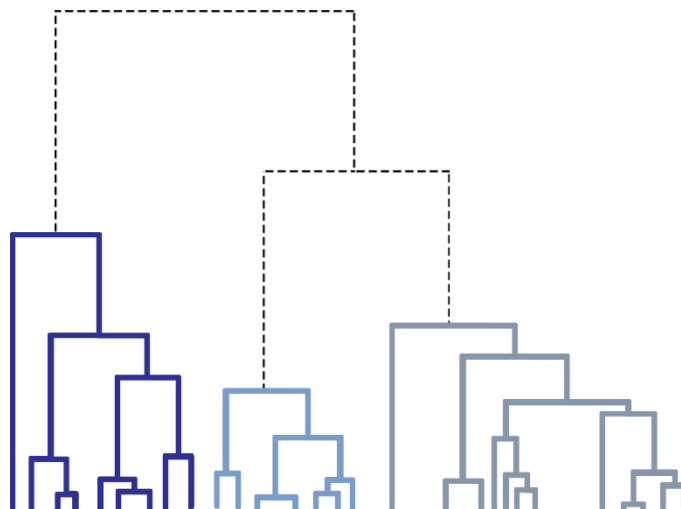


Autoreferat



**Genetyczne różnicowanie  
wybranych serowarów  
*Salmonella enterica*  
subsp. *enterica***

**Anna Krzyżanowska**

Promotor: dr hab. Paweł Parniewski

Łódź 2014



Instytut Biologii Medycznej  
Polskiej Akademii Nauk



**INNOWACYJNA  
GOSPODARKA**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI FUNDUSZ  
ROZWOJU REGIONALNEGO



Opisane wyniki badań realizowano w ramach projektu:

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

**oraz częściowo ujęto w następującej publikacji:**

Majchrzak M, Krzyżanowska A, Kubiak AB, 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 Nov; 41(11):7121-32

Dostępność zaawansowanych technologii molekularnych i bioinformatycznych oraz ciągle rozszerzanie wiedzy na temat genomów bakteryjnych pozwala na udoskonalanie oraz zwiększanie zakresu metod biologii molekularnej używanych m.in. do różnicowania serowarów i szczepów *Salmonella*. Sekwencje genomów w obrębie rodzaju *Salmonella* są podobne do siebie na poziomie 90%. Nieduża zmienność występującą zwłaszcza w obrębie podgatunku *Salmonella enterica* subsp. *enterica* jest wyzwaniem dla metod typowania i klasyfikacji. Decydujący wpływ na wybór danej techniki ma potencjał różnicujący oraz cel jaki chcemy osiągnąć. Dlatego też, inna metoda będzie wybrana do celów szybkiej identyfikacji bakterii i ukierunkowania dalszych badań, a inna w celu śledzenia rozprzestrzeniania i poznania źródła zakażenia.

Salmonellozy są wciąż najczęściej rejestrowanym schorzeniem wśród chorób wywołanych infekcją bakteryjną, a objawiających się nieżytem jelitowo-żołądkowym. Z powodu zagrożenia zdrowia publicznego, jakie niosą ze sobą zakażenia pałeczką *Salmonella*, możliwość rozpoznawania szczepów jest niezbędna w diagnostyce oraz epidemiologii. Wzrost liczby metod biologii molekularnej jest zatem pożądany, ale metody takie powinny być szybkie, proste w wykonaniu oraz niedrogie, tak aby każde laboratorium mogło je zaaplikować.

**Głównym celem** niniejszej pracy było opracowanie testu molekularnego różnicującego serowary należące do podgatunku *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Pierwsze z prezentowanych podejść opiera się o występowanie trójnukleotydowych sekwencji powtórzonych w genomie bakterii (TRS-PCR), natomiast drugie podejście związane jest z występowaniem zmiennej liczby powtórzeń tandemowych (analiza VNTR). Kolejnym celem była ocena stabilności genomu w regionach obejmujących sekwencje powtórzone typu VNTR. Podwyższone ryzyko mutacji w takich regionach genomu bakteryjnego oznacza, że ich stabilność w trakcie wielu rund replikacyjnych powinna być zweryfikowana zanim uzna się taki marker za przydatny do różnicowania międzyszczepowego.

Szczepy *Salmonella enterica* subsp. *enterica* są obecnie różnicowane przede wszystkim na podstawie cech fenotypowych, poprzez serotypowanie – w oparciu o schemat White'a-Kauffmanna-Le Minora. Schemat ten opisuje 46 serogrup O i 114 antygenów H co składa się na ponad 2500 scharakteryzowanych antygenowo serowarów. Pociąga to za sobą konieczność zaopatrzenia laboratorium w wiele różnych surowic oraz przeprowadzenia dużej liczby oznaczeń, co implikuje wysokie koszty badań.

Do metod typowania *Salmonella*, które oparte są na genotypowaniu, zaliczamy PFGE (elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym), rep-PCR (analiza sekwencji powtarzających się), MLVA (jednoczesna amplifikacja wielu *loci* o zróżnicowanej liczbie tandemowych powtórzeń), analizę CRISPR (analiza zgrupowanych, oddzielonych regularnymi przerwami, krótkich powtórzeń palindromowych) oraz MLST (sekwencjonowanie wielu *loci*).

Realizację postawionych celów pracy rozpoczęto od przeprowadzenia analizy *in silico* genomów *Salmonella* Enteritidis (szczep P125109), *Salmonella* Typhimurium (szczep LT2) i *Salmonella* Newport (szczep SL254)

w celu określenia liczby trójnukleotydowych powtórzeń sekwencji. W analizie wzięto pod uwagę 20 możliwych motywów TRS: CGG, CCG, CTG, CAG, GTG, CAC, ATG, ATC, AAG, CTT, GTC, GAC, TTG, CAA, TAT, ATA, TCC, GGA, TAG, CTA. Sprawdzana była liczba tych motywów w DNA chromosomalnym, tandemowo powtórzonych 3 bądź więcej razy. Liczba powtórzeń poszczególnych motywów w analizowanych genomach została przedstawiona w Tab. 1.

Tab. 1. Analiza *in silico* genomów *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *S. Newport*

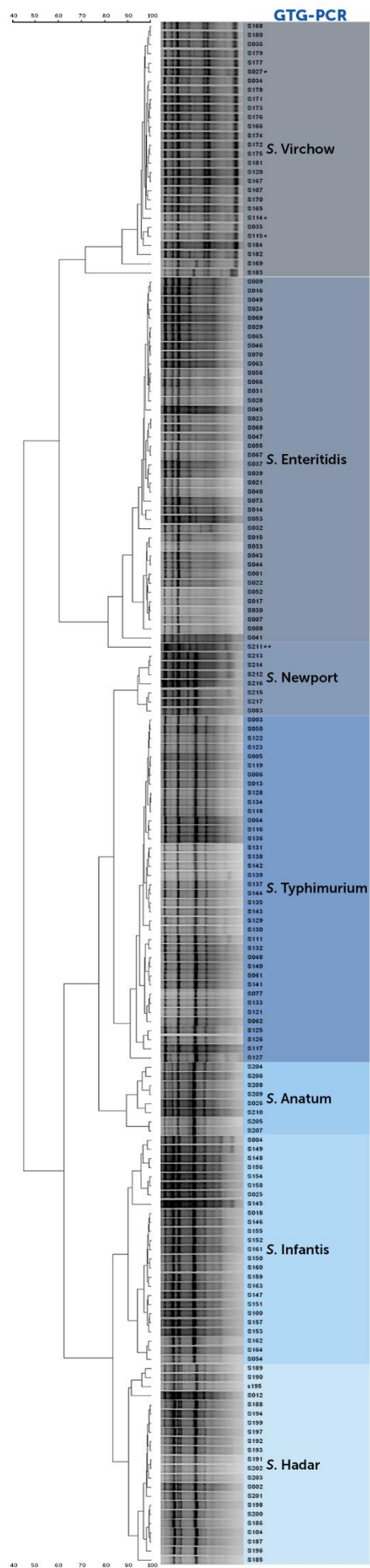
Nr	Motyw TRS	Teoretyczna liczba motywów (TRS) <sub>n≥3</sub>		
		<i>S. Enteritidis</i> szczep P125109	<i>S. Typhimurium</i> szczep LT2	<i>S. Newport</i> str. SL254
1.	CGG	517	505	497
2.	CCG	503	530	530
3.	CAG	303	309	296
4.	CTG	264	272	268
5.	CAC	168	183	171
6.	ATC	140	167	156
7.	ATG	127	139	132
8.	GTG	126	124	123
9.	ATA	104	96	92
10.	TAT	98	113	100
11.	AAG	86	92	85
12.	CTT	84	84	85
13.	GTC	73	84	83
14.	GAC	67	70	69
15.	TTG	64	67	66
16.	CAA	51	51	49
17.	GGA	23	31	30
18.	TCC	19	21	20
19.	TAG	9	12	11
20.	CTA	8	7	7

Sekwencje starterów zostały zaprojektowane w taki sposób, że od strony 3' znajdują się cztery powtórzenia wybranego motywu TRS (ostatnim nukleotydem jest G lub C), a na końcu 5' jest sześć losowo wybranych podczas syntezy nukleotydów (A, T, C lub G). Taka budowa startera (5'-N<sub>6</sub>(TRS)<sub>4</sub>-3') zapewnia jego uniwersalność (do reakcji PCR używany jest jeden starter zamiast pary) oraz lepsze jego zakotwiczenie na regionie komplementarnym powielanej matrycy. Produkty reakcji PCR były rozdzielane w 1,6% żelu agarozowym, barwione roztworem EtBr, wizualizowane i fotografowane, a otrzymane profile prążkowe poddawane były analizie w programie BioNumerics. Analiza podobieństwa była przedstawiona w formie dendrogramów, których skala prezentuje stopień podobieństwa profili prążkowych wynikający z porównań wszystkich szczepów parami. Do wygenerowania dendrogramów według współczynnika korelacji Pearsona oraz algorytmu grupowania UPGMA użyto następujących parametrów: optymalizacja 1% oraz tolerancja pozycji 1%.

Po przeprowadzeniu dwustopniowych testów wstępnych ze starterami zawierającymi 20 różnych motywów TRS i sprawdzeniu powtarzalności metod, GTG- oraz CAC-PCR zaprezentowały najwyższy potencjał

różnicowania serowarów *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Metody te zostały wykorzystane do genotypowania większej kolekcji zawierającej 169 szczepów, w tym: 40 szczepów *S. Enteritidis*, 38 szczepów *S. Typhimurium*, 25 szczepów *S. Infantis*, 28 szczepów *S. Virchow*, 22 szczepów *S. Hadar*, 8 szczepów *S. Anatum* oraz 8 szczepów *S. Newport*.

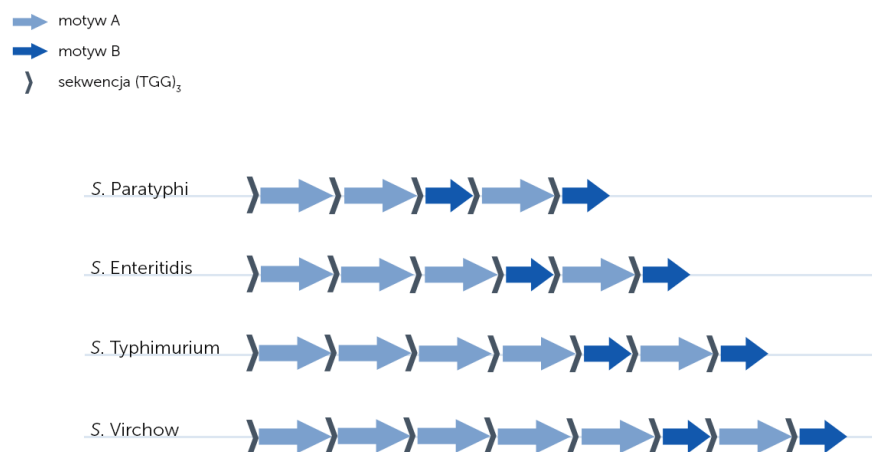
Metoda CAC-PCR (powtarzalność 95,82%) okazała się być nieskuteczna w różnicowaniu wszystkich badanych serowarów, ze względu na duże podobieństwo wzorów prążkowych dla *S. Typhimurium*, *S. Hadar* oraz *S. Newport*. Natomiast dzięki metodzie GTG-PCR (powtarzalność 96,18%) możliwe było zróżnicowanie 7 serowarów znajdujących się w badanej kolekcji szczepów *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Rys. 1).



Rys. 1. Analiza podobieństwa wzorów prążkowych uzyskanych w reakcji GTG-PCR

Przeprowadzenie analizy TRS-PCR pozwoliło na wykrycie pomyłek w wyniku serotypowania. W przypadku szczepów S027, S114, S115, które po serotypowaniu opisane były jako *S. Infantis*, otrzymano wzory prążkowe charakterystyczne dla serowaru *S. Virchow*. Powtórne oznaczenie antygenów somatycznych i rzęskowych dla tych szczepów potwierdziło wyniki testów TRS-PCR. Kolejna pomyłka związana była ze szczepem S211 opisanym początkowo jako *S. Newport*. Wzór prążkowy otrzymany dla tego szczepu w reakcji GTG-PCR był inny niż pozostałych przedstawicieli tego serowaru (podobieństwo < 50%). Był to przykład zjawiska „colonial form variations” polegającego na zróżnicowanej ekspresji mniejszych antygenów przez ten sam szczep, ale w obrębie różnych kolonii na płytce. Z takim zjawiskiem można się spotkać właśnie w przypadku serowarów *Salmonella enterica* subsp. *enterica* należących do serogrupy O:6,8, u których zróżnicowanie może dotyczyć antygeny O:6. Dalsze badania (Premi®Test *Salmonella*) wykazały, że jest to w rzeczywistości szczep *S. Bardo* (I 8:e,h:1,2), który wykazuje duże podobieństwo we wzorze antygenowym do *S. Newport* (I 6,8:e,h:1,2). Zatem wynik otrzymany w niniejszych badaniach wskazuje, że mimo znacznego podobieństwa fenotypowego tych dwóch serowarów, genotypowanie z użyciem GTG-PCR umożliwia ich rozróżnienie.

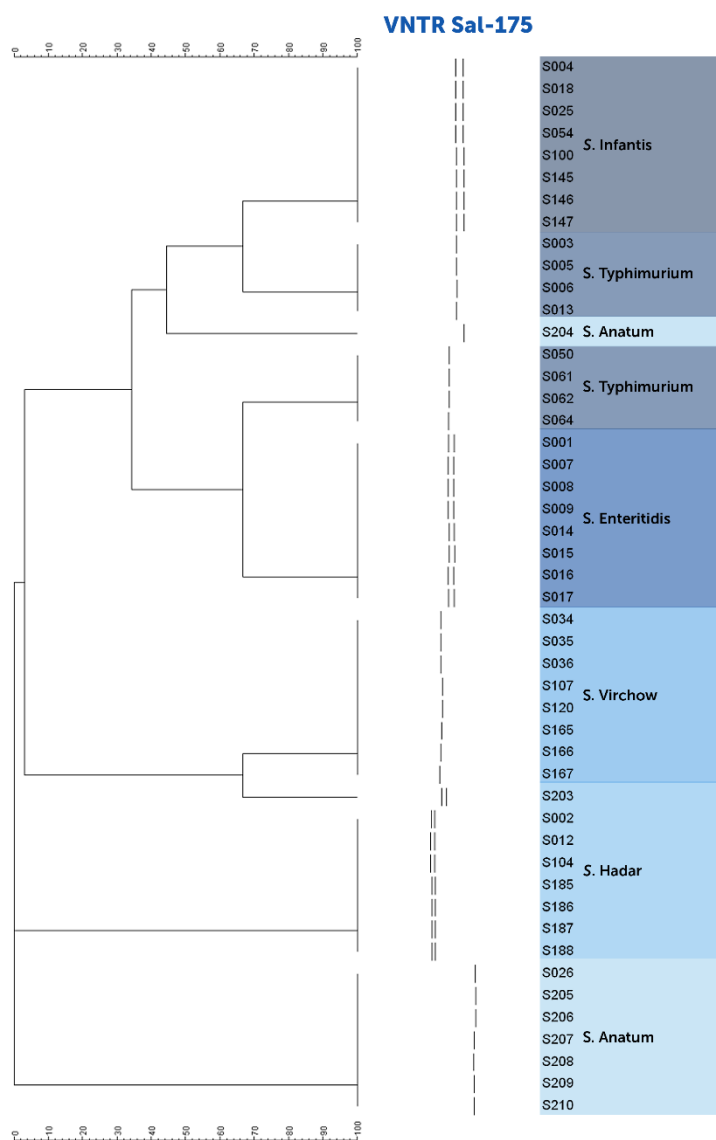
Poszukując w genomach *Salmonella enterica* subsp. *enterica* elementów TRS wykazano obecność motywów (TGG)<sub>3</sub> rozmieszczonych w regularnych odstępach, co sugerowało występowanie odcinków DNA ułożonych tandemowo. Pozwoliło to zlokalizować region z powtórzeniami VNTR znajdujący się w okolicy genu *purU* (formyltetrahydrofolate deformylase) i obejmujący sekwencje kodujące tRNA-Tyr oraz sekwencje dla regulatorowego RNA – rT. Jego budowa różni się u analizowanych przez nas serowarów *Salmonella enterica* subsp. *enterica* pod względem liczby motywów powtarzających się (Rys. 2).



Rys. 2. Schematyczne przedstawienie występowania zmiennej liczby motywów powtórzonych w genomach różnych serowarów *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

W celu amplifikacji tego regionu, zaplanowano odpowiednie sekwencje starterowe komplementarne do sekwencji przylegających do badanego fragmentu. Do reakcji PCR wykorzystywano mieszaninę 3 starterów – jeden od strony 3' regionu – STestL oraz dwa od strony 5' – StestR1 i StestR2. Przyłączenie pary starterów – StestL i StestR2 pozwala na amplifikację produktu. W genomach niektórych serowarów znajduje się również miejsce rozpoznawane przez trzeci starter – StestR1, co skutkuje powstawaniem dwóch produktów. A zatem spodziewane produkty amplifikacji umożliwiały różnicowanie na dwóch poziomach: liczby i długości produktów. Uzyskane produkty amplifikacji były rozdzielane w 1,2% żelu agarozowym, barwione roztworem EtBr, wizualizowane i fotografowane, a następnie analizowane z użyciem programu BioNumerics. Do wygenerowania dendrogramu według współczynnika podobieństwa Dice oraz algorytmu grupowania UPGMA użyto następujących parametrów: optymalizacja 1% oraz tolerancja pozycji 1%.

Przeprowadzenie analizy VNTR Sal-175 dla posiadanej kolekcji *Salmonella enterica* subsp. *enterica* pozwoliło na zróżnicowanie 6 serowarów (Rys. 3).



Rys. 3. Analiza podobieństwa produktów amplifikacji uzyskanych w reakcji VNTR Sal-175



Szczepy należące do serowarów *S. Enteritidis*, *S. Infantis* oraz *S. Hadar* posiadały miejsca rozpoznawane przez startery StestL, StestR2 oraz StestR1 dzięki czemu otrzymano w ich przypadku 2 produkty amplifikacji różniące się 150 pz. Szczepy *S. Typhimurium*, *S. Virchow* i *S. Anatum* nie miały miejsca rozpoznawanego przez starter StestR1, dlatego wynikiem reakcji VNTR Sal-175 był jeden produkt. W przypadku szczepów S204 (*S. Anatum*) oraz S203 (*S. Hadar*) uzyskano produkty, które różniły się długością od tych, otrzymanych przez inne szczepy odpowiadających serowarów. W metodzie CAC- i GTG-PCR ich wzory prążkowe nie odróżniały się od pozostałych przedstawicieli tych serowarów. Szczep *S. Anatum* S204 jest szczepem referencyjnym dlatego w podejściach, które skupiają się na różnicach w niewielkim regionie DNA ważne jest stosowanie dodatkowych metod np. TRS-PCR. Ogranicza się w ten sposób możliwość złego oznaczenia szczepu ze względu na brak podobieństwa do szczepu referencyjnego. Metoda VNTR Sal-175 wykazała również podział w obrębie 38 szczepów serowaru *S. Typhimurium*. Wyodrębniły się w nim dwie grupy – 23 szczepów mających produkt o długości ok. 1400 pz oraz 15 szczepów, dla których miał on ok. 1200 pz. Podział taki nie występował przy zastosowaniu metod CAC- i GTG-PCR. Pochodzenie izolatów i data izolacji nie sugerują również występowania takiego podziału w obrębie serowaru *S. Typhimurium*.

Ze względu na częstą niestabilność sekwencji zawierających zmienną liczbę tandemowych powtórzeń, zaplanowana została także analiza stabilności badanego regionu VNTR Sal-175 przeprowadzona dla dwóch szczepów z każdego z serowarów: *S. Enteritidis* (S007 i S097), *S. Typhimurium* (S005 i S064), *S. Infantis* (S004, S018) oraz *S. Virchow* (S027 i S036). Dodatkowo porównywana była ona ze stabilnością 10 regionów VNTR, które są powszechnie stosowane w analizie MLVA szczepów *S. Enteritidis* (SE-3, SENTR-4, SENTR-5, SENTR-6, SENTR-7) oraz *S. Typhimurium* (STTR-3, STTR-5, STTR-6, STTR-9, STTR10pl). W tym celu przeprowadzono 35 pasaży wybranych szczepów *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. W dniach: V, X, XV, XX, XXV, XXX, XXXV pobierano z hodowli po 1 ml do izolacji genomowego DNA i przeprowadzono reakcje amplifikacji regionów VNTR: Sal-175, SENTR i STTR, których wyniki wizualizowano i analizowano z użyciem metod i parametrów takich jak przy analizie VNTR Sal-175.

Analiza stabilności regionu Sal-175 wykazała, że szczepy *S. Infantis* S004 i S018 utrzymały niezmienną długość produktów w czasie trwania eksperymentu. Ze względu na to, że jeden ze szczepów *S. Typhimurium* – S064 – wykazał stabilność badanego regionu tylko do X przesiewu (pozostałe szczepy do XV lub XX przesiewu), wnioskowano, że taki jest limit, do którego można wykorzystywać w badaniach przesiewane hodowle. Różnice w porównaniu z profilem wyjściowym dla danego szczepu, wiązały się ze zmianami w liczbie motywów A lub/i B w regionie Sal-175. Analizy stabilności regionów SENTR i STTR wykazała, że w przypadku szczepu *S. Typhimurium* S064 utrzymywana była ona również do X przesiewu, natomiast w szczepie S005 do XV przesiewu. Regiony VNTR w szczepach *S. Enteritidis* S007 i S097 ulegały rearanżacjom odpowiednio po XV i XX przesiewie.

Wykonanie analizy MLVA z użyciem starterów znakowanych fluoroforami, a następnie elektroforezy kapilarnej umożliwiło zbadanie, które z badanych *loci* SENTR i STTR były niestabilne po wielokrotnych przesiewach hodowli bakteryjnej. W przypadku szczepów *S. Enteritidis* S007 i S097 rearanżacjom odpowiednio po XV i XX przesiewie ulegały regiony SENTR-7 oraz SENTR-5. U szczepów *S. Typhimurium* S005 (po XV przesiewie) i S064 (po X przesiewie) były to *loci* STTR-9, STTR-5 i STTR-3.

Przedstawione wyniki pracy pozwoliły na zrealizowanie postawionych w pracy celów, ale są także punktem wyjścia do postawienia kolejnych hipotez, które warto przestudiować. Na pewno interesujące będzie zbadanie z użyciem opracowanego testu GTG-PCR oraz VNTR Sal-175 bardziej zróżnicowanej kolekcji *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Należy uwzględnić w niej między innymi takie serowary jak *S. Dublin*, który jest blisko spokrewniony z *S. Enteritidis* oraz 4,5,12:i:-, który reprezentuje jednofazowy wariant *S. Typhimurium*. Ciekawym podejściem byłoby również wykorzystanie metody w pilotażowym badaniu drobiu, zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (UE) Nr 1086/2011.

#### **Wnioski:**

- Przedstawione w pracy metody CAC-, GTG-PCR oraz analiza VNTR regionu Sal-175 są prostymi w wykonaniu, powtarzalnymi oraz skutecznymi metodami różnicowania najczęściej izolowanych serowarów *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Mogą być stosowane jako metody wspomagające tradycyjne serotypowanie – w celu ograniczenia liczby potrzebnych do oznaczeń surowic oraz nakierowania dalszych analiz epidemiologicznych.
- Ponadto, przy zastosowaniu wraz z innymi opisanymi w literaturze *loci* VNTR, region Sal-175 może wzbogacić ich użyteczność w genotypowaniu oraz badaniach filogenetycznych. Metoda taka mogłaby być zastosowana przy badaniu kolekcji, w której są różne serowary *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.
- Przy badaniach uwzględniających analizę *loci* VNTR należy ograniczyć liczbę prowadzonych przesiewów hodowli bakteryjnej, tak aby nie generować zmian w regionach na nie podatnych, a które to zmiany nie będą prawdziwym odzwierciedleniem różnic w genomie.