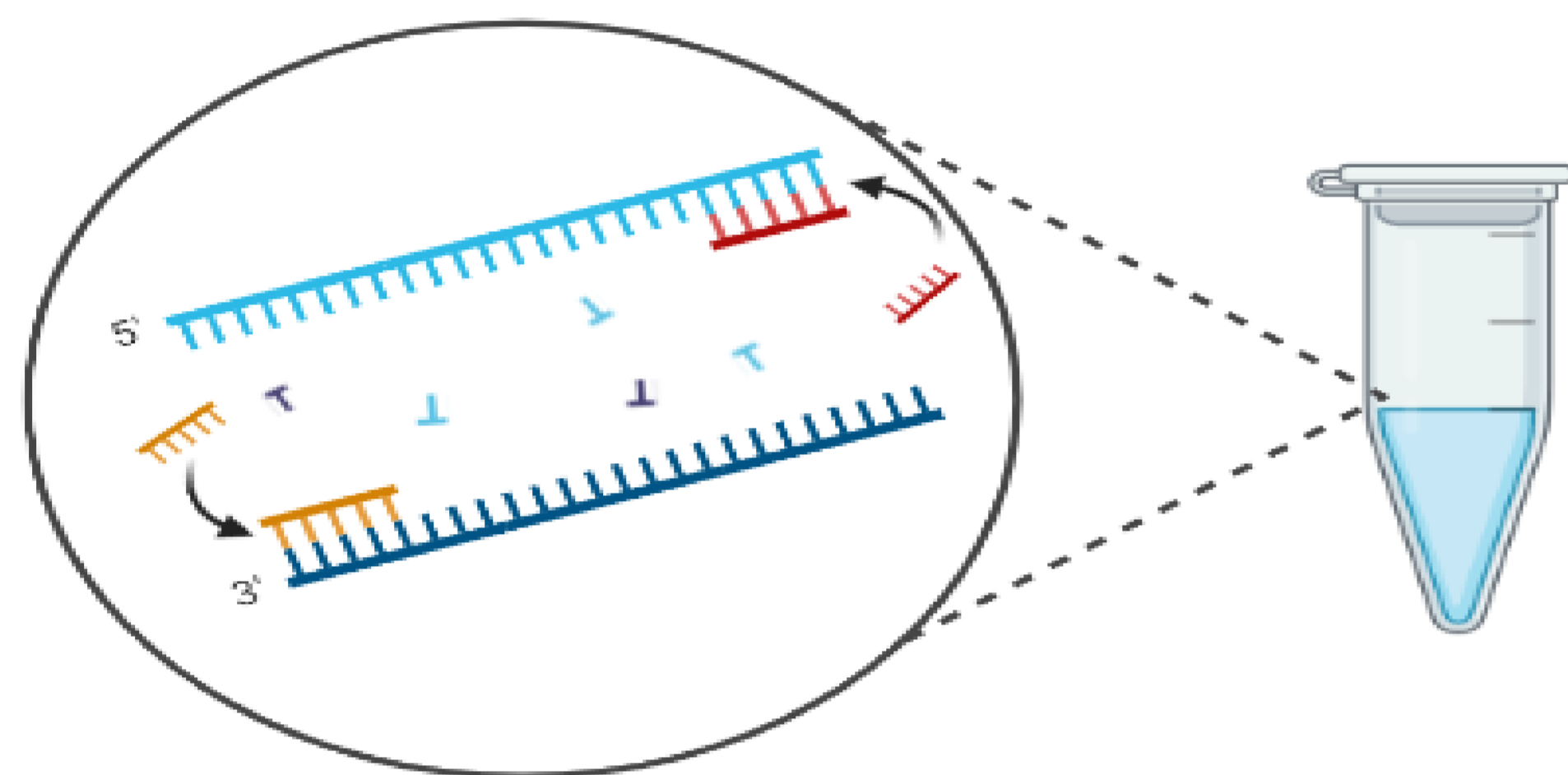
Aleksandra Rosińska*, Beata Krawczyk
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii
Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska
*s160148@student.pg.edu.pl

WSTĘP

Zakażenie układu moczowego (ZUM) jest szeroko rozpowszechnioną infekcją wśród pacjentów ambulatoryjnych i szpitalnych; rocznie na świecie odnotowuje się około 150 milionów przypadków. Stąd ważne jest monitorowanie uropatogennych szczepów *E. coli* pod względem obecności istotnych dla wirulencji genów, które podnoszą ryzyko nawrotowego ZUM, a nawet sepsy.

CEL

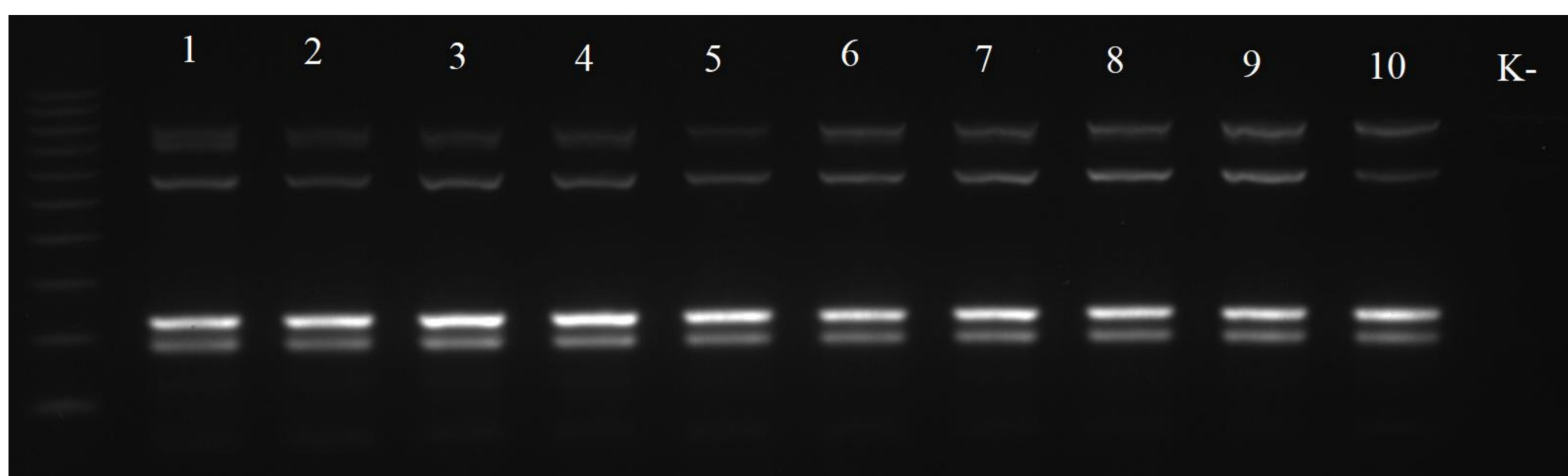
Opracowanie układu i optymalizacja warunków (profilu temperaturowego, stężenia jonów magnezu i jednostek polimerazy pwo) reakcji multiplex PCR do wykrywania genów *coli* *tosA*, *tosB*, *mrkD*, *Afa/Dr* powiązanych z rozwojem ZUM oraz ewaluacja na klinicznych szczepach *E. coli*



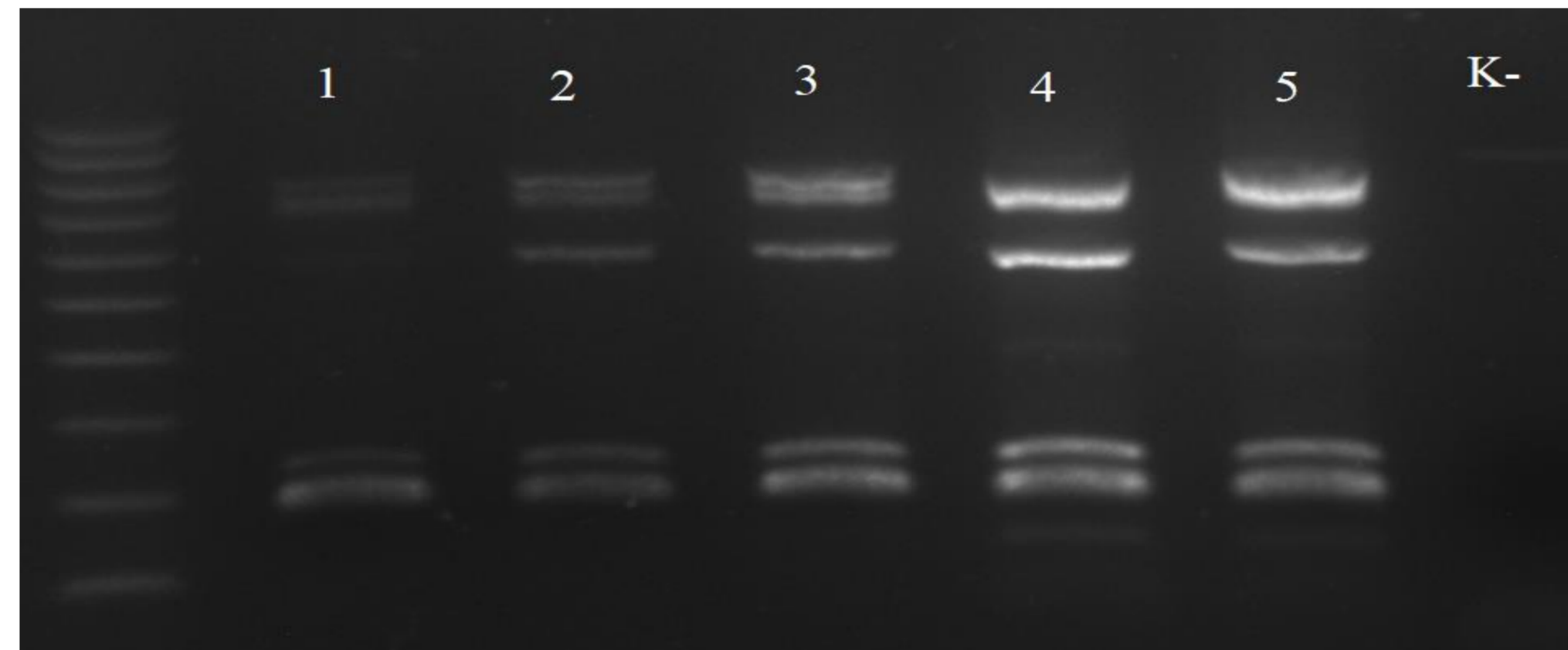
METODOLOGIA

Izolacja matrycy DNA szczepów CFT oraz *E. coli*. Z ich wykorzystaniem ustalono optymalną temperaturę przyłączenia starterów przeprowadzając reakcje simpleks PCR z gradientem temperatur (59 - 69,5 °C). Na podstawie uzyskanych danych przeprowadzono pierwszą reakcję multiplex, dla której ustalono optymalną temperaturę reakcji w podobny sposób. Układ optymalizowano: przeprowadzono multiplex PCR z gradientem jednostek polimerazy Pwo (0,1-0,3 µl), a następnie z gradientem stężenia jonów magnezu (0,7-1,9 µl). Opracowany układ przetestowano na trzydziestu szczepach klinicznych. Dla wzmocnienia specyficzności reakcji przeprowadzono dodatkową optymalizację układu na mieszaninie matryc klinicznych z dodatkiem wzmacniacza PolyMate Additive firmy BIOLINE.

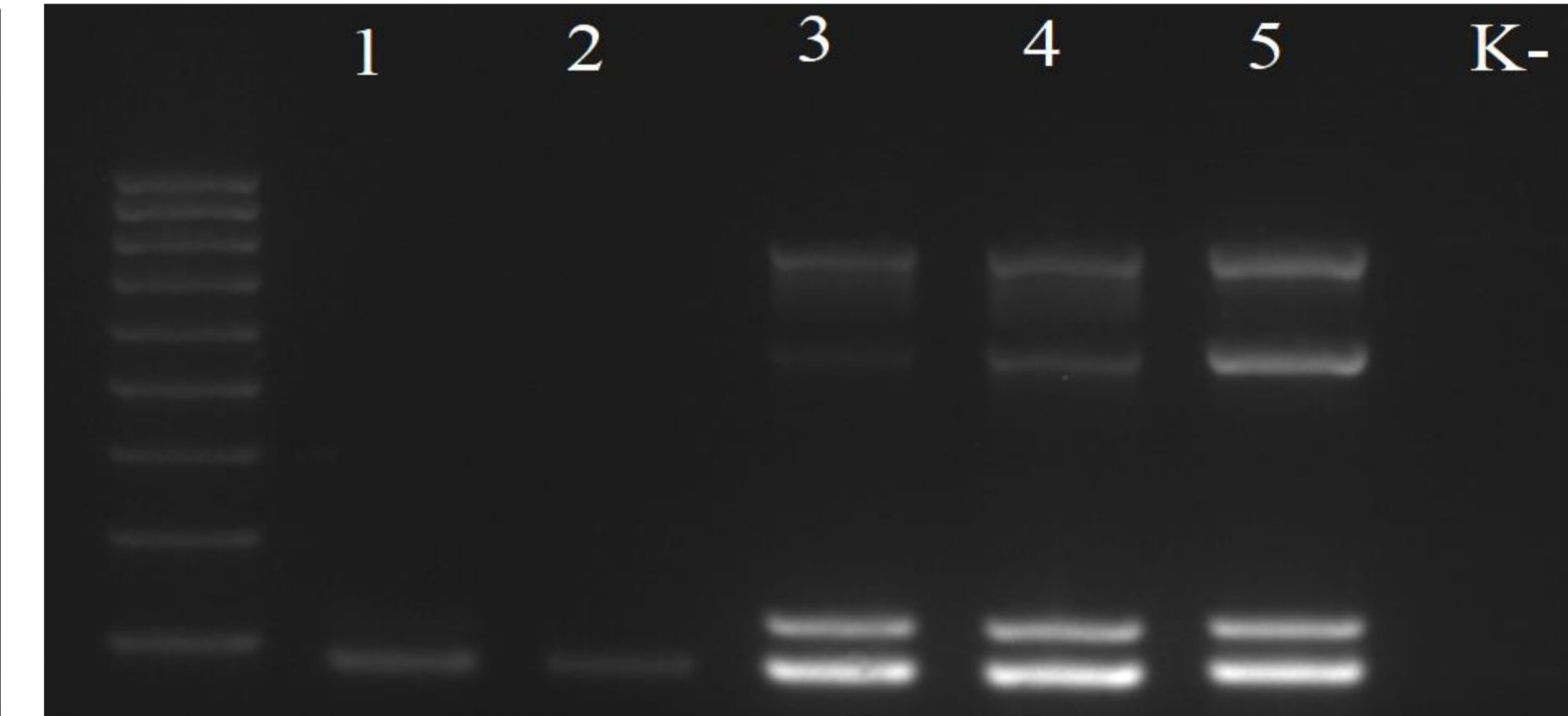
WYNIKI



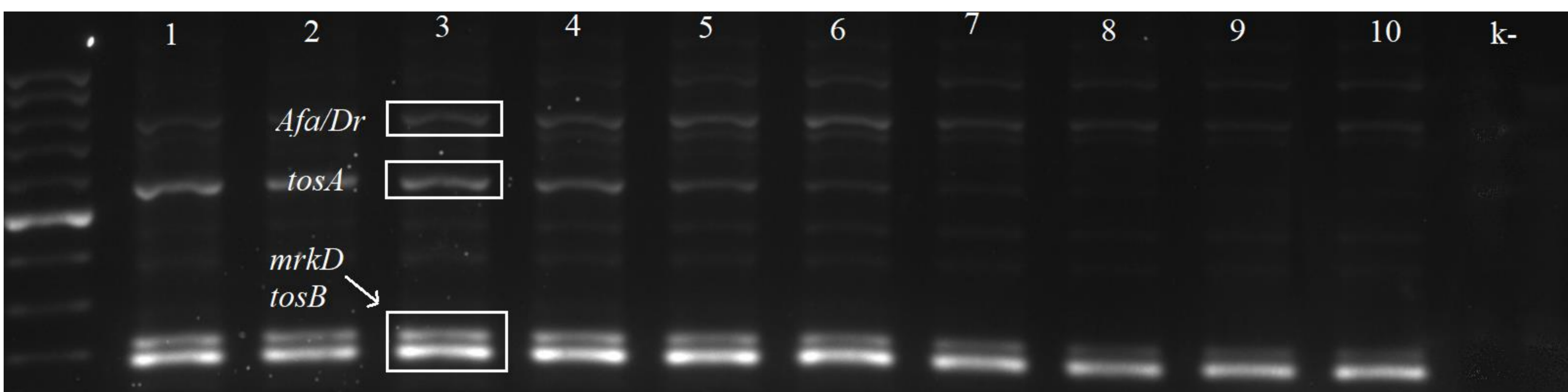
Zdjęcie 1 Wyniki reakcji multiplex PCR- gradient temperatur



Zdjęcie 2 Wyniki reakcja multiplex PCR – gradient polimerazy



Zdjęcie 3 Wyniki reakcja multiplex PCR – gradient Mg²⁺

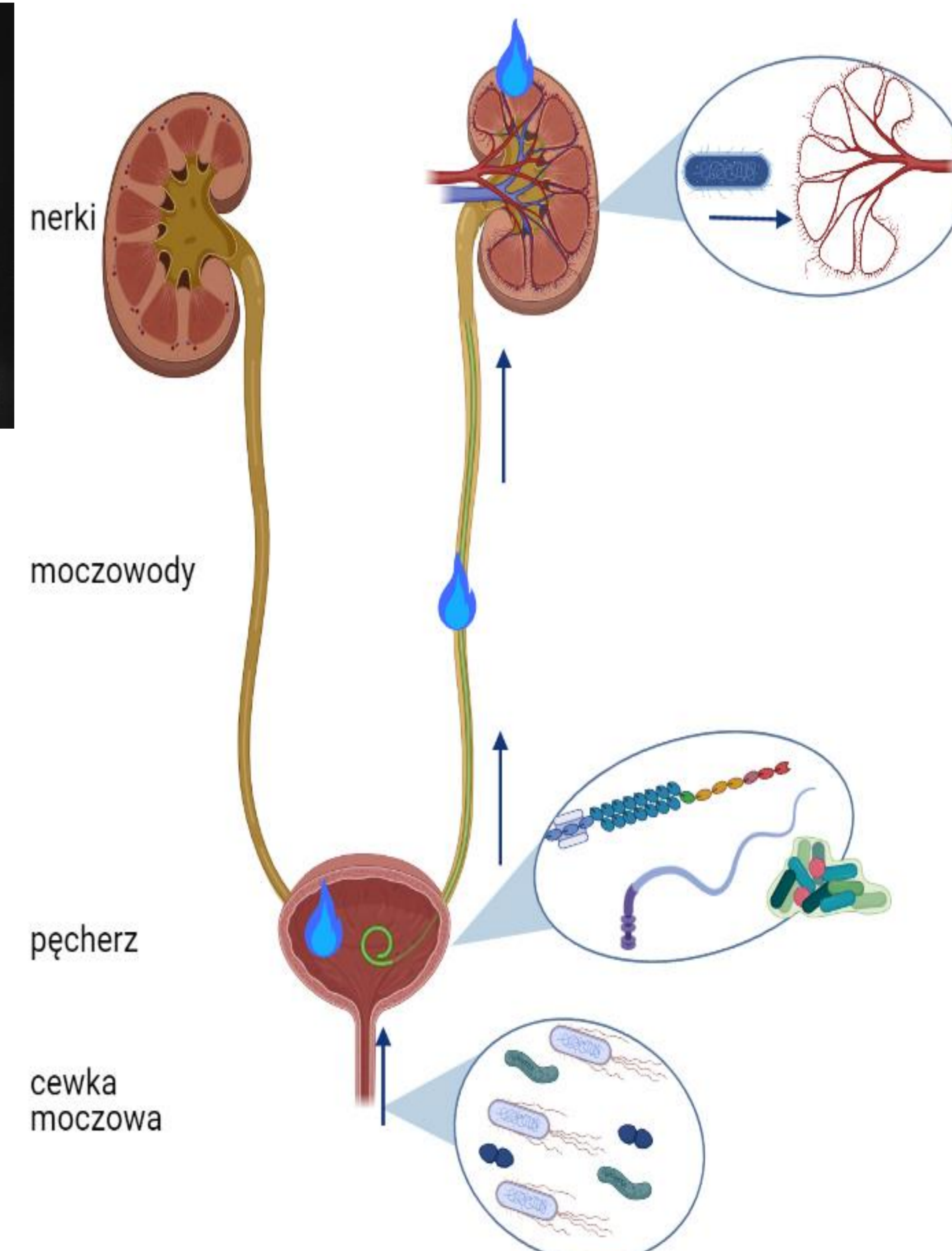


Zdjęcie 4 Wyniki reakcji multiplex PCR – szczepy kliniczne, master mix ze wzmacniaczem

WNIOSKI

Na podstawie uzyskanych wyników ustalono optymalną temperaturę przyłączenia starterów (65,5 °C) oraz skład master mix (polimeraza 0,25 µl, MgCl₂ 1,6 µl, Polymate Additive 1µl, bufor shark 2,5 µl, dNTPs 2 µl, startery *Afa/Dr* 0,5 µl *tosA* 0,5 µl, *tosB* 1 µl oraz *mrkD* 1,5 µl, woda 9,65 µl).

Opracowany układ multiplex PCR wykorzystano do analizy 30 izolatów klinicznych pobranych od pacjentów chorych na ZUM i urosepsę. Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie częstości występowania poszczególnych genów: *Afa/Dr* (66,67 %), *tosA* (33,33%), *mrkD* (0%) oraz *tosB* (26,67%). Wyniki sugerują, że fimbrialne i afimbrialne adhezyny typu *Afa/Dr* są powiązane z wysoką wirulencją *E. coli* i bardzo często odpowiadają za nawrotowe zakażenie układu moczowego. Natomiast obecność genu *tosA* jest powiązana ze zwiększoną częstością występowania innych czynników wirulencji w genomie bakterii.



Literatura:

1. Piątek-Zalewska B., Piątek R., Krawczyk B., Olszewski M., Patomechanizm zakażeń dróg moczowych wywołanych przez uropatogenne szczepy *E. coli*, Postepy Hig Med Dosw (online), 2019; 73: 269-281
2. Krawczyk B., Michalik M., Fordon M., Wysocka M., Samet A., Nowicki B. *Escherichia coli* Strains with Virulent Factors Typical for Uropathogens were Isolated from Sinuses from Patients with Chronic Rhinosinusitis—Case Report. *Pathogens*. 2020; 9(5):318.