

Instytut Biologii Medycznej

Polskiej Akademii Nauk



Anna Bogumiła Kubiak

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

- streszczenie

Promotor rozprawy doktorskiej

dr hab. Paweł Parniewski, prof. IBM PAN

Łódź 2014

STRESZCZENIE

Wyniki otrzymane w toku przeprowadzonych badań i analiz pozwoliły na oszacowanie użyteczności testów TRS-PCR z wykorzystaniem starterów $N_6(\text{CGG})_4$ i $N_6(\text{GTG})_4$ w różnicowaniu szczepów *E. coli*. Przeanalizowano dwa patotypy – IPEC oraz ExPEC. Patotyp ExPEC reprezentowany był przez pięćdziesiąt szczepów należących do podgrupy UPEC. Szczepy IPEC reprezentowane były przez sto jeden genomowych DNA należących do siedmiu subpatotypów oraz dwa izolaty – sorbitolo-dodatni K157+ i sorbitolo-ujemny K157- pochodzące z innego źródła. W grupie szczepów IPEC było dziewięć szczepów należących do subpatotypu ATEC, dwadzieścia dwa izolaty subpatotypu EAEC, pięć izolatów EIEC, piętnaście EPEC, osiemnaście ETEC, dziesięć LEE_{neg.}-STEC, dwadzieścia dwa LEE_{pos.}-STEC. Wszystkie szczepy zostały scharakteryzowane pod kątem ich przynależności do grupy filogenetycznej oraz posiadanych czynników wirulencji zarówno typowych dla subpatotypu UPEC jak i tych typowych dla patotypu IPEC zgodnie z protokołami opisanymi w sekcjach 3.2.4., 3.2.5. i 3.2.6.. Dla szczepów, które nie posiadały określonego antygeny somatycznego O, został on oznaczony [sekcja 3.2.3.]. Dla wszystkich izolatów wygenerowano swoiste profile prążkowe z wykorzystaniem metody TRS-PCR według protokołów opisanych w sekcji 3.2.7.. Na tej podstawie 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 $N_6(\text{CGG})_4$ -PCR i $N_6(\text{GTG})_4$ -PCR, analizę ich powtarzalności oraz wyznaczono współczynniki różnicowania (DI) badanych kolekcji szczepów *E. coli*.

Dla wybranych czterdziestu sekwencji dostępnych genomów *E. coli* została przeprowadzona *in silico* analiza obecności i budowy zidentyfikowanego w tej pracy elementu VNTR-COLI-175. 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 $N_6(\text{CGG})_4$ -PCR i $N_6(\text{GTG})_4$ -PCR.

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

Reasumując wyniki dotyczące obecności czynników wirulencji wśród szczepów UPEC można zauważyć, że aż 76% tej kolekcji szczepów cechuje się obecnością co najmniej czterech czynników wirulencji typowych dla UPEC oraz 14% posiada jakikolwiek czynnik wirulencji typowy dla szczepów IPEC. W przypadku kolekcji izolatów IPEC, charakterystyka związana z obecnością czynników wirulencji UPEC pokazała, że 13,86% szczepów posiadało chociaż jeden taki czynnik - z wyłączeniem obecności czynnika *fimG/fimH*, powszechnie występującego u patogennych szczepów *E. coli*. Obserwacja ta jest potwierdzeniem problemu jednoznacznego klasyfikowania i rozróżniania izolatów tego gatunku w oparciu o brak lub obecność danego czynnika czy grupy czynników wirulencji.

Wygenerowane profile prążkowe za pomocą testów $N_6(\text{CGG})_4$ i $N_6(\text{GTG})_4$ pozwoliły na oszacowanie ich użyteczności w różnicowaniu konkretnych subpatotypów *E. coli* oraz sprawdzenie czy zachodzą zależności pomiędzy otrzymanym profilem prążkowym a danym profilem wirulencji. Oba zastosowane testy TRS-PCR cechowały się niemalże identyczną siłą różnicowania badanych izolatów. Stwierdzono, że nie można rozdzielać, definiować lub grupować szczepów IPEC według ich przynależności subpatotypowej, jednakże wysokie wartości współczynników różnicowania (DI) dla analiz $N_6(\text{CGG})_4$, $N_6(\text{GTG})_4$ i ich analizy uśrednionej wskazują na wysoką użyteczność tych testów. W przypadku szczepów IPEC nie zaobserwowano większych analogii pomiędzy posiadany profilem wirulencji a wygenerowanymi w reakcjach TRS-PCR profilami prążkowymi. Podsumowując skuteczność analiz TRS-PCR dla poszczególnych subpatotypów IPEC można powiedzieć, że pozwalają one na głębokie różnicowanie międzyszczepowe. Gdy różnicowanie z wykorzystaniem jednego ze starterów nie było wystarczające, drugi zazwyczaj zwiększał potencjał dyskryminacyjny testu.

Analiza uśredniona bazująca na testach $N_6(\text{CGG})_4$, $N_6(\text{GTG})_4$, dla izolatów UPEC i IPEC pozwoliła na wymierną ocenę ich potencjału różnicującego. Wyznaczona wartość współczynnika różnicowania DI była najwyższa (DI=0,996), co wskazuje na efektywność różnicowania takich szczepów zastosowanymi testami TRS-PCR. Co więcej, grupowanie się szczepów UPEC i IPEC we wspólnej analizie TRS-PCR obrazuje generalną tendencję do odseparowywania się szczepów pozajelitowych od typowych patogenów jelitowych. Sformułowano zatem wniosek, że zastosowana metoda TRS-PCR jest także użyteczna w różnicowaniu szczepów w zależności od niszy, jaką kolonizują, będąc patogenem jelitowym lub patogenem układu moczowego.

Pomimo silnego różnicowania międzyszczepowego testami $N_6(\text{CGG})_4$ i $N_6(\text{GTG})_4$, pewna liczba izolatów UPEC i IPEC pozostawała niezróżnicowana. Niektóre z tych szczepów, które

według algorytmu Huntera i Gastona uważane są w analizie uśrednionej TRS-PCR za identyczne, zróżnicowane zostały na podstawie obecności i budowy elementu VNTR-COLI-175. Stabilność tego elementu VNTR oraz powyższa obserwacja pozwala stwierdzić, że jest on użyteczny jako dodatkowy marker różnicujący w testach TRS-PCR.

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*.