

Streszczenie

Kolibakterioza, jako powszechna i wywołująca wysoką śmiertelność choroba bakteryjna, stanowi istotny problem w drobiarstwie, przyczyniając się do dużych strat ekonomicznych hodowców. Choroba pojawia się w wyniku zakażenia bakteriami *E. coli* patogennymi dla ptactwa (APEC). Szczepy te zaliczane są do patogenów pozajelitowych (ExPEC), które niosą ze sobą istotne dla patogenezы czynniki wirulencji, takie jak: adhezyny, toksyny, protektyny, czy czynniki związane z mechanizmami pozyskania żelaza ze środowiska. Diagnostyka kolibakteriozy jest niezwykle istotna w kontekście profilaktyki wystąpienia choroby w stadzie, zastosowania celowanej terapii oraz bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności. Równocześnie, identyfikacja szczepów odpowiedzialnych za zakażenie sprawia dużo trudności z uwagi na to, że APEC stanowią heterogenną grupę o wieloczynnikowym mechanizmie patogenezы. Dodatkowo, rozpowszechnienie komensalnych bakterii *E. coli* w środowisku powoduje problemy podczas izolacji szczepów oraz oceny ich potencjału chorobotwórczego, jako że szczepy te również w pewnych warunkach mogą wywoływać zakażenie. W związku z powyższym, niezwykle istotne jest opracowanie metody diagnostycznej, która w szybki i jednoznaczny sposób pozwoli wskazać na szczepy patogenne, wywołujące zakażenie w stadzie.

Głównym celem prezentowanej pracy było opracowanie metody diagnostycznej opartej o reakcję PCR, która pozwoli na identyfikację szczepów *E. coli* patogennych dla drobiu (APEC). W tym celu zgromadzono kolekcję szczepów pochodzących od ptaków objętych kolibakteriozą oraz od zdrowych ptaków. Następnie szczepy różnicowano, sekwencjonowano ich genomy oraz przeprowadzono analizę bioinformatyczną, mającą na celu wytypowanie odpowiednich determinant wirulencji odpowiedzialnych za wywołanie kolibakteriozy. Test diagnostyczny, opracowany metodą *in silico*, zweryfikowano metodami laboratoryjnymi.

Różnicowanie szczepów *E. coli* wykonano w oparciu o metodę PCR MP, analizując powstałe profile prążkowe w oprogramowaniu BioNumerics. Umożliwiło to odrzucenie z dalszych badań szczepów tożsamyh i ograniczenie liczby prób poddanych reakcji sekwencjonowania. Sekwencjonowanie Nowej Generacji (NGS) całych genomów (WGS) przeprowadzono na platformie Illumina, a złożenia genomów przygotowano w oprogramowaniu SPAdes z niezbędną manualną edycją. Otrzymane wyniki umożliwiły przeprowadzenie szeregu analiz *in silico*: oceny obecności wybranych czynników

Opracowanie metody diagnostycznej do identyfikacji szczepów *Escherichia coli* patogennych dla drobiu wirulencji, serotypowania czy obecności markerów antybiotykooporności. Dodatkowo, przeprowadzono analizę PCR grup filogenetycznych badanych szczepów *E. coli* wg metody Clermont'a i wsp., (2013).

Aby móc skonstruować poprawny model dotyczący przewidywania zjadliwości szczepów *E. coli*, przeprowadzono reklasyfikację szczepów z pierwotnego podziału bazującego na źródle pozyskania szczepów na klasyfikację opartą o wyniki badań dotyczących przeżywalności zarodków kurzych w modelu *in ovo*. Uzyskane wyniki pozwoliły na podział szczepów na dwie grupy (83 szczepy patogenne i 17 szczepów niepatogennych) i dobór takich czynników wirulencji, które poprawnie różnicują bakterie na te dwie grupy.

Test diagnostyczny zaprojektowano w oparciu o amplifikację w reakcji PCR typu multipleks 2 genów wirulencji (*iroC* i *hlyF*) oraz genu kodującego flipazę antygeny O serotypu O78. Zgodnie z zaprojektowaną metodą obecność któregośkolwiek z tych genów świadczy o przynależności szczepu do grupy patogenów, zaś brak genów w próbce oznacza szczep komensalny. Podczas weryfikacji otrzymanych wyników z modelu predykcyjnego w stosunku do eksperymentów w modelu zarodka kurzego, otrzymano dokładność metody na poziomie 93,00% oraz czułość i specyficzność równe odpowiednio: 98,80% i 64,71%. Przesunięcie punktu odcięcia w kierunku czułości wynika z faktu, że szybka identyfikacja chorego stada i możliwość wdrożenia leczenia stanowiła priorytet podczas prowadzonych badań. Metodę zoptymalizowano i otrzymano 100% zgodności wyników laboratoryjnych z wynikami *in silico*.

Podsumowując, wykorzystanie sekwencjonowania całych genomów *E. coli* pozwala na opracowanie szybkiej metody diagnostycznej identyfikującej szczepy patogenne dla drobiu: APEC. Opracowany test, oparty o PCR, w połączeniu z miejscem izolacji szczepów i objawami klinicznymi choroby po przeprowadzeniu dalszej walidacji może być stosowany w praktyce.