

ZAKLJUČNO POROČILO
O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA
NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA
PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Naziv težišča v okviru CRP:

Povezovanje ukrepov za doseganje trajnostnega razvoja



2. Šifra projekta:

V4-0530

Stevilka za

63 113-134 / 2008

18

3. Naslov projekta:

Razvoj metod za sledenje virom kontaminacije kmetijskih in živilskih proizvodov

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

RAZVOJ METOD ZA SLEDENJE VIROM KONTAMINACIJE KMETIJSKIH IN ŽIVILSKIH PROIZVODOV

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

DEVELOPMENT OF METHODS FOR TRACING THE SOURCES OF CONTAMINATION OF FOOD PRODUCTS

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

patogeni mikroorganizmi, molekularna detekcija, molekularna tipizacija, sledenje kontaminaciji

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

pathogens, molecular detection, molecular typing, tracing of contamination

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Inštitut za fizikalno biologijo d.o.o. (šifra RO: 1821)

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

/

6. Sofinancer/sofinancerji:

/

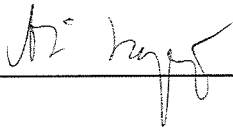
7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

21408

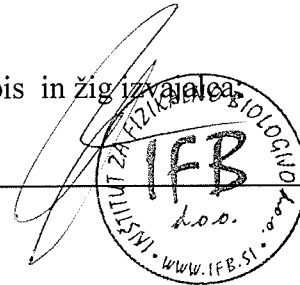
Aleš Lapanje

Datum: 15.09.2011

Podpis vodje projekta:



Podpis in žig izvajalca:



II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- a) v celoti
 b) delno
 c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- a) da
 b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

1. Uvod

Mikrobna kontaminacija kmetijskih pridelkov in posledično živil je v svetu pereč problem. Izmed številnih patogenih mikrobov se *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. in *Campylobacter* sp. pogosto pojavljajo kot povzročitelji bolezni in z živil povezanih okužb. Posebej v zadnjem času so sevi rodu *Campylobacter*, odporni na povišane temperature, porajajoči vir nevarnosti kontaminacije in okužb (Mackiw et al., 2008). Povzročajo vročino, drisko in črevesne krče. *Listeria monocytogenes* je pogost povzročitelj listerioz, spontanih abortusov in hudih okvar centralnega živčnega sistema pri človeku. *Listeria* izloča toksin, ki zastrupi epitelne celice, saj jim ustavi celični cikel in celice propadejo (Rogers et al., 1996). Zelo podoben učinek ima eden od toksinov enteropatogenega seva bakterije *Salmonella typhi* – celični distenzijski toksin (Haghjoo in Galan, 2004). Ostale enteropatogene vrste rodu *Salmonella* izločajo enterotoksin, ki je kodiran znotraj *spv* operona na patogenem otoku, delu bakteriofaga (Lesnick et al., 2001). Najbolj zloglasni sev *E. coli* O157:H7 lahko izloča shiga toksin, ki je kodiran na profagu (Besser et al., 2007). Večina toksinov patogenih bakterij je ali na plazmidih ali na profagih, kar pomeni, da so na izredno mobilnem delu genoma in to ne samo znotraj vrste, ampak tudi med vrstami (Johansen et al., 2001).

Določene bolezni, ki se ponavadi pojavljajo samo pri živalih, se pogosto pojavi tudi določena manifestacija pri ljudeh. Takšne vrste infekcija je npr. infekcija z *Mycobacterium avium paratuberculosis*, ki je verjetno eden od trigerjev za nastanek Chronove bolezni pri človeku. Slednji bakteriji smo zaradi vse večje povezanosti Johnsove bolezni pri govedu in Chronove bolezni pri človeku, in vse večje aktualnosti problematike, tudi največ namenili v okviru tega raziskovalnega projekta.

Za bistveno izboljšanje meje detekcije mikroorganizmov v kontaminiranih vzorcih smo predhodno morali izboljšati načine vzorčenja, izolacije nukleinskih kislin, molekularnega bogatenja tarč s pomočjo modernih tehnologij manipulacije DNK (magnetna separacija, hibridizacijske kromatografske tehnologije ali predhodno imunološko bogatenje celic). Ta prvi metodološki pristop predstavlja pomemben razvojno-tehnološki prispevek k zaznavi. Tipizacija oz. natančna determinacija sevov predstavlja na novo pripravljeno direktno metodo sledenja virom kontaminacije kmetijskih in živilskih proizvodov.

Raziskave v projektu so imele skupen cilj in sicer določiti najhitrejšo metodo detekcije sevov direktno v okoljskih vzorcih s pomočjo molekularnih tehnik in metodologij. S tem smo določili prototipne metode, ki predvsem pohitrijo in v določenih primerih lahko tudi pocenijo v primerjavi s klasičnim mikrobiološkim pristopom.

2. Namen in cilji raziskave

Namen raziskave je razvoj izboljšanih metod direktne molekularne zaznave in sledljivosti virom kontaminacije kmetijskih in živilskih proizvodov.

Za doseganje namena smo si zastavili **specifične raziskovalne cilje**:

- Izboljšanje direktne molekularne detekcije *E. coli*, *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Campylobacter* v kompleksnem vzorcu:
 - osredotočenje na vzorčenje,
 - osredotočenje na najbolj optimalno metodo destrukcije celic,
 - osredotočenje na bogatitev molekularnih tarč brez gojenja za lažjo kasnejšo detekcijo.

¹ Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

- Analiza genov, ki kodirajo toksine na izolatih:
 - osredotočenje na operone,
 - osredotočenje na okolico in razmerja med ORF v operonu za toksine,
 - osredotočenje na okolico operonov oz. genov za toksine,
 - indukcija profagov in identifikacija razlik,
 - opredelitev možne tipizacijske sheme.
- Toksinotipizacija izbranih sevov.
- Direktna toksinotipizacija in kvantifikacija tarčnih sekvenc s pomočjo qPCR.
-

3. Metodologija projekta

Celoten projekt je zasnovan fazno:

- I. faza je bila namenjena izboljšanju vzorčenja in izkoristka izolacije nukleinskih kislin iz vzorcev kmetijskih in živilskih produktov z namenom direktne zaznave kontaminacije z uporabo učinkovitih metod destrukcije celic in ekstrakcije dednine. V drugi
- II. faza je bila usmerjena predvsem v razvoj in uporabo molekularnih metod. V tej fazi smo razvili postopke za ugotavljanje sekvenčne variabilnosti in diverzitete genov za toksine
- III. faza je na podlagi prvotni dveh faz omogočila integracijo rezultatov v eni smeri za namene razvoja sistema za direktno tipizacijo izbranih patogenih mikroorganizmov na osnovi multipleksne RFLP-PCR reakcije in talilnega profila na qPCR in direktne uporabe na terenu.

4. Rezultati projekta

I. Faza – Izboljšava vzorčenja in izkoristka izolacije nukleinskih kislin

a) Organizacija

Na začetku smo pregledali obstoječe stanje na trgu glede kompletov za izolacijo nukleinskih kislin, ki se uporabljajo za tovrstne namene. Določili smo zaenkrat samo dva proizvajalca: BioEnteric (Irska) in Eiken Chemical (Japonska), ki bi prišla v poštev. Preučili smo še nekatere druge splošne komercialne kite in preverili uspešnost detekcije (MoBio, Qiagen, Promega). Iz testov smo zaključili, da bomo sloneli na nadaljnjem razvoju kompleta za izolacijo nukleinskih kislin, ki temelji na zidélku lastne izdelave (SmartHelix DNA isolation kit).

Poleg tega smo se tudi dogovorili z Inštitutom za varovanje zdravja Republike Slovenije, da nam bo dobavljala kontaminirana živila z bakterijami in referenčne seve, ki so predmet raziskave tega projekta.

b) Razvoj kompletov za izolacijo nukleinskih kislin

❖ Razvoj učinkovitega načina lize celic iz kompleksnih vzorcev

V prvem delu tega projekta smo se osredotočili na razvoj metodologij za najbolj uspešen način razbijanja celic iz kulture. Za ta namen smo uporabili kulturo bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*. Ti dve bakterijski vrsti smo izbrali zato, ker je eno izredno lahko lizirati in drugo izredno težko. Za meritve koncentracije DNK smo morali pripraviti rutinske postopke na osnovi fluorometričnih meritev. Za te potrebe smo uporabili meritve s pomočjo barvil Syto82 in SybrGreen I. Fluorometrične meritve smo umerili s pomočjo standardnega kita ter fluorometra Qubit (Invitrogen). Izkazalo se je, da je SybrGreen I meritev bolj ustrezna, saj ni interferirala tako močno z določenimi detergenti in hkrati je inkubacija lahko kratka (krajša od 25 min, ki je potrebna za barvilo Syto82).

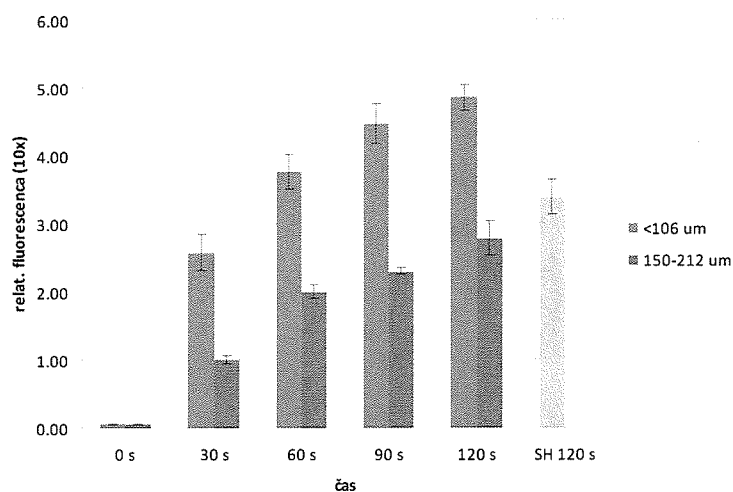
Po vzpostavitvi merilnih metod, smo določili kritične točke lize bakterijskih celic:

1. Izbira mehanskega razbijanja (kakšna velikost kroglic se uporabi)

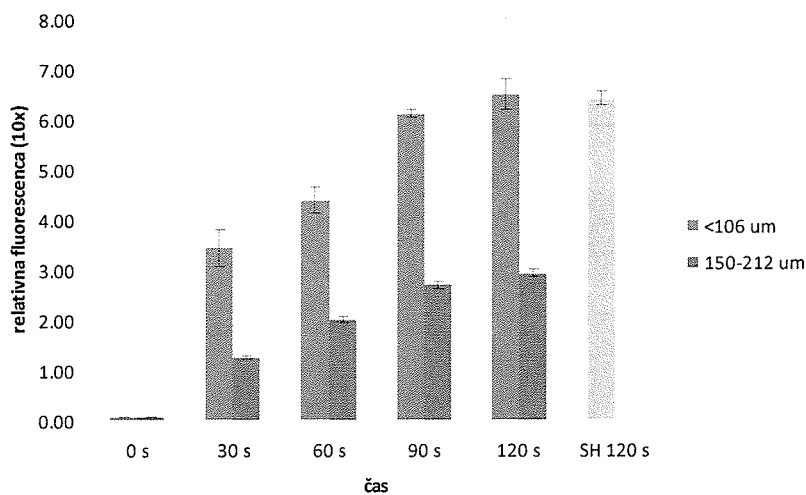
2. Izbira detergentov

3. Čas razbijanja

Ugotovili smo, da je izredno ugodno razbijanje v času 120 minut ter pri najmanjših kroglicah (slika 1, slika 2).



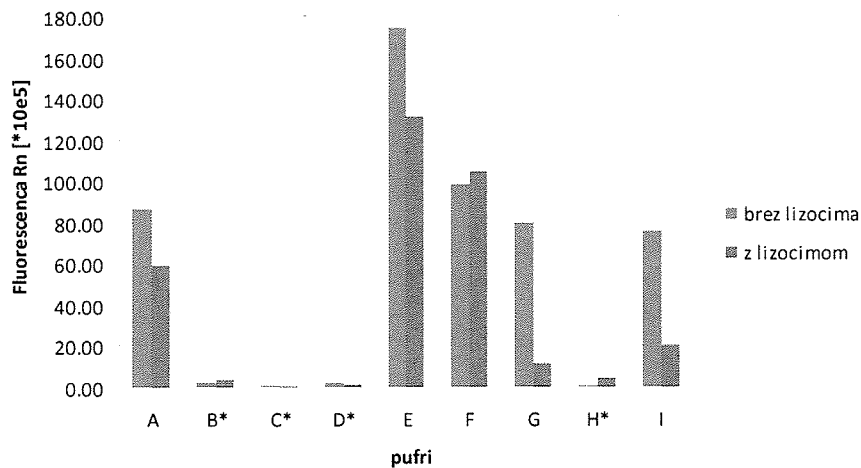
Slika 1. Primerjava časov ter velikosti kroglic pri bakteriji *E. coli*



Slika 2. Primerjava časov ter velikosti kroglic pri bakteriji *S. aureus*

Za primerjavo smo imeli SmartHelix kit (IFB d.o.o., označeno kot SH), ki je nespecifičen in lizira večino bakterijskih celic.

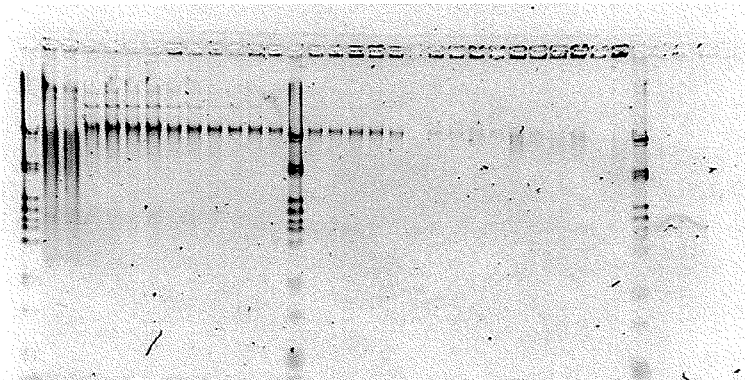
Različne pufre smo primerjali tako, da smo kombinirali detergente Triton X100 in SDS. Preliminarno smo uporabili tudi CTAB, ki pa se z DNK kompleksira in ga je izredno težko potem uporabiti za namene ekeltroforezne ločitve. Najbolj ustrezen je bil pufer, ki je vseboval Triton X100 ter Guanidin HCl (slika 3).



Slika 3. Primerjava različnih kombinacij pufrov za potrebe liziranja celic (*S. aureus*)

Poleg tega smo preverjali amplifikacije s pomočjo PCR. V vseh primerih je PCR reakcija uspešna, vendar rahlo inhibirana. Zaradi tega smo pričeli z implementacijo čiščenja s pomočjo kolonic. Izbrali smo kolonice Econospin kolonice. Te vrste kolonic temeljijo na silikatni osnovi in se aktivirajo s pomočjo guanidinijevega HCl ali pa guanidinijevega izotiocianata.

Pri sami lizi smo opazili, da ima lahko vpliv tudi viskoznost lizirajočega medija. To je za pričakovati, saj fizikalna liza temelji na vibraciji zelo malih delcev in s tem irigacijo celične stene/membrane. Viskoznejši kot je medij več sile je potrebno za enako vibracijo kroglic. Pri tem je mogoče optimizirati metodo, da pridobimo na koncu več bolj kvalitetne DNK, to je DNK z višjo molekularno maso. Da smo preverili in tudi optimizirali viskoznost medija za povečanje uspešnosti lize smo uporabili metodo lize z enakim pufrom kot smo ga predhodno razvili in mu dodali glicerol. Ugotovili smo, da je viskoznost vplivala tako na količino izlužene DNK (manj v bolj viskoznem mediju), kot tudi na kvaliteto (manj nizkomolekularne DNK v bolj viskoznem mediju) (Slika 4).



Slika 4. Prikaz vpliva količine glicerola na kvaliteto in količino izlužene DNK iz bakterije *S. aureus*. Od leve proti desni je naraščajoča količina glicerola v enakem puftru in pri enaki količini celic

- ❖ razvoj postopka liziranja in ekstrakcije nukleinskih kislin iz čistih kultur

Da predhodno lahko predvidimo postopke tipizacije, moramo pridobiti prvo informacijo o znanih tipih bakterij. To pomeni, da je potrebno izdelati metodo hitre in učinkovite ekstrakcije nukleinskih kislin iz čistih kultur. Za ta namen smo pripravili številne protokole izboljšane izolacije nukleinskih kislin iz točno določenih mikroorganizmov. Ti mikroorganizmi so:

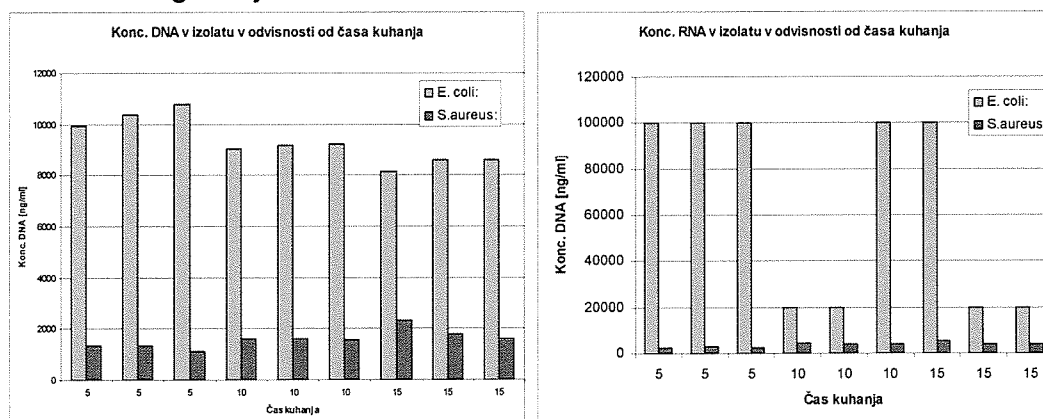
Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Legionella pneumophila* in *Listeria monocytogenes*. Bakterije *M. avium paratuberculosis* nismo lizirali na ta način, ker imajo izredno odporno celično steno in smo za te uporabili metodo lize, ki smo jo razvili za kompleksne vzorce.

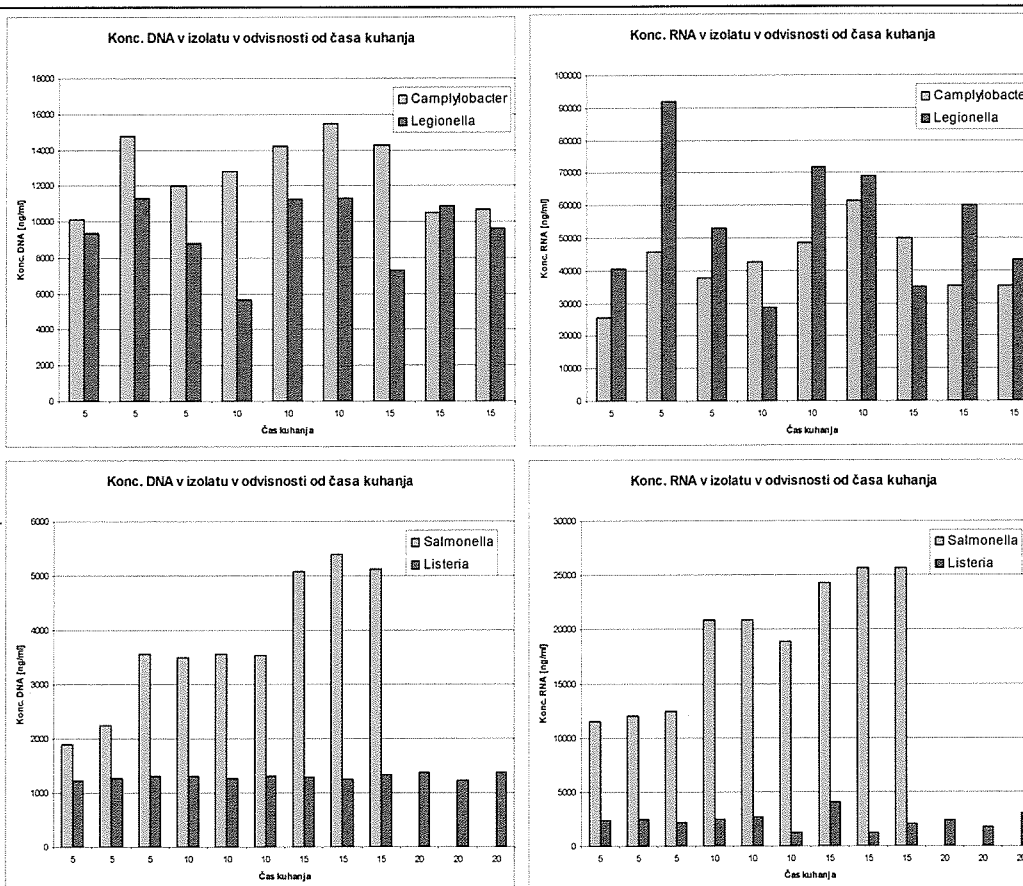
Metodološko smo izhajali iz klasičnih protokolov, ki smo jih sami razvili in so se predhodno izkazale za hitre in z visokim izkoristkom: fenolna ekstrakcija z mehansko lizo in metoda s prekuhavanjem. V tem času smo natančno ocenili predvsem metodo s prekuhavanjem in dodajanjem ionskih izmenjevalcev. Hipotetično naj bi ionski izmenjevalci na podlagi vezave dvovalentnih kationov, vplivali na aktivnosti encimov, predvsem restriktaz, in s tem posledično daljšo obstojnost tako izoliranih nukleinskih kislin.

V raziskavi smo uporabili 6 patogenih mikroorganizmov, ki so pogosto škodljivi človeku: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Legionella pneumophila* in *Listeria monocytogenes*. Kulture *E. coli* in *S.aureus* smo vzgajali sami, ostale patogene pa smo prejeli od IVZ-LJ. Testirali smo izolacijo s posebnim kationskim izmenjevalcem (Chelex) z enostavnim segrevanjem. Sprva smo vzorce kuhali v vroči kopeli, nato smo sistem aplicirali na stripe in mikrotitrsko ploščo. Za ta namen smo:

1. Določili čas segrevanja na 100°C potreben, da se izolira veliko DNA in RNA.
2. Preverili smo potreben čas centrifugiranja stripov/plošč, da se pelet popokanih celic in chelexa dobro zalepi na dno posodice in ne moti naknadnih postopkov (PCR).
3. Preverili smo, če prihaja do inhibicije, pri raznih količinah začetnega števila celic.
4. Preverili smo, če prihaja do navzkrižne kontaminacije.
5. Preverili smo, če so tako pridobljeni izolati uporabni vsaj 1 mesec pri -20°C.
6. Preverili smo še možnost uporabe multiplex PCR tako izolirane DNK za določanje *E. coli* in *Samonelle* sp.

1. Test časa segrevanja





Slika 5a, b, c, d, e, f. Grafičen prikaz rezultatov koncentracij DNA in RNA v odvisnosti od časa kuhanja za vsako vrsto patogena.

Rezultati segrevanja in variacije časa prikazujejo, da je potrebno predvsem za bakteriji *Listeria monocytogenes* kot tudi za *S. aureus* daljši čas segrevanja (več kot 15 min) in za bakterije *E. coli*, *Campylobacter jejuni* in *Legionella pneumophila* le kratek čas (5 min). Pri tem pa je potrebno bakterijo *Salmonella enterica* segreti natančno 15 min (Slike 5a-f).

2. Test časa centrifugiranja

Ponavadi se uporablja metode segrevanja v 1,5 ml epruveh. Za namene vzporedne manipulacije velikega števila celic, smo razvili metodo segrevanja v stripih in mikrotiterskih ploščah (8 ali 96 vzorcev hkrati). Pri tem je manipulacija po centrifugiranju lahko daljša, kar posledično vpliva na odlepljanje centrifugiranega peleta. Zaradi tega smo morali preveriti potreben čas centrifugiranja stripov/plošč, da se pelet popokanih celic in chelexa dobro zalepi na dno posodice. Po ustreznem času kuhanja smo izolate centrifugirali in sproti preverjali, kako je z lepljenjem in čvrstostjo peleta.

Izolate smo centrifugirali 5, 10 in 15 min ter tako ovrednotili potreben čas centrifugiranja (3000 RPM, 22°C) (Tabela 1).

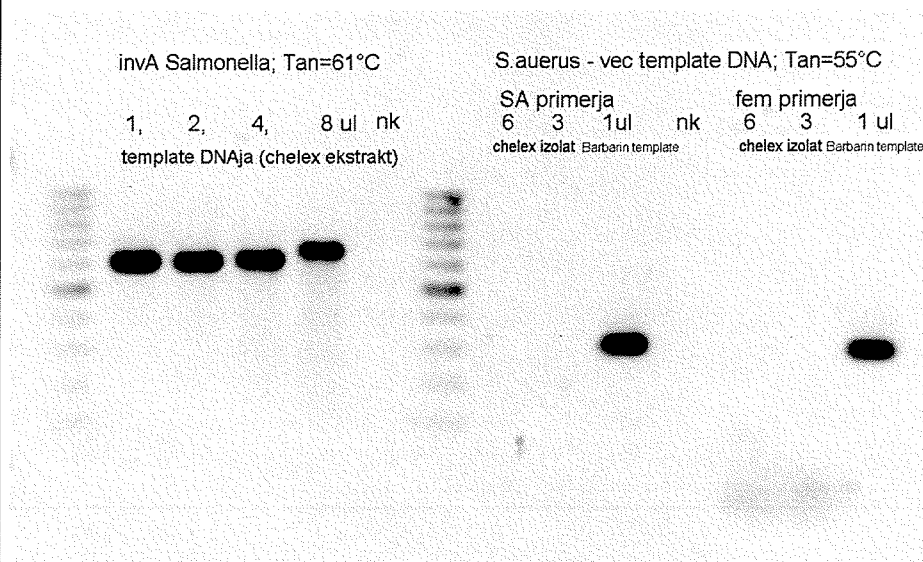
Tabela 1. Čvrstost in prilepljenost peleta ostankov liziranih celic v odvisnosti od časa centrifugiranja

Čas	Čvrstost peleta	Pelet prilepljen na dno epice
5	/	/
10	ok	ok
15	ok	ok

Ugotovili smo, da zadošča 10 minutno centrifugiranje stripov/ plošč, da se ustvari lep pelet in se lahko zanesljivo odpipetira le supernatant brez Chelexa. Dodatno bi bilo potrebno razviti matrix, ki bi še bolj utrdil pelet in omogočal manipulacijo supernatanta kar z multikanalno pipeto.

3. Test inhibicije

Z izolati, kjer smo izmerili najboljši izkoristek s fluorimetrom (določen čas kuhanja) smo naredili PCR, s katerim smo ovrednotili količino izolata, ki nam bo dala objektivne, ne-inhibirane rezultate. Poleg tega smo tudi določili temperaturo prileganja (Tan) za pare oligonukleotidnih začetnikov *invA* in *fem* (Slika 6).



Slika 6. Test inhibicije PCR.

Sklepi:

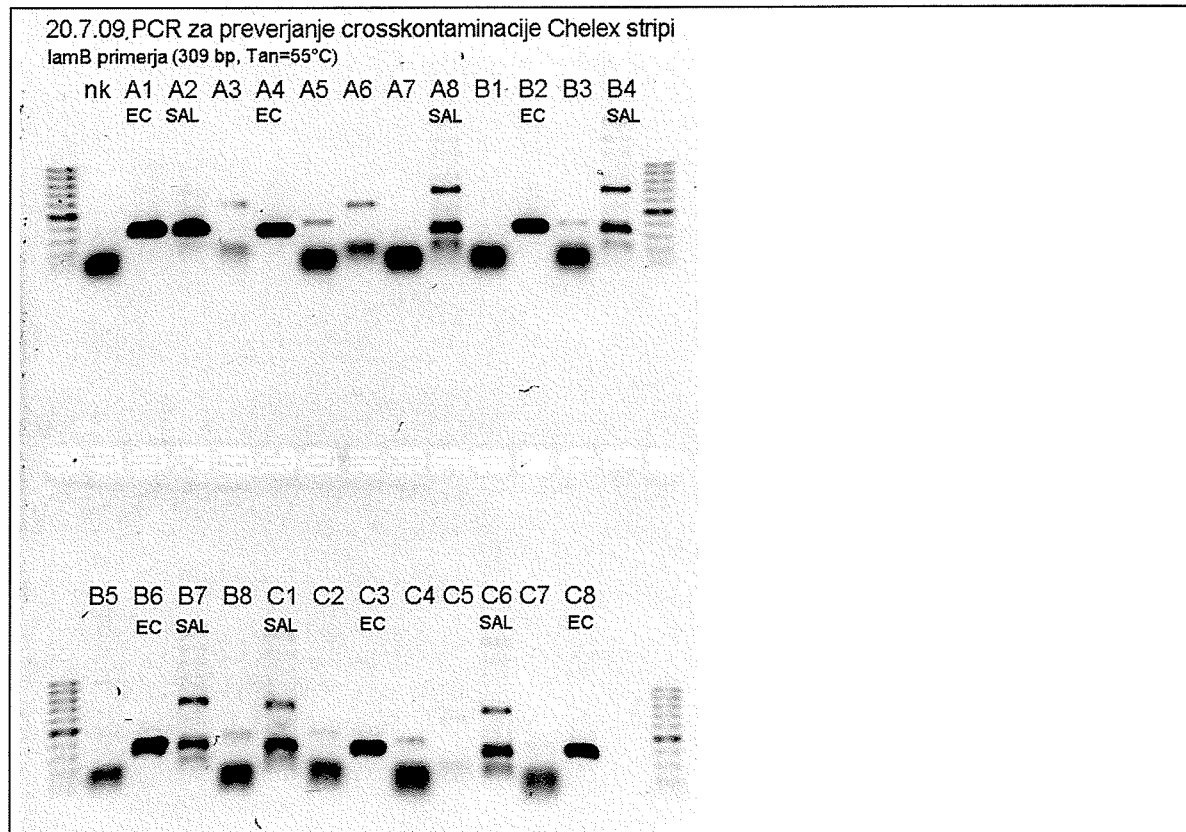
- temperatura prileganja za *invA* primerje za določanje Salmonelle = 61°C
- uporabili 1, 2, 4 ali 8 µl Chelex izolata – vse se je lepo pomnoževalo, kar pomeni, da ni bilo inhibicije; ja pa pri 4 in 8 µl že malo nečistoč zaradi preveč DNA template-a

4. Test navzkrižne kontaminacije s PCR

Ker je pogosto pričakovati, da pri večjem številu paralelnih vzorcev pride do navzkrižne kontaminacije, smo to preverjali s pomočjo PCR tarčnega gena na vzorcih izolirane DNK s pomočjo segrevanja. *E. coli* ali *Salmonella* sp. (EC ali SAL) smo nacepili v naslednje luknje, in naredili chelex izolacijo:

Tabela 2. Shema prostorske razporeditve vzorcev za test navzkrižne kontaminacije

Luknja	1	2	3	4	5	6	7	8
Strip A	EC	SAL		EC				SAL
Strip B		EC		SAL		EC	SAL	
Strip C	SAL		EC			SAL		EC



Slika 7. Pod oznakami vzorcev so oznake katera bakterija je bila izolirana v tej jamici.

Sklepi:

- Rezultati so deloma v redu, saj smo v 7ih od skupno 25ih vzorcih dobili pozitiven signal PCRja, kjer ne bi smelo biti amplikona. Prav tako smo pri 5ih od 6ih vzorcih *Salmonelle* dobili nespecifične PCR produkte (Slika 7).

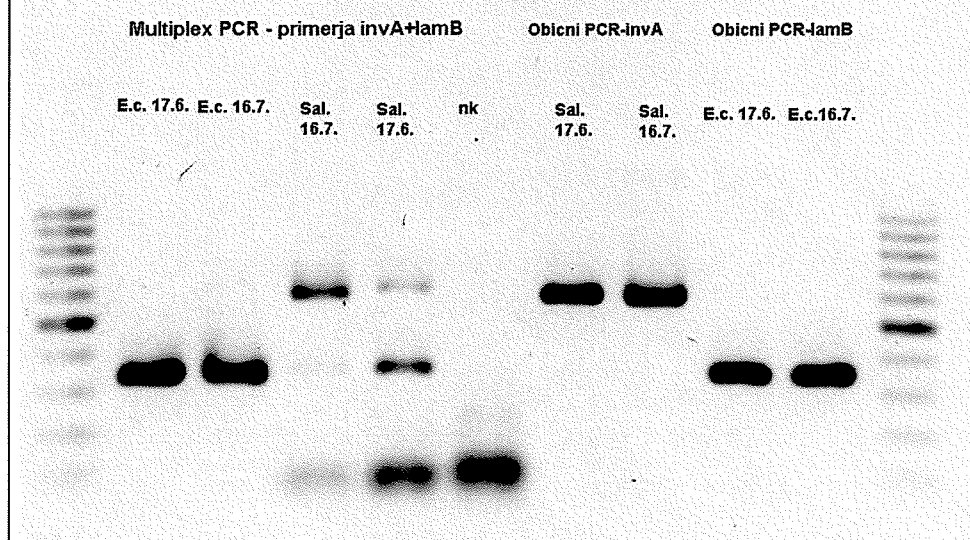
5. Test časovne uporabnosti chelex izolatov

Naredili smo svežo izolacijo *E. coli* in *Salmonella* sp. Te izolate in pa izolate, ki so bili 1 mesec na -20°C smo preverili s PCR (Slika 8).

6. Implementacija multiplex PCR za *E. coli* in *Salmonella* sp. na DNK izolirani s segrevanjem.

Za namene hkratnega preverjanja prisotnosti *E. coli* in *Salmonella* sp. smo uporabili oligonukleotidna začetnika *invA* in *lamB*. Oba skupaj sta uspešno pomnožila izbrani tarči. Pri tem bi bilo potrebno dodatno še optimizirati v smislu zmanjšanja nastajanje dodatnih fragmentov v multipleksni reakciji (Slika 8).

17.7.09 PCR za preverjanje multiplex PCRja



Slika 8. Preverjanje obstojnosti DNK na multipleks PCR reakcijo.

Sklepi:

- Chelex izolati so obstojni več kot 1 mesec na -20°C.
- Multiplex PCR uspel, z *lamB* primerji se da detektirati tako *E. coli* kot *Salmonella* sp.

Na koncu I. faze smo ugotavljali in optimizirali protokole, ki bi povečali izplen DNK. Za ta namen smo predvsem preverjali metode obdelave površine plastične stene mikroepruvet za čim manjše lepljenje DNK na stene mikroepruvet.

V prvih poskusih smo poskusili izboljšati izkoristke reakcije s pomočjo uporabe koloidnih delcev, ki bi inaktivirale površinske interakcije. V primeru, da se DNA prileplja stene posode, jo je manj v reakcijski mešanici. Hkrati pa lahko tudi encima manj zaradi enakih dogodkov. Zaradi tega smo naredili le nekaj preliminarnih poskusov. Testirali smo vplive koloidnih delcev na PCR brez kvantifikacije. Potrebno bi bilo testirati še večje število različno nabitih koloidov in različno kvaliteto vezave na stene posodic.

II. Faza tipizacija in toksinotipizacija izbranih bakterij.

S pomočjo literature in nukleotidnih baz, predvsem NCBI, smo določili metode, ki bi bile enostavne in hitre za PCR pomnoževanje, možne za kvantifikacijo in predvsem nižjega cenovnega ranga. Tako smo pregledali možne variante tipizacije ali na podlagi toksinov, drugih virulenčnih genov ali določenih tipskih genov (insercijske sekvence). V tej fazi smo se potem začeli praktično osredotočati na mikobakterije. Testirali smo tudi možnost tipizacije na primeru *M. tuberculosis* in nadaljevali na kmetijsko in živinorejsko, v zadnjem času pa tudi zaradi pojava Chronove bolezni, neposredno pomembne tudi za človeka, bakteriji *M. avium paratuberculosis*.

1. *Campylobacter* spp. in *Escherichia coli*

Za bakterijo *E. coli* je bila pregledana literatura za že znane toksine in razpoložljive oligonukleotidnih začetnike za detekcijo le-teh toksinov (Tabela 3).

Tabela 3. Oligonukleotidni začetniki znani iz literature, ki so usmerjeni v detekcijo toksinov

TOKSIN	VEZAVNO MESTO	IME PRIMERJA	ZAPOREDJE (forward)	IME PRIMERJA	ZAPOREDJE (reverse)
Shiga toksin (stx) 1	STX 1	STX1-F	5-ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC-3	STX1-R	5-GAACGCCCACTGAGATCATC-3
Shiga toksin (stx) 2	STX 2	STX2-F	5-TCGCCAGTTATCTGACATTCTG-3	STX2-R	5-GGCACTGTCTGAAACTGCTCC-3
Toplotno labilni toksin (LT) 1	LT 1	LT1-F	5-TTACGGCGTFACTATCCTCTCTA-3	LT1-R	5-GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC-9
Verotoksin 1	SLT 1	LP 30	5-CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG-3	LP 31	5-CACCAGACAATGTAACCGCTG-3
Verotoksin 2	SLT 2	LP 43	5-ATCCTATCCCGGAGTTTACG-3	LP 44	5-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3
Toplotno stabilni toksin (ST) 2	ST 2	STII-FP	5-GCAATAAGGTTGAGGTGAT-3	STII-RT	5-GCCTGCAGTGAATGGAC-3

V nadaljevanju smo razvili lastne oligonukleotidne začetnike za obe skupini sevov.

Sprva smo in silico analizirali vse do sedaj znane toksine, ki jih izločajo različni sevi bakterij *Campylobacter jejuni* in *Escherichia coli*, določitev njihovih nukleotidnih zaporedij in primerjava med njimi.

Metode dela:

V bazi podatkov NCBI smo poiskali nukleotidna zaporedja genov, ki zapisujejo izbrane toksine, za vse seve preiskovanih bakterijskih vrst. Nukleotidna zaporedja smo med seboj primerjali s programom BioEdit. Sledilo je iskanje že znanih oligonukleotidnih začetnikov za izbrane toksine preko literature in konstruiranje oligonukleotidnih začetnikov s programi PrimerExpress 3.0.

Toksinotipizacija bakterije *Campylobacter jejuni*

Rod *Campylobacter* je bil prvič odkrit leta 1963. Gre za po Gramu negativne, spiralne, mikroaerofilne bakterije, ki se prosto gibljejo z bički. Glavni kvarljivec hrane in humani patogen je *Campylobacter jejuni* (95% obolelosti). Pogosta je tudi *C. coli* (4% obolelosti). Ostale vrste iz rodu *Campylobacter* povzročijo le 1% primerov obolelosti. *C. fetus* je povzročitelj spontanah splavov pri govedih in ovcah in je hkrati oportuni patogen pri ljudeh (Wilson et al., 2008).

Okužba s kampilobaktri povzroča hude gastrointestinalne težave, ki lahko privedejo celo do krvave driske. Drisko spremlja vročina, bolečine v trebuhu, slabost, glavobol in mišične bolečine. Bolezen nastopi 2-5 dni po okužbi in traja med 7 in 10 dni. Infektivna doza se začne pri 400-500 bakterij, pri nekaterih posameznikih pa več (Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook: *Campylobacter jejuni*; FDA, ZDA; <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodbornellness/FoodbornellnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070024.htm>, 24.3.10;)

Bakterij *Campylobacter* sp. aktivno penetrirajo črevesni mukozni epitel in izloča proteine s pomočjo flagelarne aparata. Celice črevesnega epitela jo pogoltnejo, kar povzroči razpad integritete epitela. Že 500 celic lahko predstavlja infektivno dozo. Kampilobakter sorazmerno rad privzema tujo DNA in si jo izmenjuje v obliki horizontalnega prenosa genov. Tako je kar 20% genoma variabilnega med izolati. Genom *C. jejuni* je velik cca. 1,6-1,7 Mb. Raste v mikroaerofilnih razmerah med 30 in 44°C. *C. jejuni* v okolico izloča različne virulencne dejavnike. Večinoma, kot že prej omenjeno, skozi flagelarni izločevalni aparat. Glavni izločeni proteini so FlaC, FspA, Cia (*C. jejuni* invasion antigens) in citolitični distendni toksin (CdtA, CdtB in CdtC). FlaC je protein, ki veže HEp-2 celice. FspA (18kb) je v dveh oblikah: FspA1 in FspA2. Le FspA2 veže eukariotske celice in inducira apoptozo v epitelih celicah. Citolitični distendni toksin je sestavljen iz treh podenot CdtA, CdtB in CdtC, ki so vse nujne za toksični efekt. Privzetje CdtB v celice je nujno za toksičnost za eukariotske celice. CdtB ima aktivnost podobno DNazi I. Translociran je do jedra, kjer povzroči ustavitev celičnega cikla v fazi G2 (van Putten et al., 2009).

Glavni virulencni geni in geni, ki kodirajo toksine v *Campylobacter* sp. so: *cadF*, *flaA*, *cdtA* - cytolethal distending toxin subunit A, *cdtB* - cytolethal distending toxin subunit B, *cdtC* -

cytolethal distending toxin subunit C, *cdtABC*, *virB11*. Še drugi virulenčni ali toksinski geni so: *cadF*, *ceuE*, *virB11*, *flaA*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*. Kot potencialen gen za molekularno tipizacijo se je izkazal tudi *hip* (hipuraza), ker ima ta gen le *C. jejuni* (Linton et al., 1997; Persson et al., 2005;).

Med najbolj diskriminativnimi se omenja kombinacija *cdtA*, *cdtB* in *cdtC* genov, kot se to uporablja v kitu RR134A *Campylobacter* (*cdt* gene) PCR Detection and Typing Kit (Takara Bio., Inc.)

(http://catalog.takara-bio.co.jp/en/product/basic_info.asp?unitid=U100006078).

Potencialna uporabnost *flaA* gena, ki kodira bičkasti protein FlaA, izhaja iz dejstva, da je le-ta močno variabilen (Dingle et al., 2002).

Diskriminacija med vrstami *Campylobacter jejuni*, *coli* in *fetus*

Najprej je potrebno določiti katero od treh najbolj razširjenih patogenih vrst iz rodu *Campylobacter* smo izolirali. Za ta namen smo s programom Primrose razvili set treh parov primerjev, optimiziranih za RTqPCR:

Primerja za *C. jejuni*:

Sekvenca (5'→3')	Tm	GC%
Forward primer TGCCAACAACAACCTTCAGCTGTGC	59.08	50.00%
Reverse primer GCAAGGGGCTATTCCAAGCGT	57.81	54.55%
Dolžina produkta	119 bp	

Test v NCBI Nucleotide blast: 100 % ujemanje s *C. jejuni*, precej slabše ujemanje s *C. coli* ali *C. fetus*.

Primerja za *C. coli*:

Sekvenca (5'→3')	Tm	GC%
Forward primer ACAACCCGTGGGCGTGGGTA	60.39	65.00%
Reverse primer TCCGCTTGCACTCTGCTAACGA	58.60	54.55%
Dolžina produkta	150 bp	

Test v NCBI Nucleotide blast: 100 % ujemanje s *C. coli*, precej slabše s *C. jejuni* ali *C. fetus*.

Primerja za *C. fetus*:

Sekvenca (5'→3')	Tm	GC%
Forward primer TGGAATTTGCAAGGCAAGTTCGGCT	59.88	50.00%
Reverse primer AGGTAAATTCCTGCTTCTGAACGGC	58.18	44.44%
Dolžina produkta	120 bp	

Test v NCBI Nucleotide blast: 100 % ujemanje s *C. fetus*, slabše ujemanje s *C. jejuni* ali *C. coli*.

Na podlagi izbranih primerjev lahko ločimo med tremi najpogostejšimi patogenimi vrstami iz rodu *Campylobacter*.

Diskriminacija med sevi *Campylobacter jejuni*

Glede na to, da je *C. jejuni* najbolj razširjena izmed humanih patogenov iz rodu *Campylobacter*, smo se osredotočili na toksinotipizacijo v tej vrsti. Po pozitivnem testu za *C. jejuni* (glej gor), je potrebno določiti sev. Mi smo izbrali tipizacijo sevov, glede na variabilnost zapisov štirih genov. Proučili smo genetsko variabilnost zapisa genov za citoletalni distendni toksin (*cdt*) podenote A, B in C (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*). Prav tako smo naredili toksinotipizacijo na podlagi sekvenc gena *fspA2*, ki z vezavo na celice črevesnega epitela povzroči njihovo apoptozo, gena *hipO*, ki kodira hipurikazo in je specifičen za *C. jejuni*, ter gena *hlaA*, ki kodira bičkasti aparat in je izjemno variabilen.

cdt gen

a) Diskriminacija s Taqman sondami

Forward primer 1: 5`-CCTATACTCCACCrCyTTTAGCTG-3`

24 bp, 50% GC, Tm basic = 57°C

Test v NCBI Nucleotide blast: 100 % ujemanje s *C. fetus*, nič ujemanja s *C. jejuni* ali *C. coli*.

Reverse primer 1: 5`-TCTCCAGTAGGAGyTGCAAAGGy-3`

23 bp, 52% GC, Tm basic = 57°C

Test v NCBI Nucleotide blast: 100 % ujemanje s *C. fetus*, nič ujemanja s *C. jejuni* ali *C. coli*.

Velikost pomnožka zgornjih oligonukleotidnih začetnikov je 183 baznih parov.

Taqman sonde:

- 5`-GTTTAAGATCTCATATAGTTTCGGATCATTTTCCAG-3`

33 bp, 36% GC, Tm basic = 60°C

- 5`GTTTAAGATCTCATATAGTTTCAGATCATTTTCCAG-3`

36 bp, 31% GC, Tm basic = 59°C

- 5`-GATGCTTGCAAGTTTAAGATCATTTTCCAG-3`

30 bp, 37% GC, Tm basic = 58°C

- 5`-ATGCTTGCAAGTTTAAGATCATTTTCCAG-3`

28 bp, 32% GC, Tm basic = 54°C

b) Diskriminacija z melting profili

Za diskriminacijo z melting profili smo izbrali regijo, kjer sta v genih *cdtABC* dve obsežni deleciji. Tako dobimo, če pomnožujemo skrajne regije teh delecij, tri skupine ampliconov, ki se, bolj kot po bazni sestavi, ločijo po dolžini. Zaradi treh različnih skupin ampliconov lahko ločimo med tremi skupinami sevov *C. jejuni*.

Forward primer 1: 5`-ACCTATACTCCACCGCTTTTAGCT-3`

24 bp, 56°C, 46% GC

Test v NCBI Nucleotide blast: 100 % ujemanje s *C. fetus*, nič ujemanja s *C. jejuni* ali *C. coli*.

Reverse primer 1: 5`-TCCAGTAGGAGTTGCAAAGGCTAAAGT-3`

27 bp, 58°C, 44% GC

Test v NCBI Nucleotide blast: 100 % ujemanje s *C. fetus*, nič ujemanja s *C. jejuni* ali *C. coli*.

Na podlagi izbranih primerjev dobimo tri skupine ampliconov genov *cdtABC* *C. jejuni* v približni dolžini 144, 165 in 172 bp, z meltingi cca. 72 in 73°C. Problem predstavlja, da sta si dva amplicona podobna po nukleotidni sestavi in imamo zato le 2 melting vrhova.

Forward primer 2: 5`-ATGCTTGCAAGTTTAAGATC-3`

20 bp, 46°C, 35% GC

Test v NCBI Nucleotide blast: 100 % ujemanje s *C. fetus*, nič ujemanja s *C. jejuni* ali *C. coli*.

Reverse primer 2 (5'->3'): 5`-ATTRTRCTTTRTTTTTATGTTTAT-3`

26 bp, 44°C, 12% GC

Test v NCBI Nucleotide blast: 100 % ujemanje s *C. fetus*, nič ujemanja s *C. jejuni* ali *C. coli*.

Na podlagi izbranih oligonukleotidnih začetnikov dobimo tri skupine amplikonov genov *cdtABC* *C. jejuni* v približni dolžini 80, 103 in 110 bp, z meltingi cca. 59, 63 in 65°C (OligoCalc) oz. 74, 77 in 78°C (VectorNTI). Problem predstavlja nizka melting temperatura oligonukleotidnih začetnikov.

***fspA2* gen**

Na podlagi poravnave šestnajstih zaporedij sekvec gena *fspA2* iz baze NCBI Nucleotide smo se odločili, da ne bi bil pravišnji za genotipizacijo, saj je bilo vseh 16 sekvenc precej podobnih si med seboj. Prav tako ni bilo nobenih obsežnejših delecij/ insercij, ki bi bile uporabne za ločevanje na podlagi melting profilov.

***hipO* gen**

Na podlagi poravnave 36 zaporedij sekvec gena *hipO* v bazi NCBI Nucleotide, smo se odločili, da bi bilo lahko zaporedje na lokacijah od 122 do 126 baze, glede na sekvence v *Campylobacter jejuni*, uporabno za tipizacijo, saj je tu prisotna močno variabilna regija.

***hlaA* gen**

Sekvence gena *hlaA*, ki kodira bičkasti aparat in smo jih uspeli dobiti v bazi NCBI Nucleotide, so se izkazale za izjemno variabilne. Kot take bi bile uporabne za ločevanje z uporabo tehnike denaturacijske gradientne gelske elektroforeze (DGGE). Visoko variabilni segment *flaA* gena bi lahko ločili na DGGE gelih, ker se močno razlikujejo po svojem baznem zaporedju.

Z namenom pomnožiti *flaA* gen smo razvili set primerjev FlaA:

Forward primer FlaAf: 5`-GGTCTTAGAGTTTAGAAATTATGGAGGG-3`

28 bp, 39% GC, Tm basic = 57°C

Test v NCBI Nucleotide blast: 100% ujemanje s *C. jejuni*.

Reverse primer FlaAr: 5`-TCATCATCTTTTACCCACTCATCCCATC-3`

28 bp, 43% GC, Tm basic = 58°C

Test v NCBI Nucleotide blast: 100% ujemanje s *C. jejuni*.

Z omenjenima primerjema bi pomnožili približno 686 bp dolge segmente, ki bi jih nato ločili z uporabo DGGE. Tako dobljene fragmente različnih sevov bi izrezali in DNA ponovno pomnožili s PCR. Po sekveniranju bi dobili točne podatke o sekvencah raznih sevov.

Literatura:

Linton D., Lawson A.J., Owen R.J., Stanley J.1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. J Clin Microbiol, 35(10): 2568-2572

Persson S., Olsen K.E.P.2005. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. J Med Microbiol, 54(11): 1043-1047

Dingle K.E. s sod. 2002. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: A basis for epidemiologic investigation. Emerging Infect Dis, 8(9): 949-955

Toksinotipizacija bakterije *Escherichia coli*

E. coli je ena izmed najbolj preučevanih prokariotskih mikroorganizmov. Uvrščamo jo v družino Enterobacteriaceae in je po Gramu negativna bakterija. Rod obsega pet vrst: *E. coli*, *E. hermannii*,

E. fergusonii, *E. vulneris* in *E. blattae*.

E. coli, ki povzročajo črevesne okužbe delimo na sledeče seve:

- Enteropatogene *E. coli* (EPEC) – ne izločajo verotoksina. V to skupino uvrščamo naslednje O-serološke supine: O26, O55, O86, O88, O103, O111, O114, O119, O125ac, O126, O127, O128ab, O142, O145, O157, O158.
- Enterotoksigene *E. coli* (ETEC) - izločajo toplotno labilne (LT) in/ ali toplotno stabilne (ST) enterotoksine. Toplotno labilni enterotoksini so funkcionalno in strukturno zelo podobni enterotoksinu *Vibrio cholerae*. V to skupino uvrščamo naslednje O-serološke skupine: O6, O8, O25, O78, O153, O128, O86.
- Enteroinvazivne *E. coli* (EIEC) so sorodne šigelam.
- Enteroagregativne *E. coli* (EAggEC) - izdelujejo nekatere enterotoksine in citotoksine. Njihova značilnost je, da se na celice črevesne sluznice pritrjujejo v značilnem vzorcu in, da se bakterije povezujejo med seboj.
- Difuzno adherentne *E. coli* (DAEC)
- Verotoksigene *E. coli* (VTEC) – izdelujejo verotoksine VT1 in/ali VT2, ki so podobni šigovim toksinom, ki jih izdeluje *Shigella dysenteriae* tipa 1. Najpogostejše O-serološke skupine VTEC so O157, O6, O26, O91, O103, O111, O113, O117, O118, O121, O128, O145. Med VTEC sodijo tudi enterohemoragične *E. coli* (EHEC).

Določili smo naslednje oligonukleotidne začetnike za izbrane toksine:

- Shiga toksin 1 (Paton A.W., 1998):
 - Forward primer: STX1-F: 5`-ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC-3`
 - Reverse primer: STX1-R: 5`-GAACGCCCACTGAGATCATC-3`
 - Dolžina pomnožka: 180 bp
- Shiga toksin 2 (Paton AW, 1998):
 - Forward primer: STX2-F: 5`-TCGCCAGTTATCTGACATTCTG-3`
 - Reverse primer: STX2-R: 5`-GGCACTGTCTGAAACTGCTCC-3`
 - Dolžina pomnožka: 255 bp
- Shiga like toxin 1 (Tsen in Jian, 1998):
 - Forward primer: SLT I-5: 5`-AGCTGAAGCTTTACGTTTTTCGG-3`
 - Reverse primer: SLT I-3: 5`-TTTGCGCACTGAGAAGAAGAGA-3`
 - Dolžina pomnožka: 590 bp
- Shiga like toxin 2 (Tsen in Jian, 1998):
 - Forward primer: SLTII-5: 5`-TTTCCATGACAACGGACAGCAGTT-3`
 - Reverse primer: SLTII-3: 5`-ATCCTCATTATACTTGGAAAACCTCA-3`
 - Dolžina pomnožka: 694 bp
- Toplotno labilni toksin 1 (Yano s sod. 2007):
 - Forward primer: LT1-F: 5`-TTACGGCGTACTATCCTCTCTA-3`
 - Reverse primer: LT1-R: 5`-GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC-3`
 - Dolžina pomnožka: 275 bp
- Toplotno labilni toksin 1 (Victor s sod., 1991)
 - Forward primer: LT 51: 5`-CCGTATTACAGAAATCTGA-3`
 - Reverse primer: LT 31: 5`-GTGCATGATGAATCCAGGGT-3`
 - Dolžina pomnožka: 110 bp

- Toplotno stabilni toksin 2 (Lortie s sod., 1991):
 - Forward primer: STII-FP: 5`-GCAATAAGGTTGAGGTGAT-3`
 - Reverse primer: STII-RT: 5`-GCCTGCAGTGAAATGGAC-3`
 - Dolžina pomnožka: 368 bp
- Verotoksin 1 (Cebula s sod., 1995):
 - Forward primer: LP 30: 5`-CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG-3`
 - Reverse primer: LP 31: 5`-CACAGACAATGTAACCGCTG -3`
 - Dolžina pomnožka: 348 bp
- Verotoksin 2 (Cebula s sod., 1995):
 - Forward primer: LP 43: 5`-ATCCTATCCCGGGAGTTTACG-3`
 - Reverse primer: LP 44: 5`-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3`
 - Dolžina pomnožka: 584 bp

2. Tipizacija bakterij *Salmonella* sp.

S pomočjo literature in javno dostopnih baz podatkov (NCBI, UniProt) poiskati genske zapise toksinskih in virulenčnih genov za bakterijo rodu *Salmonella* in ugotoviti na podlagi kakšnih razlik v nukleotidnem zapisu zgoraj omenjenih genov lahko ločimo med seboj čim večje število različnih patogenih sevov bakterije rodu *Salmonella*.

Iz literature in baze podatkov UniProt smo sprva poiskali gene, ki zapisujejo toksine ali pa virulenčne faktorje in preverili njihovo delovanje, ki ga imajo na gostiteljsko celico. Sledilo je iskanje zaporedja nukleinskih baz v bazi podatkov NCBI Blast ter preverjanje prisotnosti posameznega gena pri posameznih bakterijskih sevih, za katere je v bazi podatkov objavljen celoten genom. Nato smo zaporedja nukleinskih kislin posameznega gena primerjali med različnimi sevi bakterije rodu *Salmonella* s programom BioEdit Sequence Alignment Editor. V bazi podatkov smo poiskali tudi informacijo o lokaciji izbranega gena pri posameznem sevu: ali se gen nahaja na plazmidu ali na kromosomu. Med bakterijskimi sevi smo poleg primerjave nukleotidnega zapisa gena primerjali tudi nukleotidni zapis njegove okolice ter iskali palindromska zaporedja.

Rezultati

Izbor toksinskih in virulenčnih genov:

cdtB:

1. protein z endonukleazno aktivnostjo, povzroči poškodbe DNA, fragmentacijo kromatina, ustavitev G2/M celičnega cikla in povečanje jedra v gostiteljski celici,
2. gen je zapisan na kromosomu,
3. gen se nahaja pri treh bakterijskih sevih: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi* str. *CT18*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi* str. *Ty2* in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi A* str. *ATCC 9150*.

spvB (*Salmonella* plasmid virulence):

1. delovanje produkta gena ni znano,
2. gen je zapisan na plazmidu,
3. gen se nahaja pri sledečih bakterijskih sevih: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar

Choleraesuis plasmid pOU7519, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium plasmid pSLT-BT, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi C strain RKS4594 plasmid pSPCV, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis str. SC-B67 plasmid pSCV50, *Salmonella enterica* OU7025 plasmid pOU1113, *Salmonella typhimurium* LT2 plasmid pSLT, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis RF-1 plasmid pKDSC50, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin plasmid pOU1115.

hlyE:

1. gen zapisuje protein hemolizin E s hemolitično aktivnostjo do sesalčjih celic, na celičnih membranah katerih tvori pore,
2. gen je zapisan na kromosomu,
3. gen se nahaja pri sledečih bakterijskih sevih: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi A str. AKU_12601, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Schwarzengrund str. CVM19633, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi A str. ATCC 9150, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. Ty2, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. CT18.

ccdB:

1. gen zapisuje citotoksični protein, ki preprečuje delovanje encima DNA-giraze, ki je odgovoren za razvitje dvovijačne DNA ob njenem pomnoževanju,
2. gen je lahko zapisan na:
 - a. kromosomu: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis str. P125109, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum str. 287/91, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin str. CT_02021853, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona str. SL483, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Schwarzengrund str. CVM19633.
 - b. plazmidu: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis plasmid pOU7519, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis str. SC-B67 plasmid pSCV50, *Salmonella enterica* OU7025 plasmid pOU1113, *Salmonella typhimurium* LT2 plasmid pSLT, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis RF-1 plasmid pKDSC50, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Kentucky str. CVM29188 plasmid pCVM29188_46, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Kentucky str. CVM29188 plasmid pCVM29188_101, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium plasmid pU302L, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin str. CT_02021853 plasmid pCT02021853_74, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin plasmid pOU1115.

Ob pregledu prisotnosti zgoraj omenjenih genov različnih bakterijskih sevov, se je izkazalo, da imajo lahko določeni bakterijski sevi več različnih toksinskih in virulenčnih genov hkrati. Takšni primeri so:

- sevi, ki imajo zapis za gena *cdtB* in *hlyE* so: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. Ty2, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi A str. ATCC 9150,

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18,

- sev, ki ima zapis za gena *hlyE* in *ccdB* je *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Schwarzengrund str. CVM19633,*
- sevi, ki imajo zapis za gena *spvB* in *ccdB* so: *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis plasmid pOU7519, Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67 plasmid pSCV50, Salmonella enterica OU7025 plasmid pOU1113, Salmonella typhimurium LT2 plasmid pSLT, Salmonella enterica enterica sv Choleraesuis RF-1 plasmid pKDSC50, Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin plasmid pOU1115.*

Ob pregledu zapisa gena *ccdB* pri različnih sevih smo našli sev pri katerem je imenovani gen zapisan tako na kromosomu kot tudi na plazmidu: *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin str. CT_02021853 plasmid pCT02021853_74.*

Ločevanje posameh sevov *Salmonella* na podlagi pregleda različnih nukleotidnih zapisov toksinskih in/ali virulenčnih genov in njihove prisotnosti/odsotnosti v posameznem genomu

Toksinski geni zapisani na kromosomih:

Na podlagi nukleotidnega zapisa za gen *hlyE* lahko ločimo tri skupine sevov:

1. *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str. AKU_12601* in *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str. ATCC 9150*: se ne ločita med seboj; drugi sev lahko ločimo od prvega s pomnožitvijo še dodatnega gena *cdtB*,
2. *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. Ty2* in *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18*: se ne ločita med seboj,
3. *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Schwarzengrund str. CVM19633*: se samostojno loči na podlagi razlik v nukleotidnem zaporedju zapisa za gen *hlyE*.

Na podlagi nukleotidnega zaporedja za gen *ccdB* lahko ločimo dve skupini sevov:

1. *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. P125109, Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum str. 287/91* in *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin str. CT_02021853*: se ne ločijo med seboj; zadnji sev lahko ločimo od prvih dveh še z dodatno pomnožitvijo istega gena (le drug zapis) na plazmidu,
2. *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona str. SL483*: se samostojno loči na podlagi razlik v nukleotidnem zaporedju zapisa za gen *ccdB*.

Toksinski geni zapisani na plazmidih:

Na podlagi nukleotidnega zaporedja za gen *ccdB* lahko ločimo šest skupin sevov:

1. *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky str. CVM29188 plasmid pCVM29188_46*: se samostojno loči na podlagi razlik v nukleotidnem zaporedju zapisa za gen *ccdB*,
2. *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky str. CVM29188 plasmid pCVM29188_101*: se samostojno loči na podlagi razlik v nukleotidnem zaporedju zapisa

za gen *ccdB*,

3. *Salmonella typhimurium* plasmid *pU302L*: se samostojno loči na podlagi razlik v nukleotidnem zaporedju zapisa za gen *ccdB*,
4. *Salmonella enterica* strain *OU7025* plasmid *pOU1113*: se samostojno loči na podlagi razlik v nukleotidnem zaporedju zapisa za gen *ccdB*,
5. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Dublin* str. *CT_02021853* plasmid *pCT02021853_74*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Dublin* plasmid *pOU1115* in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* str. *LT2* plasmid *pSLT*: se ne ločijo med seboj; prvi sev lahko ločimo od drugega na podlagi znanja, da sev vsebuje zapis za ta isti toksinski gen tudi na kromosomu; drugi sev lahko ločimo od preostalih dveh na podlagi znanja, da ta sev vsebuje tudi gen *spvB*,
6. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* strain *OU7519* plasmid *pOU7519*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* str. *SC-B67* plasmid *pSCV50* in *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis* RF-1 plasmid *pKDSC50*: se jih ne da ločiti med seboj.

Na podlagi nukleotidnega zaporedja *spvB* lahko ločimo sev:

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar *Paratyphi C* strain *RKS4594* plasmid *pSPC*.

Literatura:

Zore A., Zabukovnik P., Andlovic A. 2007. Enterohemoragični sevi *Escherichia coli* in onesnaženost hrane od polja do mize. Posvetovanje: Varna in zdrava hrana na mizi potrošnika, 7. december 2007

Tsen H.-Y., Jian L.-Z. 1998. Development and use of a multiplex PCR system for the rapid screening of heat labile toxin I, heat stable toxin II and shiga-like toxin I and II genes of *Escherichia coli* in water. *Journal of Applied Microbiology*: 84, 585–592

Victor T., Toit R.O., van Zyl J., Bester A.J., van Helden P.D. 1991. Improved method for the routine identification of toxigenic *Escherichia coli* by DNA amplification of a conserved region of the heat labile toxin A subunit. *Journal of Clinical Microbiology*: 29, 158–161

Lortie L.A., Dubreuil J.D., Harel J. 1991. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhoea. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 656–659

Paton A. W., Paton J. C. 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *Journal of Clinical Microbiology* 36:598–602

Cebula T. A., Payne W. L., Feng P. 1995. Simultaneous Identification of Strains of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 and Their Shiga-Like Toxin Type by Mismatch Amplification Mutation Assay-Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*: 33, 1, 248–250

Yano A., Ishimaru R., Hujikata R. 2007. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-

stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. Microbiology Methods: 68, 414-420

3. Razvoj metode in situ tipizacije bakterij na primeru *M. tuberculosis*

Izvedli smo preliminarne poskuse za tipizacijo sevov *Mycobacterium tuberculosis* na podlagi lokalizacije insercijskih sekvenc tipa IS6110. Klasične metode uporabljajo RFLP tipizacijo, ki traja več dni, zaradi česar je potreben razvoj hitrejših molekularnih metod. Razviti princip metode se da prenesti tudi na druge človeku nevarne bakterije, kot je *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*, ki je povzročitelj Johnne-jeve bolezni pri govedu in drugih prežvekovalcih, pri človeku pa je domnevno vpletena v razvoj Crohn-ove bolezni. Glavna pot prenosa bolezni na človeka je kontakt z okuženo živaljo, še bolj pomembno pa preko kontaminiranega kravjega mleka.

Insercijske sekvence so mobilni genetski elementi, ki se nahajajo v več kopijah v genomu bakterij. Število in pa lokacija teh insercijskih sekvenc v genomu nam omogoča ločiti med posameznimi sevi *M. tuberculosis*. Karakterizacija okolic insercijskih sekvenc pri različnih sevih nam bo omogočila načrtovanje multiplex PCR sistema, na podlagi katerega bomo lahko identificirali prisotnost različnih sevov v vzorcu ali karakterizirali posamezne seve, izolirane s klasičnimi mikrobiološkimi tehnikami.

Metode

Za določitev lokacij IS6110 smo iz agaroznega gela klasične RFLP tipizacije izrezali IS6110 pozitivne odseke DNK petih sevov *M. tuberculosis*. Nato smo izvedli čiščenje DNK iz gela čez *silica* kolone (Promega, ZDA) in preverili prisotnost IS6110 v posameznem odseku DNK s PCR.

Uporabili smo začetne oligonukleotide:

IS6110_60F 5' TCTGGCGTTGAGCGTAGTAG
IS6110_418r 5' CGAGCAAGCCATCTGGAC

Uporabili smo PCR program:

Temp.	čas
95°C	2 min
95°C	45 s
55°C	45 s
72°C	45 s
72°C	5 min

Očiščene odseke smo nato razrezali z restrikcijskimi encimi. Izbrali smo encime, ki režejo znotraj insercijske sekvence in v okolici 3' konca IS6110, glede na genom *M. tuberculosis* H37Rv. V preliminarnih poskusih smo preizkusili tri restrikcijske encime:

Encim	Čas inkubacije z DNK/temp.	Čas za inaktivacijo encima/temp.
BamHI	1 h/37°C	20 min/80°C
NcoI	1 h/37°C	20 min/65°C
Eco52I	1 h/37°C	20 min/65°C

Pomembni parametri pri restrikcijskih encimih so predvsem izkoristek rezanja in ponovne

ligacije, možnost inaktivacije in rezidualna aktivnost ter velikost odsekov, ki jih generira. Optimalna dolžina, ki jo še lahko učinkovito pomnožimo s PCR je do 4000 bp. To je odvisno od oddaljenosti prepoznavnega mesta za encim od 3' konca insercijske sekvence, ki se razlikuje za vsako insercijsko sekvenco. Minimalna dolžina je pomembna za uspešno ligacijo v krožno DNK in se giblje med 150 in 200 bp.

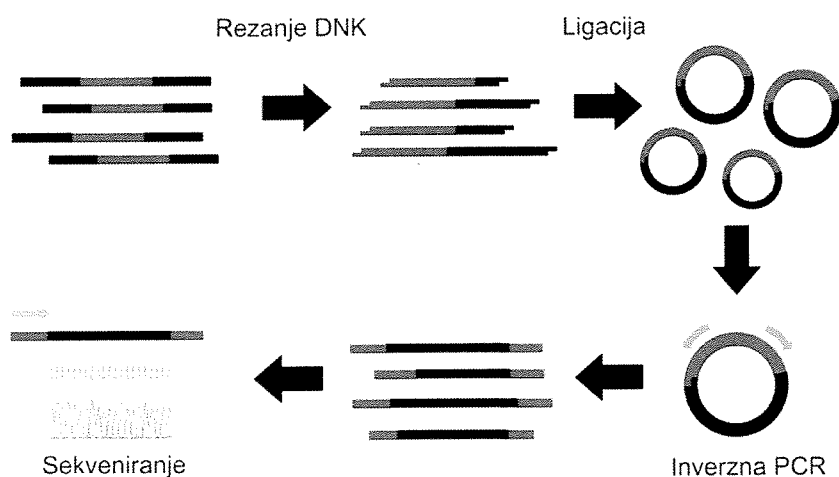
Razrezano DNK smo nato ligirali s T4 ligazo, 16 ur na 16°C, inaktivirali encim 20 min pri 65°C in mešanico uporabili direktno v inverzni PCR reakciji. V primeru uspešne avtoligacije smo dobili krožne DNK produkte, ki so vsebovali 3' okolico IS6110 (Slika 9). Krožne produkte smo pomnožili z inverznimi začetnimi oligonukleotidi:

ISOF 5' TACAAGACCGAGCTGATCAAAC
ISOR 5'AGATCCCCTATCCGTATGGTG

Uporabili smo PCR program:

Temp.	čas
94°C	2 min
95°C	45 s
56°C	45 s
72°C	3,5 min
72°C	5 min

Za pozitivno kontrolo smo skonstruirali plazmid na osnovi pCR 2.1 (Invitrogen), ki je vseboval 800 bp 3' konca IS6110.



Slika 9. Princip določevanja okolic insercijske sekvence IS6110. Rdeče označeno – IS6110, črno označeno – okolica IS6110

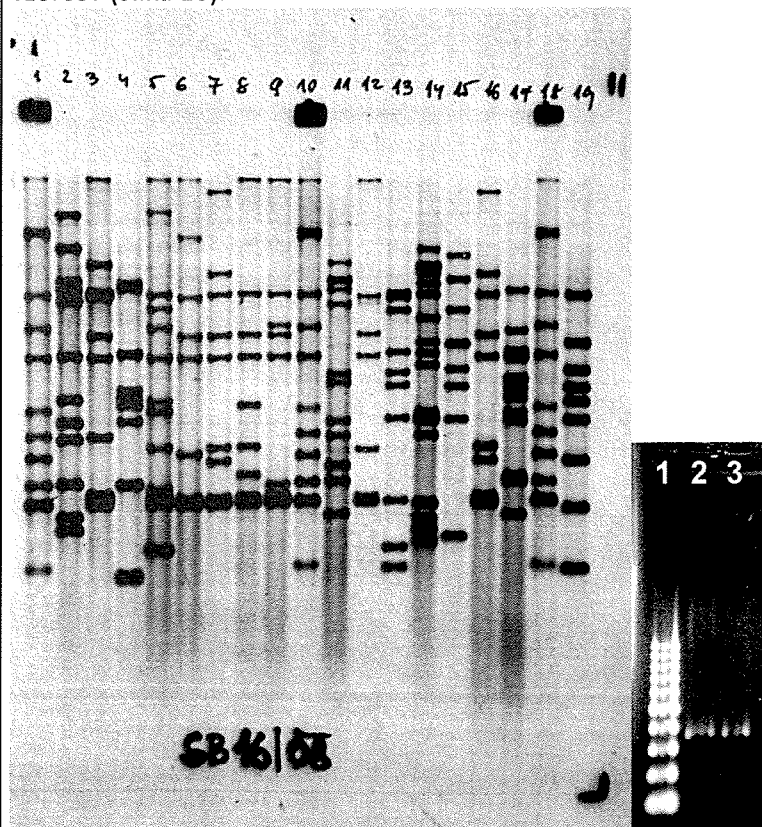
Amplikone smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo, jih izrezali iz gela ter očistili čez silica kolone (Promega, ZDA). Očiščene amplikone smo sklonirali v vektor pCR 2.1 (Invitrogen, ZDA) in transformirali v elektrokompetentne *E. coli*. Po inkubaciji na LB ploščah s selekcijskim antibiotikom (ampicilin) in X-gal smo bele kolonije precepili, izolirali plazmidno DNK in sekvenirali inserte z M13 univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi.

Zaporedja smo poravnali v programu Bioedit, lokacijo IS6110 pa določili s preverjanjem naleganja zaporedij na objavljene genome *M. tuberculosis* z uporabo orodja Blastn.

Rezultati

Izrez IS6110 pozitivnih odsekov

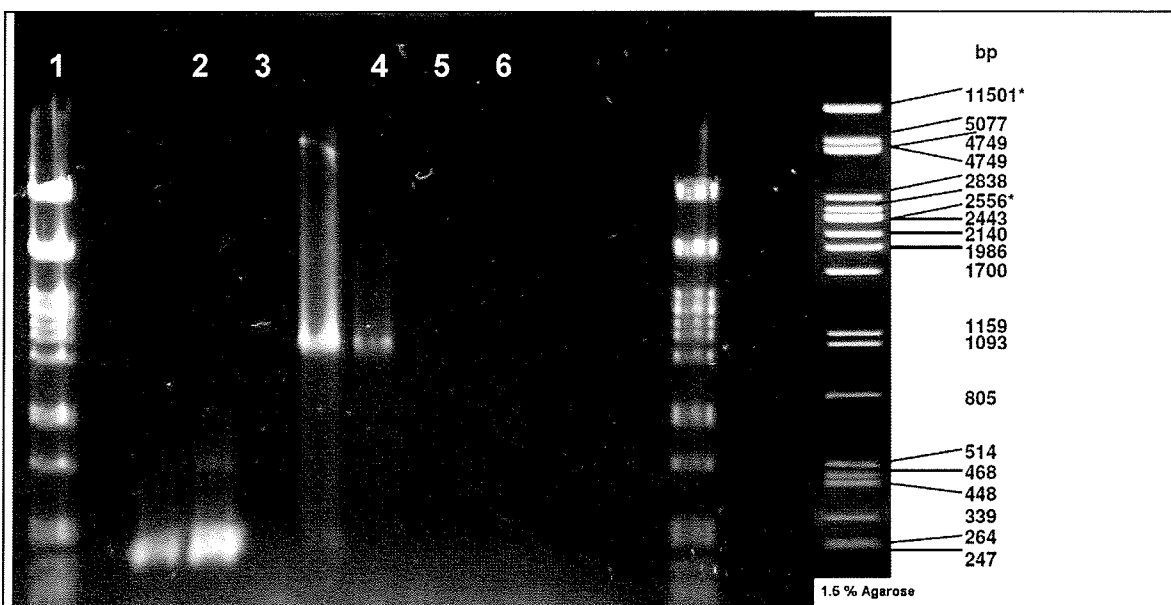
Uspešno smo izrezali IS6110 pozitivne odseke iz agaroznega gela RFLP tipizacije. Z začetnimi oligonukleotidi IS6110_60F/IS6110_R smo uspešno pomnožili specifičen odsek iz vseh izrezanih vzorcev (Slika 10).



Slika 10. Levo - slika agaroznega gela klasične RFLP tipizacije (Bolnišnica Golnik). Vidni so odseki, pozitivni za prisotnost IS6110. Izrezali smo vse odseke vzorcev 1, 9, 14, 15 in 19. Desno - PCR za povratno preverjanje prisotnosti IS6110 v izrezanih in čiščenih DNK odsekih; 1 - označevalec velikosti, 2 - vzorec 19A, 3 - vzorec 19B.

Rezanje odsekov z restrikcijskimi encimi, inverzna PCR in analiza zaporedij

Z rezanjem in ponovno ligacijo smo dobili ustrezne krožne DNK produkte, ki smo jih uspeli pomnožiti z inverzno PCR (Slika 11). S tem smo potrdili delovanje zasnovanega koncepta.



Slika 11. Primer agarozne gelske elektroforeze produktov po rezanju z NcoI, ligaciji in inverzni PCR. V primeru prisotnosti krožne, pravilno ligirane DNK, smo dobili viden produkt. 1 – označevalec velikosti (legenda skrajno desno), 2 – vzorec 19F, 3 – vzorec 19F, 4, 5 – pozitivna kontrola, 6 – negativna kontrola.

Preizkušeni encimi niso bili ustrezni glede na izbrane parametre.

Encim BamHI je kazal rezidualno aktivnost, kljub temperaturni inaktivaciji, zaradi česar je bil izkoristek pomnoževanja krožnih ligacijskih produktov z inverzno PCR slab. Analiza zaporedij je pokazala, da v večini zaporedij manjkajo 3' okolice IS6110. Razlog je bilo nespecifično rezanje encima BamHI, t.i. *star* aktivnost, ki se je kljub redčenju encima v restrikcijski reakciji nismo uspeli znebiti.

Pri encimu NcoI nismo zaznali rezidualne aktivnosti ali nespecifičnega rezanja. Z inverzno PCR smo uspešno pomnožili avtoligirane krožne DNK le pri 4 vzorcih. Razlog je v preveliki oddaljenosti prepoznavnega mesta za NcoI od 3' konca nekaterih IS6110, zaradi česar je bil ligacija v krožne produkte slaba, zaradi prevelikih konstruktov (nad 4000 bp) pa z inverzno PCR nismo dobili produkta.

Na podobne težave smo naleteli tudi pri uporabi encima Eco52I.

Sklep

Zasnova koncepta lokalizacije IS6110 v *M. tuberculosis* je ustrezna in jo bomo uporabljali v prihodnjih poskusih. V preliminarnih raziskavah smo preverili delovanje treh restrikcijskih encimov, ki pa so se izkazali za neustrezne glede na izbrane parametre. Z *in silico* analizo objavljenih genomov *M. tuberculosis* smo izbrali nove restrikcijske encime, ki jih bomo preizkusili. Preverili smo predvsem oddaljenost med restrikcijskimi mesti znotraj IS6110 in v okolici 3' konca. Po primerjavi je med najbolj primeren kandidati encim Bfal (Tabela 4).

Tabela 4. Primerjava razdalj med dvema prepoznavnima mestoma za različne restriksijske encime v IS6110 in okolici 3' konca IS6110. Primerjava je bila izvedena na genomu *M. tuberculosis* H37Rv (Genebank ID: NC_000962)

Restriksijski encimi/razdalje med dvema prepoznavnima mestoma v bp					
zap. št.	BpuEI	Bfal	BssHII	XhoI	ZraI/AatI
IS61100					
1	2333	2021	388	459	4248
2	3338	882	444	249	489
3	4633	568	2675	966	1865
4	3295	1972	2398	1162	416
5	>5000	654	1391	3927	1746
6	1200	820	247	246	247
7	2618	773	996	3542	1541
8	4205	376	290	680	1177
9	1848	1238	799	569	2284
10	3553	874	446	4384	206
11	>5000	770	1565	1082	393
12	935	1136	231	1026	1471
13	2480	1071	860	>5000	2965
14	>5000	371	3640	3019	416
15	>5000	882	444	250	488
16	>5000	806	1085	2845	988
17	2716	1297	619	1330	1584

Ob uspešnem testiranju encima Bfal bomo pripravili klonsko knjižnico produktov inverzne PCR za posamezne seve ter pridobili zaporedja vseh okolic 3' koncev IS6110. Glede na ta zaporedja bomo zasnovali multiplex PCR sistem za hitro tipizacijo sevov. Preizkusili bomo tudi neposredno tipizacijo s primerjavo dolžin produktov inverzne PCR in jo primerjali s klasično RFLP tipizacijo.

In silico* analiza lokacij insercijskih zaporedij tipa 6110 na objavljenih genomih *Mycobacterium tuberculosis

Za namene *in situ* genotipizacije sevov *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) direktno iz vzorcev, smo z bioinformatičnimi orodji izvedli analizo lokacij oziroma okolic insercijskih zaporedij tipa 6110 (IS6110). Zaporedja okolic nam bodo omogočila konstrukcijo oligonukleotidov, ki bodo temelj za genotipizacijo sevov *Mtb*, bodisi z multipleks PCR reakcijo na izbranih ustrezno diskriminatornih lokacijah IS6110, bodisi s pripravo mikročipa za tarčno resekveniranje z metodami sekveniranja naslednje generacije.

Metode

Zaporedja objavljenih genomov smo dobili v javni bazi podatkov NCBI (National Centre for Biotechnology Information) in jih analizirali v programu VectorNTI (Invitrogen). Vse prisotne IS6110 vključno z okolico 1000 baznih parov gor- in dolvodno smo poravnali v programu Bioedit. Zaporedja 5' in 3' okolic smo primerjali z NCBI bazo nukleotidnih zaporedij z uporabo algoritma

BLAST (NCBI) in poiskali pripadajoče genomske regije oziroma gene. Identiteto predvidenih prepisov v proteine smo preverili v bazi proteinskih zaporedij UNIPROT (www.uniprot.org), fizično lokacijo genov pa v aplikaciji za vizualizacijo anotiranih genomov Sequence Viewer (NCBI). Lokacije vseh IS6110 smo normirali na sev H37Rv s primerjavo nukleotidnih zaporedij okolic IS6110 z zaporedjem genoma H37Rv z algoritmom BLAST (NCBI). Vsako specifično lokacijo smo označili s svoj številko in določili diskriminatorno moč genotipizacije z lokacijami IS6110.

Rezultati

Analizirali smo 5 objavljenih genomov *Mtb*:

1. Sev H37Rv (NCBI ref. št.: NC_000962.2),
2. Sev H37Ra (NCBI ref. št.: NC_009525.1),
3. Sev CDC 1551 (NCBI ref. št.: NC_002755),
4. Sev KZN 1435 (NCBI ref. št.: NC_012943.1) in
5. Sev F11 (NCBI ref. št.: NC_009565.1).

Sevi so se razlikovali v številu IS6110 v genomu (Tabela 5) kot tudi po lokacijah/insercijskih mestih, kar kaže na veliko raznolikost sevov glede omenjene insercijske sekvence. IS6110 so bile vstavljene v nekodirajočih regijah med dvema odprtima bralnima okvirjema, kar lahko vpliva na regulacijo prepisovanja genov, ki sledijo. Nekatere so bile locirane tudi znotraj kodirajočih genov, kar lahko povzroči izgubo funkcionalnosti ali pa pridobitev nove. Iz tega vidika so lokacije IS6110 pomembne tudi za fenotip seva, poznavanje teh lokacij z ustreznimi genotipizacijskimi postopki pa bi nam omogočilo sklepati tudi na fenotip (npr. virulenčnost, odpornost na antibiotike, itd.).

Tabela 5. Število IS6110 pri analiziranih sevih

Sev	H37Rv	H37Ra	CDC 1551	KZN 1435	F11
št. IS6110	14	9	4	14	17

V Tabeli 6 so prikazane lokacije IS6110 v analiziranih genomih, podane so 5' in 3' okolice insercijskih mest. Opazili smo povečano frekvenco insercij v okolici genov, ki kodirajo za PPE, PE in PE-PGRS proteinov, ki naj bi imeli vlogo pri antigeniski variabilnosti *Mtb*. Določene IS6110 so bile locirane v okolici insercijskih sekvenc drugih tipov (npr. IS1573 in IS 1603) ali na mestih z več zaporednimi tandemskimi ponovitvami oligonukleotidnih motivov. Za mnogo genov v 5' in 3' okolicih do sedaj še ni znanih funkcij ali celo homologov v proteinskih bazah podatkov (UNIPROT).

Tabela 6. Lokacije IS6110 v analiziranih genomih

MTB strain/ IS#	Gene	Locus tag	homology/annotation	IS6110 orient.	Gene	Locus tag	homology/annotation
			5' end				3' end
CDC1551							
1	<i>mmpL</i>	MT1502	MmpL family transmembrane transport protein	(+)	-	MT1505	serine esterase, cutinase family
2	-	MT2880	general secretion pathway protein A-related protein	(+)	-	MT2883	CRISPR-associated protein Cas2
3	<i>PPE46</i>	MT3101	PPE family protein	(-)	-	MT3098	PPE family protein
4	-	MT0412	MmpL family membrane protein	(+)	-	MT0415	conserved hypothetical protein
H37Ra							
1	-	MRA_0010	putative conserved membrane protein	(+)	-	MRA_0013	hypothetical membrane protein
2	<i>lprF</i>	MRA_1378	putative conserved lipoprotein LprF	(+)	-	MRA_1381	desaturase-related protein
3	<i>mmpL1</i>	MRA_1765D	putative transmembrane transport protein MmpL14	(+)	<i>cut1</i>	MRA_1771	putative cutinase Cut1, interrupted
4	-	MRA1779	truncated IS6110 transposase	(+)	-	MRA_1775	hypothetical protein
5	-	MRA_2181	hypothetical protein	(+)	-	MRA_2184	putative conserved transmembrane protein
6	-	MRA_2380	PPE family protein	(-)	-	MRA_2377	PPE family protein
7	-	MRA_2837	conserved hypothetical protein	(+)	-	MRA_2840	hypothetical protein
8	-	MRA_3369	IS1547 transposase	(-)	<i>mooC3</i>	MRA_3366	molybdenum cofactor biosynthesis protein C3
9	<i>kgp</i>	MRA_3516	dicarboxylic acid transport integral membrane protein	(-)	<i>bpoA</i>	MRA_3513	putative peroxidase BpoA
H37Rv							
1	-	Rv0797	probable transposase fusion protein (IS1547 N-term)	(-)	-	Rv0794c	probable oxidoreductase, dihydrolipoamide dehydrogenase (lipoB), mercuric reductase
2	<i>lprF</i>	Rv1368	probable conserved lipoprotein LprF	(+)	-	Rv1371	probable conserved membrane protein
3	<i>picD</i>	Rv1755c	probable phospholipase C4 (fragment) PicD	(+)	<i>cut1</i>	Rv1758	probable cutinase Cut1
4	-	Rv1765c	conserved hypothetical protein	(-)	-	Rv1762c	hypothetical protein
5	<i>PPE22</i>	Rv2107	PE family protein	(-)	-	Rv2104c	conserved hypothetical protein
6	-	Rv2166c	conserved hypothetical protein	(+)	-	Rv2169c	probable conserved transmembrane protein
7	-	Rv2280	possible D-lactate dehydrogenase (cytochr.) precursor	(-)	-	Rv2277c	Possible glycerophosphodiesterase
8	<i>PPE40</i>	Rv2356c	PPE family protein	(-)	<i>PPE39</i>	Rv2353c	PPE family protein
9	-	Rv2650c	possible phiRv2 prophage	(-)	-	Rv2647	hypothetical protein
10	-	-	36 bp direct repeat region, cca 1800 bp upstream	(+)	-	-	36 bp direct repeat region, 1500 bp downstream
11	-	Rv3185	probable transposase for IS6110	(-)	-	Rv3183	possible transcriptional regulatory protein
12	-	Rv3188	conserved hypothetical protein	(-)	-	Rv3185	probable transposase for IS6110
13	-	Rv3327	IS1547 transposase	(-)	<i>mooC</i>	Rv3324c	molybdenum cofactor biosynthesis protein C
14	<i>kgp</i>	Rv3476c	dicarboxylic acid transport integral membrane protein	(-)	<i>bpoA</i>	Rv3473c	putative peroxidase BpoA

Tabela 7. Lokacije IS6110 v analiziranih genomih - nadaljevanje

MTB strain/ IS#	Gene	Locus tag	homology/annotation 5' end	IS6110 orient.	Gene	Locus tag	homology/annotation 3' end
KZN 1435							
1	-	TBMG_00850	conserved hypothetical protein	(+)	-	TBMG_00853	HAD superfamily hydrolase
2	-	TBMG_01160	conserved hypothetical protein	(-)	-	TBMG_01157	conserved hypothetical protein
3	-	TBMG_01198	oxidoreductase	(-)	-	TBMG_01201	hypothetical protein
4	-	TBMG_01478	antitoxin	(+)	-	TBMG_01481	conserved hypothetical protein
5	-	TBMG_01621	PPE family protein	(-)	-	TBMG_01623	conserved hypothetical protein
6	-	TBMG_01702	transcriptional regulator, lysR-family	(-)	<i>lipM</i>	TBMG_01699	esterase LipM
7	-	TBMG_04043	transposase IS6110	(-)	-	TBMG_01873	PE family protein
8	-	TBMG_01877	conserved hypothetical protein	(-)	-	TBMG_04042	transposase IS6110
9	-	TBMG_01964	conserved hypothetical protein	(+)	-	TBMG_01957	conserved hypothetical protein
10	-	TBMG_02192	conserved hypothetical protein	(-)	-	TBMG_02189	hypothetical protein
11	-	TBMG_02241	conserved hypothetical protein	(-)	<i>cut1</i>	TBMG_02238	cutinase cut1
12	-	TBMG_03157	hydrolase	(-)	-	TBMG_03154	hypothetical protein
13	<i>moaB3</i>	TBMG_03374	pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase moaB3	(+)	-	TBMG_03377	alternative RNA polymerase sigma factor sig ₃
14	-	TBMG_03675	transposase	(+)	-	TBMG_03678	conserved hypothetical protein
F11							
1	-	TBFG_10851	hypothetical protein	(+)	-	TBFG_10854	hypothetical protein
2	-	TBFG_11349	interrupted adenylate cyclase (N-term)	(-)	-	TBFG_11346	interrupted adenylate cyclase (C-term)
3	-	TBFG_11738	interrupted hypothetical protein, pseudogene	(+)	-	TBFG_11738	interrupted hypothetical protein, pseudogene
4	-	TBFG_11772	conserved hypothetical protein	(+)	<i>picD</i>	TBFG_11775	phospholipase C PicD
5	<i>cut1</i>	TBFG_11779	cutinase 1 Cut1, interrupted	(+)	<i>cut1</i>	TBFG_11779	cutinase 1 Cut1, interrupted
6	-	TBFG_11786	conserved hypothetical protein	(-)	-	TBFG_11783	PE-PGRS family protein
7	-	TBFG_11793	transposase	(-)	-	TBFG_11790	conserved hypothetical protein
8	-	TBFG_11805	interrupted cytochrome p450 CYP144, pseudogene	(+)	-	TBFG_11805	interrupted cytochrome p450 CYP144, pseudogene
9	-	TBFG_12047	interrupted conserved hypothetical protein TBFG_1790	(-)	-	TBFG_12047	interrupted conserved hypothetical protein TBFG_1790
10	-	TBFG_12115	conserved hypothetical protein	(-)	-	TBFG_12112	conserved transmembrane protein
11	-	TBFG_12379	PPE family protein	(-)	-	TBFG_12376	PPE family protein
12	-	TBFG_12382	PPE family protein	(-)	-	TBFG_12379	PPE family protein
13	-	TBFG_12415	interrupted conserved hypothetical protein	(+)	-	TBFG_12415	interrupted conserved hypothetical protein
14	-	TBFG_12827	conserved hypothetical protein	(+)	-	TBFG_12830	conserved hypothetical protein
15	-	TBFG_13130	interrupted hydrolase, haloacid dehalogenase-like fam.	(-)	-	TBFG_13130	interrupted hydrolase, haloacid dehalogenase-like fam.
16	-	TBFG_13205	hypothetical transcriptional regulatory protein	(+)	-	TBFG_13208	conserved hypothetical protein
17	-	TBFG_13356	pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase moaB3	(+)	-	TBFG_13359	transposase IS1547

Za vse gene v okolici IS6110 pri različnih sevih smo poiskali homologe v genomu seva H37Rv, da bi lahko preverili ohranjenost insercijskih mest in s tem določili IS6110 insercijske genotipe za vsak posamezen sev. Homologi in njihove anotacije v H37Rv so prikazani v Tabeli 8, genotipi glede na vse analizirane lokacije IS6110 pa v Tabeli 9.

Tabela 8. H37Rv homologi in anotacije genov v okolih IS6110 pri različnih sevih.

#	H37Rv			H37Rv		
	Strain H37Rv	homolog	H37Rv gene annotation	Strain H37Rv	homolog	H37Rv gene annotation
5' end				3' end		
1	Rv0797	-	probable transposase fusion protein (IS1547 N-term)	Rv0794c	-	probable oxidoreductase, dihydroliposamide dehydrogenase (lpoB), mercuric reductase
2	Rv1368	-	probable conserved lipoprotein LprF	Rv1371	-	probable conserved membrane protein
3	Rv1755c	-	probable phospholipase C4 (fragment) PlcD	Rv1758	-	probable cutinase Cut1
4	Rv1765c	-	conserved hypothetical protein	Rv1762c	-	hypothetical protein
5	Rv2107	-	PE family protein	Rv2104c	-	conserved hypothetical protein
6	Rv2166c	-	conserved hypothetical protein	Rv2169c	-	probable conserved transmembrane protein
7	Rv2280	-	possible D-lactate dehydrogenase (cytochr.) precursor	Rv2277c	-	Possible glycerolphosphodiesterase
8	Rv2356c	-	PPE family protein	Rv2353c	-	PPE family protein
9	Rv2650c	-	possible phiRv2 prophage protein	Rv2647	-	hypothetical protein
10	Rv2813	-	36 bp direct repeat region, cca 1800 bp upstream	Rv2816c	-	36 bp direct repeat region, cca 1800 bp upstream
11	Rv3185	-	probable transposase for IS6110	Rv3183	-	possible transcriptional regulatory protein
12	Rv3188	-	conserved hypothetical protein	Rv3185	-	probable transposase for IS6110
13	Rv3327	-	IS1547 transposase	Rv3324c	-	molybdenum cofactor biosynthesis protein C
14	Rv3476c	-	dicarboxylic acid transport integral membrane protein	Rv3473c	-	putative peroxidase BpoA

#	Strain CDC1551			Strain CDC1551		
	Strain H37Rv	homolog	H37Rv gene annotation	Strain H37Rv	homolog	H37Rv gene annotation
5' end				3' end		
1	MT1802	-	-	MT1805	Rv1758	probable cutinase Cut1
2	MT2880	Rv2813	hypothetical protein, 36 bp direct repeat region, cca 1800 bp upstream	MT2883	Rv2816c	hypothetical protein, 36 bp direct repeat region, 1800 bp downstream
3	MT3101	Rv3018c	PPE family protein, PPE46	MT3098	Rv3018c	PPE family protein, PPE46
4	MT0412	Rv0403c	membrane protein Mmp51	MT0415	Rv0403c	membrane protein Mmp51

#	Strain H37Ra			Strain H37Ra		
	Strain H37Ra	homolog	H37Rv gene annotation	Strain H37Ra	homolog	H37Rv gene annotation
5' end				3' end		
1	MRA_0010	Rv0010c	Probable conserved membrane protein	MRA_0013	Rv0011c	integral membrane protein involved in inhibition of septation
2	MRA_1378	Rv1368	lipoprotein LprF	MRA_1361	Rv1371	hypothetical protein
3	MRA_1768D	-	-	MRA_1771	Rv1758	hypothetical protein
4	MRA1779	Rv1765	hypothetical protein, transposase 6110	MRA_1775	Rv1762c	hypothetical protein
5	MRA_2181	Rv2166c	cell division protein MraZ	MRA_2184	Rv2169c	transmembrane protein
6	MRA_2380	Rv2356c	PPE family protein	MRA_2377	Rv2353c	PPE family protein, PPE2e
7	MRA_2837	Rv2813	hypothetical protein, 36 bp direct repeat region, cca 1800 bp upstream	MRA_2840	Rv2816c	hypothetical protein, 36 bp direct repeat region, 1500 bp downstream
8	MRA_3369	Rv0797	probable transposase fusion protein (IS1547 N-term)	MRA_3366	Rv3324c	molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaC
9	MRA_3516	Rv3476c	dicarboxylic acid transport integral membrane protein KgtP	MRA_3513	Rv3473c	peroxidase BpoA

#	Strain KZN 1435			Strain KZN 1435		
	Strain KZN 1435	homolog	H37Rv gene annotation	Strain KZN 1435	homolog	H37Rv gene annotation
5' end				3' end		
1	TBMG_00850	Rv0835	lipoprotein LpoQ	TBMG_00853	Rv3113	phosphatase
2	TBMG_01160	Rv2775	hypothetical protein	TBMG_01157	-	-
3	TBMG_01198	Rv2813	hypothetical protein	TBMG_01201	Rv2775	hypothetical protein
4	TBMG_01478	Rv2492	hypothetical protein	TBMG_01481	Rv2492	hypothetical protein
5	TBMG_01631	Rv2352c	PPE family protein	TBMG_01623	Rv2353c	PPE family protein
6	TBMG_01702	Rv2282c	LysR family transcriptional regulator	TBMG_01699	Rv2283	hypothetical protein
7	TBMG_04043	Rv2106	IS6110 transposase	TBMG_01873	Rv2107	PE family protein, PE22
8	TBMG_01877	Rv2106	IS6110 transposase	TBMG_04042	Rv2107	PE family protein, PE22
9	TBMG_01964	Rv2019	hypothetical protein	TBMG_01967	Rv2019	hypothetical protein
10	TBMG_02192	Rv1804c	hypothetical protein	TBMG_02189	Rv1805c	hypothetical protein
11	TBMG_02241	Rv1754c	hypothetical protein, proline rich protein	TBMG_02238	Rv1758	probable cutinase Cut1
12	TBMG_03157	Rv3113	phosphatase	TBMG_03154	Rv0836c	hypothetical protein
13	TBMG_03374	-	-	TBMG_03377	Rv3328c	RNA polymerase sigma factor SigJ
14	TBMG_03675	Rv3638	transposase IS1384	TBMG_03678	Rv3639c	hypothetical protein

H37Rv			H37Rv			
Strain F11	homolog	H37Rv gene annotation	Strain F11	homolog	H37Rv gene annotation	
5' end			3' end			
1	T6FG_10851	Rv0835	lipoprotein LpqQ	T6FG_10854	Rv0836c	hypothetical protein
2	T6FG_11349	Rv1319c	adenylate cyclase	T6FG_11346	Rv1319c	adenylate cyclase
3	T6FG_11738	Rv1725c	hypothetical protein	T6FG_11736	Rv1725c	hypothetical protein
4	T6FG_11772	Rv1754c	hypothetical protein	T6FG_11775	Rv1754c	hypothetical protein
5	T6FG_11779	-	-	T6FG_11779	Rv1758	probable cutinase Cut1
6	T6FG_11786	Rv1759c	PE-PGRS family protein, wag22	T6FG_11783	Rv1760	hypothetical protein
7	T6FG_11793	Rv1765c	hypothetical protein	T6FG_11790	Rv1765A	transposase
8	T6FG_11805	Rv1777	cytochrome p450 144 CYP144	T6FG_11805	Rv1777	cytochrome p450 144 CYP144
9	T6FG_12047	Rv2105c	hypothetical protein	T6FG_12047	Rv2105c	hypothetical protein
10	T6FG_12115	Rv2077A	hypothetical protein, alanine rich	T6FG_12112	Rv2078	hypothetical protein
11	T6FG_12379	-	-	T6FG_12376	Rv2352c	PPE family protein
12	T6FG_12382	Rv2356c	PPE family protein, PPE40	T6FG_12379	Rv2356c	PPE family protein, PPE40
13	T6FG_12415	Rv2390c	hypothetical protein	T6FG_12415	Rv2390c	hypothetical protein
14	T6FG_12827	Rv3113	hypothetical protein	T6FG_12830	-	-
15	T6FG_13130	Rv3113	phosphatase	T6FG_13130	Rv3113	phosphatase
16	T6FG_13205	Rv3183	transcriptional regulatory protein	T6FG_13208	Rv3184	transposase IS6110
17	T6FG_13356	-	-	T6FG_13359	-	-

Tabela 9. Relativne lokacije IS6110 v vseh analiziranih genomih glede na genom seva H37Rv pripadajoči genotipi. Vsaki unikatni lokaciji je bila dodeljena zaporedna numerično vrednost, skupek vseh pa predstavlja IS6110 genotipizacijski profil, ki je specifičen za sev.

Strain	Insertion site relative to strain H37Rv		Genotype assignment number	Strain	Insertion site relative to strain H37Rv		Genotype assignment number
	5' end	3' end			5' end	3' end	
H37Rv	Rv0797	Rv0794c	1	KZN 1435	Rv0835	Rv3113	20
	Rv1368	Rv1371	2		Rv2775	-	21
	Rv1755c	Rv1758	3		Rv2813	Rv2775	22
	Rv1765c	Rv1762c	4		Rv2492	Rv2492	23
	Rv2107	Rv2104c	5		Rv2352c	Rv2353c	24
	Rv2166c	Rv2169c	6		Rv2282c	Rv2283	25
	Rv2280	Rv2277c	7		Rv2106	Rv2107	26
	Rv2356c	Rv2353c	8		Rv2106	Rv2107	27
	Rv2650c	Rv2647	9		Rv2019	Rv2019	28
	Rv2813	Rv2816c	10		Rv1804c	Rv1805c	29
	Rv3185	Rv3183	11		Rv1754c	Rv1758	30
	Rv3188	Rv3185	12		Rv3113	Rv0836c	31
	Rv3327	Rv3324c	13		-	Rv3328c	32
	Rv3476c	Rv3473c	14		Rv3638	Rv3639c	33
CDC 1551	-	Rv1758	15	F 11	Rv0835	Rv0836c	34
	Rv2813	Rv2816c	10		Rv1319c	Rv1319c	35
	Rv3018c	Rv3018c	16		Rv1725c	Rv1725c	36
	Rv0403c	Rv0403c	17		Rv1754c	Rv1754c	37
H37Ra	Rv0010c	Rv0011c	18		-	Rv1758	15
	Rv1368	Rv1371	1		Rv1759c	Rv1760	38
	-	Rv1758	15		Rv1765c	Rv1765A	39
	Rv1765	Rv1762c	4		Rv1777	Rv1777	40
	Rv2166c	Rv2169c	6		Rv2105c	Rv2105c	41
	Rv2356c	Rv2353c	8		Rv2077A	Rv2078	42
	Rv2813	Rv2816c	10		-	Rv2352c	43
	Rv0797	Rv3324c	19		Rv2356c	Rv2356c	44
	Rv3476c	Rv3473c	14		Rv2390c	Rv2390c	45
					Rv2813	-	46
					Rv3113	Rv3113	47
					Rv3183	Rv3184	48
					-	-	49

Iz Tabele 9 je razvidno, da so lokacije večine IS6110 unikatne za sev. Od 58 identificiranih lokacij je bilo kar 49 unikatnih, kar kaže na močno diskriminatorno moč določevanja sevov glede na število in lokacije IS6110 pri *Mtb*. Velika raznolikost insercijskih mest nakazuje na nestabilnost genomov *Mtb* v kontekstu insercijskih sekvenc in da obstaja možnost diverzifikacije ter fenotipske variabilnosti med sevi kot posledica premeščanj mobilnih genomskih elementov. Intenzivna premeščanja so lahko posledica prilagajanja stresnim razmeram v okolju, kakršno je v gostitelju, zaradi česar je fenotip gostitelja prav tako pomemben za uspešno infekcijo z določenim fenotipom/genotipom *Mtb*.

V nadaljevanju projekta bomo pregledali možne rešitve in platforme za *in situ* genotipizacijo *Mtb* na podlagi števila in lokacij IS6110. Dosedanje raziskave so pokazale veliko diskriminatorno moč teoretičnega modela, zaradi česar bo potrebno izmed vseh izbrati le reprezentativne lokacije. Podoben model bomo preizkusili tudi na primeru bakterije *Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis*, kjer bomo pregledali število in lokacije IS900 na objavljenih in nekaterih še neobjavljenih 'draft' genomih.

4. Razvoj metode tipizacije podvrst bakterij *Mycobacterium avium*

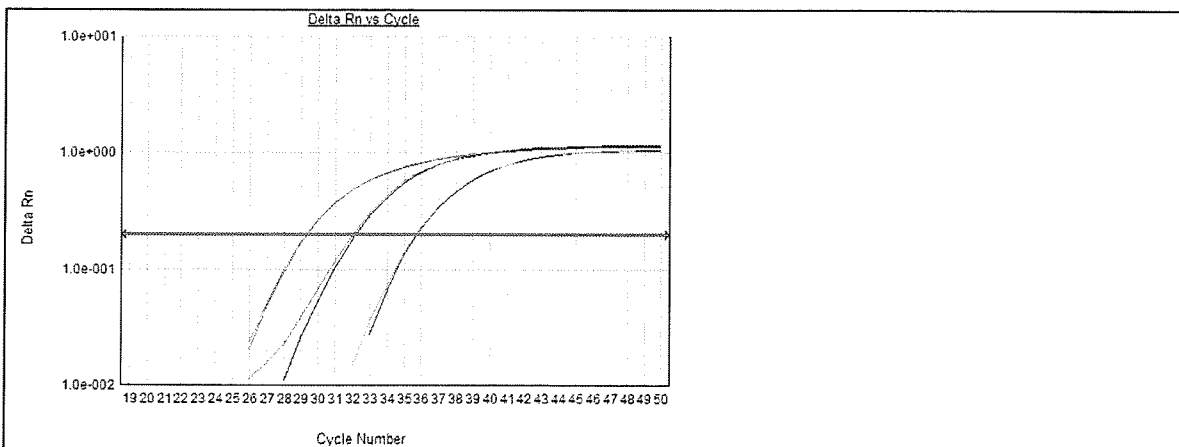
Delo smo nadaljevali na področju detekcije različnih sevov mikobakterij. Cilj je bil detekcija in diskriminacija sevov direktno v vzorcih iz kmetije (feces krav, zemljina, voda iz napajalnika). Tovrstnih metod do sedaj ni bilo še nikjer opisanih in smo na tem naredili en korak naprej. Do zdaj se je namreč vedno zaznavalo samo prisotnost mikobakterij in šele po izolaciji bakterij se je lahko določilo tudi sev. Detekcija sevov pa je izredno pomembna predvsem zaradi epidemioloških slik (npr. kje je izvor okužbe) in poteka bolezni (npr. določen sev povzroča le določen potek bolezni). Ključni pomen teh metod je, da so hitre in vsaj toliko ali bolj informativne kot klasične. Zaradi dobro znanih kriterijev določitve določenih sevov na podlagi insercijskih sekvenc, smo to metodologijo razvili do aplikativne faze. Kot prvo pa smo morali razviti oligonukleotidne začetnike in določiti parametre kvantifikacije *M. avium paratuberculosis*

4a. Razvoj metodologije detekcije podvrst bakterij *Mycobacterium avium*

Detekcijo MAP smo izvedli z Real-time PCR System 7500 (ABI). Za ta namen smo razvili metodo na podlagi TaqMan sonde in z začetnimi oligonukleotidi:

DH2F	5' GCCTCGACTACAACAAGAGC
DH2R	5' GCGTCGGGAGTTTGGTAG
DH2P	5' FAM - GCCGCGCTGATCCTGCTTACT - TAMRA

Za pripravo umeritvene krivulje in kvantifikacijo smo v vektor pCR2.1 (Invitrogen) sklonirali insert IS900, ki je vseboval tarčo pomnoževanja z navedenimi začetnimi oligonukleotidi. Nastali konstrukt smo transformirali v *E. coli* TOP10 in iz prekonočne kulture izolirali plazmidno DNK, ki je služila kot standard za umeritveno krivuljo v RT-qPCR. Nadalje bi morali še določiti parametre kot so spodnja meja detekcije, dinamično območje, volumsko območje in učinkovitosti pomnoževanja (Slika 12).



Slika 12. Primer detekcije *M. avium paratuberculosis* DNK (odsek na IS900) z Real-time PCR. Prikazane so krivulje pomnoževanja za vzorec 19 pri treh različnih redčitvah (v duplikatih).

4.b Razločevanje podvrst *M. avium* (*M. avium paratuberculosis*, *M. avium hominissuis*, *M. avium avium*, *M. avium silvaticum*)

Podvrste *Mycobacterium avium* so zelo sorodne in imajo skupnega tudi do 99% genoma, zato jih je zelo težko ločiti z molekularnimi metodami. Pri infekcijah z bakterijami te vrste pogosto najdemo prisotnost dveh ali več podvrst. Te bakterije imajo zelo širok spekter gostiteljev, od perutnine, divjih in udomačenih prežvekovalcev do človeka, še zlasti nevarne so infekcije pri ljudeh z oslabiljenim imunskim sistemom (bolniki s HIV). Sposobne so preživeti tudi dalj časa v okolju. Identifikacija prisotnosti posameznih podvrst je ključna za pravilno diagnostiko in načrtovanje zdravljenja. Zaenkrat se jih ločuje glede na prisotnost insercijskih sekvenc različnih tipov, kar zahteva več PCR reakcij za natančno identifikacijo prisotne podvrste (Tabela 10). Poleg tega ni čisto za izključiti možnost, da določenih insercijskih sekvenc določena podvrsta nima in s tem se lahko narobe identificira določen tip.

Tabela 10. Tipi insercijskih sekvenc, ki so značilni za posamezno podvrsto in so podlaga za dosedanje molekularne metode diskriminacije med podvrstami.

<i>M. avium</i> podvrsta	Prisotnost tipa IS, ki omogoča ločevanje med podvrstami			
	IS900	IS901	IS902	IS1245
<i>avium</i> (MAA)	-	+	-	-
<i>paratuberculosis</i> (MAP)	+	-	-	-
<i>hominissuis</i> (MAH)	-	+	-	+
<i>silvaticum</i> (MAS)	-	-	+	-

Naš namen je bil razviti 'one step' molekularno metodo za zaznavanje posameznih podvrst v okoljskih in kliničnih vzorcih, na podlagi natančne analize variabilnih genomskih regij med podvrstami.

Z *in silico* analizo objavljenih genomov *Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis* K-10, *Mycobacterium avium* podvrste *avium* ATCC 25291 in *Mycobacterium avium* podvrste *hominissuis* MAC 104 smo identificirali regijo, ki bi omogočala ločitev med posameznimi podvrstami v enem koraku. Genom *Mycobacterium avium* podvrste *silvaticum* še ni na voljo, zato ga bomo vključili v analizo v kasnejši fazi.

Gre za regijo gena za sintezo mikobaktina J, ki služi mikobakterijam kot siderofor v okolju s pomanjkanjem železa.

Metode

Za osnovno metodo ločevanja smo izbrali RT-qPCR z metodiko Sybrgreen detekcije in profiliranja z disociacijskimi krivuljami.

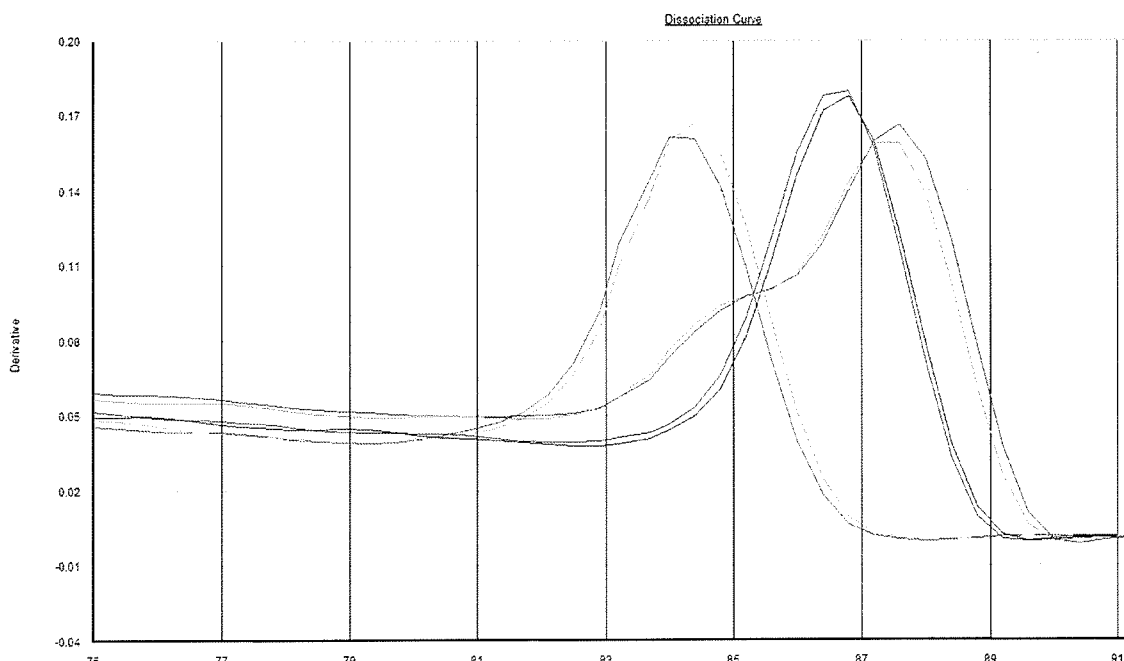
Skonstruirali smo dva para začetnih nukleotidov (Tabela 11), ki specifično pomnožujeta tri različno dolge odseke z genomov podvrst. Vsaka podvrsta da v PCR reakciji produkt specifične dolžine, ki se loči od ostalih po temperaturi disociacije. Analiza disociacijskih krivulj nam tako omogoča identifikacijo prisotnih podvrst v vzorcu (Slika 13)

Tabela 11. Uporabljeni začetni oligonukleotidi za tipizacijo podvrst *M. avium*.

Oznaka	Zaporedje	Tarča	Dolžina produkta	Temp. disociacije
mbtAP_R	CCTGCGTGGCCGAGCTG	MAP	74 bp	86,8°C
mbtAPH_F	CGACGACGCCGTGTGATC	MAP, MAH	63 bp	84,4°C
mbtAHA1_R	GCCATCCCGAACACCTGCT	MAA, MAH	134 bp	87,4°C
mbtAA1_F	GCCTGCGAGTGGGAACC	MAA		

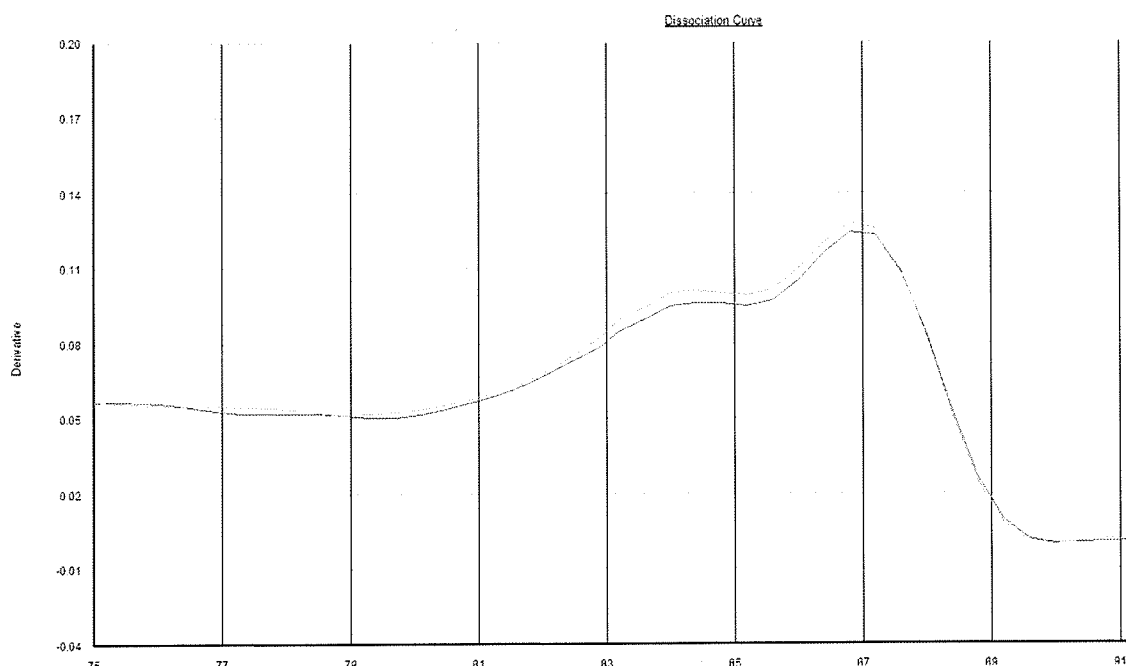
Poskuse smo izvajali na Real-Time PCR System 7500 (ABI). Mešanica je vsebovala 400 nM vsakega začetnega oligonukleotida in Power SybrGreen Master Mix (ABI). Temperatura pritrdjanja začetnih oligonukleotidov je bila 61°C, v skupno 45 ciklih pomnoževanja. Vsakič smo izvedli še korak disociacije PCR produktov po tovarniških nastavitvah.

Rezultati



Slika 13. Disociacijske krivulje specifičnih PCR produktov. Od leve proti desni: *M. avium* ssp. *hominissuis* = 84,4°C, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* = 86,8°C,

M. avium ssp. *avium* = 87,4°C.



Slika 14. Primer detekcije dveh vrst hkrati v enem vzorcu. Prisotna je DNK *M. avium* ssp. *hominissuis* (levi vrh) in *M. avium* ssp. *avium* (desni vrh).

III. Faza - detekcija bakterij in diskriminacija sevov v okoljskih vzorcih brez predhodne gojitve

1. Detekcija *Mycobacterium avium* podvrste *paratuberculosis* v fecesu okuženih krav in okoljskih vzorcih

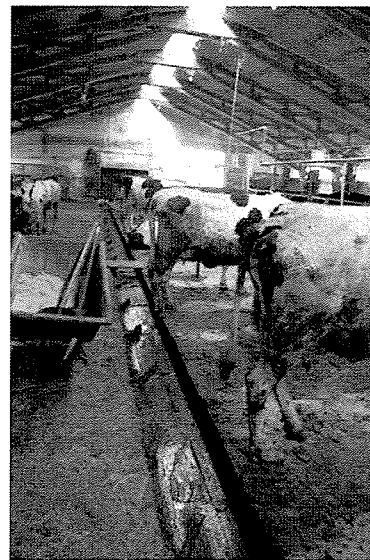
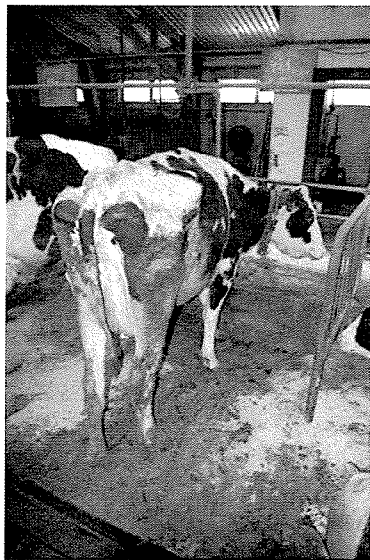
Mycobacterium avium podvrste *paratuberculosis* je bakterija, ki povzroča paratuberkulozo (Johne-jeva bolezen) pri prežvekovalcih, omenja pa se tudi njena vpletenost v razvoj kroničnega vnetja prebavnega trakta pri človeku (Crohn-ova bolezen). Paratuberkuloza povzroča velike ekonomske izgube v govedoreji in ovčjereji, saj učinkovitih zdravil zaenkrat še ni na voljo, bolezen pa se običajno konča s poginom živali zaradi shiranosti in dehidracije. Infektivnost je visoka, bolezen pa se hitro širi predvsem med mladimi živalmi in v obdobju laktacije, če je krava okužena.

Hitra detekcija in tipizacija je zato nujna za iskanje virov okužb in izvajanje ustreznih varnostnih ukrepov proti širitvi okužbe.

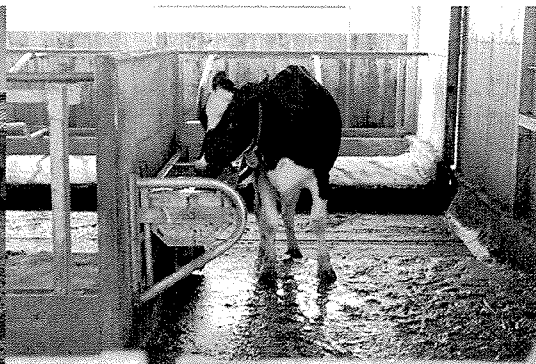
Metode

Izvedli smo vzorčenje okolja kmetije, kjer je bila s klasičnimi mikrobiološkimi tehnikami (serološke in gojitvene metode) predhodno potrjena prisotnost MAP pri govedu.

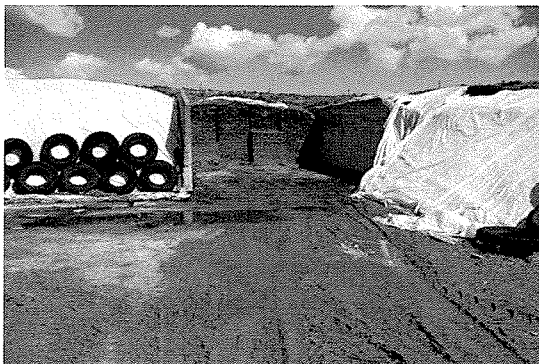
Vzorčili smo feces krav, silažo, vodo v napajalnikih v neposredni bližini goveda, steljo, odvodne kanale blata, zbiralnike gnojnice, gnojišča, pašnike, vodotoke na pašnikih in v bližnji okolici (slike 15-18).



Slika 15. Vzorčenje fecesa krave s simptomi paratuberkuloze (levo) in odvodnega kanala blata (desno).



Slika 16. Vzorčenje gnojišča (levo) in napajalnikov v staležu (desno).



Slika 17. Vzorčenje skladišča silaže in stoječe vode v okolici (levo) ter odprti rezervoar odpadne vode iz hleva.



Slika 18. Vzorčenje iztoka odpadne vode (levo) in bližnjega vodotoka (desno).

Tekoče vzorce smo filtrirali čez filtre (0,22 μm) in izolirali DNK s Smarthelex Complex samples DNA Isolation Kit (IFB d.o.o.). Trdne vzorce smo zatehtali (okoli 500 mg) in izolirali DNK s Smarthelex DNAid Kit (IFB d.o.o.).

Za vsak vzorec smo pripravili tri redčitve izolirane DNK (korak redčenja 1/10), redčitve pa nanašali v duplikatih na mikrotitrsko ploščico. Plazmidnim standardom smo pomerili DNK in posamezno redčitev nanesli v triplikatih.

Rezultati

MAP DNK smo zaznali v 32 od 40 vzorcih, večina okoljskih vzorcev je bila pozitivna, kar kaže na obseg kontaminacije. Koncentracije MAP v okolju so se gibale od 3 do 10^7 MAP/g oz. ml (Tabela 12). V fecesu smo zaznali 10^8 MAP/g (Tabela 13).

Tabela 12. Popis vzorcev in koncentracije MAP, določene z Real-time PCR (RT-qPCR)

Oznaka vzorca	Tip vzorca	Količina	Opis	koncentracija MAP	
1	feces	20 g	Krava s simptomi Johnne-jeve bolezni, imela krvavo drisko	9.98E+08	MAP/g
2	gnojnica	20 ml	stranski odvodni kanal	1.77E+05	MAP/ml
3	feces	30 g	skupni odvodni kanal, zunaj in znotraj hleva 1	1.64E+04	MAP/g
4	voda	20 ml	luža pri staji pred hlevom 1	7.98E+05	MAP/ml
5	blato	20 ml	znotraj staje pred hlevom 1	3.12E+05	MAP/ml
6	gnojnica	20 ml	ново gnojišče	3.14E+03	MAP/ml
7	blato	20 g	stara gnojišče	1.02E+05	MAP/g
8	gnojnica	20 ml	odvodni kanal v staležu v hlevu 2	6.86E+05	MAP/ml
9	voda	4 l	napajalnik v hlevu 2	n.a.*	
9A	biofilm	50 ml	usedlina in biofilm iz sten napajalnika v hlevu 2	4.61E+05	MAP/ml

10	voda	50 ml	voda z usedlino iz napajalnika v hlevu 2,	7.46E+05	MAP/ml
11	silaža	20 g	razprostrta silaža za hranjenje pred staležem	0.00E+00	MAP/g
12	gnojnica	50 ml	iztok iz hleva 2 na JZ strani	1.10E+05	MAP/ml
13	voda	50 ml	luža pred JZ vhodom v hlev 2	pmd ^s	
14	voda	50 ml	luža pri nepokritem skladišču kompresirane silaže	2.55E+02	MAP/ml
15	silaža	30 g	kompresirana silaža	pmd	
16	voda	20 ml	luža pred drugim nepokritim skladiščem kompresirane silaže	pmd	
17	gnojnica	50 ml + 0,5 l	bazen odvajane gnojnice iz hleva 2 na SV strani	1.16E+07	MAP/g
18	silaža	10 g	balirana silaža pod streho	n.a.	
19	voda	50 ml	skupni odvodni kanal odpadne vode s kmetije, v jašku na JZ strani, malo naprej od novega gnojišča	4.65E+05	MAP/ml
20	voda	20 g	biofilm v levi in desni cevi, ki se stekata v skupni odvodni kanal v jašku	1.60E+06	MAP/g
21	voda	50 ml	luža poleg jaška	pmd	
22	voda	0,5 l	direktno za iztokom v potok	6.17E+04	MAP/ml
23	biofilm	40 g	biofilm iz lesenega vodila, preko katerega teč odpadna voda v potok	2.45E+05	MAP/g
24	sediment	50 g	breg potoka 50 nižje od iztoka odpadne vode	pmd	
1P	voda	5 l	napajalnik na levi strani hleva	3.94E+00	MAP/ml
2P	voda	5 l	napajalnik na desni strani	6.56E+00	MAP/ml
3P	stelja	20 g	v staležu	1.07E+05	MAP/g
4P	biofilm	20 g	biofilm, ki se je nabral ob robu ventilatorja za prezračevanje hleva	1.08E+04	MAP/g
5P	gnojnica	50 ml	zbiralni odvodni vod v hlevu	1.37E+07	MAP/ml
6P	silaža	20 g	razprostrta silaža za hranjenje v hlevu	4.00E+02	MAP/g
7P	voda	30 ml	luža pred hlevom, na V strani hleva	2.01E+05	MAP/ml
8P	blato	50 g	pot goveda na pašnik na V strani hleva	7.88E+04	MAP/g
9P	silaža	20 g	balirano seno, pod streho	pmd	

10P	voda	30 ml	luža poleg poti goveda na pašnik na V strani hleva	2.19E+06	MAP/ml
11P	gnojnica	30 ml	gnojišče na J strani hleva	6.61E+05	MAP/ml
12P	voda	50 ml	prešiščena voda v dveh zbiralnikih, poleg črpalnega stolpa gnojnice iz hleva	2.52E+03	MAP/ml
13P	blato	40 g	pot goveda na pašnik na J strani hleva	2.25E+06	MAP/g
14P	gnojnica	30 ml	iz druge strani gnojišča na J strani hleva	2.67E+05	MAP/ml
15P	voda	30 ml	kanal z vodo, ki vodi od pokrite kompresirane silaže, JZ od hleva	2.83E+02	MAP/ml
16P	voda	20 ml	stoječa voda v pri cevi cisterne za prevoz gnojnice	1.48E+06	MAP/ml

‡ vzorec ni bil analiziran

§ pod mejo detekcije

Tabela 13. Koncentracije MAP v vzorcih kravjega fecesa, določenih z Real-time PCR.

Vzorec	Koncentracija MAP [MAP/g]
F1	3.91E+06
F2	2.21E+08
F3	1.67E+07
F4	1.66E+06
F5	1.51E+04
F6	1.42E+03
F7	6.89E+04
F8	4.00E+08
F9	1.18E+04
F10	3.21E+04

Rezultati kažejo na visoko stopnjo kontaminacije v znotraj živinskih objektov in neposredni okolici kmetije. MAP se namreč v velikih količinah izloča v fecesu simptomatskega goveda ter se tako prenaša v širše in ožje okolje. To kaže na problematiko preprečevanja širjenja okužb, kjer ukrepi ne smejo biti omejeni le na ločevanje zdravih in bolnih krav, temveč zahteva bolj radikalne ukrepe, še zlasti zaradi zoonotskega potenciala te bolezni.

Sezonska dinamika in distribucija *M. avium paratuberculosis* na kontaminiranih kmetijah

V predhodnih obdobjih smo izvedli vzorčenje kmetije in neposredne okolice, kjer je bil zabeležena paratuberkuloza. Vzorčenje smo ponovili še dvakrat in pridobili vpogled v sezonsko dinamiko kontaminacije okolja z Map. Določili smo območja, ki so potencialen vir za širjenje okužbe oz. kroženje Map znotraj populacije goveda v okviru kmetije. Poleg tega smo identificirali

potencialne vire za širjenje Map izven območja kmetije z okuženim govedom.

Metode

Izvedli smo vzorčenje okolja kmetije, kjer je bila s klasičnimi mikrobiološkimi tehnikami (serološke in gojitvene metode) predhodno potrjena prisotnost Map pri govedu. Vzorčenje smo izvedli v maju, juliju in novembru, pri čemer smo nekatere vzorce zajeli v vsakem obdobju, določen del vzorcev pa le v enem ali dveh obdobjih.

Vzorčili smo feces krav s sumom na paratuberkulozo, silažo, vodo v napajalnikih v neposredni bližini goveda, steljo, odvodne kanale gnoja, zbiralnike gnojnice, deponije gnoja, izhode na pašnike, pašnike, vodotoke na pašnikih in v bližnji okolici.

Tekoče vzorce smo filtrirali čez filtre (0,22 µm, Nalgene) in izolirali DNK s Smarthelex Complex samples DNA Isolation Kit (IFB d.o.o.). Trdne vzorce smo zatehtali (okoli 500 mg) in izolirali DNK s Smarthelex DNAid Kit (IFB d.o.o.). Tekoče vzorce z veliko koloidnimi delci smo centrifugirali (3 ml, 10.000xg, 5 min) in DNK izolirali iz peleta kot iz trdnih vzorcev.

Detekcijo MAP smo izvedli z Real-time PCR System 7500 (ABI) z začetnimi oligonukleotidi in TaqMan sondo:

DH2F	5' GCCTTCGACTACAACAAGAGC
DH2R	5' GCGTCGGGAGTTTGGTAG
DH2P	5' FAM - GCCGCGCTGATCCTGCTTACT - TAMRA

Za pripravo umeritvene krivulje in kvantifikacijo smo v vektor pCR2.1 (Invitrogen) sklonirali insert IS900, ki je vseboval tarčo pomnoževanja z navedenimi začetnimi oligonukleotidi. Nastali konstrukt smo transformirali v *E. coli* TOP10 in iz prekončne kulture izolirali plazmidno DNK, ki je služila kot standard za umeritveno krivuljo v RT-qPCR.

Za vsak vzorec smo pripravili dve redčitvi izolirane DNK (korak redčenja 1/10), redčitve pa nanašali v duplikatih na mikrotitrsko ploščico. Plazmidnim standardom smo pomerili DNK in posamezno redčitev nanesli v triplikatih.

Nekaj zaporedij pomnoženega odseka IS900 iz vzorcev smo sekvenirali (Macrogen, Južna Koreja), da smo potrdili identiteto pomnožkov in s tem specifičnost reakcije PCR.

Iz koncentracije genov IS900 v vzorcu smo izračunali št. bakterij/ml ali /g vzorca pri predpostavki, da en genom Map v povprečju vsebuje 15 genov za IS900 (število IS900 namreč variira med sevi, Pavlik s sod., 2005)

Tloris kmetije smo pridobili iz katastrskega načrta Slovenije. V načrt smo zaradi preglednosti vnesli le qPCR rezultate relevantnih vzorcev (Tabela 14).

Rezultati

Skupno smo izvedli detekcijo iz 75 vzorcev, od tega 16 vzorcev iz majskega, 36 iz julijskega in 23 iz novemberskega vzorčenja, vse v 2010. V majskem vzorčenju smo zabeležili 94 %, v julijskem 64 % in novemberskem 74 % Map pozitivnih vzorcev.

Tabela 14. Popis vzorcev za detekcijo MAP s qPCR na IS900

Oznaka vzorca	Tip vzorca	Količina	Opis/orientacija
1	voda	5 l	napajalnik na levi strani hleva/Z
2	voda	5 l	napajalnik na desni strani hleva/Z
3	gnojevka	20 g	iz tal v staležu
4	biofilm	20 g	biofilm ob robu ventilatorja za prezračevanje
5	gnojnica	50 ml	zbiralni odvodni vod v hlevu
7	voda	50 ml	luža pred hlevom, na v strani hleva
8	blato	50 g	pot goveda na pašnik na V strani hleva
9	silaza	20 g	balirano seno, pod streho
10	voda	50 ml	luža poleg poti goveda na pašnik na V strani hleva
11	gnojnica	30 ml	gnojišče na J strani hleva
12	voda	50 ml	prašičena voda v dveh zbiralnikih, poleg črpalnega stolpa gnojnice iz hleva
13	blato	40 g	pot goveda na pašnik na J strani hleva
14	gnojnica	30 ml	iz druge strani gnojišča na J strani hleva
15	voda	30 ml	kanal z vodo, ki vodi od pokrite kompresirane silaže, JZ od hleva
16	voda	20 ml	stoječa voda v cevi cisterne za prevoz gnojnice/J
17	silaza	30 g	pokrita silaza, fermentirana, zunanje skladišče, pokrito s polivinilom
18	gnojevka	40 ml	staro gnojišče
19	voda	40 ml	pred vhodom v hlev/Z
20	voda	1 l	velik rezervoar vode za hlevom/S, pri pokriti balirani silaži
21	biofilm	10 g	izsušen napajalnik pred staležem s teleti, kovinski
22	voda	50 ml+1l	napajalnik poleg Z1
23	voda	1 l	napajalnik, betonski, druga stran hleva kot 1 in 2
24	voda	40 ml	samodozirni mali napajalnik v staležu
25	voda	1 l	stoječa voda v trsu sredi pašnika
26	voda	2 l	potok v gozdčku na robu pašnika/SV
27	iztrebek	40 g	kravjak na pašniku/SV
28	voda	4 l	potok pod cesto/JZ
29	sediment	40 g	brežina potoka 28
30	sediment	20 g	Shojeno blato okoli krmilnika na pašniku/SV- vzorec 1
31	sediment	20 g	Shojeno blato okoli krmilnika na pašniku/SV- vzorec 2

V ožjem območju kmetije smo najvišje koncentracije Map zaznali v iztrebkih krav s sumom na paratuberkulozo ($10^3 - 10^8$ Map/g, Slika 19) in v vzorcih, ki so bili v stiku s kravjimi iztebki, kot so kanali za odvod gnoja/gnojnice ($10^4 - 10^7$ Map/ml, slika 19), deponije gnoja ($10^4 - 10^6$ Map/g, slika 19), talna stelja znotraj hleva ($10^5 - 10^6$ Map/g, slika 19) in pa shojena zemlja, pomešana z iztrebki na poti goveda na pašnik ($10^4 - 10^7$ Map/g, slika 18). Slednje kaže na veliko verjetnost prenosa Map na območja izven hleva in možnost prenosa infekcije na zdravo govedo, kljub eventualni izolaciji okuženih krav znotraj hleva.

Z Map je bila okužena tudi večina notranjih vodnih virov (napajalniki, kovinski ali betonski), pri čemer gre verjetno za sekundarno kontaminacijo preko kontakta okuženih krav z vodo. Vsi napajalniki so namreč na višini, ki omogoča kontakt s trupom goveda, še zlasti z zadkom, ki je pogosto prekrit z ostanki stelje in iztrebkov, kateri lahko zaidejo v vodo v napajalnikih. Kontaminirani so bili tako suhi kot polni napajalniki pri teletih, ki so predvidoma bolj dovzetna za okužbo z Map kot starejše govedo, simptomatika pa se lahko pojavi šele po parih letih, zaradi česar je kasneje težko sklepati na vir okužbe. Glede na to, da smo v vzorcih izvajali detekcijo DNK in ne RNK, obstaja možnost, da zaznane bakterije (vse ali le del) niso bile viabilne in dejansko ne predstavljajo neposredne grožnje za okužbo. Kljub temu je prisotnost same DNK pomemben indikator za sledenje kontaminacije.

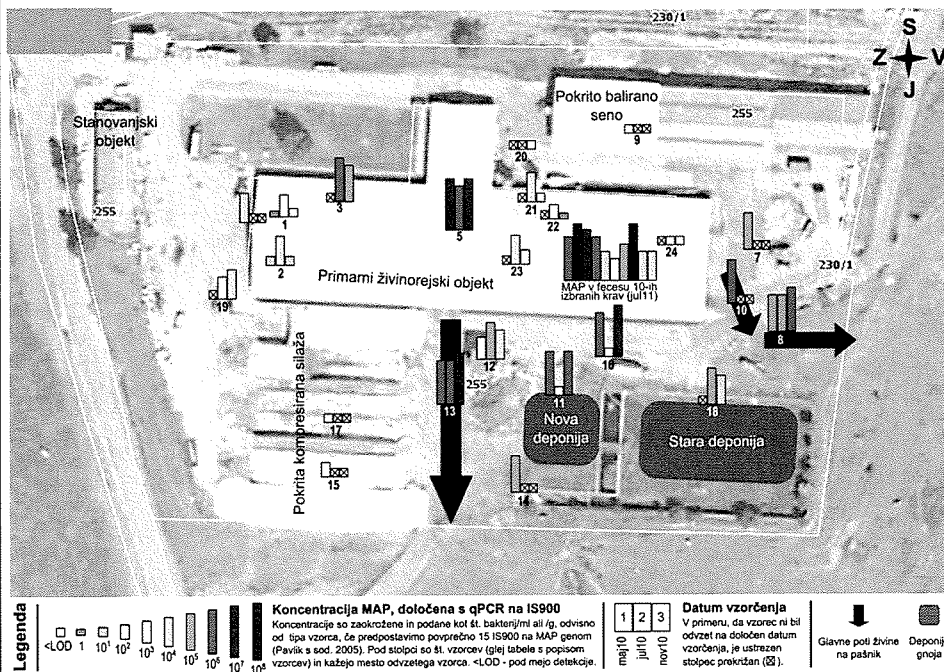
Map negativni so bili le samodozirni kovinski napajalniki, montirani na ograjo staleža, kjer voda ni stoječa, temveč se dovaja glede na potrebo individualne krave. To nakazuje ne možno vlogo stoječe vode in pripadajoče združbe mikroorganizmov na perzistenco Map v takšnih okoljih.

Stoječe vode v okolici hleva so predvidoma zaradi spiranja kontaminiranih površin prav tako vsebovale visoke koncentracije Map ($10^3 - 10^6$ Map/ml, slika 19).

Pri enkratnem vzorčenju (maj 2010) biofilma na okvirju ventilatorja za prezračevanje hleva smo zaznali 10^4 Map/g (slika 19), kar je izredno zanimivo in kaže na posredno (z dviganjem delcev suhe stelje, kontaminirane z Map) ali neposredno (aerosolizacija kontaminiranih tekočin – tvorba mikrokapljič) aerosolizacijo Map. Aerosolizacija lahko omogoča Map potovanje na daljše razdalje in kontaminacijo širšega območja okoli kmetije.

Pokrita silaža in balirano seno ter voda v zunanjih zaprtih rezervoarjih niso bili kontaminirani z Map oz. pod mejo detekcije (slika 19), kar kaže na izreden pomen izolacije kontaminiranih območij za preprečevanje širjenja okužbe.

Analiza vzorcev širše okolice kmetije je pokazala prisotnost Map v zemlji, kjer so bile sledi intenzivnega gajenja goveda ($10^4 - 10^5$ Map/g, slika 20). Kontaminirani so bili tudi vodni viri (do 10^2 Map/ml, slika 2), vendar le na SV (vzorec 26) in V (vzorec 25) strani kmetije, medtem ko potok na JZ (vzorec 28) strani ni bil kontaminiran (Slika 20). Možen vzrok za to, je večji pretok vode v potoku na JZ strani, medtem ko je imel potok na SV precej manjši pretok, julija pa je voda dejansko stala. Vzorec št. 25 je bil odvzet iz stoječe vode v trsju oz. močvirnatem predelu nižje lege pašnika. To kaže na spiranje Map v vodna telesa, kjer se z Map obogatena stoječa voda ob prvem deževju (povečanem pretoku) premakne s tokom do bolj oddaljenih lokacij. Depozicija Map v predelih struge in na bregovih nižje po toku lahko kontaminira področje, ki je precej oddaljeno od vira.



Slika 19. Distribucija in sezonska dinamika MAP v živinorejskih objektih

Metode

V primeru MTB smo preizkusili različne endonukleaze za fragmentacijo genomske DNK in ugotovili, da za tvorbo ustrezno dolgih fragmentov za uspešno pomnoževanje z inverzno PCR, lahko uporabimo endonukleazo *Bfal*, s prepoznavnim mestom:

```
5'...CTAG...3'  
3'...GATC...5'
```

Endonukleaza reže znotraj IS6110 in v bližini njenega 3' konca, slednja oddaljenost je odvisna od nukleotidnega zaporedja 3' okolice IS6110, torej njene lokacije v genomu. Endonukleaza je bila izbrana tako, da oddaljenost od mesta rezanja znotraj IS6110 do mesta v 3' okolici ni daljša od 2000 bp, kar smo preverili na modelnem objavljenem genomu seva H37Rv.

V primeru MAP smo za fragmentacijo genomske DNK uporabili endonukleazo *EagI*, s prepoznavnim mestom:

```
5'...CGGCCG...3'  
3'...GCCGGC...5'
```

Velikost fragmentov smo teoretično preverili na objavljenem genomu MAP sev K-10.

Fragmentirano DNK smo nato ponovno zlepili s T4 ligazo, pri koncentraciji DNK 0,5 ng/ul, s čimer smo dosegli preferenčno avtoligacijo in nastanek krožnih produktov. Krožno DNK smo pomnožili z inverzno PCR, z začetnima oligonukleotidoma

za MTB:

```
ISBfa!_2F ACTGGTAGAGGCCGCGAT  
ISBfa!_R GGCTGCCTACTACGCTCAAC
```

za MAP:

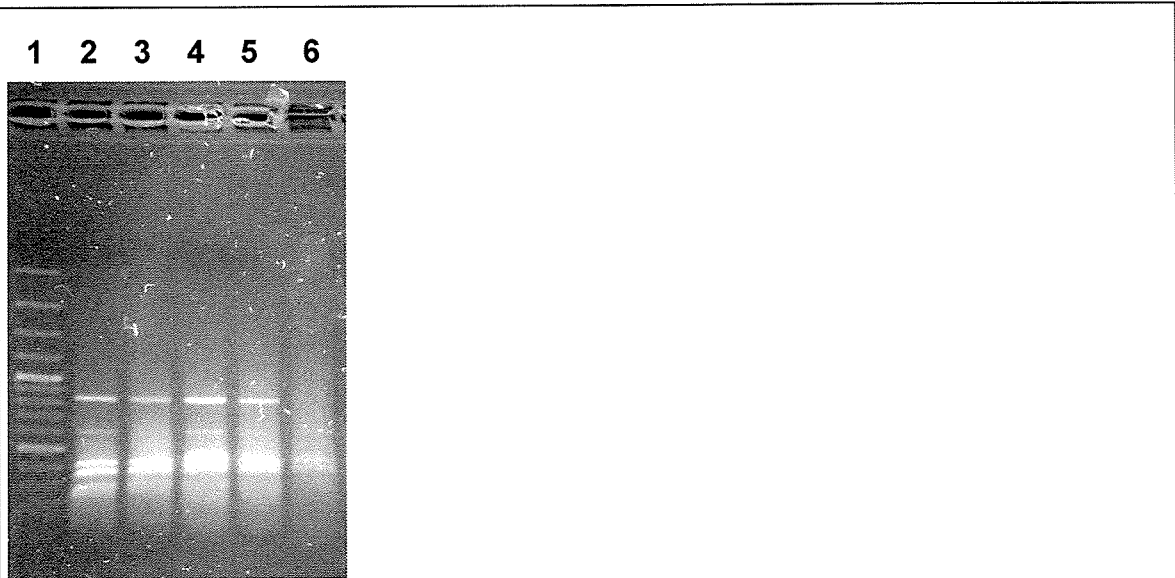
```
IS9EagI_f CTGTTGAGGTTTCCGCTGATG  
IS9EagI_r CGCAACCACGCTGTCTACCAC
```

ki sta pomnoževala le krožne produkte, ki so vsebovali insercijsko sekvenco (IS). PCR produkte smo nato preverili z elektroforezo, kjer smo dobili različno dolge pomnožene DNK odseke. To je odvisno od oddaljenosti obeh prepoznavnih mest za endonukleazo (glej shemo v prejšnjem poročilu) in se razlikuje za različne lokacije IS.

Število pomnoženih odsekov nam pove koliko IS je v genomu analiziranega seva, kar se razlikuje od seva do seva, poleg tega med sevi variirajo dolžine odsekov zaradi različnih lokacij IS v genomu.

Rezultati

Posamezne odseke smo izrezali iz agaroznega gela (Slika 22), PCR produkte očistili s silica kolonami in poslali sekvenirati.

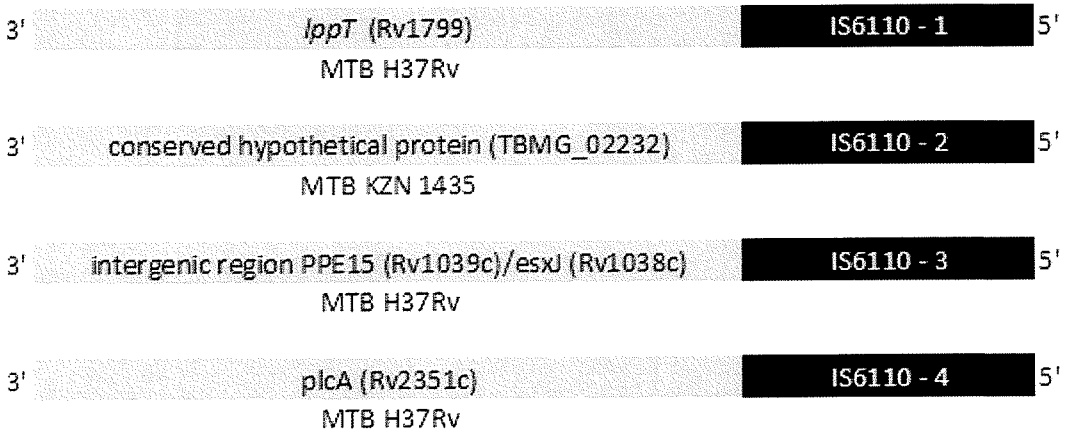


Slika 22. In situ tipizacija sevov MAP. 1 – označevalec velikosti; 2,3 – sev MAP 446; 4,5 – sev 468/09; 6 – sev MAP 56/1. Seva 446 in 468/09 sta enaka, 56/1 pa nima zgornjih dveh odsekov.

Dobljena zaporedja smo poravnali s programom Bioedit (Slika 22), lokacije IS pa določili s poravnavo z algoritmiom Blast, dostopnemu v NCBI spletni bazi nukleotidnih zaporedij (Slika 23).

```
G2 Mtb      GTCTCCGGACTCACCGGGGCGGTTCAAGGGACCCTCTGCCAGACATGCTGAGCCCGTC
TG2        GTCTCCGGACTCACCGGGGCGGTTCAACCAGTTGGCCCGGCCGTGATTGACATTCCA
TH1       GTCTCCGGACTCACCGGGGCGGTTCAAAAGGGGGACATCTCACTCGTTTGAGGCCAGC
TH2       GTCTCCGGACTCACCGGGGCGGTTCAACCAGTTGGCCCGGCCGTGATTGACATTCCA
H2 Mtb    GTCTCCGGACTCACCGGGGCGGTTCAAAAGGGGGACATCTCACTCGTTTGAGGCCAGC
19D BfaI  GTCTCCGGACTCACCGGGGCGGTTCAACCAGTTGGCCCGGCCGTGATTGACATTCCA
TE1       GTCTCCGGACTCACCGGGGCGGTTCAACCAGTTGGCCCGGCCGTGATTGACATTCCA
TF1       GTCTCCGGACTCACCGGGGCGGTTCAACCAGTTGGCCCGGCCGTGATTGACATTCCA
TI1       GTCTCCGGACTCACCGGGGCGGTTCAACCAGTTGGCCCGGCCGTGATTGACATTCCA
TI2       GTCTCCGGACTCACCGGGGCGGTTCACTCAGGAAACCACACCCCGTCCGCGGGACTCC
```

Slika 23. Poravnava zaporedij inverznih PCR produktov pri MTB. Osenčeno je zaporedje IS6110, ki je skupno vsem zaporedjem, neosenčene so zaporedja okolic 3' konca IS6110, ki se razlikujejo za vsako IS. Vsa zaporedja pripadajo enemu sevu.



Slika 24. Lokacije analiziranih IS6110 enega seva MTB. Poravnava z algoritmom Blast v bazi nukleotidnih zaporedij NCBI. S črno so označene različne IS6110, oranžni del predstavlja pripadajočo okolico. Vpisani so geni, katerim pripada določeno nukleotidno zaporedje, podpisana je oznaka seva iz NCBI podatkovne baze, kjer je bila zaznana prisotnost iskanega

zaporedja.

V prihodnjem obdobju bomo nadaljevali z *in situ* tipizacijo različnih sevov MTB in MAP ter določevanjem nukleotidnih zaporedij okolic IS. Nadalje bomo razmislili o možnosti izvedbe multiplex detekcije reprezentativnih lokacij IS. Za te namene bomo skonstruirali začetne oligonukleotide za posamezne lokacije in preverili, katere lokacije omogočajo zadovoljivo diskriminacijo za *in situ* tipizacijo sevov, v primerjavi z obstoječimi metodami tipizacije (RFLP, MIRU-VNTR).

In silico* analiza lokacij insercijskih zaporedij tipa 900 na objavljenih genomih *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis

Za namene *in situ* genotipizacije sevov *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) direktno iz vzorcev, smo, podobno kot v primeru *M. tuberculosis*, z bioinformatičnimi orodji izvedli analizo lokacij oziroma okolic insercijskih zaporedij tipa 900 (IS900). Zaporedja okolic bodo omogočila konstrukcijo oligonukleotidov, ki bodo temelj za genotipizacijo sevov Map, bodisi z multipleks PCR reakcijo na izbranih ustrezno diskriminatornih lokacijah IS900, bodisi s pripravo mikročipa za tarčno resekveniranje z metodami sekveniranja naslednje generacije.

Metode

V javnih bazah podatkov je zaenkrat v celoti sekveniran in anotiran le en genom Map in sicer sev K-10, zaradi česar primerjava lokacij in okolic med posameznimi sevi ni bila možna. Veliko genomskih zaporedij Map je bilo posekveniranih v zadnjih parih letih, vendar so še v 'draft' verzijah in vsebujejo še veliko regij s slabo pokritostjo, zaradi česar določitev lokacij IS900 ni možna oz. je nezanesljiva. Pričakuje se porast javno dostopnih anotiranih genomov Map v prihodnjih letih, ko bo tudi mogoče izvesti primerjavo profilov IS900.

Zaporedje objavljenega genoma smo dobili v javni bazi podatkov NCBI (National Centre for Biotechnology Information) in ga analizirali v programu VectorNTI (Invitrogen). Vse prisotne IS900 vključno z okolico 1000 baznih parov gor- in dolvodno smo poravnali v programu Bioedit. Zaporedja 5' in 3' okolic smo primerjali z NCBI bazo nukleotidnih zaporedij z uporabo algoritma BLAST (NCBI) in poiskali pripadajoče genomske regije oziroma gene. Identiteto predvidenih prepisov v proteine smo preverili v bazi proteinskih zaporedij UNIPROT (www.uniprot.org). V primeru, da gen v okolici IS900 ni bil anotiran za MAP, smo prevzeli anotacijo najbolj podobnih mikobakterijskih paralogov. Fizično lokacijo genov smo določili v aplikaciji za vizualizacijo anotiranih genomov Sequence Viewer (NCBI).

Rezultati

Map, sev K-10 vsebuje 14 IS900, 8 v orientaciji proti-smiselne (*ang.* antisense) in 7 v orientaciji smiselne (*ang.* sense) DNK verige. Večina IS900 je locirana v okolici genov z neznano funkcijo, ki so unikatni za MAP in ne vsebujejo paralogov v *M. tuberculosis* H37Rv. Posledično se težko sklepa na fenotipske posledice posamezne insercije IS900 (Tabela 15).

Tabela 15. Lokacije IS900 v genomu MAP K-10.

MAP strain/IS#	Gene	Locus tag	homology/annotation	IS900 orient.	Gene	Locus tag	homology/annotation
			5' end				3' end
MAP K-10							
1	-	MAP_0033c	transcription factor WhiB family	(+)	-	MAP_0035	Helix-turn-helix domain protein
2	-	MAP_0160	hypothetical protein	(-)	-	MAP_0158	PPE family protein
3	-	MAP_0966c	hypothetical protein	(+)	-	MAP_0968	hypothetical protein
4	-	MAP_1032c	hypothetical protein	(+)	-	MAP_1034c	hypothetical protein
5	-	MAP_1721c	hypothetical protein	(+)	-	MAP_1723	hypothetical protein
6	-	MAP_1772	hypothetical protein	(-)	-	MAP_1770c	hypothetical protein
7	-	MAP_1784c	hypothetical protein	(+)	-	MAP_1786c	hypothetical protein
8	-	MAP_1794	hypothetical protein	(-)	-	MAP_1792	hypothetical protein
9	<i>nirA_1</i>	MAP_2035	Sulfite reductase [ferredoxin] 1	(-)	-	MAP_2033	hypothetical protein
10	-	MAP_2107c	hypothetical protein	(+)	-	MAP_2109c	hypothetical protein
11	-	MAP_2204c	hypothetical protein	(-)	-	MAP_2203c	hypothetical protein
12	<i>ogt</i>	MAP_2445	Methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase	(-)	<i>alkA</i>	MAP_2443	DNA-3-methyladenine glycosidase
13	<i>PE_6</i>	MAP_2576c	PE family protein	(+)	-	MAP_2578	hypothetical protein
14	-	MAP_3479c	hypothetical protein	(+)	<i>lpqD</i>	MAP_3481	Lipoprotein LpqD

Zaključki

Rezultati raziskovalnega projekta so naslednji:

1. Metode izolacije nukleinskih kislin
 - V raziskavi smo razvili dve metodi:
 - a) Izredno učinkovita izolacija nukleinskih kislin iz kompleksnih matriksov (feces, prst, krma).
 - b) Pripravili smo metodo hitre lize in sprotne obdelave velikega števila vzorcev izoliranih sevov (96 vzorcev hkrati) za potrebe tipizacije izolatov, ki tako nadgrajujejo bazo
2. Priprava oligonukleotidnih začetnikov za potrebe tipizacije in detekcije določenih bakterij (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campilobacter* spp., *Escherichia coli*)
3. Praktična priprava in situ tipizacije *M. avium paratuberculosis* in ločevanje sevov *Mycobacterium avium* kompleksa.
4. Razširitev in situ tipizacije tudi na humane vzorce sevov *M. tuberculosis*
5. Testiranje tipizacije in detekcije na okoljskih vzorcih – kmetiji, ki je kontaminirana z Map
6. Ugotavljanje sezonske dinamike kontaminiranosti z Map.

Zadnji rezultat prikazuje pravzaprav praktično vrednost raziskave. In sicer analiza vzorcev iz ožjega in širšega območja kmetije je pokazala visoko stopnjo kontaminiranosti z Map. Kljub temu, da z izbrano metodo kvantifikacije ne moremo ločiti med živimi in neživimi frakcijami Map, lahko predvidevamo, da je prenos živih bakterij v okolje izven hleva znaten. Literatura navaja, da lahko Map preživi v okolju izven gostitelja tudi več kot eno leto, zaradi česar lahko sklepamo, da je vsaj določen del zaznanih Map viabilnih.

Simptomatske krave lahko z iztrebki izločajo ogromne količine Map in verjetno poglavito prispevajo k visokim koncentracijam bakterij v okoljskih vzorcih. Zaenkrat je neznano, ali se Map lahko razmnožuje v okolju izven gostitelja, predvideva pa se, da so okoljske amebe možen rezervoar, ki omogoča preživetje ali celo razmnoževanje Map v okolju.

Obseg kontaminacije, ki smo jo pokazali v raziskavi, kaže na obsežnost problematike preprečevanja nadaljnjega širjenja okužb z Map. Glede na perzistentnost Map v okolju je

praktično nemogoče preprečiti pojave novih okužb zgolj z izolacijo simptomatskega goveda. Dodaten problem je izločanje Map v iztrebkih asimptomatskega goveda in dolga inkubacijska doba oz. latentna faza infekcije, ki lahko traja tudi več let.

Za preprečevanja pojavljanja paratuberkuloze v čredah je zato potrebno upoštevati dejstvo obširne kontaminacije okolja in razviti nove strategije, ki bodo bodisi kontrolirale obseg kontaminacije, npr. z skrbno načrtovano infrastrukturo in notranjo ureditvijo hlevov (samodozirni napojalniki), ali pa se bodo lotile problema z uporaba drugih preventivnih sredstev, kot npr. cepiva, ki pa zaenkrat na trgu še niso dostopna.

Vsekakor je za pravočasno identifikacijo okuženega goveda potrebno uvesti rutinsko molekularno testiranje za prisotnost Map v bioloških vzorcih, predvsem tudi zaradi možnega zoonotskega potenciala Map, ki se zadnje čase vse pogosteje navaja v strokovni literaturi (Crohn-ova bolezen).

Da bi se izsledki raziskava, ki nakazujejo na pripravo rutinskih metod, lahko praktično vpeljala v rutinske preiskave kontaminacije in vira okužbe, bi bilo potrebno še številne dodatne preiskave in validacije, predvsem pa:

1. Izboljšati metodo hitre lize predvsem v smislu kroskontaminacije in vpeljave uporabe multikanalne pipete
2. Povečati zbirko sevov za potrebe tipizacije in preveriti navzkrižnost rezultatov
3. Na številnih vzorcih in različnih sevih drugih vrst kot Map preizkusiti in izdelati protokol, ki temelji na naši metodi *in situ* tipizacije
4. Na podlagi številnih genomov in na podlagi naše *in situ* tipizacije izdelati metodo, ki bi prototipno fazo, do katere smo tekom te raziskave prišli, pripeljali do širše uporabnosti

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen² rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

² Označite lahko več odgovorov.

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvo, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
 - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
 - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

1. Izvirni znanstveni članek:

TRAUNŠEK, Urban, TOPLAK, Nataša, JERŠEK, Barbara, LAPANJE, Aleš, MAJSTOROVIĆ, Tamara, KOVAČ, Minka. Novel cost-efficient real-time PCR assays for detection and quantitation of *Listeria monocytogenes*. *J. microbiol. methods*. [Print ed.], 2011, vol. 85, issue 1, str. 40-46, doi: [10.1016/j.mimet.2011.01.018](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.018). [COBISS.SI-ID [3871608](https://www.cobiss.si/id/3871608)]

2. Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci:

OCEPEK, Matjaž, PATE, Mateja, MUŠČET, Barbara, AVBERŠEK, Jana, LOGAR, Katarina, LAPANJE, Aleš, ZRIMEC, Alexis. Comparison of DNA extraction methods to detect *Salmonella* in water. V: BARLIČ-MAGANJA, Darja (ur.), RASPOR, Peter (ur.). 4th Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participation, Portorož, November 2008. *Microbiology for today : book*

of abstracts = zbornik povzetkov. Ljubljana: Slovensko mikrobiološko društvo: = Slovenian Microbiological Society, 2008, str. 149. [COBISS.SI-ID [2999418](#)]

KOPINČ, Rok, MUŠČET, Barbara, BRENČIČ, Mihael, MATOZ, Tomo, ZRIMEC, Alexis, LAPANJE, Aleš. Identification of attached and unattached bacterial populations on dolomite bedrock. V: *EUROBIOFILMS 2009 : programme & abstract book*. [Rome: Fondazione Santa Lucia, 2009], str. 119-120. [COBISS.SI-ID [26208729](#)]

RAZINGER, Jaka, MUŠČET, Barbara, ZRIMEC, Alexis, LAPANJE, Aleš. Fluctuations in the pumping regime decrease the stability of biofilm in highly perforated dolomite aquifers. V: *EUROBIOFILMS 2009 : programme & abstract book*. [Rome: Fondazione Santa Lucia, 2009], str. 122-123. [COBISS.SI-ID [26209241](#)]

KOPINČ, Rok, OCEPEK, Matjaž, LAPANJE, Aleš. Antibiotic susceptibility testing of Mycobacterium avium subspecies under iron starvation. V: *21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 27th International Congress of Chemotherapy (ICC), Milan, Italy, 7-10 May 2011*. [Milan: s.n., 2011], [Str. 1]. [COBISS.SI-ID [28757977](#)]

3. Objavljeni povzetek strokovnega prispevka na konferenci

HUBAD, Barbara, KOPINČ, Rok, ZRIMEC, Alexis, LAPANJE, Aleš. Detection of airborne M. tuberculosis in a pulmonary hospital and tuberculosis diagnostic laboratory. V: NIEMANN, Stefan (ur.). *32nd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 26th - 29th June 2011, Lübeck. Scientific Program including Abstracts : 32nd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 26th - 29th June 2011, Lübeck, Germany*. Werne: Agentur Konsens, 2011, str. 70. [COBISS.SI-ID [28758233](#)]

KOPINČ, Rok, WYNE, James W., MICHALSKI, Wojtek P., LAPANJE, Aleš. Comparative genomics of mycobactin synthesis operons in sheep and cattle strains of M. avium subsp. paratuberculosis. V: NIEMANN, Stefan (ur.). *32nd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 26th - 29th June 2011, Lübeck. Scientific Program including Abstracts : 32nd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 26th - 29th June 2011, Lübeck, Germany*. Werne: Agentur Konsens, 2011, str. 92-93. [COBISS.SI-ID [28758489](#)]

4. Patentna prijava

LAPANJE, Aleš. *Visoko zmogljiva izolacija nukleinskih kislin*. Ljubljana: Urad RS za intelektualno lastnino, 2009. 7 str., ilustr. [COBISS.SI-ID [27382745](#)]

LAPANJE, Aleš. *Avtomatizacija izolacije nukleinskih kislin iz kompleksnih vzorcev : številka prijave: P-201000223 z dne 26.7.2010*. Ljubljana: Urad RS za intelektualno lastnino, 2010. 8 str., [ilustr.]. [COBISS.SI-ID [27534553](#)]

LAPANJE, Aleš. *Postopek za hitro genotipizacijo sevov Mycobacterium avium podvrste paratuberculosis : številka prijave: 201000231, z dne 28.7.2010*. Ljubljana: Urad RS za intelektualno lastnino, 2010. 10 str., [ilustr.]. [COBISS.SI-ID [27534297](#)]

5. Patent

LAPANJE, Aleš. *Visoko zmogljiva izolacija nukleinskih kislin*. Ljubljana: Urad RS za intelektualno lastnino, 2009. 7 str., ilustr. : patentna prijava P-200900392 z dne 21. 12. 2009 patent št. 23249 z

dne30.6.2011

6. Zaključene diplomske naloge

ŠTIMPFEL, Martin. *Molekularno biološka analiza pritrjenih in planktonskih bakterijskih združb v lokalnem vodovodnem sistemu : diplomsko delo = Characterization of attached and planktonic bacterial communities in local water distribution system by molecular methods : graduation thesis*, (Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomski dela, 20). Ljubljana: [M. Štimpfel], 2009. XI, 56 f., [34] f. pril., ilustr., preglednice. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_stimpfel_martin.pdf. [COBISS.SI-ID 6116473]

ŽITNIK, Miha. *Identifikacija pritrjenih in planktonskih bakterijskih vrst v dolomitnem vodonosniku : diplomsko delo, univerzitetni študij = Identification of attached and unattached bacterial species in dolomite aquifer : graduation thesis, university studies*, (Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, Ljubljana, Diplomski naloge, 481). Ljubljana: [M. Žitnik], 2011. IX, 70 f., graf. prikazi, tabele. [COBISS.SI-ID 3929720]

7. Odobrena tema doktorske dizertacije

KOPINČ, Rok Vloga homeostaze železa v ekologiji podvrst bakterije *Mycobacterium avium*. *Role of Iron Homeostasis in Ecology of Mycobacterium avium subspecies*. Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni študij Biomedicine.

8. Razvoj izdelkov

SmartHelix DNAid – postopek in mešanica kemikalij za učinkovito izolacijo nukleinskih kislin iz kompleksnih vzorcev (<http://smart-helix.com/smarthelix-complex-samples-dna-extraction-kit.html>)

Ezextract – postopek in mešanica kemikalij za izolacijo nukleinskih kislin iz velikega števila različnih izolatov (<http://smart-helix.com/index.php?module=page&pageID=53>)

9. Mreženje

Na podlagi znanja pridobljenega tekom tega projekta, smo vzpostavili mednarodne stike z Veterinarskim raziskovalnim inštitutom iz Češke, Friedrich Loeffler inštitutom iz Nemčije, ChipShop podjetjem iz Nemčije, veterinarskim inštitutom Istituto Zooprofilattico Sperimentale za diagnostiko iz Italije in poglobili sodelovanja v Sloveniji: Univerza v Ljubljani – Veterinarska fakulteta, podjetje Omega d.o.o. in Inštitut za varovanje zdravja Ljubljana.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

1. Znanstvena odličnost

V pripravi imamo še dva članka, ki ju mislimo objaviti v mednarodnih revijah z indeksom citiranosti.

2. Podjetništvo

V načrtu imamo implementacijo idej in prvih izdelkov v novo nastala odcepljena podjetja

3. Mreženje

S pomočjo obiskov na konferencah se nam je povečala mreža sodelav in s tem kroženje znanja in raziskovalcev med podjetji in raziskovalnimi organizacijami.

4. Sodelovanje na EU projektih

Rezultati raziskave se kažejo tudi v tem, da smo bili povabljeni v EU projekt FP7, ki je bil uspešno odobren. Nosilno podjetje je ChipShop iz Nemčije.

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- a) v domačih znanstvenih krogih;
- b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- c) pri domačih uporabnikih;
- d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

/

3.7. Število diplomantov, magistrrov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

Na podlagi pridobljenega znanja tekom tega projekta sta uspešno zaključila dva diplomanta. Oba sta aplicirala molekularne tehnike na pitno vodo:

ŠTIMPFEL, Martin. *Molekularno biološka analiza pritrjenih in planktonskih bakterijskih združb v lokalnem vodovodnem sistemu : diplomsko delo = Characterization of attached and planktonic bacterial communities in local water distribution system by molecular methods : graduation thesis*, (Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomsko dela, 20). Ljubljana: [M. Štimpfel], 2009. XI, 56 f., [34] f. pril., ilustr., preglednice. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_stimpfel_martin.pdf. [COBISS.SI-ID 6116473]

ŽITNIK, Miha. *Identifikacija pritrjenih in planktonskih bakterijskih vrst v dolomitnem vodonosniku : diplomsko delo, univerzitetni študij = Identification of attached and unattached bacterial species in dolomite aquifer : graduation thesis, university studies*, (Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, Ljubljana, Diplomске naloge, 481). Ljubljana: [M. Žitnik], 2011. IX, 70 f., graf. prikazi, tabele. [COBISS.SI-ID 3929720]

4. Sodelovanje s tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

Kot rezultat tega projekta je odprtje sodelovanja med 4 raziskovalnimi organizacijami in podjetji: Friedrich Loeffler inštituta iz Nemčije, ChipShop podjetja iz Nemčije, Veterinarskega inštituta Istituto Zooprofilattico Sperimentale iz Italije in Veterinarsko-raziskovalnega inštituta (VRI, Vuvel) iz Češke.

S FLI in ChipShop sodelujemo sedaj na projektu EU FP7 z namenom razvoja detekcije patogenov v zraku z uporabo molekularnih tehnik in izdelave mikrofluidnih naprav.

Z raziskovalci veterinarskega inštituta Istituto Zooprofilattico Sperimentale iz Italije in Veterinarskega raziskovalnega inštituta iz Češke sodelujemo v smislu pretoka raziskovalcev in v prihodnosti potencialne prijave novega EU projekta.

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

Trenutno skupaj delamo na raziskavah na novo odobrenega EU projekta. Torej rezultat je uspešno odobren nov FP7 projekt in nadaljevanje dela na podobni tematiki.

5. Bibliografski rezultati³ :

Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.

6. Druge reference⁴ vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

/

³ Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani:<http://www.izum.si/>

⁴ Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije. Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.