

RÓŻNORODNOŚĆ GATUNKÓW GENOMOWYCH I PROFIL PATOGENNOŚCI *AEROMONAS* SP. SEROGRUPY PGO1 IZOLOWANYCH Z TKANEK RYB HODOWLANYCH

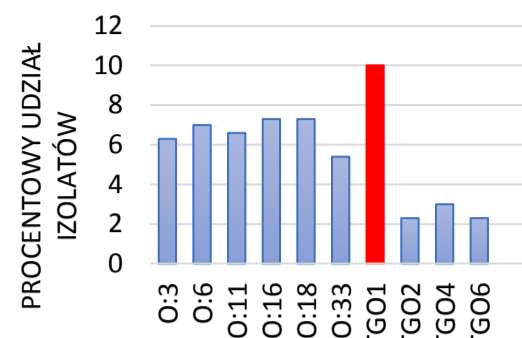
VI. OGÓLNOPOLSKIE SYMPOZJUM MIKROBIOLOGICZNE
„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK”
Puławy, 23-24 czerwca 2022 roku



Maria Kurzylewska¹, Katarzyna Dworaczek¹, Anna Turska-Szewczuk¹

¹Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytutu Nauk Biologicznych, Katedra Genetyki i Mikrobiologii

Wstęp Bakterie z rodzaju *Aeromonas* to Gram-ujemne pałeczki będące główną przyczyną śnięcia ryb w gospodarstwach rybackich. Ich głównym czynnikiem wirulencji jest lipopolisacharyd, składający się z lipidu A, rdzenia i O-antygeny. Ze względu na unikalną budowę, nawet w obrębie szczepów, łańcuch O-swoisty pełni rolę antygeny powierzchniowego i determinuje swoistość serologiczną bakterii. Znane są dwa systemy klasyfikowania pałeczek *Aeromonas*, utworzone w oparciu o specyficzne determinanty antygeny somatycznego. W systemie identyfikacji serologicznej *Aeromonas* wyróżniamy: (a) 44 ustalone grupy serologiczne (schemat NIH Sakazaki i Shimada, 1984); (b) ~53 tymczasowych grup serologicznych (Ameryka, Azja, Thomas 1990); (c) nieokreśloną ilość grup tymczasowych TG (ang. PG -provisional group) charakterystycznych dla obszarów geograficznych (np. w Polsce PGO1-PGO20, Kozińska 2009, PIW-PIB).



Wyk. 1. Dominujące grupy serologiczne pomiędzy izolatami uzyskanymi od karpia i pstrąga (Kozińska 2009)

Celem badań było określenie występowania gatunków genomowych oraz charakterystyka profilu patogenności szczepów *Aeromonas* sp., serogrupy PGO1, dominującej wśród mezofilnych aeromonadów, izolowanych od ryb hodowlanych w Polsce

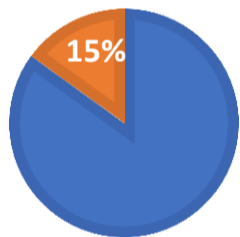
Materialy i metody Badaniami objęto 34 izolaty *Aeromonas* sp. Typowanie serologiczne przeprowadzono metodą aglutynacji i potwierdzono techniką Western blotting. Identyfikację gatunkową oparto na analizie sekwencji i polimorfizmu genu 16S rRNA (PCR-RFLP). Profil patogenności izolatów, obejmujący zdolność do syntezy toksyn i enzymów, określono na podstawie analizy fenotypu i genotypu.

Badania serologiczne

Na podstawie typowania serologicznego z wykorzystaniem testów aglutynacji z inaktywowanymi termicznie izolatami oraz surowicą, określono przynależność do 15% (6 izolatów) do serogrupy PGO1, co potwierdzono wykorzystując Western blotting.

TYPOWANIE SEROLOGICZNE BAKTERII *AEROMONAS* TECHNIKĄ WESTERN BLOTTING

■ Badana pula izolatów



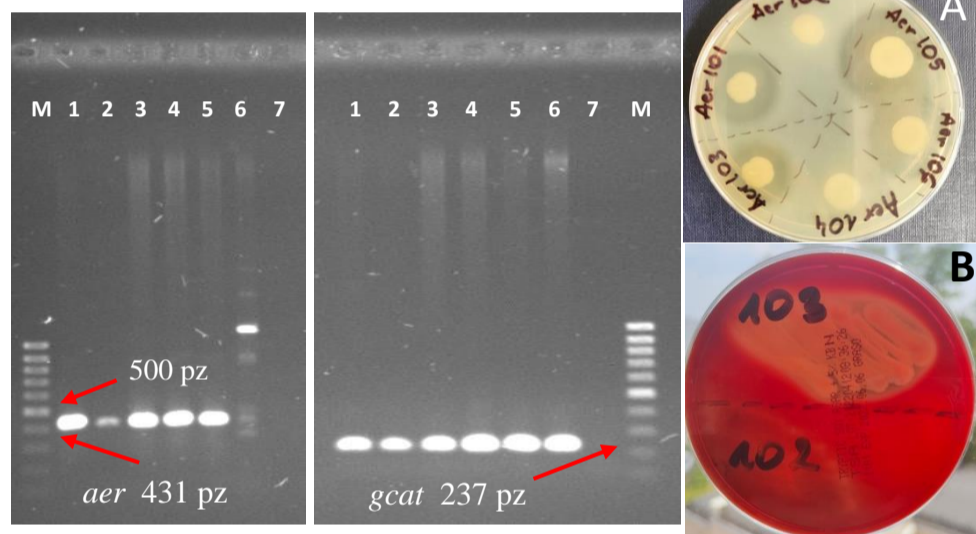
■ Izolaty przynależne do serogrupy PGO1

Wyniki

Identyfikacja gatunkowa

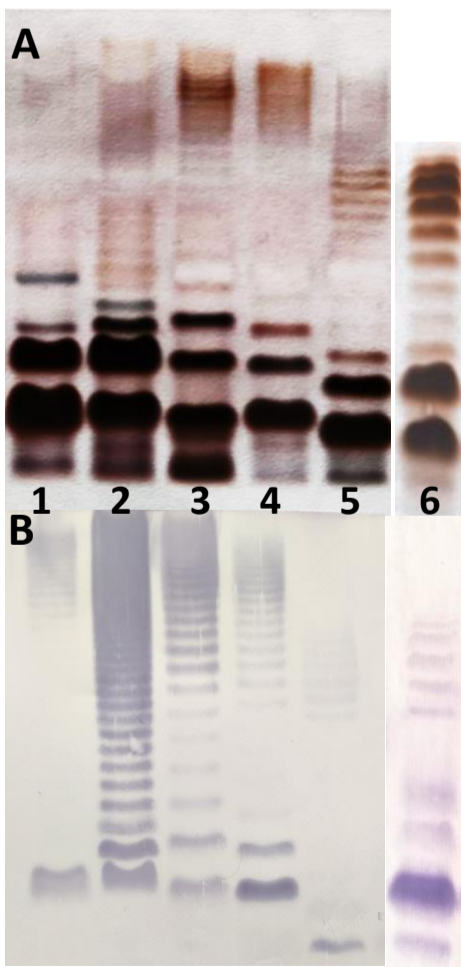
Identyfikacja gatunkowa			
No	Szczep	Analiza sekwencji 16S	Analiza polimorfizmu genu 16S rRNA (PCR-RFLP)
1	Aer101	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>
2	Aer102	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>
3	Aer103	<i>A. encheleia</i>	<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>
4	Aer104	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>
5	Aer105	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
6	Aer106	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>

Profil patogenności izolatów

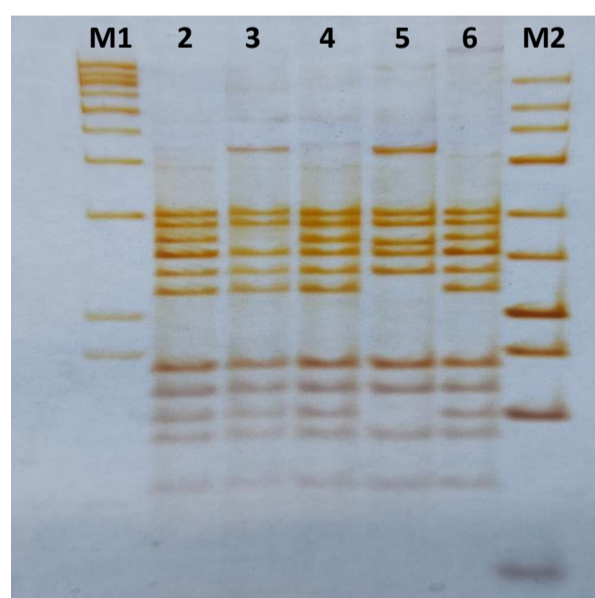


Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR
M – Marker, 1. Aer101, 2. Aer102, 3. Aer106, 4. Aer103, 5. Aer104, 6. Aer105, 7. K-kontrola negatywna.

A. Aktywność proteolityczna izolatów na podłożu stałym z dodatkiem 5% odtłuszczonego mleka.
B. Aktywność hemolityczna bakterii oznaczona na agarze TSB z 5% krwią baranią.



A. SDS-PAGE LPS, B. Western blot z referencyjną surowicą odpornościową PGO1. Studzienka 1. Aer103, 2. Aer102, 3., 4. Aer105, 5. Aer104, 6. Aer101



Analiza polimorfizmu genu 16S rRNA (PCR-RFLP)

Szczep	Aktywność hemolityczna	Aktywność proteolityczna		Profil genetyczny					
		K	Ż	<i>aer</i>	<i>ast</i>	<i>gcat</i>	<i>act</i>	<i>ser</i>	<i>alt</i>
Aer101	α	+	++	+	-	+	+	+	-
Aer102	β	+	+	+	-	+	+	+	+
Aer103	α	+	++	+	-	+	+	+	+/-
Aer104	β	+	+	+	-	+	+	+	+
Aer105	β	+	++	+/-	-	+	+/-	+	-
Aer106	β	+	++	+	-	+	+	-	+

K – aktywność kazeinolityczna, Ż – aktywność żelatynolityczna, gen: *aer* – aerolizyny, *ast* – ciepłostabilnej cytotoxycznie enterotoksyny, *gcat* – acetylotransferazy glicerofosfolipid: cholesterol, *act* – cytotoxycznej enterotoksyny, *ser* – proteazy serynowej, *alt* – ciepłolabilnej cytotoxycznie enterotoksyny.

Wnioski

- Izolaty, na których przeprowadzono badania należą do serogrupy PGO1, co potwierdzono metodą aglutynacji i Western blotting.
- Analiza sekwencji genu 16S rRNA wykazała, że badane szczepy reprezentują gatunki genomowe *A. veronii* bv. *sobria*, *A. encheleia* i *A. hydrophila*. Natomiast analiza polimorfizmu genu 16S rRNA (PCR-RFLP) potwierdziła identyfikację gatunkową izolatów, z wyjątkiem szczepu Aer103, który określono jako należący do *A. salmonicida* lub *A. bestiarum*. Niezgodność w identyfikacji sugeruje konieczność zastosowania innej metody (MLST – multi-locus sequence typing) do potwierdzenia przynależności gatunkowej szczepu.
- W obrębie serogrupy PGO1 zidentyfikowano różne gatunki genomowe *Aeromonas* sp. charakteryzujące się odmiennymi profilami patogenności.
- Badane bakterie wytwarzają enzymy i toksyny bakteryjne co wiąże się z ich wirulencją.
- Typ hemolizy nie jest powiązany z serogrupą.
- Szczepy *Aeromonas* wykazują aktywność proteolityczną (żelatynolityczną i kazeinolityczną), co zostało potwierdzone fenotypowo i genotypowo.
- Zdolność do produkcji enzymów rozkładających białka nie jest powiązana z gatunkiem bakterii.

Literatura

- Kozińska A. Genotypowa i serologiczna analiza krajowych izolatów mezofilnych *Aeromonas* sp. w aspekcie chorobotwórczości i rodzaju objawów chorobowych wywołanych przez ryby, 2009, PIWet-PIB, Puławy.
- Nawaza et al. Detection and characterization of virulence gene and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish, *Food Microbiology*, 27,237-331.