

**Praca doktorska**

**Tytuł:** Charakterystyka molekularna szczepów *Francisella tularensis* wyizolowanych z próbek klinicznych i środowiskowych za pomocą metody real-time PCR i Multispacer Typing.

**Autor:** mgr inż. Piotr Cieślik

**Promotor:** dr hab. n. med. Józef Knap, prof. WUM

**Promotor pomocniczy:** mjr dr n. biol. Agata Bielawska-Drózd

**STRESZCZENIE**

*Francisella tularensis* została rozpoznana na początku XX wieku, jako czynnik chorobotwórczy tularemii, jednej z najbardziej niebezpiecznych chorób odzwierzęcych. W obrębie gatunku *F. tularensis*, na podstawie cech biochemicznych, dawki infekcyjnej oraz występowania geograficznego, wyodrębniono 4 podgatunki: wysoce zakaźny *F. tularensis* subsp. *tularensis* (typ A) występujący głównie w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej, *F. tularensis* subsp. *holarctica* (typ B) występująca głównie w Europie, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* izolowana najczęściej w Azji oraz niepatogenny dla ludzi podgatunek *F. tularensis* subsp. *novicida*.

Pałeczka tularemii, ze względu na swoje zdolności infekcyjne oraz zdolność do wywoływania różnych postaci chorobowych, została sklasyfikowana przez CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) jako potencjalny wysoce niebezpieczny czynnik broni biologicznej (grupa A).

Większość danych dotyczących występowania tularemii w Polsce opiera się na badaniach serologicznych, rzadziej mikrobiologicznych. W pracy podjęto po raz pierwszy w kraju, próbę charakterystyki molekularnej wyizolowanych rodzimych szczepów należących do kolekcji ODiZZB WIHiE otrzymanych z Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Zastosowano własną metodę PCR czasu rzeczywistego w układzie multipleks z sondami typu TaqMan do różnicowania podgatunków *F. tularensis*, a następnie dokonano genotypowania *F. tularensis* w oparciu o metodę Multi Spacer Typing (określenie genotypu ST – Sequence Type). Analizę otrzymanych profili genetycznych przeprowadzono w oparciu o dostępne porgramy: BLAST, ClustalOmega i MEGA6.

Do badań wykorzystano 49 szczepów *F. tularensis* (w tym 15 szczepów pochodzących z Polski). W celu identyfikacji czynnika oraz ich różnicowania na podgatunki opracowano metodę duplex real-time PCR. Regiony do amplifikacji wybrano na podstawie analizy genomów szczepów reprezentujących poszczególne podgatunki (dla typu A – *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU, dla typu B – *F. tularensis* subsp. *tularensis* LVS oraz *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* FSC147 i *F. tularensis* subsp. *novicida* U112).

Stosując powyższą metodę wykazano, że wszystkie szczepy pochodzące z Polski należą do podgatunku *F. tularensis* subsp. *holarctica*.

Czułość metody dla wszystkich podgatunków *F. tularensis* określona na podstawie szeregu rozcieńczeń DNA wynosi: - 10 fg/ $\mu$ l DNA, co koreluje z 4,9 GE (Genomic Equivalent) dla typu A, B i *mediasiatica* i 4,83 GE dla podgatunku *novicida*. W przypadku szeregu rozcieńczeń zawiesiny komórek *F. tularensis*, czułość metody określono na poziomie  $5 \times 10^1$  CFU/ml (1,5 CFU/ reakcję PCR) dla typu A (szczep Newton) oraz  $6 \times 10^2$  CFU/ml (18 CFU/reakcję PCR) dla typu B (szczep Kodar R).

Określenie podobieństwa genetycznego pozyskanych szczepów *F. tularensis* dokonano metodą MST (Multispacer Typing), opierającej się na sekwencjonowaniu 4 wybranych sekwencji międzygenowych (S1, S2, S3 i S4). W toku przeprowadzonych analiz w obrębie polskich szczepów *F. tularensis* opisano poniższe genotypy: genotyp ST6 (szczepy ZS, ZG, ZG „Szary”, ZP, KS i KR), genotyp ST27 (szczepy CR i KP2) oraz genotyp ST19 (szczep ZG „S”). Ponadto, stwierdzono obecność nowych genotypów (ST.N1 – szczepy KGORZ i ZM, ST.N2 – szczep MR3, ST.N3 – szczep ZW, ST.N4 – szczep CMM, ST.N5 – szczep ZD). Dodatkowo, opisano 23 nowe genotypy dla szczepów pochodzących z innych krajów oraz dla szczepów zdeponowanych w bazie danych (NCBI, USA)

Dokonano również środowiskowej analizy epidemiologicznej zbadanych szczepów muzealnych z terenu Polski.

Zastosowanie opracowanej metody real-time PCR oraz analizę wysoce zmiennych obszarów międzygenowych za pomocą metody MST jest przydatne w określaniu zmienności genetycznej *F. tularensis*. Wykorzystane może być również w charakterystyce molekularnej pałeczek tularemii izolowanych w badaniach ludzi i zwierząt czy w badaniach przesiewowych i w ogniskach epizootyczno-epidemicznych.

**Title:** Molecular characterization of *Francisella tularensis* strains isolated from clinical and environmental samples with real-time PCR and Multispacer Typing methods.

## **ABSTRACT**

*Francisella tularensis* was recognized in the early twentieth century as a pathogen of tularemia, one of the most dangerous zoonoses. Based on biochemical properties, infective dose and the geographical location within the species *F. tularensis*, four subspecies was distinguished: the highly infectious *F. tularensis* subsp. *tularensis* (type A) occurs mainly in the United States of America, *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Type B) occurs mainly in Europe, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* isolated mostly in Asia and non-pathogenic to humans subspecies of *F. tularensis* subsp. *novicida*.

Due to its infectious ability and based on different forms of the disease, etiological agent of tularemia has been classified by the CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) as a potentially highly dangerous agent of biological weapons (group A).

Most of the data describing occurrence of tularemia in Poland are based on serological, less microbiological tests. In this paper, for the first time in Poland, it has been attempted to molecular characterization of strains belonging to the collection of BTICC MIHE (Puławy) received from the Institute of Marine and Tropical Medicine in Gdynia using own-designed real-time PCR in a multiplex format with TaqMan probes to differentiate subspecies of *F. tularensis*. Genotyping of *F. tularensis* was performed based on the Multispacer Typing method (genotype ST - Sequence Type). Analysis of obtained genetic profiles was conducted with available bioinformatics' programs: BLAST, Clustal Omega and MEGA6.

The study included 49 strains of *F. tularensis* with 15 strains from Poland.

In order to identify the biological agent and differentiate at the subspecies level, duplex real-time PCR method has been developed. The regions for amplification were selected on the basis of analysis of the genomes representing different subspecies: for type A – *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU a type B – *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* FSC147 and *F. tularensis* subsp. *novicida* U112.

Application of developed real-time PCR method has shown, that all strains originating from Poland represent *F. tularensis* subsp. *holarctica* subspecies.

The sensitivity of designed real-time PCR method for *F. tularensis* subspecies was determined on 10-fold DNA serial dilutions and revealed detection limit at 10 fg/ $\mu$ l of DNA, which correlates with 4.9 GE (Genomic Equivalent) of a type A, B, and *mediasiatica* and 4.83 for GE subspecies *novicida*. In the case of serial cell suspension of *F. tularensis* dilutions, the sensitivity of the method revealed detection limit at:  $5 \times 10^1$  CFU/ml (1.5 CFU/PCR) for a type A (strain Newton) and  $6 \times 10^2$  CFU/ml (18 CFU/PCR) for type B (strain Kodar R).

Genetic similarity of obtained *F. tularensis* strains were analyzed using Multispacer Typing method (MST), which is based on sequencing of four, selected intergenic sequences (S1, S2, S3 and S4). Genetic analysis within the Polish strains of *F. tularensis* allowed description of following genotypes: genotype ST6 (strains: ZS, ZG, ZG "Szary", ZP, KS and KR), genotype ST27 (strains: CR and KP2) and ST19 genotype (strain ZG "S "). In addition, presence of new genotypes was also found: ST.N1 - strains KGorz and ZM, ST.N2 - strain MR3, ST.N3 - strain ZW, ST.N4 - strain CMM and ST.N5 - strain ZD. Additionally, MST method described 23 new genotypes of strains from other countries and strains deposited in the database (NCBI, USA).

Additionally, There has also been environmental epidemiological analysis of the tested museum strains from Poland has also been performed.

The application of developed real-time PCR method and analyzing the highly variable intergenic regions with MST may be useful tools in detection, differentiation and determination of genetic variation among *F. tularensis* strains. Above methods can also be successfully used in the molecular characterization of tularemia strains isolated from humans and animals in screening research and during epizootic and epidemic outbreaks.