

JOANNA KAZIMIERCZAK

**OPRACOWANIE METODY DIAGNOSTYCZNEJ
DO IDENTYFIKACJI SZCZEPÓW
ESCHERICHIA COLI PATOGENNYCH DLA DROBIU**

*Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr. hab. Jarosława Dastycha
oraz dr. Dominika Strapagiela, prof. UŁ
w Proteon Pharmaceuticals S.A. w Łodzi*

*Badania współfinansowane ze środków unijnych
w ramach projektu POIR.01.01.01-00-0149/16
„Zintegrowany system diagnostyki i prewencji zakażeń patogennych *E. coli* w stadach drobiu”
w ramach działania 1.1 „Projekty B+R przedsiębiorstw”,
Poddziałania 1.1.1 „Badania przemysłowe i prace rozwojowe realizowane przez przedsiębiorstwa”
Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój*



**Fundusze
Europejskie**
Inteligentny Rozwój



MINISTERSTWO
ROZWOJU

Unia Europejska
Europejski Fundusz
Rozwoju Regionalnego



Życiorys naukowy

Wykształcenie

- 07.2013 – Uzyskanie tytułu magistra, Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Centrum Kształcenia Międzynarodowego. Tytuł pracy: “Production of scaffolds from bionanocellulose for potential cartilage regeneration”.
- 02.2012 – Uzyskanie tytułu inżyniera, Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Centrum Kształcenia Międzynarodowego. Tytuł pracy: “Application of transglutaminase in production of different sort of jams and jelly-like products”.

Publikacje

- M. Różański, A. Drzewiecka, J. Witaszewska, E. Wójcik, A. Guziński, B. Zimoń, R. Matusiak, J. Kazimierzak et al.* RT-qPCR based tests for SARS-CoV-2 detection in pooled saliva samples for massive population screening to monitor epidemics. *Sci Rep.* 2022;12(1):8082
- P. Tynecki, A. Guziński, J. Kazimierzak et al.* PhageAI - Bacteriophage Life Cycle Recognition with Machine Learning and Natural Language Processing. Under review, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.11.198606>
- E. A. Wójcik, M. Stańczyk, A. Wojtasik, J. D. Kowalska, M. Nowakowska, M. Łukasiak, M. Bartnicka, J. Kazimierzak, J. Dastyk.* Comprehensive evaluation of the safety and efficacy of BAFASAL[®] bacteriophage preparation for the reduction of *Salmonella* in the food chain. *Viruses* 2020, 12, 742
- J. D. Kowalska, J. Kazimierzak et al.* Growing trend of fighting infections in aquaculture environment - opportunities and challenges of phage therapy. *Antibiotics* 2020, 9, 301
- J. Kazimierzak et al.* Complete genome sequences of *Aeromonas* and *Pseudomonas* phages as a supportive tool for development of antibacterial treatment in aquaculture. *Virology journal*, 16(1), 4, 2019
- J. Kolsut et al.* In silico analysis of virulence associated genes in genomes of *Escherichia coli* strains causing colibacillosis in poultry. *J Vet Res* 61, 2017

Sumaryczny IF: 21,428

Komunikaty i doniesienia zjazdowe

P. Sowińska, M. Adamczyk, J. Kazimierzak et al. Presence of production strain's DNA in BAFASAL[®] preparation – one aspect of phage commercial product analyses. Viruses Of Microbes 2022, Guimaraes, Portugal

A. Pękala, E. Śmigielska, E. Wojda, J. Witaszewska, J. Kazimierzak et al. Bacteriophage preparation to prevent and control poultry infections. Oxford Bacteriophage Conference – Phages 2020 Virtual

J. Kazimierzak et al. A development of a bacteriophage cocktail based on example from aquaculture. 8th International Weigl Conference, Łódź, 2019

J. Kolsut et al. BAFADOR[®] - a bacteriophage preparation for aquaculture, conference BioMillennium 2017, Gdańsk

E. Górecka, J. Kolsut et al. Identification and molecular characteristics of bacteriophages active against fish pathogens, conference Jurata, 2014

Zgłoszenia patentowe

J. Dastych, E. A. Wójcik, A. Maszewska, M. Szymańska, P. Szewczyk, E. Górecka, J. Kazimierzak et al. A bacteriophage preparation in the form of a gel for the prevention or treatment of bacteria infections in dairy cattle farms, the method of its production and bacteriophage strains. No. of patent application: PCT/PL2022/050021

J. Dastych, E. A. Wójcik, A. Maszewska, M. Stańczyk, A. Pękala, E. Śmigielska, E. Wojda, J. Kazimierzak et al. Synergistic composition of phages and the method of obtaining thereof. No. of patent application: P.434485

J. Dastych, J. Kazimierzak et al. Method and system for detection of extraintestinal *E.coli* strains pathogenic to poultry. No. of patent application: P.431942

A. Wojtasik, E. Górecka, E. A. Wójcik, M. Stańczyk, J. Kolsut et al. Bacteriophage strains and their applications. International Publication Number: WO2017176136A1

Wprowadzenie

Kolibakterioza drobiu określana jest jako każde miejscowe albo ogólnoustrojowe zakażenie wywołane przez szczepy *Escherichia coli* patogenne dla ptaków (APEC – Avian Pathogenic *E. coli*). Na chorobę narażone są wszystkie gatunki ptactwa, jednak najczęściej diagnozuje się ją wśród kur, indyków i kaczek. Kolibakterioza rzadko występuje jako samodzielna jednostka chorobowa. Najczęściej poprzedzają ją: osłabienie odporności ptaków, uszkodzenia układu oddechowego, stres, złe warunki środowiskowe, zagęszczenie stada oraz niedobór niektórych składników odżywczych. Obecnie coraz częściej uważa się jednak, że szczepy APEC są bardzo dobrze przygotowane do funkcjonowania jako patogeny, co może świadczyć o tym, że zakażenia te nie zawsze muszą być oportunistyczne.

Kolibakterioza może pojawić się w wyniku horyzontalnego lub wertykalnego zakażenia bakteriami *Escherichia coli*, które wnikają do organizmu poprzez śluzówkę lub uszkodzoną skórę i kolonizują narządy wewnętrzne dzięki czynnikom adhezyjnym. Szczepy chorobotwórcze przedostają się przez śluzówkę do komórek nabłonka worków powietrznych, a następnie do płynów ustrojowych, wywołując ostrą reakcję zapalną prowadzącą do produkcji makrofagów i limfocytów. Szczepy wysoce patogenne powodują śmiertelność w krótkim czasie od zakażenia, natomiast mniej wirulentne wywołują zmiany chorobowe w tkankach na skutek osłabienia układu odpornościowego ptaków.

Jeśli chciano by opisać jednym słowem charakterystykę szczepów APEC, to byłaby to różnorodność. Grupa ta jest niezwykle heterogenna – różne szczepy mogą charakteryzować się obecnością różnych czynników wirulencji, a każdy z nich jest w stanie wywołać kolibakteriozę – nie istnieje archetypowy szczep APEC. Wynika to z faktu, że w swoim genomie *E. coli* posiada duży procent ruchomej puli genów nabywanych w wyniku HTG. W związku z powyższym, szczepy dostosowują się do zmieniającego się środowiska, a poprzez nowe kombinacje genów wirulencji wykazują coraz to większą zjadliwość. Co więcej, istnieje hipoteza, że obecność pewnych określonych czynników warunkujących patogenność zmienia się wraz z wiekiem ptaków i trudno jest wskazać geny, które odpowiadają za wirulencję, niezależnie od stadium rozwoju. Czynniki zjadliwości szczepów APEC można podzielić na następujące grupy: adhezyny, inwazy, czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza, protektyny i toksyny.

Poprawna diagnostyka kolibakteriozy i identyfikacja szczepów *E. coli* odpowiedzialnych za zakażenie stanowi duże wyzwanie. W pierwszym etapie próby powinny zostać poddane

ukierunkowanej diagnostyce *E.coli* i dopiero wtedy można poddać je dalszej charakterystyce w kierunku APEC. Ponieważ nie istnieje jednolity schemat diagnostyczny, w ocenie patogenności szczepów wykorzystywane są różne techniki, m.in. serotypowanie, analiza filogenetyczna, czy ocena występowania genów wirulencji.

Pomimo coraz większej liczby badań nad molekularnymi determinantami wirulencji w szczepach APEC, serotypowanie nadal pozostaje ważnym elementem diagnostyki, a istotnymi są serotypy: O1, O2 i O78. Analizy porównawcze zsekwencjonowanych genomów szczepów o serotypie O78 i szczepów o serotypach O1 lub O2 często charakteryzują się brakiem obecności tych samych genów wirulencji. Dodatkowo, posiadają też inną liczbę determinant patogenności i ruchomych elementów genetycznych. W związku z powyższym, wydaje się, że szczepy o tym serotypie mają inne, niezdefiniowane jeszcze mechanizmy zjadliwości. Potwierdza to również hipotezę, że szczepy APEC stanowią heterogenną grupę i korzystają z różnej kombinacji genów wirulencji, by wywołać infekcję. Analizy całego genomu wydają się być niezbędne w celu ustalenia kombinacji genów odpowiedzialnych za patogenność szczepu, zaś informacje dotyczące serotypu nie są wystarczające, by można było zaklasyfikować dany szczep jako wirulentny.

Bez dokładnej identyfikacji szczepów chorobotwórczych i zróżnicowania ich od szczepów komensalnych, nie ma możliwości odpowiedniego doboru terapii celowanej. Upowszechnienie się w ostatnich latach analiz sekwencji całych genomów (WGS) stwarza nowe możliwości w diagnostyce. Analizy porównawcze genomów oraz czynników odpowiedzialnych za wirulencję można przeprowadzać na niespotykaną wcześniej skalę. Daje to nadzieję na jednoznaczny dobór cech określających patotyp APEC i zaprojektowanie testu diagnostycznego w oparciu o wybrane czynniki.

Cel pracy

Głównym celem przedstawionej pracy było opracowanie metody diagnostycznej identyfikującej szczepy *E. coli* patogenne dla drobiu (APEC).

Cel ten zrealizowano poprzez następujące cele cząstkowe:

- Pozyskanie kolekcji szczepów *E. coli* od chorych i zdrowych ptaków.

- Zróżnicowanie szczepów w oparciu o dostępne metody genetyczne oraz zsekwencjonowanie genomów *E. coli*, zidentyfikowanych jako różne, technologią NGS.
- Wybór szerokiej puli genów związanych z chorobotwórczością szczepów APEC.
- Klasyfikację szczepów na patogenne i niepatogenne w oparciu o dane z modelu *in ovo*, wybrane geny i analizy bioinformatyczne.
- Opracowanie metody klasyfikacji szczepów na patogenne i niepatogenne w oparciu o występowanie jak najmniejszej liczby genów (maksymalnie 5) związanych z chorobotwórczością.
- Weryfikację przyjętej metody klasyfikacji w oparciu o parametry walidacyjne (czułość, specyficzność, dokładność, dodatnią i ujemną wartość predykcyjną) i krzywą ROC.

Metodyka badań

Szczepy bakteryjne *E. coli* z kolekcji Proteon Pharmaceuticals S.A. wykorzystywane w badaniach pochodziły od drobiu (brojlery, kury nioski, indyki, gęsi) i izolowane były zarówno od zwierząt z kolibakteriozą, jak również od zdrowych osobników w celu uzyskania szczepów komensalnych.

W pracy prowadzono hodowle bakteryjne w celu izolacji genomowego DNA, który następnie różnicowano przy zastosowaniu metody PCR MP i analizie w programie BioNumerics. Następnie, zróżnicowany DNA poddawano reakcji sekwencjonowania całych genomów (WGS) z wykorzystaniem technologii NGS na platformie Illumina NextSeq 500 w trybie sparowanych odczytów 2 x 150 pz. Przeprowadzono składanie genomów *de novo* (SPAdes). Genomy adnotowano (RAST) i analizowano w celu określenia serotypów, genów antybiotykooporności i obecności odpowiednich determinant wirulencji. Zaprojektowano test multiplex PCR (Primer-BLAST), który wykonano w celu wykazania zgodności danych laboratoryjnych z danymi *in silico*. Zaprojektowany test oceniano statystycznie w programie RStudio.

W pracy zastosowano także test na modelu zarodka kurzego w celu weryfikacji patogenności szczepów.

Wyniki i dyskusja

W prezentowanej pracy wykorzystano sekwencjonowanie całych genomów (WGS) 112 szczepów *E. coli* do przeprowadzenia szerokiej analizy bioinformatycznej w kierunku obecności wybranych 194 czynników wirulencji, zdefiniowania serotypów czy weryfikacji obecności markerów antybiotykooporności. Dodatkowo, przeprowadzono analizę PCR grup filogenetycznych badanych szczepów *E. coli* wg metody Clermont'a i wsp.

Szczepy *E. coli* powodujące kolibakteriozę stanowią heterogenną grupę – nawet izolaty pozyskane z tych samych lokalizacji mogą posiadać inny profil genów wirulencji. Dodatkowo, bakterie *E. coli* obecne są we florze jelitowej ptaków jako niegroźne komensale, jednak w określonych warunkach również te bakterie mogą wywoływać efekt chorobotwórczy. Dlatego, aby móc skonstruować poprawny model dotyczący przewidywania zjadliwości szczepów *E. coli*, przeprowadzono reklasyfikację szczepów z pierwotnego podziału bazującego na źródle pozyskania szczepów na klasyfikację opartą o wyniki badań dotyczących przeżywalności zarodków kurzych w modelu *in ovo*. Dzięki temu dokonano podziału na 83 szczepy patogenne i 17 szczepów niepatogennych oraz wybrano takie czynniki wirulencji, które poprawnie różnicują bakterie na te dwie grupy.

Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że spośród analizowanych czynników wirulencji istnieją takie, które nie miały bezpośredniego wpływu na zjadliwość analizowanych szczepów – były to geny obecne we wszystkich próbach, niezależnie od grupy patogenności oraz geny, których obecności nie stwierdzono w żadnym ze szczepów. Natomiast najbardziej różnicującymi czynnikami wskazującymi na patogenność, były geny kodujące mechanizmy pozyskiwania żelaza: siderofory *iro*, *iuc*, *fyuA*, *ybt*, transportery *ets* oraz hemolizyna *hlyF* i białko błony zewnętrznej *ompT*. Dodatkowym czynnikiem patogenności było występowanie serotypu O78. Stwierdzono, że spośród wielu innych, jedynie ten serotyp jest obecny w szczepach APEC ze statystycznie większą częstością oraz, że sam może być determinantą patogenności – w 14% przypadków występował niezależnie od innych czynników zjadliwości.

Podczas oceny doboru odpowiednich czynników wirulencji do testu diagnostycznego zastosowano dokładny test Fisher'a. Ostatecznie test diagnostyczny zaprojektowano w oparciu o amplifikację w metodzie PCR typu multipleks 2 genów wirulencji (*iroC* i *hlyF*) oraz genu kodującego flipazę antygeny O serotypu O78. Zgodnie z zaprojektowanym testem, obecność któregośkolwiek z tych genów świadczy o przynależności szczepu do grupy patogenów, zaś brak genów w próbce oznacza szczep komensalny. Podczas weryfikacji otrzymanych wyników

z modelu predykcyjnego w stosunku do eksperymentów w modelu zarodka kurzego, otrzymano dokładność metody na poziomie 93,00% oraz czułość i specyficzność równe odpowiednio: 98,80% i 64,71%. Przesunięcie punktu odcięcia w kierunku czułości wynika z faktu, że szybka identyfikacja chorego stada i możliwość wdrożenia leczenia stanowiła priorytet podczas prowadzonych badań.

Metodę zoptymalizowano i otrzymano 100% zgodności wyników laboratoryjnych z wynikami *in silico*. Jednak przed wprowadzeniem testu do praktyki, niezbędne jest przeprowadzenie dodatkowej walidacji z wykorzystaniem danych eksperymentalnych i klinicznych poszerzonych o inne modele niż test żywotności zarodka kurzego.

Wnioski

Wykorzystanie sekwencjonowania całych genomów *Escherichia coli* pozwoliło na opracowanie szybkiej metody diagnostycznej identyfikującej szczepy patogenne dla drobiu: APEC.

Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać, że:

- klasyfikacja szczepów *E.coli* związana z występowaniem kolibakteriozy na patogenne i niepatogenne, oparta na źródle ich izolacji, nie jest wiarygodna i należy ją zweryfikować innymi metodami;
- analizy oparte o filogenetykę, serotypowanie, czy antybiotykooporność nie są wystarczające do takiej weryfikacji;
- sekwencjonowanie całych genomów (WGS) pozwala na przeprowadzenie dogłębnej charakterystyki szczepów *in silico*, co w konsekwencji umożliwia zróżnicowanie ich na patogenne i niepatogenne na podstawie wybranych czynników;
- model *in ovo* pozwala na weryfikację pierwotnych założeń dotyczących patogenności szczepów;
- niektóre czynniki wirulencji obecne są również w komensalnych szczepach *E. coli*, wskazując na ich potencjał chorobotwórczy;
- geny związane z mechanizmami pozyskiwania żelaza, geny kodujące toksyny oraz obecność serotypu O78 są najważniejszymi determinantami patogenności szczepów;

- analiza kilkuset czynników wirulencji pozwoliła na dobór odpowiednich dyskryminantów patogenności i zaprojektowanie metody PCR, która w szybki sposób wskazuje na potencjał chorobotwórczy szczepów *E. coli*,
- opracowany test wymaga dalszej walidacji przed wprowadzeniem do praktyki.


Joanna Kazimierczak