

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Instytut Biologii Medycznej

Polskiej Akademii Nauk



Anna Bogumiła Kubiak

**„Genetyczna analiza epidemiologiczna
patogennych szczepów *Escherichia coli*”**

Promotor rozprawy doktorskiej

dr hab. Paweł Parniewski, prof. IBM PAN

Łódź 2014

Praca została wykonana pod kierunkiem dr. hab. Pawła Parniewskiego, prof. IBM PAN, w Pracowni Genetyki Molekularnej Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi.

Badania były finansowane w ramach projektu POIG.01.01.02-10-107/09 realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, lata 2007-2013 „Badanie mechanizmów molekularnych na styku organizm ludzki – patogen – czynniki środowiska” (InterMolMed).



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Autoreferat rozprawy doktorskiej

ŻYCIORYS NAUKOWY ANNY BOGUMIŁY KUBIAK

WYKSZTAŁCENIE:

- data uzyskania tytułu naukowego: 6 listopada 2009 – tytuł magistra inżyniera, Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, tytuł pracy: „Interakcje pomiędzy *Brochothrix thermosphacta* a mikroflorą zanieczyszczającą mięso”

PUBLIKACJE:

- **Kubiak A. B.**, Wojtasik A., Augustynowicz-Kopeć E., Zabost A., Zwolska Z., Parniewski P., TRS-PCR based genotyping of *Mycobacterium kansasii*, Postępy Nauk Medycznych, 2011, Vol. 24, No. 10, 846-852
- Wojtasik A., **Kubiak A. B.**, Krzyżanowska A., Majchrzak M., Augustynowicz-Kopeć E., Parniewski P., Comparison of the (CCG)₄-based PCR and MIRU-VNTR for molecular typing of *Mycobacterium avium* strains, Mol Biol Rep., 2012, 39, 7681-7686, IF=2,929
- Majchrzak M., Krzyżanowska A., **Kubiak A. B.**, Wojtasik A., Wołkowicz T., Szych J., Parniewski P., TRS-based PCR as a potential tool for inter-serovar discrimination of *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Hadar*, *S. Newport* and *S. Anatum*, Mol Biol Rep. 2014, 41(11), 7121-32, IF=2,51

KOMUNIKATY I DONIESIENIA ZAJAZDOWE:

- M. Majchrzak, A. Wojtasik, A. Krzyżanowska, **A. B. Kubiak**, P. Parniewski, TRS Based PCR as a Tool for Discrimination of Intestinal *Escherichia coli* Strains, BioForum 2011 - 10th Central European and Asian Biotechnology Exchange, 11-12.05.2011, Łódź, Polska
- A. Wojtasik, M. Majchrzak, **A. B. Kubiak**, A. Krzyżanowska, J. Dziadek, P. Parniewski, Application of Trinucleotide Repeat Sequence- based PCR for Molecular Typing of *Mycobacterium gordonae* Strains, BioForum 2011 - 10th Central European and Asian Biotechnology Exchange, 11-12.05.2011, Łódź, Polska
- **A. B. Kubiak**, A. Wojtasik, A. Krzyżanowska, M. Majchrzak, E. Augustynowicz-Kopeć, P. Parniewski, TRS-PCR genotyping of *Mycobacterium kansasii*, 7th European Meeting on Molecular Diagnostics, 12-14.10.2011, Haga, Holandia
- A. Krzyżanowska, M. Majchrzak, **A. B. Kubiak**, A. Wojtasik, P. Parniewski, TRS-PCR genotyping of intracellular pathogens – *Salmonella enterica* serovars, 7th European Meeting on Molecular Diagnostics, 12-14.10.2011, Haga, Holandia
- **Anna B. Kubiak**, Marta Majchrzak, Anna Krzyżanowska, Arkadiusz Wojtasik, M. Alexander Schmidt, Inga Benz, Paweł Parniewski, „Molecular genotyping of human intestinal *E. coli* strains”, The 3rd Workshop on MICROBIOLOGY IN HEALTH AND ENVIRONMENTAL PROTECTION–MIKROBIOT 2013, 17-20.09.2013 r., Polska, Łódź
- Anna Krzyżanowska, Marta Majchrzak, **Anna B. Kubiak**, Arkadiusz Wojtasik, Tomasz Wołkowicz, Jolanta Szych, Paweł Parniewski, TRS-BASED PCR AS A POTENTIAL TOOL FOR INTER-SEROVAR GENOTYPING SALMONELLA ENTERITIDIS, TYPHIMURIUM, INFANTIS, VIRCHOW, HADAR, NEWPORT AND ANATUM, The 3rd Workshop on MICROBIOLOGY IN HEALTH AND ENVIRONMENTAL PROTECTION–MIKROBIOT 2013, 17-20.09.2013 r., Polska, Łódź
- **Anna B. Kubiak**, Marta Majchrzak, Anna Krzyżanowska, Arkadiusz Wojtasik, Arezoo Fattahi Mehr, Inga Benz, M. Alexander Schmidt, Paweł Parniewski, Molecular genotyping of human pathogenic *E. coli* strains, 10th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers, 2-5.10.2013 r., Paryż, Francja
- Anna Krzyżanowska, Marta Majchrzak, **Anna B. Kubiak**, Arkadiusz Wojtasik, Tomasz Wołkowicz, Jolanta Szych, Paweł Parniewski, TRS-based PCR as a potential tool for inter-serovar genotyping *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars, 10th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers, 2-5.10.2013 r., Paryż, Francja
- Marta Majchrzak, Anna Krzyżanowska, **Anna B. Kubiak**, Arkadiusz Wojtasik, Paweł Parniewski, VNTR-175 – a novel tool for differentiation of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*?, 10th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers, 2-5.10.2013 r., Paryż, Francja

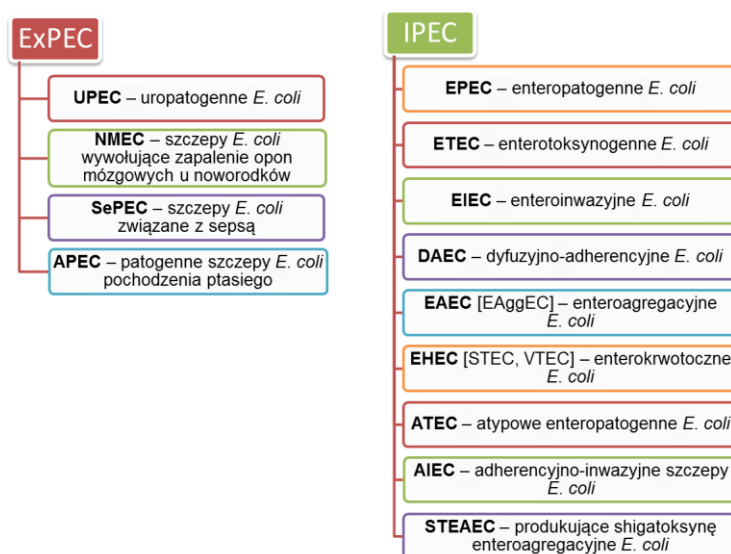
UDZIAŁ W PROJEKTACH BADAWCZYCH:

- projekt nr POIG 01.01.02-10107/09 „Badania mechanizmów molekularnych na styku organizm ludzki – patogen – czynniki środowiska (InterMolMed)”

Autoreferat rozprawy doktorskiej

WPROWADZENIE

Escherichia coli jest niezmiernie różnorodnym gatunkiem pałeczek jelitowych, który w zależności od miejsca występowania, profilu patogenności oraz miejsca i rodzaju wywołanego schorzenia, może zostać podzielony na trzy główne grupy. Komensalne, czyli jelitowe niepatogenne szczepy *E. coli*, są częścią naturalnej mikroflory jelitowej człowieka i rzadko są przyczyną zachorowań. Oprócz komensalnych szczepów *E. coli*, ogromne znaczenie mają szczepy patogenne, które przyczyniają się do dużej liczby zatruc pokarmowych, schorzeń urologicznych oraz wywołują poważne choroby, niekiedy zagrażające życiu, czy wręcz prowadzące do zgonu pacjenta. Patogenne szczepy *E. coli* można podzielić na dwie zasadnicze grupy – szczepy wywołujące zakażenia jelitowe (ang. intestinal pathogenic *E. coli*, IPEC), będące bezwzględными patogenami oraz na grupę szczepów wywołujących zakażenia pozajelitowe (extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC), które są fakultatywnymi patogenami. Patotypy różnicuje się dalej w podgrupy – subpatotypy, które wiążą się z konkretnymi schorzeniami oraz charakteryzują się obecnością lub brakiem określonych czynników patogenności, ściśle związanych z ich patogenezą. Podział na patotypy i subpatotypów patogennych szczepów *E. coli* przedstawia Rysunek Nr 1.



Rysunek Nr 1. Podział patogennych szczepów *E. coli*

Duża plastyczność genomowa szczepów z gatunku *E. coli*, przyczynia się do nabywania przez niektóre szczepy specyficznych cech związanych z patogennością. Efektem jest wzrost ich zdolności do adaptacji i rozwoju w nowych niszach, a także wywoływaniem szerszego spektrum chorób. Czynniki wirulencji są często kodowane na ruchomych elementach genetycznych, które mogą być przenoszone między szczepami, przyczyniając się tym samym do stworzenia nowego profilu wirulencji. Zestawy czynników patogenności

Autoreferat rozprawy doktorskiej

najbardziej sprzyjające zakażeniom utrzymują się w puli genowej szczepów, stając się specyficznymi dla różnych patotypów *E. coli*. Zestawienie wybranych, najważniejszych czynników wirulencji patogennych szczepów *E. coli* przedstawia Tabela Nr 1.

SUBPATOTYP	PATOTYP	GRUPA FILOGENETYCZNA (wg. Clermont et. al.)	DOMINUJĄCE SEROTYPY „O”	SPECYFICZNE CZYNNIKI PATOGENNOŚCI	SCHORZENIA WYWOŁYWANE U LUDZI
UPEC	EXPEC	B2, D	O1, O2, O4, O6, O16, O18, O22, O25, O75	adhezyny fimbrialne (Pap, Sfa), adhezyny otoczkowe (AFA-family), toksyny (α -Hly, Cnf1, Cnf2), bakteriocyny (Usp), siderofory (aerobaktyna)	zakażenia układu moczowego
NMEC			RÓŻNE SEROTYPY	inwazyjne Ibes (<i>ibeA</i> , <i>ibeB</i> , <i>ibeC</i>)	zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków
SePEC				toksyny (α -Hly, Cnf1, Cnf2), adhezyny fimbrialne (Pap, Sfa), adhezyny otoczkowe (AFA-family), siderofory	sepsa (posocznica), bakteremia, zakażenia ogólnoustrojowe
EPEC	IPEC	A, B1, D	O18, O44, O86, O55, O25, O87, O111, O114, O124-O127, O128ab, O142	czynnik przylegania EPEC (plazmid EAF, adhezyna <i>bfpB</i>), intimina, wyspa patogenności LEE	śluzowe biegunki niemowląt, biegunki krwawe
ETEC			O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O92, O115, O128ac, O139, O148, O153, O159, O167	ciepłochwienne (LT-I, LT-II) i ciepłostabilne toksyny (ST-I, ST-Ia, ST-Ib, ST-II), adhezyny CFA/I, CFA/II, adhezyny tworzące wiązki	biegunki podróżnych, biegunki u dzieci (tzw. cholera dzieci)
EIEC			O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, O164	inwazyjna (InvE)	biegunki czerwono-podobne
DAEC			O75, O15, O126	toksyna podobna do ST (EAST toksyna), toksyna hemolizynopodobna, adhezyny otoczkowe (AFA-family)	chroniczne biegunki u dzieci, przewlekłe wodne biegunki dorosłych w krajach słabo rozwiniętych
EAEC [EAggEC]			RÓŻNE SEROTYPY w tym: O3, O15, O44, O51, O77, O78, O86, O91, O92, O111, O113, O123, O141, O146	małe fimbrialne adhezyny (AAF/HDA), gen aktywatora transkrypcji (<i>aggR</i>), toksyny (Pet, EAST1, ShET1), fimbrie agregująco-adherencyjne (AAF), mucynaza (Pic)	
EHEC [STEC, VTEC]			O157, O26, O48, O103, O104, O111, O145	ciepłostabilna cytolizyna werotoskyna (VT), afimbrialne adhezyny (Saa),	krwotoczne zapalenie jelita grubego (HC), zespół mocznicowo – hemolityczny (HUS)
ATEC			RÓŻNE SEROTYPY	wyspa patogenności LEE, utrata plazmidu EAF	biegunki u ludzi typowe w krajach rozwiniętych

Tabela Nr 1. Charakterystyka wybranych patotypów i subpatotypów *E. coli*

Patogeneza szczepów *E. coli* jest wieloetapowym procesem i składają się na nią między innymi: kolonizacja warstwy śluzowej nabłonka, unikanie mechanizmów obronnych gospodarza, namnażanie się a następnie uszkodzenie narządów, a w konsekwencji organizmu gospodarza. Wśród chorób ściśle związanych z patogennymi szczepami *E. coli* wyróżnić można biegunki, ostre stany zapalne, krwotoczne zapalenie jelita grubego, infekcje układu moczowego, infekcje ran chirurgicznych, posocznice, zespół hemolityczno-mocznicowy oraz zapalenie opon mózgowych.

Biorąc pod uwagę powszechność występowania *E. coli* oraz to, że trwająca cały czas ewolucja tego mikroorganizmu doprowadziła do powstania wszechstronnego gatunku zdolnego do kolonizacji i namnażania się w wielu środowiskach jak i możliwości bytowania w nich jako komensal, istnieje ciągła konieczność monitorowania zmian zachodzących w obrębie tego gatunku w celach epidemiologicznych.

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Według Światowej Organizacji Zdrowia na prawie 4,5 miliarda przypadków, zatrucia pokarmowe są przyczyną śmierci 1,9 miliona osób rocznie i pod względem śmiertelności zajmują trzecie miejsce wśród chorób dotykających ludność na całym świecie. Szacuje się, że tylko sześć gatunków bakterii, w tym *Escherichia coli*, powodują koszty ekonomiczne rzędu od 6,5 do 34,9 miliarda dolarów rocznie, z czego od 2,9 do 6,7 miliarda dolarów związane są z chorobami przenoszonymi poprzez skażoną żywność. Zakażenia szpitalne są także ważnym problemem klinicznym, stwarzającym zagrożenie dla zdrowia publicznego oraz bezpieczeństwa ludzi. Ważnym jest to, iż *E. coli* jest jednym z najczęściej izolowanych patogenów w przypadku zakażeń szpitalnych, w tym w przypadkach zakażeń krwi, również tych pierwotnych oraz w przypadku zatruc pokarmowych.

CELE PROWADZONYCH BADAŃ

Głównym celem prowadzonych badań było określenie skuteczności genetycznego różnicowania kolekcji jelitowych patogennych szczepów *E. coli* (IPEC) z wykorzystaniem testów $N_6(CGG)_4$ -PCR i $N_6(GTG)_4$ -PCR. Następnie porównanie wyników genotypowania otrzymanych dla kolekcji uropatogennych szczepów *E. coli* (UPEC) z wynikami dotyczącymi kolekcji IPEC. Kolejnym aspektem badań było zaprojektowanie testu wykorzystującego analizę obecności zidentyfikowanego elementu VNTR-COLI-175 (ang. variable number tandem repeats, zmienna liczba tandemowych powtórzeń) i określenie jego efektywności w różnicowaniu patogennych szczepów *E. coli*.

ZNACZENIE PROWADZONYCH BADAŃ

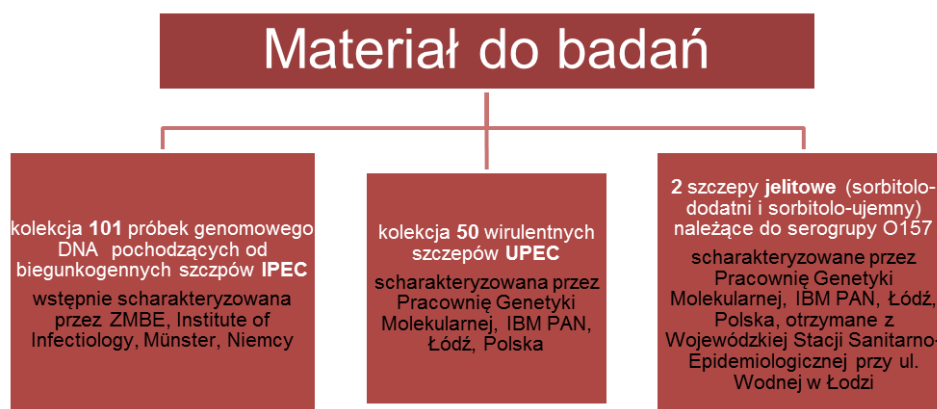
W aspekcie zdrowia ludzi i zwierząt, chorobotwórcze bakterie są ciągle wyzwaniem, a co więcej procesy ewolucji ich wirulencji pozostają niecałkowicie wyjaśnione, nawet w przypadku tak dobrze poznanego patogenu jak *Escherichia coli*. Różne subpatotypy powodują rozmaite rodzaje zmian patologicznych lub/i odmienne rodzaje infekcji dotyczących wielu narządów wewnętrznych czy też zakażeń ran. Taka różnorodność tego gatunku to tylko jedna z wielu ważnych klinicznie cech, a tym samym także trudność dla diagnostów i badaczy. Dodatkowym wyzwaniem w badaniach związanych z *E. coli* jest fakt, iż gatunek ten nieustannie ewoluuje, przysparzając tym samym kolejnych problemów w zrozumieniu i opisanu mechanizmów związanych z jego patogennością. Jest to efekt procesów związanych z plastycznością genomu *E. coli*. Możemy tutaj wymienić np. modyfikacje istniejących już genów oraz mechanizmy utraty i gwałtownego nabywania dodatkowych, przynoszących korzyści genów. Istnieje zatem realne zagrożenie, że pojawią

Autoreferat rozprawy doktorskiej

się nowe szczepy tego gatunku, które będą szkodliwe dla zdrowia człowieka. W związku z tym koniecznym staje się ciągle doskonalenie i rozszerzanie arsenału metod, które sprostają potrzebom molekularnego typowania bakteryjnych patogenów.

MATERIAŁ DO BADAŃ

Analizowane kolekcje szczepów zostały przedstawione na Rysunku Nr 2.



Rysunek Nr 2. Szczepy bakteryjne wykorzystane w toku prowadzonych badań

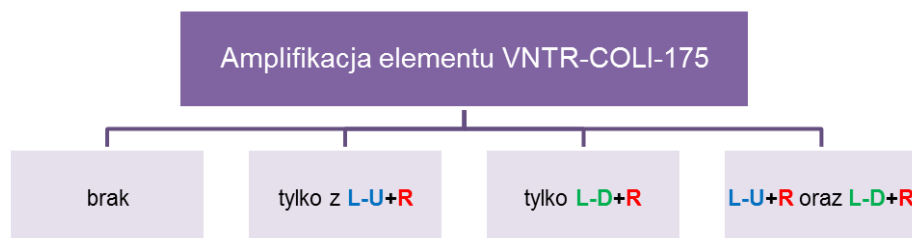
GLÓWNA ZASTOSOWANA METODYKA BADAŃ

W generowaniu profili prążkowych dla badanych kolekcji szczepów *E. coli* wykorzystano technikę TRS-PCR, która opracowana została w Pracowni Genetyki Molekularnej IBM PAN w Łodzi. Wykorzystany w toku badań test oparty jest na amplifikacji fragmentów DNA położonych pomiędzy trójnukleotydowymi sekwencjami powtarzającymi się, występującymi w genomach wielu bakterii, w tym *E. coli*. Wykorzystano dwa motywy TRS – CGG i GTG. Amplifikacji ulegają fragmenty położone pomiędzy traktami TRS od strony 5' na obu niciach DNA. Jeżeli motywy na obu niciach DNA znajdują się dostatecznie blisko siebie produkt amplifikacji powstanie. Jeśli zaś są zbyt daleko, amplifikacja takiego fragmentu nie będzie możliwa [Rysunek Nr 3A i 3B].



Rysunek Nr 3. Schemat reakcji TRS-PCR wykorzystującej obecność w genomie powtórzeń motywu CGG (A) oraz motywu GTG (B)

Analizy *in silico*, określające obecność i budowę nowego elementu VNTR-COLI-175 dla dostępnych sekwencji genomów *E. coli*, pozwoliły na opracowanie testu różnicującego szczepy *E. coli* co do budowy tego regionu VNTR. Różnorodność wariantów produktów reakcji PCR oraz różnice w długości otrzymanych produktów nasunęły ważną hipotezę, że motyw VNTR-COLI-175 jest rokujący jako dodatkowy marker różnicujący do testu TRS-PCR. Możliwe były do otrzymania cztery wyniki amplifikacji, które schematycznie przedstawiono na Rysunku Nr 4.



Rysunek Nr 4. Możliwe warianty amplifikacji elementu VNTR-COLI-175 dla *E. coli*

OTRZMANE WYNIKI I ICH DYSKUSJA

Wszystkie analizowane szczepy *E. coli* zostały scharakteryzowane co do przynależności do odpowiedniej grupy filogenetycznej, posiadanych czynników wirulencji typowych dla szczepów IPEC oraz typowych dla szczepów UPEC. Dla każdego z nich wygenerowano profile prążkowe w testach $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$ oraz przeprowadzono reakcję amplifikacji regionu VNTR-COLI-175.

Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że wśród badanych szczepów UPEC dominowały te należące do grupy filogenetycznej B2, natomiast w grupie szczepów IPEC dominowały te reprezentujące grupy filogenetyczne A i B1. Widać zatem, że wśród szczepów

Autoreferat rozprawy doktorskiej

UPEC dominowały izolaty z grupy filogenetycznej typowej na patotypu ExPEC, zaś wśród szczepów IPEC typowe dla szczepów pochodzenia jelitowego.

Rozważając wyniki analizy obecności czynników wirulencji typowych dla szczepów jelitowych w szczepach kolekcji UPEC stwierdzono, że 14% szczepów cechowało się obecnością tylko jednego czynnika wirulencji IPEC. Analiza współwystępowania tych poszczególnych profili wirulencji IPEC jak i UPEC pokazała, że nie da się w wyraźny sposób połączyć obecności badanych czynników wirulencji typowych dla szczepów uropatogennych wśród szczepów IPEC z konkretnym profilem wirulencji IPEC. Tym samym nie da się jej łączyć z obecnością lub brakiem poszczególnych czynników wirulencji IPEC. Analogicznie jest w przypadku szczepów UPEC. Porównywalną zależność zaobserwowano w przypadku szczepów sorbitolo-doatniego (K157+) i sorbitolo-ujemnego (K157-). Wykrycie czynników wirulencji IPEC u 14% szczepów UPEC oraz czynników wirulencji UPEC (z wyłączeniem typowego dla patogennych szczepów *E. coli fimG/fimH*) u 7,92% szczepów IPEC, potwierdza skłonność do nabywania różnych czynników wirulencji przez patogenne szczepy *E. coli*.

Domniemywać można zatem, że szczepy z kolekcji IPEC, które posiadają czynniki wirulencji UPEC, w sprzyjających okolicznościach mogą stać się potencjalnym czynnikiem etiologicznym infekcji związanych z układem moczowym.

Na podstawie testów TRS-PCR wykonano analizy podobieństw profili prążkowych dla tak otrzymanych amplikonów, zarówno dla szczepów IPEC jak i UPEC i IPEC łącznie. Wykonano także, niezbędną do oszacowania użyteczności testów $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$, analizę ich powtarzalności oraz wyznaczono współczynniki różnicowania (DI) badanych kolekcji szczepów *E. coli* [Tabela Nr 4]. Chcieliśmy także sprawdzić, czy zachodzą zależności pomiędzy określonymi profilami wirulencji a profilami prążkowymi wygenerowanymi w reakcjach TRS-PCR.

Rozważając różnicowanie szczepów należących do kolekcji IPEC za pomocą TRS-PCR można stwierdzić, iż testy $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$ cechowały się niemalże identyczną siłą dyskryminacji badanych izolatów [Tabela Nr 4]. Analizując strukturę dendrogramów, ilustrujących różnicowanie izolatów IPEC za pomocą zastosowanych analiz TRS-PCR, widać, że niemożliwe jest zaobserwowanie grupowania szczepów zgodnie z ich przynależnością subpatotypową [Rysunek Nr 5]. Na podstawie tych spostrzeżeń stwierdzono, że nie można rozdzielać, definiować i grupować szczepów IPEC według ich przynależności subpatotypowej za pomocą testów $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$ [Rysunek Nr 5]. Jednakże, wysokie wartości współczynników różnicowania

Autoreferat rozprawy doktorskiej

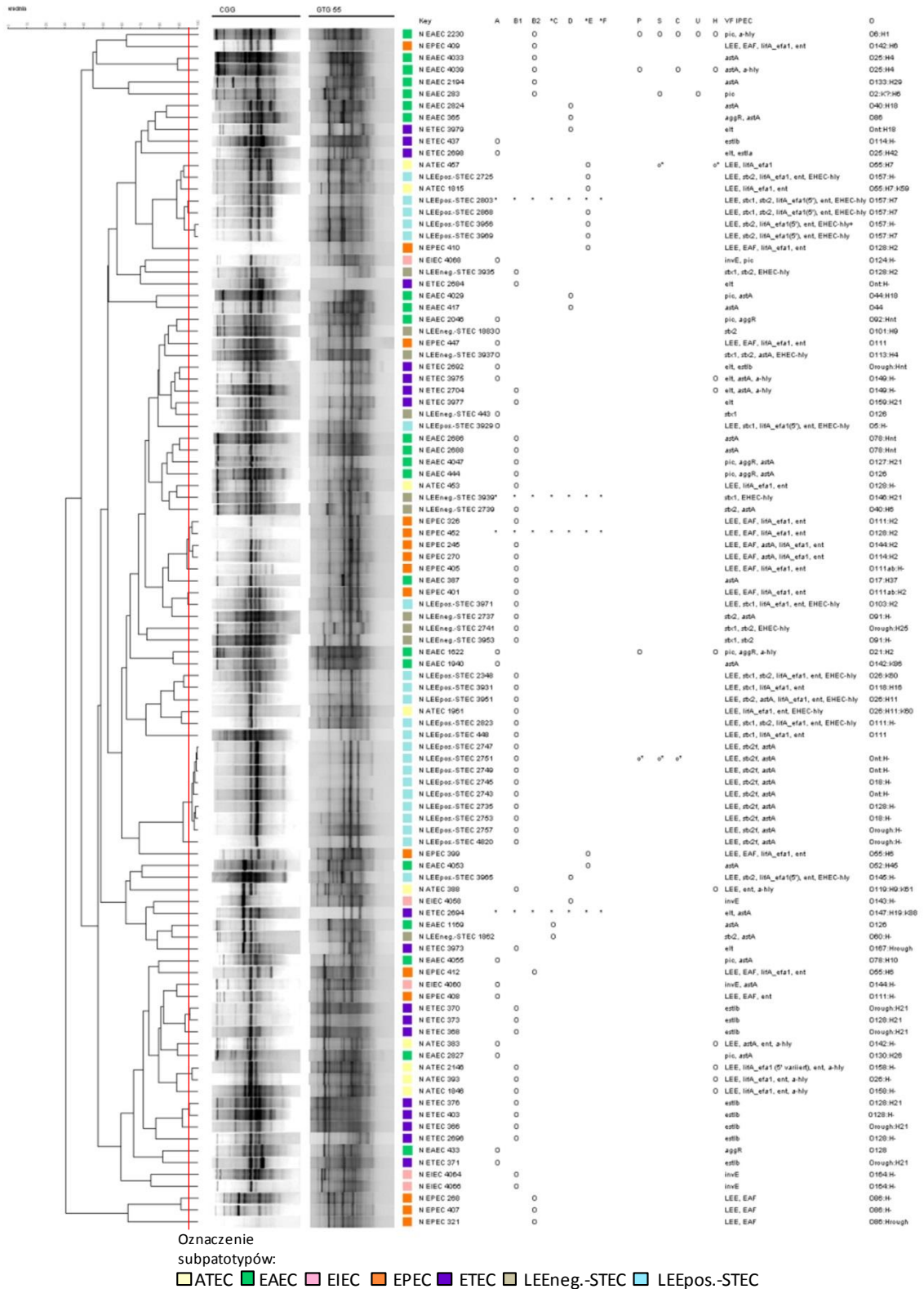
dla pojedynczych analiz TRS-PCR, jak i dla analizy uśrednionej implikują ich potencjalną użyteczność epidemiologiczną.

Tabela Nr 4. Analiza powtarzalności analiz $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$ (R) oraz stopnia różnicowania badanych izolatów *E. coli*

Rodzaj analizy	Powtarzalność analizy (R) [%]	Współczynnik różnicowania (DI) dla IPEC	Współczynnik różnicowania (DI) dla IPEC, UPEC oraz K175+ i K157-
$N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$	96,20	0,987	0,992
$N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$	95,00	0,985	0,986
uśredniona dla $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$	95,00*	0,990	0,996

*- przyjęta najniższa wartość powtarzalności (taka jak dla $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$)

Autoreferat rozprawy doktorskiej

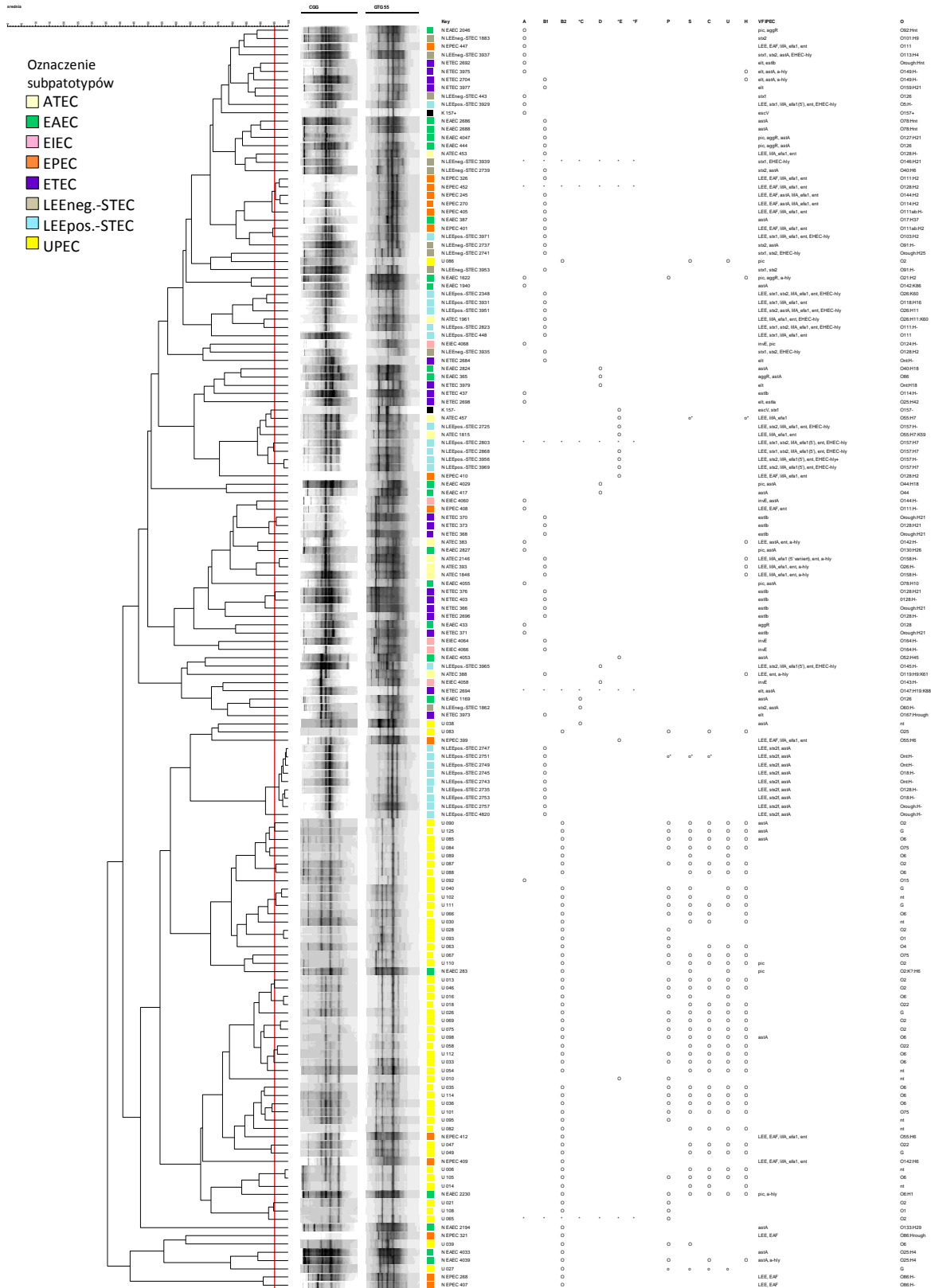


Rysunek Nr 5. Analiza uśredniona różnicowania szczepów IPEC dla $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$. Poszczególne subpatotypy oznaczono innymi kolorami. Czerwona linia – odcięcie wynikające z powtarzalności ($R=95,00\%$). Rysunek w większej rozdzielczości dołączony w materiałach dodatkowych na końcu rozprawy.

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Aby realnie ocenić potencjał różnicujący testów TRS-PCR, sprawdzono generowaną przez nie siłę różnicowania dwóch różnych grup patogenów *E. coli*, a mianowicie szczepów jelitowych i uropatogennych. Różnicowanie szczepów IPEC w zestawieniu z kolekcją UPEC zostało określone na podstawie testów $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$, $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$. Wykonano także analizę opartą na ich uśrednieniu. Podobnie jak dla poprzednich analiz z wykorzystaniem TRS-PCR, wyznaczone zostały współczynniki różnicowania szczepów [Tabela Nr 4]. Dla połączonej kolekcji szczepów IPEC i UPEC współczynniki różnicowania zarówno dla testu $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ jak i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$ osiągały wysokie wartości. Analizując dendrogram przedstawiony na Rysunku Nr 6 stwierdzono, że zastosowane testy TRS-PCR pozwalają na głębokie różnicowanie badanych izolatów IPEC i UPEC. Co więcej, taka analiza podobieństwa wygenerowanych profili prążkowych, ukazuje wysoką efektywność różnicowania takich szczepów testami $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$. Na dendrogramie przedstawiającym analizę podobieństw otrzymanych profili prążkowych widać silne i głębokie różnicowanie poszczególnych izolatów. Co więcej, widać także wyraźną tendencję do odgrupowywania się szczepów pochodzenia jelitowego od szczepów uropatogennych, które zgromadziły się w dwóch odrębnych klastrach [Rysunek Nr 6]. Powyższe obserwacje świadczą o użyteczności zastosowanej metody TRS-PCR nie tylko w różnicowaniu izolatów *per se*, ale także na różnicowaniu ich w aspekcie bycia patogenem jelitowym lub pozajelitowym. Powyższe obserwacje pozwalają na sformułowanie tezy, że zastosowana metoda TRS-PCR jest użyteczna w różnicowaniu szczepów pod kątem tego, czy są one patogenami jelitowymi, czy pozajelitowymi uropatogenami, a nie tylko w międzyszczepowej dywersyfikacji. Nabiera to tym większego znaczenia, gdy weźmiemy pod uwagę tak naświetlany ostatnio przez badaczy problem, jakim jest pojawianie się izolatów/wariantów pośrednich pomiędzy zdefiniowanymi już subpatotypami, czy patotypami. Testy $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$ mogłyby być zatem użyteczne w różnicowaniu takich izolatów, pomagając również w pewnym stopniu w określaniu ich pochodzenia lub ukazywaniu podobieństwa do patogenów jelitowych lub szczepów izolowanych z moczu.

Autoreferat rozprawy doktorskiej



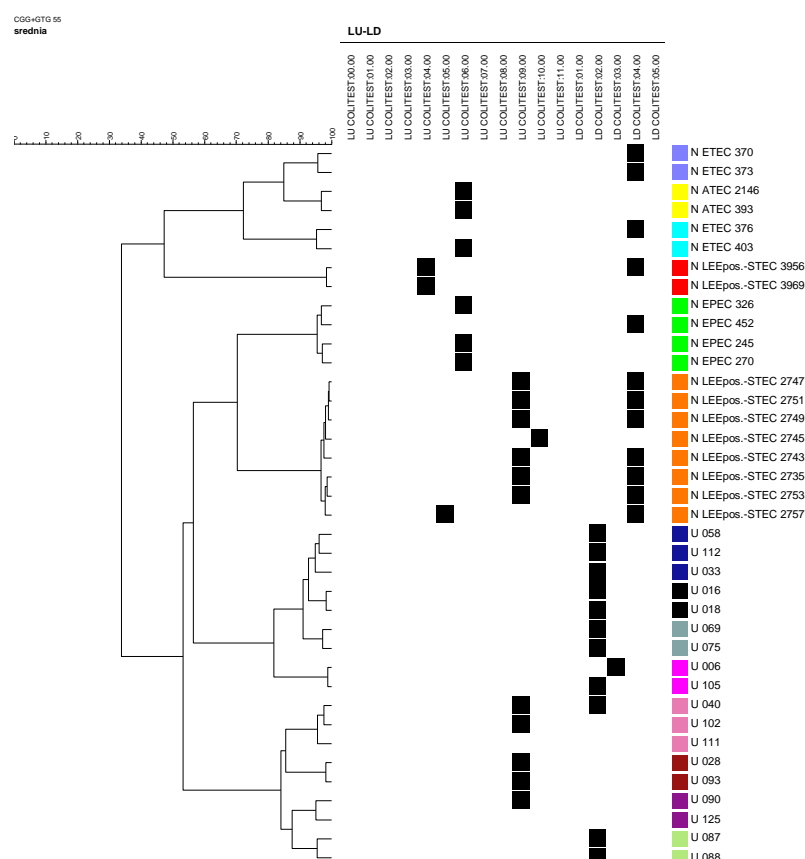
Rysunek Nr 6. Analiza uśredniona różnicowania szczepów IPEC i UPEC z wykorzystaniem reakcji $N_6(CGG)_4$ -PCR i $N_6(GTG)_4$ -PCR. Poszczególne subpatotypy oznaczono innymi kolorami. Czerwona linia – odcięcie wynikające z powtarzalności ($R=95,00\%$). Rysunek w większej rozdzielczości dołączony w materiałach dodatkowych na końcu rozprawy.

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Dla wybranych czterdziestu sekwencji dostępnych genomów *E. coli* została przeprowadzona *in silico* analiza obecności i budowy zidentyfikowanego elementu VNTR-COLI-175. Oszacowano również użyteczność zaplanowanych sekwencji starterowych dla amplifikacji fragmentów zawierających motywy VNTR. Starter LU w połączeniu ze starterem R umożliwiał amplifikację wybranego regionu VNTR dla większości szczepów. Były to szczepy o zbliżonej budowie sekwencji flankującej element VNTR-COLI-175 od jego strony 5'. Dla kilku szczepów o zdecydowanie odmiennej budowie sekwencji flankującej region VNTR od strony 5' użyteczny okazał się zestaw starterów LD i R. Ze względu na ograniczoną liczbę zanalizowanych sekwencji, nie można wykluczyć, iż dla pewnych szczepów *E. coli* może nie dojść do amplifikacji tego regionu w ogóle, czy to ze względu na brak elementu VNTR-COLI-175 czy też ze względu na inną budowę sekwencji flankującej od strony 5' [Rysunek Nr 4].

Następnie na podstawie zaprojektowanego testu opartego na amplifikacji tego elementu VNTR, określono jego użyteczność w różnicowaniu badanych izolatów IPEC i UPEC. Zbadano także, czy analiza obecności i budowy elementu VNTR-COLI-175 może być efektywnym markerem różnicującym w testach $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$.

Pomimo że zastosowane testy TRS-PCR okazały się użyteczne w międzyszczepowym różnicowaniu szczepów UPEC i IPEC, to pewna liczba izolatów pozostawała nadal niezróżnicowana. Były to szczepy, które według algorytmu Huntera i Gastona można uważać za identyczne w analizie uśrednionej TRS-PCR [Rysunek Nr 6]. Postanowiono wykorzystać w ich wypadku potencjał dywersyfikacyjny zidentyfikowanego przez nas elementu VNTR-COLI-175. W tym celu dla szczepów identycznych w TRS-PCR sporządzono dendrogram w oparciu o uśrednienie podobieństw profili prążkowych wygenerowanych w testach $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$ z uwzględnieniem analizy obecności nowego elementu VNTR [Rysunek Nr 7]. Rozważając dendrogram przedstawiony na Rysunku Nr 7 można zaobserwować, że obraz profili VNTR-COLI-175 pozwolił na rozróżnienie identycznych jak dotąd szczepów. Uwzględniając powyższe obserwacje oraz zbadaną stabilność badanego elementu VNTR-COLI-175, można wnioskować, że jest on użytecznym dodatkowym markerem, który różnicuje identyczne w analizach TRS-PCR patogenne szczepy *E. coli*.



Rysunek Nr 7. Potencjał różnicujący elementu VNTR-COLI-175 w odniesieniu do szczepów IPEC i UPEC identycznych według algorytmu Huntera i Gastona [123] z wykorzystaniem analizy uśrednionej opartej na reakcjach $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$. Identyczne izolaty w testach TRS-PCR są oznaczone tym samym kolorem.

Uwzględniając stabilność otrzymywanych profili prążkowych, siłę różnicowania międzyszczepowego testami $N_6(\text{CGG})_4$ i $N_6(\text{GTG})_4$ oraz ich wysoką powtarzalność na poziomie co najmniej 95%, można powiedzieć, że mogą być one stosowane jako skuteczne narzędzie molekularne różnicujące szczepy UPEC i IPEC.

Otrzymane w toku badań wyniki oraz wyciągnięte z nich wnioski przyczyniają się do zwiększenia naszej wiedzy o badanych izolatach IPEC i UPEC. Tym samym poszerzają wiedzę o patogennych szczepach *E. coli* w aspekcie swoistych dla danych subpatotypów czynników wirulencji oraz różnicowania ich z wykorzystaniem testów TRS-PCR. Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nas testami TRS-PCR, jako narzędziami śledzącymi ewolucyjne zależności wśród patogennych szczepów *E. coli*.

SFORMUŁOWANO NASTĘPUJĄCE WNIOSKI:

1. Testy $N_6(\text{CGG})_4\text{-PCR}$ i $N_6(\text{GTG})_4\text{-PCR}$ są wysoce efektywnymi narzędziami molekularnymi różnicującymi międzyszczepowo jelitowe patogenne szczepy *E. coli*, nie grupują zaś szczepów IPEC zgodnie z przynależnością subpatotypową.
2. Odrębne grupowanie się szczepów pochodzenia jelitowego od szczepów pozajelitowych wskazuje na użyteczność metody TRS-PCR w różnicowaniu *E. coli* w zależności od kolonizowanej niszy – czy są patogenem jelitowym czy pozajelitowym uropatogenem.
3. Element VNTR-COLI-175 może służyć jako dodatkowy marker różnicujący szczepy określone przez algorytm Huntera i Gastona jako identyczne w analizach TRS-PCR.