

2. Streszczenie

Epidemiologia molekularna stanowi naukę zajmującą się badaniem chorób zakaźnych w odniesieniu do wybranych cech genetycznych drobnoustroju, który powoduje zakażenia u gospodarza. Molekularne badania epidemiologiczne pomagają zrozumieć mechanizmy oddziaływania między gospodarzem i patogenem, a także określić czynniki wirulencji, pokrewieństwo filogenetyczne i szlaki transmisji drobnoustrojów patogennych. Wśród bakterii Gram-ujemnych, istotne zagrożenie stanowią pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, w tym pałeczki *Escherichia coli* oraz wielolekooporne szczepy *Pseudomonas aeruginosa*. Wśród metod typowania drobnoustrojów, znajdujących zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej, wyróżnić można metody oparte na analizie cech fenotypowych oraz materiału genetycznego mikroorganizmów. Metody genotypowe znalazły zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej oraz badaniach epidemiologicznych - w wykrywaniu, identyfikacji i różnicowaniu drobnoustrojów. Zastąpienie metod fenotypowych metodami molekularnymi, m.in. opartymi na reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR), do charakteryzowania izolatów klinicznych, pozwoliło na skrócenie czasu wykonywania analiz, często również na zmniejszenie ich kosztów i pracochłonności. Pozwoliło to także na badanie mikroorganizmów, których hodowla laboratoryjna jest utrudniona lub niemożliwa.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było ulepszenie metodyki genetycznego różnicowania patogennych szczepów *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* techniką TRS-PCR. Niniejsza praca jest kontynuacją badań nad opracowaną w Pracowni Genetyki Molekularnej metodą molekularną TRS-PCR, wykorzystywaną do różnicowania szczepów klinicznych, w oparciu o analizę podobieństwa profili prążkowych. Metodę interpretacji profili prążkowych TRS-PCR udoskonalono, wprowadzając system numeryczny, w którym takiemu samemu profilowi przyporządkowano wartość liczbową. Pozwala to na łatwiejszą analizę profili molekularnych uzyskiwanych dla badanych szczepów oraz możliwość porównywania wyników otrzymanych w różnych laboratoriach. W celu określenia siły różnicowania nowej metodyki TRS-PCR, otrzymane wyniki porównano z wynikami uzyskanymi z analiz MLST (w przypadku kolekcji *E. coli*) i MLVA (dla szczepów *P. aeruginosa*).

W pierwszej kolejności przeprowadzono badania, które pozwoliły na opracowanie i oszacowanie użyteczności testu TRS-PCR z wykorzystaniem startera $N_6(CAC)_4$ w różnicowaniu uropatogennych szczepów *E. coli*. Biorąc pod uwagę wysoką

powtarzalność tej metody, identyczną, jak dla testu GTG-PCR, jednakże mniejszą niż dla CGG-PCR, metoda CAC-PCR pozwoliła pogrupować 124 badane szczepy UPEC w 52 unikalne klastry.

Przeprowadzona następnie dla izolatów UPEC uśredniona analiza profili prążkowych w oparciu o trzy testy TRS-PCR, pozwoliła na ocenę ich potencjału różnicującego. Biorąc pod uwagę wyznaczoną wysoką wartość współczynnika powtarzalności wynoszącą 95 %, otrzymano 111 unikalnych szczepów spośród 124 badanych izolatów UPEC. Wskazuje to na wysoką efektywność różnicowania szczepów UPEC z zastosowaniem uśrednionej analizy profili prążkowych w oparciu o wyżej wymienione testy TRS-PCR.

Metodykę analiz profili prążkowych TRS-PCR ulepszono, wprowadzając numeryczną klasyfikację dla identycznych profili, uzyskiwanych w poszczególnych testach TRS-PCR do różnicowania kolekcji uropatogennych szczepów klinicznych *E. coli*. Za identyczne uznano profile, o podobieństwie powyżej obliczonej wartości powtarzalności. W wyniku porównania siły różnicowania metody CAC-PCR z przeprowadzonymi uprzednio w Pracowni badaniami molekularnymi dla badanej kolekcji szczepów UPEC w oparciu o metody CGG-, i GTG-PCR, otrzymano 52 klasy CAC-PCR, 86 klas GTG-PCR i 99 klas CGG-PCR. Następnie, każdy izolat *E. coli* posiadający unikalny profil poszczególnych klas TRS-PCR (CAC-, GTG- i CGG-PCR), został przyporządkowany do osobnej grupy TRS-PCR. Takie podejście do interpretacji wyników profilowania pozwoliło na zróżnicowanie 121 unikalnych izolatów, różniących się co najmniej w jednej klasie TRS, spośród 124 uropatogennych szczepów *E. coli* dostępnych w kolekcji Pracowni Genetyki Molekularnej IBM PAN. Różnicowanie klinicznych szczepów UPEC w oparciu o numeryczny system nadawania klas TRS-PCR wykazuje więc większą zdolność różnicowania izolatów niż klasyczna, uśredniona analiza profili prążkowych.

W kolejnej części niniejszej pracy przeprowadzono analizę porównawczą, dla kilku wybranych szczepów UPEC i STEC, przy użyciu dwóch różnych technik typowania molekularnego: w oparciu o metodę numerycznego systemu nadawania klas TRS-PCR oraz metodę MLST, w oparciu o schemat zaproponowany przez Wirth T. i wsp. Analiza TRS-PCR dostarczyła wyników różnicujących wybrane szczepy *E. coli* w sposób podobny do tych, uzyskanych w wyniku analizy MLST. Uzyskane wyniki sugerują jednak, że metoda TRS-PCR pozwala na zróżnicowanie szczepów o identycznych profilach sekwencyjnych ST.

W niniejszej pracy po raz pierwszy sprawdzono użyteczność metodyki porównywania profili prążkowych CGG- i GTC-PCR do określania genetycznego zróżnicowania

patogennej kolekcji klinicznych szczepów *P. aeruginosa* wyizolowanych od pacjentów z mukowiscydozą. Wyznaczone wartości współczynników powtarzalności przeprowadzonych analiz dla obu testów CGG- i GTC-PCR były na bardzo wysokim i zbliżonym poziomie (odpowiednio, 93,3 %, i 95,3 %), co oznacza, że analizy TRS-PCR dla kolekcji szczepów *P. aeruginosa* mogą mieć wysoki potencjał różnicujący. Spośród badanych 63 izolatów *P. aeruginosa*, dzięki różnicowaniu CGG-PCR, sklasyfikowano 27 unikalnych szczepów, natomiast różnicowanie GTC-PCR pozwoliło na identyfikację jedynie 10 unikalnych izolatów. Pozwala to stwierdzić, że test CGG-PCR mają większy potencjał różnicujący, niż metoda GTC-PCR. Następnie przeprowadzono uśrednioną analizę podobieństwa otrzymanych profili prążkowych dla obu testów TRS-PCR, która pozwoliła na przyporządkowanie 63 badanych szczepów *P. aeruginosa* do 26 klastrów.

Następnie, badanym szczepom przypisano numery klas CGG- i GTC-PCR. Szczepy *P. aeruginosa* o wzorach profili prążkowych o podobieństwie powyżej wartości powtarzalności dla obu testów CGG- i GTC-PCR, traktowano jako identyczne. Na podstawie nadanego profilu dla poszczególnych klas TRS-PCR, badane szczepy przypisano do 40 grup TRS-PCR, różniących się przynajmniej w jednej klasie TRS-PCR. W ten sposób wyodrębniono 25 pojedynczych grup TRS-PCR oraz 15 kompleksów, do których przyporządkowano co najmniej dwa bądź więcej izolatów *P. aeruginosa*.

W dalszej części pracy doktorskiej, wyniki różnicowania badanej kolekcji szczepów *P. aeruginosa* z wykorzystaniem systemu numerycznego TRS-PCR, porównano z wynikami analizy VNTR-MLVA, uzyskanych dla tych szczepów. Określono 26 grup MLVA dla 63 izolatów *P. aeruginosa*, posiadających unikalny numeryczny profil alleliczny, odpowiadający liczbie powtórzeń kopii sekwencji VNTR. Porównując powyższe metody, przypisanie numerycznych klas i grup TRS-PCR silniej różnicuje izolaty kliniczne w porównaniu do VNTR-MLVA, na co wskazują również obliczone wartości współczynnika Wallace'a. Na podstawie grup MLVA zostały nadane numery szczepów, bądź ich wariantów, dla poszczególnych pacjentów. Analizę tę poszerzono, biorąc dodatkowo pod uwagę określone wartości numeryczne grup TRS-PCR. Pozwoliło to na dalsze zróżnicowanie kolekcji szczepów *P. aeruginosa*.

Nowa metoda analiz profili TRS-PCR jest wysoce użyteczna w różnicowaniu szczepów klinicznych *E. coli* i *P. aeruginosa*, oraz wykazuje większą zdolność różnicowania izolatów niż klasyczna, uśredniona analiza profili prążkowych. Za pomocą zastosowanej metody numerycznej wykazano możliwość wykrycia nawet niewielkich różnic genetycznych pomiędzy szczepami bakterii.

Wyniki uzyskanych badań sugerują, że zarówno MLST, jak i TRS-PCR są skutecznymi metodami do genotypowania klinicznych szczepów *E. coli*, oraz mogą być wykorzystywane w rutynowym nadzorze epidemiologicznym i identyfikacji źródła transmisji *E. coli*. Wydaje się jednak, że metoda numeryczna TRS-PCR jest w niektórych przypadkach bardziej różnicująca w porównaniu z MLST. Numeryczna metoda interpretacji wyników TRS-PCR, zaproponowana w tej pracy, może stanowić zatem uzupełnienie dla analiz MLST.

Wyniki badań ujęte w rozprawie sugerują, że MLVA w połączeniu z TRS-PCR są powtarzalnymi i wysoko różnicującymi metodami typowania DNA izolatów *P. aeruginosa* od pacjentów z mukowiscydozą. Nowa metodyka TRS-PCR wykazuje większą siłę różnicowania od techniki VNTR-MLVA i może stanowić uzupełnienie schematu MLVA lub być stosowana jako wstępna, szybka, i powtarzalna metoda genotypowania izolatów *P. aeruginosa*. Za pomocą zastosowanej metody numerycznej wykazano możliwość wykrycia nawet niewielkich różnic genetycznych pomiędzy szczepami bakterii.

Podsumowując, w niniejszej pracy zaproponowano nowe podejście do interpretacji genotypowania TRS-PCR, w którym każdemu unikalnemu profilowi TRS-PCR przypisywana jest wartość liczbowa. Jeżeli szukamy podobieństw lub przeprowadzamy dochodzenia filogenetyczne możemy zastosować metodę uśrednioną TRS-PCR (uśrednienie wyników pojedynczych typowań). Metoda numeryczna, która jest sumą wyników pojedynczych typowań, pozwala na maksymalne rozróżnienie szczepów dla dochodzeń epidemiologicznych, a uzyskane wyniki liczbowe są łatwe do interpretacji. Metoda analiz profili prążkowych TRS-PCR wykazuje dużą siłę różnicowania i wysoką powtarzalność, a numeryczna metoda interpretacji wyników profilowania TRS-PCR może być stosowana jako uzupełniające narzędzie molekularne do identyfikacji szczepów patogennych w badaniach klinicznych i dochodzeniach epidemiologicznych.