

Tytuł pracy: "Genetyczne różnicowanie wybranych szczepów *Salmonella enterica* subsp. *enterica*"

mgr Anna Krzyżanowska

Promotor: dr hab. Paweł Parniewski

Streszczenie

Techniki molekularne mają niewątpliwy wpływ na ułatwienie diagnostyki i epidemiologii zakażeń bakteryjnych. Przy wyborze danej techniki decydujący jest jej 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.

Celem mojej pracy było opracowanie prostego testu molekularnego różnicującego serowary należące do podgatunku *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Pierwsze z przedstawionych 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). Moim dalszym celem była ocena stabilności genomu w regionach obejmujących sekwencje powtórzone typu VNTR. Uznaliśmy, że w dotychczas publikowanych pracach nie ma dostatecznego nacisku na to zagadnienie, a sekwencje tego typu mogą ulegać rearanżacjom genetycznym.

Badana kolekcja *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (n=169) obejmuje serowary należące do najczęściej izolowanych w Polsce: *S. Enteritidis* (n=40), *S. Typhimurium* (n=38), *S. Infantis* (n=25), *S. Virchow* (n=28), *S. Hadar* (n=22), *S. Newport* (n=8) i *S. Anatum* (n=8). Na szczepach z tej kolekcji przeprowadziłam, opracowane w Pracowni Genetyki Molekularnej IBM PAN testy PCR wykorzystujące startery z 20 różnymi motywami TRS oraz powszechnie stosowane startery: BOX, REP, ERIC. Otrzymane wzory prążkowe analizowałam pod względem obecności, rozmieszczenia i intensywności poszczególnych fragmentów. Poza tym, bardzo ważnym elementem badań było sprawdzenie powtarzalności tych metod. Pozwoliło to na wyodrębnienie dwóch najbardziej efektywnych technik PCR, wykorzystujących występowanie sekwencji powtarzających się w genomie *Salmonella* – CAC- i GTG-PCR.

Kolejną metodą opracowaną w PGM jest metoda dywersyfikująca szczepy *Salmonella enterica* subsp. *enterica* na podstawie budowy znalezionej regionu, zawierającego powtórzenia VNTR i nazwanego przez nas Sal-175. Badania *in silico* wskazały, że znajdują się w nim m.in. dwie sekwencje powtórzone tandemowo i ich liczba w poszczególnych serowarach jest różna. Umożliwia to w bardzo prosty sposób, bo na podstawie długości jednego lub dwóch otrzymanych fragmentów, zróżnicować kolekcję *Salmonella*. Ze względu na możliwą niestabilność powtórzeń VNTR, prowadziłam przesiewy wybranych szczepów z kolekcji, aby w ich trakcie monitorować ewentualne zmiany w obrębie badanego regionu Sal-175. Dla porównania włączyłam do badań stabilności inne powtórzenia tandemowe, których analiza wykorzystywana jest w dochodzeniach epidemiologicznych serowarów *S. Typhimurium* (STTR) i *S. Enteritidis* (SENTR). Wyniki wskazują graniczną liczbę przesiewów, powyżej której pojawiają się zmiany w obrębie badanych regionów VNTR.

Podsumowując, metody opisane w niniejszej pracy – GTG-PCR, CAC-PCR oraz analiza powtórzeń VNTR w regionie Sal-175, mogą być używane jako szybkie i proste testy służące do dyskryminacji często izolowanych serowarów *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Określenie wzoru prążkowego dla nieznanego szczepu *Salmonella* dzięki metodom TRS-PCR, nie eliminuje, ale w znacznym stopniu wspomaga tradycyjne podejście jakim jest serotypowanie. Zmniejsza to również zużycie drogich surowic niezbędnych do pełnego oznaczenia serowaru. Poza tym druga, opisana przeze mnie metoda, wykorzystująca różnice w liczbie powtórzeń tandemowych w regionie Sal-175, może być włączona do analiz epidemiologicznych – MLVA.