

Instytut Biologii Medycznej
Polskiej Akademii Nauk

Mgr inż. Dariusz Stanisław Jarych

Molekularne analizy genomowe
patogennych szczepów

Pseudomonas aeruginosa i *Escherichia coli*

**Rozprawa na Stopień Naukowy
Doktora Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu
w Dyscyplinie Nauki Medyczne
Promotor: Prof. dr hab. Paweł Parniewski, IBM PAN
Promotor pomocniczy: Dr inż. Marta Majchrzak, IBM PAN**

Łódź, 2022

Praca została wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Pawła Parniewskiego w Pracowni Genetyki Molekularnej, Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi.

Badania były finansowane ze środków statutowych Instytutu Biologii Medycznej PAN oraz z minigrantu Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN nr G50: „Typowanie molekularne wybranych szczepów klinicznych E. coli metodą MLST”.

Część wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej została opublikowana:

- 1) D. Jarych, E. Augustynowicz-Kopec, A. Iwanska, P. Parniewski, i M. Majchrzak, „Molecular analysis of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from cystic fibrosis patients”, Sci Rep, t. 11, nr 1, s. 15460, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-95034-2. IF = 4.996*

oraz:

- 2) M. Majchrzak, A. B. Kubiak-Szeligowska, D. Jarych, i P. Parniewski, „Numerical interpretation of TRS-PCR profiling results for Escherichia coli strains isolated from patients with bacteriuria in Lodz region, Poland”, Mol Biol Rep, t. 46, nr 5, s. 5543–5553,. 2019, doi: 10.1007/s11033-019-04932-2. IF= 2.107*

Podziękowania

Panu prof. dr hab. Pawłowi Parniewskiemu,
za opiekę, przekazaną wiedzę i cenne rady,
za zaangażowanie i nieocenioną pomoc w trakcie przygotowywania rozprawy,
cierpliwość i wyrozumiałość oraz motywację
do krytycznego spojrzenia na problematykę badawczą

Pani dr inż. Marcie Majchrzak,
za życzliwość, inspirację do zgłębiania zagadnień naukowych,
niezastąpioną pomoc w planowaniu doświadczeń
i merytoryczne wsparcie w rozwiązywaniu wielu problemów naukowych

Pani dr inż. Annie B. Kubiak-Szeligowskiej,
za merytoryczną pomoc podczas pisania pracy doktorskiej
oraz za okazane wsparcie i cenne rady podczas realizacji badań

Rodzinie i Przyjaciółom,
za nieustanną wiarę we mnie, cierpliwość,
wyrozumiałość i motywację

Spis treści

1. WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	7
2. STRESZCZENIE	10
3. ABSTRACT	14
4. WSTĘP	18
4.1. CHARAKTERYSTYKA PAŁECZEK <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	19
4.1.1. Czynniki wirulencji <i>P. aeruginosa</i>	21
4.2. ZAKAŻENIA Z UDZIAŁEM <i>P. AERUGINOSA</i>	30
4.3. MUKOWISCYDOZA, A INFEKCJE <i>P. AERUGINOSA</i> , CZYNNIKI WIRULENCJI PATOGENU, CZYNNIKI GOSPODARZA	32
4.4. CHARAKTERYSTYKA PAŁECZEK <i>ESCHERICHIA COLI</i>	35
4.5. PATOTYP IPEC, SUBPATOTYPY, CZYNNIKI WIRULENCJI.....	38
4.6. PATOTYP ExPEC, SUBPATOTYPY, CZYNNIKI WIRULENCJI	40
4.7. ZAKAŻENIA Z UDZIAŁEM <i>E. COLI</i>	44
4.8. IDENTYFIKACJA MOLEKULARNA PATOGENÓW BAKTERYJNYCH, RÓŻNICOWANIE, DOCHODZENIA EPIDEMIOLOGICZNE	46
4.8.1. Metody typowania fenotypowego	47
4.8.2. Metody typowania molekularnego.....	49
5. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	57
6. MATERIAŁY	58
6.1. MATERIAŁ BIOLOGICZNY	58
6.1.1. Szczepy kliniczne <i>E. coli</i>	58
6.1.2. Szczepy kliniczne <i>P. aeruginosa</i>	58
6.2. PODŁOŻA BAKTERYJNE	59
6.3. ODCZYNNIKI CHEMICZNE, MATERIAŁY, ROZTWORY I BUFORY	59
6.4. STARTERY WYKORZYSTANE W REAKCJACH PCR.....	60
6.5. STANDARDY WIELKOŚCI FRAGMENTÓW DNA	63
6.6. URZĄDZENIA LABORATORYJNE	63
6.7. PROGRAMY BIOINFORMATYCZNE	63
7. METODY	64

7.1.	METODY HODOWLI DROBNOUSTROJÓW ORAZ PRZYGOTOWANIE ZAWIESIN BAKTERYJNYCH DO PRZECHOWYWANIA W TEMPERATURZE -80 °C	64
7.1.1.	<i>Metody hodowli E. coli</i>	64
7.1.2.	<i>Metody hodowli P. aeruginosa</i>	64
7.1.3.	<i>Przygotowanie zawiesin bakteryjnych do przechowywania w temperaturze -80°C</i>	64
7.2.	IZOLACJA CAŁKOWITEGO BAKTERYJNEGO DNA	64
7.3.	REAKCJA TRS-PCR DLA BADANYCH SZCZEPÓW <i>P. AERUGINOSA</i> I <i>E. COLI</i>	65
7.3.1.	<i>Reakcja TRS-PCR z wykorzystaniem starterów: (N)₆(CGG)₄, (N)₆(GTC)₄, (N)₆(CAC)₄, (N)₆(CCG)₄, bądź (N)₆(GAC)₄</i>	65
7.4.	GENOTYPOWANIE MLST	66
7.5.	TYPOWANIE MOLEKULARNE OPARTE O SEKWENCJE VNTR (MLVA).....	68
7.6.	ELEKTROFOREZA W ŻELACH AGAROWYCH.....	70
7.7.	ANALIZY PORÓWNAWCZE PROFILI PRAŻKOWYCH OTRZYMYWANYCH PO AMPLIFIKACJI METODĄ TRS-PCR	70
7.7.1.	<i>Określenie powtarzalności analiz (R) dla testów TRS-PCR dla badanych kolekcji szczepów E. coli i P. aeruginosa</i>	70
7.8.	SYSTEM PRZYPISYWANIA KLAS TRS-PCR	71
7.9.	ANALIZY BIOINFORMATYCZNE	72
7.10.	ZGODNOŚĆ METOD TYPOWANIA MLVA I TRS-PCR.....	72
7.11.	WYZNACZANIE WSPÓŁCZYNNIKA RÓŻNICOWANIA (DI).....	73
8.	WYNIKI	74
8.1.	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	74
8.1.1.	<i>Określenie powtarzalności analiz (R) dla testu CAC-PCR dla badanej kolekcji szczepów E. coli</i>	74
8.1.2.	<i>Różnicowanie szczepów UPEC z wykorzystaniem analizy CAC-PCR</i>	75
8.1.3.	<i>Różnicowanie szczepów UPEC z wykorzystaniem analizy uśrednionej opartej na reakcjach CGG-PCR, GTG-PCR i CAC-PCR</i>	77
8.1.4.	<i>Opracowanie metody numerycznej typowania molekularnego</i>	79
8.1.5.	<i>Przypisanie klas TRS-PCR dla kolekcji uropatogennych szczepów E. coli</i>	80
8.1.6.	<i>Analiza MLST</i>	84
8.2.	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	89
8.2.1.	<i>Opracowanie testów TRS-PCR do różnicowania kolekcji P. aeruginosa</i>	89

8.2.2. Określenie powtarzalności analiz (R) dla testu CGG-PCR i GTC-PCR badanych kolekcji szczepów <i>P. aeruginosa</i>	90
8.2.3. Różnicowanie szczepów <i>P. aeruginosa</i> z wykorzystaniem analizy CGG-PCR	91
8.2.4. Różnicowanie szczepów <i>P. aeruginosa</i> z wykorzystaniem analizy GTC-PCR	93
8.2.5. Różnicowanie szczepów <i>P. aeruginosa</i> z wykorzystaniem uśrednionej analizy opartej na reakcjach CGG-PCR i GTC-PCR.....	95
8.2.6. Przypisanie klas TRS-PCR dla szczepów <i>P. aeruginosa</i>	97
8.2.7. Analiza MLVA izolatów <i>P. aeruginosa</i>	100
8.2.8. Porównanie metod typowania MLVA i TRS-PCR.....	106
8.2.9. Określenie współczynnika zgodności różnicowania między zastosowanymi metodami typowania.....	112
9. WNIOSKI.....	113
10. DYSKUSJA	114
11. PODSUMOWANIE.....	123
12. SUMMARY	126
13. SPIS TABEL I RYSUNKÓW.....	129
13.1. SPIS TABEL	129
13.2. SPIS RYSUNKÓW	131
14. WYKAZ POZOSTAŁYCH PUBLIKACJI	133
15. WYKAZ POLSKICH I ZAGRANICZNYCH KONFERENCJI NAUKOWYCH.	135
16. BIBLIOGRAFIA	136
17. ZAŁĄCZNIK.....	148

1. Wykaz najczęściej używanych skrótów

Skrót	Rozwinięcie w języku angielskim	Rozwinięcie w języku polskim
ABC	ATP-binding cassette	Kaseta wiążąca ATP
AHL	Acyl homoserine lactone	Acylowane laktony homoseryny
AIEC	Adherent-invasive <i>E. coli</i>	Szczepy <i>E. coli</i> prowadzące do adhezji i inwazji komórek nabłonkowych
APEC	Avian pathogenic <i>E. coli</i>	Szczepy <i>E. coli</i> pochodzenia ptasiego
ATEC	Atypical <i>E. coli</i>	Atypowe enterogenne szczepy <i>E. coli</i>
BSI	Bloodstream infections	Infekcje krwi
CAUTI	Catheter-associated urinary tract infection	Infekcja dróg moczowych związana z cewnikiem
c-di-GMP	Cyclic diguanylate	Cykliczny di-GMP
CF	Cystic fibrosis	Mukowiscydoza
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	Błonowy regulator przewodnictwa
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate	Cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan
DAEC	Diffusely-adhering <i>E. coli</i>	Dyfuzyjnie-przylegające szczepy <i>E. coli</i>
DI	Diversity index	Współczynnika różnicowania
DMSO	Dimetylosulfotlenek	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid	Kwas deoksyrybonukleinowy
EAEC	Enteraggative <i>E. coli</i>	Enteraggacyjne szczepy <i>E. coli</i>
EAST1	Enteraggative <i>E. coli</i> heat-stable enterotoxin 1	Ciepłostała enterotoksyna 1 typowa dla szczepów EAEC
ECM	Extracellular matrix	Macierz zewnątrzkomórkowa
eDNA	Extracellular DNA	Zwnątrzkomórkowy DNA
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Kwas wersenowy
EHEC	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>	Enterokrwotoczne szczepy <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>	Enteroinwazyjne szczepy <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i>	Enteropatogenne szczepy <i>E. coli</i>
EPS	Exopolysaccharide	Egzopolisacharyd
ESBL	Extended-spectrum β -lactamases	β -laktamazy o rozszerzonym spektrum
ETEC	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	Enterotoksynogenne szczepy <i>E. coli</i>

ExPEC	Extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i>	Pozajelitowe patogenne szczepy <i>E. coli</i>
GIs	Genomic islands	Wyspy genomowe
Has	Heme assimilation system	System asymilacji hemu
HGT	Horizontal gene transfer	Horyzontalny transfer genów
HK	Histidine kinase	Kinaza histydynowa
HUS	Haemolytic-uraemic syndrome	Zespół hemolityczno-mocznicowy
Hxu	Hemopexin uptake	System wychwytu hemopeksyny
IHF	Integration host factor	Czynnik integracyjny gospodarza
IL-8	Interleukin 8	Interleukina 8
IM	Inner membrane	Błona wewnętrzna
IPEC	Intestinal pathogenic <i>E. coli</i>	Patogenne jelitowe szczepy <i>E. coli</i>
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolisacharyd
MBL	Metallo- β -lactamases	Metallo- β -laktamazy
MDR	Multidrug resistance	Oporność wielolekowa
MGE	Mobile genetic elements	Mobilne elementy genetyczne
MLST	Multilocus sequence typing	Typowanie na podstawie sekwencjonowania genów metabolizmu podstawowego
MLVA	Multiple loci VNTR analysis	Typowanie molekularne oparte o sekwencje VNTR
MPEC	Mammary pathogenic <i>E. coli</i>	Szczepy <i>E. coli</i> powodujące zakażenia gruczołu mlecznego
MS	Mass spectrometry	Spektrometria mas
NGS	Next generation sequencing	Sekwencjonowanie następnej generacji
NMEC	Neonatal meningitis <i>E. coli</i>	Szczepy <i>E. coli</i> powodujące zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków
OM	Outer membrane	Błona zewnętrzna
PAI	Pathogenicity islands	Wyspy patogenności
PCR	Polymerase chain reaction	Reakcja łańcuchowa polimerazy
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis	Elektroforeza żelowa w polu pulsacyjnym
Phu	<i>Pseudomonas</i> heme uptake	System wychwytu hemu

REP	Repetitive extragenic palindromic elements	Powtarzające się, pozagenowe elementy palindromowe
RFLP	Restriction fragment length polymorphic DNA analysis	Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych
RNA	Ribonucleic acid	Kwas rybonukleinowy
RR	Response regulator	Regulator odpowiedzi
SEPEC	Sepsis-associated <i>E. coli</i>	Szczepy <i>E. coli</i> związane z posocznicą
SHI	<i>Shigella</i> Island	Wyspy patogenności <i>Shigella</i>
ST	Sequence type	Typ sekwencyjny
sRNA	Small RNA	Mały regulatorowy RNA
STEC	<i>Shigatoxigenic E. coli</i>	Szczepy <i>E. coli</i> produkujące Shiga toksynę
T1SS	Type one secretion system	System sekrecji typu I
T2SS	Type two secretion system	System sekrecji typu II
T3SS	Type three secretion system	System sekrecji typu III
T5SS	Type five secretion system	System sekrecji typu V
T6SS	Type six secretion system	System sekrecji typu VI
TAE	Tris-acetate-EDTA	Tris-octan-EDTA
TCSTS	Two component signal transduction system	Dwuskładnikowe systemy przekazywania sygnału
TRS	Trinucleotide repeat sequences	Trójnukleotydowe sekwencje powtórzone
UPEC	Uropathogenic <i>E. coli</i>	Uropatogenne szczepy <i>E. coli</i>
UTI	Urinary tract infection	Zakażenie dróg moczowych
VAP	Ventilator-associated pneumonia	Respiratorowe zapalenie płuc
VNTR	Variable number of tandem repeats	Zmienna liczba powtórzeń tandemowych
VTEC	Verocytotoxin producing <i>E. coli</i>	Szczepy <i>E. coli</i> produkujące werocytotoksynę
WGS	Whole genome sequencing	Sekwencjonowanie całych genomów
WHO	World Health Organization	Światowa Organizacja Zdrowia

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 otrzymywanych 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.

3. Abstract

Molecular epidemiology is the study of infectious diseases in relation to selected genetic characteristics of the microorganism causing the host infection. Molecular epidemiological studies help to understand the mechanisms of interaction between the host and the pathogen and define virulence factors, phylogenetic relatedness, and pathogenic microbial transmission pathways. The rods belonging to the *Enterobacteriaceae* family pose a significant threat among gram-negative bacteria, including *Escherichia coli* and multi-drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Among the methods of typing microbial microorganisms used in diagnostics, one can distinguish methods based on the analysis of phenotypic characteristics and genetic material of microorganisms. Genotyping methods have been used in microbiological diagnostics and epidemiological research - in detecting, identifying, and differentiating microorganisms. Replacement phenotypic methods with molecular techniques based on the polymerase chain reaction (PCR) for characterizing clinical isolates allowed to shorten the analysis time and reduce their costs and labor consumption. It also allowed for studying microorganisms whose laboratory cultivation is difficult or impossible.

The main aim of this dissertation was to improve the methodology of genetic differentiation of pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* using the TRS-PCR technique. This work is a continuation of the research on the TRS-PCR molecular method developed in the Laboratory of Molecular Genetics, used for the differentiation of clinical strains, based on the analysis of the similarity of band profiles. The interpretation of TRS-PCR band profiles was improved by introducing a numerical system in which the same profile was assigned a numerical value. This approach allows for a more accessible analysis of molecular profiles obtained for the tested strains and the possibility of comparing the results obtained in different laboratories. In order to determine the differentiation power of the new TRS-PCR methodology, the results were compared with those obtained from the MLST (for *E. coli* collections) and MLVA (for *P. aeruginosa* strains) analyses.

First, studies were conducted that allowed for developing and evaluating the usefulness of the TRS-PCR test using the $N_6(CAC)_4$ primer to differentiate uropathogenic *E. coli* strains. Considering the high reproducibility of this method, identical to that for the GTG-PCR test but lower than for the CGG-PCR, the CAC-PCR method allowed the grouping of 124 tested UPEC strains into 52 unique clusters.

The averaged analysis of the band profiles based on three TRS-PCR tests for UPEC isolates allowed for assessing their differentiating potential. Given the high value of the repeatability coefficient of 95%, 111 unique strains were identified from among 124 tested UPEC isolates. Such a result indicates a high efficiency of the differentiation of UPEC strains using averaged analysis based on the above-mentioned TRS-PCR tests.

TRS-PCR band profile analysis methodology was improved by introducing numerical classification for identical profiles obtained in individual TRS-PCR tests to differentiate the collection of uropathogenic clinical *E. coli* strains. The profiles with similarities above the calculated repeatability value were considered identical. As a result of comparing the strength of differentiation of the CAC-PCR method with the molecular tests carried out previously in the Laboratory for the studied collection of UPEC strains, based on the CGG- and GTG-PCR methods, 52 CAC-PCR classes, 86 GTG-PCR classes and 99 CGG classes were obtained. Subsequently, each *E. coli* isolate with a unique TRS-PCR class profile (CAC-, GTG- and CGG-PCR) was assigned to a separate TRS-PCR group. This approach to the interpretation of profiling results allowed for the differentiation of 121 unique isolates, differing in at least one TRS class, from among 124 uropathogenic *E. coli* strains available in the collection of the IBM PAN Molecular Genetics Laboratory. Differentiating clinical UPEC strains based on the numerical system of assigning TRS-PCR classes showed a better ability to differentiate isolates than the classical, averaged analysis of the band profiles.

In the next part of this work, a comparative analysis was carried out for several selected UPEC and STEC strains, using two different molecular typing techniques: based on the numerical classification TRS-PCR system and the MLST method on the scheme proposed by Wirth *et al.* The TRS-PCR analysis provided the results differentiating selected strains of *E. coli* like those obtained in the MLST analysis. However, the results suggest that the TRS-PCR method also allows for the differentiation of some strains with identical ST sequence profiles.

In this study, the usefulness of the methodology of comparing CGG- and GTC-PCR band profiles for determining the genetic diversity of clinical collections of *P. aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis was tested for the first time. The determined values of the repeatability coefficients of the analyzes performed for both the CGG- and GTC-PCR tests were at a very high and similar level (93.3% and 95.3%, respectively), which means that the TRS-PCR analyses for the collection of *P. aeruginosa* may have a high differentiating potential. Of the 63 *P. aeruginosa* isolates tested,

27 unique strains were classified by CGG-PCR differentiation, while GTC-PCR differentiation allowed the identification of only ten unique isolates. This result allowed us to conclude that the CGG-PCR test has a better differentiation potential than the GTC-PCR method. Then, an averaged analysis of the similarity of the obtained band profiles for both TRS-PCR tests was performed, assigning 63 tested *P. aeruginosa* strains to 26 clusters.

Subsequently, the strains were assigned CGG- and GTC-PCR class numbers. *P. aeruginosa* strains with band profiles displaying similarity above the repeatability value for both CGG- and GTC-PCR tests were treated as identical. Based on the assigned profile for each TRS-PCR class, the tested strains were assigned to 40 TRS-PCR groups, differing in at least one TRS-PCR class. This way, 25 individual TRS-PCR groups, and 15 complexes were identified, to which at least two or more *P. aeruginosa* isolates were assigned.

In the next part of the doctoral dissertation, the results of differentiation of the studied collection of *P. aeruginosa* strains using the TRS-PCR numerical system were compared with the results of the VNTR-MLVA analysis obtained for these strains. 26 MLVA groups were identified for 63 *P. aeruginosa* isolates having a unique numerical allelic profile corresponding to the copy number of the VNTR sequence. Comparing the above methods, the assignment of numerical classes and groups of TRS-PCR differentiates clinical isolates more strongly compared to VNTR-MLVA, which is also indicated by the calculated values of Wallace's coefficient. Individual patients were assigned strain numbers or variants based on MLVA groups. This analysis was extended to include the specific numerical values of the TRS-PCR groups and has resulted in further diversification of the *P. aeruginosa* strain collection.

The new method of analysis of TRS-PCR profiles seems beneficial in the differentiation of clinical strains of *E. coli* and *P. aeruginosa* and shows a greater ability to differentiate isolates than the classical, averaged analysis of the band profiles. The applied numerical method proved that even slight genetic differences between bacterial strains could be detected.

Our research results suggest that MLST and TRS-PCR are effective methods for genotyping clinical *E. coli* strains and can be used in routine epidemiological surveillance and identification of *E. coli* transmission sources. It seems, however, that the numerical TRS-PCR method is in some cases more differentiating than MLST. Therefore, the numerical interpretation of TRS-PCR results proposed in this work can complement the MLST analyses.

The results of the research presented in the dissertation suggest that MLVA in combination with TRS-PCR are reproducible and highly differentiating methods of typing DNA of *P. aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. The new TRS-PCR methodology shows a greater differentiation power than the VNTR-MLVA technique. It can complement the MLVA scheme or be a primary, rapid, reproducible method for genotyping *P. aeruginosa* isolates. Applying the numerical method showed that detecting even minor genetic differences between bacterial strains was possible.

In conclusion, this dissertation proposes a new approach to interpreting TRS-PCR genotyping, in which each unique TRS-PCR profile is assigned a numerical value. If we want to look for similarities or carry out phylogenetic investigations, we can use the average TRS-PCR method (averaging the results of single typing). The numerical method, the sum of the results of single typings, allows the maximum differentiation of strains for epidemiological investigations, and the obtained numerical results are easy to interpret. The TRS-PCR band profile analysis method shows high differentiation power and reproducibility, and the numerical interpretation of TRS-PCR profiling results can be used as a complementary molecular tool to identify pathogenic strains in clinical trials and epidemiological investigations.

4. Wstęp

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, pokrewieństwa filogenetyczne i szlaki transmisji drobnoustrojów patogennych. Zakażenia szpitalne, wywołane przez szczepy wielolekooporne i posiadające wiele czynników wirulencji, stanowią przyczynę przedłużającego się leczenia, a także zgonów. Wśród bakterii Gram-ujemnych, istotne zagrożenie stanowią pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* (w tym pałeczki *Escherichia coli*), wytwarzające enzymy o rozszerzonym spektrum substratowym (ang. *extended-spectrum β -lactamase*, ESBL), oraz wielolekooporne szczepy *Pseudomonas aeruginosa* wytwarzające metalo- β -laktamazy (ang. *metalo- β -lactamases*, MBL). Aby pomóc w odkryciu odpowiednich strategii profilaktycznych i terapeutycznych, w 2017 r. Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) przedstawiła listę priorytetowych patogenów, zgodnie z którą patogenne bakterie *P. aeruginosa* i *E. coli* stanowią istotny problem zdrowotny, ze względu na ich duży potencjał epidemiologiczny, powodowanie zakażeń zagrażających życiu i łatwość rozprzestrzeniania się, a także mających znaczący poziom oporności na wiele antybiotyków. Odpowiednia diagnostyka mikrobiologiczna stanowi ważny aspekt ograniczania zakażeń i pozwala na zastosowanie właściwego leczenia, a także poznanie dróg rozprzestrzeniania się infekcji oraz rezerwuarów mikroorganizmów patogennych. Skupiska patogenów mogą stanowić źródło rozprzestrzeniających się infekcji wewnątrzszpitalnych, jednakże określenie powiązań epidemiologicznych nie zawsze jest łatwe do ustalenia. 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.

4.1. Charakterystyka pałeczek *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* wykazują zdolność do kolonizacji różnorodnych siedlisk lądowych i wodnych, oraz mają duże znaczenie w chorobach roślin i ludzi oraz w zastosowaniach biotechnologicznych. Jednym z najlepiej poznanych i mających duże znaczenie w chorobotwórczości jest pałeczka ropy błękitnej - *Pseudomonas aeruginosa* [2].

P. aeruginosa to Gram-ujemna, oportunistyczna bakteria o kształcie pałeczek, o długości od 2 do 4 μm i szerokości od 0,5 do 1,5 μm , posiadająca pojedynczą wicę polarną, występująca w glebie i wodzie. Mikroorganizm ten został po raz pierwszy wyizolowany w 1882 roku przez Carle Gessarda i początkowo nazwany *Bacillus pyocyaneus* [3]. Ze względu na swoją zdolność biosyntetyczną, *P. aeruginosa* rozwija się w środowiskach o minimalnej zawartości składników odżywczych i w różnych warunkach fizycznych, umożliwiając przetrwanie w warunkach szpitalnych i środowiskowych [4]. Optymalna temperatura rozwoju dla tej bakterii wynosi 37 °C. Jest to bakteria niefermentująca laktozy, która w sytuacjach tlenowych wykorzystuje szlak glikolityczny do rozkładu glukozy, z tlenem jako ostatecznym akceptorem elektronów. Jednak w warunkach beztlenowych bakteria wykorzystuje azot jako akceptor elektronów [5].

P. aeruginosa jest często izolowana z gleby i wód gruntowych skażonych ropą naftową. Bakteria ta posiada zdolność do produkcji biosurfaktantów oraz do rozkładu węglowodorów ropy naftowej, przez co jest również wykorzystywana w bioremediacji toksycznych odpadów organicznych, w tym aromatycznych związków węglowodorowych [2]. Związki aromatyczne, takie jak fenolosiarczany i fenyloalanina można uznać za przypuszczalne substraty dla aktywności katabolicznej *P. aeruginosa* [5]. *P. aeruginosa* charakteryzuje się wytwarzaniem pigmentów nadających hodowłom specyficzne kolory: zielono-niebieski (piocyjanina), zielony (piowerdyna), czerwony (piorubina) bądź brązowo-czarny (piomelanina). Niektóre szczepy *P. aeruginosa* wytwarzają pozakomórkowy polisacharyd – alginian [6].

P. aeruginosa posiada genom o wielkości >6 Mbp, większy niż u wielu innych prokariotów, zawierający geny regulatorowe, a także geny zaangażowane w katabolizm i transport związków organicznych z wnętrza komórki przez błonę komórkową. Właściwości te przyczyniają się do adaptacji *P. aeruginosa* do różnych warunków środowiskowych i są ściśle związane z rozwojem antybiotykooporności [7], [8]. W wyniku badań i analiz wielu sekwencji genomowych *P. aeruginosa*, możemy wyróżnić: tzw.

genom rdzeniowy (ang. *core genome*), o długości około 5,84 Mbp, zawierający konserwatywne sekwencje około 4000 genów (w tym geny kodujące czynniki wirulencji), wspólnych dla większości szczepów *P. aeruginosa*, oraz tzw. genom pomocniczy (ang. *accessory genome*), o długości około 727 kbp, zawierający zestaw genów oraz sekwencji kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. *deoxyribonucleic acid*, DNA), niewystępujących we wszystkich szczepach, w skład którego wchodzi mobilne elementy genetyczne (ang. *mobile genetic elements*, MGE), takie jak: fagi, plazmidy, transpozony, sekwencje insercyjne i wyspy genomowe (ang. *genomic islands*, GIs) [5], [9]. Genom pomocniczy odgrywa znaczącą rolę w takich procesach, jak patogenezę i oporność na antybiotyki i metale ciężkie, może wpływać na zwiększoną wirulencję (poprzez kodowanie dodatkowych czynników wirulencji, w tym egzotoksyny, np. ExoS oraz ExoU), oraz może determinować adaptację tego patogenu do różnych środowisk. Genom *P. aeruginosa* zawiera również powtarzające się, pozagenowe elementy palindromowe (ang. *repetitive extragenic palindromic*, (REP) *elements*), będące sekwencjami DNA o długości od 21 do 65 bp. Sekwencje te mogą stabilizować mRNA i są miejscem wiązania polimerazy DNA I, gyrazy DNA i integracyjnego czynnika gospodarza (ang. *integration host factor*, IHF), który bierze udział m.in. w rekombinacji, replikacji DNA i regulacji ekspresji genów [2] [10].

Ściana komórkowa *P. aeruginosa* ma złożoną budowę i zbudowana jest tylko z jednej warstwy usieciowanej mureiny o grubości od 2 do 10 nm. Dominującą część ściany komórkowej u *P. aeruginosa* tworzy błona zewnętrzna, która działa jako selektywna bariera zapobiegająca przenikaniu antybiotyków i wykazuje mniejszą przepuszczalność błony zewnętrznej w porównaniu z innymi bakteriami Gram-ujemnymi. W błonie zewnętrznej *P. aeruginosa* znajdują się fosfolipidy, białka strukturalne i lipopolisacharyd (ang. *lipopolysaccharide*, LPS). LPS jest składnikiem zewnętrznej warstwy błony zewnętrznej składającej się z lipofilowego lipidu kotwiczącego A, wewnętrznego rdzenia oligosacharydowego i zewnętrznego łańcucha oligosacharydowego, antygeny O [11]. Obecność fosfolipidów, białek strukturalnych i LPS na powierzchni komórki bakteryjnej powoduje rozpoznawanie jej przez układ odpornościowy gospodarza.

P. aeruginosa stanowi ogromne zagrożenie dla zdrowia człowieka również ze względu na oporność na wiele klas antybiotyków oraz stanowi ważną przyczynę szpitalnych zakażeń na całym świecie [12]. *P. aeruginosa* jest patogenem zdolnym do infekowania u człowieka szeregu tkanek, zwłaszcza u pacjentów z obniżoną odpornością, np. po przeszczepach i poddawanych chemioterapii, z ranami oparzeniowymi

i przebywających na oddziałach intensywnej terapii (OIT), prowadząc do zapalenia płuc, infekcji dróg moczowych bądź posocznicy. Bakteria ta jest trudnym do zwalczania patogenem ze względu na tworzenie biofilmu podczas przewlekłych infekcji, który zwiększa oporność na leczenie przeciwdrobnoustrojowe.

W kontrolowaniu wirulencji i oporności u *P. aeruginosa* zaangażowane są m.in. system sekrecji typu III (ang. *type three secretion system*, T3SS) [13], czynniki sigma [14] i dwuskładnikowe systemy przekazywania sygnału (ang. *two componentc signal transduction system*, TCSTS) [15].

Co istotne, *P. aeruginosa* został sklasyfikowany jako patogen ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i gatunki *Enterobacter*) i, jako taki, stanowi priorytet dla nowych badań oraz opracowywania leków przez WHO [4].

4.1.1. Czynniki wirulencji *P. aeruginosa*

Czynniki wirulencji *P. aeruginosa* kodowane są zarówno przez genom rdzeniowy, jak i pomocniczy. Czynniki wirulencji mogą być zlokalizowane w obrębie tzw. wysp patogenności (ang. *pathogenicity islands*, PAIs). *P. aeruginosa* ma kilka mechanizmów wirulencji, które umożliwiają wniknięcie do organizmu gospodarza, a następnie namnożenie i uszkodzenie komórek zainfekowanego organizmu. Czynniki te u *P. aeruginosa* mogą występować na powierzchni komórki bakteryjnej oraz mogą być wydzielane pozakomórkowo. Do czynników wirulencji u *P. aeruginosa* należą te, związane z ruchliwością (wici, pile typu IV), unikaniem odpowiedzi immunologicznej gospodarza (elastazy i proteazy alkaliczne), opornością na antybiotyki (pompy wielolekooporności), cytotoksycznością (egzotoksyny, LPS, barwniki (np. piowerdyna, piocyjanina), T3SS, fosfolipazy), czy zdolnością do tworzenia biofilmu (produkcja alginianu) [2], [6], [12].

Ruchliwość i adhezja do komórek gospodarza

Ruchliwość i zdolność do przylegania do komórek gospodarza są czynnikami wirulencji odgrywającymi ważną rolę w przemieszczaniu się bakterii, wyzwalaniu odpowiedzi immunologicznych gospodarza, tworzeniu się biofilmu i rozwoju przewlekłej infekcji.

U bakterii ruchliwość odgrywa fundamentalną rolę w kolonizacji powierzchni abiotycznych (np. wyrobów medycznych) i biotycznych (np. uszkodzone tkanki).

P. aeruginosa, w celu poruszania się, wykorzystuje pojedynczą wić polarną, złożoną z białka flageliny o nazwie FliC oraz rzęski. Zmiany kierunku ruchu wynikają z chemotaksji i są wyzwalane sygnałami chemicznymi [5].

Adhezja umożliwia patogenom przyleganie do nabłonka oddechowego i jest niezbędnym etapem infekcji. Adhezja jest osiągana przez interakcje między adhezynami bakteryjnymi, a receptorami gospodarza. W przypadku infekcji *P. aeruginosa* głównymi adhezynami są: pojedyncza wić, która jest niezbędna do ruchliwości, adhezji do komórek i tworzenia biofilmu, oraz pile typu IV, które są wyrostkami złożonymi z białek – pilin. Adhezyny umożliwiają bakteriom przemieszczanie się po powierzchni i pośredniczą w przyleganiu do receptorów powierzchniowych komórek nabłonka dróg oddechowych, głównie poprzez mucyny oddechowe i glikolipidy gospodarza. W szczególności ganglio-N-tetraozylceramid (asialo-GM1), występujący na komórkach ssaków, stanowi receptor dla *P. aeruginosa* i jest rozpoznawany przez pile typu IV. W przyłączeniu do glikolipidu bierze udział region C-końcowy białka pilinowego (wiązania dwusiarczkowe), oraz grupy węglowodanowe glikoprotein [16]–[19]. Asialo-GM1 może być również rozpoznawany przez lektynę A (LecA), inne białko należące do adhezyn *P. aeruginosa* [20]. Rozprzestrzenianie się *P. aeruginosa* jest również częściowo zależne od produkcji elastazy bakteryjnej i innych proteaz, degradujących kolagenowe i niekolagenowe białka gospodarza oraz zaburza integralność błony podstawnej, niszcząc fizyczne bariery gospodarza, które normalnie hamowałyby rozprzestrzenianie się infekcji. Proteazy mogą mieć również niekorzystny wpływ na mechanizmy wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej gospodarza (elastaza hamuje chemotaksję monocytów, co może niekorzystnie wpływać na wczesne usuwanie *P. aeruginosa* przez fagocytozę, a także na późniejszą prezentację antygenów bakteryjnych układowi odpornościowemu gospodarza) [21].

Systemy pozyskiwania żelaza

Żelazo jest pierwiastkiem niezbędnym do wzrostu i funkcjonowania kluczowych enzymów zaangażowanych u *P. aeruginosa* w syntezę DNA, transport elektronów i ochronę przed stresem oksydacyjnym. Brak żelaza w otoczeniu zapobiega tworzeniu przez *P. aeruginosa* biofilmu [22]. W komórkach bakteryjnych rola tego pierwiastka opiera się na zdolności jonów żelaza do utleniania i redukcji. Ponieważ żelazo jest mikroelementem występującym w środowisku w ograniczonych ilościach ze względu na

jego niską rozpuszczalność w formie żelazowej (Fe^{3+}), *P. aeruginosa* wyewoluował wiele mechanizmów molekularnych w celu jego pozyskiwania. *P. aeruginosa* wydziela dwa siderofory wiążące żelazo: piowerdynę i piochelinę, które mają powinowactwo do żelaza w formie jonów żelazowych Fe^{3+} , a po związaniu jonów mogą być importowane z powrotem do komórki. W przypadku dostępności w środowisku jonów żelazowych Fe^{2+} , na przykład w warunkach beztlenowych lub po redukcji przez fenazyny, *P. aeruginosa* wykorzystuje swój system wychwytu jonów Fe^{2+} - Feo-ABC. *P. aeruginosa* posiada również trzy systemy importu hemu do pozyskiwania żelaza z hemoprotein gospodarza, w tym system wychwytu hemu (ang. *Pseudomonas heme uptake*, Phu) i system asymilacji hemu (ang. *heme assimilation system*, Has), oraz system wychwytu hemopeksyny (ang. *hemopexin uptake*, Hxu) [23].

Oporność na antybiotyki

Oporność na antybiotyki oznacza zdolność do zmniejszania skuteczności danego antybiotyku. Do najbardziej rozpowszechnionych mechanizmów przeciwdrobnoustrojowej oporności wielolekowej (ang. *multiple drug resistance*, MDR), u *P. aeruginosa* zalicza się: wytwarzanie enzymów inaktywujących antybiotyki (np. zwiększona ekspresja genów kodujących β -laktamazy: ESBL oraz MBL), blokadę docelowych receptorów antybiotyków poprzez zmianę szlaków metabolicznych (m. in. regulacja kaskady reakcji prowadzących do modyfikacji lipidu A), zmianę przepuszczalności błony komórkowej (np. poprzez utratę kanałów błony zewnętrznej (ang. *outer membrane porins*), oraz mechanizm aktywnego usuwania antybiotyku z komórki poprzez zwiększoną ekspresję pomp wielolekooporności (ang. *efflux pumps*). Poryny są białkami błonowymi, które tworzą wypełnione wodą kanały dyfuzyjne prowadzące przez zewnętrzną ścianę komórek bakterii, przez które zachodzi przenikanie składników odżywczych. Pompy wielolekooporności umożliwiają *P. aeruginosa* czynne usuwanie z komórki szkodliwych związków, w tym substancji przeciwbakteryjnych, jak również soli żółci, toksyn, detergentów i biocydów. Geny determinujące obecność pomp wielolekooporności, takich jak systemy MexAB-OprM, zazwyczaj kodowane są chromosomalnie. Mechanizmy oporności wielolekowej u *P. aeruginosa* związane są z mobilnymi elementami genetycznymi, co sprzyja rozprzestrzenianiu się oporności podczas wymiany informacji genetycznej w procesie horyzontalnego transferu genów, i nabywania oporności wielolekowej wśród izolatów *P. aeruginosa* [24]. Metallo- β -laktamazy, posiadające w centrum aktywnym cynk,

odpowiadają u *P. aeruginosa* za oporność na większość antybiotyków β -laktamowych, w tym karbapenemy. Indukowalny gen *ampC*, kodujący enzym hydrolityczny β -laktamazy – cefalosporynazę, nadaje oporność na większość antybiotyków β -aktamowych, w tym penicyliny i cefalosporyny [5].

Tworzenie biofilmu

Tworzenie biofilmu przez patogeniczne bakterie *P. aeruginosa* jest uważane za jeden z głównych czynników wirulencji. Biofilm zapobiega usuwaniu bakterii przez komórki odpornościowe gospodarza i osłabia odpowiedź immunologiczną gospodarza na powstałą infekcję [25]. Biofilm stanowią skupiska komórek bakteryjnych przyczepionych do powierzchni i pokrytych wydzielaną macierzą zewnątrzkomórkową (ang. *extracellular matrix*, ECM). Składnikami ECM są: egzopolisacharyd (ang. *exopolysaccharide*, EPS), zewnątrzkomórkowy DNA (ang. *extracellular DNA*, eDNA), kwas rybonukleinowy, (ang. *ribonucleic acid*, RNA), białka i lipidy. Macierz zewnątrzkomórkowa chroni strukturę biofilmu przed trudnymi warunkami środowiska. W związku z tym, bakterie tworzące biofilmy wykazują wysoką oporność na antybiotyki i zmniejszoną podatność na odpowiedź immunologiczną gospodarza, poprzez co stanowią główną przyczynę przewlekłych infekcji [26].

W pierwszym etapie rozwoju biofilmu swobodnie pływające bakterie w formie planktonicznej przyczepiają się za pomocą zewnątrzkomórkowych struktur bakteryjnych i wiążą się do podłoża na zasadzie niespecyficznych, odwracalnych oddziaływań. W procesie tym biorą udział struktury bakteryjne, takie jak adhezyny, pile typu IV i lipopolisacharydy, które są specyficznie regulowane przez sygnały środowiskowe. Inicjacja tworzenia biofilmu następuje wraz ze wzrostem cyklicznego di-GMP (ang. *cyclic diguanylate*, c-di-GMP), który jest wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem wykorzystywanym w transdukcji sygnału. Kontakt *P. aeruginosa* z powierzchnią jest rozpoznawany przez białko WspA, związane z błoną białko receptorowe, które wytwarza sygnał do produkcji c-di-GMP, co prowadzi do produkcji adhezyny CdrA, a następnie polisacharydów zewnątrzkomórkowych: Psl, Pel i alginianu [17], [26]–[28]. Tworzenie biofilmu, w tym wytwarzanie białek Psl i Pel oraz zmiana ruchliwości, jest również regulowane przez mały regulatorowy RNA (ang. *small RNA*; sRNA) [8]. Po związaniu się komórek z podłożem i wytworzeniu EPS, obserwuje się namnażanie i różnicowanie drobnoustrojów. Przejście z formy planktonicznej do stadium biofilmu zmienia wzorzec ekspresji genów i powoduje, iż ponad 800 białek bakteryjnych ma sześciokrotny bądź

wyższy wzrost poziomu ekspresji (co stanowi ponad 50% proteomu) [8], [29]. Ostatnim etapem rozwoju biofilmu jest uwolnienie pojedynczych komórek planktonowych lub mikrokoloni z biofilmu, ekspansja na nowe powierzchnie, co daje początek nowemu biofilmowi. Rozwój biofilmu jest również ściśle związany z systemem sygnalizacji zwanym *quorum sensing* (QS) [26].

Quorum sensing

Quorum sensing stanowi mechanizm umożliwiający komunikację między komórkami bakterii, który odgrywa znaczącą rolę w procesie formowania i funkcjonowania biofilmu. QS opiera się na wytwarzaniu i uwalnianiu małych cząsteczek sygnałowych, zwanych autoinduktorami, które umożliwiają *P. aeruginosa* określenie gęstości populacji, regulację ekspresji genów i czynników wirulencji, fenotypu, ruchliwości i adhezji, oraz umożliwiają koordynację aktywności przeciwko odpowiedzi immunologicznej gospodarza w warunkach infekcji. Funkcje autoinduktorów u bakterii Gram-ujemnych pełnią acylowane laktony homoseryny (ang. *acyl homoserine lactone*, AHL). QS jest kluczowe w procesie patogenezy *P. aeruginosa*, reguluje bowiem m.in. ekspresję zewnątrzkomórkowych proteaz, czy pomp wielolekooporności. Każdy system QS może być również aktywowany przez czynniki środowiskowe, takie jak stres fosforanowy, niski poziom tlenu i żelaza [5], [8], [30], [31].

Czynniki sigma

U *P. aeruginosa*, jak i u innych bakterii Gram-ujemnych, ekspresja genów jest ściśle kontrolowana przez regulatory transkrypcji, tzw. czynniki sigma (δ). Czynniki sigma biorą udział w interakcjach pomiędzy polimerazą RNA i sekwencją promotora genów. Dla *P. aeruginosa* zidentyfikowano dotychczas 24 przypuszczalne czynniki sigma [14].

Jednym z najbardziej istotnych czynników u *P. aeruginosa* jest δ^{70} (RpoD), który rozpoznaje sekwencje promotorowe kontrolujące ekspresję genów metabolizmu podstawowego. Wiążąc się z polimerazą RNA tworzy holoenzym biorący udział w inicjacji transkrypcji. Czynnikiem δ^{70} jest odpowiedzialny za rozpoznawanie i wiązanie do sekwencji DNA w pozycjach -10 i -35 regionów promotorowych oraz za rozplecenie podwójnej nici DNA wiążącego się z polimerazą RNA, prowadząc do powstania transkryptu, który może zostać poddany translacji. Kolejnym istotnym czynnikiem jest δ^{32} (RpoH), który jest niezbędny *P. aeruginosa* w regulacji ekspresji genów kodujących białka

szoku cieplnego. Główną funkcją związaną z innym czynnikiem δ^{28} (RpoF) u *P. aeruginosa* jest kontrola biosyntezy flageliny związanej z ruchliwością. Ekspresja czynnika δ^{38} (RpoS) wpływa na regulację mechanizmu QS poprzez modulację regulatorów transkrypcyjnych RhlR i LasR, jak również na zmiany morfologiczne i fizjologiczne, związane z wydzielaniem cząsteczek autoinduktorów i tworzeniem biofilmu. Czynniki kontrolowane przez gen *lasR* są krytycznymi wyznacznikami patogenezы *P. aeruginosa* w zakażeniu ran oparzeniowych (*lasR* koduje białko krytyczne dla zainicjowania odpowiedzi *quorum sensing*, zaangażowanej w wytwarzanie danego czynnika wirulencji i tworzenie biofilmu [32]. RpoS bierze udział w wydzielaniu pozakomórkowych czynników wirulencji, takich jak alginian, egzotoksyna A, elastazy LasA i LasB oraz egzoenzym S. Stwierdzono, że szczepy RpoS-ujemne są mniej odporne na działanie nadtlenu wodoru, wysoką temperaturę, hiperosmolarność, niskie pH i etanol w stacjonarnej fazie wzrostu. Alternatywny czynnik δ^{22} (AlgT (AlgU) lub RpoE), jest niezbędny do zapewnienia odporności na stres oksydacyjny i ekstremalne dla bakterii temperatury. AlgT kontroluje również konwersję *P. aeruginosa* do śluzowego fenotypu z nadprodukcją alginianu u pacjentów z mukowiscydozą [14]. Innym ważnym czynnikiem jest δ^{54} (RpoN), szeroko rozpowszechniony wśród bakterii i niezbędny w wielu procesach, takich jak: asymilacja azotu, ruchliwość, reakcja na bakteriofagi i tolerancja na cynk [14].

Dwuskładnikowe systemy przekazywania sygnału

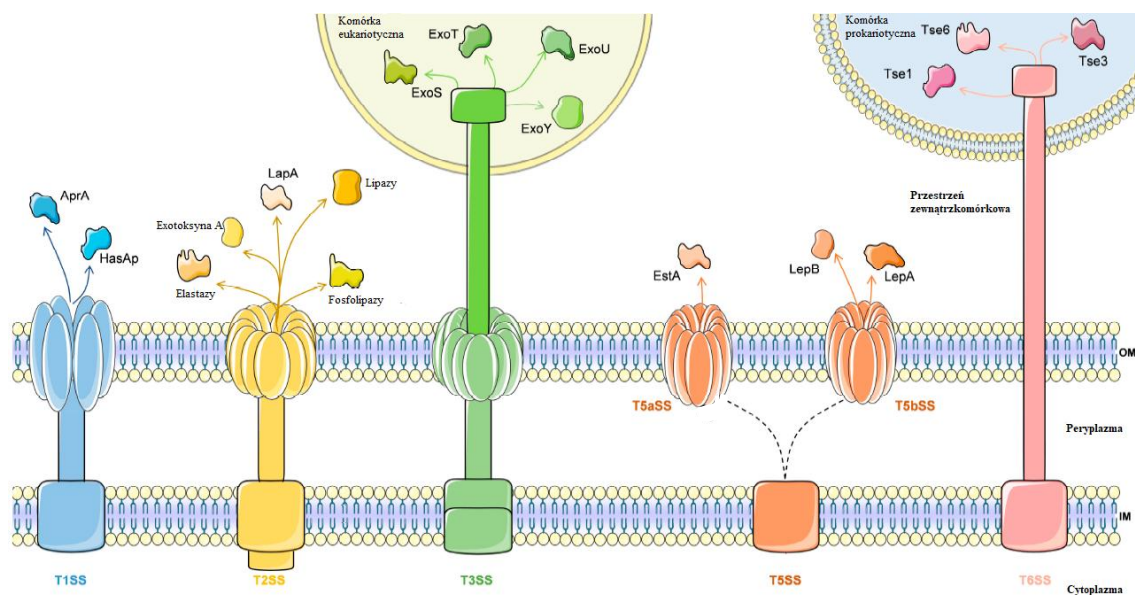
Dwuskładnikowe systemy przekazywania sygnałów to szlaki regulacyjne, które występują u bakterii powszechnie i umożliwiają adaptacyjną odpowiedź komórki na sygnały docierające z otoczenia komórki poprzez modulację ekspresji wielu genów. Umożliwia to przystosowanie się m.in. do warunków nasłonecznienia, osmolarności (stężenia jonów, np. Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}), zawartości tlenu, wilgotności, temperatury, pH, obecności lub braku składników pokarmowych w otoczeniu, a także kontaktu z komórkami gospodarza. TCSTS odgrywają ważną rolę w regulacji wielu właściwości fizjologicznych bakterii, np. w sporulacji, bioluminescencji, tworzeniu biofilmu, czy ruchliwości. Systemy takie zaangażowane są m.in. w regulację ekspresji genów wirulencji, proces koniugacji oraz tworzenie biofilmu, a także transport jonów i substancji odżywczych, jak również w regulację szlaków metabolicznych. TCSTS umożliwiają zmianę aktywności enzymatycznej części białek, również tych, odpowiedzialnych za wirulencję, wytwarzanie toksyn czy antybiotykooporność [15], [33].

TCSTS składa się z błonowego białka sensorowego, którym jest kinaza histydynowa (ang. *histidine kinase*, HK), która odbiera sygnał ze środowiska oraz zlokalizowanego w cytoplazmie białka regulatorowego – regulatora odpowiedzi (ang. *response regulator*, RR). RR ulega zmianie konformacyjnej wynikającej z odebrania sygnału i wywołuje określoną odpowiedź komórkową, regulując ekspresję docelowego genu, zapobiegając lub umożliwiając przyłączenie się polimerazie RNA do DNA i działając jako czynnik transkrypcyjny [34].

Przykładem systemów TCSTS jest GacS/GacA, który odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu procesów zakaźnych *P. aeruginosa*, poprzez hamowanie ekspresji czynników wirulencji związanych z ostrą infekcją, takich jak T3SS, pile typu IV i tworzenie wici. System GacS/GacA kontroluje także mechanizmy związane z przewlekłą infekcją, takie jak system sekrecyjny typu VI (ang. *type VI secretion system*, T6SS) i tworzenie biofilmu. System GacS/GacA składa się z transmembranowego czujnika hybrydowego HK, GacS. Funkcją GacS jest fosforylacja domen regulatora odpowiedzi (RR) i fosfotransferu histydyny (Hpt), co powoduje ich przeniesienie do GacA w cytozolu. GacA promuje transkrypcję dwóch regulatorowych sRNA (RsmZ i RsmY), które wiążą się z małym białkiem wiążącym RNA - RsmA, poprzez charakterystyczne motywy GGA, zapobiegając przyłączaniu się do docelowych mRNA, unikając wyciszenia ich translacji i zwiększając ekspresję mRNA. Prowadzi to również do zwiększenia ekspresji genów związanych z T3SS, pilami typu IV i tworzeniem wici, jednocześnie zmniejszenia ekspresji genów zaangażowanych w tworzenie T6SS i biofilmu [5], [33], [34].

Układy sekrecyjne

P. aeruginosa posiada szereg złożonych systemów wydzielniczych, które dostarczają czynniki wirulencji, takie jak toksyny, elastazy, lipazy i proteazy do środowiska zewnątrzkomórkowego lub do cytozolu komórki gospodarza. *P. aeruginosa* posiada pięć systemów wydzielniczych: typ I, typ II, typ III, typ V i typ VI [5], przedstawionych na Rysunku Nr 1 (typ IV nie występuje u *P. aeruginosa* - podobną funkcję pełni T3SS, np. wstrzykiwanie białek do eukariotycznych komórek gospodarza [35]).



Rysunek Nr 1. Systemy sekrecyjne *P. aeruginosa* (OM – błona zewnętrzna, ang. *outer membrane*; IM – błona wewnętrzna, ang. *inner membrane*) [5].

System wydzielniczy typu I (ang. *type I secretion system*, T1SS), jest jednym z najprostszych opisanych bakteryjnych systemów wydzielniczych. T1SS wymaga białka błony zewnętrznej, transportera ABC (ang. *ATP-binding cassette*), który jest umieszczony w błonie wewnętrznej i dostarcza energię do procesu transportu oraz białka adaptacyjnego łączącego błonę zewnętrzną i wewnętrzną w peryplazmie. U *P. aeruginosa* istnieją dwa typy T1SS umożliwiające pozyskiwanie żelaza hemowego z hemoglobiny oraz będące czynnikiem wirulencji biorącym udział w różnych zakażeniach wywoływanych przez tę bakterię [5].

System wydzielniczy typu II (ang. *type II secretion system*, T2SS), jest konserwatywnym systemem w bakteriiach Gram-ujemnych, którego rolą jest transport dużych multimerycznych białek, wcześniej sfałdowanych w peryplazmie, przez błonę zewnętrzną. T2SS wykorzystuje dwuetapowy proces dostarczania białek zewnątrzkomórkowych: pierwszy obejmuje dostarczanie białek z cytoplazmy do peryplazmy, a drugi etap polega na dalszym wydzielaniu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej za pośrednictwem kompleksu T2SS. U *P. aeruginosa* istnieją dwa typy T2SS: system Xcp i Hxc. System Xcp może wydzielać co najmniej 14 białek, które odgrywają główną rolę podczas infekcji, takich jak proteazy, elastazy (prowadzą do degradacji tkanki łącznej w płucach), egzotoksyna A (hamuje syntezę białek poprzez ADP-rybozylację czynnika elongacji komórkowej w komórce gospodarza, prowadząc w konsekwencji do śmierci komórki), oraz fosfolipazy i lipazy (degradują surfaktanty i modyfikują funkcje odpornościowe gospodarza). System Hxc (homologiczny z Xcp),

działa tylko w fosforanach i wydziela tylko jedno białko LapA (fosfatazę alkaliczną), ograniczające warunki wzrostu [5].

Układ sekrecyjny *P. aeruginosa* typu III (ang. *type III secretion system*, T3SS) jest jednym z najbardziej znanych mechanizmów wirulencji. Umożliwia bakteriom wstrzykiwanie cytotoksycznych białek efektorowych do cytozolu komórek gospodarza, takich jak komórki nabłonka oddechowego i pomaga w kolonizacji dróg oddechowych oraz unikaniu mechanizmów odporności gospodarza. Białka efektorowe są w stanie zmieniać funkcje komórki gospodarza – powodują zakłócanie wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i zmienianie cytoszkieletu aktynowego komórek gospodarza [12]. U *P. aeruginosa* istnieją cztery białka efektorowe określane jako egzoenzymy: ExoU, ExoS, ExoT i ExoY [13], oraz niedawno opisane PemA i PemB [36]. Po dostarczeniu do cytoplazmy komórki gospodarza, białka efektorowe zostają aktywowane poprzez interakcje z ich pokrewnymi kofaktorami eukariotycznymi, co prowadzi do cytotoksyczności lub rearanżacji cytoszkieletu komórek gospodarza, które ograniczają fagocytozę i mogą prowadzić do apoptozy [3]. Kliniczne i środowiskowe szczepy *P. aeruginosa* różnią się pod względem posiadanych efektorów, co określa patofizjologię danego szczepu/izolatu. ExoY, ExoS i ExoT były pierwszymi zidentyfikowanymi efektorami *P. aeruginosa* - są to enzymy dwufunkcyjne posiadające aktywność białka aktywującego GTPazę (GAP) i ADP-rybozylotransferazy, które zaburzają adhezję między komórkami poprzez rozerwanie cytoszkieletu aktynowego komórek nabłonka oddechowego gospodarza, prowadząc do cytotoksyczności (ExoS), lub rearanżacji cytoszkieletu komórek gospodarza, które ograniczają fagocytozę (ExoT). Zatrucie komórek przez ExoS charakteryzuje się śmiercią komórki i ostatecznie prowadzi do apoptozy. ExoY jest cyklazą nukleotydową, która zaburza połączenia szczelin międzysródbłonkowych i promuje hiperfosforylację oraz uwalnianie białka Tau i amyloidu- β . ExoU jest odpowiedzialny za największą zjadliwość ze względu na swoją aktywność cytotoksyczną, która indukuje śmierć komórek gospodarza. ExoU powiązane z poważnymi skutkami choroby u ludzi oraz w modelach infekcji zwierzęcych [4]. Produkty wydzielane przez aparat sekrecyjny typu III, a także inne czynniki wirulencji *P. aeruginosa* (fosfolipaza C, białko wiążące ferripyochelinę, lipopolisacharydy), są zaangażowane są w patogenezę infekcji ran oparzeniowych [3].

Układ sekrecyjny typu V (ang. *type V secretion system*, T5SS) jest najprostszym opisanym dotychczas systemem sekrecyjnym. W tym systemie białka efektorowe są transportowane do zewnętrznej powierzchni błony zewnętrznej i pozostają z nią związane

lub są uwalniane do środowiska zewnątrzkomórkowego. T5SS składa się z autotransporterów (T5aSS), oraz dwuczłonowych systemów wydzielniczych (T5bSS). U *P. aeruginosa* EstA (ang. *autotransporter esterase*) jest jedynym scharakteryzowanym białkiem T5aSS, które jest istotne dla produkcji ramnolipidu, co wpływa na ruchliwość komórek i tworzenie biofilmu. W T5bSS odnotowano sześć grup białek efektorowych, w tym LepA/LepB, które wydzielają proteazę wpływającą na odpowiedź gospodarza na infekcję bakteryjną [5].

Co najmniej sześć białek efektorowych (Tse1-6) jest wydzielanych przez układ sekrecyjny typu VI (ang. *type VI secretion system*, T6SS). Białka efektorowe Tse1 i Tse3 są wydzielane do peryplazmy i hydrolizują peptydoglikan, powodując w konsekwencji lizę komórek bakteryjnych. Białko Tse2 zatrzymuje wzrost zarówno komórek prokariotycznych, jak i eukariotycznych, natomiast białka Tse4, Tse5 i Tse6 działają jako efekторы przeciwbakteryjne [5].

4.2. Zakażenia z udziałem *P. aeruginosa*

P. aeruginosa stanowi przyczynę szpitalnych infekcji dróg moczowych (ang. *urinary tract infection*, UTI), zwłaszcza związanych z cewnikiem (ang. *catheter-associated urinary tract infection*, CAUTI), infekcji dróg oddechowych, w tym zapalenia płuc, zwłaszcza u pacjentów mechanicznie wentylowanych, zapalenia wsierdza, opon mózgowych, jak również posocznicy [2], [8]. *P. aeruginosa* powoduje również infekcje u osób z niedoborami odporności, np. pacjentów onkologicznych, czy po przeszczepach, a także wśród osób starszych, szczególnie długo lub wielokrotnie hospitalizowanych, pacjentów oddziałów intensywnej terapii (OIT), gdzie zakażenie może mieć ostry przebieg.

Do najpoważniejszych zakażeń wywoływanych przez *P. aeruginosa* należą również:

- zakażenia skóry i tkanek miękkich, wśród których największe niebezpieczeństwo dla zdrowia i życia pacjenta wiąże się z zakażeniami ran oparzeniowych oraz pooperacyjnych;
- ostre, wrzodziejące zapalenie rogówki u osób noszących miękkie soczewki kontaktowe o wydłużonym czasie noszenia;
- przewlekłe infekcje płuc u pacjentów z mukowiscydozą (ang. *cystic fibrosis*, CF);
- zakażenia krwi (sepsa) [2], [3], [37].

W środowisku pozaszpitalnym *P. aeruginosa* może wywołać zapalenie mieszków włosowych, zapalenie szpiku kostnego oraz wsierdza, zapalenie ucha środkowego lub zewnętrznego, a u chorujących na AIDS – również zapalenie płuc i sepsę [38].

Dużą rolę w zakażeniach odgrywa tworzenie przez *P. aeruginosa* biofilmów. Zakażenia związane z biofilmem można podzielić na infekcje spowodowane przez urządzenia medyczne (infekcje związane z cewnikami do żyły centralnej, cewnikami moczowymi, cewnikami do dializy otrzewnowej, soczewkami kontaktowymi), oraz na bezpośrednie infekcje w tkankach gospodarza (przewlekłe zapalenie płuc u pacjentów z CF, przewlekłe zapalenie ucha środkowego, zapalenie wsierdza, przewlekłe zapalenie kości i szpiku, przewlekłe zapalenie gruczołu krokowego, zakażenie dróg moczowych i zapalenie dziąseł) [8].

Zakażenie *P. aeruginosa* jest częstym powikłaniem u pacjentów z oparzeniami w związku z występowaniem wilgotnego środowiska w ranach oparzeniowych. Znaczenie *P. aeruginosa* w takich zakażeniach wynika ze zdolności patogenu do wykorzystywania osłabienia mechanizmów odpornościowych gospodarza i wydzielania szeregu czynników wirulencji. *P. aeruginosa* jest najczęstszym drobnoustrojem Gram-ujemnym prowadzącym do infekcji u pacjentów z ranami oparzeniowymi, prowadząc do pojawienia się sepsy, a nawet zgonu pacjenta [39]. Ważną rolę w zakażeniach *P. aeruginosa* pod względem zdolności do utrzymywania się w miejscu rany, jak i zdolności do rozprzestrzeniania się w jej obrębie odgrywają pili i wici.

Wrzodzące zapalenie rogówki jest szybko postępującą odpowiedzią zapalną na bakteryjne zakażenie rogówki. *P. aeruginosa* silnie wiąże się z wewnętrzną częścią warstwy łzowej składającej się ze śluzu, który hamuje przyleganie bakterii do nabłonka rogówki. Śluz oczny osób noszących soczewki kontaktowe ma znacznie obniżony poziom kwasu sialowego, N-acetyloglukozaminy, galaktozo-N-cetylgalaktozaminy i mannozy. Jednym z czynników przyczyniających się do zapalenia jest utrata przylegania śluzu ocznego do bakterii, osłabiając kluczowy mechanizm usuwania bakterii.

P. aeruginosa jest patogenem powszechnie izolowanym od pacjentów z ostrymi infekcjami dróg oddechowych, które powstają w wyniku uszkodzenia nabłonka dróg oddechowych w wyniku wentylacji mechanicznej [4]. W badaniu obserwacyjnym dotyczącym punktowej częstości występowania zakażeń u pacjentów na oddziałach intensywnej terapii (OIT) stwierdzono, że *P. aeruginosa* stanowi 16,2% zakażeń pacjentów i jest przyczyną 23% wszystkich zakażeń nabytych na OIT, przy czym najczęstszym miejscem zakażenia jest układ oddechowy [40].

Zakażenia krwi (ang. *bloodstream infections*, BSI), wywołane przez *P. aeruginosa* prowadzą do sepsy i są związane z wysokimi wskaźnikami zachorowalności

i śmiertelności, z szacowanymi wskaźnikami śmiertelności na poziomie 43,2% - 58,8% [41].

Dane z OIT polskich szpitali klasyfikują ten patogen w czołówce najważniejszych czynników zakaźnych. Według danych Najwyższej Izby Kontroli dotyczących wyników kontroli zakażeń w podmiotach leczniczych z 2018 roku, pałeczka ropy błękitnej oporna na karbapenemy lub inne dwie grupy leków lub polimyksyny stanowiła 4,4% łącznej liczby wykrytych patogenów i 2,9% łącznej liczby zakażeń szpitalnych.

4.3. Mukowiscydoza, a infekcje *P. aeruginosa*, czynniki wirulencji patogenu, czynniki gospodarza

Mukowiscydoza

Mukowiscydoza jest rzadką, nieuleczalną, genetycznie dziedziczną chorobą autosomalną recesywną z częstością występowania około 1 na 2500 żywych urodzeń. Zgodnie z danymi Hospital for Sick Children in Toronto (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/Home.html>; dostęp 17/06/2022), od 1989 roku zidentyfikowano ponad 2110 mutacji genetycznych w genie CFTR, kodującym białko błonowego kanału jonowego odpowiedzialnego za sekrecję jonu chlorkowego (ang. *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*, CFTR) [42], [43]. Najczęściej występująca mutacja - delecja w kodonie fenyloalaniny w pozycji 508 (F508del) dotyka około 66–70% populacji rasy kaukaskiej [44] i 53–57% polskich chorych na mukowiscydozę [45]. F508del prowadzi do nieprawidłowej sekrecji jonu Cl⁻ i towarzyszącej w przebiegu mukowiscydozy nadmiernej absorpcji jonu Na⁺. Nieprawidłowe stężenia soli w wydzielinie dróg oddechowych pacjentów z mukowiscydozą negatywnie wpływają na funkcję peptydów przeciwbakteryjnych, takich jak defensyny. Zapalenie dróg oddechowych i rozwój przewlekłej infekcji bakteryjnej prowadzą do gromadzenia się ropnego, lepkiego śluzu, niedrożności, niszczenia i zwłóknienia dróg oddechowych, sprzyjającego wtórnym zakażeniom *P. aeruginosa* [46]. Ten pojedynczy defekt genetyczny ma plejotropowy wpływ na rozwój i funkcjonowanie kilku tkanek i narządów, w tym trzustki, gruczołów potowych, nasieniowodów i jelit. Według Krajowego Rejestru Pacjentów Fundacji CF mediana wieku przeżycia osoby z mukowiscydozą wynosi obecnie 33,4 roku.

Pacjenci z mukowiscydozą są podatni na przewlekłe infekcje płuc wywołane *P. aeruginosa*, co stanowi główną przyczynę zachorowalności i zwiększonej śmiertelności związanej z tą chorobą [4], [47]. Aż 70% pacjentów z mukowiscydozą w wieku dorosłym jest zakażonych *P. aeruginosa* [48]. Podczas przewlekłego zakażenia płuc u osób z mukowiscydozą, *P. aeruginosa* przechodzi ewolucyjną adaptację, co prowadzi do zmian metabolizmu, a także do powstania mutacji w genach m.in. związanych z biofilmem (*mucA*, *algU* i *morA*), oraz zmniejszeniem wytwarzania czynników wirulencji (*ykoM* i *mpl*). Mutacje w systemach regulacyjnych (*rpoN*, *nfxB*, *mexR*, *gacA* i *gacS*), w tym *quorum sensing* (*lasR*), prowadzą do zmian profilu ekspresji genów. Ponadto, mutacje w genach zaangażowanych w naprawę DNA, takich jak *mutS* i *mutL*, wpływają na zwiększenie tempa ewolucji populacji bakterii we wczesnych stadiach kolonizacji, prowadząc do powstania szczepów hipermutatorowych. Specyficzne mutacje punktowe oraz małe insercje i delecje w genach związanych ze opornością na antybiotyki (*mexZ*, *nfxB*, *mexR*, *gyrA*, *gyrB* i *mpl*), powodują zmniejszenie wrażliwości *P. aeruginosa* na antybiotyki podczas infekcji. W przeciwieństwie do większości mutacji jednopunktowych, pozyskiwanie i utrata genów w połączeniu z horyzontalnym transferem genów i transpozonów, prowadzi do dużych ewolucyjnych i adaptacyjnych zmian genomowych i fenotypowych [49].

Zestaw czynników wirulencji kodowanych przez *P. aeruginosa*, zwłaszcza system wydzielniczy typu III, odgrywa główną rolę w patogenezie i osłabianiu neutrofilii oraz mechanizmów fagocytozy, obniżając odpowiedź immunologiczną gospodarza na infekcję [3], [4]. W ostrej fazie zakażenia u pacjentów, *P. aeruginosa* jest w stanie przyczepić się do nabłonka oddechowego za pomocą rzęsek i wici typu IV, a toksyny wydzielane przez bakterię uszkadzają komórki płuc. Następnie, *P. aeruginosa* zaczyna wydzielać macierz zewnątrzkomórkową, tworząc biofilm, który przylega do nabłonka oddechowego oraz odgrywa ważną rolę w przyleganiu bakterii do komórek i unikaniu odpowiedzi immunologicznej gospodarza, zapewniając ochronę przed fagocytozą przez neutrofile i antybiotyki. [17]. Produkcja alginianu jest niezbędna do tworzenia śluzowego fenotypu *P. aeruginosa* obserwowanego u pacjentów z mukowiscydozą. Wytwarzanie alginianu jest zazwyczaj ograniczone przez czynnik anty-sigma, MucA, który wiąże czynnik sigma - AlgT, zapobiegając indukowaniu ekspresji alginianu w regionie promotora *algD*. Mutacje w genie *mucA* powodują niehamowaną aktywność AlgT,

prowadząc do produkcji alginianu w drogach oddechowych u pacjentów z mukowiscydozą. W trakcie przewlekłej infekcji i po utworzeniu przez *P. aeruginosa* biofilmu, zwalczenie zakażenia jest w większości przypadków niemożliwe [7].

Bakteryjne zmiany fenotypowe obserwowane podczas przewlekłej infekcji u pacjentów z mukowiscydozą mogą odzwierciedlać podobne adaptacje morfologiczne, które wyewoluowały w celu przeżycia w warunkach ograniczenia składników odżywczych w środowiskach wodnych [38].

Białko CFTR, oprócz roli w transporcie soli, może bezpośrednio wpływać na infekcje płuc *P. aeruginosa* poprzez swoją rolę jako receptora komórek nabłonkowych dla tego drobnoustroju. Dochodzi do interakcji między pierwszą zewnątrzkomórkową pętlą białka CFTR, a całą zewnętrzną częścią LPS *P. aeruginosa*. Komórki nabłonkowe z ekspresją zmutowanego białka CFTR (zwłaszcza zmutowany allel CFTR przenoszący mutację $\Delta F508$, która stanowi 70% alleli CFTR u pacjentów z CF), internalizują *P. aeruginosa* znacznie mniej wydajnie niż komórki nabłonkowe z ekspresją normalnego białka CFTR [3].

Przewlekłe zakażenie wywołane *P. aeruginosa* u pacjentów z mukowiscydozą utrudnia dokładną diagnozę i leczenie oraz wiąże się ze zwiększoną śmiertelnością [7], [37]. Wczesne leczenie *P. aeruginosa* u pacjentów z mukowiscydozą stało się standardem [48], ponieważ daje 80 % szans na eliminację *P. aeruginosa* z dolnych dróg oddechowych [50]. Agresywne schematy leczenia *P. aeruginosa* wiążą się ze zmniejszeniem częstości występowania *P. aeruginosa* u pacjentów z mukowiscydozą. W przypadku infekcji *P. aeruginosa*, postępowanie zapobiegawcze skupia się na szybkiej diagnostyce i niezwłocznym rozpoczęciu terapii przeciwdrobnoustrojowej [12].

4.4. Charakterystyka pałeczek *Escherichia coli*

Escherichia coli to powszechnie występująca, fakultatywnie beztlenowa bakteria Gram-ujemna o średnicy około 0,4 μm i długości 2-3 μm , będąca komensalem mikroflory jelitowej kręgowców [51]. *E. coli* jest najpowszechniej występującą bakterią tlenową w mikrobiocie jelitowej [52], a także patogenem ssaków i ptaków [53], mogącym powodować ciężkie infekcje i choroby jelitowe lub pozajelitowe. *E. coli* rozwija się w szerokim zakresie temperatur (15–45 °C), co pozwala jej kolonizować wiele środowisk [54].

Genom *E. coli* składa się z kolistego chromosomu i plazmidów (zazwyczaj od dwóch do czterech plazmidów na szczep). Wielkość genomu *E. coli* waha się od 4,2 do 6,0 Mbp, co warunkuje możliwość kodowania odpowiednio 3900-5800 genów u szczepów komensalnych, bądź wariantów patogennych. Wielkość plazmidów różni się w zależności od ich typów - plazmidy koniugacyjne osiągają wielkość do 300 kbp, a plazmidy niezdolne do własnego transferu są wielkości do 30 kbp [55]. Genom gatunku *E. coli* posiada strukturę mozaikową, na którą składa się rdzeń genomu, kodujący podstawowe funkcje komórkowe oraz genom pomocniczy z sekwencjami genów specyficznych dla danego szczepu. Rearanżacje genetyczne w genomach *E. coli* zapewniają wysoką różnorodność dzięki pozyskiwaniu lub utracie niektórych genów w wyniku różnorodnych modyfikacji genetycznych [52]. Na elementach mobilnych, takich jak: wyspy genomowe, bakteriofagi, sekwencje insercyjne (ang. *insertion sequences*, IS), integrony, plazmidy i transpozony, zlokalizowane są geny wirulencji i geny oporności na antybiotyki [56]. Sekwencje insercyjne, transpozony i integrony mogą z kolei ułatwiać rearanżacje genomowe *E. coli*, takie jak duplikacja i supresja genów, a także inkorporację do genomu nowych genów. [57].

Szczepy *E. coli* są klasyfikowane serologicznie na podstawie 173 antygenów O i 56 antygenów H, zgodnie ze schematem wprowadzonym w 1947 r. przez Kauffmanna [58]. Zbiór szczepów bakteryjnych charakteryzujących się tym samym antygenem O stanowi serogrupę, natomiast specyficzna kombinacja antygeny O i antygeny H określa serotyp izolatu. Dodatkowe antygeny analizowane w klasyfikacji Kauffmanna to antygeny otoczkowe K i antygeny fimbrialne F [55].

Clermont i wsp. w 2000 roku wprowadzili podział szczepów *E. coli*, umożliwiający przyporządkowanie szczepów do określonych grup filogenetycznych (A, B1, B2, i D), charakteryzujących się różnym stopniem wirulencji. Stanowi to obecnie podstawę

klasyfikacji filogenetycznej pałeczek *E. coli* w oparciu o amplifikację genów *chuA* i *yjaA* oraz fragmentu DNA *TspS4.C2* [59]. Biorąc pod uwagę zależności między przynależnością do określonej grupy, a zdolnością do wywołania choroby wywnioskowano, że:

- bakterie komensalne, będące składnikiem naturalnej mikroflory, najczęściej należą do grup B1 lub A;
- bakterie wywołujące infekcje pozajelitowe, głównie w obrębie układu moczowego, najczęściej zaliczane są do grupy B2 lub D;
- bakterie wywołujących biegunki mogą należeć do grup filogenetycznych A, B1 i D.

Obecnie stosowany jest rozszerzony system klasyfikacji filogenetycznej obejmujący osiem grup filogenetycznych: B2, G, F i D, oraz A, B1, C i E. Można wyróżnić także dodatkową grupę, nazwaną H, która wydaje się być spokrewniona z filogrupą D [55].

Chorobotwórcze szczepy *E. coli* można podzielić na patotypy (patowary), i odpowiednie subpatotypy. Do głównych patotypów należą pozajelitowe patogenne szczepy *E. coli* (ang. *Extraintestinal Pathogenic E. coli*, **ExPEC**), oraz patogenne jelitowe szczepy *E. coli* (ang. *Intestinal Pathogenic E. coli*, **IPEC**). Definicja subpatotypów ExPEC opiera się na wielu kryteriach, takich jak m.in.: miejsce infekcji, na przykład układ moczowy - uropatogenne szczepy *E. coli* (ang. *Uropathogenic E. coli*, **UPEC**), grupa infekowanych zwierząt, na przykład szczepy *E. coli* pochodzenia ptasiego (ang. *Avian Pathogenic E. coli*, **APEC**), mających związek z narządem u gospodarza, na przykład powodujących zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków (ang. *Neonatal Meningitis E. coli*, **NMEC**), związane z posocznicą (ang. *Sepsis-Associated E. coli*, **SEPEC**), szczepy *E. coli* gruczołu mlecznego (ang. *Mammary Pathogenic E. coli*, **MPEC**). Wśród subpatotypów IPEC można wyróżnić takie, których definicja opiera się na obecności specyficznego genu, na przykład gen *stx* kodujący toksyny Shiga (ang. *Shigatoxigenic E. coli*, **STEC**), posiadaniu specyficznego fenotypu *ex vivo*, na przykład prowadzący do adhezji i inwazji komórek nabłonkowych (ang. *Adherent-invasive E. coli*, **AIEC**) [55]. Wśród subpatotypów IPEC wyróżnić można również atypowe enterogenne szczepy *E. coli* (ang. *Atypical E. coli*, **ATEC**), enterokrwotoczne szczepy *E. coli* (ang. *Enterohemorrhagic E. coli*, **EHEC**), enteropatogenne szczepy *E. coli* (ang. *Enteropathogenic E. coli*, **EPEC**), enterotoksynogenne szczepy *E. coli* (ang. *Enterotoxigenic E. coli*, **ETEC**), enteroinwazyjne szczepy *E. coli* (ang. *Enteroinvasive E. coli*, **EIEC**), enteroagregacyjne szczepy *E. coli* (ang. *Enteroadgregative E. coli*, **EAEC**), dyfuzyjnie-przylegające szczepy *E. coli* (ang. *Diffusely-Adhering E. coli*, **DAEC**)

[60]. W Tabeli Nr 1 przedstawiono charakterystykę najczęściej występujących subpatotypów *E. coli* z uwzględnieniem głównych grup filogenetycznych, typu sekwencyjnego (ang. *sequence type*, ST), i serotypu [55].

Tabela Nr 1. Charakterystyka najczęściej występujących patotypów *E. coli* [55].

Patotyp <i>E. coli</i>	Subpatotyp <i>E. coli</i>	Podstawa różnicowania	Główny gospodarz/nosiciel	Najczęstsza grupa filogenetyczna	Główny typ sekwencyjny (ST)	Główny serotyp
ExPEC	UPEC	wyizolowane z moczu	człowiek, ssaki domowe	B2	STc131	O16:H5, O25:H4
					STc73	O2:H1, O6:H1
					STc95	O1/O2/O18/O45:K1:H7, O2:K1:H4
					STc12	O4:H1/H5
				STc14	O75:H5	
	D	STc69	O17/O73/O77:H18			
	NMEC	wyizolowany z płynu mózgowo-rdzeniowego noworodków	człowiek	B2	STc95	O1/O2/O18/O45:K1:H7, O2:K1:H4
				F	STc59	O1:K1:H7
					STc62	O7:K1:H45
	APEC	wyizolowane od ptaków	drób	B2	STc95	O1/O2/O18/O45:K1:H7, O2:K1:H4
				C	STc88	O8/O78:H4/H9/H19
				G	STc117	O multiple:H4
E				STc11	O157:H7	
				STc29	O26:H11/H– O111:H8/H–	
IPEC	STEC i/lub EHEC	geny <i>stx</i>	człowiek, bydło, owca	B1	ST17	O45/O103:H2
	EPEC	zmiany typu A/E (attaching and effacing) w nabłonku jelita	człowiek, ssaki domowe	A	ST1788 (EPEC5)	zmiennie
					STc10 (EPEC10)	O zmienne:H40
				B1	STc3 (EPEC2)	O103/O111/O114/ O126/O128:H2
					STc328 (EPEC7)	O88:H25
						O128/O153/O?:H7
				B2	STc15 (EPEC1)	O55/O127/O142:H6
					STc28 (EPEC4)	O85:H31, O33/O119:H6
					STc5342 (EPEC8)	O55/O76:H51
					STc2346 (EPEC9)	O33/O142:H34
				E	STc335	O55:H7
	STc32	O145:H28				
	ETEC	termostabilne i termolabilne enterotoksyny	człowiek, świnia, bydło	A, B1, C, E	Liczne	Liczne
	EIEC	zwiększenie liczby kolonocytów	tylko człowiek	A	ST6	O124:H30
				B1	ST270	O164:H7
				E	ST280	O143:H26
	EAEC	adhezja agregacyjna na enterocytach	człowiek, ssaki domowe	A, B1, B2, D	Liczne	Liczne

Tabela Nr 1. cd. Charakterystyka najczęściej występujących patotypów *E. coli* [55].

Patotyp <i>E. coli</i>	Subpatotyp <i>E. coli</i>	Podstawa różnicowania	Główny gospodarz/nosiciel	Najczęstsza grupa filogenetyczna	Główny typ sekwencyjny (ST)	Główny serotyp
IPEC	DAEC	adhezja rozproszona na enterocytach	człowiek	Wszystkie filogrupy	Liczne	Liczne
	AIEC	adhezja i inwazja komórek nabłonka jelit	człowiek	Wszystkie filogrupy z przewagą B2	ST135 ST73, ST95, ST127, ST131	O83:H1 Serotypy ExPEC
Hybrydowy IPEC		cechy wspólne EHEC i EAEC	człowiek	B1	ST678	O104:H4
Hybrydowy IPEC–ExPEC		zespół hemolityczno-mocznicowy (ang. <i>haemolytic-uraemic syndrome</i> , HUS) i posocznica	człowiek, bydło	A	ST301	O80:H2

4.5. Patotyp IPEC, subpatotypy, czynniki wirulencji

Pod względem oddziaływania na organizm człowieka oraz przebiegu infekcji, wyróżnia się sześć głównych subpatotypów IPEC: EPEC, ETEC, EIEC, EAEC, EHEC, DAEC [60].

Enteropatogenne szczepy E. coli (ang. enteropathogenic E. coli, EPEC)

Szczepy EPEC cechują się specyficzną adhezją do nabłonka jelitowego za pomocą białka intyminy oraz wytwarzaniem swoistego dla niego receptora TIR (ang. *translocated intimin receptor*).

Enterotoksynogenne szczepy E. coli (ang. enterotoxigenic E. coli, ETEC)

Szczepy ETEC wytwarzają termostabilną enterotoksynę, w tym dwa podtypy (STh i STp), i/lub termolabilną enterotoksynę (LT), oraz fimbrie, które umożliwiają przyleganie do nabłonka jelitowego.

Enteroinwazyjne szczepy E. coli (ang. enteroinvasive E. coli – EIEC)

EIEC mają zdolność do inwazji komórek nabłonka jelitowego, dzięki cechom blisko spokrewnionym z cechami *Shigella*: obecność plazmidu wirulencji (pINV), wysp

genomowych (ang. *Shigella island*, SHI), i mechanizmu inaktywacji genów. Szczepy EIEC należą do trzech głównych linii filogenetycznych (filogrupy: A, B1 i E).

Enteroagregacyjne szczepy E. coli (ang. enteroaggregative E. coli – EAEC)

Szczepy EAEC wyodrębnione zostały na podstawie zdolności adhezji do komórek linii HEp-2, przy udziale fimbrii AAF (ang. *aggregative adherence fimbriae*), oraz uwalniania ciepłostajłej enterotoksyny 1, typowej dla szczepów EAEC (ang. *enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1*, EAST1).

Enterokrwotoczne szczepy E. coli (ang. enterohemorrhagic E. coli, EHEC)

Do szczepów enterokrwotocznych należą *E. coli* produkujące toksynę Shiga (ang. *Shiga toxin producing E. coli*, STEC), oraz *E. coli* produkujące werocytotoksynę (ang. *Verocytotoxin producing E. coli*, VTEC). Wśród szczepów należących do EHEC, głównie występującym jest serotyp *E. coli* O157:H7 (pozostałe szczepy są określane jako non-O157 *E. coli*). STEC jest definiowany przez obecność genów kodujących toksynę Shiga (*stx*). W oparciu o podobieństwo sekwencji białek opisano dwa typy Stx: Stx1 i Stx2. Toksyny Stx2 można podzielić na podtypy Stx2a–Stx2g. Oprócz genów kodujących toksynę Stx, większość szczepów EHEC zawiera wyspę patogenności LEE (ang. *locus of enterocyte effacement*, LEE). Szczepy EHEC charakteryzują się również obecnością pochodzącego z plazmidu genu enterohemolizyny *ehxA*.

Dyfuzyjno-adherencyjne szczepy E. coli (ang. diffusely adherent E. coli, DAEC)

Szczepy DAEC charakteryzują się rozproszonym wzorem przylegania do komórek nabłonka, w którym pośredniczą spokrewnione adhezyny afimbrialne (adhezyny Afa/Dr), i fimbrialne.

Główne cechy subpatotypów jelitowych *E. coli* przedstawiono w Tabeli Nr 2.

Tabela Nr 2. Główne cechy subpatotypów jelitowych *E. coli* [52].

Subpatotyp IPEC	Główne czynniki wirulencji	Główny objaw kliniczny	Oporność na główne środki przeciwdrobnoustrojowe (ang. <i>antimicrobial resistance</i> , AMR)
STEC	toksyna Shiga	krwotoczne zapalenie okrężnicy, zespół hemolityczno-mocznicowy i zakrzepowa plamica małopłytkowa	streptomycyna, ampicylina, tetracykliny i sulfonamidy
EHEC	EscF, EscC, EspA, EspB, EspD, Intimin, Tir i Toksyna Shiga	krwawa biegunka i hemolityczny zespół mocznicowy	streptomycyna, ampicylina, tetracykliny i sulfonamidy
EPEC	EscF, EscC, EspA, EspB, EspD, Intimin, Tir, plazmid EAF (tEPEC) i Bfp (tEPEC)	biegunka	streptomycyna, ampicylina, tetracyklina, trimetoprim i sulfametoksazol
EAEC	plazmid pAA, zagregowana adhezja fimbrii (AAF), regulator AggR i dyspersyna	ostra i przewlekła biegunka	ampicylina, trimetoprim, sulfametoksazol, kwas nalidyksowy i cyprofloksacyna
EIEC	plazmid pINV i inwazyjny	czterwonka bakteryjna	karbapenem, fosfomycyntrometanol, nitrofurantoina, chloramfenikol, β -laktamy, kwas nalidyksowy, ampicylina i fluorochinolony
ETEC	enterotoksyny termostabilne (ST) i termolabilne (LT)	biegunka, zwana biegunką podróżnika	ampicylina, sulfametoksazol, tetracyklina i azytromycyna
DAEC	adhezyny Afa/Dr	przewlekła biegunka u dzieci	ampicylina, trimetoprim, sulfametoksazol, fosfomycyna, piperacylina, tetracyklina, cyprofloksacyna, kotrimoksazol, nitrofurantoina, oksacylina, bakteryцина, kloksacylina, chloramfenikol i kwas nalidyksowy

4.6. Patotyp ExPEC, subpatotypy, czynniki wirulencji

Szczepy ExPEC są zdolne do wywoływania infekcji pozajelitowych. U szczepów ExPEC, oporność na oksymino-cefalosporyny (np. cefotaksym, ceftazydym, cefovecin i ceftiofur), jest często spowodowana wytwarzaniem enzymów hydrolizujących ESBL [61]. Szczepy ExPEC przynależą głównie do grupy filogenetycznej B2 i w mniejszym stopniu do grupy D [62].

Do czynników wirulencji szczepów ExPEC należą m.in. adhezyny, siderofory, toksyny, systemy pozyskiwania żelaza, lipopolisacharydy i inwazyjny. Czynniki wirulencji

ExPEC są kodowane na wyspach patogenności, plazmidach i innych ruchomych elementach genetycznych [52]. Struktury powierzchniowe odgrywają u ExPEC znaczącą rolę w procesie adhezji. Opisano trzy główne typy adhezyn: fimbrie, adhezyny afimbrialne (Afa), i białka błony zewnętrznej. Adhezyny fimbrialne S (*sfa*), fimbrie F1C, pile typu P, PapC i Iha są najczęściej występującymi adhezynami wśród izolatów *E. coli* od pacjentów z zapaleniem układu moczowego:

- Fimbrie typu 1 - posiadają zdolność aglutynacji czerwonych krwinek oraz przyczepiania się do innych komórek gospodarza, np. błon śluzowych, kolonizują usta, pochwę oraz jelita; adhezyną fimbrii typu 1 *E. coli* jest białko FimH;
- Fimbrie typu S (kodowane przez gen *sfa*) - rozpoznają kwas sialowy występujący na powierzchni ludzkich erytrocytów; fimbrie typu S są morfologicznie bardzo podobne do fimbrii typu 1 i fimbrii typu P; fimbrie typu S są czynnikiem wirulencji najczęściej występującym wśród izolatów wywołujących zapalenie opon mózgowych oraz sepsę;
- Fimbrie typu P - wiążą się do węglowodanów wchodzących w skład glikosfingolipidów, powiązanych z antygenem D erytrocytów; fimbrie typu P są kodowane przez zestaw genów zorganizowanych w klaster genów *pap* znajdujących się na chromosomie *E. coli*;
- Fimbrie typu F1C - nie posiadają zdolności hemaglutynacji; charakteryzują się adhezją do komórek nabłonka jamy ustnej, dróg żółciowych oraz nerek.

Patotyp ExPEC obejmuje kilka subpatotypów, w tym uropatogenne szczepy *E. coli* (UPEC), szczepy *E. coli* powodujące noworodkowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (NMEC), szczepy *E. coli* związane z sepsą (SEPEC), szczepy *E. coli* gruczołu mlecznego (MPEC), i szczepy *E. coli* wywołujące zakażenia u ptaków (APEC).

Uropatogenne szczepy E. coli (ang. uropathogenic E. coli, UPEC)

Geny kodujące czynniki wirulencji szczepów UPEC umiejscowione są na ruchomych elementach genetycznych, przenoszonych drogą horyzontalnego transferu genów (ang. *horizontal gene transfer*, HGT). Do najważniejszych czynników wirulencji szczepów UPEC zalicza się:

- siderofory - umożliwiające pozyskiwanie i transport żelaza do komórki bakteryjnej w celu modulacji odpowiedzi immunologicznej i szlaków metabolicznych

gospodarza (żelazo stanowi niezbędny element wielu procesów komórkowych, m.in. jako zasadniczy kofaktor wielu enzymów zaangażowanych w metabolizm komórkowy); wśród szczepów UPEC znanych jest wiele genów kodujących receptory dla sideroforów, m.in. *iroN* (receptor dla salmocheliny), *iutA* (receptor dla aerobaktyny), *fyuA* (receptor dla jersiniabaktyny), *iha* (receptor dla enterobaktyny). Szczepy UPEC syntetyzujące siderofory wykazują zdolność do kolonizacji miejsc ubogich w żelazo, takich jak drogi moczowe;

- adhezyny i inwazyjne umożliwiają bakteriom przyleganie do komórek gospodarza;
- toksyny modulujące odpowiedź immunologiczną i szlaki metaboliczne; szczepy UPEC produkują następujące toksyny:
 - α -hemolizynę (HlyA), która przeprowadza lizę erytrocytów poprzez utworzenie porów w błonie komórkowej erytrocytów i leukocytów;
 - cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący (ang. *cytotoxic necrotizing factor*, CNF-1), który reorganizuje cytoskielet komórek głównie poprzez nieodwracalne formowanie się cienkich wiązek włókien aktynowych, co uniemożliwia podziały komórkowe;
 - toksynę autotransportującą (VAT, Vat-like/Vat-ExEc), której główną funkcją jest wakuolizacja komórek eukariotycznych, co prowadzi do niszczenia komórek pęcherza moczowego i nerek;
 - genotoksyna, tj. białko Usp wywołujące fragmentację DNA i apoptozę komórek; bakteriocyna Usp bierze udział w tworzeniu porów w błonie cytoplazmatycznej oraz zakłócaniu syntezy ściany komórkowej; powstałe pory powodują wypływ aminokwasów, jonów i ATP, co prowadzi do zaburzenia syntezy DNA, RNA, białek i polisacharydów oraz zahamowania transportu składników odżywczych.
- białko Ag43 umożliwiające szczepom UPEC adhezję do komórek układu moczowego, agregację i formowanie biofilmu, który stanowi barierę dla stosowanych antybiotyków.

Szczepy E. coli powodujące noworodkowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (ang. neonatal meningitis E. coli, NMEC)

Do istotnych czynników wirulencji szczepów NMEC zalicza się:

- antygen otoczkowy K1, który odpowiada za ochronę przed fagocytozą, jest odpowiedzialny za rozprzestrzenianie się bakterii i nadaje właściwości umożliwiające wywołanie zakażenia, chroniąc bakterie przed reakcją obronną organizmu,
- geny *ibeA* (białko inwazyjne będące głównym wyznacznikiem decydującym o inwazji szczepów *E. coli* do komórek śródbłonna naczyń włosowatych mózgu oraz zasadniczy czynnik wywołujący zapalenie opon mózgowych), *ibeB*, *ibeC* (kodujące białka biorące udział w inwazji do komórek i do tkanek);
- białko Iss chroniące przed fagocytozą [61].

Szczepy E. coli powodujące sepsę (posocznicę) (ang. sepsis-associated E. coli, SEPEC)

Sepsa bakteryjna to stan, w którym bakterie dostają się do krwioobiegu. W przypadkach sepsy najczęściej izolowanym drobnoustrojem z krwi pacjenta jest szczep SEPEC, który wydziela toksyny, takie jak HlyA (α -hemolizyna), Sat (toksyna autotransporter), i CNF-1. Toksyny te mogą zmieniać kształt i/lub funkcję komórek gospodarza, przyczyniając się w ten sposób do zmiany procesów biologicznych. Fimbrie typu 1 są również istotnym czynnikiem wirulencji wykorzystywanym przez szczepy SEPEC do przylegania i inwazji komórek [63], [64].

Szczepy E. coli powodujące zakażenia u ptaków (ang. avian pathogenic E. coli, APEC)

Czynniki wirulencji typowe dla APEC obejmują hemolizyny (HlyE), kolicyny (CvaC), białko Iss, fimbrie typu I (FimC), hemaglutyninę (Tsh), i siderofory (IucC, SitA). Szczepy APEC są również potencjalnym patogenem odzwierzęcym przenoszonym przez żywność, a także źródłem zakażeń pozajelitowych u ludzi. Szczepy APEC wykazują podobieństwo genetyczne z ludzkimi szczepami ExPEC: UPEC i NMEC, poprzez posiadanie zbliżonych czynników wirulencji [65].

Chorobotwórcze szczepy E. coli powodujące infekcje gruczołu mlekowego (ang. mammary pathogenic E. coli, MPEC)

Głównym czynnikiem wirulencji szczepów MPEC jest lipopolisacharyd, który jest odpowiedzialny za wywołanie wstrząsu endotoksycznego i wywołanie silnej odpowiedzi immunologicznej poprzez wiązanie z receptorem Toll-podobnym 4 (TLR4), oraz stymulację ekspresji chemokin (takich jak IL-8 i RANTES), i cytokin prozapalnych (takich jak IL-6 i IL-1 β) [66], [67].

Główne cechy najważniejszych subpatotypów ExPEC przedstawiono w Tabeli Nr 3.

Tabela Nr 3. Cechy głównych subpatotypów pozajelitowych *E. coli* (ExPEC) [52].

Subpatotyp ExPEC	Główne cechy wirulencji	Objaw kliniczny	Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe (ang. antimicrobial resistance, AMR)
UPEC	fimbrie P, niektóre inne adhezyny odporne na mannozę i fimbrie typu 1, otoczka K, hemolizyna, aerobaktyna	infekcje dróg moczowych i krwi	fluorochinolon, aminoglikozydy, trimetoprim-sulfametoksazol i karbapenemy
SEPEC	fimbrie typu 1, P i S, otoczka K K1/K5, hemolizyna, aerobaktyna, yersiniabaktyna, salmochelina, CNF1, wydzielana toksyna autotransportera, oporność na surowicę i kolicyna V	bakteriemia i posocznica	karbapenemy
NMEC	<i>ompTp, hlyF, cvaC, etsA, cvaA, etsB, cvaB, iss, iutA i tsh</i>	zapalenie opon mózgowych i bakteriemia u noworodków	sulfizoksazol streptomycyny, ampicylina, tetracyklina, chloramfenikol, kanamycyna i trimetoprim-sulfametoksazol

4.7. Zakażenia z udziałem *E. coli*

Szczepy *E. coli* mogą powodować zarówno choroby pozajelitowe (infekcje dróg moczowych, infekcje w obrębie jamy brzusznej, płuc, skóry i tkanek miękkich, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków, zapalenie pęcherza moczowego, ostre odmiedniczkowe zapalenie nerek i sepsę), jak i zakażenia jelitowe (różne postaci biegunki, zespół hemolityczno-mocznicowy). Uważa się, że głównym źródłem zakażeń układu moczowego jest *E. coli* stanowiąca mikrobiotę jelitową. Częstość występowania zakażeń *E. coli* wzrasta wśród ludzi, ponadto rośnie oporność *E. coli* na antybiotyki.

E. coli zajmuje obecnie trzecie miejsce na liście opornych na antybiotyki „priorytetowych patogenów”, opisanej przez WHO [51], [55], [60], [68].

Patogenne szczepy *E. coli* są często przenoszone między ludźmi, a zwierzętami hodowlanymi i stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego, i przemysłu hodowlanego. Zakażenia *E. coli* następują głównie poprzez spożywanie skażonej wody i żywności, takiej jak niedogotowane produkty mięsne i surowe mleko oraz konsumpcję produktów rolnych, zanieczyszczonych odchodami zwierząt podczas uprawy [69].

Zakażenia powodowane przez szczepy ExPEC

Szczepy UPEC są odpowiedzialne za zakażenia układu moczowego (ZUM), zarówno u dzieci, jak i osób dorosłych. Zakażenie układu moczowego, prowadzące do wielu powikłań, jest jednym z najczęściej występujących w Polsce infekcji, występującej zwłaszcza u kobiet [70] [71]. Infekcje układu moczowego prowadzą do wielu powikłań, w tym do odmiedniczkowego zapalenia nerek, uszkodzenia nerek u małych dzieci i przedwczesnych porodów. Zakażenia układu moczowego związane z cewnikowaniem (CAUTI), mogą występować jako zakażenia objawowe i bezobjawowe, w równym stopniu u kobiet i mężczyzn.

Szczepy NMEC mają zdolność przetrwania w krwiobiegu i infekcji opon mózgowo-rdzeniowych niemowląt, która przyczynia się do wysokiej śmiertelności (10%), i zachorowalności (30%) noworodków.

Szczepy APEC wywołujące wielonarządowe infekcje u ptactwa (kolibakteriozy), są przyczyną milionowych strat w przemyśle drobiarskim w skali światowej, dziesiątkując stada hodowlane.

Patotyp MPEC jest również izolowany od zwierząt, gdyż powoduje śmiertelne zapalenie płuc u świń, zapalenie gruczołów mlecznych u krów i świń, ropometrie i infekcje dróg moczowych u psów [51] [68].

Zakażenia powodowane przez szczepy IPEC

Szczepy *E. coli* będące patogenami jelitowymi mogą wywoływać infekcje jelitowe o ciężkim przebiegu, w tym choroby biegunkowe, będące jedną z głównych przyczyn śmiertelności wśród dzieci poniżej piątego roku życia [72].

Enterotoksynogenne szczepy *E. coli* (ETEC) są głównym patogenem jelitowym. Zakażenia szczepami ETEC mają kliniczną postać biegunek, najczęściej ustępujących bez

leczenia. Szczepy te występują zwłaszcza u dzieci poniżej 5 roku życia, u których powodują około 10 – 20% przypadków biegunek. Zakażenie ETEC jest spowodowane spożyciem skażonej żywności i wody w krajach rozwijających się, gdzie brakuje infrastruktury do dostarczania czystej wody pitnej i usuwania odchodów. Szczepy ETEC mogą przetrwać w kale przez ponad pół roku, a w wodzie potrafią występować w postaci biofilmu, co zapewnia większą zdolność przetrwania [73].

Enteroinwazyjne szczepy *E. coli* (EIEC) wywołują zakażenia klinicznie przypominające czerwonkę bakteryjną, aktywnie wnikając do komórek nabłonka okrężnicy, co prowadzi do powstania owrzodzenia błony śluzowej, uwalniania cytotosyn i biegunki.

Szczepy EAEC odpowiedzialne są za przewlekłe biegunki trwające od 2 tygodni do kilku miesięcy, występujące najczęściej u niemowląt i dzieci.

Szczepy EHEC związane są z krwawymi biegunkami i krwotocznym zapaleniem jelita grubego, którego częstym powikłaniem jest hemolityczny zespół mocznicowy i/lub zakrzepowa plamica małopłytkowa. Najczęstszym źródłem zakażenia człowieka jest bydło, spożywanie zanieczyszczonej wody i żywności, niepasteryzowanego mleka lub produktów mlecznych, bezpośredni kontakt ze zwierzętami lub kałem chorych ludzi.

Szczepy STEC są zdolne powodować krwotoczne zapalenie okrężnicy, zespół hemolityczno-mocznicowy oraz zakrzepową plamicę małopłytkową. Zakażenie *E. coli* wytwarzającymi toksynę Shiga jest szczególnie niebezpieczne u dzieci [74].

Szczepy DEAC oraz EPEC powodują najczęściej przewlekłe biegunki u dzieci i niemowląt.

4.8. Identyfikacja molekularna patogenów bakteryjnych, różnicowanie, dochodzenia epidemiologiczne

Epidemiologia jest nauką badającą wpływ czynników środowiskowych na występowanie chorób w populacji lub wpływających na stan zdrowia ludności, której celem jest poszukiwanie czynników etiologicznych ryzyka, a także opracowanie zasad profilaktyki i wprowadzenie ich w życie. W obrębie szczepów *P. aeruginosa* i *E. coli* mogą występować różnice genetyczne wynikające z postępującej zmienności na skutek procesów rekombinacji i mutacji, gdzie zmiany w DNA są dziedziczone w sposób trwały i przekazywane komórkom potomnym. Znalezienie klonalnie spokrewnionych izolatów jest dowodem na to, że szczepy te są elementami łańcucha transmisji zakażenia.

Kluczowym elementem w badaniach epidemiologicznych jest odpowiedni dobór metod diagnostycznych w celu określenia stopnia podobieństwa genetycznego pomiędzy szczepami.

Identyfikacja klonalnych szczepów i różnicowanie molekularne mikroorganizmów mają ogromne znaczenie w mikrobiologii medycznej oraz dochodzeniach epidemiologicznych, gdzie mogą służyć do wykrywania i kontroli zakażeń. Wyniki badań mogą stanowić podstawę do wprowadzenia środków zapobiegawczych i działań sanitarnych, mających ograniczyć lub zahamować rozprzestrzenianie się mikroorganizmów patogennych, by w chwili, gdy pojawi się ognisko danej choroby, można było je łatwo zidentyfikować i porównać z istniejącymi wcześniej szczepami. Identyfikacja molekularna szczepów staje się coraz ważniejszym badaniem we współczesnej mikrobiologii.

W diagnostyce mikrobiologicznej oraz w badaniach epidemiologicznych stosuje się obecnie klasyczne metody diagnostyczne oparte na analizie cech fenotypowych oraz metody oparte na analizie materiału genetycznego, wykorzystujące nowoczesne techniki biologii molekularnej. Metody typowania bakterii uznawane są za użyteczne w dochodzeniu epidemiologicznym, jeżeli posiadają wystarczająco dużą siłę różnicowania, są proste w użyciu, pozwalają na typowanie wszystkich izolatów, a uzyskane wyniki są powtarzalne międzylaboratoryjnie.

4.8.1. Metody typowania fenotypowego

Wykorzystywane w diagnostyce epidemiologicznej metody typowania fenotypowego klasyfikują bakterie na podstawie cech fenotypowych mikroorganizmów. Do metod typowania fenotypowego zaliczyć można m.in. biotypowanie, typowanie bakteriofagowe, ocenę profili lekooporności oraz serotypowanie.

Zdolność mikroorganizmów do zmian ekspresji genów w zależności od środowiska może powodować, że dwa genetycznie identyczne szczepy mogą fenotypowo być rozpoznawane jako różne. Możliwość powstania pojedynczych mutacji punktowych, insercji lub delecji, wśród izolatów jednego szczepu może również wpływać na zmianę fenotypu; przykładem są występujące insercje w genie *oprD*, powodujące brak wrażliwości bakterii *P. aeruginosa* na karbapenemy [75].

W przebiegu przewlekłego zakażenia, próbki pobierane od pacjentów są poddawane analizie mikrobiologicznej w celach diagnostycznych, identyfikacji patogenów i analizie

wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe. Techniki typowania fenotypowego mają ograniczoną zdolność różnicowania szczepów do efektywnego przeprowadzenia dochodzenia epidemiologicznego izolatów, które są fenotypowo niepowiązane, ale genetycznie homologiczne. Testy fenotypowe są bardzo przydatne do śledzenia adaptacji wewnątrzklonalnej i mikroewolucji bakterii podczas przewlekłej infekcji [38], [50].

Biotypowanie

Biotypowanie bakterii jest metodą polegającą na określeniu biotypu, bądź wariantu ekologicznego (powiązanego z danym gatunkiem zwierzęcia). Biotypowanie polega na klasyfikacji szczepów bakteryjnych na podstawie cech biochemicznych, takich jak: wytwarzanie siarkowodoru (H₂S), produkcji DNaz oraz ureazy, a także oceny typu wzrostu kolonii bakteryjnej. Biotypowanie jest metodą łatwą w przeprowadzeniu, niewymagającą specjalistycznego sprzętu i wykorzystywaną w wielu laboratoriach pomimo niskiego potencjału różnicującego [76].

Typowanie fagowe

Bakteriofagi są wirusami, które powodują lizę bakterii. Typowanie fagowe jest stosowane od wczesnych lat 60 i polega na rozróżnianiu szczepów bakterii ze względu na podatność na lizę przy użyciu określonego panelu zidentyfikowanych fagów [42]. Siła różnicowania tej metody zależy od doboru zestawu fagów oraz badanych bakterii. Zaletą tej metody jest brak konieczności wykorzystywania drogiego, specjalistycznego sprzętu. Wadą tej metody jest natomiast ryzyko rekombinacji i zmiany specyficzności DNA fagów referencyjnych z DNA fagów, które występowały naturalnie w badanych izolatach bakteryjnych.

Analiza profili lekooporności

Badanie profilu oporności na antybiotyki opiera się na założeniu, że identyczne bakterie odpowiedzialne za powstawanie epidemii charakteryzują się identyczną lub podobną wrażliwością na antybiotyki. Badanie profilu oporności na antybiotyki zależy również od stabilności oporności mikroorganizmów na leki. Przeprowadzenie takiego badania jest proste i mało czasochłonne oraz względnie tanie, ze względu na rutynowość wykonywania antybiogramów. Zaletą tej metody jest powszechna standaryzacja wykonywania testów wrażliwości na antybiotyki. Wykonanie antybiogramu nie zawsze

daje stuprocentową pewność, jaki rodzaj antybiotyku należy zastosować w zwalczaniu szczepu bakterii odpowiedzialnego za daną infekcję, zwłaszcza, gdy miejscowo zostanie zahamowany rozwój bakterii.

Serotypowanie

Serotypowanie LPS jest prostą metodą, która stanowi od kilkudziesięciu lat podstawę badań epidemiologicznych, zapewniającą najbardziej powtarzalne wyniki i posiadającą największą siłę różnicowania spośród innych metod fenotypowych. Metoda ta opiera się na identyfikacji różnic składu O-polisacharydu w bakteryjnym LPS poprzez oddziaływanie z różnymi przeciwciałami poliklonalnymi [42]. Serotypowanie jest metodą skringową, łatwą do zastosowania w laboratoriach diagnostycznych. Wadą metody jest wysoki koszt ze względu na wymagania dotyczące szerokiego spektrum surowic niezbędnych do wykonania oznaczeń [77].

4.8.2. Metody typowania molekularnego

a) Metody analizy białek

Metody typowania w oparciu o analizę białek bakteryjnych są przeprowadzane z wykorzystaniem elektroforezy oraz metod identyfikujących białka za pomocą spektroskopii masowej.

Metodą typowania w oparciu o rozdział elektroforetyczny jest technika MLEE (ang. *Multi-Locus Enzyme Electrophoresis*), w której szczepy różnicuje się w oparciu o ruchliwość elektroforetyczną izoenzymów komórkowych rozpuszczalnych w buforach wodnych. Ruchliwość ta zależna jest od składu aminokwasowego oraz ułożenia przestrzennego izoenzymów. Rozdział elektroforetyczny może być przeprowadzany m.in. w żelach poliakrylamidowych, na których dokonuje się reakcji izoenzymów komórkowych ze specyficznym związkiem substratowym w celu uwidocznienia badanych enzymów na żelu. Uzyskany wzór izoenzymów komórkowych jest charakterystyczny dla badanego szczepu. Siła dyskryminacji techniki MLEE jest wysoka, jednakże niższa niż innych metod molekularnych, takich jak MLST i PFGE.

Do typowania szczepów bakteryjnych metodą spektrometrii mas (ang. *mass spectrometry*, MS), wykorzystuje się technikę MALDI-TOF MS (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time-of-Flight Mass Spectrometry*), która analizuje sekwencje białka różniące się pojedynczym aminokwasem. W metodzie MALDI-TOF MS

do typowania wykorzystuje się białka metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping proteins*). MALDI-TOF MS stanowi szybką metodę pozwalającą na identyfikację bakterii o dużej sile różnicowania, która może być z powodzeniem wykorzystywana do rutynowej diagnostyki klinicznej w laboratoriach mikrobiologicznych [78], [79].

b) Metody molekularne

Metody molekularne pomogły w zrozumieniu epidemiologii zakażeń w oparciu o typowanie szczepów bakteryjnych, bazując na różnicach w ich genomach, które mogą być spowodowane mutacjami powstałymi podczas replikacji bądź rekombinacjami genetycznymi. Metody typowania molekularnego mają większą siłę różnicowania w porównaniu do fenotypowych, ponieważ zmienność fenotypowa wśród izolatów bakterii może być zależna od zmian środowiska i zmieniać profil ekspresji genów.

Metody genotypowe ze względu na dużą siłę różnicowania szczepów są dziś rutynowo używane w diagnostyce i epidemiologii, jednak ich wykorzystanie wiąże się z wyższymi kosztami badania niż w przypadku technik fenotypowych. Metody typowania molekularnego powinny charakteryzować się odpowiednio dużą siłą dyskryminacji oraz nie powinny opierać się jedynie na obecności, bądź braku markera genetycznego, lecz także dawać możliwość oceny podobieństwa izolatów w badanej grupie. Metody typowania molekularnego powinna charakteryzować wysoka powtarzalność, czyli możliwość uzyskania tych samych wyników dla tych samych organizmów, przy każdym badaniu oraz przy użyciu tej samej procedury, odczynników i aparatury. Techniki typowania molekularnego okazały się bardzo przydatne w typowaniu *P. aeruginosa* i *E. coli* do celów epidemiologicznych.

Techniki typowania molekularnego obejmują: analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*) [80], elektroforezę żelową w polu pulsacyjnym (ang. *Pulsed-field Gel Electrophoresis, PFGE*) [81]–[85], analizę losowo amplifikowanego polimorficznego DNA (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP*) [85], [86], PCR z wykorzystaniem sekwencji powtórzonych (ang. *Repetitive Element Palindromic PCR, rep-PCR*) [87], losową amplifikację polimorficznego DNA (ang. *Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD*) [83], [85], amplifikację sekwencji regionów międzygenowych (ang. *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR, ERIC-PCR*) [82], PCR w oparciu o trójnukleotydowe sekwencje powtórzone (ang. *Trinucleotide Repeat Sequences-based*

PCR, TRS-PCR) [88], analizę zmiennej liczby powtórzeń tandemowych w wielu *loci* (ang. *Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat (VNTR) Analysis, MLVA*), oraz typowanie na podstawie sekwencjonowania genów metabolizmu podstawowego (ang. *Multi-Locus Sequence Typing, MLST*) [89]. Dostępnych jest również wiele metod typowania molekularnego bakterii opartych na analizie całego genomu lub jego części, jednakże metody te są ogólnie dostępne tylko w wyspecjalizowanych laboratoriach.

Metoda Rep-PCR

Rep-PCR jest metodą różnicowania opartą na różnicach w wielkości oraz liczbie kopii repetytywnych fragmentów DNA. Metoda rep-PCR polega na amplifikacji fragmentów DNA położonych pomiędzy konserwatywnymi, powtarzalnymi, 35-40 nukleotydowymi sekwencjami. Powstałe podczas amplifikacji fragmenty DNA są rozdzielane metodą elektroforezy, a uzyskany układ prążków DNA na żelu jest charakterystyczny dla różnych szczepów bakterii. Metoda rep-PCR jest analogiczna do metody RAPD, z tym wyjątkiem, że krótkie startery stosowane do amplifikacji są skierowane na znane sekwencje DNA, które występują w wielu pozycjach w genomie bakteryjnym (znane jako repetytywne pozapalindromiczne DNA), natomiast w metodzie RAPD wykorzystywane są krótkie, niespecyficzne startery PCR [90]. Metoda rep-PCR jest łatwa w standaryzacji i możliwa do zastosowania nawet w mniej wyspecjalizowanych laboratoriach diagnostycznych.

Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD

Metoda RAPD jest metodą, która wykorzystuje amplifikację PCR losowego odcinka genomu bakteryjnego w celu generowania profili genetycznych. Metoda RAPD wykorzystuje krótkie startery o losowej sekwencji nukleotydów i długości od 8 do 12 par zasad. Startery te łączą się podczas reakcji PCR z komplementarnymi fragmentami DNA. Powstałe podczas amplifikacji fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie metodą elektroforezy, a uzyskany układ prążków DNA na żelu jest charakterystyczny dla różnych szczepów bakterii. Metoda ta jest prostsza i mniej pracochłonna niż PFGE, jednak mniej różnicująca [42]. Zaletą tej metody jest brak konieczności znajomości sekwencji analizowanego DNA, niski koszt i łatwość wykonania badania. Wadą metody RAPD jest niska powtarzalność wyników, która jest zależna od jakości matrycy DNA, a także użytych odczynników oraz warunków reakcji PCR.

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR

ERIC-PCR jest metodą różnicowania opartą na różnicach w wielkości oraz liczbie kopii repetytywnych fragmentów DNA, należąca do grupy metod bazujących na powielaniu powtórzonych fragmentów DNA. Metoda ERIC-PCR polega na zastosowaniu w reakcji PCR starterów, które są komplementarne do 127-nukleotydowych sekwencji konserwatywnych w genomie bakteryjnym, występujących w różnych liczbach kopii i różnie w nim rozmieszczonych, w zależności od gatunku lub szczepu. W metodzie ERIC-PCR amplifikacji podlegają fragmenty DNA położone pomiędzy powtórzonymi sekwencjami rozproszonymi. Powstałe podczas amplifikacji fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie, a uzyskany układ prążków DNA na żelu jest charakterystyczny dla różnych szczepów bakterii [91]. ERIC-PCR wykazuje mniejszą siłę różnicowania w porównaniu z RAPD [92].

Trinucleotide Repeat Sequences-based PCR, TRS-PCR

Metoda TRS-PCR opiera się na obecności w genomach bakterii rozproszonych, powtarzających się, mikrosatelitarnych, trójnukleotydowych sekwencji różniących się liczbą kopii i rozmieszczeniem w genomach. W metodzie TRS-PCR wykorzystuje się pojedyncze startery określonego typu, np. $N_6(CTG)_4$, które są komplementarne do odpowiednich regionów w badanym genomie. Startery te umożliwiają amplifikację fragmentów DNA położonych pomiędzy trójnukleotydowymi sekwencjami od końca 5' na obu niciach DNA. Powstałe podczas amplifikacji fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie, a uzyskany układ prążków DNA na żelu jest charakterystyczny dla różnych szczepów bakterii. Metoda TRS-PCR (wraz z RAPD, rep-PCR i ERIC), należy do metod określanych jako PCR fingerprinting, których zasada różnicowania polega na powielaniu polimorficznych regionów DNA metodą PCR. Biorąc pod uwagę wysoką powtarzalność i specyficzność profili, TRS-PCR może stanowić narzędzie przesiewowe do szybkiego i wydajnego genotypowania szczepów klinicznych [88], [93]–[95]. Profile TRS-PCR mogą potencjalnie służyć jako cenne markery do badań filogenetycznych i epidemiologicznych [93], [95], [96]. W porównaniu z innymi metodami, TRS-PCR ma wyższą powtarzalność i siłę różnicowania niż ERIC-PCR [95], bądź MLVA [88], [97].

Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP

Metoda RFLP opiera się na analizie różnic w długości fragmentów DNA otrzymanych po trawieniu z wykorzystaniem endonukleaz restrykcyjnych [98]. W metodzie tej, genomowy DNA jest ekstrahowany z bakterii, a następnie trawiony wybranym enzymem restrykcyjnym. Otrzymane w wyniku trawienia fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie. Następnie przeprowadza się reakcję hybrydyzacji znakowanej radioaktywnie sondy z rozdzielonymi elektroforetycznie fragmentami DNA stanowiącymi hiperzmienną część genomu bakteryjnego.

Modyfikacją metody RFLP jest metoda PCR-RFLP, w której trawienie odpowiednim enzymem jest poprzedzone amplifikacją PCR znanego fragmentu DNA. Uzyskane po analizie elektroforetycznej charakterystyczne wzory fragmentów restrykcyjnych umożliwiają identyfikację szczepów bakteryjnych. Zaletą techniki RFLP i PCR-RFLP jest niski koszt badania, prostota w wykonaniu oraz szybkość uzyskania wyników, natomiast zdolność do typowania ze względu na analizę jedynie części genomu jest niezbyt wysoka.

Pulsed-field Gel Electrophoresis, PFGE

Izolaty bakteryjne są powszechnie identyfikowane przy użyciu elektroforezy żelowej w zmiennym polu pulsacyjnym (PFGE), w której DNA bakteryjny jest rozdzielany elektroforetycznie po trawieniu wybraną endonukleazą restrykcyjną. Tożsamość dwóch izolatów w analizie PFGE sugeruje, że reprezentują one ten sam szczep lub klon [98].

Metoda PFGE bazująca na występowaniu polimorfizmów genetycznych w całym genomie bakteryjnym, jest obecnie uważana za „złoty standard” w badaniu *P. aeruginosa*, szczególnie wśród pacjentów z mukowiscydozą [38], [50]. W metodzie tej, genomowy DNA jest ekstrahowany, a następnie poddawany trawieniu enzymami restrykcyjnymi, w wyniku którego powstaje około 40-50 fragmentów DNA (w zależności od gatunku bakterii), które poddawane są rozdziałowi elektroforetycznemu. Analiza układu otrzymanych fragmentów DNA na żelu agarozowym pozwala na analizę filogenetyczną i różnicowanie szczepów [99]. Aby umożliwić migrację dużych fragmentów przez żel, fragmenty DNA są rozdzielane za pomocą wyspecjalizowanego aparatu do elektroforezy, a następnie barwione. Wynikiem różnicowania jest charakterystyczny dla danego szczepu układ prążków DNA na żelu. Do analizy pokrewieństwa szczepów wykorzystuje się odpowiednie oprogramowanie [100]. Metoda ta zapewnia wysoki stopień rozróżnienia

między szczepami i stanowi bardzo skuteczne narzędzie epidemiologiczne. Wadą tej metody jest pracochłonna i czasochłonna analiza, która wiąże się z koniecznością użycia zaawansowanego sprzętu do elektroforezy, dostępnego tylko w wyspecjalizowanych laboratoriach [101].

Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP

W analizie AFLP do trawienia genomowego DNA bakterii stosuje się enzymy restrykcyjne. Do fragmentów DNA, otrzymanych w wyniku trawienia enzymatycznego, dołącza się - za pomocą enzymu ligazy - krótkie, dwuniciowe fragmenty DNA (tzw. adaptory). Po ligacji, fragmenty DNA otrzymane po trawieniu, amplifikuje się z wykorzystaniem metody PCR oraz starterów specyficznych do dołączonych adapterów (przy czym jeden ze starterów jest znakowany fluorescencyjnie w celu odczytania wyników po elektroforezie). Analiza przeprowadzana jest za pomocą automatycznych sekwenatorów kapilarnych. Zaletami metody AFLP jest wysoka powtarzalność wyników oraz prostota wykonania, a także możliwość wykorzystania niewielkich ilości matrycy DNA. Wadą tej analizy jest dość wysoki koszt badania oraz duża pracochłonność. Ze względu na złożoność uzyskiwanych tą metodą wyników, analiza wzoru prążków wymaga również odpowiednich programów komputerowych. Analiza AFLP z powodzeniem identyfikuje szczepy epidemiczne z siłą różnicowania porównywalną do PFGE [101].

Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat (VNTR) Analysis (MLVA)

Metoda MLVA jest techniką molekularną typowania mikroorganizmów w oparciu o obecność w genomach bakteryjnych regionów DNA o zmiennej liczbie powtórzeń tandemowych (ang. *Variable Number Tandem Repeats*, VNTR). Sekwencje VNTR stanowią powtarzające się sekwencje nukleotydowe, których liczba w danych regionie VNTR jest indywidualną cechą mikroorganizmu. Analiza MLVA wykorzystuje PCR do amplifikacji fragmentów VNTR, zawierających powtórzenia tandemowe obecne w chromosomie bakteryjnym. Pomiar długości amplifikowanego produktu określa się za pomocą elektroforezy żelowej lub elektroforezy kapilarnej o wysokiej rozdzielczości i stanowi podstawę do wyznaczenia liczby powtórzeń tandemowych dla badanych alleli. Polimorfizmy w sekwencjach genów skutkują zmienną liczbą powtórzeń tandemowych, co stanowi podstawę porównań między szczepami. Zestawy alleli, z kilku powtarzających się regionów, wykorzystuje się do identyfikacji nowych grup klonalnych, lub już istniejących,

umieszczonych w publicznych bazach danych [42], [102]. W porównaniu do metody PFGE, metoda MLVA jest prostsza i mniej czasochłonna.

Multi-Locus Sequence Typing, MLST

Metoda MLST polega na sekwencjonowaniu sześciu bądź siedmiu genów niezbędnych do utrzymania metabolizmu komórkowego (tzw. geny „housekeeping”, które uważane są za reprezentatywne dla całego genomu), a następnie identyfikacji szczepów mikroorganizmów na podstawie różnic w sekwencjach tych genów. Zazwyczaj sekwencjonowaniu podlegają określone dla danego mikroorganizmu regiony o długości 450 – 500 pz. W celu przeprowadzenia analiz wykorzystywane są globalne bazy danych sekwencji i typów sekwencyjnych (ang. *sequence type*, ST) [103]. Uzyskane wyniki są powtarzalne i łatwo porównywalne pomiędzy laboratoriami, charakteryzujące się dużą siłą różnicowania.

Istnieje kilka metod będących modyfikacjami klasycznej metody MLST, w tym eMLST (ang. *extended MLST*), która stanowi rozszerzenie standardowej metody o badanie dodatkowych miejsc w genomie lub wydłużenie długości badanych sekwencji [104], rMLST (ang. *ribosomal MLST*), bazująca na różnicach w 53 genach kodujących podjednostki białek rybosomalnych [105], oraz cgMLST (ang. *core genome MLST*) i wgMLST (ang. *whole genome MLST*), dotyczące badania całego genomu [106]. Metody te charakteryzują się większą siłą dyskryminacji niż konwencjonalne MLST.

Sekwencjonowanie całych genomów (ang. Whole Genome Sequencing, WGS)

Najnowszą i najdokładniejszą dostępną technologią do badania pokrewieństwa klonalnego jest metoda bezpośredniego sekwencjonowania całego genomu (WGS), w oparciu o sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*, NGS). Metoda WGS wykorzystywana jest m.in. w badaniu ewolucji genetycznej szczepów bakteryjnych.

Sekwencjonowanie genomów bakterii pozwala na uzyskanie głębszego wglądu w ich funkcje, zarówno pod względem kolonizacji nisz środowiskowych, jak również ich cech metabolicznych i fizjologicznych. W porównaniu do innych technik typowania molekularnego, ilość informacji dostarczonych jako wynik sekwencjonowania całego genomu jest dużo większa - z pojedynczego badania można uzyskać informacje pozwalające na różnicowanie bakterii na podstawie całej sekwencji genomowego DNA,

jak i danych umożliwiającą przeprowadzenie analiz MLST, rMLST, a także wgSNP (ang. *whole genome Single-Nucleotide Polymorphism*). Metoda wgSNP polega na różnicowaniu badanych sekwencji na podstawie występowania różnych wariantów polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) w DNA - im więcej różnic SNP pomiędzy dwoma organizmami, tym są one mniej spokrewnione. W porównaniu do metod cgMLST i wgMLST, metoda ta charakteryzuje się większą siłą różnicowania molekularnego. Metody cgMLST i wgMLST wykorzystują podejście tzw. „gene-by-gene”, w których badane sekwencje porównuje się z sekwencjami genów referencyjnych. Metody te są coraz częściej stosowanymi metodami typowania mikroorganizmów. W metodzie cgMLST badane są sekwencje genów konserwatywnych ewolucyjnie dla danego gatunku, które występują np. u 95% wszystkich szczepów. W metodzie wgMLST oprócz genów konserwatywnych, badane są dodatkowo geny pomocnicze, a po rozszerzeniu badania o międzygenowe regiony DNA oraz pseudogeny, wgMLST jest w pełni badaniem całogenomowym [2], [42], [102].

Współczynnik dyskryminacji WGS jest nieporównywalnie wyższy z innymi technikami, a uzyskane informacje są wysoce powtarzalne i dokładnie mierzone za pomocą programów bioinformatycznych. Oprócz analiz porównawczych, z pojedynczego badania WGS istnieje możliwość odczytywania z sekwencji nukleotydowych informacji dotyczących cech wirulencji oraz wrażliwości na antybiotyki. Wadami tej techniki jest jednak długi czas analizy badanych sekwencji oraz wysoki koszt przeprowadzania typowania WGS w rutynowej diagnostyce epidemiologicznej.

5. Założenia i cel pracy

1. Ulepszenie metodyki różnicowania patogennych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* techniką TRS-PCR.
2. Porównanie nowej metodyki TRS-PCR z metodą VNTR-MLVA dla szczepów *Pseudomonas aeruginosa* oraz z metodą MLST dla szczepów *Escherichia coli*.

6. Materiały

6.1. Materiał biologiczny

Jako materiał biologiczny w prowadzonych badaniach wykorzystano kolekcje patogennych szczepów klinicznych *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*.

6.1.1. Szczepy kliniczne *E. coli*

W pracy wykorzystano 124 szczepy kliniczne UPEC wyizolowane w latach 2005-2006 z moczu pacjentów Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego Nr 2 im. Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi. Dodatkowo, w typowaniu molekularnym metodą MLST uwzględniono 8 szczepów klinicznych STEC, posiadających wyspę patogenności LEE, otrzymanych z Center for Molecular Biology of Inflammation – ZMBE, Institute of Infectiology, Münster w Niemczech w latach 2011-2012.

Szczepy wyizolowano z podłoża różnicujących, określono serotyp, czynniki wirulencji, typowe dla patogennych szczepów *E. coli* (moczowych, jak i jelitowych), przypisano do poszczególnych grup filogenetycznych. Kolekcja szczepów była także typowana uprzednio metodą CGG-PCR i GTG-PCR.

6.1.2. Szczepy kliniczne *P. aeruginosa*

Sześćdziesiąt trzy izolaty *P. aeruginosa* pozyskano w latach 2012-2019 od ośmiu pacjentów z Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. Wszystkie szczepy kliniczne pochodziły od dorosłych pacjentów (≥ 18 lat) z mukowiscydozą i były pobierane w szpitalu podczas kolejnych infekcji. Próbkę płwociny po pobraniu od pacjentów wysiewano na selektywne podłoża do izolacji *P. aeruginosa*: Columbia Blood Agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francja) i MacConkey Agar (bioMérieux). Identyfikację *P. aeruginosa* przeprowadzano rutynowymi metodami mikrobiologicznymi (test na oksydazę, produkcja pigmentu, wzrost w 42 °C). W celu potwierdzenia identyfikacji bakterii *P. aeruginosa*, korzystano z komercyjnego systemu identyfikacji VITEK[®]2 (bioMérieux), oraz MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Charakterystyka kliniczna pacjentów obejmowała płeć oraz wiek pacjenta, analizę obecności delekcji F508 w genie *cftr* oraz choroby współistniejące.

6.2. Podłoża bakteryjne

- L-bulion (*ang.* Lysogeny Broth, LB; BD Difco™);
- L-agar (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA).

6.3. Odczynniki chemiczne, materiały, roztwory i bufony

W toku prowadzonych badań wykorzystano odczynniki chemiczne, materiały, roztwory i bufony, których zestawienie przedstawiono w Tabeli Nr 4.

Tabela Nr 4. Odczynniki chemiczne, roztwory i bufony używane w badaniach.

Nazwa odczynnika	Producent	Wykorzystanie
Bufory i roztwory z zestawu <u>GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit</u> : Lysis Solution T, Lysis Solution C, Wash Solution 1, Wash Solution Concentrate, Elution Solution (10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0), Proteinaza K, RNaza A.	Sigma-Aldrich	Izolacja genomowego DNA zgodnie z zaleceniami producenta
Bufory i roztwory z zestawu <u>GeneJET Genomic DNA Purification Kit</u> : Proteinaza K, RNaza A, Digestion Solution, Lysis Solution, Wash Buffer I, Wash Buffer II, Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,1 mM EDTA).	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA	
50 X stężony roztwór trójfosforanów deoksynukleotydów (dNTP): mieszanina 10 mM dGTP, 10mM dCTP, 10mM dATP, 10mM dTTP	Sigma-Aldrich	Metoda PCR
Polimeraza <i>Taq</i> DNA	Invitrogen™, Life Technologies	
Bufor do Polimerazy <i>Taq</i> DNA 10 x stężony [zawiera 200 mM Tris HCl (pH 8,4), 500 mM KCl]	Invitrogen™, Life Technologies	
50 mM chlorek magnezu	Invitrogen™, Life Technologies	
DMSO	BioShop®, Ontario, Kanada	
Woda uzdatniana DEPC (wolna od DNaz i RNaz)	Ambion® firmy ThermoFisher Scientific	Elektroforeza DNA
Agaroza	BioShop®, Ontario, Kanada	
Bufor octanowy TAE, 50 x stężony (0,04 M Tris-octan, 0,001 M EDTA, pH=8,0)	BioShop®, Ontario, Kanada	
Roztwór bromku etydyny (EtBr) w stężeniu 10 mg/ml	BioShop®, Ontario, Kanada	
Sterylny roztwór gliceryny o stężeniu 50 %	Polskie Odczynniki Chemiczne S.A., Gliwice, Polska	Przygotowywanie zawiesin bakteryjnych do przechowywania w temperaturze -80 °C

6.4. Startery wykorzystane w reakcjach PCR

Oligonukleotydowe sekwencje starterowe wykorzystywane w reakcjach amplifikacji zostały zsyntetyzowane w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie (dla testów TRS-PCR), oraz w firmie Genomed S.A. z Warszawy (pozostałe startery). Sekwencje nukleotydowe, ich lokalizacja w genomie oraz przewidywana wielkość amplifikowanych produktów dla poszczególnych starterów/par starterów zastosowanych dla metod: TRS-PCR, MLST i MLVA, przedstawiono odpowiednio w Tabelach Nr 5-7. W przypadku metody TRS-PCR (Tabela Nr 5), starter $(N)_6(CAC)_4$ wykorzystywano do różnicowania szczepów UPEC oraz ośmiu szczepów STEC. Następujące startery: $(N)_6(CGG)_4$, $(N)_6(GTC)_4$, $(N)_6(CAC)_4$, $(N)_6(CCG)_4$, $(N)_6(GAC)_4$, wykorzystywano w celu opracowania testów TRS-PCR do różnicowania kolekcji *P. aeruginosa*, spośród których startery: $(N)_6(CGG)_4$, $(N)_6(GTC)_4$ zastosowano w różnicowaniu posiadanej kolekcji szczepów klinicznych *P. aeruginosa* (Tabela Nr 5).

Tabela Nr 5. Startery oligonukleotydowe zastosowane w analizie TRS-PCR (pz – par zasad).

Starter	Sekwencja oligonukleotydowa (5'-3')	Amplifikowany region	Temperatura przyłączenia starterów w reakcji amplifikacji [°C]	Długość produktu amplifikacji	Referencja
CGG	$(N)_6(CGG)_4$	Region pomiędzy TRS	72,0	od ~100 do ~2500 pz	[1], [88], [95], [96]
CAC	$(N)_6(CAC)_4$	Region pomiędzy TRS	61,0	od ~100 do ~2500 pz	[1], [93], [97]
GTC	$(N)_6(GTC)_4$	Region pomiędzy TRS	61,0	od ~100 do ~2500 pz	[88]
CCG	$(N)_6(CCG)_4$	Region pomiędzy TRS	72,0	od ~100 do ~2500 pz	[97]
GAC	$(N)_6(GAC)_4$	Region pomiędzy TRS	61,0	od ~100 do ~2500 pz	[97]

Tabela Nr 6. Startery oligonukleotydowe zastosowane w analizie MLST (pz – par zasad) [107].

Amplifikowany gen	Funkcja genu	Starter	Sekwencja oligonukleotydowa (5'-3')	Temperatura przyłączenia starterów w PCR [°C]	Wielkość produktu amplifikacji (pz)
<i>adh</i>	kinaza adenylanowa	adh-F	TCATCATCTGCACTTTCCGC	54,0	536
		adh-R	CCAGATCAGCGCGAACTTCA		
<i>fumC</i>	hydrataza fumaranowa	fumC-F	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	58,0	469
		fumC-R	GTACGCAGCGAAAAAGATTC		
<i>gyrB</i>	gyraza DNA	gyrB-F	TCGGCGACACGGATGACGGC	60,0	460
		gyrB-R	ATCAGGCCTTCACGCGCATC		
<i>icd</i>	dehydrogenaza izocytrynianowa/ izopropylomalanaowa	icd-F	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	54,0	518
		icd-R	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
<i>mdh</i>	dehydrogenaza jabłczanowa	mdh-F	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG	60,0	452
		mdh-R	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT		
<i>purA</i>	dehydrogenaza adenylobursztynianowa	purA-F	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	54,0	478
		purA-R	CATACGGTAAGCCACGCAGA		
<i>recA</i>	rekombinaza A	recA-F	CGCATTCGCTTTACCCTGACC	58,0	510
		recA-R	TCTCGATCAGCTTCTCTTTT		

Tabela Nr 7. Startery oligonukleotydowe zastosowane w analizie MLVA (pz – par zasad) [108].

Locus	Starter	Sekwencja oligonukleotydów (5'-3')	Długość powtórzeń tandemowych (pz)	Długość regionów flankujących 5' (pz)	Długość regionów flankujących 3' (pz)	Referencja
ms061	ms61-F	CTTGCCGTGCTACCGATCC	6	25	35	[109]
	ms061-R	CCCCATGCCAGTTGC				
ms172	ms172-F	GGATTCTCTCGCACGAGGT	54	185	195	[110]
	ms172-R	TACGTGACCTGACGTTGGTG				
ms207	ms207-F	ACGGCGAACAGCACCAGCA	6	70	45	[110]
	ms207-R	CTCTTGAGCCTCGGTCCT				
ms209	ms209-F	CAGCCAGGAACTGCGGAGT	6	70	43	[110]
	ms209-R	CTTCTCGCAACTGAGCTGGT				
ms211	ms211-F	ACAAGCGCCAGCCGAACCTGT	101	138	105	[110]
	ms211-R	CTTCGAACAGGTGCTGACCGC				
ms213	ms213-F	CTGGGCAAGTGTTGGTGGATC	103	61	118	[110]
	ms213-R	TGGCGTACTCCGAGCTGATG				
ms214	ms214-F	AAACGCTGTTCGCCAACCTCTA	115	133	67	[110]
	ms214-R	CCATCATCCTCCTACTGGTT				
ms217	ms217-F	TTCTGGCTGTCGCGACTGAT	109	165	204	[110]
	ms217-R	GAACAGCGTCTTTTCCTCGC				
ms222	ms222-F	AGAGGTGCTTAACGACGGAT	101	128	73	[110]
	ms222-R	TGCAGTTCTGCGAGGAAGGCG				

6.5. Standardy wielkości fragmentów DNA

Przedstawione poniżej markery wykorzystywano jako wzorce wielkości dla analizowanych produktów PCR w rozdzielach elektroforetycznych w żelu agarozowym:

- Marker GeneRuler™ 100 bp Plus (ThermoFisher Scientific), generujący fragmenty o wielkości: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 par zasad (pz).
- Marker GeneRuler™ 50 bp (ThermoFisher Scientific), generujący fragmenty o wielkości: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 par zasad (pz).

6.6. Urządzenia laboratoryjne

- Termocyklery T-3000 Biometra (Analytik Jena, Jena, Niemcy), wykorzystywano do przeprowadzenia amplifikacji DNA metodą PCR;
- BioPhotometer Model #6131 (Eppendorf, Hamburg, Niemcy), wykorzystywano do pomiarów stężeń wyizolowanego DNA oraz do pomiarów gęstości optycznej hodowli bakteryjnych.
- Cieplarko-wytrząsarka Infors AG CH-4103 AT-18 (Infors AG, Bottmingen, Szwajcaria), wykorzystywana do prowadzenia hodowli bakteryjnych;
- Aparat do elektroforezy Sub-Cell® GT System (Bio-Rad, Hercules, CA, US).
- System do wizualizacji i fotografowania żeli FluorChem 8800 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA), wraz z oprogramowaniem AlphaView™.

6.7. Programy bioinformatyczne

- BioNumerics wersja 4.6. (Applied-Maths, Saint-Martens-Latem, Belgia).
- Vector NTI Advance Software wersja 11.5.4 (ThermoFisher Scientific).
- Sigma Plot (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).
- Chromas software wersja. 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia).

7. Metody

7.1. Metody hodowli drobnoustrojów oraz przygotowanie zawiesin bakteryjnych do przechowywania w temperaturze -80 °C

7.1.1. Metody hodowli *E. coli*

Hodowle bakteryjne szczepów *E. coli* prowadzone były w 10 ml podłożu płynnym LB z wykorzystaniem cieplarko-wytrząsarki Infors AG CH-4103 AT-18, w temperaturze 37 °C z mieszaniem, przy 120 obr./min., w czasie 24 godzin do osiągnięcia $OD_{600} = 1.0$. W każdym przypadku do hodowli płynnej wykorzystano zawiesinę bakteryjną przygotowaną jak w punkcie 7.1.3 (sekcja Metody).

7.1.2. Metody hodowli *P. aeruginosa*

Pojedyncze kolonie szczepów *P. aeruginosa* pobierano z płytki agarowej i hodowano przez noc w 5 ml płynnej pożywki LB w 37 °C z mieszaniem (120 obr./min.), z wykorzystaniem cieplarko-wytrząsarki Infors AG CH-4103 AT-18. Następnego dnia hodowle bakteryjne przenoszono do 5 ml świeżej pożywki płynnej LB przy użyciu ezy i hodowano w temperaturze 32 °C lub 37 °C przez 18–48 h (w zależności od szybkości wzrostu hodowli), z mieszaniem przy 120 obr./min., aż do uzyskania wartości OD_{600} 0,9–1,0. Z każdego izolatu przygotowano zawiesinę do przechowywania w niskich temperaturach.

7.1.3. Przygotowanie zawiesin bakteryjnych do przechowywania w temperaturze -80°C

Szczepy bakteryjne przechowywano w temperaturze -80 °C w postaci mieszanin: 500 µl świeżej hodowli bakteryjnej w płynnym podłożu LB z 50 % roztworem glicerolu w stosunku 1:1.

7.2. Izolacja całkowitego bakteryjnego DNA

Izolację całkowitego bakteryjnego DNA przeprowadzono zarówno dla *E. coli* i *P. aeruginosa* za pomocą zestawów do izolacji DNA GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich), oraz GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific), zgodnie z protokołami producentów. Do izolacji DNA

wykorzystywano 1 ml świeżej hodowli komórek bakteryjnych prowadzonych w płynnym podłożu LB (punkt 7.1., sekcja Metody).

Ilość i czystość każdej próbki genomowego DNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm za pomocą spektrofotometru BioPhotometer. Każdą próbkę DNA rozcieńczano do stężenia 20 ng/μl, a następnie wykorzystywano w reakcjach amplifikacji metodą PCR.

7.3. Reakcja TRS-PCR dla badanych szczepów *P. aeruginosa* i *E. coli*

W generowaniu profili prążkowych dla badanych kolekcji szczepów *P. aeruginosa* i *E. coli* wykorzystano technikę TRS-PCR, która została opracowana w Pracowni Genetyki Molekularnej IBM PAN. Pozwala ona na amplifikację fragmentów DNA położonych między mikrosatelitarnymi trójnukleotydowymi sekwencjami powtórzonymi [93], [95], [97].

7.3.1. Reakcja TRS-PCR z wykorzystaniem starterów: (N)₆(CGG)₄, (N)₆(GTC)₄, (N)₆(CAC)₄, (N)₆(CCG)₄, bądź (N)₆(GAC)₄

Izolację genomowego DNA przeprowadzono zgodnie z punktem 7.2. (sekcja Metody). Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji amplifikacji z wykorzystaniem starterów (N)₆(CGG)₄, (N)₆(CAC)₄, (N)₆(CCG)₄, (N)₆(GAC)₄ bądź (N)₆(GTC)₄ dla pojedynczej reakcji o objętości końcowej 50 μl został przedstawiony w Tabeli Nr 8.

Tabela Nr 8. Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR w analizach TRS-PCR.

Nazwa odczynnika	Producent	Objętość [μl]	Stężenie końcowe
10X stężonego buforu do polimerazy <i>Taq</i>	Invitrogen™, Life Technologies, CA, USA	5,0	1X
50 mM chlorku magnezu	Invitrogen™, Life Technologies, CA, USA	1,5	1,5 mM
Mieszanina trifosforanów deoksyrybonukleotydów zawierająca po 10 mM każdego trifosforanu (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Sigma	1,0	200 pmol/μl
10 μM starter (N) ₆ (CAC) ₄ , (N) ₆ (CGG) ₄ , (N) ₆ (GTC) ₄ , (N) ₆ (CCG) ₄ , bądź (N) ₆ (GAC) ₄ , w zależności od reakcji TRS-PCR (Tabela Nr 5)	Genomed S.A.	1,0	200 fmol/μl
DMSO	BioShop	3,0	6%
Polimeraza <i>Taq</i> (5 U/μl)	Invitrogen™, Life Technologies, CA, USA	0,2	1 U
Matrycowe genomowe DNA o stężeniu 20 ng/μl	N/D	1,0	N/D

N/D – nie dotyczy

Reakcja amplifikacji prowadzona była z wykorzystaniem termocyklera T-3000 (Biometra), zgodnie z etapami zawartymi w Tabeli Nr 9.

Tabela Nr 9. Warunki reakcji amplifikacji metodą TRS-PCR.

Etap	Temperatura [°C]	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95,0	3 minuty	1
Denaturacja	95,0	1 minuta	35
Przyłączanie starterów	Odpowiednia temperatura hybrydyzacji starterów w zależności od analizy TRS-PCR (Tabela Nr 5)	1 minuta	
Elongacja	72,0	2 minuty	
Końcowa elongacja	72,0	8 minut	1
Chłodzenie	4,0	-	1

Rozdział elektroforetyczny produktów uzyskanych w wyniku reakcji PCR przeprowadzono w 1,6% żelach agarozowych zgodnie procedurą opisaną w punkcie 7.6 (sekcja Metody).

7.4. Genotypowanie MLST

Typowanie na podstawie sekwencjonowania genów metabolizmu podstawowego (MLST) przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym przez Wirth T. i wsp. [107]. Wykorzystuje on schemat bazujący na amplifikacji i sekwencjonowaniu fragmentów siedmiu genów metabolizmu podstawowego przy użyciu starterów, których sekwencje oligonukleotydowe zostały zawarte w Tabeli Nr 6. Zaproponowany schemat typowania szczepów *E. coli* metodą MLST wykorzystuje fragmenty następujących siedmiu genów metabolizmu podstawowego: *adk* (kinaza adenylnowa), *fumC* (hydrataza fumaranowa), *gyrB* (gyraza DNA), *icd* (dehydrogenaza izocytrynian/izopropyljabłczan), *mdh* (dehydrogenaza jabłczanowa), *purA* (dehydrogenaza adenylbursztynianowa), *recA* (rekombinaza A).

Izolację genomowego DNA przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 7.2. (sekcja Metody). Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej reakcji amplifikacji, o objętości końcowej 50 µl został przedstawiony w Tabeli Nr 10.

Tabela Nr 10. Skład mieszaniny reakcyjnej w analizach MLST.

Nazwa odczynnika	Producent	Objętość [μl]	Stężenie końcowe
10X stężonego buforu do polimerazy <i>Taq</i>	Invitrogen™, Life Technologies, CA, USA	5,0	1X
50 mM chlorku magnezu	Invitrogen™, Life Technologies, CA, USA	1,5	1,5 mM
Mieszanina trifosforanów deoksyrybonukleotydów zawierająca po 10 mM każdego trifosforanu (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Sigma-Aldrich	1,0	200 pmol/μl
10 μM każdego ze starterów PCR (Tabela Nr 6)	Genomed S.A.	2,0	400 fmol/μl
DMSO	BioShop	3,0	6%
Polimeraza <i>Taq</i> (5 U/μl)	Invitrogen™, Life Technologies, CA, USA	0,2	1 U
Matrycowe genomowe DNA o stężeniu 20 ng/μl	N/D	1,0	N/D

N/D – nie dotyczy

Reakcję amplifikacji przeprowadzano z wykorzystaniem termocyklera T-3000 (Biometra), zgodnie z etapami zawartymi w Tabeli Nr 11:

Tabela Nr 11. Warunki reakcji PCR w analizie MLST.

Etap	Temperatura [°C]	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95,0	2 minuty	1
Denaturacja	95,0	30 sekund	35
Przyłączanie starterów	Temperatura hybrydyzacji starterów zgodnie z Tabelą Nr 6	1 minuta	
Elongacja	72,0	1 minuta	
Końcowa elongacja	72,0	5 minut	1
Chłodzenie	4,0	-	1

Produkty amplifikacji poddawano oczyszczaniu poprzez precypitację DNA. W tym celu, 45 μl produktu PCR przenoszono do probówki 1,5 ml typu Eppendorf i dodawano 130,5 μl 95 % etanolu, 4,5 μl 125 mM EDTA i 4,5 μl 3M octanu potasu. Mieszaninę wymieszano poprzez worteksowanie przez 15 sekund i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Po inkubacji, mieszaninę wirowano przy prędkości 3000 x g przez 30 minut w temperaturze 4 °C. Po wirowaniu, supernatant usuwano, dodawano 157,5 μl 70 % etanolu i wymieszano poprzez worteksowanie przez 15 sekund.

Następnie wirowano ponownie przy prędkości 1700 x g przez 15 minut w temperaturze 4 °C, usuwano supernatant; pellet DNA suszono w otwartej probówce w temperaturze pokojowej przez około 15 min. Oczyszczone DNA zawieszano w 25 µl wody DEPC i mierzono stężenie DNA metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem aparatu Eppendorf BioPhotometer Model #6131.

Po przeprowadzeniu oczyszczania, DNA rozcieńczono do 10 ng/µl. Produkty PCR sekwencjonowano w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, przy użyciu starterów przednich. Dane sekwencjonowania analizowano przy użyciu oprogramowania Chromas v. 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia). Otrzymane sekwencje porównywano z sekwencjami referencyjnymi istniejących alleli w bazie danych MLST dla *E. coli* w celu określenia typów alleli i typów sekwencyjnych (ST), zgodnie z opisem w punkcie 7.9. (sekcja Metody).

7.5. Typowanie molekularne oparte o sekwencje VNTR (MLVA)

Dla wszystkich 63 izolatów *P. aeruginosa* użytych w badaniach przeprowadzono analizę MLVA, zgodnie ze schematem wykorzystującym amplifikację, metodą PCR, dziewięciu *loci* o zmiennej liczbie powtórzeń tandemowych (VNTR), zaproponowanym przez Turtona J.F. i wsp. [108]. Izolację genomowego DNA przeprowadzono zgodnie z punktem 7.2. (sekcja Metody). Sekwencje starterów do przeprowadzenia amplifikacji *loci*: ms61, ms172, ms207, ms209, ms211, ms213, ms214, ms217 i ms222 zaadoptowano z Onteniente L. i wsp. [109] oraz Vu-Thien H. i wsp. [110]. Sekwencje starterów, długości powtórzeń tandemowych i regionów flankujących zostały zamieszczone w Tabeli Nr 7.

Izolację genomowego DNA przeprowadzono zgodnie z punktem 7.2. (sekcja Metody). Skład mieszaniny reakcyjnej został zoptymalizowany względem piśmiennictwa źródłowego i dla pojedynczej reakcji amplifikacji o objętości końcowej 25 µl został przedstawiony w Tabeli Nr 12.

Tabela Nr 12. Skład mieszaniny reakcyjnej w analizach MLVA.

Nazwa odczynnik	Producent	Objętość [μl]	Stężenie końcowe
10X stężonego buforu do polimerazy <i>Taq</i>	Invitrogen™, Life Technologies, CA, USA	2,5	1X
50 mM chlorku magnezu	Invitrogen™, Life Technologies, CA, USA	0,5 (dla ms211) 0,75 1,0 (dla ms222)	1,0 mM 1,5 mM 2,0 mM
Mieszanina trifosforanów deoksyrybonukleotydów zawierająca po 10 mM każdego trifosforanu (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Sigma-Aldrich	0,5	200 pmol/μl
10 μM każdego ze starterów PCR (Tabela Nr 7)	Genomed S.A.	4,0	1600 fmol/μl
DMSO	BioShop	3,0	6%
Polimeraza <i>Taq</i> (5 U/μl)	Invitrogen™, Life Technologies, CA, USA	0,2	1 U
Matrycowe genomowe DNA o stężeniu 20 ng/μl	N/D	1,0	N/D

N/D – nie dotyczy

Reakcje amplifikacji przeprowadzono przy użyciu termocyklera T3000 (Biometra), w warunkach przedstawionych w Tabeli Nr 13.

Tabela Nr 13. Warunki reakcji amplifikacji w przeprowadzanych analizach MLVA.

Etap	Temperatura [°C]	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95,0	5 minut	1
Denaturacja	95,0	15 sekund	35
Przylączenie starterów	Temperatura hybrydyzacji starterów w zależności od amplifikowanych <i>loci</i> : 58 °C dla ms172, ms207, ms203, ms213 oraz 60 °C dla ms61, ms211, ms214, ms217, ms222	20 sekund	
Elongacja	72,0	30 sekund	
Końcowa elongacja	72,0	15 minut	1
Chłodzenie	4,0	-	1

Elektroforezę produktów po PCR przeprowadzono z wykorzystaniem 1,6 % żelu agarozowego zgodnie z punktem 7.6. (sekcja Metody). Wielkość każdego amplikonu określano za pomocą oprogramowania BioNumerics (wersja 4.6) (Applied-Maths). Wielkości produktów PCR zastosowano do oceny liczby powtórzeń motywów poszczególnych *loci*. Liczba powtórzeń motywów mini- i mikrosatelitarnych oszacowano przez odjęcie niezmiennego regionu flankującego od wielkości amplikonu,

a następnie podzielenie przez długość powtórzeń tandemowych (Tabela Nr 7), zgodnie z punktem 7.9. (sekcja Metody).

7.6. Elektroforeza w żelach agarozowych

Produkty amplifikacji uzyskane po PCR rozdzielane były z wykorzystaniem elektroforezy horyzontalnej w 1,6 % żelach agarozowych z wykorzystaniem aparatu do elektroforezy Sub-Cell[®] GT System (Bio-Rad). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w temperaturze pokojowej, w 1x stężonym buforze TAE, przy napięciu 70 V (2,4 V/cm odległości między elektrodami). Do analiz MLVA oraz TRS-PCR zastosowano marker wielkości GeneRuler[™] 100 bp Plus (ThermoFisher Scientific), natomiast do analiz MLST zastosowano marker wielkości GeneRuler[™] 50 bp (ThermoFisher Scientific). Elektroforezę prowadzono do momentu, w którym barwnik (błękit bromofenolowy) osiągnął odległość 6 cm od studzienek. Żele agarozowe następnie barwiono w roztworze bromku etydydy (EtBr) (o końcowym stężeniu 2 µg/ml), przez 10 min. i odbarwiano w wodzie przez kolejne 10 min. Żele agarozowe wizualizowano w świetle UV przy długości fali 312 nm, przy użyciu systemu FluorChem 8800 z oprogramowaniem Alpha EaseFC v. 3.1.2 (AlphaInnotech, San Leandro, CA, USA), a następnie dokumentowano.

7.7. Analizy porównawcze profili prążkowych otrzymywanych po amplifikacji metodą TRS-PCR

W celu przeprowadzenia analizy podobieństwa badanych szczepów bakteryjnych, profile prążkowe po rozdziale fragmentów DNA na żelach agarozowych otrzymanych w wyniku analizy TRS-PCR analizowano za pomocą oprogramowania BioNumerics wersja 4.6. (Applied Maths), zgodnie z opisem zawartym w punkcie 7.9 (sekcja Metody).

7.7.1. Określenie powtarzalności analiz (R) dla testów TRS-PCR dla badanych kolekcji szczepów *E. coli* i *P. aeruginosa*.

Powtarzalność metody CAC-PCR dla *E. coli* określano przez analizę porównawczą podobieństwa profili prążkowych (krzywej densytometrycznej), charakterystycznej dla trzech oddzielnych wzorów prążków uzyskanych dla trzech wybranych szczepów z zastosowaniem startera N₆(CAC)₄.

Powtarzalność metody TRS-PCR dla *P. aeruginosa* (testy CGG-, GTC-PCR), określono przez analizę porównawczą podobieństwa profili prążkowych (krzywej densytometrycznej), charakterystycznej dla czterech oddzielnych wzorów prążków uzyskanych dla trzech wybranych szczepów dla każdego z zastosowanych odpowiednich dla danej metody starterów TRS-PCR.

W celu wyznaczenia wartości powtarzalności poszczególnych testów TRS-PCR (R), wykonano analizy porównawcze podobieństwa profili prążkowych według procedury opisanej w punkcie 7.9 (sekcja Metody), i oszacowano średnią arytmetyczną podobieństwa (S_a) profili prążkowych oraz wartości odchylenia standardowego (SD), z wykorzystaniem oprogramowania Sigma Plot (SPSS Inc.). Współczynnik powtarzalności wzoru prążków (R) dla każdego startera obliczono w następujący sposób:

$$R = S_a - SD [\%]$$

gdzie:

R – wartość powtarzalności

S_a – średnia arytmetyczna podobieństwa profili prążkowych dla powtórzeń amplifikacji dla poszczególnych izolatów dla danej analizy

SD – odchylenie standardowe wartości średniej podobieństwa profili prążkowych dla danej analizy.

7.8. System przypisywania klas TRS-PCR

W celu ulepszenia metodyki różnicowania patogennych szczepów *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* techniką TRS-PCR (punkt 7.7., sekcja Metody), został opracowany unikalny schemat klasyfikacji, w którym poszczególnym wzorom TRS-PCR przypisywana jest wartość liczbowa. Na podstawie analiz z użyciem oprogramowania BioNumerics wersja 4.6. (punkt 7.9., sekcja Metody), każdemu unikalnemu profilowi przypisano numer klasy. Wzory profili prążkowych dla poszczególnych analiz TRS-PCR o podobieństwie krzywych densytometrycznych powyżej wartości powtarzalności (punkt 7.7.1., sekcja Metody), zostały uznane jako identyczne.

7.9. Analizy bioinformatyczne

Do generowania dendrogramów, w celu różnicowania genetycznego bakterii na podstawie wyników uzyskanych metodą TRS-PCR, wykorzystywano oprogramowanie BioNumerics wersja 4.6. (Applied-Maths). Dendrogramy w analizach porównawczych profili prążkowych konstruowano na podstawie podobieństwa ich krzywych densytometrycznych, z wykorzystaniem współczynnika korelacji Pearsona (optymalizacja 1%, tolerancja pozycji 1%) oraz algorytmu grupowania UPGMA (ang. *unweighted pair group method with arithmetic mean*).

Oprogramowanie Vector NTI Advance Software wersja 11.5.4 (ThermoFisher Scientific) wykorzystywano do analiz sekwencji starterów wykorzystywanych w metodzie MLST dla wybranych szczepów *E. coli* oraz sekwencji starterowych TRS-PCR, jak również długości powtórzeń tandemowych oraz sekwencji flankujących 3' i 5' VNTR do analiz MLVA w genomie referencyjnym *P. aeruginosa* PAO1, zgodnie z Tabelą Nr 7.

Oprogramowanie Sigma Plot (SPSS Inc.) wykorzystywano do wykonania analiz powtarzalności TRS-PCR.

Wyniki sekwencjonowania DNA w postaci elektroferogramów analizowano i konwertowano do plików FASTA z wykorzystaniem oprogramowania Chromas software wersja 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd). Otrzymane sekwencje DNA porównano z istniejącymi sekwencjami DNA allelami w bazie danych MLST dla *E. coli* w celu określenia typu alleli i typów sekwencyjnych (ST): (https://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search, dostęp online 09/09/2021), oraz porównywano z sekwencjami referencyjnymi z wykorzystaniem programu Nucleotide Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; dostęp online 10/09/2021).

7.10. Zgodność metod typowania MLVA i TRS-PCR.

Stopień zgodności między metodą MLVA i schematem typowania numerycznego TRS-PCR zostały określone w analizie szczepów *P. aeruginosa* za pomocą współczynnika Wallace'a (*W*), z wykorzystaniem oprogramowania w wersji online (<http://www.comparingpartitions.info/>; dostęp w dniu 06.09.2021), na podstawie Wallace, D.L., 1983 [111].

7.11. Wyznaczanie współczynnika różnicowania (DI)

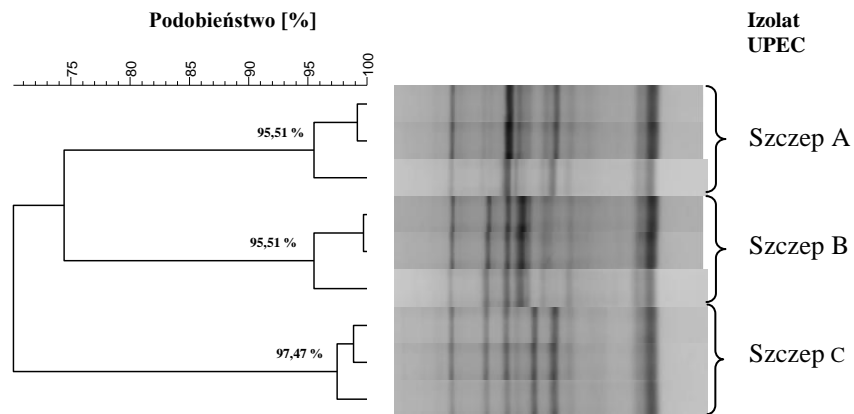
Dla poszczególnych wyników analiz testów: CAC-PCR, uśrednionej analizy podobieństwa profili prążkowych (CAC-, GTG-, CGG-PCR), oraz typowania numerycznego TRS-PCR dla *E. coli*, a także dla poszczególnych wyników analiz testów: CGG-, GTC-PCR, uśrednionej analizy podobieństwa profili prążkowych (CGG-, GTC-PCR), oraz typowania numerycznego TRS-PCR i MLVA dla *P. aeruginosa*, określono ich siłę różnicowania poprzez wyliczenie współczynnika różnicowania (ang. *diversity index*, DI), zgodnie z procedurą Huntera i Gastona [112].

8. Wyniki

8.1. *Escherichia coli*

8.1.1. Określenie powtarzalności analiz (R) dla testu CAC-PCR dla badanej kolekcji szczepów *E. coli*

Realizację pierwszego etapu pracy doktorskiej rozpoczęto od przeprowadzenia testu CAC-PCR na wybranej kolekcji szczepów *E. coli*. W tym celu w pierwszej kolejności określono powtarzalność metody CAC-PCR dla badanych szczepów UPEC. Analizę porównawczą podobieństwa profili prążkowych otrzymanych z wykorzystaniem startera $N_6(CAC)_4$ wykonano dla trzech wybranych izolatów w trzech powtórzeniach każdy (Rysunek Nr 2), zgodnie z opisem w punkcie 7.3. (sekcja Metody). Powtarzalność analizy CAC-PCR została obliczona zgodnie z metodą opisaną w punkcie 7.7.1. (sekcja Metody). W przypadku metody CAC-PCR powtarzalność wyniosła 95,0 %.

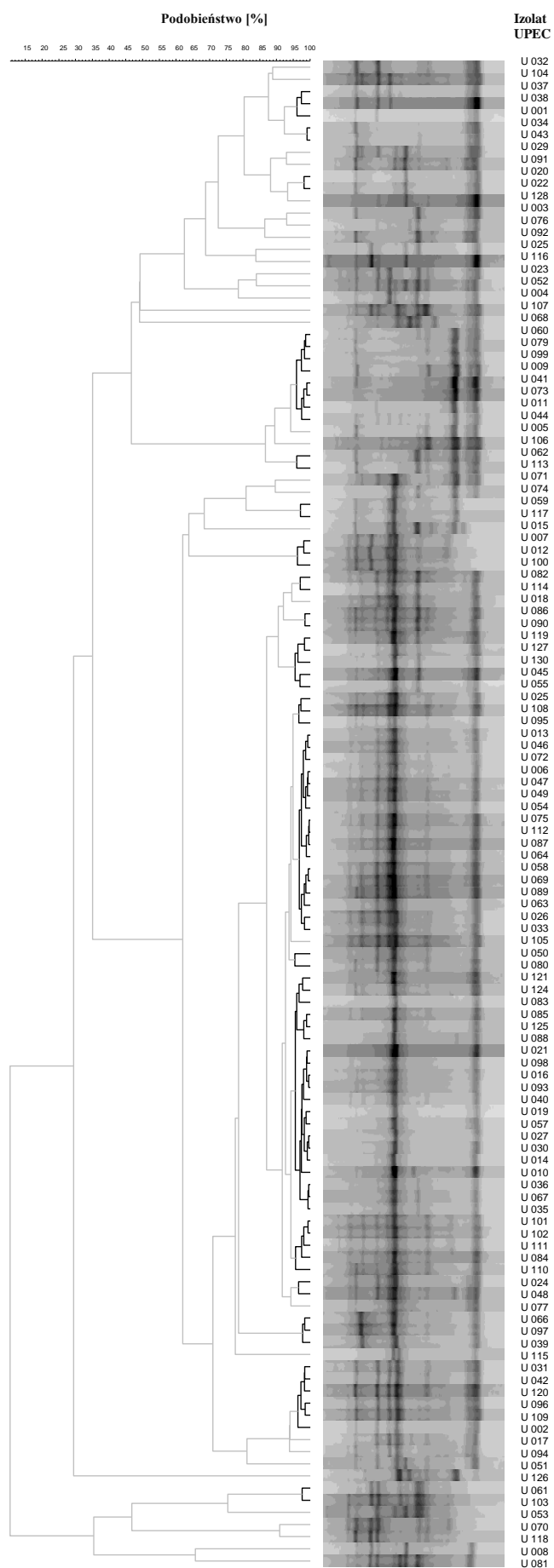


Rysunek Nr 2. Określenie wartości powtarzalności dla metody CAC-PCR na podstawie analizy wzorów prążkowych dla trzech wybranych izolatów UPEC.

8.1.2. Różnicowanie szczepów UPEC z wykorzystaniem analizy CAC-PCR.

W celu przeprowadzenia różnicowania molekularnego kolekcji szczepów UPEC (punkt 6.1.1., sekcja Materiały), metodą CAC-PCR, na wyizolowanym z hodowli bakteryjnych genomowym DNA (punkt 7.2., sekcja Metody), wykonano reakcje TRS-PCR z wykorzystaniem startera $N_6(CAC)_4$, zgodnie z opisem w punkcie 7.3. (sekcja Metody). Otrzymane produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie, zgodnie z opisem zawartym w punkcie 7.6. (sekcja Metody). Z uzyskanych w ten sposób profili prążkowych sporządzono dendrogram zgodnie z opisem metody w punkcie 7.7. (sekcja Metody) (Rysunek Nr 3), z uwzględnieniem wartości powtarzalności dla metody CAC-PCR wynoszącej 95,0 %. Pogrubione linie na dendrogramie łączą szczepy uznane jako identyczne.

Na podstawie analizy podobieństwa profili prążkowych z wykorzystaniem metody CAC-PCR, 124 izolaty UPEC pogrupowano w 52 unikalne klastry. Obliczony, zgodnie z opisem metody w punkcie 7.11. (sekcja Metody), współczynnik różnicowania DI dla tej analizy wyniósł 0,9462.

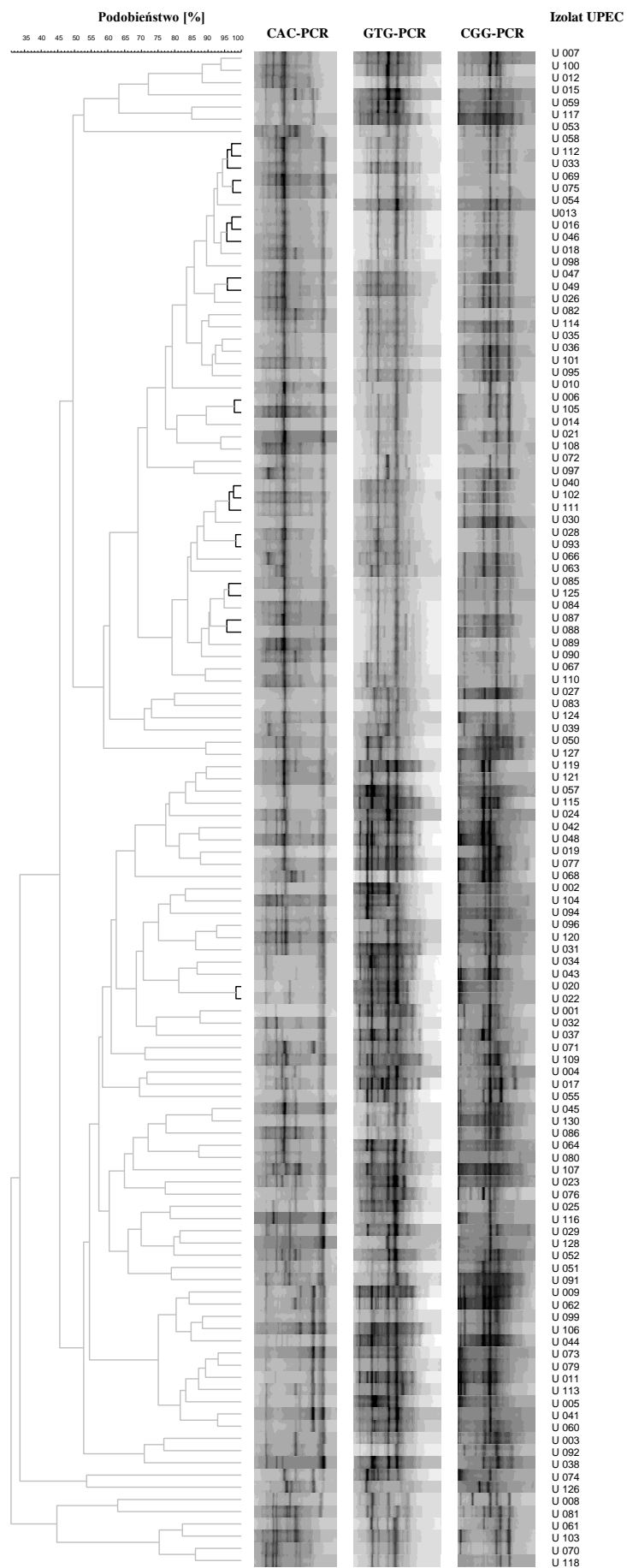


Rysunek Nr 3. Analiza podobieństwa profili prążkowych dla 124 izolatów UPEC, z użyciem metody CAC-PCR.

8.1.3. Różnicowanie szczepów UPEC z wykorzystaniem analizy uśrednionej opartej na reakcjach CGG-PCR, GTG-PCR i CAC-PCR.

Na podstawie pojedynczych analiz dla testów CAC-PCR, oraz przeprowadzonych uprzednio w Pracowni Genetyki Molekularnej testów GTG-PCR i CGG-PCR, wykonano uśrednioną analizę podobieństwa otrzymanych profili prążkowych dla wszystkich trzech testów (Rysunek Nr 4). Dendrogram został sporządzony zgodnie z opisem metody w punkcie 7.7. (sekcja Metody). W przypadku analizy uśrednionej dla CAC-PCR, CGG-PCR i GTG-PCR, za wartość powtarzalności przyjęto najniższą wartość wyznaczoną dla powyższych testów, wynoszącą 95,0 %. Pogrubione linie na dendrogramie łączą szczepy uznane jako identyczne.

Na podstawie uśrednionej analizy dla trzech testów TRS-PCR, otrzymano 111 unikalnych szczepów spośród 124 badanych izolatów UPEC. Obliczony, zgodnie z opisem metody w punkcie 7.11. (sekcja Metody), współczynnik różnicowania DI dla tej analizy wyniósł 0,9979.

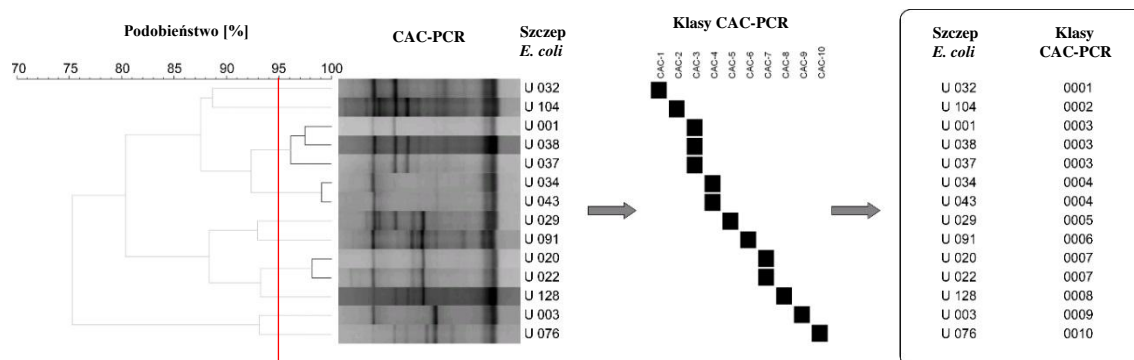


Rysunek Nr 4. Uśredniona analiza podobieństwa profili prążkowych dla 124 izolatów UPEC, z wykorzystaniem metod CAC-PCR, GTG-PCR i CGG-PCR.

8.1.4. Opracowanie metody numerycznej typowania molekularnego

W kolejnym etapie prac postanowiono udoskonalić technikę TRS-PCR. Do opracowania metody numerycznej typowania molekularnego metodą TRS-PCR wybrano 14 szczepów z kolekcji UPEC (punkt 6.1.1., sekcja Materiały), dla których przeprowadzono porównanie podobieństwa profili prążkowych wybraną metodą CAC-PCR, zgodnie z punktem 7.3. (sekcja Metody). Następnie, otrzymane produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie zgodnie z punktem 7.6. (sekcja Metody). Otrzymane profile prążkowe poddano analizie podobieństwa według metody opisanej w punkcie 7.7. (sekcja Metody).

Biorąc pod uwagę obliczoną wartość powtarzalności metody, która dla CAC-PCR wynosi 95,0 %, szczepy UPEC o wzorach profili prążkowych o podobieństwie powyżej tej wartości traktowano jako identyczne. Każdemu unikalnemu profilowi CAC-PCR przypisano numer klasy, zgodnie z opisem w punkcie 7.8. (sekcja Metody) oraz ze schematem przedstawionym na Rysunku Nr 5 (czerwona linia stanowi wartość powtarzalności dla CAC-PCR). Pogrubione linie na dendrogramie łączą szczepy należące do tego samego klastra, które zostały uznane jako identyczne.



Rysunek Nr 5. Schemat przedstawiający przypisanie klas numerycznych, na przykładzie CAC-PCR (każdemu unikalnemu profilowi przypisano numer klasy — dla zaprezentowanych 14 szczepów przypisano 10 klas CAC); opracowano na podstawie Majchrzak M. i wsp., 2019 [1].

8.1.5. Przypisanie klas TRS-PCR dla kolekcji uropatogennych szczepów *E. coli*

Opracowaną nową metodę numeryczną zastosowano do całej posiadanej w Pracowni Genetyki Molekularnej kolekcji szczepów *E. coli*, w tym wykorzystanej w niniejszej pracy doktorskiej kolekcji szczepów UPEC i STEC.

Odpowiednie klasy TRS-PCR zostały przyporządkowane, analogicznie jak w punkcie 8.1.4., do przeprowadzonych w pierwszym etapie prac analiz CAC-PCR oraz wcześniejszych badań z użyciem metod CGG-PCR i GTG-PCR. W ten sposób, każdemu szczepowi z kolekcji UPEC zostały przypisane trzy wartości liczbowe - numer klasy TRS-PCR, zgodnie z opisem w punkcie 7.8. (sekcja Metody), oraz 8.1.4 (sekcja Wyniki). Na podstawie analizy wyodrębniono 52 klasy CAC-PCR, 86 klas GTG-PCR i 99 klas CGG-PCR [1] (Tabela Nr 14).

Szczepy *E. coli* posiadające identyczne wartości liczbowe poszczególnych klas TRS-PCR, zostały przyporządkowane do jednej grupy TRS-PCR. Na podstawie analizy, spośród 124 izolatów *E. coli* otrzymano 121 unikalnych grup TRS-PCR, różniących się co najmniej w jednej klasie TRS-PCR. W wyniku analizy następujące 3 pary szczepów: U020 i U022 oraz U058 i U112, a także U069 i U075, posiadające identyczne klasy TRS-PCR, zostały przyporządkowane do tych samych grup TRS-PCR, odpowiednio o nr 10, 57 i 63 (zaznaczone w Tabeli Nr 14 czerwoną ramką). Obliczony, zgodnie z opisem metody w punkcie 7.11. (sekcja Metody), współczynnik różnicowania DI dla tej analizy wyniósł 0,9996.

Tabela Nr 14. Wartości numeryczne trzech odrębnych klas i grupy TRS-PCR dla uropatogennych szczepów *E. coli*, przyporządkowanych na podstawie profilowania CAC-, GTG- i CGG-PCR.

Szczep <i>E. coli</i>	Klasa TRS-PCR			Grupa TRS-PCR
	CAC-PCR	GTG-PCR	CGG-PCR	
U 032	1	2	71	1
U 104	2	16	40	2
U 001	3	1	80	3
U 037	3	51	51	4
U 038	3	66	5	5
U 043	4	43	36	6
U 034	4	53	77	7
U 029	5	36	84	8
U 091	6	59	24	9
U 020	7	55	32	10
U 022	7	55	32	10
U 128	8	35	75	11
U 003	9	54	23	12
U 076	10	32	50	13
U 092	11	58	6	14
U 025	12	40	96	15
U 116	13	40	34	16
U 023	14	38	40	17
U 052	15	34	78	18
U 004	16	62	91	19
U 107	17	21	27	20
U 068	18	15	52	21
U 009	19	3	30	22
U 011	19	42	38	23
U 044	19	51	45	24
U 073	19	57	32	25
U 079	19	57	39	26
U 041	19	58	75	27
U 060	19	62	74	28
U 099	19	67	82	29
U 005	20	64	32	30
U 106	21	65	72	31
U 062	22	49	31	32
U 113	22	61	37	33
U 071	23	48	86	34
U 074	24	18	32	35
U 059	25	68	43	36
U 117	25	69	29	37
U 015	26	27	74	38
U 007	27	22	83	39
U 100	27	23	85	40
U 012	27	24	89	41

Tabela Nr 14. cd. Wartości numeryczne trzech odrębnych klas i grupy TRS-PCR dla uropatogennych szczepów *E. coli* przyporządkowanych na podstawie profilowania CAC-, GTG- i CGG-PCR.

Szczep <i>E. coli</i>	Klasa TRS-PCR			Grupa TRS-PCR
	CAC-PCR	GTG-PCR	CGG-PCR	
U 082	28	80	64	42
U 114	28	81	58	43
U 018	29	72	59	44
U 090	30	74	12	45
U 086	30	83	88	46
U 127	31	9	95	47
U 055	31	10	93	48
U 130	31	20	26	49
U 045	31	39	25	50
U 119	31	47	51	51
U 028	32	76	4	52
U 108	32	77	18	53
U 095	32	82	56	54
U 064	33	19	44	55
U 072	33	25	62	56
U 058	33	71	62	57
U 112	33	71	62	57
U 026	33	71	67	58
U 087	33	72	6	59
U 089	33	72	10	60
U 013	33	72	60	61
U 046	33	72	61	62
U 069	33	72	65	63
U 075	33	72	65	63
U 033	33	73	62	64
U 054	33	74	63	65
U 006	33	74	97	66
U 049	33	85	68	67
U 047	33	85	69	68
U 063	33	86	1	69
U 105	34	74	97	70
U 050	35	9	94	71
U 080	35	33	35	72
U 057	36	13	48	73
U 019	36	17	73	74
U 027	36	29	8	75
U 124	36	37	16	76
U 010	36	41	66	77
U 121	36	52	48	78
U 083	36	63	15	79
U 088	36	72	7	80

Tabela Nr 14. cd. Wartości numeryczne trzech odrębnych klas i grupy TRS-PCR dla uropatogennych szczepów *E. coli* przyporządkowanych na podstawie profilowania CAC-, GTG- i CGG-PCR.

Szczep <i>E. coli</i>	Klasa TRS-PCR			Grupa TRS-PCR
	CAC-PCR	GTG-PCR	CGG-PCR	
U 016	36	72	59	81
U 014	36	74	98	82
U 030	36	75	3	83
U 085	36	75	11	84
U 125	36	75	12	85
U 098	36	75	66	86
U 093	36	76	4	87
U 021	36	77	17	88
U 040	36	78	2	89
U 035	36	80	59	90
U 036	36	82	55	91
U 067	36	84	13	92
U 110	37	11	14	93
U 111	37	75	1	94
U 084	37	75	9	95
U 102	37	78	1	96
U 101	37	84	57	97
U 048	38	12	54	98
U 024	38	28	49	99
U 077	39	17	42	100
U 039	40	26	1	101
U 097	40	26	57	102
U 066	40	79	1	103
U 115	41	46	46	104
U 002	42	4	33	105
U 109	42	6	87	106
U 042	42	44	53	107
U 120	42	45	79	108
U 031	42	50	28	109
U 096	42	56	76	110
U 017	43	70	92	111
U 094	44	7	41	112
U 051	45	34	47	113
U 126	46	8	99	114
U 103	47	30	20	115
U 061	47	31	21	116
U 053	48	60	81	117
U 070	49	30	19	118
U 118	50	30	22	119
U 008	51	5	70	120
U 081	52	14	90	121

8.1.6. Analiza MLST

W kolejnym etapie pracy doktorskiej postanowiono porównać, opracowaną w Pracowni Genetyki Molekularnej IBM PAN, metodę numeryczną TRS-PCR, z powszechnie stosowaną do analiz molekularnych metodą MLST. W tym celu, do wykonania analiz MLST wybrano czternaście szczepów z posiadanych w Pracowni kolekcji *E. coli*: sześć różnorodnych izolatów z kolekcji 124 klinicznych szczepów UPEC oraz osiem blisko spokrewnionych izolatów z kolekcji patogenów jelitowych *E. coli* (punkt 6.1.1, sekcja Materiały).

Analizę typowania sekwencyjnego MLST, z wykorzystaniem schematu zaproponowanego przez Achtmanna i wsp. [107], przeprowadzono, zgodnie z opisem zawartym w punkcie 7.4. (sekcja Metody).

Wyniki typowania MLST, w postaci numeru typu poszczególnych alleli, zostały przedstawione w Tabeli Nr 15. Szczepy UPEC: U108 i U021 (zaznaczone w Tabeli Nr 15 w czerwonej ramce), zostały sklasyfikowane jako ten sam typ sekwencyjny ST95. Pozostałe analizowane szczepy UPEC zostały przypisane do różnych typów ST. W przypadku szczepów STEC następujące izolaty: 4820, 2757, 2743, 2751, 2735, 2749, sklasyfikowano jako ten sam typ sekwencyjny ST20 (zaznaczone w Tabeli Nr 15 w niebieskiej ramce). Dla izolatu STEC 2745 zidentyfikowano nowy typ allelu *mdh*, natomiast dla izolatu STEC 2753, na podstawie profilu poszczególnych alleli, zidentyfikowano nowy typ ST, nieposiadający przypisanego numeru w bazie danych MLST.

Uzyskane w niniejszej rozprawie wyniki potwierdzają obecność kilku typów sekwencyjnych, które są powszechnie wykrywane wśród patogennych szczepów *E. coli*. W przypadku szczepów ExPEC, badania epidemiologiczne wskazują, że za większość infekcji odpowiada podzbiór patogennych linii *E. coli*, scharakteryzowanych m.in. jako typ sekwencji ST73, ST131, ST95 i ST127, które są odpowiedzialne za prawie połowę wszystkich ZUM lub zakażeń krwi (BSI) wywoływanych przez *E. coli* w wielu regionach świata [113]–[118]. Spośród nich, ST73 okazał się jednym z najczęściej izolowanych pozajelitowych typów *E. coli* [119]. Typy ST131, ST95 i ST73 zostały opisane jako częste przyczyny infekcji dróg moczowych (UTI), i infekcji krwi, podczas gdy izolaty sklasyfikowane jako ST73 zostały opisane również jako mające związek z ogniskami ZUM [120]. Typ ST73 jest istotnym i zróżnicowanym szczepem *E. coli* i często charakteryzowany dla szczepów UPEC [121]. Szczepy *E. coli*

należące do typu ST131 są często charakteryzowane wśród populacji UPEC i stanowią realne zagrożenie dla zdrowia. Szczep *E. coli* należący do ST131 został opisany jako pandemiczny szczep wielolekooporny (MDR), który jest obecnie dominującą oporną bakterią *E. coli*, występującą zarówno u osób dorosłych, jak i dzieci [122]. Obecność ST131 wiąże się z różnymi zakażeniami inwazyjnymi, co skutkuje wyższymi kosztami opieki zdrowotnej oraz zwiększoną zachorowalnością i śmiertelnością [123]. ST131 zawiera geny β -laktamazy oraz szeroki zakres genów wirulencji i oporności na przenaszalnym plazmidzie [124]. W przeciwieństwie do ST131, izolaty ST95 charakteryzowano jako znacznie mniej odporne na antybiotyki [113], natomiast ST127 stanowił szczep *E. coli* związany z wieloma czynnikami wirulencji [125].

Tabela Nr 15. Wyniki analizy MLST dla wybranych szczepów STEC i UPEC (ST- typ sekwencyjny, nieznany typ ST– brak informacji w bazie danych). (w czerwonej ramce zaznaczono ten sam typ sekwencyjny ST95; w niebieskiej ramce zaznaczono ten sam typ sekwencyjny ST20).

Szczep <i>E. coli</i>	Allel							Typ ST
	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	
U 108	37	38	19	37	17	11	26	95
U 021	37	38	19	37	17	11	26	95
U 124	53	40	47	13	36	28	29	131
U 101	14	14	10	235	17	7	10	1758
U 114	36	24	9	13	17	11	25	73
U 097	13	14	19	36	23	11	10	127
N LEEpos.-STEC 4820	6	4	3	18	7	7	6	20
N LEEpos.- STEC 2757	6	4	3	18	7	7	6	20
N LEEpos.- STEC 2743	6	4	3	18	7	7	6	20
N LEEpos.- STEC 2751	6	4	3	18	7	7	6	20
N LEEpos.- STEC 2735	6	4	3	18	7	7	6	20
N LEEpos.- STEC 2749	6	4	3	18	7	7	6	20
N LEEpos.- STEC 2745	6	4	3	18	Nieznany	7	6	Nieznany
N LEEpos.- STEC 2753	429	4	3	18	7	7	6	Nieznany

Na podstawie porównania sekwencji DNA fragmentu genu *mdh* dla izolatu STEC 2745 z sekwencją DNA fragmentu genu *mdh*, przypisanego jako typ sekwencyjny allelu nr 7 dla izolatu STEC 2753, przy użyciu oprogramowania Nucleotide Blast (punkt 7.9., sekcja Metody), zidentyfikowano tranzycję A>G w pozycji 162 (Rysunek Nr 6).

STEC 2745	1	CCCATAGACAGGGTTGCAGACCCGCCACCGGCTTTCGCTTCAACCACCTCAGTACCCGCG	60
STEC 2753	452	CCCATAGACAGGGTTGCAGACCCGCCACCGGCTTTCGCTTCAACCACCTCAGTACCCGCG	393
STEC 2745	61	TTCTGGATACGTTTGGTCAGATCAGCCACTTCCTGCTCGGTAAAACCTAACGCCAGGAACC	120
STEC 2753	392	TTCTGGATACGTTTGGTCAGATCAGCCACTTCCTGCTCGGTAAAACCTAACGCCAGGAACC	333
STEC 2745	121	TGTGACAGCAGCGGCAGAATGGTAACACCAGAGTGACCGCCA G TAACCGGCACTTCAACT	180
STEC 2753	332	TGTGACAGCAGCGGCAGAATGGTAACACCAGAGTGACCGCCA A TAACCGGCACTTCAACT	273
STEC 2745	181	TCGCCTGGCTGTTTGCCTTTCAGTTCGCAACAAAGGTGTTGGAACGAATGATATCCAGC	240
STEC 2753	272	TCGCCTGGCTGTTTGCCTTTCAGTTCGCAACAAAGGTGTTGGAACGAATGATATCCAGC	213
STEC 2745	241	GTGGTAACGCCGAACAGTTTGTTTTTTGCATAAACACCGGCTTTTTTCAGCACTTCAGCA	300
STEC 2753	212	GTGGTAACGCCGAACAGTTTGTTTTTTGCATAAACACCGGCTTTTTTCAGCACTTCAGCA	153
STEC 2745	301	GCAATCGCAACTGTGGTGTAAACCGGTTAGTGATAATACCAATGCACGCTTTCGGGCAG	360
STEC 2753	152	GCAATCGCAACTGTGGTGTAAACCGGTTAGTGATAATACCAATGCACGCTTTCGGGCAG	93
STEC 2745	361	GTTTTTCGCAACTTGCTGTACCAGTTTTTTCACGATGCCGGCGTTAACGTTAAACAGGTCG	420
STEC 2753	92	GTTTTTCGCAACTTGCTGTACCAGTTTTTTCACGATGCCGGCGTTAACGTTAAACAGGTCG	33
STEC 2745	421	GAACGATCCATACCCGGTTTACGCGCTACACC	452
STEC 2753	32	GAACGATCCATACCCGGTTTACGCGCTACACC	1

Rysunek Nr 6. Porównanie wyników sekwencjonowania fragmentu genu *mdh* dla izolatu STEC 2745 z typem allelu nr 7, otrzymanym dla izolatu STEC 2753 (kolorem czerwonym zaznaczono obecność tranzycji A>G w pozycji 162) (wygenerowane programem Nucleotide Blast).

W przypadku izolatu STEC 2753 przypisano typ sekwencyjny allelu *adk* o numerze 429, oraz zidentyfikowano nieznaną typ ST. Pozostałe badane izolaty STEC zostały przypisane do typu sekwencyjnego allelu *adk* nr 6, oraz typu ST 20. Za pomocą porównania sekwencji DNA przy użyciu oprogramowania Nucleotide Blast (punkt 7.9., sekcja Metody), wykazano obecność tranzycji C>T w pozycji 527 sekwencji analizowanego fragmentu genu *adk* o typie allelu nr 429, w porównaniu do allelu *adk* nr 6 (Rysunek Nr 7).

STEC 2753	1	TACCCGCTTCCGCTTCTTTGGAGTAGTAGCCGATCAGCGGTGCAGTCATCTGATGGTATT	60
STEC 2745	1	TACCCGCTTCCGCTTCTTTGGAGTAGTAGCCGATCAGCGGTGCAGTCATCTGATGGTATT	60
STEC 2753	61	CAACCAGACGTTTACGCACGGTTTCTTCCTGATCGTCTTTACGGGTAGTCAGTTCTTCAC	120
STEC 2745	61	CAACCAGACGTTTACGCACGGTTTCTTCCTGATCGTCTTTACGGGTAGTCAGTTCTTCAC	120
STEC 2753	121	CGGTAACGTCGTCTTTGCCTTCTACTTTTCGGCGGATTGAATTTAACGTGATAAACACGAC	180
STEC 2745	121	CGGTAACGTCGTCTTTGCCTTCTACTTTTCGGCGGATTGAATTTAACGTGATAAACACGAC	180
STEC 2753	181	CAGACGGCGCATGAACGCGGGCCCTACGATACGATCAACAATCAGTTCGTCCGGTACGT	240
STEC 2745	181	CAGACGGCGCATGAACGCGGGCCCTACGATACGATCAACAATCAGTTCGTCCGGTACGT	240
STEC 2753	241	CGAATTCAGAACGTAATCAACATTGATGCCCGCTTCTTTTCATCGCGTCTGCCTGCGGAA	300
STEC 2745	241	CGAATTCAGAACGTAATCAACATTGATGCCCGCTTCTTTTCATCGCGTCTGCCTGCGGAA	300
STEC 2753	301	TGGTACGCGGAAGCCGTCCAACAGGAAACCATTACGGCAGTCTTCCTGAGCAATGCGCT	360
STEC 2745	301	TGGTACGCGGAAGCCGTCCAACAGGAAACCATTACGGCAGTCTTCCTGAGCAATGCGCT	360
STEC 2753	361	CTTTAACAGCGCGATCACCAGTTCGTTCGGTGACCAGTTTCCAGCATCCATAATGTCTT	420
STEC 2745	361	CTTTAACAGCGCGATCACCAGTTCGTTCGGTGACCAGTTTCCAGCATCCATAATGTCTT	420
STEC 2753	421	TTGCTTGTTTACCAGCTCGGAGCCAGATTTGACCGCAGCAGCAGCATATCGCCAGTGG	480
STEC 2745	421	TTGCTTGTTTACCAGCTCGGAGCCAGATTTGACCGCAGCAGCAGCATATCGCCAGTGG	480
STEC 2753	481	AGATTTGCGGAATACCATATTTCTCCATGATGAACTGAGCCTGAGTTCCTTTCCCC	536
STEC 2745	481	AGATTTGCGGAATACCATATTTCTCCATGATGAACTGAGCCTGAGTCCCTTTCCCC	536

Rysunek Nr 7. Porównanie wyników sekwencjonowania fragmentu genu *adk* (typ 429) dla izolatu STEC 2753 z typem allelu nr 6 otrzymanym dla izolatu STEC 2745 (kolorem czerwonym zaznaczono obecność tranzycji C>T w pozycji 527) (wygenerowane programem Nucleotide Blast).

8.1.7. Porównanie nowej metodyki TRS-PCR z metodą MLST

W celu porównania skuteczności obu metod, zebrane wyniki różnicowania molekularnego wybranych szczepów z wykorzystaniem analiz: MLST i numerycznej klasyfikacji TRS-PCR, przedstawiono w Tabeli Nr 16.

Szczepy UPEC: U108 i U021, sklasyfikowane jako ten sam typ sekwencyjny ST95, zostały przyporządkowane do różnych grup TRS-PCR. W przypadku pozostałych badanych szczepów UPEC, obie metody MLST, jak i TRS-PCR pozwoliły na rozróżnienie szczepów w podobnym stopniu. Dla pozostałych analizowanych szczepów UPEC: U 124, U 101, U 114 oraz U 097, zidentyfikowano różne typy sekwencyjne (odpowiednio: ST131, ST1758, ST73, ST127). Szczepy te zostały również przypisane do różnych grup TRS-PCR (Tabela Nr 16).

W przypadku szczepów STEC: 2735, 2745 i 2753 (zaznaczonych w Tabeli Nr 16 w czerwonej ramce), należących do tej samej grupy TRS-PCR, uzyskano różne typy sekwencyjne. Dla szczepów STEC 2745 i 2753, zidentyfikowano nieznane typy sekwencyjne ST, różniące się obecnością substytucji nukleotydów w analizowanych fragmentach genów, odpowiednio *mdh* i *adk*, w porównaniu do typu ST20 otrzymanego dla pozostałych analizowanych szczepów STEC. Szczepy STEC: 2743 i 2751, posiadające ten sam typ sekwencyjny ST 20 oraz należące do tych samych grup TRS-PCR, zostały sklasyfikowane jako identyczne z wykorzystaniem obu metod różnicowania (zaznaczone w Tabeli Nr 16 w niebieskiej ramce). W przypadku pozostałych analizowanych szczepów STEC: 4820, 2757 i 2749, posiadających identyczny typ sekwencyjny ST20, metoda numeryczna TRS-PCR pozwoliła na rozróżnienie ww. izolatów.

Tabela Nr 16. Porównanie wyników typowania molekularnego MLST z grupami TRS-PCR, dla wybranych izolatów UPEC i STEC (ST- typ sekwencyjny, nieznany typ ST – brak informacji w bazie danych).

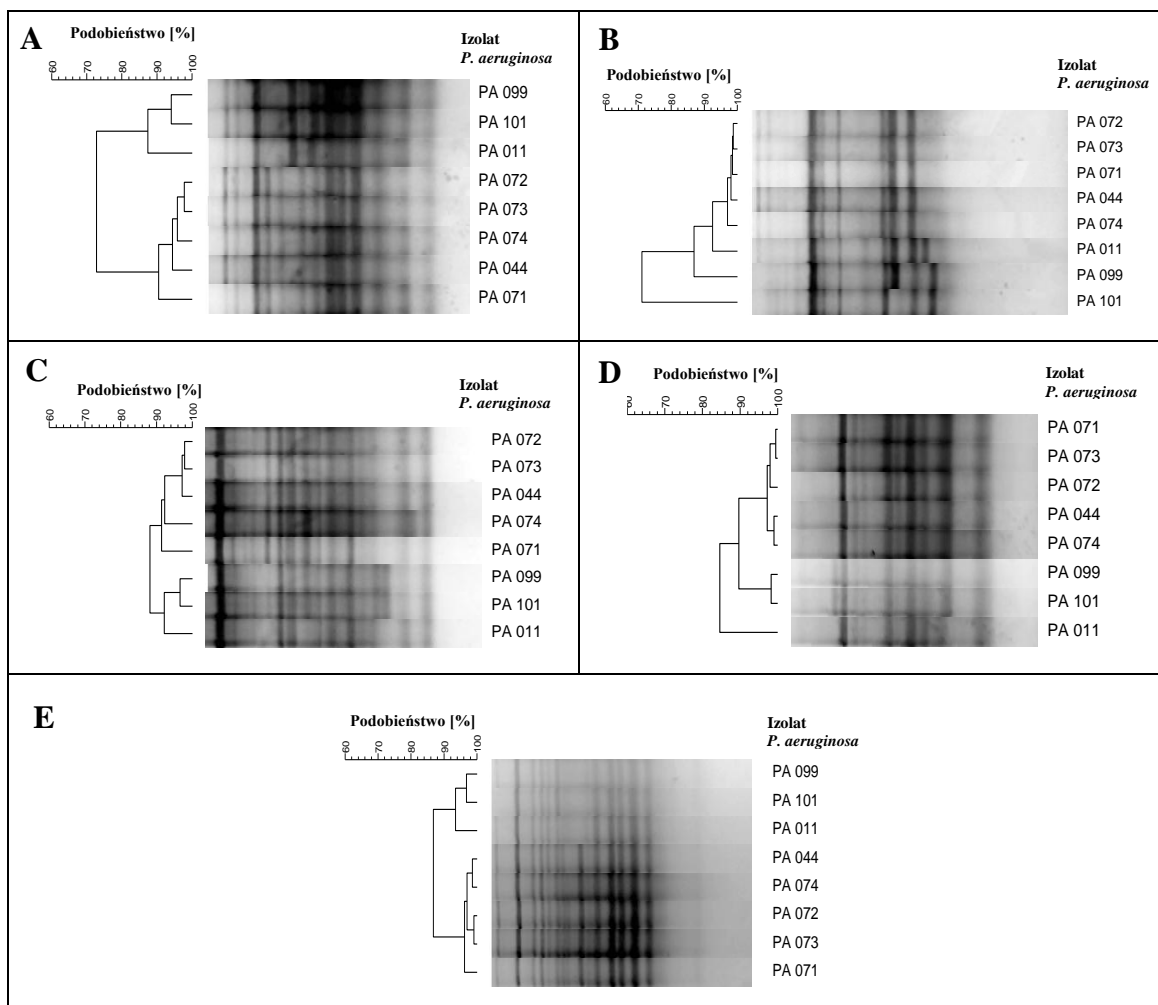
Szczep <i>E. coli</i>	Klasa TRS-PCR			Grupa TRS-PCR	Typ ST
	CAC-PCR	GTG-PCR	CGG-PCR		
U 108	32	77	18	53	95
U 021	36	77	17	88	95
U 124	36	37	16	76	131
U 101	37	84	57	97	1758
U 114	28	81	58	43	73
U 097	40	26	57	102	127
N LEEpos.-STEC 4820	53	87	100	122	20
N LEEpos.-STEC 2757	53	88	101	123	20
N LEEpos.-STEC 2743	54	87	101	124	20
N LEEpos.-STEC 2751	54	87	101	124	20
N LEEpos.-STEC 2749	56	87	101	126	20
N LEEpos.-STEC 2735	55	87	101	125	20
N LEEpos.-STEC 2745	55	87	101	125	Nieznany ST
N LEEpos.-STEC 2753	55	87	101	125	Nieznany ST

8.2. *Pseudomonas aeruginosa*

8.2.1. Opracowanie testów TRS-PCR do różnicowania kolekcji *P. aeruginosa*

Badania dotyczące molekularnego różnicowania klinicznej kolekcji szczepów *Pseudomonas aeruginosa* metodą TRS-PCR rozpoczęto od wyznaczenia najbardziej różnicującego testu. Przeprowadzono wstępną analizę z wykorzystaniem pięciu starterów TRS-PCR, wytypowanych na podstawie analizy *in silico* genomu referencyjnego szczepu *P. aeruginosa* PAO1 (punkt 7.9., sekcja Metody). Biorąc pod uwagę zawartość par GC w genomie i ze względu na związaną z tym wyższą powtarzalność analiz TRS-PCR, następujące startery: N₆(CGG)₄, N₆(GTC)₄, N₆(CAC)₄, N₆(CCG)₄, N₆(GAC)₄, zostały wytypowane jako najbardziej odpowiednie do opracowania testów TRS-PCR dla tego patogenu. Reakcje TRS-PCR, rozdział elektroforetyczny otrzymanych produktów PCR, oraz analizę porównania profili prążkowych przeprowadzono dla wybranych ośmiu izolatów *P. aeruginosa*, zgodnie z opisem, odpowiednio w punkcie 7.3., 7.6., 7.7. i 7.9. (sekcja Metody).

Na podstawie wyników różnicowania wybranych metod TRS-PCR przedstawionych na Rysunku Nr 8, wytypowano testy wykorzystujące startery N₆(CGG)₄ i N₆(GTC)₄, jako te najbardziej różnicujące.



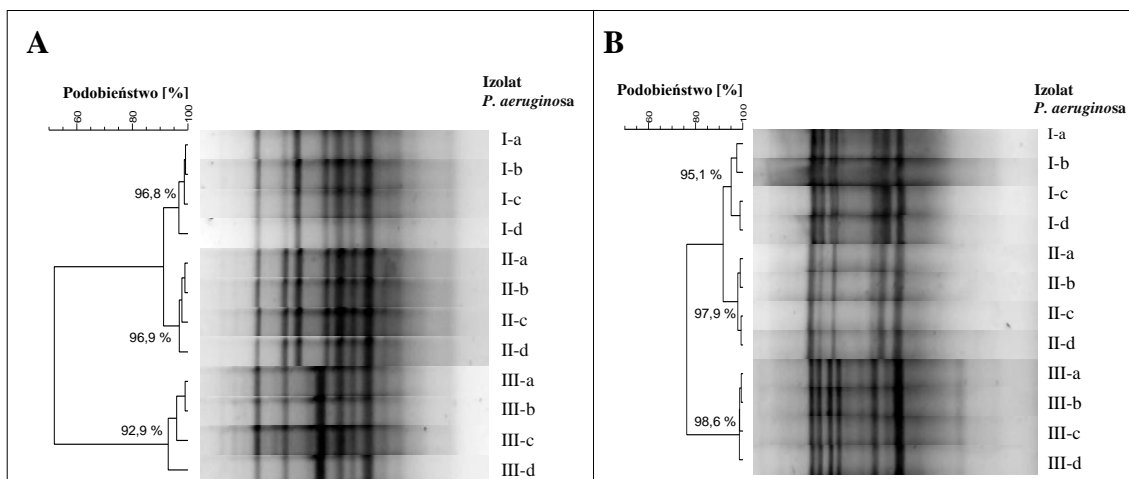
Rysunek Nr 8. Analiza wstępna podobieństwa profili prążkowych metodą TRS-PCR dla wybranych 8 izolatów *P. aeruginosa*, z wykorzystaniem pięciu starterów: A) $N_6(CGG)_4$, B) $N_6(GTC)_4$, C) $N_6(CAC)_4$, D) $N_6(CCG)_4$, E) $N_6(GAC)_4$.

8.2.2. Określenie powtarzalności analiz (R) dla testu CGG-PCR i GTC-PCR badanych kolekcji szczepów *P. aeruginosa*

W celu określenia powtarzalności metod TRS-PCR wytypowanych do różnicowania szczepów *P. aeruginosa* (punkt 6.1.2., sekcja Materiały), przeprowadzono reakcje z wykorzystaniem starterów $N_6(CGG)_4$ i $N_6(GTC)_4$, dla trzech wybranych szczepów w czterech powtórzeniach każdy, zgodnie z opisem w punkcie 7.3. (sekcja Metody). Analizę elektroforetyczną produktów PCR przeprowadzono zgodnie z punktem 7.6. (sekcja Metody). Analizę podobieństwa profili prążkowych przeprowadzono zgodnie z punktem 7.7. (sekcja Metody). Powtarzalność analiz CGG-PCR i GTC-PCR obliczono zgodnie z metodą opisaną w punkcie 7.7.1. (sekcja Metody). Na Rysunku Nr 9 przedstawiono analizę porównawczą podobieństwa wzorów prążkowych

otrzymanych dla metod CGG-PCR oraz GTC-PCR wraz z wartością procentową podobieństwa dla każdego badanego izolatu bakteryjnego.

W przypadku metody CGG-PCR powtarzalność wyniosła 93,3 %, natomiast dla metody GTC-PCR – 95,3 %.



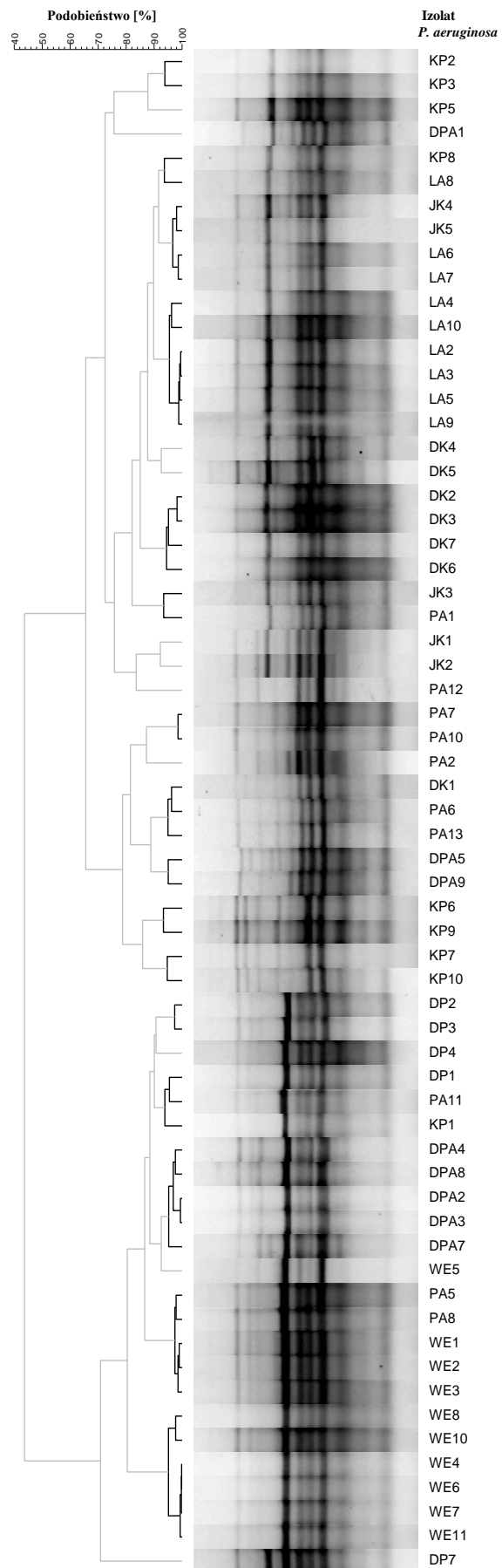
Rysunek Nr 9. Analiza podobieństwa profili prążkowych, przeprowadzona dla analiz CGG-PCR i GTC-PCR, dla trzech różnych izolatów *P. aeruginosa*, w czterech powtórzeniach; (A-CGG-PCR; B-GTC-PCR).

8.2.3. Różnicowanie szczepów *P. aeruginosa* z wykorzystaniem analizy CGG-PCR

W celu przeprowadzenia analizy CGG-PCR, izolację genomowego DNA z płynnych hodowli bakteryjnych, reakcję CGG-PCR, rozdział elektroforetyczny produktów PCR wykonano odpowiednio zgodnie z punktem 7.2., 7.3. oraz 7.6. (sekcja Metody).

W wyniku przeprowadzonych reakcji TRS-PCR z wykorzystaniem startera $N_6(CGG)_4$, dla wszystkich 63 szczepów z kolekcji *P. aeruginosa* (rozdział 6.1.2. – sekcja Materiały), otrzymano profile prążkowe, na podstawie których sporządzono dendrogram pokazujący procent podobieństwa poszczególnych izolatów, zgodnie z opisem metody w sekcji 7.7. (Rysunek Nr 10), z uwzględnieniem wartości powtarzalności wynoszącej 93,3%. Pogrubione linie na dendrogramie łączą szczepy uznane za identyczne.

Analiza CGG-PCR pozwoliła na wyznaczenie 27 unikalnych klastrow dla 63 izolatów *P. aeruginosa*. Obliczony, zgodnie z opisem metody w punkcie 7.11. (sekcja Metody), współczynnik różnicowania DI dla tej analizy wyniósł 0,9611.



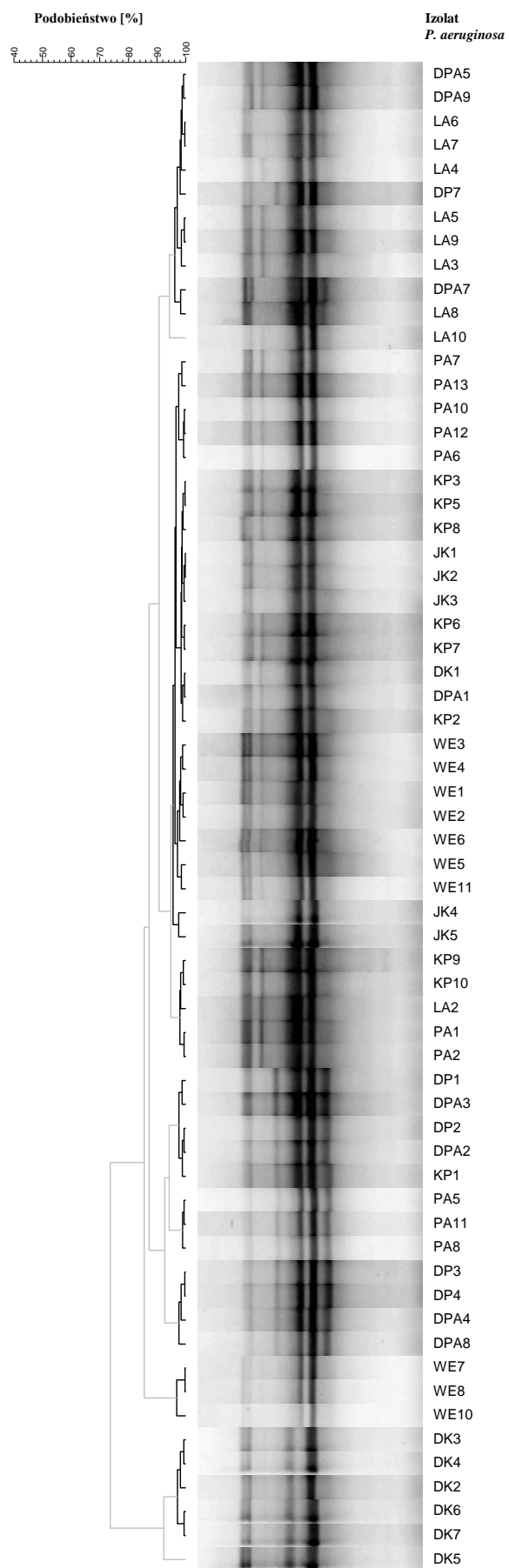
Rysunek Nr 10. Analiza podobieństwa profili prążkowych dla 63 izolatów *P. aeruginosa*, z wykorzystaniem metody CGG-PCR.

8.2.4. Różnicowanie szczepów *P. aeruginosa* z wykorzystaniem analizy GTC-PCR

W celu przeprowadzenia analizy GTC-PCR, izolację genomowego DNA z płynnych hodowli bakteryjnych, reakcję GTC-PCR, rozdział elektroforetyczny produktów PCR, wykonano odpowiednio zgodnie z punktem 7.2., 7.3. oraz 7.6. (sekcja Metody).

W wyniku przeprowadzonych reakcji TRS-PCR z wykorzystaniem startera $N_6(GTC)_4$, otrzymano profile prążkowe dla wszystkich 63 szczepów z kolekcji *P. aeruginosa* (rozdział 6.1.2. – sekcja Materiały), na podstawie których sporządzono dendrogram pokazujący procent podobieństwa poszczególnych izolatów, zgodnie z opisem metody w sekcji 7.7. (Rysunek Nr 11), z uwzględnieniem wartości powtarzalności wynoszącej 95,3%. Pogrubione linie na dendrogramie łączą szczepy uznane za identyczne.

Analiza GTC-PCR pozwoliła na wyznaczenie 10 unikalnych klastrów dla 63 izolatów *P. aeruginosa*. Obliczony, zgodnie z opisem metody w punkcie 7.11. (sekcja Metody), współczynnik różnicowania DI dla tej analizy wyniósł 0,7967.

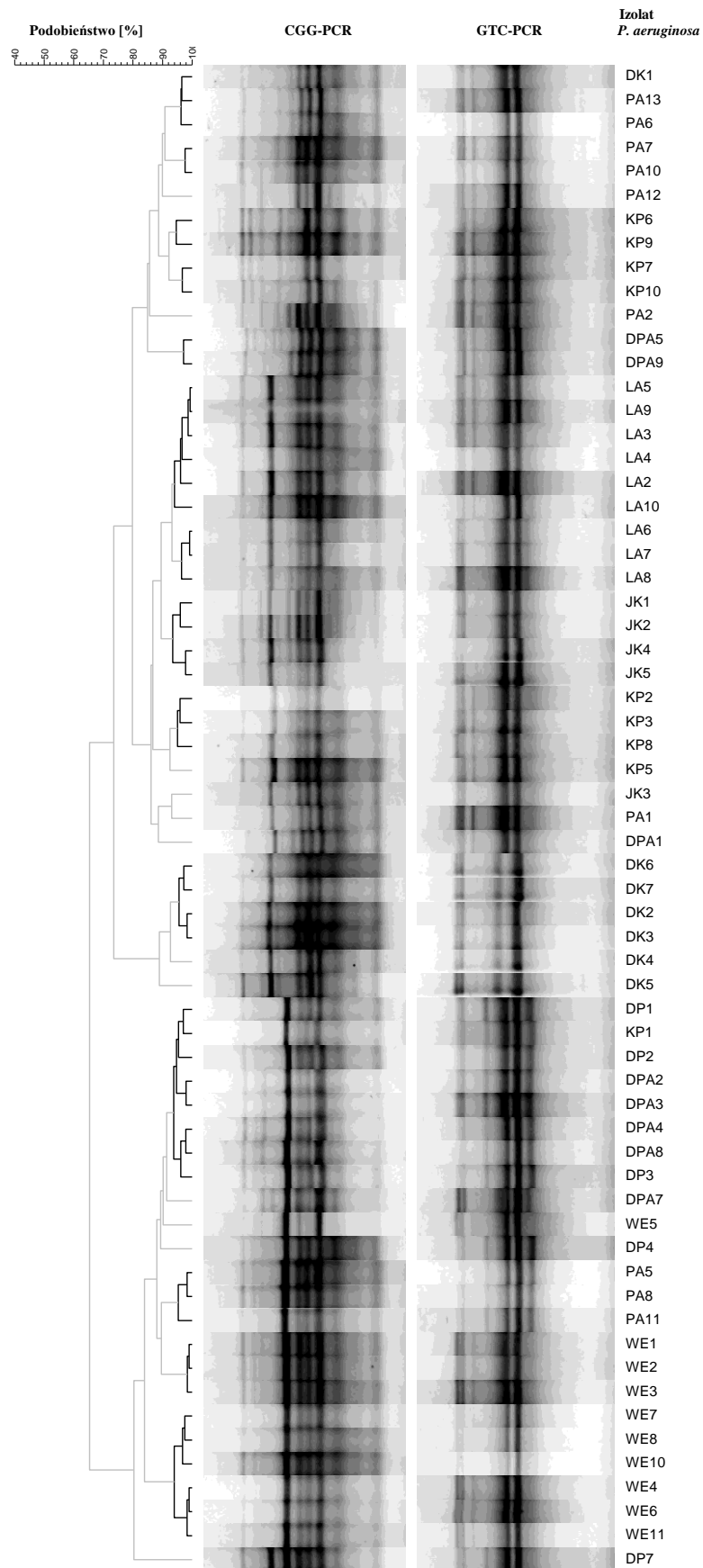


Rysunek Nr 11. Analiza podobieństwa profili prążkowych dla 63 izolatów *P. aeruginosa*, z wykorzystaniem metody GTC-PCR.

8.2.5. Różnicowanie szczepów *P. aeruginosa* z wykorzystaniem uśrednionej analizy opartej na reakcjach CGG-PCR i GTC-PCR.

Na podstawie pojedynczych analiz CGG-PCR i GTC-PCR wykonano uśrednioną analizę podobieństwa otrzymanych profili prążkowych dla obu testów TRS-PCR. Dendrogram został sporządzony zgodnie z opisem metody w punkcie 7.7. (sekcja Metody). W przypadku analizy uśrednionej dla CGG-PCR i GTC-PCR, za wartość powtarzalności przyjęto najniższą wartość wyznaczoną dla pojedynczych testów, wynoszącą 93,3 %. Pogrubione linie na dendrogramie łączą szczepy uznane za identyczne.

Na podstawie takiej analizy, 63 izolaty *P. aeruginosa* pogrupowano w 26 klastrow (Rysunek Nr 12). Obliczony, zgodnie z opisem metody w punkcie 7.11. (sekcja Metody), współczynnik różnicowania DI dla tej analizy wyniósł 0,9544.



Rysunek Nr 12. Usredniona analiza podobienstwa profili prążkowych dla 63 izolatów *P. aeruginosa*, z wykorzystaniem metody CGG-PCR i GTC-PCR.

8.2.6. Przypisanie klas TRS-PCR dla szczepów *P. aeruginosa*

Na podstawie przeprowadzonych analiz podobieństwa poszczególnych profili prążkowych CGG-PCR oraz GTC-PCR, każdemu szczepowi *P. aeruginosa* zostały przypisane wartości liczbowe - odpowiadające numerowi danej klasy TRS, zgodnie z opisem w punkcie 7.8. (sekcja Metody). Szczepy *P. aeruginosa* posiadające identyczny profil poszczególnych klas TRS-PCR, zostały przyporządkowane do jednej grupy TRS-PCR (Tabela Nr 17).

Na podstawie analizy numerycznej, spośród 63 izolatów *P. aeruginosa* otrzymano 40 unikalnych grup TRS-PCR, różniących się co najmniej w jednej klasie TRS-PCR. Obliczony, zgodnie z opisem metody w punkcie 7.11. (sekcja Metody), współczynnik różnicowania DI dla tej analizy wyniósł 0,9831. Izolaty *P. aeruginosa* posiadające identyczne klasy TRS-PCR, zostały przyporządkowane do tych samych grup TRS-PCR (zaznaczone w Tabeli Nr 17 w czerwonej ramce).

Spośród siedmiu izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta DK wyodrębniono cztery grupy TRS-PCR: 11, 12, 13 i 21. Do grupy TRS-PCR nr 13 przyporządkowano izolaty DK02, DK03, DK06 i DK07.

Pięć izolatów *P. aeruginosa* pobranych od pacjenta DP zostało przyporządkowanych do 5 grup TRS-PCR: 27, 28, 29, 30, 40.

Osiem izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta DPA zostało przyporządkowanych do następujących grup TRS-PCR: 3, 22, 32, 33, 34. Izolaty DPA05 i DPA09, DPA02 i DPA03 oraz DPA04 i DPA08 zostały przyporządkowane do tych samych grup TRS-PCR, odpowiednio nr 22, 33 i 34.

Pięć izolatów *P. aeruginosa* pobranych od pacjenta JK zostało przyporządkowanych do czterech grup TRS-PCR: 7, 14, 16 i 17. Do grupy TRS-PCR nr 7 zostały przypisane izolaty JK04 i JK05.

Dla dziewięciu izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta KP przyporządkowano następujące grupy TRS-PCR: 1, 2, 5, 23, 24, 25, 26, 30. Izolaty KP02 i KP03 zostały przyporządkowane do tej samej grupy TRS-PCR nr 1.

Dla dziewięciu izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta LA, przyporządkowano następujące grupy TRS-PCR: 4, 6, 8, 9, 10. Izolaty LA06 i LA07 zostały przyporządkowane do grupy TRS-PCR nr 6, natomiast izolaty LA03, LA04, LA05 i LA09 zostały przyporządkowane do grupy TRS-PCR nr 8.

Dziesięć izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta PA zostało przyporządkowanych do następujących grup TRS-PCR: 15, 18, 19, 20, 21, 31, 37. Izolaty PA07 i PA10, oraz PA06 i PA13, a także PA05 i PA08 zostały przyporządkowane do tych samych grup TRS-PCR, odpowiednio nr 19, 20 i 37.

Dla dziesięciu izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta WE, przyporządkowano następujące grupy TRS-PCR: 35, 36, 38, 39. Izolaty WE01, WE02 i WE03 przyporządkowano do tej samej grupy TRS-PCR nr 36, izolaty WE04, WE06, i WE11 przyporządkowano do tej samej grupy TRS-PCR nr 38, natomiast izolaty WE07, WE08, i WE10 przyporządkowano do tego samej grupy TRS-PCR nr 39.

Izolaty *P. aeruginosa*, które należą do tych samych grup TRS-PCR, mogą pochodzić od różnych pacjentów. Do grupy TRS-PCR nr 21 należą izolaty pobrane od pacjenta DK (DK01) i pacjenta PA (PA06 i PA13). W przypadku grupy TRS-PCR nr 30 izolaty były pobrane od pacjentów DP (DP01) i KP (KP01).

Tabela Nr 17. Wartości klas CGG- i GTC-PCR oraz wyznaczonych na tej podstawie grup TRS-PCR dla szczepów *P. aeruginosa* (w czerwonej ramce zaznaczono izolaty *P. aeruginosa* należące do tych samych grup TRS-PCR).

Izolat <i>P. aeruginosa</i>	Klasa TRS-PCR		Grupa TRS-PCR
	CGG-PCR	GTC-PCR	
KP02	1	3	1
KP03	1	3	1
KP05	2	3	2
DPA01	3	3	3
LA08	4	1	4
KP08	4	3	5
LA06	5	1	6
LA07	5	1	6
JK04	5	3	7
JK05	5	3	7
LA03	6	1	8
LA04	6	1	8
LA05	6	1	8
LA09	6	1	8
LA10	6	2	9
LA02	6	4	10
DK04	7	9	11
DK05	8	10	12
DK02	9	9	13
DK03	9	9	13
DK06	9	9	13
DK07	9	9	13

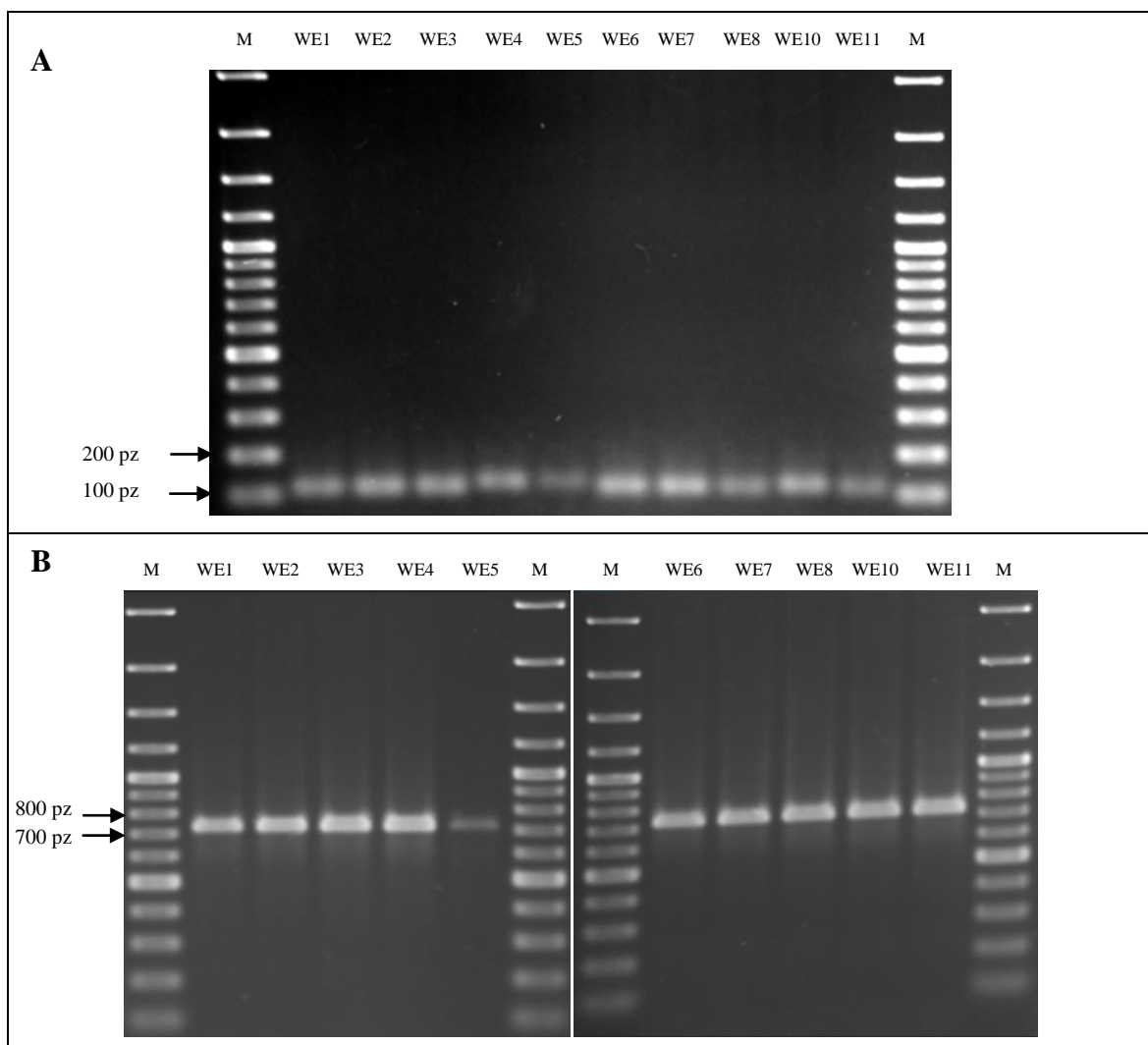
Tabela Nr 17. cd. Wartości klas CGG- i GTC-PCR oraz wyznaczonych na tej podstawie grup TRS-PCR dla szczepów *P. aeruginosa* (w czerwonej ramce zaznaczono izolaty *P. aeruginosa* należące do tych samych grup TRS-PCR).

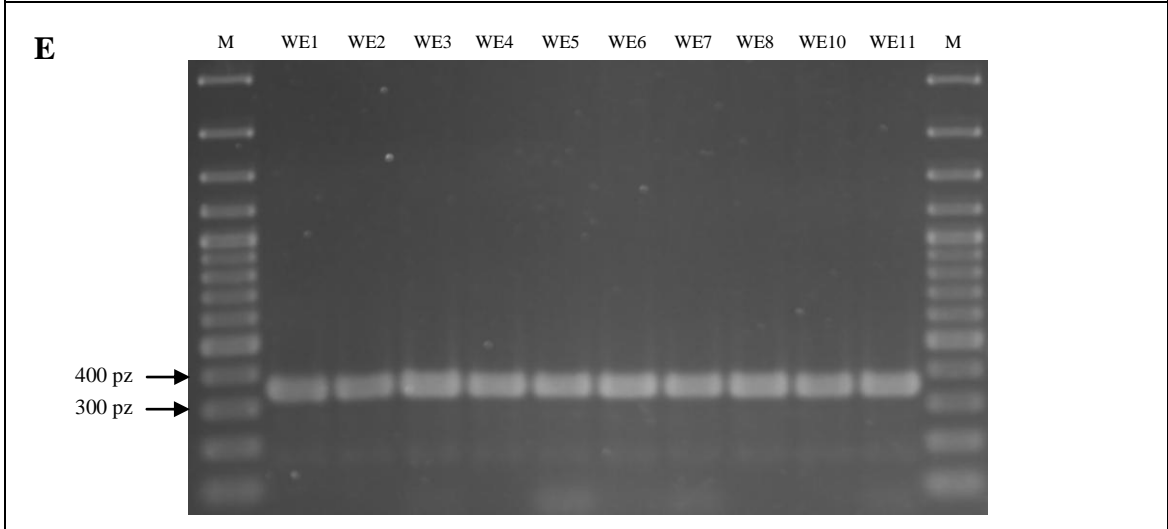
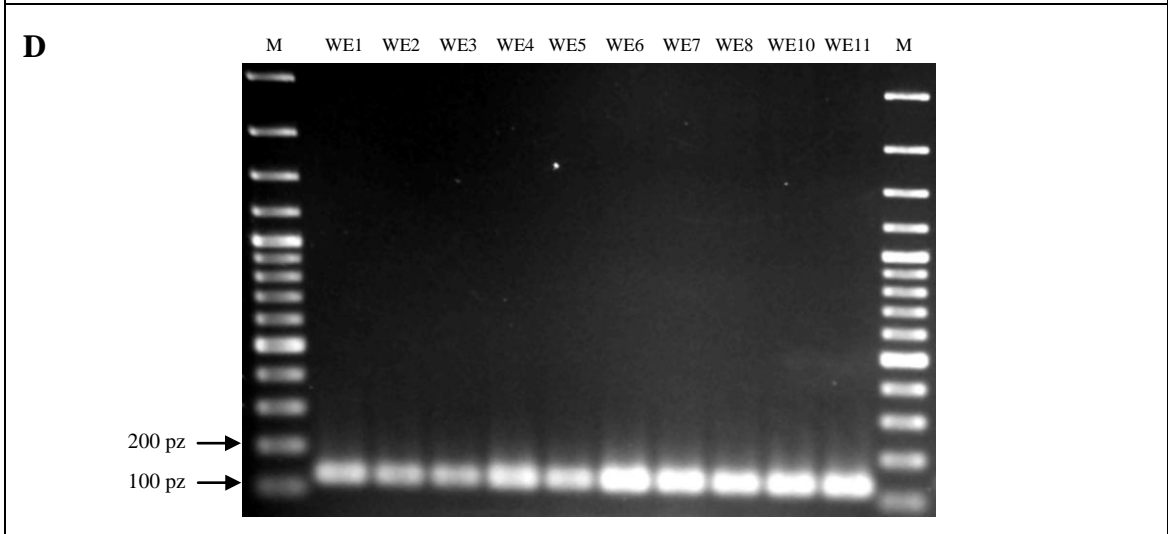
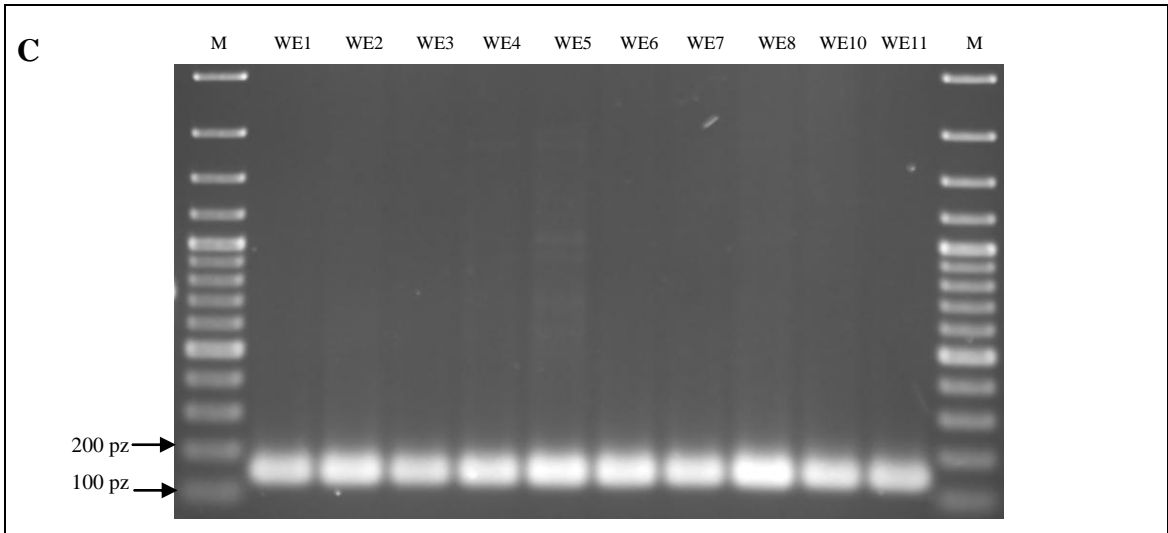
Izolaty <i>P. aeruginosa</i>	Klasa TRS-PCR		Grupa TRS-PCR
	CGG-PCR	GTC-PCR	
JK03	10	3	14
PA01	10	4	15
JK01	11	3	16
JK02	12	3	17
PA12	13	3	18
PA07	14	3	19
PA10	14	3	19
PA02	15	4	20
DK01	16	3	21
PA06	16	3	21
PA13	16	3	21
DPA05	17	1	22
DPA09	17	1	22
KP06	18	3	23
KP09	18	4	24
KP07	19	3	25
KP10	19	4	26
DP02	20	5	27
DP03	20	7	28
DP04	21	7	29
DP01	22	5	30
KP01	22	5	30
PA11	22	6	31
DPA07	23	1	32
DPA02	23	5	33
DPA03	23	5	33
DPA04	23	7	34
DPA08	23	7	34
WE05	24	3	35
WE01	25	3	36
WE02	25	3	36
WE03	25	3	36
PA05	25	6	37
PA08	25	6	37
WE04	26	3	38
WE06	26	3	38
WE11	26	3	38
WE07	26	8	39
WE08	26	8	39
WE10	26	8	39
DP07	27	1	40

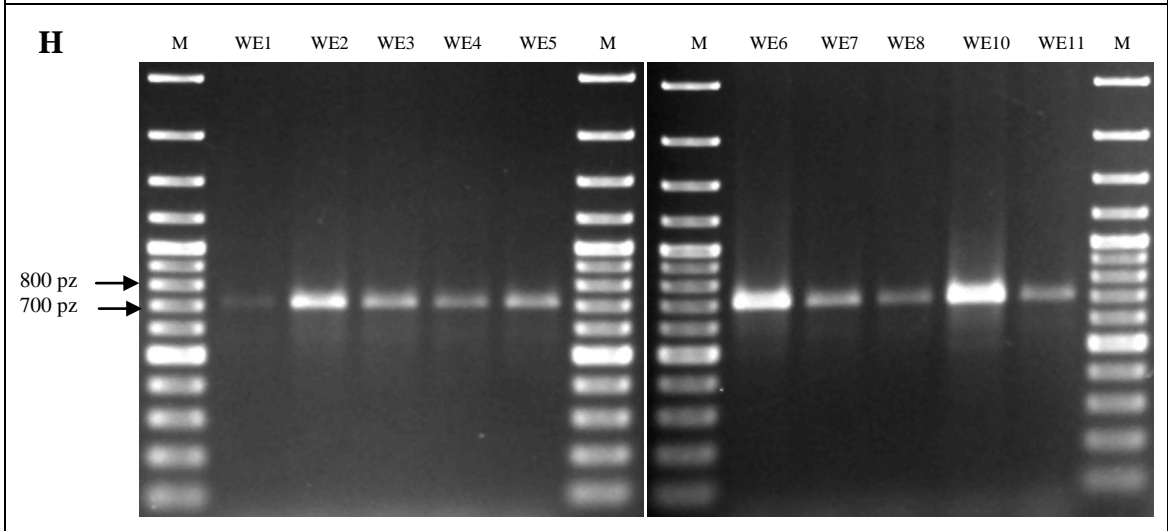
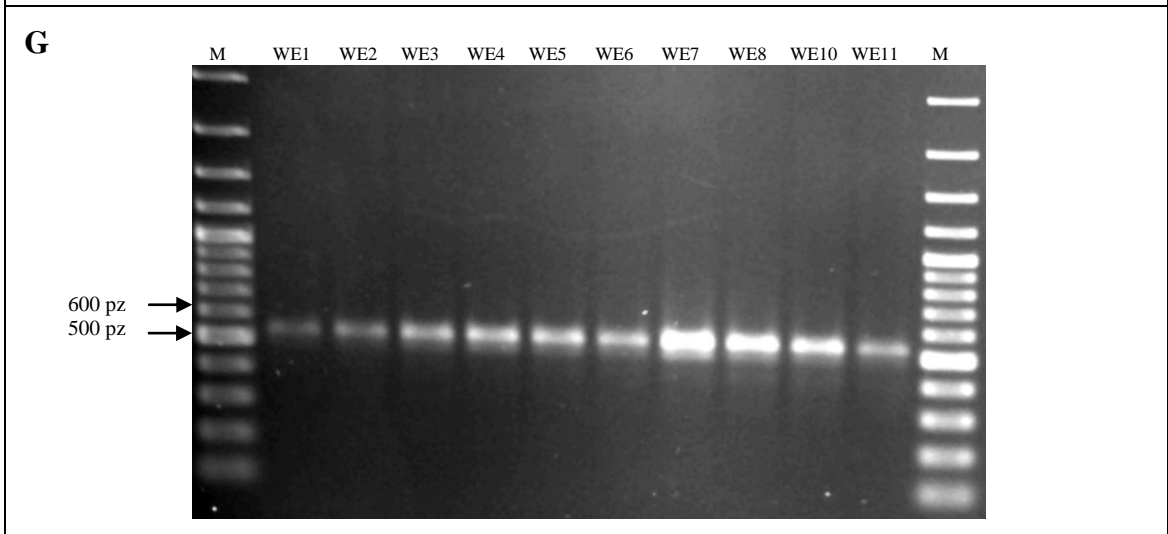
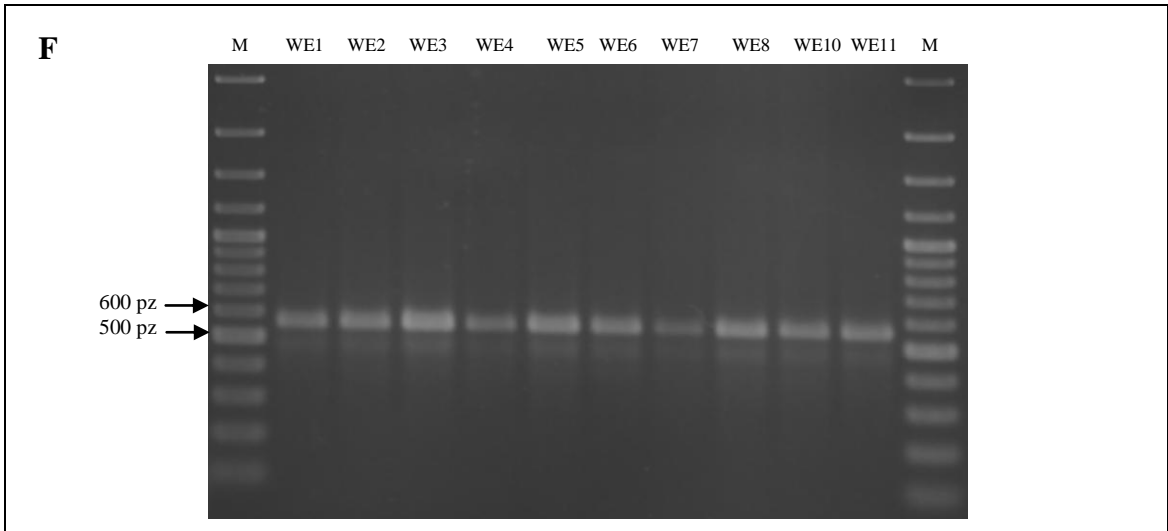
8.2.7. Analiza MLVA izolatów *P. aeruginosa*

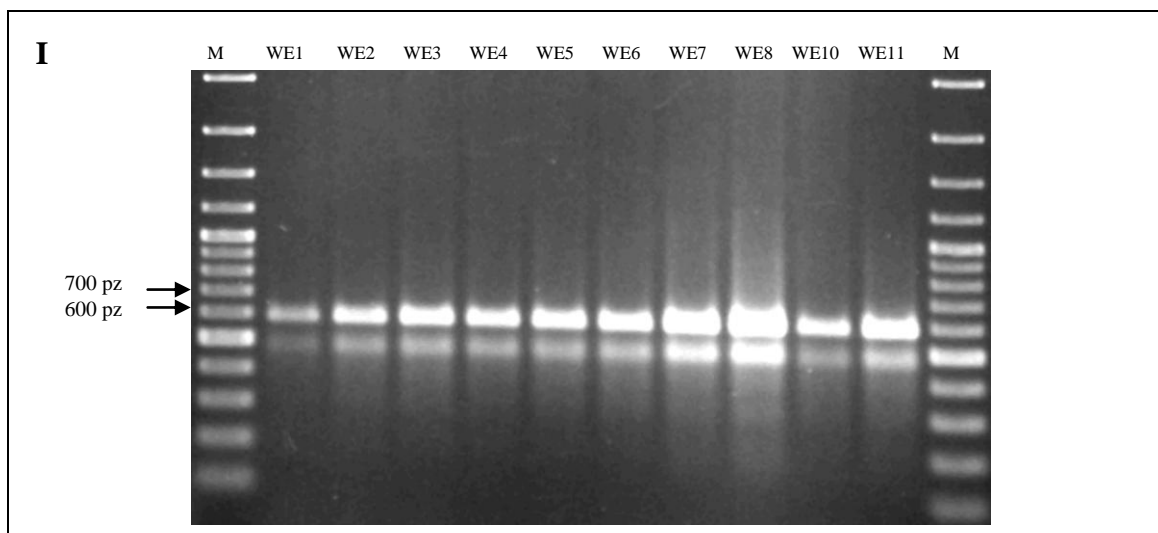
W ostatnim etapie pracy doktorskiej postanowiono porównać zastosowaną metodę numeryczną TRS-PCR z powszechnie stosowaną do analiz molekularnych *Pseudomonas aeruginosa* metodą MLVA. W tym celu przeprowadzono analizę MLVA dla całej kolekcji 63 patogennych szczepów *P. aeruginosa* (punkt 6.1.2., sekcja Materiały). Analizę MLVA przeprowadzono zgodnie z opisem zawartym w punkcie 7.5. (sekcja Metody). Rozdział elektroforetyczny produktów PCR przeprowadzono zgodnie z punktem 7.6. (sekcja Metody). Zdjęcia żeli agarozowych po rozdziale elektroforetycznym poszczególnych amplikonów VNTR dla izolatów *P. aeruginosa* pobranych od pacjenta oznaczonego symbolem WE, przedstawiono na Rysunku Nr 13.

Zdjęcia analiz MLVA dla pozostałych pacjentów zostały przedstawione w Załączniku na końcu pracy.









Rysunek Nr 13. Zdjęcia rozdziałów elektroforetycznych otrzymanych dla produktów PCR po analizie MLVA dla izolatów *P. aeruginosa* pozyskanych od pacjenta oznaczonego symbolem WE dla poszczególnych VNTR: A - ms061; B - ms172; C - ms207; D - ms209; E - ms211; F - ms213; G - ms214; H - ms217; I - ms222 (M – marker 100bp Plus, pz – par zasad).

Szczepy *P. aeruginosa* posiadające identyczny profil markerów VNTR, zostały przyporządkowane do jednej grupy MLVA. Na podstawie analizy MLVA, spośród 63 izolatów *P. aeruginosa* otrzymano 26 unikalnych grup MLVA (zaznaczone w Tabeli Nr 18 w czerwonej ramce). Obliczony, zgodnie z opisem metody w punkcie 7.11. (sekcja Metody), współczynnik różnicowania DI dla tej analizy wyniósł 0,9478.

Spośród siedmiu izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta DK wyodrębniono cztery grupy MLVA: 5, 6, 7, 16. Do grupy MLVA nr 5 przyporządkowano izolaty: DK04, DK05 i DK06, natomiast do grupy MLVA nr 7 przyporządkowano izolaty: DK02 i DK03.

Pięć izolatów *P. aeruginosa* pobranych od pacjenta DP zostało przyporządkowanych do 2 grup MLVA: 9 i 23. Do grupy nr 9 przyporządkowano następujące izolaty: DP01, DP02, DP03, DP04.

Osiem izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta DPA zostało przyporządkowanych do następujących grup MLVA: 18, 19, 20, 21, 22. Izolaty DPA02, DPA03, DPA04 i DPA08 zostały przyporządkowane do tej samej grupy MLVA nr 18.

Pięć izolatów *P. aeruginosa* pobranych od pacjenta JK zostało przyporządkowanych do tej samej grupy MLVA nr 8.

Dla dziewięciu izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta KP przyporządkowano następujące grupy MLVA: 10, 11, 17, 24. Izolaty KP06, KP09,

KP10 zostały przyporządkowane do tej samej grupy MLVA nr 11, natomiast izolaty KP02, KP03, KP05, KP08 zostały przyporządkowane do tej samej grupy MLVA nr 24.

Dla dziewięciu izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta LA, przyporządkowano następujące grupy MLVA: 1, 4, 14, 15, 26. Izolaty LA06, LA07 i LA08 zostały przyporządkowane do grupy MLVA nr 4, natomiast izolaty LA02, LA03 i LA04 zostały przyporządkowane do grupy MLVA nr 14.

Dziesięć izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta PA zostało przyporządkowanych do następujących grup MLVA: 2, 12, 13 i 25. Izolaty PA05 i PA8 zostały przyporządkowane do tej samej grup MLVA nr 12, natomiast izolaty: PA02, PA06, PA07, PA10, PA12, PA13 – do grupy MLVA nr 13.

Dla dziesięciu izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta WE przyporządkowano grupę MLVA nr 3.

Izolaty *P. aeruginosa*, które należą do tych samych grup MLVA pochodzą od tych samych pacjentów.

Tabela Nr 18. Wyniki genotypowania metodą MLVA dla 63 badanych izolatów *P. aeruginosa*, w czerwonej ramce zaznaczono izolaty *P. aeruginosa* należące do tych samych grup MLVA.

Izolat <i>P. aeruginosa</i>	Marker VNTR									Grupa MLVA
	ms061	ms172	ms207	ms209	ms211	ms213	ms214	ms217	ms222	
LA10	0	5	3	1	2	4	1	4	3	1
PA11	0	6	11	2	5	13	24	3	3	2
WE01	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3
WE02	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3
WE03	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3
WE04	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3
WE05	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3
WE06	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3
WE07	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3
WE08	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3
WE10	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3
WE11	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3
LA06	10	3	3	1	2	3	4	2	3	4
LA07	10	3	3	1	2	3	4	2	3	4
LA08	10	3	3	1	2	3	4	2	3	4
DK04	10	5	11	3	3	1	1	4	2	5
DK05	10	5	11	3	3	1	1	4	2	5
DK06	10	5	11	3	3	1	1	4	2	5
DK07	10	5	14	3	3	1	1	4	2	6

Tabela Nr 18. cd. Wyniki genotypowania metodą MLVA dla 63 badanych izolatów *P. aeruginosa*, w czerwonej ramce zaznaczono izolaty *P. aeruginosa* należące do tych samych grup MLVA.

Izolat <i>P. aeruginosa</i>	Marker VNTR									Grupa MLVA
	ms061	ms172	ms207	ms209	ms211	ms213	ms214	ms217	ms222	
DK02	10	5	17	3	3	1	1	4	2	7
DK03	10	5	17	3	3	1	1	4	2	7
JK01	10	6	1	3	1	5	5	2	4	8
JK02	10	6	1	3	1	5	5	2	4	8
JK03	10	6	1	3	1	5	5	2	4	8
JK04	10	6	1	3	1	5	5	2	4	8
JK05	10	6	1	3	1	5	5	2	4	8
DP01	10	6	2	1	5	13	24	3	3	9
DP02	10	6	2	1	5	13	24	3	3	9
DP03	10	6	2	1	5	13	24	3	3	9
DP04	10	6	2	1	5	13	24	3	3	9
KP07	10	6	3	1	2	4	4	3	0	10
KP06	10	6	3	1	2	4	4	3	4	11
KP09	10	6	3	1	2	4	4	3	4	11
KP10	10	6	3	1	2	4	4	3	4	11
PA05	10	6	11	2	5	13	24	3	3	12
PA08	10	6	11	2	5	13	24	3	3	12
PA02	10	7	14	1	4	4	4	1	1	13
PA06	10	7	14	1	4	4	4	1	1	13
PA07	10	7	14	1	4	4	4	1	1	13
PA10	10	7	14	1	4	4	4	1	1	13
PA12	10	7	14	1	4	4	4	1	1	13
PA13	10	7	14	1	4	4	4	1	1	13
LA02	10	8	3	1	6	3	4	2	1	14
LA03	10	8	3	1	6	3	4	2	1	14
LA04	10	8	3	1	6	3	4	2	1	14
LA05	10	8	3	1	24	3	4	2	1	15
DK01	11	6	1	1	2	5	4	3	4	16
KP01	11	6	5	1	5	9	20	3	3	17
DPA02	11	7	8	2	5	9	16	3	3	18
DPA03	11	7	8	2	5	9	16	3	3	18
DPA04	11	7	8	2	5	9	16	3	3	18
DPA08	11	7	8	2	5	9	16	3	3	18
DPA05	11	8	2	2	3	5	4	3	4	19
DPA09	11	8	2	2	7	1	1	4	3	20
DPA01	11	8	12	2	4	3	4	1	1	21
DPA07	11	9	8	2	3	6	3	5	1	22
DP07	12	7	1	3	6	4	4	3	3	23

Tabela Nr 18. cd. Wyniki genotypowania metodą MLVA dla 63 badanych izolatów *P. aeruginosa*, w czerwonej ramce zaznaczono izolaty *P. aeruginosa* należące do tych samych grup MLVA.

Izolat <i>P. aeruginosa</i>	Marker VNTR									Grupa MLVA
	ms061	ms172	ms207	ms209	ms211	ms213	ms214	ms217	ms222	
KP02	12	7	5	2	24	3	4	2	1	24
KP03	12	7	5	2	24	3	4	2	1	24
KP05	12	7	5	2	24	3	4	2	1	24
KP08	12	7	5	2	24	3	4	2	1	24
PA01	12	7	11	2	24	4	4	2	1	25
LA09	15	8	3	1	24	3	4	2	1	26

8.2.8. Porównanie metod typowania MLVA i TRS-PCR

Porównanie wyników genotypowania MLVA i TRS-PCR dla 63 izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od ośmiu pacjentów z mukowiscydozą, przedstawiono w Tabeli Nr 19 (kompilacja Tabel Nr 17 i 18). Dla poszczególnych mini- i mikrosatelitarnych *loci* VNTR (tj. ms061, ms172, ms207, ms209, ms211, ms213, ms214, ms217, ms222), przyporządkowano wartości numeryczne, które stanowią liczbę powtórzeń tandemowych. Liczbę powtórzeń tandemowych obliczono na podstawie długości sekwencji okalających, oraz długości powtórzeń tandemowych, zgodnie z Tabelą Nr 7 w punkcie 6.4. (sekcja Materiały), oraz punktem 7.5. (sekcja Metody). Każdemu izolatowi *P. aeruginosa* przypisano zestaw liczb, stanowiący liczbę powtórzeń tandemowych dla poszczególnych markerów, stanowiących profil VNTR. Na podstawie profilu VNTR, izolaty *P. aeruginosa* przypisano do odpowiednich grup MLVA. Szczepy posiadające ten sam profil VNTR przypisano do jednej grupy MLVA. W oparciu o przynależność do grup MLVA, każdemu izolatowi *P. aeruginosa* został przypisany numer szczepu, bądź jego wariant, charakterystyczny dla pacjenta, od którego ten szczep został wyizolowany. Wariant szczepu stanowi izolat *P. aeruginosa* o profilu VNTR zbliżonym do szczepu, różniący się liczbą powtórzeń tandemowych dla nie więcej niż jednego *loci* VNTR. Klasyfikację szczepów poszerzono, biorąc pod uwagę otrzymane grupy TRS-PCR i na tej podstawie sklasyfikowano unikalne szczepy *P. aeruginosa*.

W oparciu o analizę grup MLVA i TRS-PCR zidentyfikowano 44 szczepy *P. aeruginosa* spośród 63 izolatów klinicznych od ośmiu pacjentów z mukowiscydozą. Obliczony, zgodnie z opisem metody w punkcie 7.11. (sekcja Metody), współczynnik

różnicowania DI dla tej analizy wyniósł 0,9867. Izolaty *P. aeruginosa* należące do takich samych grup TRS-PCR i MLVA uznano za identyczne. Wykazano, że izolaty o tym samym profilu numerycznym pochodziły od tych samych pacjentów.

Wśród izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta DK zidentyfikowano, z wykorzystaniem metody MLVA, dwa szczepy: DK-01 oraz DK-02, należące do grup MLVA: 16 oraz 7, a także dwa warianty szczepu DK-02 (DK-02*) (należące do grup 5 i 6). Na podstawie numerycznej metody TRS-PCR zidentyfikowano cztery grupy TRS-PCR (grupy: 11, 12, 13, 21). Na podstawie różnicowania, z wykorzystaniem połączonych metod MLVA i numerycznej metody TRS-PCR, wyodrębniono cztery unikalne szczepy *P. aeruginosa* wśród siedmiu izolatów pochodzących od tego pacjenta (DK-SV01 - DK-SV04).

Wśród izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta DP zidentyfikowano, metodą MLVA dwa szczepy (DP-01, DP-02) (grupy 9 i 23). Na podstawie numerycznej metody TRS-PCR zidentyfikowano pięć grup TRS-PCR (grupy: 27, 28, 29, 30, 40). Na podstawie różnicowania, z wykorzystaniem połączonych metod MLVA i numerycznej metody TRS-PCR, wyodrębniono pięć unikalnych szczepów *P. aeruginosa* wśród pięciu izolatów pochodzących od tego pacjenta (DP-SV01 - DP-SV05).

Wśród izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta DPA zidentyfikowano, metodą MLVA pięć szczepów (DPA-01 - DPA-05) (grupy: 18, 19, 20, 21, 22). Na podstawie numerycznej metody TRS-PCR zidentyfikowano pięć grup TRS-PCR (grupy: 3, 22, 32, 33, 34). Na podstawie różnicowania, z wykorzystaniem połączonych metod MLVA i numerycznej metody TRS-PCR, wyodrębniono sześć unikalnych szczepów *P. aeruginosa* wśród ośmiu izolatów pochodzących od tego pacjenta (DPA-SV01 - DPA-SV06).

Wśród izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta JK zidentyfikowano, z wykorzystaniem metody MLVA, jeden szczep (JK-01) (grupa 8). Na podstawie numerycznej metody TRS-PCR zidentyfikowano cztery grupy TRS-PCR (grupy: 7, 14, 16, 17). Na podstawie różnicowania, z wykorzystaniem połączonych metod MLVA i numerycznej metody TRS-PCR, wyodrębniono cztery unikalne szczepy *P. aeruginosa* wśród pięciu izolatów pochodzących od tego pacjenta (JK-SV01 - JK-SV04).

Wśród izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta KP zidentyfikowano, z wykorzystaniem metody MLVA, trzy szczepy (KP-01 - KP-03) (grupy: 11, 17, 24), a także jeden wariant szczepu (KP-03*) (grupa 10). Na podstawie numerycznej metody TRS-PCR zidentyfikowano osiem grup TRS-PCR (grupy: 1, 2, 5, 23, 24, 25, 26, 30).

Na podstawie różnicowania, z wykorzystaniem połączonych metod MLVA i numerycznej metody TRS-PCR, wyodrębniono osiem unikalnych szczepów *P. aeruginosa* wśród dziewięciu izolatów pochodzących od tego pacjenta (KP-SV01-KP-SV08).

Wśród izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta LA zidentyfikowano, z wykorzystaniem metody MLVA, cztery szczepy (LA-01 - LA-04) (grupy: 1, 4, 14, 26), a także jeden wariant szczepu (LA-01*) (grupa 15). Na podstawie numerycznej metody TRS-PCR zidentyfikowano pięć grup TRS-PCR (grupy: 4, 6, 8, 9, 10). Na podstawie różnicowania, z wykorzystaniem połączonych metod MLVA i numerycznej metody TRS-PCR, wyodrębniono sześć unikalnych szczepów *P. aeruginosa* wśród dziewięciu izolatów pochodzących od tego pacjenta (LA-SV01 - LA-SV06).

Wśród izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta PA zidentyfikowano, z wykorzystaniem metody MLVA, cztery szczepy (PA-01 - PA-04) (grupy: 2, 12, 13, 25). Na podstawie numerycznej metody TRS-PCR zidentyfikowano siedem grup TRS-PCR (grupy: 15, 18, 19, 20, 21, 31, 37). Na podstawie różnicowania, z wykorzystaniem połączonych metod MLVA i numerycznej metody TRS-PCR, wyodrębniono siedem unikalnych szczepów *P. aeruginosa* wśród dziesięciu izolatów pochodzących od tego pacjenta (PA-SV01 - PA-SV07).

Wśród izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od pacjenta WE zidentyfikowano, z wykorzystaniem metody MLVA, jeden szczep (WE-01) (grupa 3). Na podstawie numerycznej metody TRS-PCR zidentyfikowano cztery grupy TRS-PCR (grupy: 35, 36, 38, 39). Na podstawie różnicowania, z wykorzystaniem połączonych metod MLVA i numerycznej metody TRS-PCR, wyodrębniono cztery unikalne szczepy *P. aeruginosa* wśród dziesięciu izolatów pochodzących od tego pacjenta (WE-SV01 - WE-SV04).

Tabela Nr 19. Porównanie wyników genotypowania metodami MLVA i TRS-PCR dla 63 izolatów *P. aeruginosa* od 8 pacjentów z mukowiscydozą (grupa MLVA -unikalne grupy oparte na podobnym profilu VNTR; Szczep/wariant MLVA – unikalny izolat *P. aeruginosa* sklasyfikowany na podstawie analizy MLVA; Grupa TRS-PCR — unikalny izolat *P. aeruginosa* sklasyfikowany na podstawie podobieństwa klas CGG- i GTC-PCR; Szczep/wariant — unikalny izolat *P. aeruginosa* sklasyfikowany w oparciu o grupy MLVA i TRS-PCR).

Izolat <i>P. aeruginosa</i>	Marker VNTR									Grupa MLVA	Szczep/wariant MLVA	Klasa CGG-PCR	Klasa GTC-PCR	Grupa TRS	Szczep <i>P. aeruginosa</i>
	ms061	ms172	ms207	ms209	ms211	ms213	ms214	ms217	ms222						
DK01	11	6	1	1	2	5	4	3	4	16	DK-01	16	3	21	DK-SV01
DK02	10	5	17	3	3	1	1	4	2	7	DK-02	9	9	13	DK-SV02
DK03	10	5	17	3	3	1	1	4	2	7	DK-02	9	9	13	DK-SV02
DK04	10	5	11	3	3	1	1	4	2	5	DK-02*	7	9	11	DK-SV03
DK05	10	5	11	3	3	1	1	4	2	5	DK-02*	8	10	12	DK-SV04
DK06	10	5	11	3	3	1	1	4	2	5	DK-02*	9	9	13	DK-SV02
DK07	10	5	14	3	3	1	1	4	2	6	DK-02*	9	9	13	DK-SV02
DP01	10	6	2	1	5	13	24	3	3	9	DP-01	22	5	30	DP-SV01
DP02	10	6	2	1	5	13	24	3	3	9	DP-01	20	5	27	DP-SV02
DP03	10	6	2	1	5	13	24	3	3	9	DP-01	20	7	28	DP-SV03
DP04	10	6	2	1	5	13	24	3	3	9	DP-01	21	7	29	DP-SV04
DP07	12	7	1	3	6	4	4	3	3	23	DP-02	27	1	40	DP-SV05
DPA01	11	8	12	2	4	3	4	1	1	21	DPA-01	3	3	3	DPA-SV01
DPA02	11	7	8	2	5	9	16	3	3	18	DPA-02	23	5	33	DPA-SV02
DPA03	11	7	8	2	5	9	16	3	3	18	DPA-02	23	5	33	DPA-SV02
DPA04	11	7	8	2	5	9	16	3	3	18	DPA-02	23	7	34	DPA-SV03
DPA05	11	8	2	2	3	5	4	3	4	19	DPA-03	17	1	22	DPA-SV04
DPA07	11	9	8	2	3	6	3	5	1	22	DPA-04	23	1	32	DPA-SV05
DPA08	11	7	8	2	5	9	16	3	3	18	DPA-02	23	7	34	DPA-SV03
DPA09	11	8	2	2	7	1	1	4	3	20	DPA-05	17	1	22	DPA-SV06
JK01	10	6	1	3	1	5	5	2	4	8	JK-01	11	3	16	JK-SV01
JK02	10	6	1	3	1	5	5	2	4	8	JK-01	12	3	17	JK-SV02

Tabela Nr 19. cd. Porównanie wyników genotypowania metodami MLVA i TRS-PCR dla 63 izolatów *P. aeruginosa* od 8 pacjentów z mukowiscydozą (grupa MLVA -unikalne grupy oparte na podobnym profilu VNTR; Szczep/wariant MLVA – unikalny izolat *P. aeruginosa* sklasyfikowany na podstawie analizy MLVA; Grupa TRS-PCR — unikalny izolat *P. aeruginosa* sklasyfikowany na podstawie podobieństwa klas CGG- i GTC-PCR; Szczep/wariant — unikalny izolat *P. aeruginosa* sklasyfikowany w oparciu o grupy MLVA i TRS-PCR).

Izolat <i>P. aeruginosa</i>	Marker VNTR									Grupa MLVA	Szczep/wariant MLVA	Klasa CGG- PCR	Klasa GTC- PCR	Grupa TRS	Szczep <i>P. aeruginosa</i>
	ms061	ms172	ms207	ms209	ms211	ms213	ms214	ms217	ms222						
JK03	10	6	1	3	1	5	5	2	4	8	JK-01	10	3	14	JK-SV03
JK04	10	6	1	3	1	5	5	2	4	8	JK-01	5	3	7	JK-SV04
JK05	10	6	1	3	1	5	5	2	4	8	JK-01	5	3	7	JK-SV04
KP01	11	6	5	1	5	9	20	3	3	17	KP-01	22	5	30	KP-SV01
KP02	12	7	5	2	24	3	4	2	1	24	KP-02	1	3	1	KP-SV02
KP03	12	7	5	2	24	3	4	2	1	24	KP-02	1	3	1	KP-SV02
KP05	12	7	5	2	24	3	4	2	1	24	KP-02	2	3	2	KP-SV03
KP06	10	6	3	1	2	4	4	3	4	11	KP-03	18	3	23	KP-SV04
KP07	10	6	3	1	2	4	4	3	0	10	KP-03*	19	3	25	KP-SV05
KP08	12	7	5	2	24	3	4	2	1	24	KP-02	4	3	5	KP-SV06
KP09	10	6	3	1	2	4	4	3	4	11	KP-03	18	4	24	KP-SV07
KP10	10	6	3	1	2	4	4	3	4	11	KP-03	19	4	26	KP-SV08
LA02	10	8	3	1	6	3	4	2	1	14	LA-01	6	4	10	LA-SV01
LA03	10	8	3	1	6	3	4	2	1	14	LA-01	6	1	8	LA-SV02
LA04	10	8	3	1	6	3	4	2	1	14	LA-01	6	1	8	LA-SV02
LA05	10	8	3	1	24	3	4	2	1	15	LA-01*	6	1	8	LA-SV02
LA06	10	3	3	1	2	3	4	2	3	4	LA-02	5	1	6	LA-SV03
LA07	10	3	3	1	2	3	4	2	3	4	LA-02	5	1	6	LA-SV03
LA08	10	3	3	1	2	3	4	2	3	4	LA-02	4	1	4	LA-SV04
LA09	15	8	3	1	24	3	4	2	1	26	LA-03	6	1	8	LA-SV05
LA10	0	5	3	1	2	4	1	4	3	1	LA-04	6	2	9	LA-SV06
PA01	12	7	11	2	24	4	4	2	1	25	PA-01	10	4	15	PA-SV01

Tabela Nr 19. cd. Porównanie wyników genotypowania metodami MLVA i TRS-PCR dla 63 izolatów *P. aeruginosa* od 8 pacjentów z mukowiscydozą (grupa MLVA -unikalne grupy oparte na podobnym profilu VNTR; Szczep/wariant MLVA – unikalny izolat *P. aeruginosa* sklasyfikowany na podstawie analizy MLVA; Grupa TRS-PCR — unikalny izolat *P. aeruginosa* sklasyfikowany na podstawie podobieństwa klas CGG- i GTC-PCR; Szczep/wariant — unikalny izolat *P. aeruginosa* sklasyfikowany w oparciu o grupy MLVA i TRS-PCR).

Izolat <i>P. aeruginosa</i>	Marker VNTR									Grupa MLVA	Szczep/wariant MLVA	Klasa CGG- PCR	Klasa GTC- PCR	Grupa TRS	Szczep <i>P. aeruginosa</i>
	ms061	ms172	ms207	ms209	ms211	ms213	ms214	ms217	ms222						
PA02	10	7	14	1	4	4	4	1	1	13	PA-02	15	4	20	PA-SV02
PA05	10	6	11	2	5	13	24	3	3	12	PA-03	25	6	37	PA-SV03
PA06	10	7	14	1	4	4	4	1	1	13	PA-02	16	3	21	PA-SV04
PA07	10	7	14	1	4	4	4	1	1	13	PA-02	14	3	19	PA-SV05
PA08	10	6	11	2	5	13	24	3	3	12	PA-03	25	6	37	PA-SV03
PA10	10	7	14	1	4	4	4	1	1	13	PA-02	14	3	19	PA-SV05
PA11	0	6	11	2	5	13	24	3	3	2	PA-04	22	6	31	PA-SV06
PA12	10	7	14	1	4	4	4	1	1	13	PA-02	13	3	18	PA-SV07
PA13	10	7	14	1	4	4	4	1	1	13	PA-02	16	3	21	PA-SV04
WE01	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3	WE-01	25	3	36	WE-SV01
WE02	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3	WE-01	25	3	36	WE-SV01
WE03	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3	WE-01	25	3	36	WE-SV01
WE04	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3	WE-01	26	3	38	WE-SV02
WE05	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3	WE-01	24	3	35	WE-SV03
WE06	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3	WE-01	26	3	38	WE-SV02
WE07	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3	WE-01	26	8	39	WE-SV04
WE08	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3	WE-01	26	8	39	WE-SV04
WE10	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3	WE-01	26	8	39	WE-SV04
WE11	9	7	3	1	1	3	3	3	4	3	WE-01	26	3	38	WE-SV02

8.2.9. Określenie współczynnika zgodności różnicowania między zastosowanymi metodami typowania

W celu przeprowadzenia porównania zgodności typowania molekularnego klinicznych szczepów *P. aeruginosa* przy użyciu dwóch metod: MLVA i TRS-PCR, oraz sprawdzenia, czy obie metody identyfikują te same zależności między powstałymi grupami, określono stopień zgodności z wykorzystaniem współczynnika Wallace'a, zgodnie z opisem w punkcie 7.10. (sekcja Metody). Współczynnik Wallace'a (W) wskazuje prawdopodobieństwo, z jakim szczepy uznane za identyczne w metodzie MLVA zostaną sklasyfikowane również jako identyczne w metodzie TRS-PCR i odwrotnie. Przedziały ufności oszacowania punktowego pozwalają również na rozróżnienie rozbieżności wartości W , które wynikają z różnic we wzorcu zróżnicowania danej populacji drobnoustrojów lub są jedynie konsekwencją zmienności próbkowania. Dla wartości W mniejszych niż 0,5, analityczne przedziały ufności tracą pokrycie [126]. Wyniki analizy zgodności obu metod przedstawiono w Tabeli Nr 20.

Tabela Nr 20. Wartości współczynnika Wallace'a dla zastosowanych w badaniach metod MLVA i TRS-PCR.

	Grupa TRS-PCR	Grupa MLVA
Grupa TRS-PCR		0,576 (0,441 - 0,711)
Grupa MLVA	0,186 (0,087 - 0,285)	

Współczynnik Wallace'a wynosi: $W_{\text{TRS-PCR} \rightarrow \text{MLVA}} = 0,576$ (0,441 - 0,711) i $W_{\text{MLVA} \rightarrow \text{TRS-PCR}} = 0,186$ (0,087 - 0,285), co oznacza, że jeśli dwa szczepy znajdują się w tym samym klastrze według TRS-PCR, mają około 58% szans na posiadanie tego samego typu MLVA, podczas, gdy dwa szczepy znajdują się w tym samym klastrze według MLVA, mają około 19% szans na posiadanie tego samego typu TRS-PCR. Podkreśla to fakt, że TRS-PCR jest bardziej różnicującą metodą niż typowanie MLVA.

9. Wnioski

Otrzymane wyniki prowadzonych badań pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Różnicowanie klinicznych szczepów *Escherichia coli* w oparciu o numeryczny system nadawania klas i grup TRS-PCR wykazuje większą zdolność różnicowania izolatów niż klasyczna analiza podobieństwa profili prążkowych.
2. Wstępna analiza szczepów *Escherichia coli* z wykorzystaniem uzupełniających się badań: MLST i numerycznego systemu klasyfikacji TRS-PCR, wydaje się być skuteczną i silnie różnicującą metodą, która może być stosowana do typowania molekularnego tych bakterii.
3. Różnicowanie klinicznych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* w oparciu o numeryczny system nadawania klas i grup TRS-PCR wykazuje większą zdolność różnicowania izolatów, niż klasyczna analiza podobieństwa profili prążkowych.
4. Numeryczny system klasyfikacji TRS-PCR wykazuje większą siłę różnicowania niż metoda VNTR-MLVA w analizie szczepów *Pseudomonas aeruginosa* i pozwala na rozróżnienie izolatów identycznych w schemacie VNTR-MLVA.
5. Analiza szczepów *Pseudomonas aeruginosa* z wykorzystaniem uzupełniających się badań: VNTR-MLVA i numerycznego systemu klasyfikacji TRS-PCR, stanowi skuteczną i silnie różnicującą metodę, która może być z powodzeniem stosowana do typowania molekularnego tych bakterii.

10. Dyskusja

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było ulepszenie metodyki genetycznego różnicowania patogennych szczepów *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* techniką TRS-PCR. Ponadto, nową metodykę TRS-PCR porównano z metodą MLST dla szczepów *E. coli* oraz z metodą VNTR-MLVA dla szczepów *P. aeruginosa*.

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. Trójnukleotydowe sekwencje powtórzone (TRS) to rodzaj mikrosatelitarnych sekwencji rozproszonych w genomie każdego organizmu. W reakcjach PCR, wykorzystujących pojedyncze startery zawierające wybrane sekwencje trójnukleotydowe komplementarne do motywów TRS w badanym genomie, uzyskuje się profile prążkowe charakterystyczne dla analizowanych szczepów. Jednakże, duża różnorodność uzyskiwanych profili z wykorzystaniem kilku testów TRS-PCR wymagała opracowania nowej strategii ułatwiającej interpretację wyników i porównań. Jest to szczególnie istotne przy analizach porównawczych profili prążkowych dla dużej liczby szczepów. Dlatego też zmienione zostało podejście do interpretacji złożonych dendrogramów podobieństwa wzorów 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 otrzymywanych w różnych laboratoriach.

Skuteczność proponowanego podejścia przetestowano z wykorzystaniem kolekcji uropatogennych szczepów klinicznych *E. coli*, w oparciu o trzy oddzielne testy TRS-PCR - po raz pierwszy z wykorzystaniem profilowania CAC-PCR, rozszerzając metodykę o wcześniej przeprowadzone testy GTG-, i CGG-PCR, a także po raz pierwszy stosując technikę TRS-PCR do różnicowania kolekcji szczepów *P. aeruginosa*. W celu określenia siły różnicowania TRS-PCR, otrzymane wyniki porównano z wynikami uzyskanymi z analiz MLST (w przypadku kolekcji *E. coli*) i MLVA (dla szczepów *P. aeruginosa*).

Patogenne szczepy *P. aeruginosa* i *E. coli* mogą wywoływać zakażenia prowadzące do przedłużonego leczenia, jak również do zgonów, zwłaszcza u pacjentów

hospitalizowanych. Istotne jest zatem poznanie źródeł zakażeń oraz szlaków rozprzestrzeniania się infekcji, a także monitorowanie różnorodności szczepów, zarówno u pacjentów, jak i w środowisku. Diagnostyka medyczna w zakażeniach mikrobiologicznych ma na celu wykrycie czynnika wywołującego chorobę zakaźną, bądź będącego przyczyną bezobjawowego nosicielstwa, co jest istotne w zapobieganiu szerzenia się zakażeń. W przypadku zakażeń bakteryjnych istotnym celem badania mikrobiologicznego jest także ustalenie wrażliwości patogenu na leki przeciwdrobnoustrojowe, ponieważ niewłaściwa kwalifikacja mikrobiologiczna może w konsekwencji prowadzić do podjęcia niewłaściwego leczenia. Natomiast w badaniach epidemiologicznych istotne jest również określanie pokrewieństwa genetycznego w obrębie gatunku i różnicowania wewnątrzgatunkowego, gdzie zastosowanie znalazły metody molekularne. Istnieje potrzeba poszukiwania metod molekularnych charakteryzujących się niskim kosztem, łatwością w przeprowadzeniu doświadczeń i wysoką powtarzalnością wyników, pozwalających na dokładną identyfikację drobnoustrojów na poziomie szczepu. Duża zmienność szczepów bakteryjnych odgrywa ważną rolę w rozprzestrzenianiu się organizmów opornych na antybiotyki, zdolnych do powodowania zakażeń trudnych do wyleczenia, co łączy się z wysoką zachorowalnością i śmiertelnością. Dlatego też istotne jest wprowadzanie ulepszeń do metod już istniejących i proponowanie nowych rozwiązań dla dochodzeń epidemiologicznych.

Metoda TRS-PCR została z powodzeniem zastosowana do różnicowania szczepów należących do podgatunku *Salmonella*: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Hadar*, *S. Newport* i *S. Anatum*, z wykorzystaniem pięciu starterów TRS-PCR: $N_6(\text{GTG})_4$, $N_6(\text{CAC})_4$, $N_6(\text{CGG})_4$, $N_6(\text{CCG})_4$ i $N_6(\text{CTG})_4$ [93]. Przeprowadzone uprzednio w Pracowni badania z wykorzystaniem metody TRS-PCR stanowią potwierdzenie użyteczności tej metody w różnicowaniu niegruźliczych prątków *Mycobacterium gordonae* [97], oraz *Mycobacterium avium* [94]. W przypadku genotypowania szczepów *M. avium*, metoda CCG-PCR wykazała większy indeks różnicowania i powtarzalność niż MIRU-VNTR, co potwierdza wysoki potencjał testów TRS-PCR jako narzędzi przesiewowych w badaniach epidemiologicznych [94]. Zastosowane testy CAC-PCR w genotypowaniu *M. gordonae* wykazały się wyższym indeksem różnicowania i powtarzalnością w porównaniu do zastosowanej równolegle metody ERIC-PCR [97].

Metodę TRS-PCR z sukcesem zastosowano również w określaniu zróżnicowania genetycznego patogennych szczepów *E. coli*, jako skuteczne narzędzie do genotypowania kolekcji patogennych, jelitowych szczepów *E. coli* (IPEC), wyizolowanych od dzieci z biegunką [96]. W poprzednich badaniach różnicowania klinicznych szczepów UPEC z wykorzystaniem analizy CGG-PCR stwierdzono, że metoda ta wykazuje większą powtarzalność i siłę różnicowania w porównaniu do innej zastosowanej metody ERIC-PCR, również bazującej na amplifikacji metodą PCR sekwencji powtórzonych w genomach bakteryjnych. Stwierdzono również, że profilowanie CGG-PCR wykazuje korelację określonych wzorów prążkowych z przynależnością do konkretnych grup filogenetycznych, obecnością wybranych czynników wirulencji, a także opornością na antybiotyki [95].

Dla różnych gatunków patogenów bakteryjnych stosowano również inne metody wykorzystujące obecność w genomach sekwencji powtarzających się, m.in. ERIC1R-ERIC2 i REP1R-REP2I. Zastosowane startery ERIC2, BOXA1R i (GTG)₅ wykorzystano do rozróżniania serotypów *Salmonella* [127], do typowania molekularnego izolatów *E. coli* [128], (GTG)₅-PCR do identyfikacji szczepów *Streptococcus mutans* [129], oraz szczepów *Klebsiella pneumoniae* [130]. W przypadku techniki (GTG)₅-PCR wykazano jej skuteczność dla typowania szczepów bakteryjnych, a powtarzalność metody raportowana przez różne zespoły badawcze wynosiła 54,4 % [129], 70 % [130], 94,0 % [127], a nawet 97,8±1,8% [128]. Wariant tej metody, opracowany w Pracowni Genetyki Molekularnej, wykorzystujący starter N₆(GTG)₄, wykazuje zbliżoną, bądź wyższą (w zależności od źródła), powtarzalność (95,0 %) i specyficzność, ze względu na zastosowanie dłuższego startera [95].

W pierwszej części niniejszej pracy przeprowadzono analizę CAC-PCR w celu określenia różnicowania kolekcji 124 uropatogennych szczepów *E. coli*. Przeprowadzone badania miały na celu porównanie siły różnicowania TRS-PCR w oparciu o starter N₆(CAC)₄ z przeprowadzonymi uprzednio w Pracowni badaniami molekularnymi dla badanej kolekcji szczepów *E. coli* w oparciu o metody CGG-, i GTG-PCR.

Biorąc pod uwagę wyniki analizy podobieństwa profili prążkowych uzyskanych z wykorzystaniem metody CAC-PCR, oraz obliczoną wartość powtarzalności metody, zróżnicowano kolekcję 124 szczepów na 52 unikalne klastry (Rysunek Nr 3). Określenie wartości powtarzalności otrzymanych wyników jest istotne dla testów opartych na amplifikacji fragmentów powtarzających się. Określona wartość dla

metody CAC-PCR wynosząca 95,0 % cechowała się więc porównywalnie wysokim potencjałem różnicującym, jak dla testu GTG-PCR [1], jednakże mniejszym niż dla CGG-PCR (96,2 %). Następnie przeprowadzono uśrednioną analizę podobieństwa profili prążkowych uzyskanych dla trzech powyższych testów TRS-PCR. Taka analiza cechuje się znacznie większym potencjałem różnicującym niż pojedyncze testy TRS-PCR. W wyniku analizy uśrednionej otrzymano 111 unikalnych szczepów spośród 124 badanych izolatów UPEC (Rysunek Nr 4).

Ulepszona, numeryczna metodyka TRS-PCR została następnie zastosowana do różnicowania kolekcji uropatogennych szczepów klinicznych *E. coli*, w wyniku której otrzymano 52 klasy CAC-PCR, 86 klas GTG-PCR i 99 klas CGG-PCR, przy czym metoda CAC-PCR cechowała się najmniejszą zdolnością do różnicowania genetycznego badanych szczepów. Następnie, każdy izolat *E. coli* posiadający unikalny profil poszczególnych klas TRS-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 (Tabela Nr 14) [1]. Wyniki liczbowe uzyskane na podstawie powyższych analiz są dużo łatwiejsze do interpretacji, w porównaniu do złożonych dendrogramów uzyskanych dla każdego z zastosowanych starterów TRS-PCR.

Na podstawie obliczonych wartości współczynników różnicowania (DI) dla powyższych analiz wykazano, że metoda numerycznej interpretacji TRS-PCR charakteryzuje się najwyższą siłą różnicowania szczepów UPEC. W Tabeli Nr 21 porównano wartości obliczonych współczynników różnicowania DI dla wszystkich zastosowanych metod.

Tabela Nr 21. Porównanie wartości współczynników różnicowania (DI) metod wykorzystywanych w typowaniu kolekcji szczepów UPEC.

Gatunek bakterii	<i>Escherichia coli</i>				
Zastosowana metoda	CAC-PCR	GTG-PCR	CGG-PCR	Uśredniona analiza porównania podobieństwa profili prążkowych TRS-PCR	Numeryczny system klasyfikacji TRS-PCR
Indeks różnicowania (DI)	0,9462	0,989	0,9946	0,9979	0,9996

Epidemiologia molekularna zakażeń *E. coli* opiera się głównie na analizach MLVA, typowaniu sekwencji metodą MLST i elektroforezie żelowej w polu pulsacyjnym – PFGE. Ta ostatnia uważana jest za „złoty standard” w epidemiologii i typowaniu molekularnym bakterii, będąc jednocześnie metodą bardzo czasochłonną. Bez przeprowadzenia analiz porównawczych trudno jest ocenić, czy profilowanie TRS-PCR ma większą siłę różnicowania od metod rutynowo wykorzystywanych do diagnostyki molekularnej i typowania szczepów w oparciu o sekwencje DNA, takich jak PFGE, MLVA, czy MLST. Dlatego też, w kolejnej części niniejszej pracy przeprowadzono analizę porównawczą 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 i wsp. [107]. Analizę porównawczą przeprowadzono dla kilku wybranych szczepów uropatogennych oraz szczepów *E. coli* wytwarzających toksynę Shiga (STEC). Analiza TRS-PCR dostarczyła wyników różnicujących szczepy UPEC w sposób podobny do tych, uzyskanych w wyniku analizy MLST (Tabela Nr 16). Uzyskane wyniki sugerują jednak, że metoda TRS-PCR pozwala na zróżnicowanie szczepów, które są identyczne zgodnie z metodą MLST, w szczególności niektórych szczepów o identycznych profilach - ST20. Według van Hoek i wsp., *E. coli* posiadające gen *stx2f* charakteryzowały się przynależnością do ST20, a wśród znanych typów ST, ST20 był drugim najczęściej wykrywanym typem sekwencji [131]. Z drugiej strony, w przypadku szczepów STEC 2745 i 2753, charakteryzujących się taką samą grupą TRS-PCR, analiza sekwencyjna MLST pozwoliła zidentyfikować pojedyncze substytucje w genach *adk* i *mdh*, różnicujące powyższe izolaty między sobą.

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 uzupełnienie dla analiz MLST, lub być stosowana jako wstępna, szybka i powtarzalna metoda określania różnorodności izolatów *E. coli*.

W niniejszej pracy po raz pierwszy sprawdzono użyteczność metodyki TRS-PCR do określania genetycznego zróżnicowania patogennej kolekcji klinicznych szczepów *P. aeruginosa* pozyskanych od pacjentów z mukowiscydozą. Do różnicowania

szczepów *P. aeruginosa* wykorzystywane są rutynowo metody PFGE, MLST, MLVA bądź WGS [81], [110], [132]–[137], jak również testy bazujące na sekwencjach powtórzonych, takich jak rep-PCR [138]–[140] i ERIC-PCR [82], [132], [141]–[143]. W pierwszym etapie badań przeprowadzono analizy porównawcze profili prążkowych TRS-PCR dla izolatów *P. aeruginosa*. 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 szczepów unikalnych (Rysunek Nr 10), natomiast różnicowanie GTC-PCR pozwoliło na identyfikację jedynie 10 unikalnych izolatów (Rysunek Nr 11). Pozwala to stwierdzić, że test CGG-PCR ma większy potencjał różnicujący, niż GTC-PCR. Kontynuując badania, przeprowadzono uśrednioną analizę podobieństwa otrzymanych profili prążkowych dla obu testów TRS-PCR. Uśredniona analiza pozwoliła na zgrupowanie badanych szczepów *P. aeruginosa* w 26 klastrów (Rysunek Nr 12). 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 izolaty *P. aeruginosa* (Tabela Nr 17).

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. W metodzie VNTR-MLVA, dla każdego izolatu *P. aeruginosa* został, na podstawie wielkości produktu PCR, przyporządkowany numeryczny profil alleliczny, odpowiadający liczbie powtórzeń kopii sekwencji VNTR. Określono 26 grup MLVA dla izolatów *P. aeruginosa*, posiadających unikalny profil VNTR (Tabela Nr 18). Na podstawie profili VNTR określono także czy mamy do czynienia z odrębnym szczepem, czy z wariantem istniejącego szczepu, dla poszczególnych pacjentów. Wariant szczepu stanowił izolat *P. aeruginosa* o profilu VNTR zbliżonym do danego szczepu, różniący się liczbą powtórzeń tandemowych dla nie więcej niż jednego *loci* VNTR [144].

Analizę tę poszerzono, biorąc dodatkowo pod uwagę nadane wartości numeryczne grup TRS-PCR, dzięki czemu udało się jeszcze bardziej zróżnicować kolekcję szczepów *P. aeruginosa* (Tabela Nr 19).

Biorąc pod uwagę obliczone wartości współczynnika Wallace'a (Tabela Nr 20), jak również obliczone wartości współczynników różnicowania (DI) (Tabela Nr 22) wykazano, że zdolność różnicowania szczepów z kolekcji *P. aeruginosa* metodą numeryczną TRS-PCR, jest większa niż metody VNTR-MLVA.

Tabela Nr 22. Porównanie wartości współczynników różnicowania (DI) metod wykorzystywanych w typowaniu kolekcji szczepów *P. aeruginosa*.

Gatunek bakterii	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
Zastosowana metoda	CGG-PCR	GTC-PCR	Uśredniona analiza porównania podobieństwa profili prążkowych TRS-PCR	Numeryczny system klasyfikacji TRS-PCR	MLVA	MLVA+numeryczny system klasyfikacji TRS-PCR
Indeks różnicowania (DI)	0,9611	0,7967	0,9544	0,9831	0,9478	0,9867

W toku przeprowadzonych analiz, na podstawie profilu VNTR i grup MLVA, stwierdzono obecność szczepów izolowanych od tego samego pacjenta, które różniły się zarówno profilami MLVA, jak i TRS-PCR. Może to wskazywać, że pacjent został zarażony pierwotnie równolegle kilkoma szczepami, bądź część z tych szczepów została nabyta podczas trwającej przewlekłej infekcji pierwotnym szczepem *P. aeruginosa*. Współistnienie genetycznie odmiennych subpopulacji w płucach u jednego pacjenta komplikuje leczenie. Prace innych badaczy sugerują, że w ciągu pierwszych trzech lat kolonizacji płuc można zaobserwować dwa lub nawet więcej klonów *P. aeruginosa* [50]. Różne szczepy/klony *P. aeruginosa* wykryte u jednego pacjenta mogą przyczyniać się do braku korelacji między wynikami badań mikrobiologicznych, a stanem klinicznym pacjenta.

Uzyskane w tej pracy wyniki badania szczepów *P. aeruginosa* wskazują, że analiza pojedynczej kolonii bakterii, wyizolowanej z materiału klinicznego pobranego w różnych okresach od pacjenta, nie może być reprezentatywna dla oceny przebiegu infekcji. Analiza wielu kolonii z próbek pobranych z tego samego okresu pozwoliłaby

uzyskać bardziej reprezentatywny obraz infekcji i ustalić, czy w trakcie jej trwania dochodzi do zmienności rezydujących już szczepów, a także czy doszło do nadkażeń innymi szczepami. Wiadomym jest, że warunki panujące w płucach pacjentów z mukowiscydozą sprzyjają różnicowaniu szczepów w czasie przewlekłych infekcji *P. aeruginosa*, prowadząc do ich zmienności genetycznej [7].

Badania ujęte w rozprawie nie wykazały istnienia wspólnego szczepu wśród badanych pacjentów, co sugeruje, że pacjenci z mukowiscydozą byli zainfekowani unikalnymi szczepami *P. aeruginosa*. Może to świadczyć o znikomym ryzyku transmisji z pacjenta na pacjenta. Chociaż istnieją doniesienia o przenoszeniu szczepów z pacjenta na pacjenta [145], [146], nie wykazaliśmy dowodów na występowanie zakażeń krzyżowych.

Różnicowanie molekularne szczepów *P. aeruginosa* pozwoliło na określenie ich zmienności genomowej. Zastosowanie w niniejszej rozprawie metody różnicowania MLVA w połączeniu z TRS-PCR jest skuteczną metodą genotypowania, którą można zastosować do badania izolatów *P. aeruginosa* od pacjentów z mukowiscydozą. Na podstawie przeprowadzonych badań można przypuszczać, że pojedynczy szczep *P. aeruginosa*, powodujący zakażenie, w trakcie przewlekłej infekcji może podlegać zmianom genetycznym w obrębie tego samego gospodarza i mutować w swoje warianty genetyczne, bądź pacjent może być zakażony jednocześnie przez jeden bądź kilka szczepów [147], [148]. Jednakże na podstawie przeprowadzonych w niniejszej rozprawie badań w oparciu o analizę pojedynczych kolonii *P. aeruginosa* nie ma możliwości udowodnienia, czy pacjent był zakażony kilkoma szczepami jednocześnie. Zaproponowana identyfikacja genotypowa i charakterystyka szczepów *P. aeruginosa* izolowanych od pacjentów z mukowiscydozą, może być dokładnym sposobem badania epidemiologii infekcji i pozwolić na dokładniejszą ocenę środków profilaktycznych, terapeutycznych i kontrolnych.

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. Porównując

uzyskane rezultaty, na podstawie uzyskanych wartości współczynników różnicowania DI, nowa metodyka TRS-PCR bardziej różnicuje szczepy niż uśredniona analiza podobieństwa profili prążkowych (Tabele Nr 21 i 22). Za pomocą zastosowanej metody numerycznej wykazano możliwość wykrycia nawet niewielkich różnic genetycznych pomiędzy szczepami bakterii.

Analiza klinicznych uropatogennych szczepów *Escherichia coli* w oparciu o numeryczny system nadawania klas TRS-PCR może stanowić podstawę różnicowania szczepów, identycznych w schemacie analiz MLST. 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.

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 może stanowić dodatkowe uzupełnienie schematu MLVA, lub być stosowana jako wstępna, szybka, niedroga i powtarzalna metoda określania różnorodności izolatów *P. aeruginosa*.

Ponieważ badania te zostały przeprowadzone na niewielkiej liczbie pacjentów i szczepów, istnieje konieczność przeprowadzenia dalszych badań w celu potwierdzenia otrzymanych rezultatów.

Podsumowując, 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.

11. Podsumowanie

Celem niniejszej rozprawy było ulepszenie metodyki różnicowania patogennych szczepów *P. aeruginosa* i *E. coli* z wykorzystaniem techniki TRS-PCR, oraz porównanie nowej metodyki TRS-PCR z metodą MLST dla szczepów *E. coli* oraz z metodą VNTR-MLVA dla szczepów *P. aeruginosa*.

W pierwszej kolejności przeprowadzono badania, które pozwoliły na opracowanie i oszacowanie użyteczności dodatkowego, do już stosowanych, 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 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. Za identyczne uznano profile, o podobieństwie powyżej obliczonej wartości powtarzalności. Nowa metoda TRS-PCR została zastosowana do różnicowania kolekcji uropatogennych szczepów klinicznych *E. coli*, w wyniku której otrzymano 52 klasy CAC-PCR, 86 klasy GTG-PCR i 99 klas CGG-PCR. Spośród powyższych technik, opracowana w tej pracy metoda CAC-PCR cechowała się najmniejszą zdolnością do różnicowania genetycznego badanych szczepów. Następnie, każdy izolat *E. coli* posiadający unikalny profil numeryczny poszczególnych klas TRS-PCR (CAC-, GTG- i CGG-PCR), został przyporządkowany do osobnej grupy TRS-PCR. Takie podejście do interpretacji wyników pozwoliło na zróżnicowanie 121 unikalnych szczepów, różniących się co najmniej w jednej klasie, spośród 124 badanych izolatów *E. coli*. Ulepszona metodyka TRS-PCR posiada zatem większą zdolność różnicowania szczepów niż uśredniona analiza porównania profili prążkowych z trzech testów TRS-PCR, na co wskazują obliczone wartości współczynników różnicowania DI.

Przeprowadzona następnie analiza porównawcza dla kilku wybranych szczepów UPEC i STEC, przy użyciu dwóch różnych technik typowania molekularnego: w oparciu o metodę numerycznego systemu nadawania klas i grup TRS-PCR, oraz metodę MLST, dostarczyła wyników różnicujących szczepy *E. coli* w sposób podobny do tych, uzyskanych w wyniku analizy MLST. Uzyskane wyniki sugerują, że metoda TRS-PCR pozwala na różnicowanie szczepów, które są identyczne, zgodnie z metodą MLST, tzn. wykazały zróżnicowanie niektórych szczepów o identycznych profilach 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 TRS-PCR były na bardzo wysokim i zbliżonym poziomie, jednak test CGG-PCR wykazał większy potencjał różnicujący, niż 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. W kolejnym etapie, badanym szczepom przypisano numery klas CGG- i GTC-PCR, a 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 zakwalifikowano 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 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. Określono 26 grup MLVA dla 63 izolatów *P. aeruginosa*, posiadających unikalny profil VNTR. 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*. 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, oraz wartości współczynników różnicowania DI.

Podsumowując, wykazano, że zastosowana nowa metoda analiz profili TRS-PCR jest wysoce użyteczna w:

1. Różnicowaniu szczepów klinicznych *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa*, oraz wykazuje większą zdolność różnicowania izolatów niż klasyczna, uśredniona analiza profili prążkowych.
2. Nowa metodyka TRS-PCR może stanowić uzupełnienie schematu MLST, lub być stosowana jako wstępna, szybka i powtarzalna metoda genotypowania izolatów *Escherichia coli*.
3. 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 *Pseudomonas aeruginosa*.

12. Summary

This dissertation aimed to improve the differentiation methodology of pathogenic *P. aeruginosa* and *E. coli* strains using the TRS-PCR technique and to compare the new band profiles interpretation TRS-PCR method with the MLST method for *E. coli* strains and the VNTR-MLVA method for *P. aeruginosa* strains.

First, studies were conducted that allowed for the development and evaluation of the usefulness of a supplementary to the previously used TRS-PCR tests with the use of the N₆(CAC)₄ primer for the differentiation of uropathogenic strains of *E. coli*. Considering the high reproducibility of this method, identical to the GTG-PCR test, but lower than for CGG-PCR, the CAC-PCR method allowed the grouping of 124 tested UPEC strains into 52 unique clusters.

The averaged analysis of band profiles based on three TRS-PCR tests for UPEC isolates allowed for assessing their differentiating potential. Given the high value of the repeatability coefficient of 95%, 111 unique strains were identified from among 124 tested UPEC isolates. Such a result indicates a high efficiency of the differentiation of UPEC strains using averaged analysis based on the above-mentioned TRS-PCR tests.

TRS-PCR band profile analysis methodology was improved by introducing numerical classification for identical profiles obtained in individual TRS-PCR tests. The profiles with similarities above the calculated repeatability value were considered identical. The new band profiles interpretation TRS-PCR method was used to differentiate the collection of uropathogenic clinical strains of *E. coli*, which resulted in 52 CAC-PCR classes, 86 GTG-PCR classes, and 99 CGG-PCR classes. Among the above techniques, the CAC-PCR method developed in this work was characterized by the lowest ability to differentiate the studied strains genetically. Then, each *E. coli* isolate with a unique numerical profile of all TRS-PCR classes (CAC-, GTG- and CGG-PCR) was assigned to a separate TRS-PCR group. This approach to interpreting the results allowed for differentiating 121 unique strains, differing in at least one class, out of 124 tested *E. coli* isolates. The improved TRS-PCR methodology, therefore, has a greater capacity for differentiating strains than the averaged analysis of the comparison of the band profiles from the three TRS-PCR tests. This is also indicated by the calculated parameters of the DI coefficients.

Subsequently, a comparative analysis was performed for a few selected UPEC and STEC strains using two different molecular typing techniques: based on the numerical

TRS-PCR classification system and the MLST method. The analysis differentiated *E. coli* strains similar to the MLST scheme. However, the results suggest that the TRS-PCR method allows for the differentiation of strains that are identical in the MLST scheme, i.e., they showed differentiation of some strains with identical ST profiles.

In this study, the usefulness of the methodology of comparing the CGG- and GTC-PCR banding profiles for determining the genetic diversity of the pathogenic collection of clinical *P. aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis was tested for the first time. The determined values of the repeatability coefficients of the analyzes performed for both TRS-PCR tests were at a very high and similar level. However, the CGG-PCR test showed a more significant differentiation potential than the GTC-PCR. Then, an average analysis of the similarity of the obtained band profiles was performed for both TRS-PCR tests, which allowed for assigning 63 tested *P. aeruginosa* strains to 26 clusters. In the next step, the strains were assigned class numbers CGG- and GTC-PCR, and strains of *P. aeruginosa* with stripe profiles with similarity above the repeatability value for both the CGG- and GTC-PCR tests were treated as identical. Based on the assigned profile for each TRS-PCR class, the tested strains were classified into 40 TRS-PCR groups, differing in at least one TRS-PCR class. This way, 25 individual TRS-PCR groups, and 15 complexes were identified, to which two or more *P. aeruginosa* isolates were assigned.

In the other part of the doctoral dissertation, the results of differentiation of the studied collection of *P. aeruginosa* strains using the TRS-PCR numerical system were compared with the results of the VNTR-MLVA analysis. 26 MLVA groups were determined for 63 *P. aeruginosa* isolates having a unique VNTR profile. Individual patients were assigned strain or strain variants number based on MLVA groups. This analysis was extended by considering the specific numerical values of the TRS-PCR groups, and the combined analysis allowed for further diversification of the *P. aeruginosa* strain collection. Comparing the above methods, the assignment of TRS-PCR numerical classes and groups differentiates clinical isolates more strongly compared to VNTR-MLVA, which is also indicated by the calculated values of Wallace's and DI coefficients.

In conclusion, it has been shown that the new method of analysis of TRS-PCR profiles is beneficial in:

1. Differentiating clinical strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and shows a higher ability to differentiate isolates than the classical, averaged analysis of the band profiles.
2. The new TRS-PCR methodology can complement the MLST scheme or be used as a primary, rapid, and reproducible method for genotyping *Escherichia coli* isolates.
3. The new TRS-PCR methodology shows a greater differentiation power than the VNTR-MLVA technique. It can complement the MLVA scheme or be used as a primary, rapid, reproducible method for genotyping *Pseudomonas aeruginosa* isolates.

13. Spis tabel i Rysunków

13.1. Spis tabel

Tabela Nr 1. Charakterystyka najczęściej występujących patotypów <i>E. coli</i> [55].	37
Tabela Nr 2. Główne cechy subpatotypów jelitowych <i>E. coli</i> [52].	40
Tabela Nr 3. Cechy głównych subpatotypów pozajelitowych <i>E. coli</i> (ExPEC) [52].	44
Tabela Nr 4. Odczynniki chemiczne, roztwory i bufony używane w badaniach.	59
Tabela Nr 5. Startery oligonukleotydowe zastosowane w analizie TRS-PCR (pz – par zasad).	60
Tabela Nr 6. Startery oligonukleotydowe zastosowane w analizie MLST (pz – par zasad) [107].	61
Tabela Nr 7. Startery oligonukleotydowe zastosowane w analizie MLVA (pz – par zasad) [108].	62
Tabela Nr 8. Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR w analizach TRS-PCR.	65
Tabela Nr 9. Warunki reakcji amplifikacji metodą TRS-PCR.	66
Tabela Nr 10. Skład mieszaniny reakcyjnej w analizach MLST.	67
Tabela Nr 11. Warunki reakcji PCR w analizie MLST.	67
Tabela Nr 12. Skład mieszaniny reakcyjnej w analizach MLVA.	69
Tabela Nr 13. Warunki reakcji amplifikacji w przeprowadzanych analizach MLVA. ..	69
Tabela Nr 14. Wartości numeryczne trzech odrębnych klas i grupy TRS-PCR dla uropatogennych szczepów <i>E. coli</i> , przyporządkowanych na podstawie profilowania CAC-, GTG- i CGG-PCR.	81
Tabela Nr 15. Wyniki analizy MLST dla wybranych szczepów STEC i UPEC (ST- typ sekwencyjny, nieznany typ ST– brak informacji w bazie danych). (w czerwonej ramce zaznaczono ten sam typ sekwencyjny ST95; w niebieskiej ramce zaznaczono ten sam typ sekwencyjny ST20).	85
Tabela Nr 16. Porównanie wyników typowania molekularnego MLST z grupami TRS-PCR, dla wybranych izolatów UPEC i STEC (ST- typ sekwencyjny, nieznany typ ST– brak informacji w bazie danych).	88

Tabela Nr 17. Wartości klas CGG- i GTC-PCR oraz wyznaczonych na tej podstawie grup TRS-PCR dla szczepów <i>P. aeruginosa</i> (w czerwonej ramce zaznaczono izolaty <i>P. aeruginosa</i> należące do tych samych grup TRS-PCR).	98
Tabela Nr 18. Wyniki genotypowania metodą MLVA dla 63 badanych izolatów <i>P. aeruginosa</i> , w czerwonej ramce zaznaczono izolaty <i>P. aeruginosa</i> należące do tych samych grup MLVA.	104
Tabela Nr 19. Porównanie wyników genotypowania metodami MLVA i TRS-PCR dla 63 izolatów <i>P. aeruginosa</i> od 8 pacjentów z mukowiscydozą (grupa MLVA -unikalne grupy oparte na podobnym profilu VNTR; Szczep/wariant MLVA – unikalny izolat <i>P. aeruginosa</i> sklasyfikowany na podstawie analizy MLVA; Grupa TRS-PCR — unikalny izolat <i>P. aeruginosa</i> sklasyfikowany na podstawie podobieństwa klas CGG- i GTC-PCR; Szczep/wariant — unikalny izolat <i>P. aeruginosa</i> sklasyfikowany w oparciu o grupy MLVA i TRS-PCR).....	109
Tabela Nr 20. Wartości współczynnika Wallace’a dla zastosowanych w badaniach metod MLVA i TRS-PCR.	112
Tabela Nr 21. Porównanie wartości współczynników różnicowania (DI) metod wykorzystywanych w typowaniu kolekcji szczepów UPEC.....	117
Tabela Nr 22. Porównanie wartości współczynników różnicowania (DI) metod wykorzystywanych w typowaniu kolekcji szczepów <i>P. aeruginosa</i>	120

13.2. Spis rysunków

Rysunek Nr 1. Systemy sekrecyjne <i>P. aeruginosa</i> (OM – błona zewnętrzna, ang. <i>outer membrane</i> ; IM – błona wewnętrzna, ang. <i>inner membrane</i>) [5].	28
Rysunek Nr 2. Określenie wartości powtarzalności dla metody CAC-PCR na podstawie analizy wzorów prążkowych dla trzech wybranych izolatów UPEC.	74
Rysunek Nr 3. Analiza podobieństwa profili prążkowych dla 124 izolatów UPEC, z użyciem metody CAC-PCR.	76
Rysunek Nr 4. Uśredniona analiza podobieństwa profili prążkowych dla 124 izolatów UPEC, z wykorzystaniem metod CAC-PCR, GTG-PCR i CGG-PCR.	78
Rysunek Nr 5. Schemat przedstawiający przypisanie klas numerycznych, na przykładzie CAC-PCR (każdemu unikalnemu profilowi przypisano numer klasy — dla zaprezentowanych 14 szczepów przypisano 10 klas CAC); opracowano na podstawie Majchrzak et. al., 2019 [1].	79
Rysunek Nr 6. Porównanie wyników sekwencjonowania fragmentu genu <i>mdh</i> dla izolatu STEC 2745 z typem allelu nr 7, otrzymanym dla izolatu STEC 2753 (kolorem czerwonym zaznaczono obecność tranzycji A>G w pozycji 162) (wygenerowane programem Nucleotide Blast).	86
Rysunek Nr 7. Porównanie wyników sekwencjonowania fragmentu genu <i>adk</i> (typ 429) dla izolatu STEC 2753 z typem allelu nr 6 otrzymanym dla izolatu STEC 2745 (kolorem czerwonym zaznaczono obecność tranzycji C>T w pozycji 527) (wygenerowane programem Nucleotide Blast).	87
Rysunek Nr 8. Analiza wstępna podobieństwa profili prążkowych metodą TRS-PCR dla wybranych 8 izolatów <i>P. aeruginosa</i> , z wykorzystaniem pięciu starterów: A) N ₆ (CGG) ₄ , B) N ₆ (GTC) ₄ , C) N ₆ (CAC) ₄ , D) N ₆ (CCG) ₄ , E) N ₆ (GAC) ₄ .	90
Rysunek Nr 9. Analiza podobieństwa profili prążkowych, przeprowadzona dla analiz CGG-PCR i GTC-PCR, dla trzech różnych izolatów <i>P. aeruginosa</i> , w czterech powtórzeniach; (A-CGG-PCR; B-GTC-PCR).	91
Rysunek Nr 10. Analiza podobieństwa profili prążkowych dla 63 izolatów <i>P. aeruginosa</i> , z wykorzystaniem metody CGG-PCR.	92

Rysunek Nr 11. Analiza podobieństwa profili prążkowych dla 63 izolatów <i>P. aeruginosa</i> , z wykorzystaniem metody GTC-PCR.....	94
Rysunek Nr 12. Uśredniona analiza podobieństwa profili prążkowych dla 63 izolatów <i>P. aeruginosa</i> , z wykorzystaniem metody CGG-PCR i GTC-PCR.	96
Rysunek Nr 13. Zdjęcia rozdziałów elektroforetycznych otrzymanych dla produktów PCR po analizie MLVA dla izolatów <i>P. aeruginosa</i> pozyskanych od pacjenta oznaczonego symbolem WE dla poszczególnych VNTR: A - ms061; B - ms172; C - ms207; D - ms209; E - ms211; F - ms213; G - ms214; H - ms217; I - ms222 (M – marker 100bp Plus, pz – par zasad).	103

14. Wykaz pozostałych publikacji

- 1) Mikulski D, Robak P, Perdas E, Węglowska E, Łosiewicz A, Drózd I, **Jarych D**, Misiewicz M, Szemraj J, Fendler W, Robak T. Pretreatment Serum Levels of IL-1 Receptor Antagonist and IL-4 Are Predictors of Overall Survival in Multiple Myeloma Patients Treated with Bortezomib. *J Clin Med*. 2021 Dec 26;11(1):112. doi: 10.3390/jcm11010112. PMID: 35011853; PMCID: PMC8745099. **IF= 2.659**
- 2) Świerzko AS, **Jarych D**, Gajek G, Chojnacka K, Kobiela P, Kufelnicka-Babout M, Michalski M, Sobczuk K, Szala-Poździej A, Matsushita M, Mazela J, Domżałska-Popadiuk I, Kilpatrick DC, Kalinka J, Sekine H, Cedzyński M. Polymorphisms of the FCN2 Gene 3'UTR Region and Their Clinical Associations in Preterm Newborns. *Front Immunol*. 2021 Oct 28;12:741140. doi: 10.3389/fimmu.2021.741140. PMID: 34777352; PMCID: PMC8581395. **IF = 8.786**
- 3) Robak P, Szemraj J, Mikulski D, Drozd I, Juszcak K, **Jarych D**, Misiewicz M, Kościelny K, Fendler W, Robak T. Prognostic Value of Resistance Proteins in Plasma Cells from Multiple Myeloma Patients Treated with Bortezomib-Based Regimens. *J Clin Med*. 2021 Oct 28;10(21):5028. doi: 10.3390/jcm10215028. PMID: 34768548; PMCID: PMC8584776. **IF= 2.659**
- 4) Robak P, **Jarych D**, Mikulski D, Drózd I, Węglowska E, Kotkowska A, Misiewicz M, Smolewski P, Stawiski K, Fendler W, Szemraj J, Robak T. The Prognostic Value of Whole-Blood PSMB5, CXCR4, POMP, and RPL5 mRNA Expression in Patients with Multiple Myeloma Treated with Bortezomib. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 25;13(5):951. doi: 10.3390/cancers13050951. PMID: 33668794; PMCID: PMC7956525. **IF= 6.575**
- 5) Robak P, Drózd I, **Jarych D**, Mikulski D, Węglowska E, Siemieniuk-Ryś M, Misiewicz M, Stawiski K, Fendler W, Szemraj J, Smolewski P, Robak T. The Value of Serum MicroRNA Expression Signature in Predicting Refractoriness to Bortezomib-Based Therapy in Multiple Myeloma Patients. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 9;12(9):2569. doi: 10.3390/cancers12092569. PMID: 32916955; PMCID: PMC7565855. **IF= 6.639**
- 6) Robak P, Węglowska E, Drózd I, Mikulski D, **Jarych D**, Ferlińska M, Wawrzyniak E, Misiewicz M, Smolewski P, Fendler W, Szemraj J, Robak T. Cytokine and Chemokine Profile in Patients with Multiple Myeloma Treated with Bortezomib. *Mediators Inflamm*. 2020 Jun 6;2020:1835836. doi: 10.1155/2020/1835836. PMID: 32587468; PMCID: PMC7294367. **IF = 4.529**
- 7) Katarzyna Boguszevska-Byczkiewicz, **Dariusz Jarych**, Izabela Drózd, Hamed Hamed Al Huwaidi, Izabela Zawlik, Agnieszka Kołacińska. A comparison of four commercial kits used for isolating circulating cell-free DNA: QuickGeneMINI8L (Kurabo), Maxwell RSC cfDNA Plasma Kit (Promega), cfKapture 21 Kit (MagBio), and QIAamp MinElute ccfDNA Kit (Qiagen). *Medical Research Journal*. 2020;5:92-99. doi:10.5603/mrj.a2020.0021. **100 pkt MEiN**

- 8) Adamus-Białek W, Wawszczak M, Arabski M, Majchrzak M, Gulba M, **Jarych D**, Parniewski P, Głuszek S. Ciprofloxacin, amoxicillin, and aminoglycosides stimulate genetic and phenotypic changes in uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Virulence*. 2019 Dec;10(1):260-276. doi: 10.1080/21505594.2019.1596507. PMID: 30938219; PMCID: PMC6527016. **IF = 5.542**
- 9) Kubiak-Szeligowska AB, Bartnicka M, **Jarych D**, Majchrzak M. TRS-PCR profiling for discrimination of *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea under 5 years of age in Lodz region, Poland. *Mol Biol Rep*. 2016 Sep;43(9):871-80. doi: 10.1007/s11033-016-4031-x. Epub 2016 Jul 7. PMID: 27389591; PMCID: PMC4990611. **IF= 1.828**

15. Wykaz polskich i zagranicznych konferencji naukowych

- 1) **Dariusz Jarych**, Ewelina Perdas, Damian Mikulski, Miłosz Wilczyński, Jacek R. Wilczyński, Wojciech Fendler, Katarzyna D. Kania, Daria Haręża, Andrzej Malinowski, Edyta Paradowska. „HPV-related miRNA expression in ovarian cancer.” Polski Kongres Genetyki. 27-30 czerwca 2022. Kraków, Polska
- 2) Anna Puła, Paweł Robak, **Dariusz Jarych**, Damian Mikulski, Izabela Drózdź, Janusz Szemraj, Tadeusz Robak. „A circulating serum miRNAs-based model to predict early mortality in multiple myeloma patients treated with bortezomib-based regimens.” EHA2022 Hybrid Congress. 9-12 czerwca 2022, Vienna, Austria.
- 3) Daria A. Haręża, **Dariusz Jarych**, Katarzyna D. Kania. “Zastosowanie emulsyjnego PCR do wykrywania i oceny ilościowej DNA ludzkiego wirusa brodawczaka typu 16”. XIV Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2022, 24-27 marca 2022. Lublin, Polska.
- 4) E. Paradowska, K. Kania, D. Haręża, M. Kawecka, **D. Jarych**, M. Wilczyński, A. Malinowski, J. Wilczyński. „Detection of HPV16 in ovarian cancer and fallopian tube specimens”, 34th International Papillomavirus Conference (IPVC 2021), 15-19 listopada 2021, Toronto, Kanada.
- 5) Damian Mikulski, Paweł Robak, Izabela Drózdź, Małgorzata Misiewicz, **Dariusz Jarych**, Piotr Smolewski, Wojciech Fendler, Janusz Szemraj, Tadeusz Robak, “Pretreatment serum IL-13 influence outcome in multiple myeloma patients treated with bortezomib- a pilot study.” XXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów, 2–3 września 2021
- 6) Roland Prielhofer, Juanjo Barrero, Stefanie Steuer, Richard Zahr, Kristin Baumann, Lina Heistinger, **Dariusz Jarych**, Franz Zehetbauer, Matthias Mattanovich, Matthias Steiger, Hans Marx, Michael Sauer, Diethard Mattanovich, Brigitte Gasser, “Synthetic biology toolbox and application for recombinant protein production in *Pichia pastoris*: Golden Gate cloning and CRISPR/Cas9”, Pichia Conference, 3-6 kwietnia, 2016, Antalya, Turcja.

16. Bibliografia

- [1] M. Majchrzak, A. B. Kubiak-Szeligowska, D. Jarych, i P. Parniewski, „Numerical interpretation of TRS-PCR profiling results for *Escherichia coli* strains isolated from patients with bacteriuria in Lodz region, Poland”, *Mol Biol Rep*, t. 46, nr 5, s. 5543–5553, paź. 2019, doi: 10.1007/s11033-019-04932-2.
- [2] M. W. Silby, C. Winstanley, S. A. C. Godfrey, S. B. Levy, i R. W. Jackson, „*Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable”, *FEMS Microbiol Rev*, t. 35, nr 4, s. 652–680, lip. 2011, doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x.
- [3] J. B. Lyczak, C. L. Cannon, i G. B. Pier, „Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist*Address for correspondence: Channing Laboratory, 181 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA”, *Microbes and Infection*, t. 2, nr 9, s. 1051–1060, lip. 2000, doi: 10.1016/S1286-4579(00)01259-4.
- [4] K. S. Hardy, M. H. Tessmer, D. W. Frank, i J. P. Audia, „Perspectives on the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Effector ExoU and Its Subversion of the Host Innate Immune Response to Infection”, *Toxins*, t. 13, nr 12, s. 880, grudz. 2021, doi: 10.3390/toxins13120880.
- [5] T. de Sousa *i in.*, „Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*”, *IJMS*, t. 22, nr 23, s. 12892, lis. 2021, doi: 10.3390/ijms222312892.
- [6] T. Gonçalves i U. Vasconcelos, „Colour Me Blue: The History and the Biotechnological Potential of Pyocyanin”, *Molecules*, t. 26, nr 4, s. 927, luty 2021, doi: 10.3390/molecules26040927.
- [7] C. Winstanley, S. O’Brien, i M. A. Brockhurst, „*Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections”, *Trends in Microbiology*, t. 24, nr 5, s. 327–337, maj 2016, doi: 10.1016/j.tim.2016.01.008.
- [8] K. Lee i S. S. Yoon, „*Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness”, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, t. 27, nr 6, s. 1053–1064, cze. 2017, doi: 10.4014/jmb.1611.11056.
- [9] G. Li *i in.*, „Genomic analyses of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* PA1 resequenced by single-molecule real-time sequencing”, *Bioscience Reports*, t. 36, nr 6, s. e00418, grudz. 2016, doi: 10.1042/BSR20160282.
- [10] R. Tobes i E. Pareja, „Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for Insertion Sequence elements”, *BMC Genomics*, t. 7, nr 1, s. 62, grudz. 2006, doi: 10.1186/1471-2164-7-62.
- [11] S. M. Huszczyński, J. S. Lam, i C. M. Khursigara, „The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology”, *Pathogens*, t. 9, nr 1, s. 6, grudz. 2019, doi: 10.3390/pathogens9010006.
- [12] D. Reynolds i M. Kollef, „The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update”, *Drugs*, t. 81, nr 18, s. 2117–2131, grudz. 2021, doi: 10.1007/s40265-021-01635-6.
- [13] A. R. Hauser, „The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection”, *Nat Rev Microbiol*, t. 7, nr 9, s. 654–665, wrz. 2009, doi: 10.1038/nrmicro2199.

- [14] E. Potvin, F. Sanschagrin, i R. C. Levesque, „Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*”, *FEMS Microbiol Rev*, t. 32, nr 1, s. 38–55, sty. 2008, doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00092.x.
- [15] M. Sivaneson, H. Mikkelsen, I. Ventre, C. Bordi, i A. Filloux, „Two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an intricate network mediating fimbrial and efflux pump gene expression: The *Pseudomonas aeruginosa* Roc systems”, *Molecular Microbiology*, t. 79, nr 5, s. 1353–1366, mar. 2011, doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07527.x.
- [16] H. C. Krivan, V. Ginsburg, i D. D. Roberts, „*Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to gangliotetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2)”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, t. 260, nr 1, s. 493–496, sty. 1988, doi: 10.1016/0003-9861(88)90473-0.
- [17] G. W. Lau, D. J. Hassett, i B. E. Britigan, „Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*”, *Trends in Microbiology*, t. 13, nr 8, s. 389–397, sie. 2005, doi: 10.1016/j.tim.2005.05.011.
- [18] S. de Bentzmann *i in.*, „Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells”, *Infect Immun*, t. 64, nr 5, s. 1582–1588, maj 1996, doi: 10.1128/iai.64.5.1582-1588.1996.
- [19] K. K. Lee *i in.*, „The binding of *Pseudomonas aeruginosa* pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit”, *Mol Microbiol*, t. 11, nr 4, s. 705–713, luty 1994, doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00348.x.
- [20] P. D. Patil, Y. Jin, i Y.-Y. Luk, „Chemical control over Asialo-GM1: A dual ligand for pili and Lectin A that activates swarming motility and facilitates adherence of *Pseudomonas aeruginosa*”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, t. 215, s. 112478, lip. 2022, doi: 10.1016/j.colsurfb.2022.112478.
- [21] A. Urso i A. Prince, „Anti-Inflammatory Metabolites in the Pathogenesis of Bacterial Infection”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, t. 12, s. 925746, cze. 2022, doi: 10.3389/fcimb.2022.925746.
- [22] Y. Kaneko, M. Thoendel, O. Olakanmi, B. E. Britigan, i P. K. Singh, „The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity”, *J. Clin. Invest.*, t. 117, nr 4, s. 877–888, kwi. 2007, doi: 10.1172/JCI30783.
- [23] C. D. Morin, E. Déziel, J. Gauthier, R. C. Levesque, i G. W. Lau, „An Organ System-Based Synopsis of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence”, *Virulence*, t. 12, nr 1, s. 1469–1507, grudz. 2021, doi: 10.1080/21505594.2021.1926408.
- [24] K. de C. F. de Almeida Silva *i in.*, „Molecular characterization of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center”, *Burns*, t. 43, nr 1, s. 137–143, luty 2017, doi: 10.1016/j.burns.2016.07.002.
- [25] A. R. Hauser, M. Jain, M. Bar-Meir, i S. A. McColley, „Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis”, *Clin Microbiol Rev*, t. 24, nr 1, s. 29–70, sty. 2011, doi: 10.1128/CMR.00036-10.
- [26] F. F. Tuon, L. R. Dantas, P. H. Suss, i V. S. Tasca Ribeiro, „Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review”, *Pathogens*, t. 11, nr 3, s. 300, luty 2022, doi: 10.3390/pathogens11030300.
- [27] B. R. Borlee, A. D. Goldman, K. Murakami, R. Samudrala, D. J. Wozniak, i M. R. Parsek, „*Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to

- reinforce the biofilm extracellular matrix”, *Molecular Microbiology*, t. 75, nr 4, s. 827–842, luty 2010, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x.
- [28] K. M. Colvin *i in.*, „The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix: Polysaccharides of the *P. aeruginosa* biofilm matrix”, *Environmental Microbiology*, t. 14, nr 8, s. 1913–1928, sie. 2012, doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x.
- [29] K. Sauer, A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton, i D. G. Davies, „*Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm”, *J Bacteriol*, t. 184, nr 4, s. 1140–1154, luty 2002, doi: 10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002.
- [30] C. S. Curran, T. Bolig, i P. Torabi-Parizi, „Mechanisms and Targeted Therapies for *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection”, *Am J Respir Crit Care Med*, t. 197, nr 6, s. 708–727, mar. 2018, doi: 10.1164/rccm.201705-1043SO.
- [31] K. Papenfort i B. L. Bassler, „Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria”, *Nat Rev Microbiol*, t. 14, nr 9, s. 576–588, wrz. 2016, doi: 10.1038/nrmicro.2016.89.
- [32] P. Kiratisin, K. D. Tucker, i L. Passador, „LasR, a Transcriptional Activator of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes, Functions as a Multimer”, *J Bacteriol*, t. 184, nr 17, s. 4912–4919, wrz. 2002, doi: 10.1128/JB.184.17.4912-4919.2002.
- [33] H. Mikkelsen, M. Sivaneson, i A. Filloux, „Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms”, *Environmental Microbiology*, t. 13, nr 7, s. 1666–1681, lip. 2011, doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02495.x.
- [34] W. J. Gooderham i R. E. W. Hancock, „Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*”, *FEMS Microbiol Rev*, t. 33, nr 2, s. 279–294, mar. 2009, doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00135.x.
- [35] A. Filloux, „Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function”, *Front. Microbio.*, t. 2, 2011, doi: 10.3389/fmicb.2011.00155.
- [36] D. Burstein *i in.*, „Novel Type III Effectors in *Pseudomonas aeruginosa*”, *mBio*, t. 6, nr 2, s. e00161-15, maj 2015, doi: 10.1128/mBio.00161-15.
- [37] L. Camus, F. Vandenesch, i K. Moreau, „From genotype to phenotype: adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis environment”, *Microbial Genomics*, t. 7, nr 3, mar. 2021, doi: 10.1099/mgen.0.000513.
- [38] D. P. Speert, „Molecular epidemiology of *Pseudomonas Aeruginosa*”, *Front Biosci*, t. 7, nr 5, s. e354-361, 2002, doi: 10.2741/A929.
- [39] W. Norbury, D. N. Herndon, J. Tanksley, M. G. Jeschke, C. C. Finnerty, i on Behalf of the Scientific Study Committee of the Surgical Infection Society, „Infection in Burns”, *Surgical Infections*, t. 17, nr 2, s. 250–255, kwi. 2016, doi: 10.1089/sur.2013.134.
- [40] A. J. Baillie, W. Anderson, i J. E. Harthill, „Proceedings: Inhibition of tryptic activity by a gastric peptide”, *J Pharm Pharmacol*, t. 27 Suppl?–2, s. 43P, grudz. 1975.
- [41] J. T. Thaden, L. P. Park, S. A. Maskarinec, F. Ruffin, V. G. Fowler, i D. van Duin, „Results from a 13-Year Prospective Cohort Study Show Increased

- Mortality Associated with Bloodstream Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Compared to Other Bacteria”, *Antimicrob Agents Chemother*, t. 61, nr 6, s. e02671-16, cze. 2017, doi: 10.1128/AAC.02671-16.
- [42] M. D. Parkins, R. Somayaji, i V. J. Waters, „Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis”, *Clin Microbiol Rev*, t. 31, nr 4, s. e00019-18, paź. 2018, doi: 10.1128/CMR.00019-18.
- [43] J. R. Riordan *i in.*, „Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA”, *Science*, t. 245, nr 4922, s. 1066–1073, wrz. 1989, doi: 10.1126/science.2475911.
- [44] E. Ziętkiewicz, E. Rutkiewicz, A. Pogorzelski, B. Klimek, K. Voelkel, i M. Witt, „CFTR Mutations Spectrum and the Efficiency of Molecular Diagnostics in Polish Cystic Fibrosis Patients”, *PLoS ONE*, t. 9, nr 2, s. e89094, luty 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0089094.
- [45] NBS CF working group *i in.*, „Newborn screening for cystic fibrosis: Polish 4 years’ experience with CFTR sequencing strategy”, *Eur J Hum Genet*, t. 21, nr 4, s. 391–396, kwi. 2013, doi: 10.1038/ejhg.2012.180.
- [46] T. S. Cohen i A. Prince, „Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome”, *Nat Med*, t. 18, nr 4, s. 509–519, kwi. 2012, doi: 10.1038/nm.2715.
- [47] P. J. Mogayzel *i in.*, „Cystic Fibrosis Foundation Pulmonary Guideline*. Pharmacologic Approaches to Prevention and Eradication of Initial *Pseudomonas aeruginosa* Infection”, *Annals ATS*, t. 11, nr 10, s. 1640–1650, grudz. 2014, doi: 10.1513/AnnalsATS.201404-166OC.
- [48] K. M. Langan, T. Kotsimbos, i A. Y. Peleg, „Managing *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections in cystic fibrosis”, *Current Opinion in Infectious Diseases*, t. 28, nr 6, s. 547–556, grudz. 2015, doi: 10.1097/QCO.0000000000000217.
- [49] E. Rossi *i in.*, „*Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis”, *Nat Rev Microbiol*, t. 19, nr 5, s. 331–342, maj 2021, doi: 10.1038/s41579-020-00477-5.
- [50] N. Cramer, L. Wiehlmann, i B. Tümmler, „Clonal epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis”, *International Journal of Medical Microbiology*, t. 300, nr 8, s. 526–533, grudz. 2010, doi: 10.1016/j.ijmm.2010.08.004.
- [51] V. M. Sora, G. Meroni, P. A. Martino, A. Soggiu, L. Bonizzi, i A. Zecconi, „Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance”, *Pathogens*, t. 10, nr 11, s. 1355, paź. 2021, doi: 10.3390/pathogens10111355.
- [52] V. S. Braz, K. Melchior, i C. G. Moreira, „*Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, t. 10, s. 548492, grudz. 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.548492.
- [53] O. Tenaillon, D. Skurnik, B. Picard, i E. Denamur, „The population genetics of commensal *Escherichia coli*”, *Nat Rev Microbiol*, t. 8, nr 3, s. 207–217, mar. 2010, doi: 10.1038/nrmicro2298.
- [54] Q. R. Ducarmon, R. D. Zwartink, B. V. H. Hornung, W. van Schaik, V. B. Young, i E. J. Kuijper, „Gut Microbiota and Colonization Resistance against Bacterial Enteric Infection”, *Microbiol Mol Biol Rev*, t. 83, nr 3, s. e00007-19, sie. 2019, doi: 10.1128/MMBR.00007-19.
- [55] E. Denamur, O. Clermont, S. Bonacorsi, i D. Gordon, „The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*”, *Nat Rev Microbiol*, t. 19, nr 1, s. 37–54, sty. 2021, doi: 10.1038/s41579-020-0416-x.

- [56] J. Hacker, U. Hentschel, i U. Dobrindt, „Prokaryotic Chromosomes and Disease”, *Science*, t. 301, nr 5634, s. 790–793, sie. 2003, doi: 10.1126/science.1086802.
- [57] L. S. Frost, R. Leplae, A. O. Summers, i A. Toussaint, „Mobile genetic elements: the agents of open source evolution”, *Nat Rev Microbiol*, t. 3, nr 9, s. 722–732, wrz. 2005, doi: 10.1038/nrmicro1235.
- [58] J. P. Nataro i J. B. Kaper, „Diarrheagenic *Escherichia coli*”, *Clin Microbiol Rev*, t. 11, nr 1, s. 142–201, sty. 1998, doi: 10.1128/CMR.11.1.142.
- [59] O. Clermont, S. Bonacorsi, i E. Bingen, „Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group”, *Appl Environ Microbiol*, t. 66, nr 10, s. 4555–4558, paź. 2000, doi: 10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000.
- [60] J. B. Kaper, J. P. Nataro, i H. L. T. Mobley, „Pathogenic *Escherichia coli*”, *Nat Rev Microbiol*, t. 2, nr 2, s. 123–140, luty 2004, doi: 10.1038/nrmicro818.
- [61] J. Sarowska *i in.*, „Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports”, *Gut Pathog*, t. 11, nr 1, s. 10, grudz. 2019, doi: 10.1186/s13099-019-0290-0.
- [62] S. Bonacorsi i E. Bingen, „Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis”, *International Journal of Medical Microbiology*, t. 295, nr 6–7, s. 373–381, paź. 2005, doi: 10.1016/j.ijmm.2005.07.011.
- [63] L. H. S. Tibo, J. W. Bertol, R. A. Bernedo-Navarro, i T. Yano, „Cytotoxic factor secreted by *Escherichia coli* associated with sepsis facilitates transcytosis through human umbilical vein endothelial cell monolayers”, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, t. 20, nr 3, s. 298–302, maj 2016, doi: 10.1016/j.bjid.2016.01.003.
- [64] R. A. Conceição, M. S. Ludovico, C. G. T. J. Andrade, i T. Yano, „Human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) is able to adhere to and invade kidney epithelial cells in culture”, *Braz J Med Biol Res*, t. 45, nr 5, s. 417–424, maj 2012, doi: 10.1590/S0100-879X2012007500057.
- [65] D. Kathayat, D. Lokesh, S. Ranjit, i G. Rajashekara, „Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies”, *Pathogens*, t. 10, nr 4, s. 467, kwi. 2021, doi: 10.3390/pathogens10040467.
- [66] N. Zaatout, „An overview on mastitis-associated *Escherichia coli*: Pathogenicity, host immunity and the use of alternative therapies”, *Microbiological Research*, t. 256, s. 126960, mar. 2022, doi: 10.1016/j.micres.2021.126960.
- [67] S. E. Blum, E. D. Heller, S. Sela, D. Elad, N. Edery, i G. Leitner, „Genomic and Phenomic Study of Mammary Pathogenic *Escherichia coli*”, *PLoS ONE*, t. 10, nr 9, s. e0136387, wrz. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0136387.
- [68] G. Antonelli *i in.*, „Strategies to Tackle Antimicrobial Resistance: The Example of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*”, *IJMS*, t. 22, nr 9, s. 4943, maj 2021, doi: 10.3390/ijms22094943.
- [69] J. B. Lee, S. K. Kim, i J. W. Yoon, „Pathophysiology of enteropathogenic *Escherichia coli* during a host infection”, *J Vet Sci*, t. 23, nr 2, s. e28, 2022, doi: 10.4142/jvs.21160.
- [70] Q. Zeng *i in.*, „Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiology of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated From Female Patients in Shanghai, China”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, t. 11, s. 653983, sie. 2021, doi: 10.3389/fcimb.2021.653983.

- [71] M. Hyun, J. Y. Lee, i H. ah Kim, „Differences of virulence factors, and antimicrobial susceptibility according to phylogenetic group in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from Korean patients”, *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, t. 20, nr 1, s. 77, grudz. 2021, doi: 10.1186/s12941-021-00481-4.
- [72] L. W. Riley, „Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*”, *Microbiol Spectr*, t. 8, nr 4, s. 8.4.1, grudz. 2020, doi: 10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020.
- [73] Y. Zhang, P. Tan, Y. Zhao, i X. Ma, „Enterotoxigenic *Escherichia coli* : intestinal pathogenesis mechanisms and colonization resistance by gut microbiota”, *Gut Microbes*, t. 14, nr 1, s. 2055943, grudz. 2022, doi: 10.1080/19490976.2022.2055943.
- [74] S. George *i in.*, „Bacterial Gut Microbiota and Infections During Early Childhood”, *Front. Microbiol.*, t. 12, s. 793050, sty. 2022, doi: 10.3389/fmicb.2021.793050.
- [75] A. A. Ocampo-Sosa *i in.*, „Alterations of OprD in Carbapenem-Intermediate and -Susceptible Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Bacteremia in a Spanish Multicenter Study”, *Antimicrob Agents Chemother*, t. 56, nr 4, s. 1703–1713, kwi. 2012, doi: 10.1128/AAC.05451-11.
- [76] P. B. Crichton i D. C. Old, „Numerical index of the discriminatory ability of biotyping and resistotyping for strains of *Escherichia coli*”, *Epidemiol. Infect.*, t. 108, nr 2, s. 279–286, kwi. 1992, doi: 10.1017/S095026880004975X.
- [77] F. B. Halimeh *i in.*, „Historical, current, and emerging tools for identification and serotyping of *Shigella*”, *Braz J Microbiol*, t. 52, nr 4, s. 2043–2055, grudz. 2021, doi: 10.1007/s42770-021-00573-5.
- [78] A. P. Desai *i in.*, „Use of matrix assisted laser desorption ionisation–time of flight mass spectrometry in a paediatric clinical laboratory for identification of bacteria commonly isolated from cystic fibrosis patients”, *J Clin Pathol*, t. 65, nr 9, s. 835–838, wrz. 2012, doi: 10.1136/jclinpath-2012-200772.
- [79] J. Li, W. Hu, M. Li, S. Deng, Q. Huang, i W. Lu, „Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for identifying VIM- and SPM-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates”, *IDR*, t. Volume 12, s. 2781–2788, wrz. 2019, doi: 10.2147/IDR.S211984.
- [80] I. A. Holder, K. Volpel, G. Ronald, i W. Paranchych, „Studies on multiple *Pseudomonas aeruginosa* isolates from individual burn patients by RFLP, O antigen serotyping and antibiogram analysis”, *Burns*, t. 21, nr 6, s. 441–444, wrz. 1995, doi: 10.1016/0305-4179(95)00012-Z.
- [81] J. S. R. Hector i A. R. Johnson, „Determination of genome size of *Pseudomonas aeruginosa* by PFGE: analysis of restriction fragments”, *Nucl Acids Res*, t. 18, nr 11, s. 3171–3174, 1990, doi: 10.1093/nar/18.11.3171.
- [82] A. Mokhtari i K. Amini, „Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains as a multidrug resistant (MDR) bacterium and evaluating the prevalence of ESBLs and some virulence factors encoding genes by PFGE and ERIC-PCR methods”, *IJPR*, t. 18, nr 3, lip. 2019, doi: 10.22037/ijpr.2019.1100762.
- [83] O. Pappa, G. Mandilara, A. Vatopoulos, i A. Mavridou, „Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from Greek water samples by three typing methods: serotyping, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Pulsed Field Gel

- Electrophoresis (PFGE)”, *Water Science and Technology*, t. 67, nr 6, s. 1380–1388, mar. 2013, doi: 10.2166/wst.2013.678.
- [84] J. Botes, G. Williamson, V. Sinickas, i V. Gürtler, „Genomic typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates by comparison of Riboprinting and PFGE: correlation of experimental results with those predicted from the complete genome sequence of isolate PAO1”, *Journal of Microbiological Methods*, t. 55, nr 1, s. 231–240, paź. 2003, doi: 10.1016/S0167-7012(03)00156-8.
- [85] H. Speijer, P. H. M. Savelkoul, M. J. Bonten, E. E. Stobberingh, i J. H. T. Tjhie, „Application of Different Genotyping Methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a Setting of Endemicity in an Intensive Care Unit”, *J Clin Microbiol*, t. 37, nr 11, s. 3654–3661, lis. 1999, doi: 10.1128/JCM.37.11.3654-3661.1999.
- [86] A. Abdul Wahab *i in.*, „Genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis siblings in Qatar using AFLP fingerprinting”, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, t. 33, nr 2, s. 265–271, luty 2014, doi: 10.1007/s10096-013-1954-1.
- [87] I. Serrano *i in.*, „Antimicrobial resistance and genomic rep-PCR fingerprints of *Pseudomonas aeruginosa* strains from animals on the background of the global population structure”, *BMC Vet Res*, t. 13, nr 1, s. 58, grudz. 2016, doi: 10.1186/s12917-017-0977-8.
- [88] D. Jarych, E. Augustynowicz-Kopec, A. Iwanska, P. Parniewski, i M. Majchrzak, „Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients”, *Sci Rep*, t. 11, nr 1, s. 15460, grudz. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-95034-2.
- [89] F. J. Castañeda-Montes *i in.*, „Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* through a MLST approach and antibiotic resistance profiling of a Mexican clinical collection”, *Infection, Genetics and Evolution*, t. 65, s. 43–54, lis. 2018, doi: 10.1016/j.meegid.2018.06.009.
- [90] J. Versalovic, T. Koeuth, i R. Lupski, „Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial enomes”, *Nucl Acids Res*, t. 19, nr 24, s. 6823–6831, 1991, doi: 10.1093/nar/19.24.6823.
- [91] R. Ranjbar, A. Tabatabaee, P. Behzadi, i R. Kheiri, „Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) Genotyping of *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Animal Stool Specimens”, *Iran J Pathol*, t. 12, nr 1, s. 25–34, 2017.
- [92] S. H. Abdel-Rhman i D. E. Rizk, „Comparative Assessment of Different PCR-Based Typing Methods of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates”, *IDR*, t. Volume 14, s. 1019–1035, mar. 2021, doi: 10.2147/IDR.S298838.
- [93] M. Majchrzak *i in.*, „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*, t. 41, nr 11, s. 7121–7132, lis. 2014, doi: 10.1007/s11033-014-3592-9.
- [94] A. Wojtasik, A. B. Kubiak, A. Krzyżanowska, M. Majchrzak, E. Augustynowicz-Kopec, i P. Parniewski, „Comparison of the (CCG)₄-based PCR and MIRU-VNTR for molecular typing of *Mycobacterium avium* strains”, *Mol Biol Rep*, t. 39, nr 7, s. 7681–7686, lip. 2012, doi: 10.1007/s11033-012-1603-2.
- [95] W. Adamus-Bialek, A. Wojtasik, M. Majchrzak, M. Sosnowski, i P. Parniewski, „(CGG)₄-Based PCR as a Novel Tool for Discrimination of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains: Comparison with Enterobacterial Repetitive Intergenic

- Consensus-PCR”, *J Clin Microbiol*, t. 47, nr 12, s. 3937–3944, grudz. 2009, doi: 10.1128/JCM.01036-09.
- [96] A. B. Kubiak-Szeligowska, M. Bartnicka, D. Jarych, i M. Majchrzak, „TRS-PCR profiling for discrimination of *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea under 5 years of age in Lodz region, Poland”, *Mol Biol Rep*, t. 43, nr 9, s. 871–880, wrz. 2016, doi: 10.1007/s11033-016-4031-x.
- [97] A. Wojtasik *i in.*, „Trinucleotide repeat sequence-based PCR as a potential approach for genotyping *Mycobacterium gordonae* strains”, *Journal of Microbiological Methods*, t. 85, nr 1, s. 28–32, kwi. 2011, doi: 10.1016/j.mimet.2011.01.001.
- [98] J. R. Johnson i T. A. Russo, „Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*”, *International Journal of Medical Microbiology*, t. 295, nr 6–7, s. 383–404, paź. 2005, doi: 10.1016/j.ijmm.2005.07.005.
- [99] K. D. Schmidt, B. Tümmler, i U. Römling, „Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats”, *J Bacteriol*, t. 178, nr 1, s. 85–93, sty. 1996, doi: 10.1128/jb.178.1.85-93.1996.
- [100] F. C. Tenover *i in.*, „Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing”, *J Clin Microbiol*, t. 33, nr 9, s. 2233–2239, wrz. 1995, doi: 10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995.
- [101] F. W. Scott i T. L. Pitt, „Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales”, *Journal of Medical Microbiology*, t. 53, nr 7, s. 609–615, lip. 2004, doi: 10.1099/jmm.0.45620-0.
- [102] T. Sawa, K. Momiyama, T. Mihara, A. Kainuma, M. Kinoshita, i K. Moriyama, „Molecular epidemiology of clinically high-risk *Pseudomonas aeruginosa* strains: Practical overview”, *Microbiol Immunol*, t. 64, nr 5, s. 331–344, maj 2020, doi: 10.1111/1348-0421.12776.
- [103] B. G. Spratt, „Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet”, *Current Opinion in Microbiology*, t. 2, nr 3, s. 312–316, cze. 1999, doi: 10.1016/S1369-5274(99)80054-X.
- [104] Y. Chen *i in.*, „Development of an extended multilocus sequence typing for genotyping of *Brucella* isolates”, *Journal of Microbiological Methods*, t. 86, nr 2, s. 252–254, sie. 2011, doi: 10.1016/j.mimet.2011.05.013.
- [105] K. A. Jolley *i in.*, „Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain”, *Microbiology*, t. 158, nr 4, s. 1005–1015, kwi. 2012, doi: 10.1099/mic.0.055459-0.
- [106] E. Miro *i in.*, „Core/Whole Genome Multilocus Sequence Typing and Core Genome SNP-Based Typing of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates From Spain”, *Front. Microbiol.*, t. 10, s. 2961, sty. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2019.02961.
- [107] T. Wirth *i in.*, „Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective”, *Mol Microbiol*, t. 60, nr 5, s. 1136–1151, cze. 2006, doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x.

- [108] J. F. Turton, S. E. Turton, L. Yearwood, S. Yarde, M. E. Kaufmann, i T. L. Pitt, „Evaluation of a nine-locus variable-number tandem-repeat scheme for typing of *Pseudomonas aeruginosa*”, *Clinical Microbiology and Infection*, t. 16, nr 8, s. 1111–1116, sie. 2010, doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03049.x.
- [109] L. Onteniente, S. Brisse, P. T. Tassios, i G. Vergnaud, „Evaluation of the Polymorphisms Associated with Tandem Repeats for *Pseudomonas aeruginosa* Strain Typing”, *J Clin Microbiol*, t. 41, nr 11, s. 4991–4997, lis. 2003, doi: 10.1128/JCM.41.11.4991-4997.2003.
- [110] H. Vu-Thien *i in.*, „Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Longitudinal Survey of Sources of *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis Patients”, *J Clin Microbiol*, t. 45, nr 10, s. 3175–3183, paź. 2007, doi: 10.1128/JCM.00702-07.
- [111] D. L. Wallace, „A Method for Comparing Two Hierarchical Clusterings: Comment”, *Journal of the American Statistical Association*, t. 78, nr 383, s. 569, wrz. 1983, doi: 10.2307/2288118.
- [112] P. R. Hunter i M. A. Gaston, „Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson’s index of diversity”, *J Clin Microbiol*, t. 26, nr 11, s. 2465–2466, lis. 1988, doi: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988.
- [113] C. M. Stephens, S. Adams-Sapper, M. Sekhon, J. R. Johnson, i L. W. Riley, „Genomic Analysis of Factors Associated with Low Prevalence of Antibiotic Resistance in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Sequence Type 95 Strains”, *mSphere*, t. 2, nr 2, kwi. 2017, doi: 10.1128/mSphere.00390-16.
- [114] L. W. Riley, „Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*”, *Clinical Microbiology and Infection*, t. 20, nr 5, s. 380–390, maj 2014, doi: 10.1111/1469-0691.12646.
- [115] D. V. Ward *i in.*, „Metagenomic Sequencing with Strain-Level Resolution Implicates Uropathogenic *E. coli* in Necrotizing Enterocolitis and Mortality in Preterm Infants”, *Cell Reports*, t. 14, nr 12, s. 2912–2924, mar. 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.015.
- [116] A. E. Darling *i in.*, „A draft genome of *Escherichia coli* sequence type 127 strain 2009-46”, *Gut Pathog*, t. 6, nr 1, s. 32, 2014, doi: 10.1186/1757-4749-6-32.
- [117] M. P. V. Cunha *i in.*, „Pandemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil”, *PLoS ONE*, t. 12, nr 6, s. e0178970, cze. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0178970.
- [118] J. R. Johnson, B. Johnston, C. R. Clabots, M. A. Kuskowski, E. Roberts, i C. DebRoy, „Virulence Genotypes and Phylogenetic Background of *Escherichia coli* Serogroup O6 Isolates from Humans, Dogs, and Cats”, *J Clin Microbiol*, t. 46, nr 2, s. 417–422, luty 2008, doi: 10.1128/JCM.00674-07.
- [119] D. R. Bogema *i in.*, „Whole-genome analysis of extraintestinal *Escherichia coli* sequence type 73 from a single hospital over a 2 year period identified different circulating clonal groups”, *Microbial Genomics*, t. 6, nr 1, sty. 2020, doi: 10.1099/mgen.0.000255.
- [120] A. P. de Souza da-Silva *i in.*, „*Escherichia coli* sequence type 73 as a cause of community acquired urinary tract infection in men and women in Rio de Janeiro, Brazil”, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, t. 88, nr 1, s. 69–74, maj 2017, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.024.

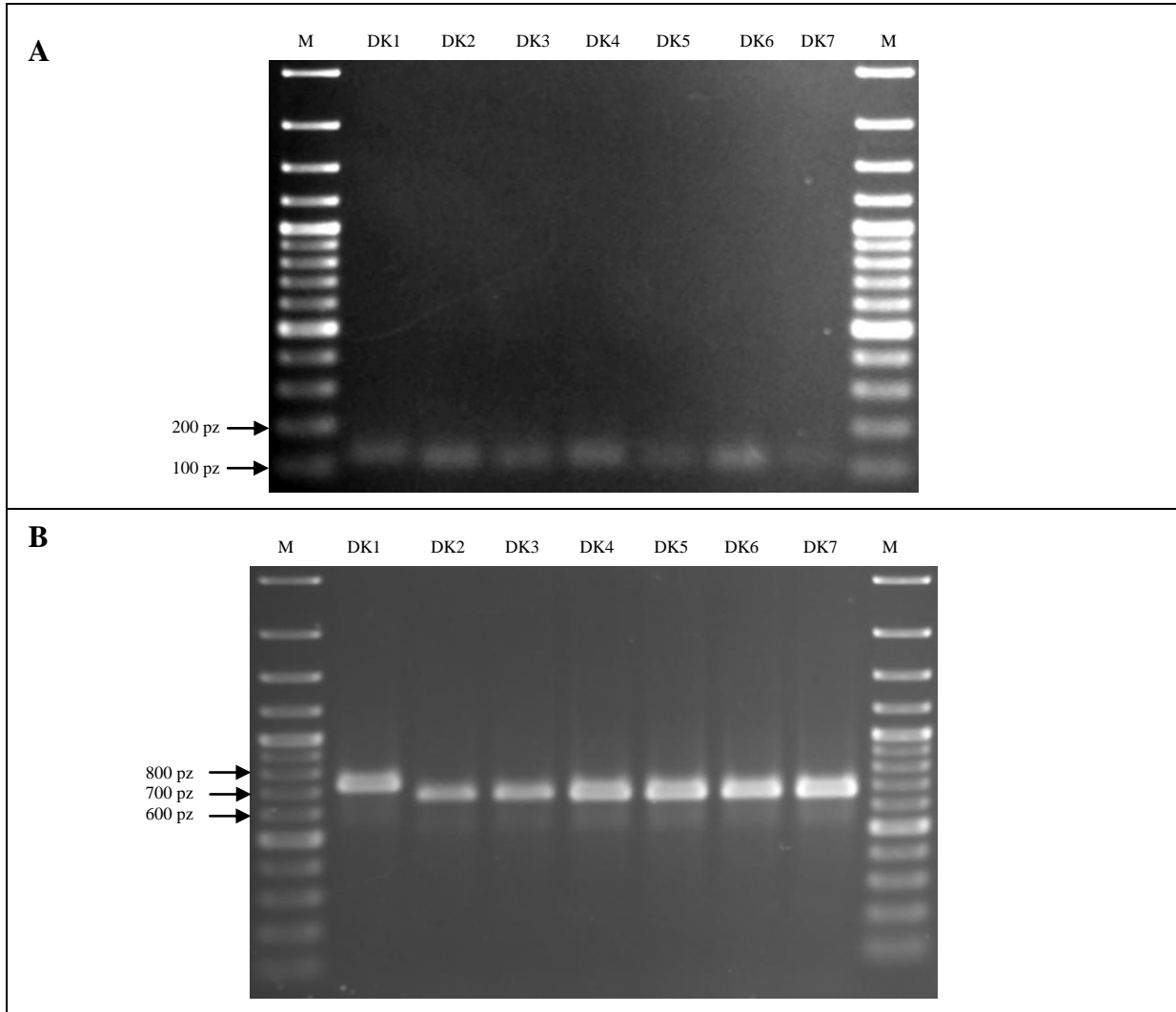
- [121] J. Zdziarski, C. Svanborg, B. Wullt, J. Hacker, i U. Dobrindt, „Molecular Basis of Commensalism in the Urinary Tract: Low Virulence or Virulence Attenuation?“, *Infect Immun*, t. 76, nr 2, s. 695–703, luty 2008, doi: 10.1128/IAI.01215-07.
- [122] A. Brolund *i in.*, „Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007–2011“, *Clinical Microbiology and Infection*, t. 20, nr 6, s. O344–O352, cze. 2014, doi: 10.1111/1469-0691.12413.
- [123] G. R. Whitmer, G. Moorthy, i M. Arshad, „The pandemic *Escherichia coli* sequence type 131 strain is acquired even in the absence of antibiotic exposure“, *PLoS Pathog*, t. 15, nr 12, s. e1008162, grudz. 2019, doi: 10.1371/journal.ppat.1008162.
- [124] B. A. Rogers, H. E. Sidjabat, i D. L. Paterson, „*Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain“, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, t. 66, nr 1, s. 1–14, sty. 2011, doi: 10.1093/jac/dkq415.
- [125] T. M. Gibreel, A. R. Dodgson, J. Cheesbrough, A. J. Fox, F. J. Bolton, i M. Upton, „Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England“, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, t. 67, nr 2, s. 346–356, luty 2012, doi: 10.1093/jac/dkr451.
- [126] F. R. Pinto, J. Melo-Cristino, i M. Ramirez, „A Confidence Interval for the Wallace Coefficient of Concordance and Its Application to Microbial Typing Methods“, *PLoS ONE*, t. 3, nr 11, s. e3696, lis. 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0003696.
- [127] G. Rasschaert, K. Houf, H. Imberechts, K. Grijspeerdt, L. De Zutter, i M. Heyndrickx, „Comparison of Five Repetitive-Sequence-Based PCR Typing Methods for Molecular Discrimination of *Salmonella enterica* Isolates“, *J Clin Microbiol*, t. 43, nr 8, s. 3615–3623, sie. 2005, doi: 10.1128/JCM.43.8.3615-3623.2005.
- [128] B. R. Mohapatra, K. Broersma, i A. Mazumder, „Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds“, *FEMS Microbiology Letters*, t. 277, nr 1, s. 98–106, grudz. 2007, doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00948.x.
- [129] P. Švec, D. Nováková, L. Žáčková, M. Kukletová, i I. Sedláček, „Evaluation of (GTG)₅-PCR for rapid identification of *Streptococcus mutans*“, *Antonie van Leeuwenhoek*, t. 94, nr 4, s. 573–579, lis. 2008, doi: 10.1007/s10482-008-9275-6.
- [130] A. Ryberg, C. Olsson, S. Ahrné, i H.-J. Monstein, „Comparison of (GTG)₅-oligonucleotide and ribosomal intergenic transcribed spacer (ITS)-PCR for molecular typing of *Klebsiella* isolates“, *Journal of Microbiological Methods*, t. 84, nr 2, s. 183–188, luty 2011, doi: 10.1016/j.mimet.2010.11.019.
- [131] A. H. A. M. van Hoek *i in.*, „Comparative genomics reveals a lack of evidence for pigeons as a main source of stx2f-carrying *Escherichia coli* causing disease in humans and the common existence of hybrid Shiga toxin-producing and enteropathogenic *E. coli* pathotypes“, *BMC Genomics*, t. 20, nr 1, s. 271, grudz. 2019, doi: 10.1186/s12864-019-5635-z.
- [132] T. J. Kidd, K. Grimwood, K. A. Ramsay, P. B. Rainey, i S. C. Bell, „Comparison of Three Molecular Techniques for Typing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Sputum Samples from Patients with Cystic Fibrosis“, *J Clin Microbiol*, t. 49, nr 1, s. 263–268, sty. 2011, doi: 10.1128/JCM.01421-10.

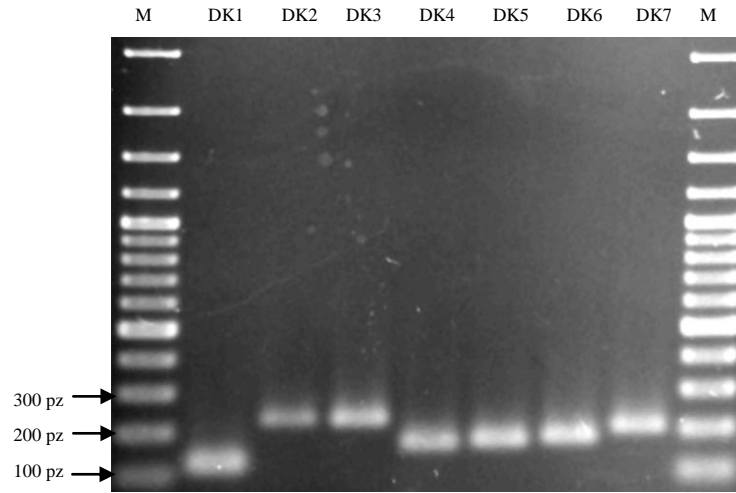
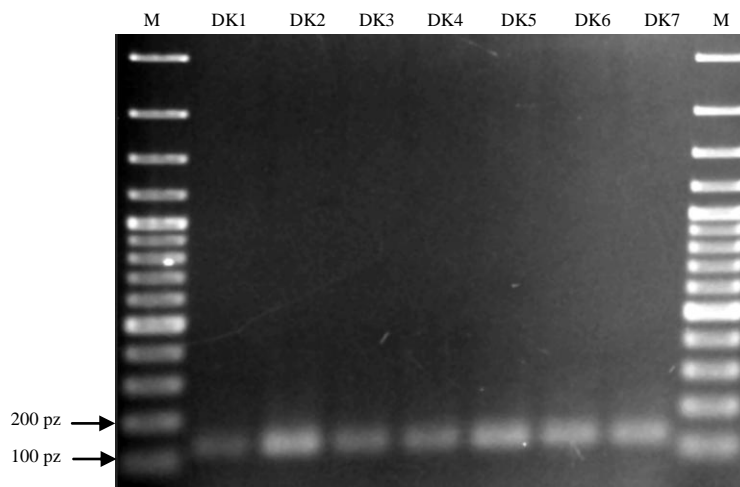
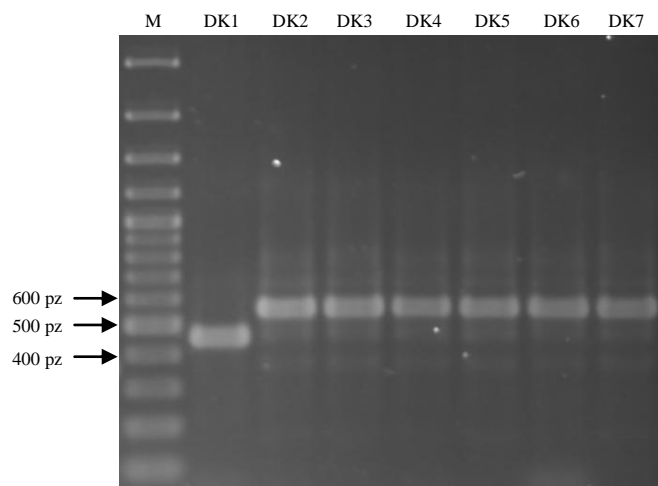
- [133] J. K. Johnson, S. M. Arduino, O. C. Stine, J. A. Johnson, i A. D. Harris, „Multilocus Sequence Typing Compared to Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa*”, *J Clin Microbiol*, t. 45, nr 11, s. 3707–3712, lis. 2007, doi: 10.1128/JCM.00560-07.
- [134] A. Lambiase, F. Rossano, O. Piazza, M. Del Pezzo, M. R. Catania, i R. Tufano, „Typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with VAP in an intensive care unit”, *New Microbiol*, t. 32, nr 3, s. 277–283, lip. 2009.
- [135] Y. J. Lau *i in.*, „DNA fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 by enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction and pulsed-field gel electrophoresis”, *Journal of Hospital Infection*, t. 31, nr 1, s. 61–66, wrz. 1995, doi: 10.1016/0195-6701(95)90084-5.
- [136] D. Martak *i in.*, „Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and whole-genome-sequencing-based typing confirms the accuracy of pulsed-field gel electrophoresis for the investigation of local *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks”, *Journal of Hospital Infection*, t. 105, nr 4, s. 643–647, sie. 2020, doi: 10.1016/j.jhin.2020.06.013.
- [137] V. Waters, J. E. A. Zlosnik, Y. C. W. Yau, D. P. Speert, S. D. Aaron, i D. S. Guttman, „Comparison of three typing methods for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis”, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, t. 31, nr 12, s. 3341–3350, grudz. 2012, doi: 10.1007/s10096-012-1701-z.
- [138] J. K. Spinler *i in.*, „Comparison of Whole Genome Sequencing and Repetitive Element PCR for Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain Typing”, *The Journal of Molecular Diagnostics*, t. 24, nr 2, s. 158–166, luty 2022, doi: 10.1016/j.jmoldx.2021.10.004.
- [139] H. Rajabi, H. Salimizand, M. Khodabandehloo, A. Fayyazi, i R. Ramazanzadeh, „Prevalence of *algD*, *pslD*, *pelF*, *PpgI*, and *PAPI-1* Genes Involved in Biofilm Formation in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Strains”, *BioMed Research International*, t. 2022, s. 1–7, maj 2022, doi: 10.1155/2022/1716087.
- [140] X. Yang, Y. Lai, C. Li, J. Yang, M. Jia, i J. Sheng, „Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from lower respiratory tract of ICU patients”, *Braz. J. Biol.*, t. 81, nr 2, s. 351–360, maj 2021, doi: 10.1590/1519-6984.226309.
- [141] A. Hematzadeh i M. Haghkhal, „Biotyping of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human infections by RAPD and ERIC-PCR”, *Heliyon*, t. 7, nr 9, s. e07967, wrz. 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07967.
- [142] M. Eladawy, M. El-Mowafy, M. M. A. El-Sokkary, i R. Barwa, „Antimicrobial resistance and virulence characteristics in ERIC-PCR typed biofilm forming isolates of *P. aeruginosa*”, *Microbial Pathogenesis*, t. 158, s. 105042, wrz. 2021, doi: 10.1016/j.micpath.2021.105042.
- [143] F. Nitz *i in.*, „Molecular Detection of Drug-Resistance Genes of *bla*OXA-23-*bla*OXA-51 and *mcr-1* in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*”, *Microorganisms*, t. 9, nr 4, s. 786, kwi. 2021, doi: 10.3390/microorganisms9040786.
- [144] S. Dahyot *i in.*, „Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Tandem Repeat Sequence Typing (TRST), helpful tools for subtyping *Staphylococcus lugdunensis*”, *Sci Rep*, t. 8, nr 1, s. 11669, grudz. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-30144-y.

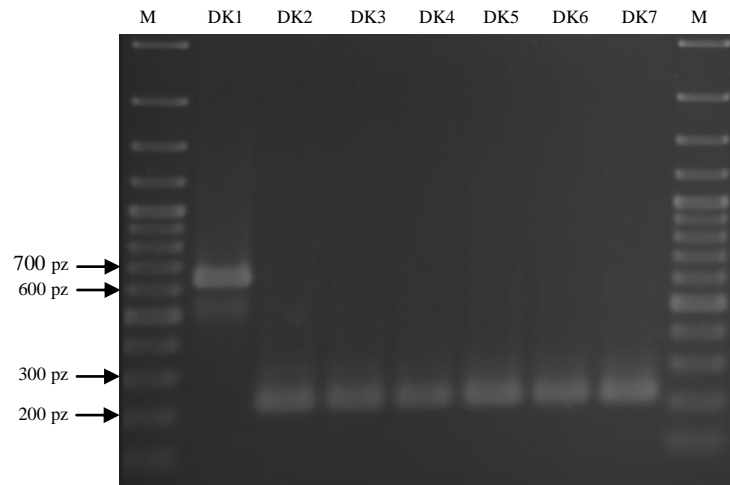
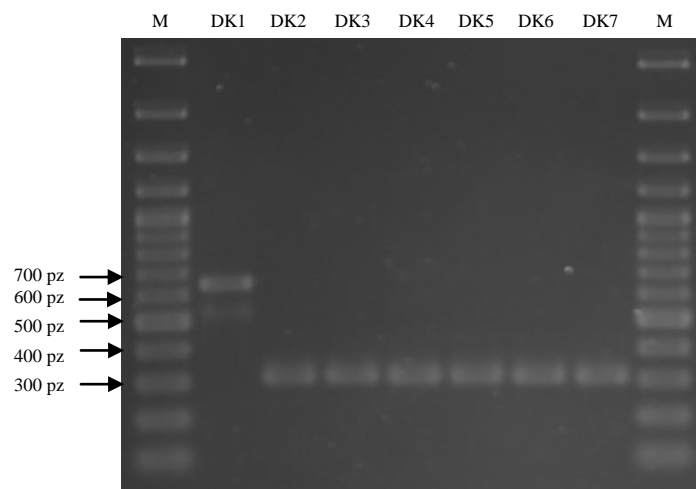
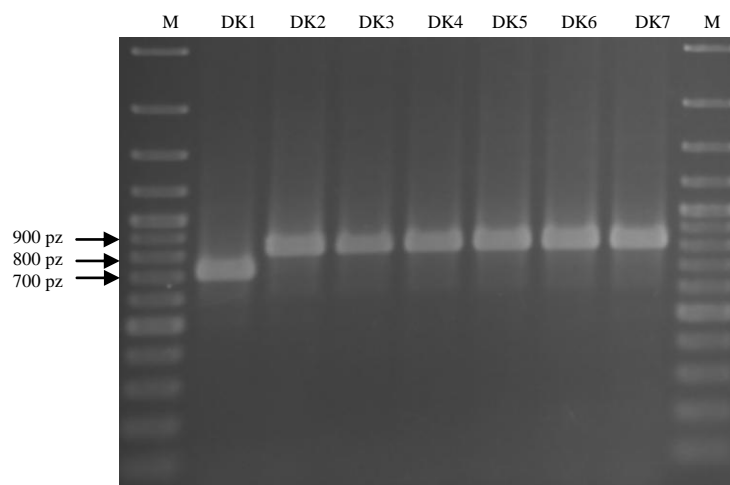
- [145] K. Prasad, D. Mayank, M. Anshuman, R. Singh, A. Afzal, i A. Baronia, „Nosocomial cross-transmission of *Pseudomonas aeruginosa* between patients in a tertiary intensive care unit”, *Indian J Pathol Microbiol*, t. 52, nr 4, s. 509, 2009, doi: 10.4103/0377-4929.56143.
- [146] T. L. Pitt, „Cross infection of cystic fibrosis patients with *Pseudomonas aeruginosa*”, *Thorax*, t. 57, nr 11, s. 921–921, lis. 2002, doi: 10.1136/thorax.57.11.921.
- [147] C. Cigana *i in.*, „Genotypic and phenotypic relatedness of *Pseudomonas aeruginosa* isolates among the major cystic fibrosis patient cohort in Italy”, *BMC Microbiol*, t. 16, nr 1, s. 142, grudz. 2016, doi: 10.1186/s12866-016-0760-1.
- [148] M. A. Middleton *i in.*, „Epidemiology of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Canadian Cystic Fibrosis Population”, *Annals ATS*, t. 15, nr 7, s. 827–836, lip. 2018, doi: 10.1513/AnnalsATS.201801-007OC.

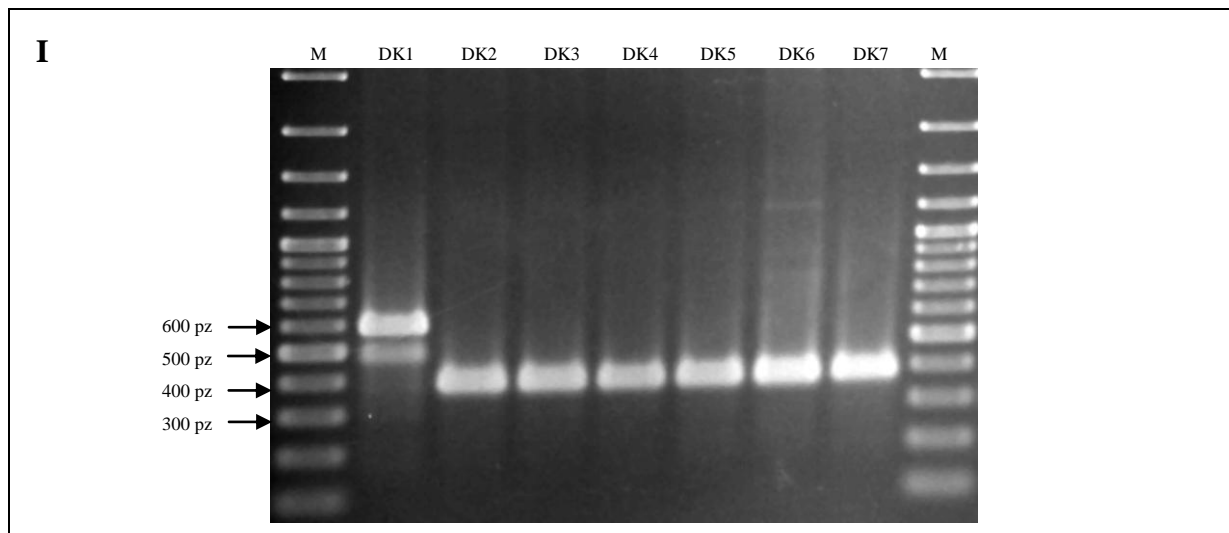
17.ZAŁĄCZNIK

Zdjęcia analiz MLVA dla pacjentów DK, DP, DPA, JK, KP, LA, PA, uwzględnionych w badaniach.

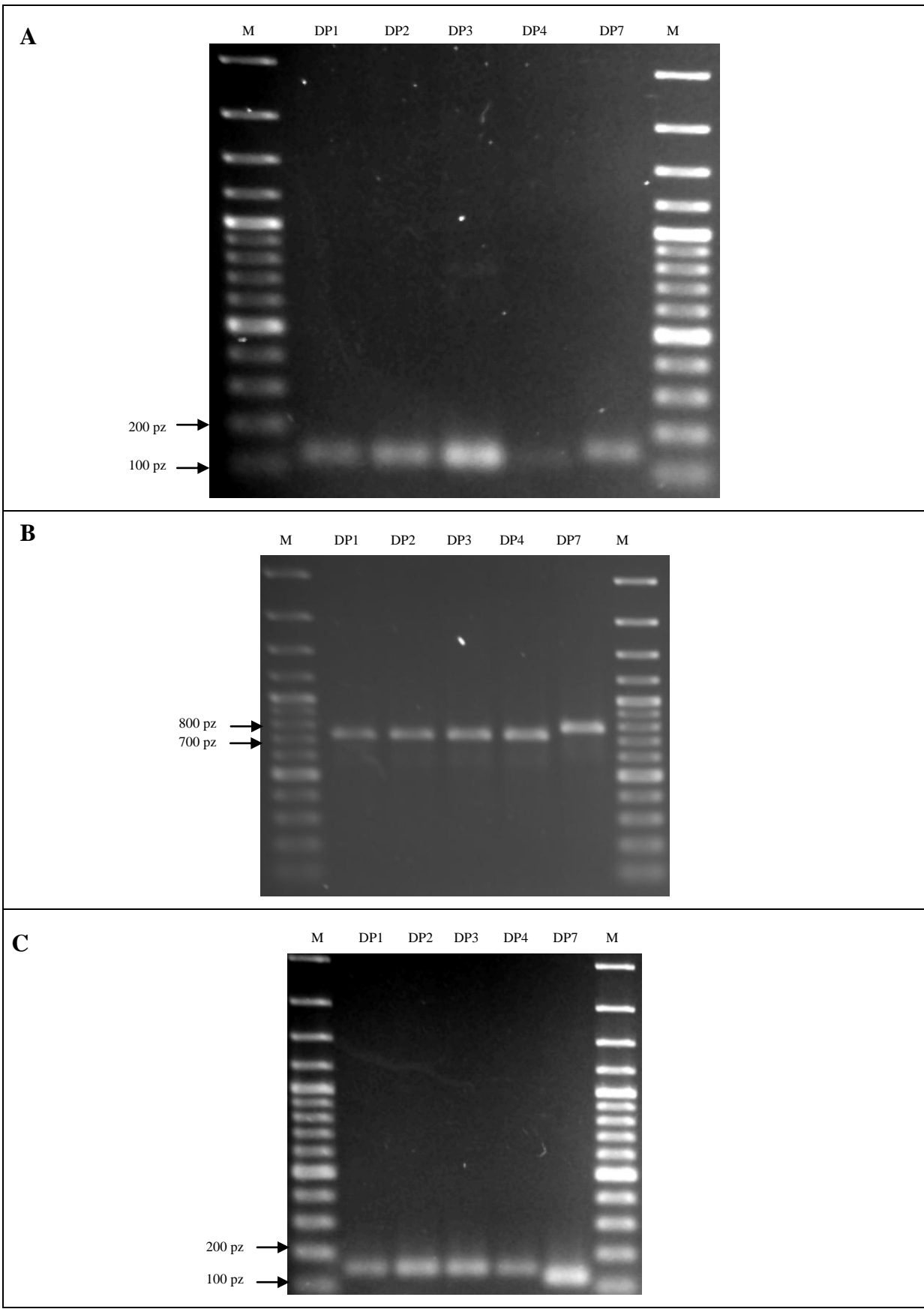


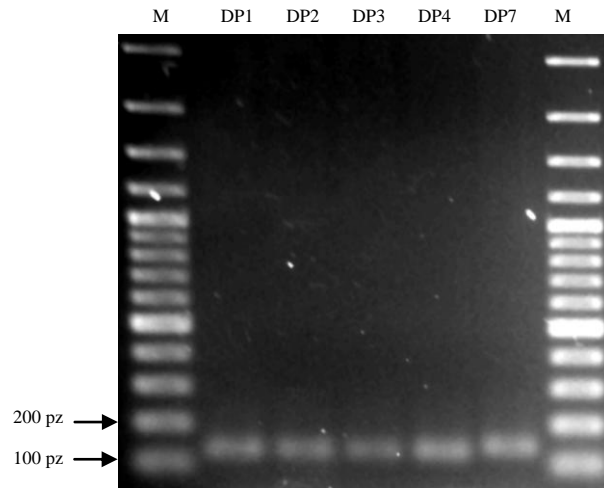
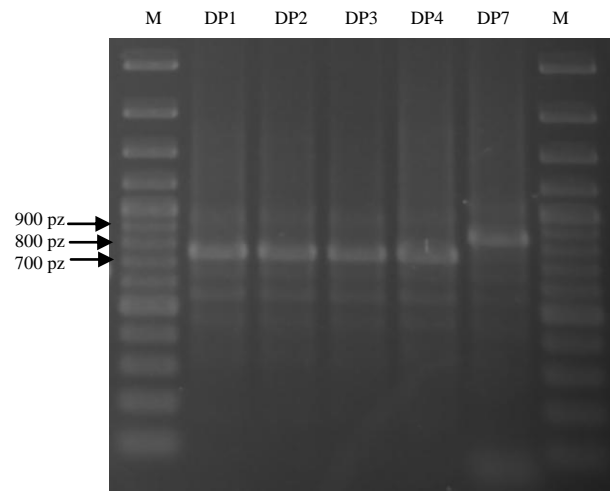
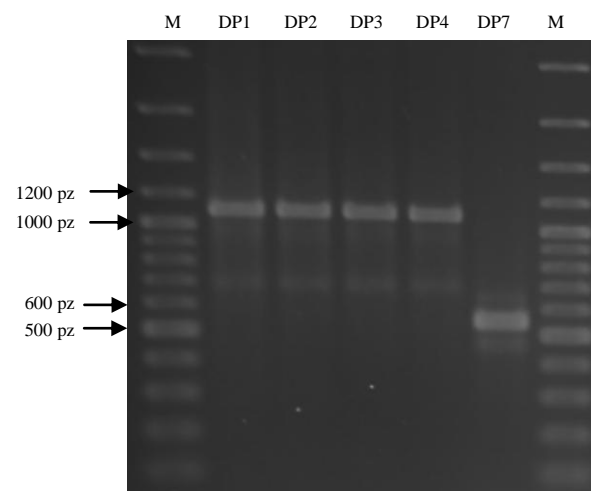
C**D****E**

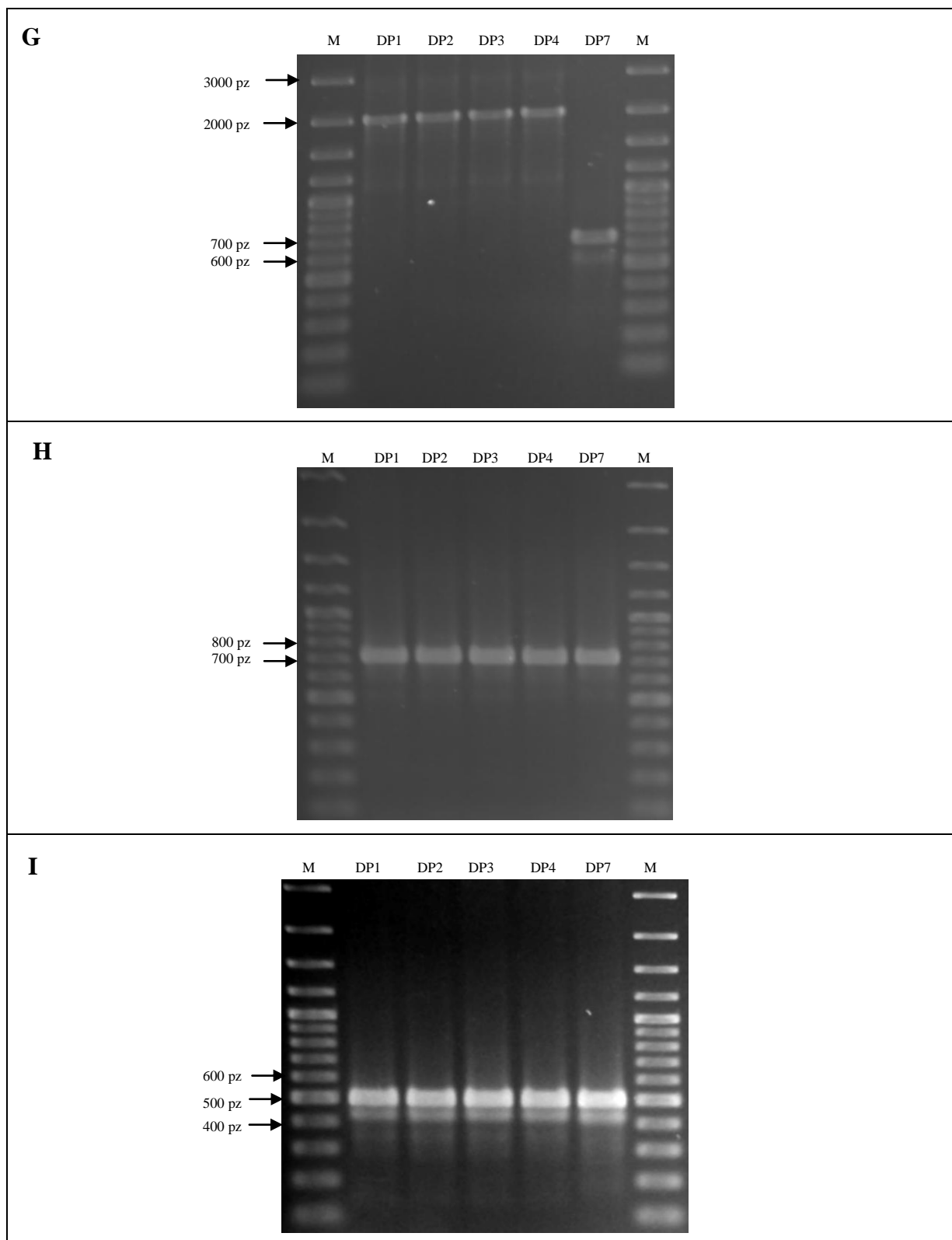
F**G****H**



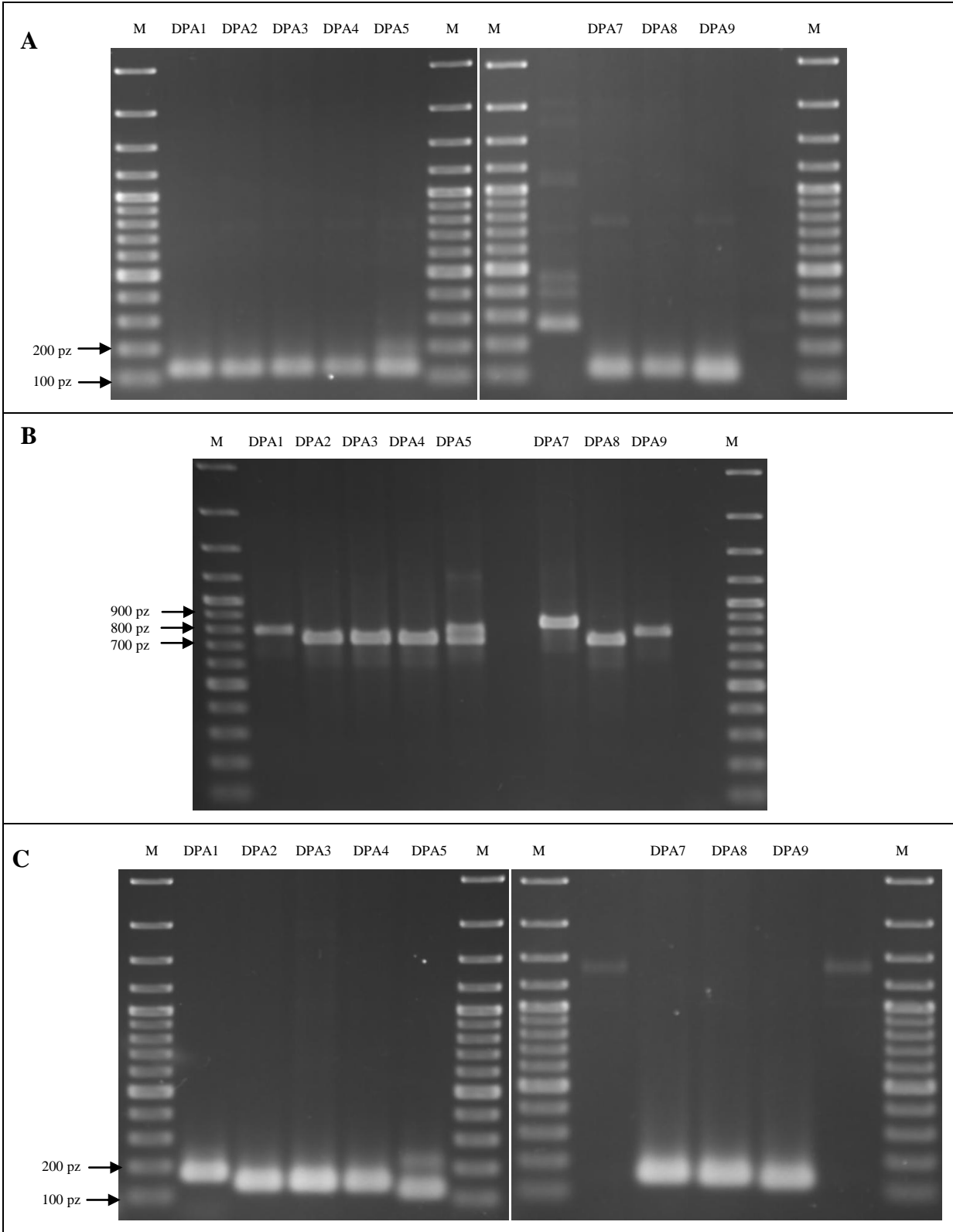
Rysunek S1. Zdjęcia rozdziałów elektroforetycznych otrzymanych dla produktów PCR po analizie MLVA dla izolatów *P. aeruginosa* pozyskanych od pacjenta oznaczonego symbolem DK dla poszczególnych VNTR: A - ms061; B - ms172; C - ms207; D - ms209; E - ms211; F - ms213; G - ms214; H - ms217; I - ms222 (M – marker 100bp Plus, pz – par zasad).

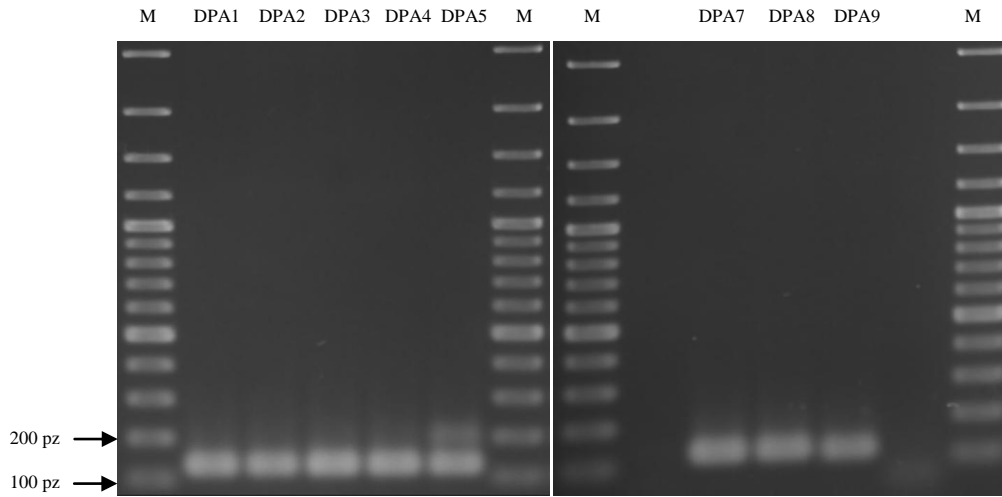
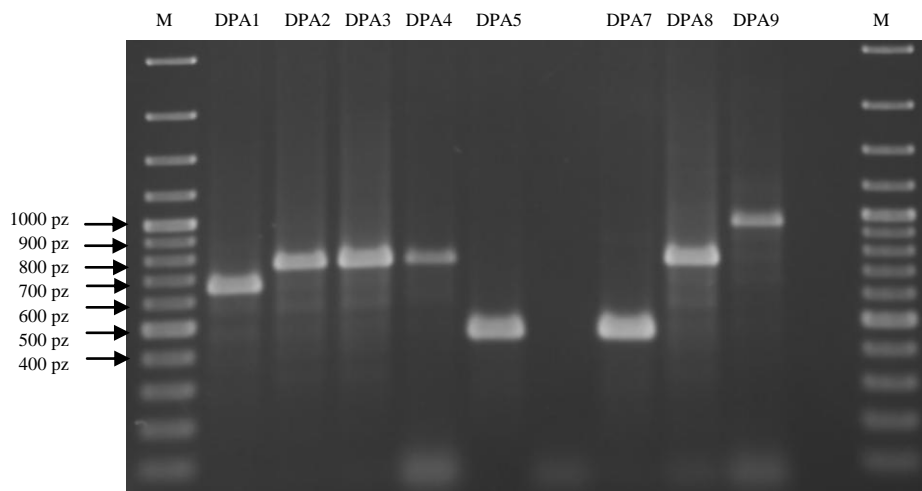
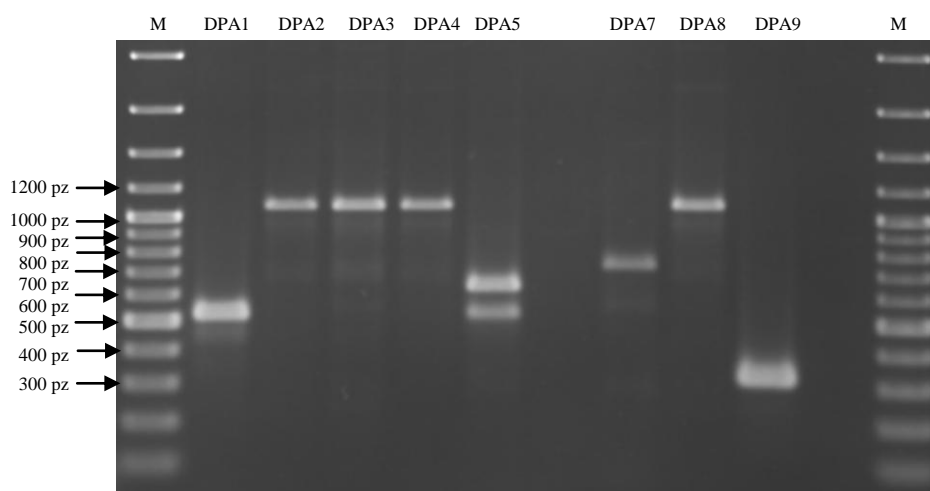


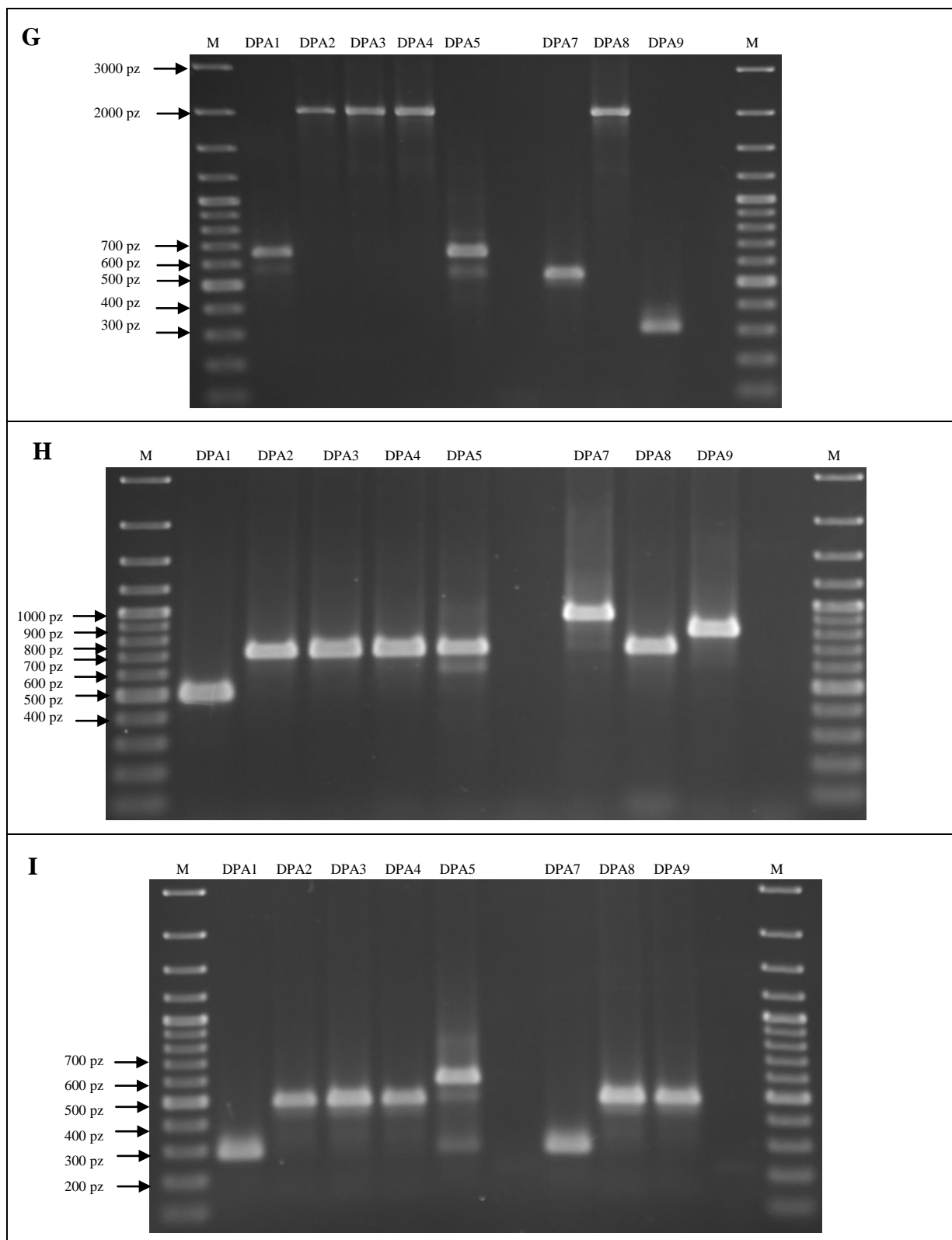
D**E****F**



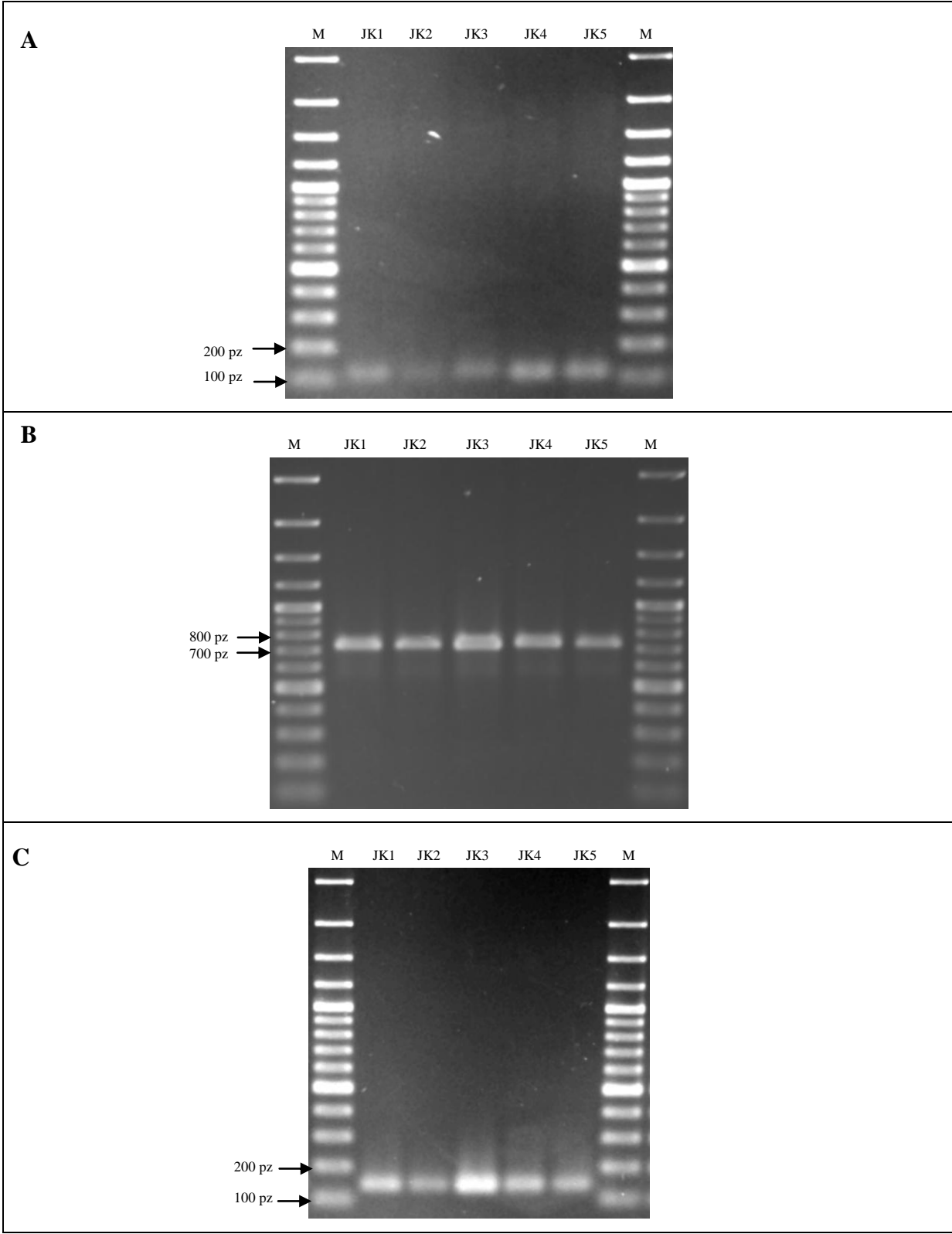
Rysunek Nr S2. Zdjęcia rozdziałów elektroforetycznych otrzymanych dla produktów PCR po analizie MLVA dla izolatów *P. aeruginosa* pozyskanych od pacjenta oznaczonego symbolem DP dla poszczególnych VNTR: A - ms061; B - ms172; C - ms207; D - ms209; E - ms211; F - ms213; G - ms214; H - ms217; I - ms222 (M – marker 100bp Plus, pz – par zasad).

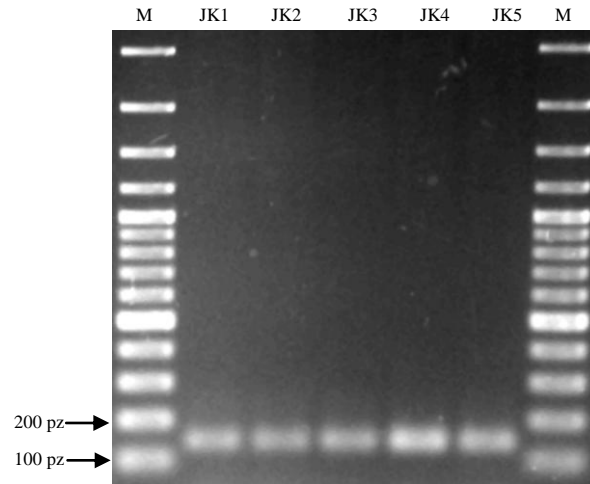
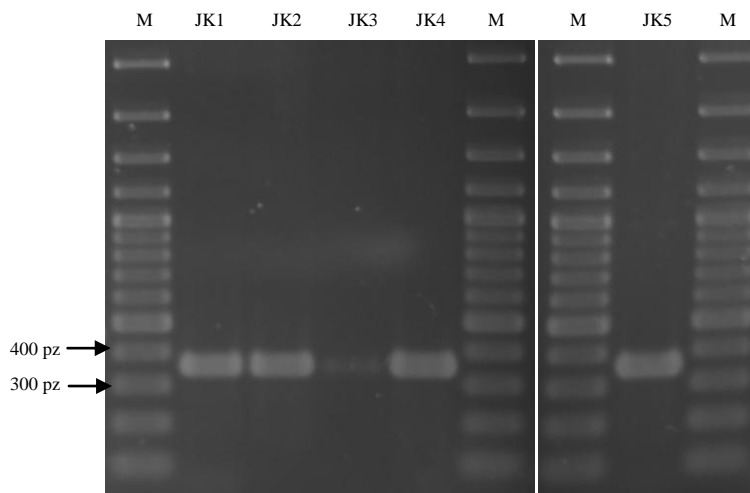
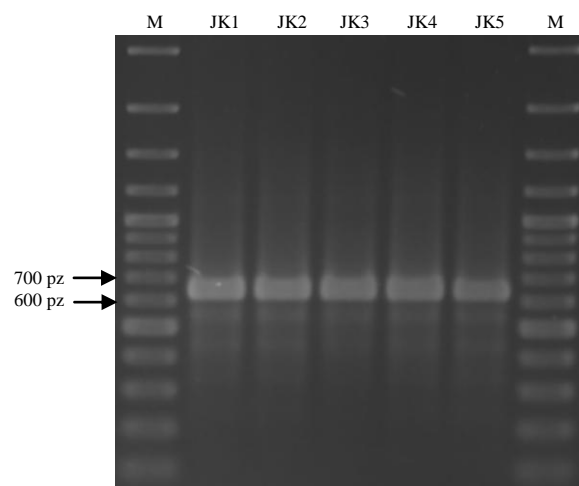


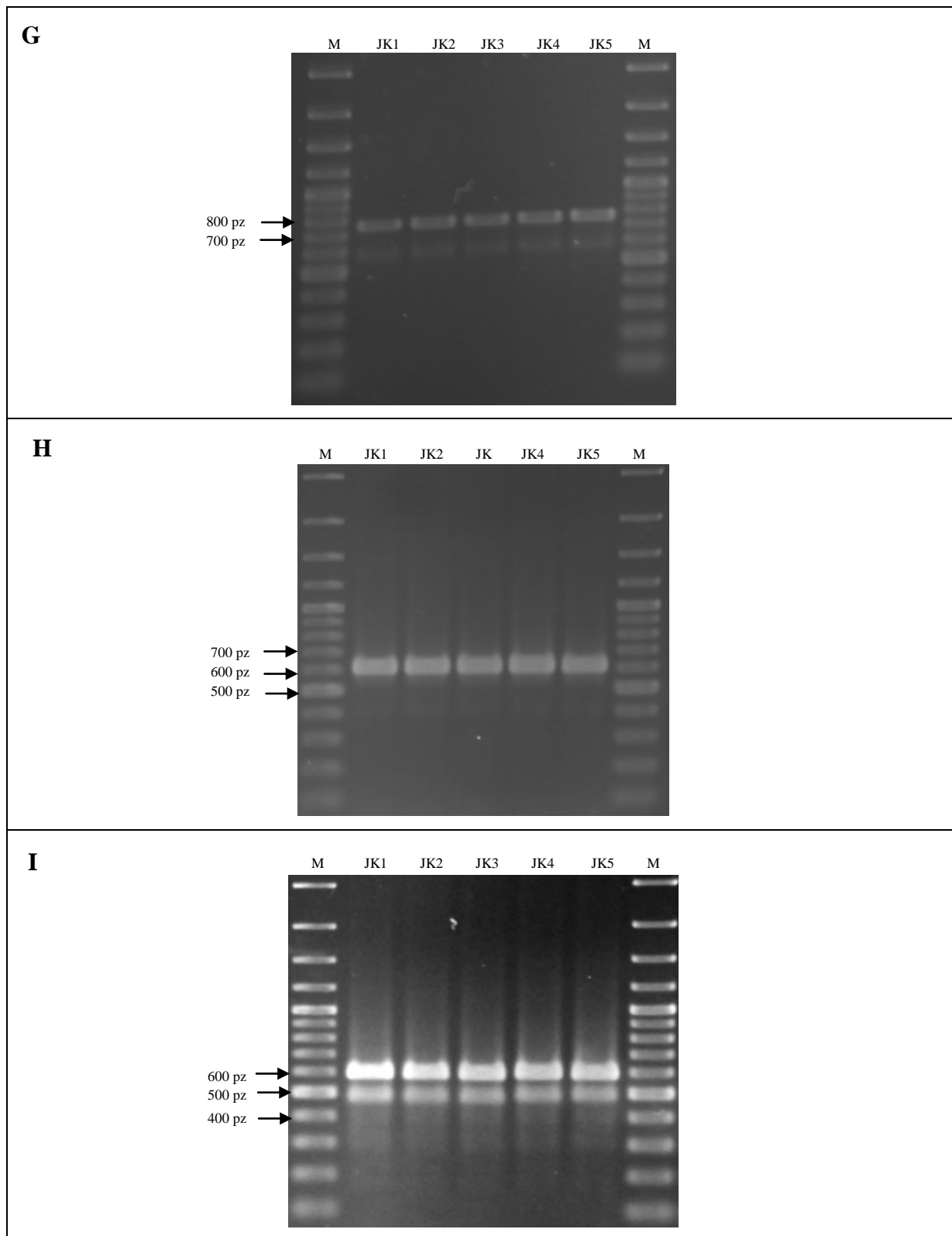
D**E****F**



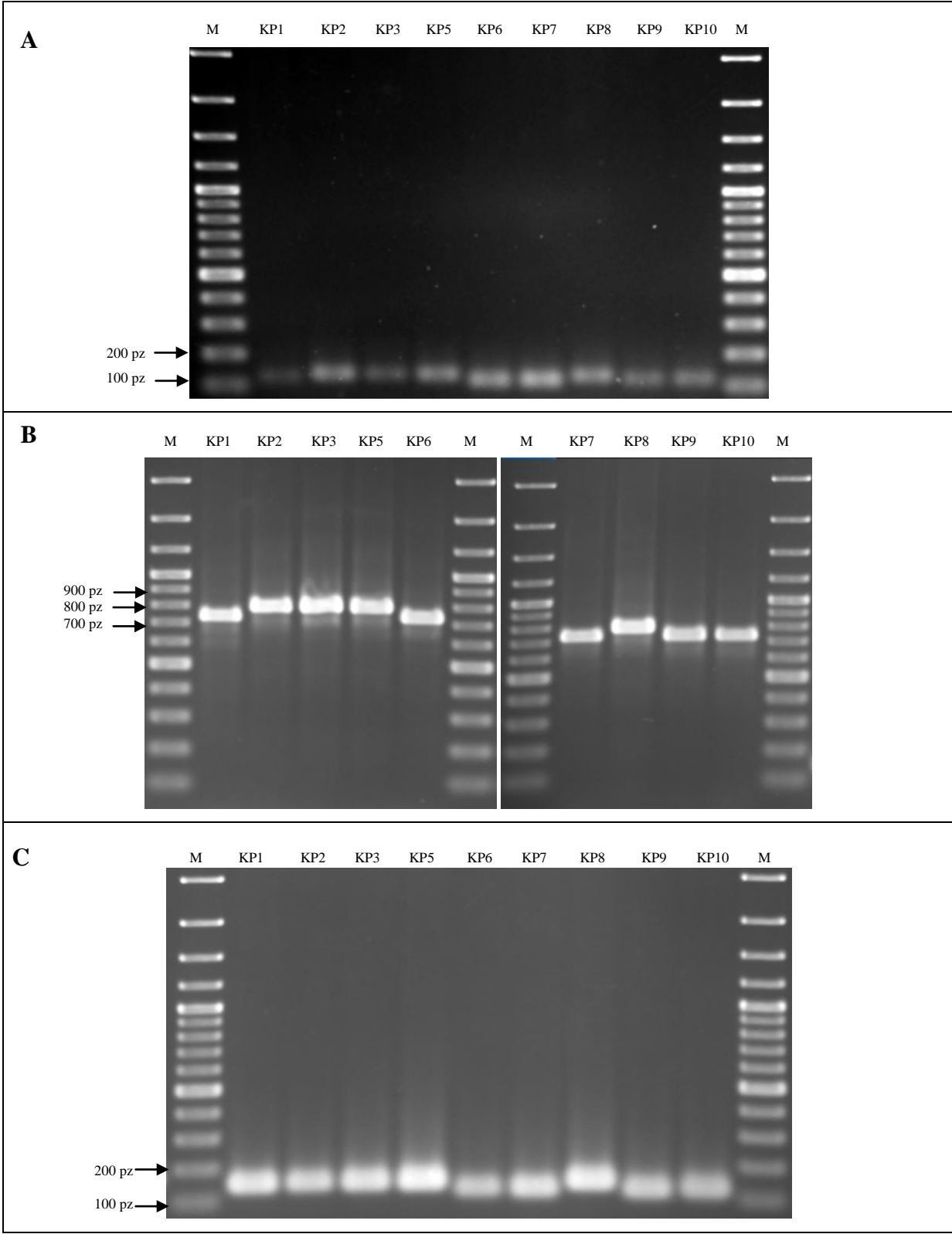
Rysunek Nr S3. Zdjęcia rozdziałów elektroforetycznych otrzymanych dla produktów PCR po analizie MLVA dla izolatów *P. aeruginosa* pozyskanych od pacjenta oznaczonego symbolem DPA dla poszczególnych VNTR: A - ms061; B - ms172; C - ms207; D - ms209; E - ms211; F - ms213; G - ms214; H - ms217; I - ms222 (M – marker 100bp Plus, pz – par zasad).

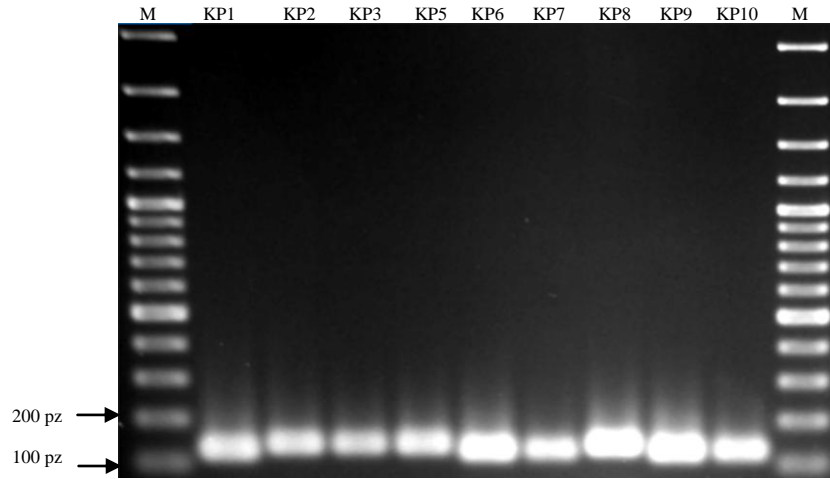
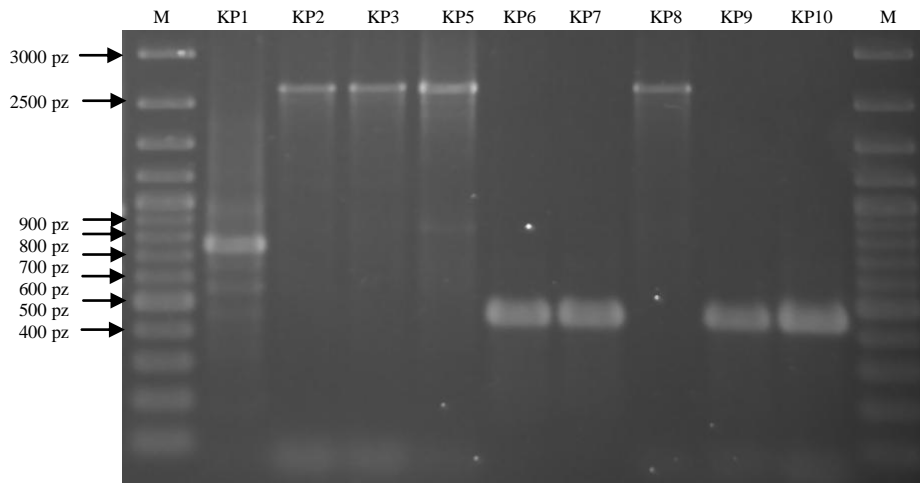
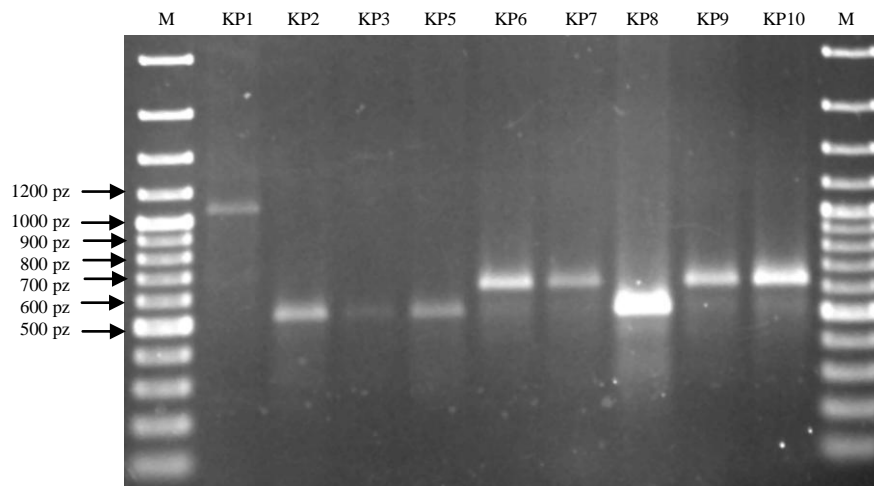


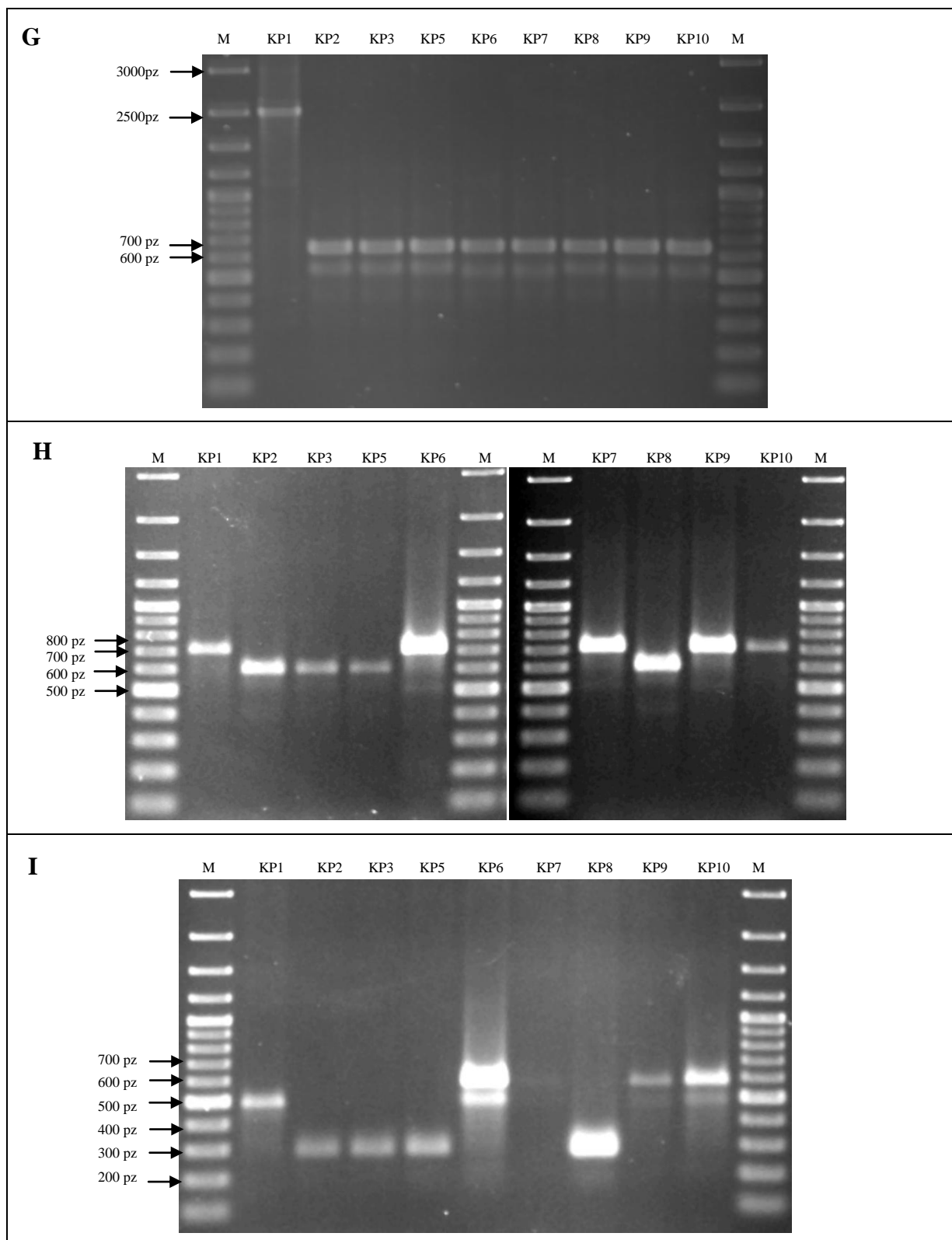
D**E****F**



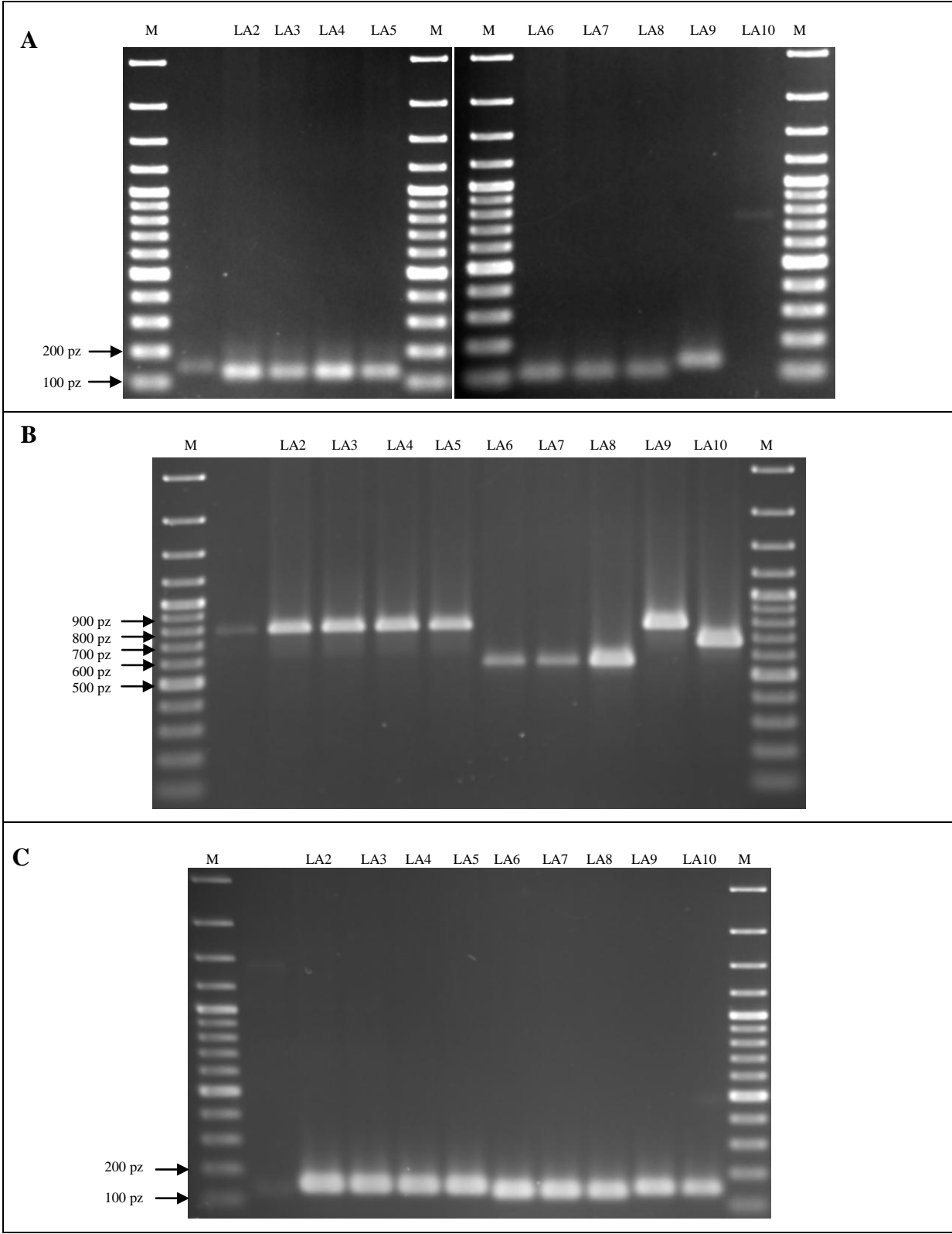
Rysunek Nr S4. Zdjęcia rozdziałów elektroforetycznych otrzymanych dla produktów PCR po analizie MLVA dla izolatów *P. aeruginosa* pozyskanych od pacjenta oznaczonego symbolem JK dla poszczególnych VNTR: A - ms061; B - ms172; C - ms207; D - ms209; E - ms211; F - ms213; G - ms214; H - ms217; I - ms222 (M – marker 100bp Plus, pz – par zasad).

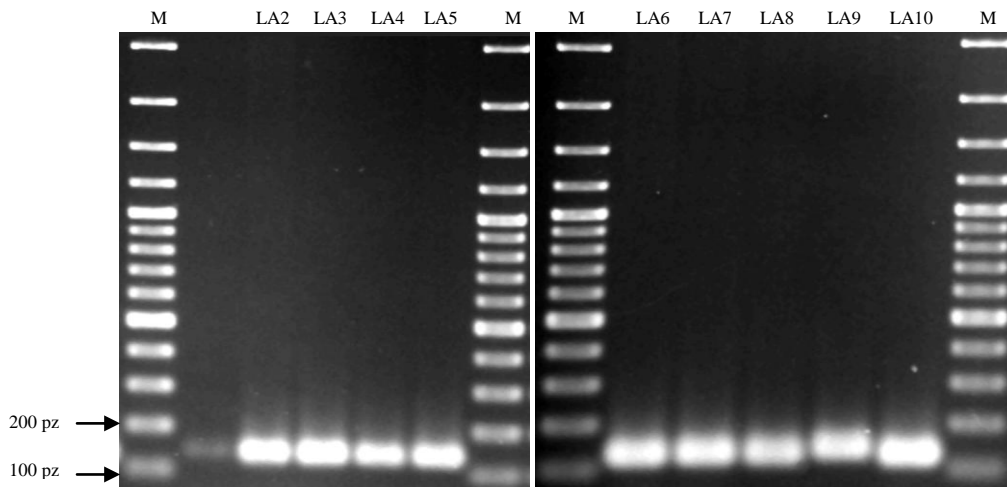
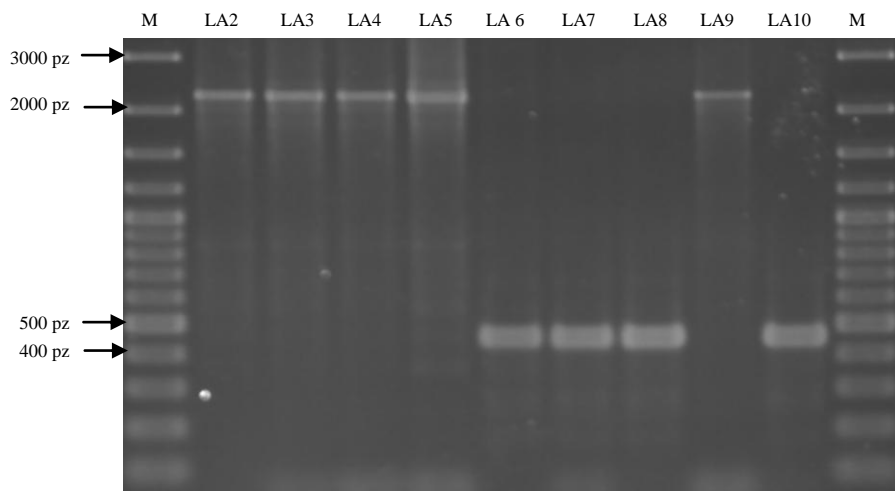
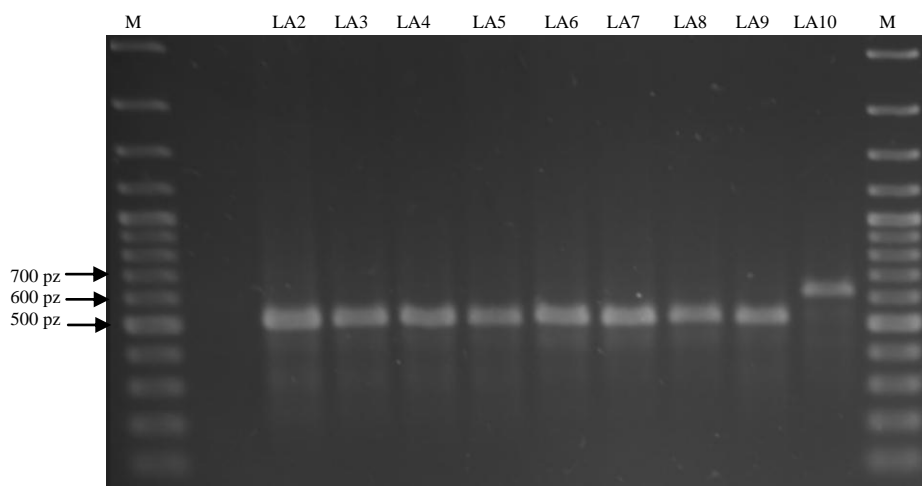


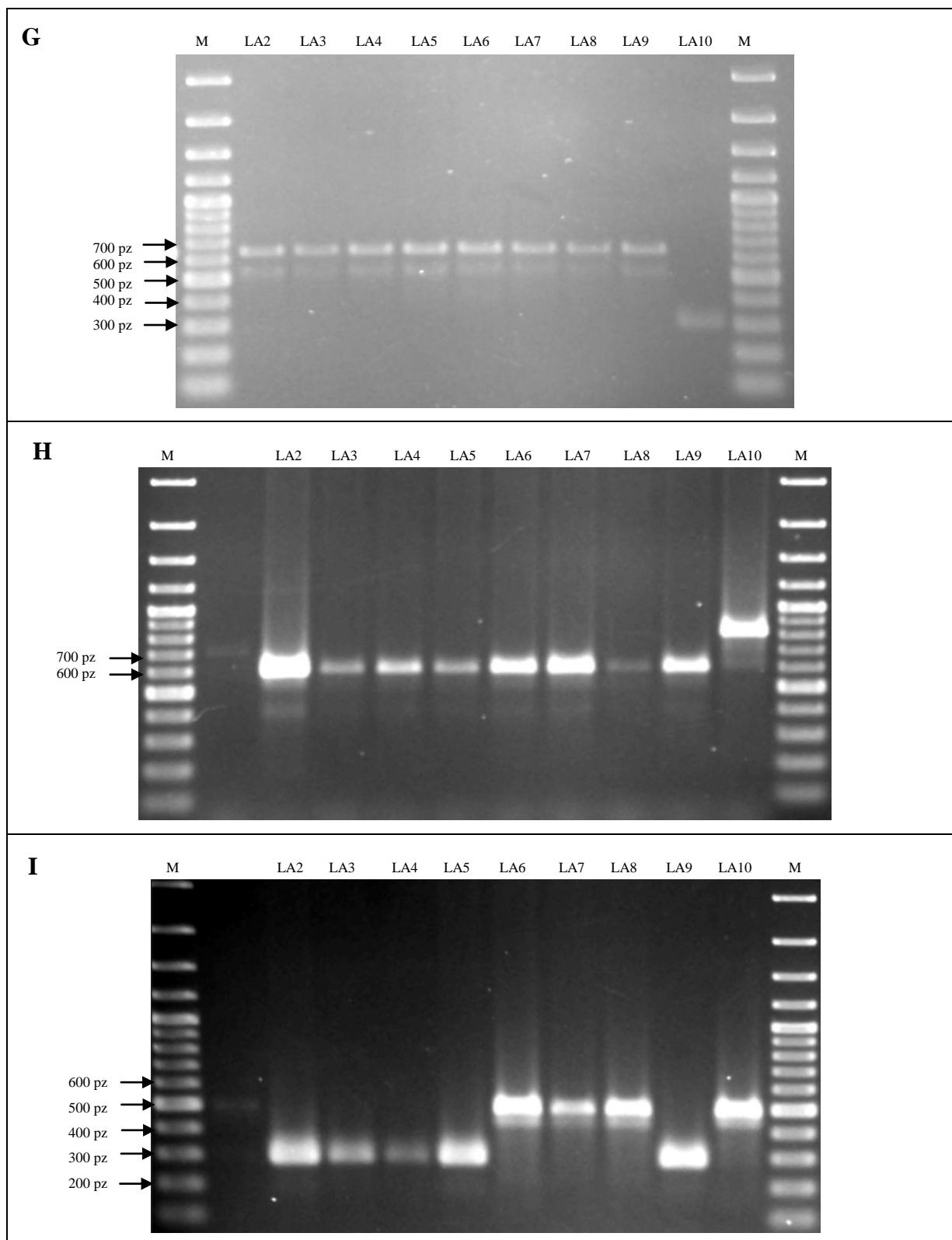
D**E****F**



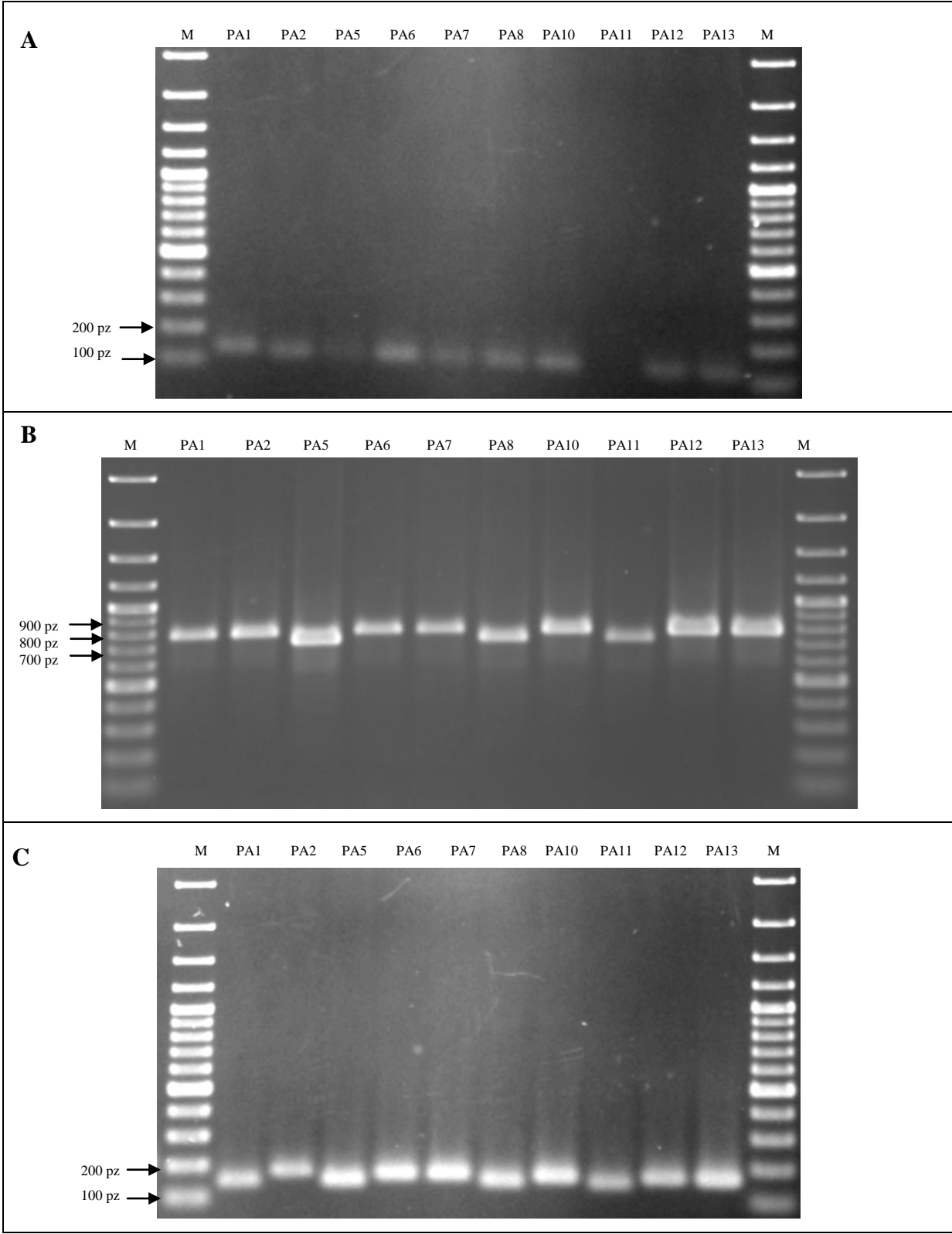
Rysunek Nr S5. Zdjęcia rozdziałów elektroforetycznych otrzymanych dla produktów PCR po analizie MLVA dla izolatów *P. aeruginosa* pozyskanych od pacjenta oznaczonego symbolem KP dla poszczególnych VNTR: A - ms061; B - ms172; C - ms207; D - ms209; E - ms211; F - ms213; G - ms214; H - ms217; I - ms222 (M – marker 100bp Plus, pz – par zasad).

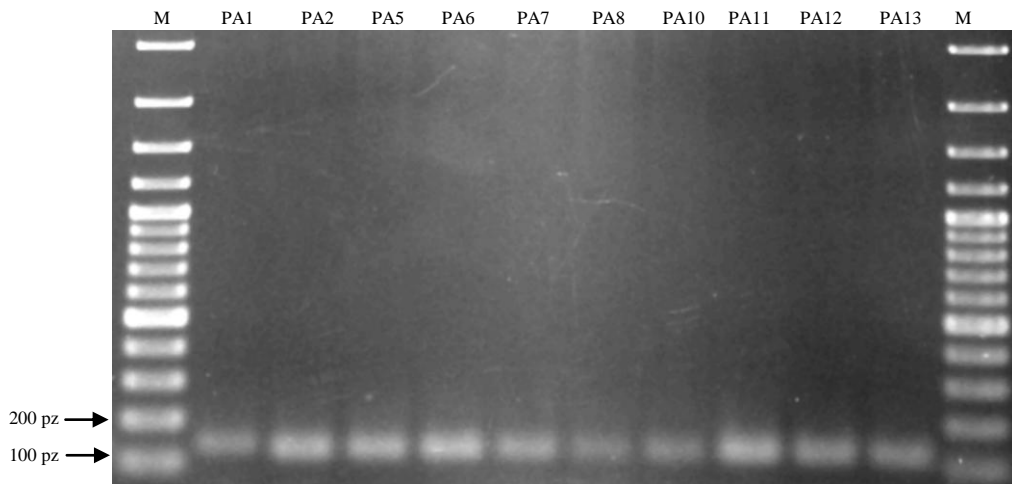
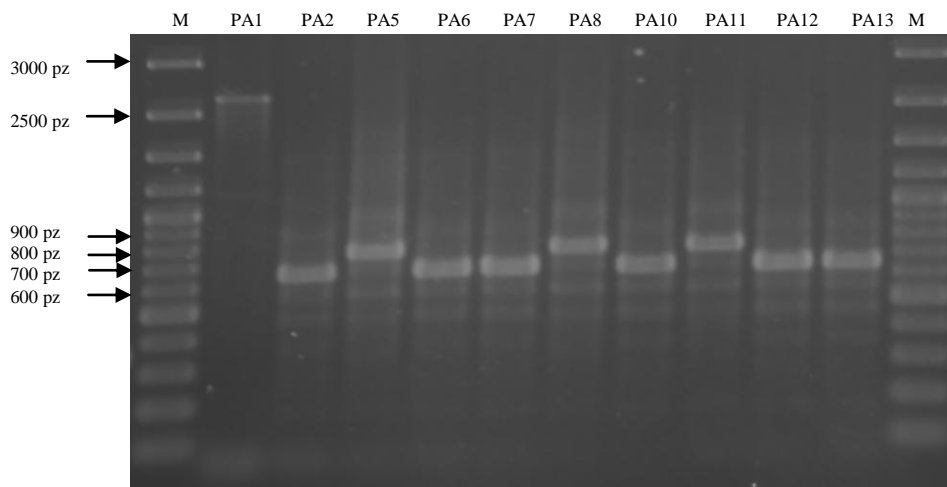
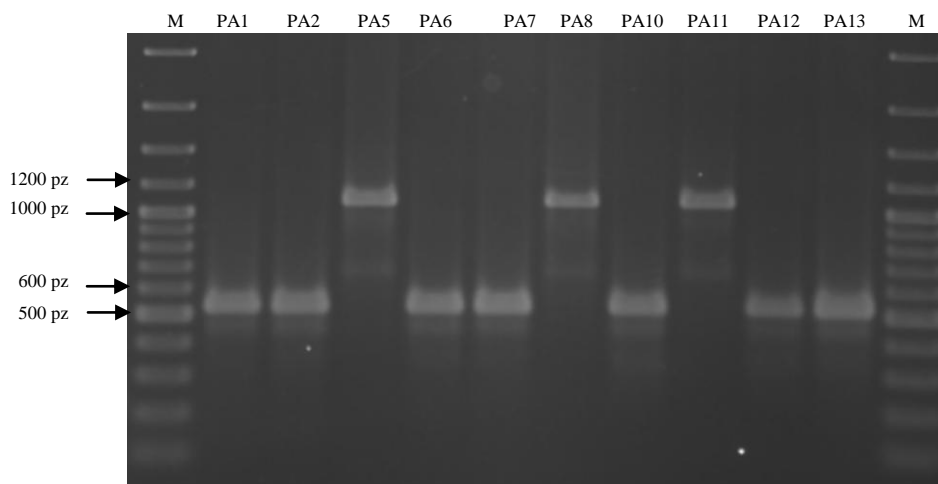


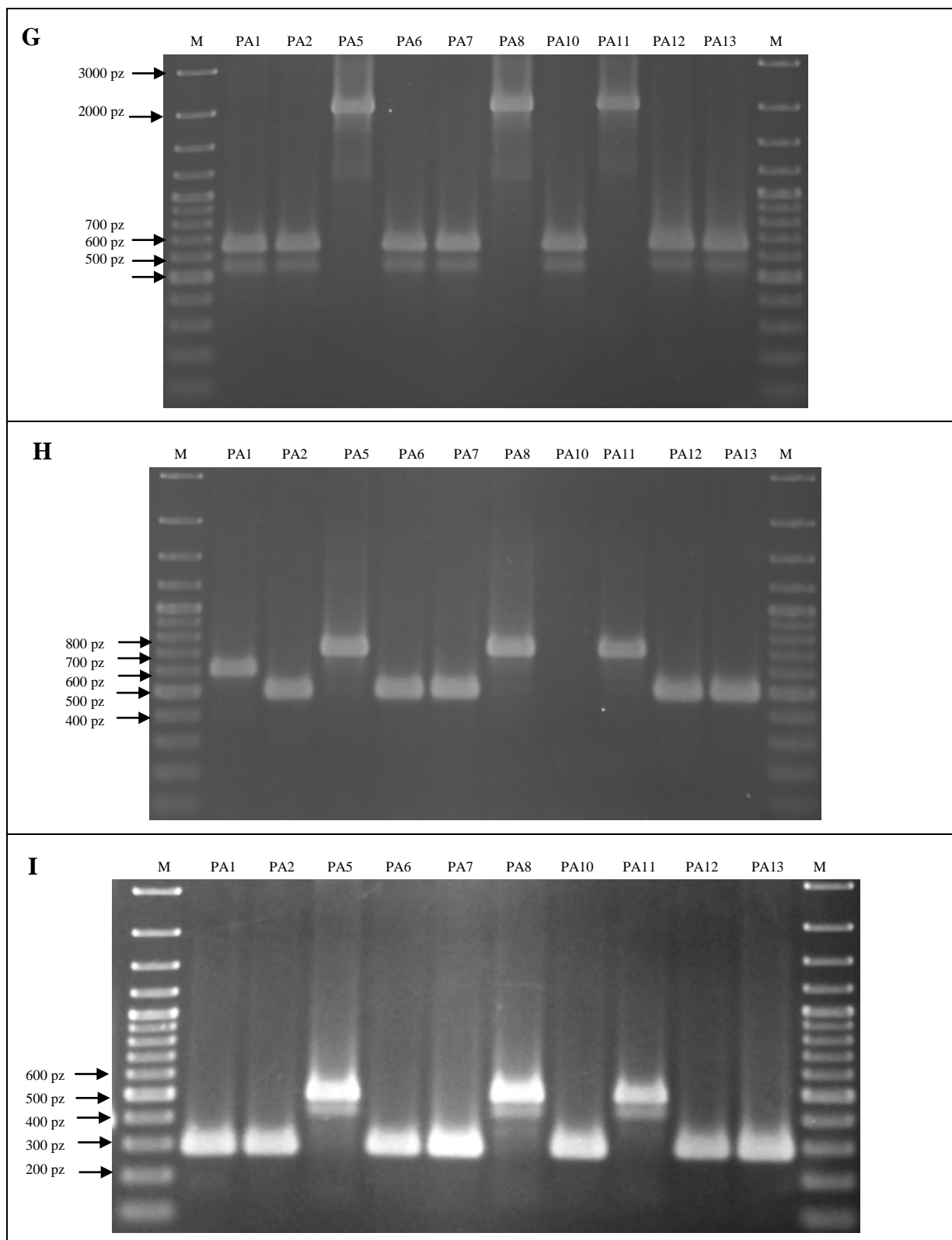
D**E****F**



Rysunek Nr S6. Zdjęcia rozdziałów elektroforetycznych otrzymanych dla produktów PCR po analizie MLVA dla izolatów *P. aeruginosa* pozyskanych od pacjenta oznaczonego symbolem LA dla poszczególnych VNTR: A - ms061; B - ms172; C - ms207; D - ms209; E - ms211; F - ms213; G - ms214; H - ms217; I - ms222 (M – marker 100bp Plus, pz – par zasad).



D**E****F**



Rysunek Nr S7. Zdjęcia rozdziałów elektroforetycznych otrzymanych dla produktów PCR po analizie MLVA dla izolatów *P. aeruginosa* pozyskanych od pacjenta oznaczonego symbolem PA dla poszczególnych VNTR: A - ms061; B - ms172; C - ms207; D - ms209; E - ms211; F - ms213; G - ms214; H - ms217; I - ms222 (M – marker 100bp Plus, pz – par zasad)

