

Applications of PCR in microbiology

Adaszek Ł., Dzięgiel B., Mazurek Ł.,
Winiarczyk S., Department of Epizootiology with
Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary
Medicine, University of Life Sciences in Lublin

Polymerase chain reaction, PCR, it is a powerful tool for molecular typing used in microbiology. PCR targeting the gene encoding 16S ribosomal RNA has been used for the last 20 years for studying prokaryotes. Broad-range PCR was first used as a taxonomic tool, then in clinical microbiology and has allowed to identify the etiological agents for several infectious diseases. This review is synthesis of data concerning the applications, assets, and drawbacks of broad-range PCR in clinical microbiology.

Keywords: 16S ribosomal RNA, PCR, molecular diagnosis.

Technika łańcuchowej reakcji polimerazy (polymerase chain reaction – PCR) i jej przydatność w diagnostyce bakteriologicznej mają tyle samo zwolenników, co przeciwników. Ta molekularna metoda badawcza, umożliwiająca wykrycie konserwatywnego genu prokariotów 16S RNA, stała się niezwykle przydatna w szybkiej identyfikacji drobnoustrojów. W niniejszym artykule przybliżymy istotę PCR w ujęciu jej wykorzystania w badaniach mikrobiologicznych.

Zastosowanie techniki PCR w badaniach bakteriologicznych

Łukasz Adaszek, Beata Dzięgiel, Łukasz Mazurek, Stanisław Winiarczyk

z Katedry Epizootologii i Kliniki Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Zasada PCR

Łańcuchowa reakcja polimerazy polega na amplifikowaniu materiału genetycznego i wykrywaniu czynników chorobotwórczych na poziomie molekularnym. Ta metoda badawcza i diagnostyczna, stworzona przez Kary'ego Mullisa, polega na powieleniu *in vitro* poszukiwanego fragmentu kwasu nukleinowego z użyciem specjalnych starterów (primerów) oraz enzymów. Startery przyłączają się do odpowiadających im pod względem sekwencji jednoniciowych odcinków DNA i ograniczają fragment, do którego termostabilna polimeraza DNA dobudowuje nić komplementarną do wyjściowej matrycy. Zastosowanie tej metody było przełomowe ze względu na powielenie i identyfikację niewielkiej ilości matrycy, która może pochodzić ze śladowych ilości krwi, cebulki włosów czy piór. Metoda PCR jest specyficzna, czuła, stosunkowo szybka i umożliwia odróżnienie laboratoryjnych szczepów bakterii od terenowych (1).

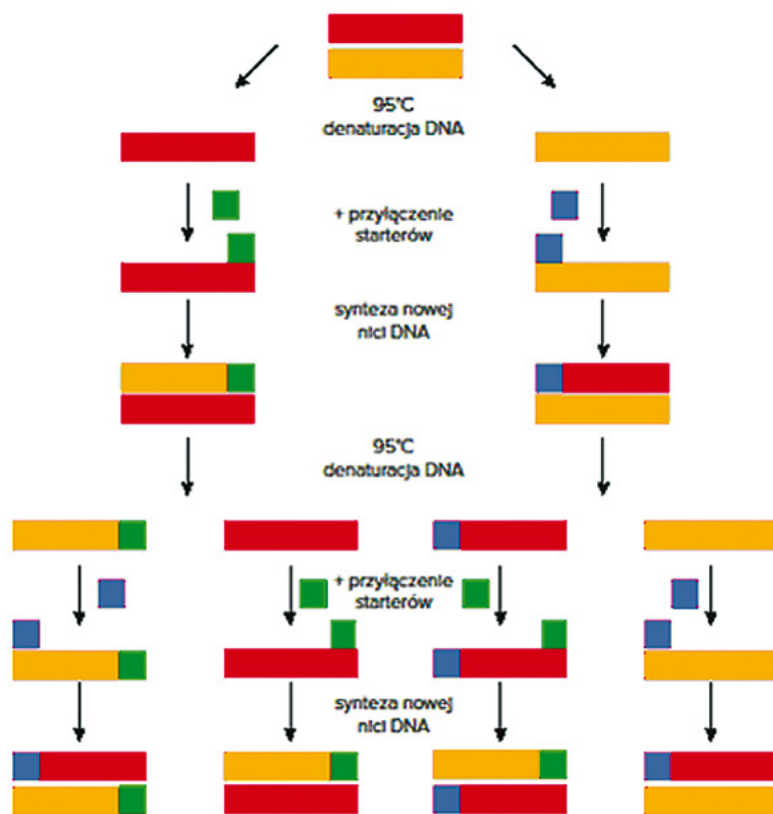
Kluczową rolę w PCR odgrywają enzymy syntetyzujące DNA, czyli termostabilne polimerazy aktywne w wysokich temperaturach, co zwiększa specyficzność i wydajność reakcji. Najczęściej stosowaną polimerazą jest termostabilna polimeraza Taq wyizolowana z pochodzącej z gorących źródeł bakterii *Thermus aquaticus*. Na rynku dostępne są liczne polimerazy otrzymywane między innymi z: *Thermus thermophilus*, *Pyrococcus furiosus*, *Bacillus stearothermophilus* i *Thermococcus litoralis* (2)

Reakcja PCR obejmuje ok. 30 cykli, a na każdy z nich składa się: denaturacja podwójnych nici DNA, przyłączanie starterów (annealing) i wydłużanie nici (elongacja). Denaturacja zachodzi w temperaturze 92–96°C. Na tym etapie badania wysoka temperatura powoduje zerwanie wiązań wodorowych i rozdzielenie helisy DNA na pojedyncze nici. Przyłączanie starterów w zależności od ich temperatury topnienia zachodzi w temperaturze 37–72°C, a proces elongacji w temp. 72°C od końca 3' startera, tak jak przy replikacji DNA *in vivo* (ryc. 1; 2, 3, 4).

W fazie wstępnej amplifikacji powielenie produktu jest powolne. W fazie logarytmicznej, gdy warunki są idealne, dochodzi do podwojenia liczby kopii DNA w czasie każdego cyklu reakcji. Następnie niedobór polimerazy, starterów oraz nagromadzone produkty powodują zmniejszenie efektywności amplifikacji i reakcja wchodzi w fazę przejściową, a następnie osiąga fazę plateau, w której obserwuje się dalsze spowolnienie jej tempa, aż do całkowitego zahamowania powielania DNA. Powtarzające się cykle reakcji prowadzą do wykładniczego wzrostu ilości produktu PCR (2, 3, 4).

Istotne dla przebiegu reakcji PCR są odpowiednie stężenia matrycy, polimerazy, starterów, trifosforanów deoksyrybonukleotydów (dNTP: dATP, dTTP, dCTP, dGTP), $MgCl_2$ i buforu dla polimerazy. Bufor reakcyjny o pH 8,3–8,8 ma zapewnić optymalne środowisko dla polimerazy i zawiera: Tris-HCl, $MgCl_2$ oraz KCl. Konieczne jest poznanie sekwencji matrycy, aby zaprojektować odpowiednie startery do reakcji PCR (2, 3, 4).

Za wyniki fałszywie ujemne PCR odpowiedzialne mogą być inhibitory (np. SDS,



Ryc. 1. Schemat PCR

EDTA, DMSO, heparyna), a także niedostateczna ilość polimerazy, nieodpowiednie startery bądź rozkład dNTP-ów. Wynik źle zoptymalizowanego PCR może być obarczony dużym błędem, który wynika z powielenia nieswoistego fragmentu DNA o wielkości identycznej lub zbliżonej do produktu specyficznego. Im większy odcinek DNA powielamy, tym trudniej uzyskać prawidłowy amplikon. Ponadto należy zachować szczególną ostrożność przy wykonywaniu mieszaniny reakcyjnej w związku z tym, że zanieczyszczenia mogą skutkować uzyskiwaniem wyników fałszywie pozytywnych (5).

Klasyczny PCR znalazł zastosowanie w szybkiej, bezpośredniej identyfikacji patogenów, gdy ich hodowla *in vitro* jest trudna lub długotrwała. Technika ta umożliwia wykrycie obecności w organizmie bakteryjnego DNA i wykorzystuje się ją do identyfikacji gatunku drobnoustrojów (6).

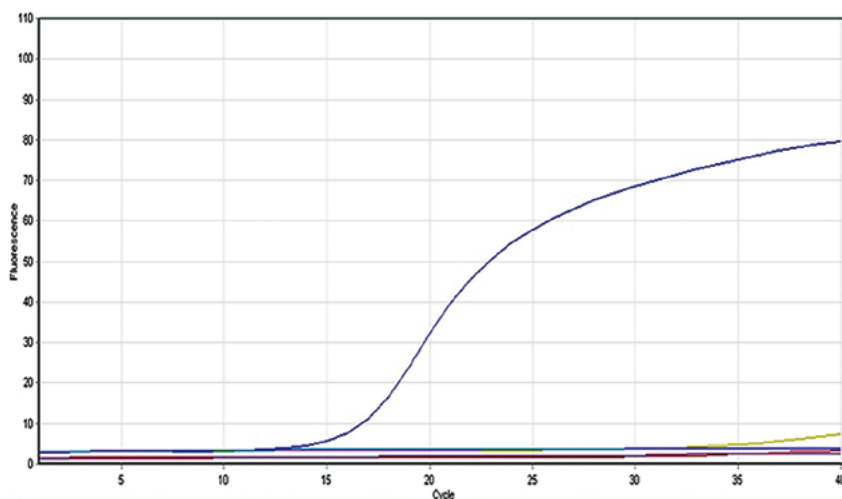
Analiza uzyskanych amplikonów może być przeprowadzona dzięki rozdzielaniu elektroforetycznemu w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym, wybarwieniu np. bromkiem etydyny i wizualizacji promieniami UV.

Jest wiele odmian metody PCR i wiele jej zastosowań. Jej modyfikacje to m.in.: RT-PCR (reverse transcriptase-PCR), Nested PCR (PCR „gniazdowy”), LCR (ligase chain reaction), ASA PCR (allele-specific amplification PCR), PCR-RLFP (restriction fragment length polymorphism PCR), Multiplex PCR, qPCR (quantitative PCR), inaczej real-time PCR (3).

W RT-PCR matrycę stanowi mRNA. Synteza DNA na matrycy mRNA odbywa się przy użyciu odwrotnej transkryptazy (RT) pozyskiwanej z wirusa AMV lub MMLV. Uzyskany w pierwszym etapie cDNA (complementary DNA) jest amplifikowany za pomocą klasycznej reakcji PCR (3, 5).

Real-time PCR, czyli reakcja PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym, to technika jakościowo-ilościowa o dużej specyficzności i wysokiej czułości, która jest wynikiem amplifikacji krótkich produktów. Real-time PCR nazywany też qPCR (quantitative PCR – ilościowy PCR), dzięki większemu zautomatyzowaniu i zwykle krótkiemu czasowi trwania jest metodą powtarzalną, a jego optymalizacja jest mniej czasochłonna. Ponadto real-time PCR jest mniej pracochłonny, bardziej czuły i wiarygodny, a ryzyko kontaminacji próbek jest zminimalizowane w porównaniu z klasycznym PCR (7).

Detekcja w czasie rzeczywistym polega na pomiarze poziomu fluorescencji emitowanej przez barwniki interkalujące do DNA lub sondy molekularne – analiza



Ryc. 2. Krzywa amplifikacji qPCR

i wizualizacja produktów prowadzona jest w trakcie trwania reakcji, a nie po jej zakończeniu (ryc. 2). W początkowych cyklach obserwujemy niski poziom fluorescencji – tło (background), a potem wzrost stężenia amplikonów powoduje wzrost poziomu fluorescencji, aż do osiągnięcia wartości progowej (Ft, fluorescencje threshold). Od cyklu progowego (Ct, cycle threshold) rozpoczyna się faza logarytmiczna amplifikacji. Im więcej kopii powielanej sekwencji znajduje się w próbce, tym mniej cykli potrzeba, by fluorescencja osiągnęła Ft (3, 7).

Metody wykrywania produktów w real-time PCR dzieli się na swoiste (zależne od sekwencji matrycy) i nieswoiste (niezależne od sekwencji matrycy). W obu grupach używa się barwników fluorescencyjnych, przy czym są one związane ze starterami i/lub sondami lub też występują jako wolne w mieszaninie reakcyjnej.

Przy wykorzystaniu swoistych metod detekcji wymagane jest posiadanie specjalnych starterów lub sond DNA, np. TaqMan MGB. Niezbędna jest specjalistyczna wiedza, aby je zaprojektować (3, 7).

Do nieswoistych metod wykrywania i ilościowego oznaczania produktów qPCR należą techniki, które wykorzystują barwniki mniej toksyczne, ale bardziej specyficzne i czułe niż bromek etydyny. Są to m.in. SYBR Green I i YO-PRO 1, które przyłączają się do dsDNA (3, 7).

Najczęściej stosowany SYBR Green I to asymetryczny związek cyjaninowy, który ma możliwość niespecyficznego wiązania się do małej bruzdy helisy DNA. Niezwiązany barwnik nie wykazuje fluorescencji, a wraz ze wzrostem stężenia produktów PCR wzrasta proporcjonalnie liczba cząsteczek fluorochromu związanego z dsDNA i rejestrowany jest wzrost poziomu fluorescencji. Technika z wykorzystaniem SYBR Green I jest najbardziej ekonomiczna, prosta i uniwersalna

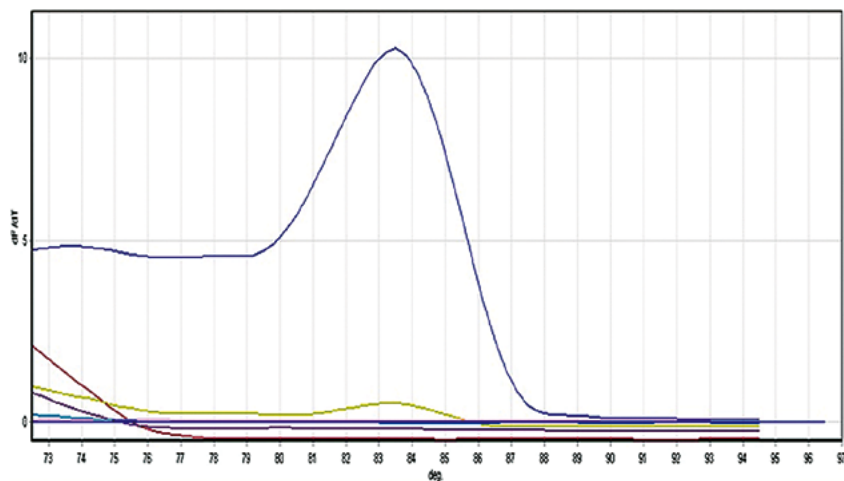
– umożliwia zastosowanie dowolnej pary starterów i matryc. Jednocześnie jest wystarczająco czuła, aby wykryć pojedynczą kopię DNA w mieszaninie reakcyjnej. Wadą barwnika SYBR Green I (podobnie jak bromku etydyny) jest interkalacja każdej dwuniciowej cząsteczki DNA, w tym dimerów starterów i niespecyficznych produktów reakcji. W związku z tym istnieje niebezpieczeństwo uzyskania fałszywie pozytywnych lub zawyżonych wyników. Temperatura topnienia (Tm) specyficznego dla danej reakcji produktu jest zwykle wyższa niż Tm dimerów starterów. W celu potwierdzenia swoistości uzyskanego amplikonu analizuje się krzywe topnienia (ryc. 3).

Materiał genetyczny bakterii wykryty za pomocą reakcji PCR lub hybrydyzacji DNA można poddać sekwencjonowaniu. Obecnie jest to metoda molekularna najczęściej stosowana do identyfikacji bakterii, która umożliwia wykrywanie zmian pojedynczych nukleotydów w materiale genetycznym. Ustalenie rodzaju i kolejności nukleotydów zawartych w kwasach nukleinowych drobnoustrojów umożliwiło stworzenie banku genów oraz klonowanie fragmentów ich DNA (3, 7).

Niestety najnowsze metody molekularne wymagają dużych nakładów finansowych, czasu i odpowiednio przeszkolonego personelu. Jednakże dzięki nim nauka ciągle się rozwija, a diagnostyka bakteriologiczna jest na coraz wyższym poziomie.

Bakteryjny rybosom – czym jest 16S?

Rybosom jest kompleksem utworzonym z białek i RNA, w obrębie którego zachodzi synteza białek z aminokwasów na matrycy mRNA (translacja), przy udziale tRNA. Rybosomy bakteryjne utworzone są z dużej podjednostki 50S i małej podjednostki 30S. Małą podjednostkę z kolei tworzą rybosomalne 16S RNA



Ryc. 3. Krzywa topnienia produktów qPCR

i 20 białek. Umożliwia ona „czytanie” mRNA. W skład dużej podjednostki wchodzi 23S rybosomalne RNA, 5S rybosomalne RNA i 30 białek.

Rybosomalne 16S RNA jest częścią małej podjednostki 30S rybosomu organizmów prokariotycznych, kodowaną przez konserwatywny gen *16S rRNA* określany także mianem *16S RNA*, lub *rrs* (8). Gen ten występuje u wszystkich gatunków bakterii w różnej liczbie kopii (9). Jest utworzony z 1500 nukleotydów i zawiera 9 hiperzmiennych regionów. Teoretycznie detekcja wspomnianego genu za pomocą technik molekularnych pozwala na identyfikację wszystkich gatunków bakterii. Co więcej, analiza sekwencji nukleotydowych genu *16S RNA* umożliwia: określenie zmian, jakie zachodzą na przełomie lat w genomie bakterii, analizę ewolucji drobnoustrojów oraz aktualizowanie ich taksonomii (10).

Wydaje się więc, że gen *16S RNA* jest dobrym markerem molekularnym dla badań bakteriologicznych. Techniki PCR oparte na wykrywaniu jego sekwencji w analizowanym materiale mają jednak pewne takie same, niezależnie od laboratorium, ograniczenia. Po pierwsze, koszt badań molekularnych, pomimo tego, że z roku na rok spada, w porównaniu z tradycyjnymi technikami mikrobiologicznymi jest wciąż wysoki. Inną przyczyną ograniczającą stosowanie tych badań to konieczność posiadania specjalistycznej aparatury do przeprowadzenia amplifikacji, która w przypadku prowadzenia badań nad filogenezą bakterii i ich ewolucją powinna zostać wzbogacona o sekwenatory DNA oraz odpowiednie programy komputerowe do obróbki sekwencji nukleotydowych genów.

Czynnikami ograniczającym czułość PCR może być mała objętość badanej próbki, która z reguły wynosi zaledwie kilka mikrolitrów (z reguły jest to objętość 1–5 µl).

Powoduje to, że ilość kopii bakteryjnego DNA w takiej objętości jest mała, i chociaż czułość PCR jest wysoka (teoretycznie technika ta pozwala wykryć już 1 do 5 kopii badanego genu w próbce), może być przyczyną wyników fałszywie ujemnych (9).

Inny problem stanowi uzyskiwanie wyników fałszywie pozytywnych badania. Sytuacja taka może być konsekwencją zanieczyszczenia badanej próbki. Aby ograniczyć niebezpieczeństwo uzyskania tego typu rezultatów, konieczne jest wykorzystywanie do reakcji łańcuchowej polimerazy odpowiednio czystych odczynników, tzw. DNA free, a także sprzętu (pipet, końcówek do pipet) przeznaczonych tylko do PCR. Aby mieć pewność, że podczas PCR nie doszło do zanieczyszczenia próbki, reakcja ta powinna być zawsze prowadzona z zastosowaniem kontroli pozytywnej i negatywnej. Kontrolę pozytywną stanowi wzorcowe DNA badanego drobnoustroju, z kolei kontrolę negatywną materiał pozbawiony DNA bakterii (np. czysta woda). Uzyskanie dodatniego wyniku reakcji dla kontroli pozytywnej oraz ujemnego dla kontroli negatywnej jest gwarantem, że reakcja została przeprowadzona właściwie, a uzyskane wyniki są wiarygodne (6).

Kiedy badanie PCR wykrywające gen *16S RNA* ma wartość diagnostyczną w bakteriologii?

Podstawę diagnostyki mikrobiologicznej stanowi w dalszym ciągu rutynowe badanie bakteriologiczne obejmujące hodowlę drobnoustrojów na odpowiednich podłożach, ich charakterystykę fenotypową (barwienie, ocena morfologii, zdolność wzrostu na odpowiednich podłożach, właściwości biochemiczne). Niemniej jednak w wielu przypadkach czułość tych metod jest z różnych powodów zbyt niska i nie pozwala na pełną identyfikację wyizolowanych drobnoustrojów.

W takiej sytuacji alternatywę stanowi badanie molekularne polegające na amplifikacji i sekwencjonowanie genu *16S rRNA* drobnoustrojów oraz porównanie jego sekwencji z sekwencjami mikroorganizmów dostępnymi w banku genów. Dzięki tak przeprowadzonej analizie możliwa staje się identyfikacja rodzaju i gatunku bakterii (11). Tego typu badania cechuje wyższa czułość w porównaniu ze standardowym badaniem bakteriologicznym, która w dużej mierze uzależniona jest od długości analizowanego genu. Im dłuższy jest fragment badanego genu, tym z reguły czułość metod molekularnych jest niższa. Jest wiele prac potwierdzających czułość PCR dla genu *16S RNA* w identyfikacji rodzaju i gatunku bakterii. W jednej z nich spośród 136 szczepów tlenowych bakterii Gram-dodatnich, których nie udało się zidentyfikować tradycyjnymi metodami bakteriologicznymi, techniką PCR przynależność do rodzaju określono dla 52,2% z nich. Według Bossharda i wsp. (12) 16S PCR pozwala na identyfikację gatunkową 65,4% badanych szczepów bakteryjnych oraz na identyfikację rodzajową 97% drobnoustrojów. Wartości te niewątpliwie robią wrażenie, niemniej jednak pamiętać należy, że różnice i zmienność sekwencji omawianego genu mogą ograniczać identyfikację niektórych gatunków, jak jest w przypadku gronkowców (*Streptococcus mitisi*, *Streptococcus pneumoniae*), niektórych enterobakterii (*Escherichia coli* i *Shigella* spp.), czy *Bacillus* spp. (*Bacillus cereus*, *B. anthracis*) (10, 13). W tych przypadkach do identyfikacji drobnoustrojów wskazane jest wykorzystanie innych genów aniżeli *16S RNA*, jak np. *rpoB*, *recA*, *tuf*, *gyrA*, *gyrB* (geny te posiadają zmienne sekwencje nukleotydowe, otoczone jednak przez sekwencje konserwatywne, przez co nadają się również jako markery diagnostyczne (6).

Bywa także, że niektóre gatunki bakterii posiadają kilka kopii genu *16S rRNA*, wykazujących pewne zróżnicowanie sekwencji (9). Sekwencja omawianego genu może także być różna na poziomie szczepu i podgatunku bakterii, przy czym zmienność ta jest na ogół nieznaczna i wynosi około 0,5%, co raczej nie powinno wpływać na wyniki amplifikacji i analizy filogenetycznej (14).

Obok zastosowania w rutynowej diagnostyce bakteriologicznej, gen *16S rRNA* wykorzystywany może być do wykrywania nowych gatunków bakterii. W tym celu prowadzona jest charakterystyka fenotypowa i genotypowa potencjalnych kandydatów do nowego gatunku (14). Stacekbrandt (15) ustalił, że do opisu nowego gatunku bakterii konieczne jest przedstawienie pełnej sekwencji genu kodującego 16S rRNA. Niestety do chwili obecnej nie

określono, jakiego rzędu różnice w sekwencji 16S rRNA muszą pojawić się w rozpatrywanych jako nowy gatunek drobnoustrojów, by uznać je za takowy. Wydaje się, że poziom homologii sekwencji nukleotydowych 16S poniżej 97% pozwala rozważać dane bakterie jako nowy gatunek (10, 14).

Wykorzystanie 16S RNA do identyfikacji bakterii pozwoliło wykazać nowe ich gatunki i szczepy. Potwierdzeniem tego wniosku mogą być badania przeprowadzone przez Drancourta i wsp. (16). Badacze ci przeprowadzili analizę molekularną 1404 izolatów bakterii, w przypadku których tradycyjne metody badania bakteriologicznego nie pozwoliły na ich identyfikację. Bazując na homologii sekwencji genu 16S, wykazano, że przy podobieństwie wyższym niż 99% do sekwencji wzorcowej dostępnej w bazie danych, dany izolat należy uznać za szczep opisanego już gatunku drobnoustrojów. Podobieństwo rzędu 97–99% umożliwiło przypisanie danego izolatu do rodzaju bakterii, natomiast przy homologii niższej aniżeli 97% można było mówić o pojawieniu się nowych gatunków drobnoustrojów. Badania wspomnianych autorów pozwoliły wykazać 11 nowych gatunków drobnoustrojów, ale co bardziej istotne potwierdziły, że 16S PCR doskonale nadaje się do analizy różnorodności mikroorganizmów. Te i inne badania zdają się potwierdzać wyżej przedstawione stwierdzenie, że przy homologii genu 16S badanego izolatu bakterii z wzorcem, wynoszącej co najmniej 97%, badany izolat można zakwalifikować do określonego rodzaju, natomiast, gdy wynosi ona 99% – do określonego gatunku bakterii (9). W tym miejscu należy jednak zwrócić uwagę, że stopień podobieństwa ustalany procentowo różni się w zależności od analizowanego odcinka genu (długości badanego fragmentu genu), a także od stosowanego programu komputerowego do obróbki i analizy sekwencji (14).

16S PCR a konwencjonalne badanie bakteriologiczne

Badania molekularne nie mogą i nie powinny w pełni zastąpić rutynowych badań bakteriologicznych (choćby z uwagi na fakt, że przy ich pomocy nie można określić antybiotykowrażliwości wyizolowanych szczepów drobnoustrojów, co jest niezwykle przydatne w praktyce klinicznej). Powinny natomiast stanowić ich uzupełnienie. Przewagą PCR nad rutynowym badaniem bakteriologicznym jest m.in. to, że technika ta razem z sekwencjonowaniem uzyskanych w PCR amplikonów pozwala na wykrycie zakażeń i identyfikację bakterii, których hodowla jest trudna i długotrwała, jak np. *Mycobacterium* spp.,

Coxiella burnetii, *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Francisella tularensis*, *Mycoplasma* spp.), bądź niemożliwa do przeprowadzenia np. z powodu wcześniej przebytej antybiotykoterapii.

W praktyce klinicznej z badań molekularnych stosunkowo często korzysta się w celu szybkiej identyfikacji drobnoustrojów trudnych w hodowli, a będących przyczyną ciężkich, zagrażających życiu zakażeń (niejednokrotnie szpitalnych) dotyczących układu sercowo-naczyniowego, nerwowego czy kostnego (6).

Podsumowanie

16S PCR wydaje się cennym narzędziem w diagnostyce bakteriologicznej. Pomimo tego, że metoda ta wykorzystywana jest w diagnostyce już od dłuższego czasu, nie można powiedzieć, iż uległa ona dezaktualizacji. Wystarczy, że porównamy jej czułość z wykorzystywaną w ostatnim czasie i zyskującą na popularności metodą spektrometrii mas, pozwalającą na jeszcze szybszą niż w przypadku PCR identyfikację izolatów drobnoustrojów wyhodowanych w laboratoriach mikrobiologicznych (17). Chociaż pierwsza z wymienionych uznawana jest za czułą i stosunkowo tanią (jeżeli chodzi o koszt badania), to wyniki Bizzini i wsp. (18) wskazują, że mniej niż połowę szczepów bakteryjnych zidentyfikowanych na podstawie 16S RNA udaje się zidentyfikować przy użyciu spektrometrii mas. Technika ta ponadto zawodzi w rozpoznawaniu takich bakterii, jak: gronkowce, pneumokoki, bakterie grupy HACEK czy *Shigella* spp. (2).

Z obserwacji tych wynika, że nawet jeśli 16S PCR ma pewne ograniczenia, to i tak stanowi niezwykle czułą technikę, która doskonale nadaje się do diagnostyki zakażeń bakteryjnych zarówno u ludzi, jak i zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Cyniak-Magierska A., Brzezianka E., Lewiński A.: Łańcuchowa reakcja polimerazy – rodzaje, metodyka i zastosowanie. *Endokrynol. Pol.* 2000, **51**, 159–167.
2. Chabros Ł., Przybylski M., Dzieciatkowski T., Łuczak M.: Modyfikacja i optymalizacja metod PCR do wykrywania regionu MIE ludzkiego herpeswirusa typu 5. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2008, **60**, 79–86.
3. Adaszek Ł., Ziętek J., Dziegiel J., Winiarczyk S.: *Wirusologia – przewodnik do ćwiczeń*. Wyd. UP w Lublinie, 2013.
4. Cyniak-Magierska A., Brzezianka E., Lewiński A.: Łańcuchowa reakcja polimerazy – rodzaje, metodyka i zastosowanie. *Endokrynol. Pol.* 2000, **51**, 159–167.
5. Mullis K.B.: The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 1990, **262**, 56–61.
6. Renouvois A., Brossier F., Sougakoff W., Jarlier V., Aubry A.: Broad-range PCR: past, present, or future of bacteriology? *Med. Mal. Infect.* 2013, **43**, 322–330.
7. Studzińska A., Tyburski J., Dąca P., Tretyn A.: PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategii monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia* 2008, **1**, 71–85.
8. Clarridge III J.E.: Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004, **17**, 840–862.

9. Petti C.A.: Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin. Infect. Dis.* 2007, **44**, 1108–1114.
10. Janda J.M., Abbott S.L.: 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 2007, **45**, 2761–2764.
11. Petti C.A., Polage C.R., Schreckenberger P.: The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J. Clin. Microbiol.* 2005, **46**, 6123–6125.
12. Bosshard P.P., Abels S., Zbinden R., Böttger E.C., Altwegg M.: Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *J. Clin. Microbiol.* 2003, **41**, 4134–4140.
13. Mignard S., Flandrois J.P.: 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J. Microbiol. Methods* 2006, **67**, 574–581.
14. Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J.: Reevaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, **3**, 733–739.
15. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kämpfer P., Maiden M.C.J.: Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002, **52**, 1043–1047.
16. Drancourt M., Berger P., Raoult D.: Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**, 2197–2202.
17. Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La S.B., Fournier P.E., Rolain J.M.: Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 2009, **49**, 543–551.
18. Bizzini A., Jatón K., Romo D., Bille J., Prod'homme G., Greub G.: Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J. Clin. Microbiol.* 2011, **49**, 693–696.

Dr hab., prof. UP Łukasz Adaszek, Klinika Chorób Zakaźnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin, e-mail: ukaszek0@wp.pl