



NOWA METODA WYDAJNEJ IZOLACJI DNA PATOGENÓW Z KRWI

(PROJEKT NR P-168)

Oferta dotyczy nowej metody izolacji DNA drobnoustrojów z krwi z wykorzystaniem lizy mechanicznej, termicznej i enzymatycznej. Metoda została zoptymalizowana pod kątem wykrywania zakażeń krwi przez bakterie oraz grzyby chorobotwórcze i umożliwia szybkie uzyskanie wysokiej jakości materiału do diagnostyki molekularnej techniką PCR.

Mikrobiologiczna diagnostyka krwi jest jednym z najbardziej problematycznych wyzwań diagnostycznych. Obecność we krwi bakterii (bakteriemia) lub grzybów (fungemia) bardzo często skutkuje sepsą, czyli ogólnoustrojowym stanem zapalnym wywołanym zakażeniem. Sepsa stanowi jeden z najbardziej palących problemów współczesnej medycyny. Śmiertelność powodowana przez zakażenia krwi o etiologii bakteryjnej czy grzybiczej jest bardzo duża. W USA z powodu sepsy umiera rocznie ponad 200 tys., w Unii Europejskiej – ok. 150 tys. osób. W krajach rozwiniętych u 2-4/1000 żywo urodzonych dzieci rozwija się sepsa i jest ona główną przyczyną ich śmierci.

W leczeniu zakażeń krwi najważniejszym i najtrudniejszym problemem decydującym o skuteczności terapii i, w konsekwencji, o kosztach i czasie hospitalizacji jest skuteczna diagnostyka czynników wywołujących ogólnoustrojową odpowiedź zapalną w przebiegu sepsy. Oznaczenie czynnika etiologicznego pozwala na zastosowanie skutecznej, celowanej antybiotykoterapii. Materiałem poddawanym badaniu diagnostycznemu jest krew pobrana od pacjenta posiadającego objawy kliniczne sepsy. Obecnie „złotym standardem” diagnostycznym jest metoda hodowli drobnoustrojów obecnych we krwi prowadzona na specjalnych podłożach specyficznych dla określonych grup patogenów. Metoda ta jest stosunkowo prosta i niedroga, ale czasochłonna – oczekiwanie na wynik może sięgać 5 dni. Ponadto identyfikacja patogenów tą metodą często zawodzi ze względu na niską czułość i jedynie w ok. 15-20% hodowli udaje się uzyskać wzrost mikroorganizmów.

W celu poprawienia wykrywalności czynników mikrobiologicznych we krwi rozwijane są molekularne metody detekcji oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, ang. *Polymerase Chain Reaction*). Ich czułość znacznie przewyższa czułość metody hodowlanej, a ponadto na wynik badania nie ma wpływu wcześniejsze zastosowanie antybiotykoterapii. Pozwala to wdrożyć leczenie natychmiast, jeszcze przed pobraniem próbek krwi do analizy. Niestety, metody biologii molekularnej również wykazują ograniczenia. Trudność sprawia wyizolowanie matrycy DNA o odpowiedniej jakości i wysokim stężeniu. Komórki bakterii i grzybów charakteryzują się zróżnicowaną podatnością na lizę, która jest niezbędnym etapem pozyskania z nich DNA. W przypadku bakterii ściana komórkowa u gatunków z grupy bakterii Gram dodatnich jest grubsza i odporna na degradację, co powoduje konieczność zastosowania specjalnej lizy enzymatycznej (lizozym, mutanolizyna i/lub lizostafina). Z kolei ściana komórkowa grzybów wykazuje zupełnie odmienny skład chemiczny niż ściana bakteryjna, a standardowe postępowanie stosowane w przypadku bakterii zawodzi. Ponadto grzyby drożdżopodobne różnią się budową ściany komórkowej od grzybów pleśniowych, co znacznie komplikuje proces izolacji DNA.

Dodatkową trudność sprawia obecność we krwi hemu, który jest silnym inhibitorem polimeraz DNA używanych w metodzie PCR. Większość dostępnych procedur preparatyki krwi nie pozwala na całkowite usunięcie efektu hamowania reakcji PCR, co w konsekwencji może prowadzić do uzyskania wyniku fałszywie negatywnego. Istnieją co prawda sposoby na ograniczenie hamującego wpływu hemu na tę reakcję, m.in. z użyciem albuminy wołowej, glicerolu czy dekstranu, jednak powodują one zmniejszenie czułości metody PCR i ograniczenie jej skuteczności diagnostycznej.



Przedmiotem oferty jest nowy sposób izolowania DNA drobnoustrojów z krwi, mający na celu uzyskanie wysokiej jakości matrycy do reakcji PCR. Prezentowana metoda może być stosowana w pełnej wersji, w wyniku której izoluje się DNA bakterii i grzybów, jak również w wariantach ograniczonych, w celu uzyskania DNA tylko bakterii lub tylko grzybów.

Podstawowe zalety proponowanej metody to:

- połączenie lizy enzymatycznej, lizy mechanicznej oraz termicznej,
- zmniejszenie do minimum stężenia hemu w próbce, dzięki czemu reakcja PCR nie jest hamowana,
- brak konieczności używania specjalnych chemicznych protektorów polimerazy DNA,
- zwiększenie czułości detekcji mikroorganizmów we krwi (detekcja już od 100 CFU/ml krwi),
- uproszczona metodyka izolacji DNA,
- zmniejszenie kosztów metody.

Oferowana metoda izolacji DNA stanowi przedmiot zgłoszenia patentowego. Dalsze prace nad rozwojem metod diagnostyki molekularnej są prowadzone w Katedrze Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, a Centrum Innowacji, Transferu Technologii i Rozwoju Uniwersytetu poszukuje podmiotów zainteresowanych komercyjnym wykorzystaniem wynalazku.

Szczegółowej informacji w sprawie udzieli:

Centrum Transferu Technologii CITTRU UJ:

dr Klaudia Polakowska

tel. +48 12 664 42 13, 519 329 129, klaudia.polakowska@uj.edu.pl