

JOANNA KAZIMIERCZAK

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

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

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



**Fundusze
Europejskie**
Inteligentny Rozwój



MINISTERSTWO
ROZWOJU

Unia Europejska
Europejski Fundusz
Rozwoju Regionalnego



Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Panu prof. dr. hab. Jarosławowi Dastychowi za umożliwienie mi wykonania tej pracy w firmie Proteon Pharmaceuticals oraz nieustanną inspirację i motywację do zgłębiania zagadnień naukowych.

Dziękuję również Panu dr. Dominikowi Strapagielowi, prof. Uniwersytetu Łódzkiego, i zespołowi Biobanku za wprowadzenie mnie w analizy bioinformatyczne oraz nieocenioną pomoc w trakcie realizacji tego projektu.

Panu dr. hab. Marcinowi Lisowi, prof. Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, składam podziękowania za współpracę naukową i życzliwość.

Dziękuję wszystkim Koleżankom i Kolegom z firmy Proteon Pharmaceuticals za współpracę i pomoc. Szczególne podziękowania kieruję do dr inż. Eweliny Wójcik za przekazaną wiedzę, zaangażowanie, poświęcony czas oraz merytoryczne wsparcie podczas całej mojej drogi zawodowej. Dziękuję także dr Annie Rumijowskiej-Galewicz za okazaną pomoc i cenne uwagi do niniejszej pracy. Mgr Patrycji Sowińskiej, dr inż. Karolinie Pospiech, mgr inż. Annie Pękali i inż. Bogumiłowi Zimoniowi dziękuję za pomoc w realizacji doświadczeń.

Chciałabym również podziękować mojemu Mężowi oraz mojej Rodzinie za nieustanne wsparcie oraz motywację.

Spis treści

Wykaz skrótów	6
1. Wstęp teoretyczny	9
1.1. Kolibakterioza	9
1.1.1. Patogeneza	11
1.1.2. Znaczenie ekonomiczne.....	12
1.1.3. Wpływ na zdrowie człowieka	13
1.2. Etiologia kolibakteriozy – <i>Escherichia coli</i>	14
1.2.1. Patotypy <i>E. coli</i>	17
1.2.2. Czynniki wirulencji szczepów APEC	19
1.2.3. Serotypy <i>E. coli</i> związane z kolibakteriozą	31
1.2.4. Podział szczepów <i>E. coli</i> na grupy filogenetyczne	33
1.2.5. Typy sekwencyjne szczepów APEC	33
1.2.6. Antybiotykooporność szczepów APEC	34
1.3. Diagnostyka, profilaktyka i leczenie kolibakteriozy	35
1.3.1. Diagnostyka	35
1.3.2. Profilaktyka.....	39
1.3.3. Leczenie	40
2. Cel pracy	42
3. Materiały i metody	43
3.1. Materiały	43
3.1.1. Szczepy bakteryjne	43
3.1.2. Podłoża mikrobiologiczne i odczynniki do hodowli szczepów <i>E. coli</i>	49
3.1.3. Zestaw do izolacji DNA	49
3.1.4. Enzymy	49
3.1.4.1. Enzymy wykorzystywane do izolacji (spoza zestawu komercyjnego)	49
3.1.4.2. Enzymy restrykcyjne	49
3.1.4.3. Enzymy do ligacji	49
3.1.4.4. Enzymy i mieszaniny wykorzystywane w reakcjach PCR	49
3.1.5. Oligonukleotydy	50
3.1.6. Bufory i roztwory	50
3.1.7. Mieszaniny reakcyjne	51
3.1.7.1. Trawienie enzymami restrykcyjnymi	51
3.1.7.2. Ligacja DNA	51
3.1.7.3. MP PCR	51

3.1.7.4. PCR typu multipleks	51
3.1.8. Odczynniki do przeprowadzenia elektroforezy poziomej	52
3.1.9. Oprogramowania komputerowe i algorytmy typu <i>open source</i>	52
3.2. Metody	53
3.2.1. Hodowle bakteryjne	53
3.2.2. Przygotowanie szczepów <i>E. coli</i> do zakażenia w modelu <i>in ovo</i>	53
3.2.3. Izolacja genomowego DNA	53
3.2.4. Pomiar stężenia DNA	53
3.2.5. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi	54
3.2.6. Ligacja DNA	54
3.2.7. Amplifikacja DNA w reakcjach PCR	54
3.2.7.1. PCR MP	54
3.2.7.2. PCR typu multipleks	55
3.2.8. Elektroforeza poziomowa w żelu agarozowym	56
3.2.9. Różnicowanie szczepów w oprogramowaniu BioNumerics	56
3.2.10. Sekwencjonowanie całych genomów technologią NGS	56
3.2.11. Analiza bioinformatyczna	57
3.2.11.1. Składanie genomów	57
3.2.11.2. Adnotacja	57
3.2.11.3. Analizy genomów z wykorzystaniem narzędzi CGE	57
3.2.11.4. Baza czynników wirulencji	58
3.2.11.5. Projektowanie starterów	63
3.2.12. Testy <i>in ovo</i>	64
3.2.13. Analiza w RStudio i ocena testu	65
3.2.13. Analiza ROC – AUC	66
4. Wyniki	67
4.1. Różnicowanie szczepów bakteryjnych w oparciu o metodę PCR MP	67
4.2. Analiza filogenetyczna	71
4.3. Charakterystyka szczepów <i>E. coli</i> metodami <i>in silico</i>	77
4.4. Występowanie czynników wirulencji w badanych szczepach	83
4.5. Wyniki z eksperymentów w modelu <i>in ovo</i>	87
4.5.1. Dobór dawki zakażającej	88
4.5.2. Analiza wyników z poszczególnych eksperymentów	89
4.6. Wybór genów różnicujących	105
4.6.1. Test Fisher'a	105

4.6.2. Weryfikacja skuteczności modeli predykcyjnych	113
4.7. Opracowanie testu PCR typu multipleks	122
5. Dyskusja	126
6. Wnioski	134
7. Streszczenie	135
8. Summary	137
9. Bibliografia	139

Wykaz skrótów

AFEC	Avian Fecal <i>Escherichia coli</i> – jelitowe szczepy <i>E. coli</i>
AIEC	Adherent-Invasive <i>Escherichia coli</i> – adherentno-inwazyjne szczepy <i>E. coli</i>
APEC	Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i> – szczepy <i>E. coli</i> patogenne dla drobiu
API	Analytical Profile Index – test biochemiczny stosowany w celu identyfikacji mikroorganizmów
ARDB	Antibiotic Resistance Genes Database – baza danych dotycząca genów oporności na antybiotyki
AUC	Area Under Curve – pole pod wykresem krzywej ROC
bp/pz	base pair/para zasad - dwie komplementarne, połączone wiązaniami wodorowymi, zasady azotowe nukleotydów dwóch różnych nici kwasu nukleinowego
CDT	Cytolethal Distending Toxin – cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący typu 1
CFU	Colony Forming Unit – jednostka tworząca kolonię
CV	Coefficient of Variation – współczynnik zmienności
CVP	Conserved Virulence Plasmid – zakonserwowane plazmidowe regiony wirulencji
DAEC	Diffusely-Adherent <i>Escherichia coli</i> – dyfuzyjno-adherentne szczepy <i>E. coli</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid – kwas deoksyrybonukleinowy
dNTPs	mieszanina trifosforanów deoksynukleozydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
EAEC	Enterogaagregative <i>Escherichia coli</i> – enteroagregacyjne szczepy <i>E. coli</i>
EDTA	sól sodowa kwasu etyleno-diamino-tetraoctowego
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> – enterokrwotoczne szczepy <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> – enteroinwazyjne szczepy <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> – enteropatogenne szczepy <i>E. coli</i>
ESBL	Extended-Spectrum Beta Lactamases – β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> – enterotoskyczne szczepy <i>E. coli</i>
ExPEC	Extraintestinal Pathogenic <i>Escherichia coli</i> – pozajelitowe patogenne szczepy <i>E. coli</i>
FASTA	format zapisu sekwencji kwasu nukleinowego lub białka składający się z pojedynczej linii opisu sekwencji oraz kolejnych linii samej sekwencji
FN	False Negative – liczba fałszywie ujemnych wyników

FP	False Positive – liczba fałszywie dodatnich wyników
HGDI	Hunter-Gaston Discriminatory Index – wskaźnik Huntera-Gaston’a – miara różnorodności prób badanych
HTG	horyzontalny transfer genów
HUS	Hemolytic-Uremic Syndrome – zespół hemolityczno-mocznicowy
IPEC	Intestinal Pathogenic <i>Escherichia coli</i> – jelitowe patogenne szczepy <i>E. coli</i>
LPS	lipopolisacharyd – endotoksyna stanowiąca składnik zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych
MDR	MultiDrug-Resistant – wielolekooporny
MLS	Makrolidy-Linkozamidy-Streptograminy – grupa antybiotyków
MLST	MultiLocus Sequence Typing – analiza sekwencji dotycząca kilku genów metabolizmu podstawowego
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing – sekwencjonowanie nowej generacji
NMEC	Neonatal Meningitis <i>Escherichia coli</i> – szczepy <i>E. coli</i> wywołujące zapalenie opon mózgowych u noworodków
NPV	Negative Predictive Value – wartość predykcyjna ujemna
ORF	Open Reading Frame – otwarta ramka odczytu – część sekwencji nukleotydów między kodonem START a kodonem STOP
PAI	Pathogenicity Island – wyspa patogenności
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanem
PCM	Polish Collection of Microorganisms – Polska Kolekcja Mikroorganizmów
PCR MP	PCR Melting Profile – odmiana metody PCR umożliwiająca typowanie bakterii
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis – elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym stosowana m.in. w celu typowania bakterii
PPV	Positive Predictive Value – wartość predykcyjna dodatnia
RFP	roztwór fizjologiczny z peptonem kazeinowym
RCF	Relative Centrifugal Force – względna siła odśrodkowa
ROC	Receiver Operating Characteristic – krzywa będąca narzędziem do oceny poprawności klasyfikatora, pokazująca związek pomiędzy czułością a specyficznością modelu

rpm	Revolutions per minute – jednostka miary częstotliwości obrotu, oznaczająca liczbę pełnych obrotów w ciągu minuty wokół ustalonej osi
SEPEC	Sepsis-associated <i>Escherichia coli</i> – szczepy <i>E. coli</i> wywołujące sepsę
SHS	Swollen Head Syndrome – syndrom obrzękłej głowy
ST	Sequence Type – typ sekwencyjny
STEC	Shiga-toxin-producing <i>Escherichia coli</i> – szczepy <i>E. coli</i> wytwarzające toksynę Shiga
Tm	temperatura topnienia starterów
TN	True Negative – liczba prawdziwie ujemnych wyników
TP	True Positive – liczba prawdziwie dodatnich wyników
UPEC	Uropathogenic <i>Escherichia coli</i> – szczepy <i>E. coli</i> wywołujące zakażenia układu moczowego
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean – metoda średnich połączeń stosowana w klastrowaniu
VAG	Virulence Associated Gene – gen kodujący czynnik wirulencji
WGS	Whole Genome Sequencing – sekwencjonowanie całych genomów
XLD	podłoże agarowe z ksylozą, lizyną i dezoksychohanem
ZUM	zakażenia układu moczowego
ZWP	zbuforowana woda peptonowa

1. Wstęp teoretyczny

1.1. Kolibakterioza

Kolibakterioza drobiu określana jest jako każde miejscowe albo ogólnoustrojowe zakażenie wywołane przez szczepy *Escherichia coli* patogeniczne dla ptaków (APEC – Avian Pathogenic *E. coli*) (Barnes i wsp., 2008). Na chorobę narażone są wszystkie gatunki ptactwa, jednak najczęściej diagnozuje się ją wśród kur, indyków i kaczek. Wysoka zachorowalność oraz ciężki przebieg zakażenia związany jest z wiekiem ptaków – narażone na nie są szczególnie osobniki młode (Dziva i Stevens, 2008).

Kolibakterioza rzadko występuje jako samodzielna jednostka chorobowa. Najczęściej poprzedzają ją: osłabienie odporności ptaków (towarzyszące m.in. chorobie Gumboro, Mareka, mykoplazmozie, kokcydiozie, zakaźnemu zapaleniu oskrzeli, krtani i tchawicy, rzekomemu pomorowi drobiu, anemii zakaźnej kurcząt), uszkodzenia układu oddechowego, stres, złe warunki środowiskowe (w szczególności: zła wentylacja pomieszczeń, obecność kurzu i pyłu, amoniaku), zagęszczenie stada oraz niedobór niektórych składników odżywczych (Lutful Kabir, 2010). Obecnie coraz częściej uważa się jednak, że szczepy APEC są bardzo dobrze przygotowane do funkcjonowania jako patogeny, co może świadczyć o tym, że zakażenia te nie zawsze muszą być oportunistyczne (Barnes i wsp., 2008, Guabiraba i Schouler, 2015).

Najbardziej powszechną drogą zakażenia jest układ oddechowy. Znaczącą rolę odgrywa również zanieczyszczenie fekalne jaj, z których szczepy APEC mogą przenieść się na kurze zarodki podczas wylęgu, skutkując zapaleniem woreczka żółtkowego oraz wysoką śmiertelnością (Lutful Kabir, 2010).

Wyróżnia się następujące postaci tej choroby (Barnes i wsp., 2008, Mituniewicz, 2015, <https://www.mojekurczaki.pl/kolibakterioza>; dostęp: 04.2019):

- kolibakterioza układu oddechowego (Rysunek 1.) – występuje często u kur i indyków na tle osłabienia układu odpornościowego ptaków spowodowanego m.in. chorobami wirusowymi (choroba Mareka), bakteryjnymi (mykoplazmy), czy nieodpowiednimi warunkami środowiskowymi (obecność amoniaku, pyłów, niedobór witaminy A); obserwuje się duszność oraz kichanie ptaków; w narządach układu oddechowego (tchawica, worki powietrzne) widoczne są zmiany – worki

powietrzne objęte zakażeniem są powiększone, zauważalne są wysięki; jest to najczęściej obserwowana forma zakażenia, która prowadzi do kolisepticemii;

- kolibakterioza układu rozrodczego (Rysunek 2.) – występuje w postaci zapalenia jajnika oraz jajowodu, a czasem także otrzewnej, dotyczy ptaków w okresie nieśności, a do zakażenia dochodzi najczęściej podczas inseminacji; jest to jedna z najczęstszych przyczyn śmiertelności wśród kur niosek, kaczek i gęsi;
- zapalenie pępka i woreczka żółtkowego u piskląt – objawia się napięciem powłok brzusznych i zmianami zapalnymi przy pępku oraz niewchłoniętym woreczkiem żółtkowym do 10. dnia życia; uważa się, że najczęstszą przyczyną tej postaci choroby jest zanieczyszczenie fekalne jaj albo przeniesienie bakterii z jelita; w wyniku rozwoju zapalenia pisklęta najczęściej padają (nawet do 20% upadków);
- syndrom obrzękłej głowy (*ang.* SHS – swollen head syndrome) – postać ostrego zapalenia objawiającego się obrzękiem obejmującym obszar okołoooczdolowy i tkanki przylegające; wysokie stężenie amoniaku w powietrzu ma wpływ na zaostrzenie objawów;
- postać uogólniona – występuje w postaci obrzęków i płynu włóknikowego wokół stawów;
- postać przewlekła – obserwuje się zapalenie skóry i tkanki łącznej podskórnej (cellulitis); skóra w okolicach pępka, pachwin i boku ciała zmienia kolor na brązowo-żółty lub czerwono-brązowy;
- kolisepticemia – zakażenie ogólnoustrojowe, podczas którego patogenne bakterie *E. coli* dostają się do krwioobiegu ptaka; choroba przebiega z różną intensywnością w zależności od chorobotwórczości szczepu i odporności organizmu; podczas nekropsji (sekcji) obserwuje się zielony kolor zajętych narządów, zanikową torebkę Fabrycjusza, a także charakterystyczny zapach, wynikający z produkcji indolu przez szczepy patogenne.

W hodowli przemysłowej najczęściej identyfikowanymi postaciami kolibakteriozy są zapalenie woreczka żółtkowego oraz kolisepticemia (Mituniewicz, 2015).



Rysunek 1. Wysięki z worków powietrznych

[<http://www.poultryhub.org/health/disease/types-of-disease/colibacillosis/>; dostęp: 03.2020]



Rysunek 2. Zapalenie jajowodu

[<https://thepoultrysite.com/articles/colibacillosis-in-layers-an-overview>; dostęp: 03.2020]

1.1.1. Patogeneza

Kolibakterioza może pojawić się w wyniku horyzontalnego lub wertykalnego zakażenia bakteriami *Escherichia coli*. Zakażenie horyzontalne następuje poprzez kontakt z zakażonym osobnikiem, zanieczyszczoną wodę lub paszę oraz poprzez infekcję układu oddechowego na skutek wdychania zanieczyszczonego powietrza. Szacuje się, że w złych warunkach środowiskowych w pyłe obecny w kurniku może znajdować się nawet do 10^6 CFU/g *E. coli*. Bakterie te mogą utrzymywać się długo w suchym powietrzu, tym samym, zwierzęta przez długi czas mogą być narażone na zakażenie. Zakażenie wertykalne występuje w wyniku transmisji bakterii przez zanieczyszczone jaja podczas wylęgu lub *in ovo* - w wyniku zapalenia jajowodu (Dziva and Stevens, 2008, Guabiraba i Schouler, 2015).

Escherichia coli wnika do organizmu poprzez śluzówkę lub uszkodzoną skórę i kolonizuje narządy wewnętrzne dzięki czynnikom adhezyjnym. Szczepy chorobotwórcze przedostają się przez śluzówkę do komórek nabłonka worków powietrznych, a następnie do płynów ustrojowych, wywołując ostrą reakcję zapalną prowadzącą do produkcji makrofagów i limfocytów. Szczepy wysoce patogenne powodują śmiertelność w krótkim czasie od zakażenia, natomiast mniej wirulentne wywołują zmiany chorobowe w tkankach na skutek osłabienia układu odpornościowego ptaków (Barnes i wsp., 2008, van der Westhuizen i Bragg, 2012).

1.1.2. Znaczenie ekonomiczne

Kolibakterioza ma duże znaczenie ekonomiczne dla hodowców, ponieważ jest jedną z najczęściej występujących chorób drobiu w każdym wieku – szczepy APEC (bez obrazu klinicznego) izoluje się aż z 63% stad hodowlanych. Wg danych dla państw unijnych m.in. w Grecji, w latach 1992 – 2001 kolibakterioza była najczęściej obserwowaną chorobą układu oddechowego u brojlerów, zaś w Belgii (część Flandrii) w latach 1997-2000 zapadalność na tę chorobę wynosiła 17,7%, 38,6% i 26,9%, odpowiednio dla brojlerów, kur niosek i stad zarodowych (Barnes i wsp., 2008). W USA koszty związane z zakażeniami pozajelitowymi szczepami *Escherichia coli* – ExPEC (*ang.* Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*) zarówno u drobiu, jak i ludzi przekraczają 4 miliardy USD rocznie (Stromberg i wsp., 2017). Poza Unią Europejską i Stanami Zjednoczonymi częste doniesienia na temat kolibakteriozy pochodzą z Brazylii, gdzie straty w latach 2001-2005 wynosiły 58 milionów USD (Rocha i wsp., 2008) oraz z rejonu Bliskiego Wschodu, gdzie np. w Jordanii u 88,2% przypadków kur z zapaleniem worków powietrznych zidentyfikowano szczepy *E. coli* jako źródło zakażenia (Barnes i wsp., 2008).

Dodatkowym czynnikiem wpływającym na wysokie koszty leczenia jest postępująca antybiotykooporność bakterii i pojawianie się szczepów wielolekoopornych. Tym samym, leczenie opierające się na podaniu antybiotyków staje się często nieskuteczne. Ponadto, dostępne komercyjnie szczepionki przeciwko kolibakteriozie nie wykazują wysokiej skuteczności, co spowodowane jest ogromną różnorodnością szczepów APEC. Duże zróżnicowanie serotypowe jest jedną z głównych przyczyn w ustaleniu optymalnego składu szczepionki, dlatego preferowane są autoszczepionki przygotowywane dla szczepów pobranych z miejsc zakażenia. Jednakże jest to proces czasochłonny i tym samym kosztowny (Guabiraba i Schouler, 2015, Mituniewicz, 2015).

1.1.3. Wpływ na zdrowie człowieka

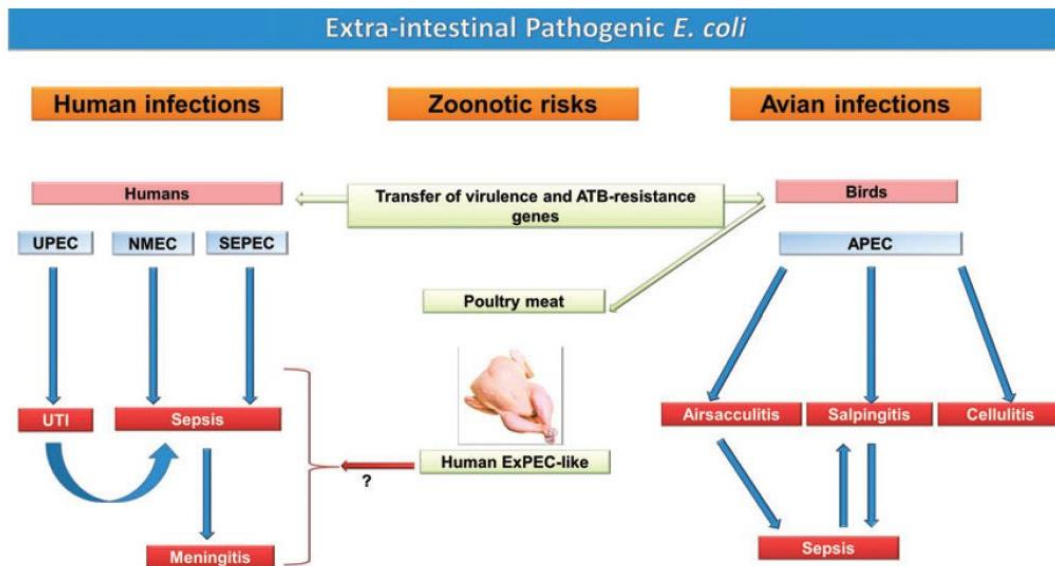
W ostatnich latach, z uwagi na wzrastającą antybiotykooporność bakterii, wiele uwagi poświęca się ograniczeniu występowania chorób odzwierzęcych u ludzi. W Stanach Zjednoczonych szczepy ExPEC są najczęstszą przyczyną występowania zapaleń układu moczowego u człowieka – ZUM, powodując 100 000 hospitalizacji i generując koszty sięgające 1,6 miliarda USD rocznie (Manges, 2016). W związku z powyższym, hipoteza związana z transmisją pozajelitowych szczepów *E. coli* poprzez łańcuch pokarmowy jest przedmiotem badań wielu grup naukowych.

Obecnie uważa się, że drób może być rezerwuarem patogennych bakterii powodujących infekcje u człowieka (Ewers i wsp., 2007). W pracy Stromberga i wsp. (2017) przebadano szczepy jelitowe, wyizolowane ze zdrowych kurczaków, w kierunku wywołania kolibakteriozy oraz innych chorób wywoływanych przez ExPEC (sepsa, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie układu moczowego). W wyniku badań na modelu myszy stwierdzono, że izolat jelitowy *E. coli* (MM218) może powodować zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Podobne wyniki uzyskała grupa Tivendale i wsp. (2010).

Jakkolwiek zagrożenie istnieje, udokumentowanie dróg transmisji szczepów wywołujących choroby drobiu na człowieka może być trudne. Z uwagi na nawet 6-miesięczny odstęp czasu pomiędzy momentem zakażenia pałeczką okrężnicy, a wywołaniem objawów, nie stwierdza się jednoznacznego związku pomiędzy zjedzeniem zanieczyszczonej mikrobiologicznie żywności, a chorobami wywołanymi przez ExPEC (Singer, 2015). Uważa się, że szczepy te przeniesione z drobiu na człowieka, kolonizują jelita zakażonych osób, a w momencie przeniesienia w środowisko pozajelitowe – najczęściej do dróg moczowych podczas kontaktu seksualnego – wywołują infekcje (ZUM). W związku z tym potencjał wywołania choroby odzwierzęcej istnieje, ale jest odsunięty w czasie (Manges, 2016).

Wg hipotez wielu grup badawczych, w odpowiednich warunkach, szczepy APEC mogą wywoływać zakażenia typowe dla pozajelitowych szczepów *E. coli* patogennych dla człowieka (np. UPEC) (Singer, 2015, Manges, 2016, Jørgensen i wsp., 2019). Na Rysunku 3. przedstawiono choroby wywoływane przez pozajelitowe *E. coli* u drobiu i ludzi z potencjalną drogą transmisji (Mellata, 2013). Badania przeprowadzone przez Mitchell i wsp. (2015) oraz Hussain i wsp. (2017) pokazują, że mięso drobiowe może być źródłem szczepów ExPEC, potencjalnie patogennych dla ludzi. W badaniach Jakobsena

i wsp. (2012) wykazano, że szczepy *E. coli* pochodzące z mięsa wykazywały zjadliwość w modelu ZUM u myszy, a ich obecność stwierdzono w moczu, pęcherzu i nerkach. Jednak, aby ocenić potencjał zoonotyczny szczepów ExPEC, potrzebnych jest więcej danych dotyczących dróg transmisji w modelach *in vivo* (Mellata i wsp., 2018).



Rysunek 3. Potencjał zoonotyczny szczepów ExPEC
[Mellata, 2013]

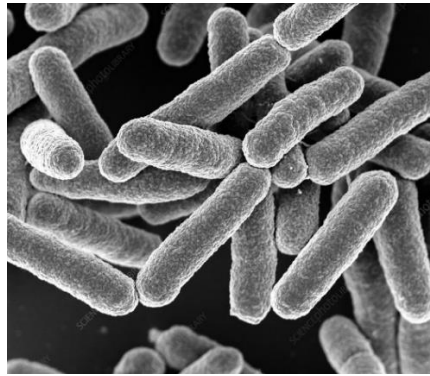
Kolejnym aspektem istotnym z punktu widzenia zdrowia publicznego jest fakt przenoszenia bakterii antybiotykoopornych od zwierząt do ludzi. Zintensyfikowane użycie antybiotyków w chowie i hodowli zwierząt na przestrzeni ostatnich lat spowodowało wzrost lekooporności szczepów środowiskowych, które transmitowane są poprzez łańcuch pokarmowy (Baldy-Chudzik i wsp., 2015, Manges, 2016).

W związku z powyższym, potencjalne zagrożenie, jakie niesie ze sobą przeniesienie szczepów APEC na człowieka, nie może być ignorowane. Mniejsza liczba chorób drobiu przekłada się jednoznacznie na zmniejszone stosowanie antybiotyków, tym samym redukując ich obecność w środowisku, co ma pozytywny wpływ zarówno na dobrostan zwierząt, jak i zdrowie człowieka (Singer, 2015).

1.2. Etiologia kolibakteriozy – *Escherichia coli*

Czynnikiem etiologicznym kolibakteriozy są bakterie *Escherichia coli* odkryte przez niemieckiego pediatrę i bakteriologa Theodor’a Eschericha. Według systematyki Bergey’a gatunek ten należy do klasy gammaproteobakterii, rzędu *Enterobacteriales* i rodziny *Enterobacteriaceae* (Sneath i wsp., 1986). Występuje powszechnie w środowisku, wchodzi

w skład flory jelitowej człowieka i innych zwierząt stałocieplnych, jest jednym z istotnych patogenów oraz stanowi organizm modelowy z uwagi na dobrze poznaną budowę, metabolizm i genom oraz łatwość hodowli i manipulacji w warunkach laboratoryjnych (Allocati i wsp., 2013). *E. coli* jest Gram-ujemną, względnie beztlenową pałeczką o wymiarach 2–3 x 0,6–0,8 μm, niewytwarzającą przetrwalników (Rysunek 4.). Szczepy posiadające rzęski są ruchliwe (Barnes i wsp., 2008).



Rysunek 4. *Escherichia coli* – obraz spod mikroskopu elektronowego
[<https://www.sciencephoto.com/media/1003528/view/escherichia-coli-sem>; dostęp: 03.2020]

Wzrost *E. coli* obserwowany jest zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych na standardowych podłożach w zakresie temperatur 18 – 44°C i w zakresie pH między 4,5 a 9. Bakterie te fermentują węglowodany (m.in. glukozę, laktozę i maltozę) z wytworzeniem kwasu i gazu. Produkują też indol z tryptofanu, redukują azotany do azotynów oraz są oksydazo-ujemne i katalazo-dodatnie. Po 24-godzinnej inkubacji w 37°C rosną w postaci gładkich, bezbarwnych kolonii na podłożach stałych. Inaktywacja większości szczepów następuje w temperaturze 60°C po 30 minutach, natomiast długo utrzymują aktywność metaboliczną w niskich temperaturach. Bakterie należące do tego gatunku wrażliwe są na większość środków dezynfekcyjnych (Barnes i wsp., 2008).

E. coli dzieli się na serotypy wg schematu Kauffmann’a (Kauffmann, 1947). Klasyfikacja ta opiera się o identyfikację antygeny somatycznego O (regionu lipopolisacharydu – LPS), antygeny rzęskowego H oraz antygeny otoczkowego K. Zazwyczaj podczas serotypowania określa się jedynie antygeny O i H – antygen O determinuje podział na serotypy, których do dzisiaj znanych jest ponad 160. Przed pojawieniem się metod molekularnych, szczepy klasyfikowano na patogenne i niepatogenne na podstawie serotypów oraz objawów chorobowych. W przypadku kolibakteriozy znanych jest przynajmniej kilka serotypów powiązanych z chorobotwórczością (m.in. O1, O2, O78). Do dzisiaj metoda serotypowania

używana jest powszechnie do klasyfikacji szczepów *E. coli* (Allocati i wsp., 2013, Sarowska i wsp., 2019).

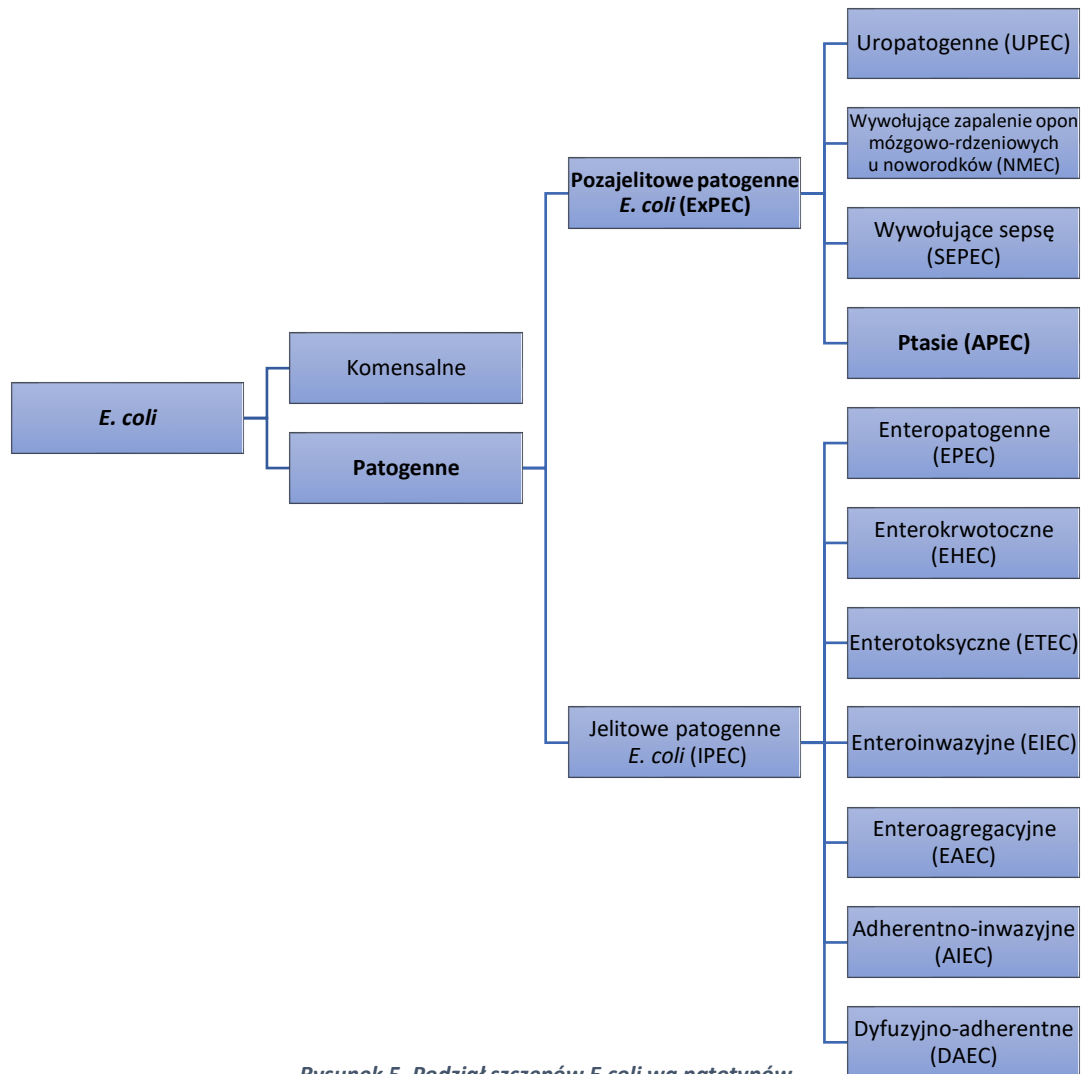
Genom *E. coli* jest dobrze poznany. Jako pierwszy, w 1997 r. został zsekwencjonowany genom szczepu *E. coli* K-12, posiadający 4 639 221 pz i kodujący 4288 genów (Blattner i wsp., 1997). Na jego podstawie zbadane zostały mechanizmy replikacji, transkrypcji czy translacji u prokariotów. Ponadto, gatunek ten znajduje duże zastosowanie w inżynierii genetycznej – uważa się, że prace Cohen’a i Boyer’a w kierunku stworzenia rekombinowanego DNA w *E. coli* dały początek współczesnej biotechnologii (Russo, 2003). Dotychczas w bazie NCBI zostało zdeponowanych ponad 110 tysięcy złożonych sekwencji genomów szczepów *E. coli* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=Escherichia%20coli>; dostęp: 03.2021). Wśród zsekwencjonowanych genomów są zarówno szczepy komensalne, jak i patogeny jelitowe oraz pozajelitowe.

Duża plastyczność genomu *E. coli* powoduje, że gatunek ten jest bardzo różnorodny i potrafi przystosować się do różnych nisz środowiskowych, tym samym zawierając w sobie zarówno szczepy komensalne, jak i chorobotwórcze. Zróżnicowanie genetyczne stanowi odzwierciedlenie złożonej struktury filogenetycznej szczepów. Metodą Clermont’a szczepy *E. coli* klasyfikuje się na następujące grupy filogenetyczne: A, B1, B2, C, D, E, F i kład I (podział szerzej opisany w punkcie 1.2.4. Podział szczepów *E. coli* na grupy filogenetyczne). Każdy szczep *E. coli* zawiera pomiędzy 4 a 5 tysięcy genów, z których część stanowi rdzeń genomu odpowiedzialny za procesy metaboliczne bakterii, natomiast ruchoma pula genów odpowiada za przystosowanie danego szczepu do różnych warunków środowiskowych. W przypadku *E. coli* pangénom określono na 16 tysięcy genów. Uważa się, że ponad dwie trzecie tej liczby stanowi ruchoma pula genów nabyta drogą horyzontalnego transferu genów (HTG) i dlatego zsekwencjonowane szczepy znacząco różnią się między sobą w zawartości poszczególnych genów (Lukjancenko i wsp., 2010, Baldy-Chudzik i wsp., 2015, Sarowska i wsp., 2019).

E. coli traktowana jest również jako organizm wskaźnikowy do oceny jakości wody. Ponieważ gatunek ten stanowi najczęstszą przyczynę biegunki na całym świecie, a patogeny transmitowane są drogą fekalno-oralną, to na podstawie obecności *E. coli* ocenia się ewentualne zanieczyszczenie kałowe próbek wody (Baldy-Chudzik i wsp., 2015).

1.2.1. Patotypy *E. coli*

Ogromna różnorodność szczepów *E. coli* powoduje, że znajdują się wśród nich szczepy zarówno komensalne, jak i patogenne, które można dalej klasyfikować wg schematu przedstawionego na Rysunku 5. (Allocati i wsp., 2013, Sarowska i wsp., 2019).



Rysunek 5. Podział szczepów *E. coli* wg patotypów

Patogeny jelitowe (IPEC) rozprzestrzeniają się przez łańcuch pokarmowy, na skutek spożycia zanieczyszczonej mikrobiologicznie żywności lub wody. Można wśród nich wyróżnić następujące grupy (Allocati i wsp., 2013, Baldy-Chudzik i wsp., 2015):

- Enteropatogenne *E. coli* (EPEC) – są główną przyczyną biegunki u dzieci, w szczególności żyjących w złych warunkach higienicznych; bakterie o tym patotypie kolonizują jelito cienkie, szczelnie przylegając do jego powierzchni i powodując niszczenie mikrokosmków jelitowych;

- Enterokrwotoczne *E. coli* (EHEC) – najbardziej wirulentne spośród patogenów jelitowych, wywołują krwotoczne zapalenie okrężnicy, czasem prowadząc do zespołu hemolityczno-mocznicowego (*ang.* HUS – Hemolytic-Uremic Syndrome); wytwarzają toksynę Shiga (Shigatoksyniczne *E. coli* – STEC) – geny wirulencji kodujące toksyny (*stx*, *eaeA*) stanowią podstawę do wykrywania zakażenia tymi szczepami u ludzi;
- Enterotoksyczne *E. coli* (ETEC) – stanowią najczęstszą przyczynę biegunki u dzieci poniżej 5. roku życia oraz wśród osób podróżujących, w szczególności do krajów o niskim rygorze higienicznym; wytwarzają enterotoksynę oraz kolonizują jelito cienkie;
- Enteroinwazyjne *E. coli* (EIEC) – blisko związane z pałeczkami rodzaju *Shigella*; w jelicie cienkim wytwarzają inwazyjny;
- Enteroagregacyjne *E. coli* (EAEC) – związane z biegunką u dzieci w krajach rozwijających się oraz u pacjentów zakażonych wirusem HIV; przylegają do komórek nabłonkowych jelita cienkiego w sposób adherentno – agregacyjny;
- Adherentno-inwazyjne *E. coli* (AIEC) – stanowią przyczynę zakażeń u osób z chorobą Crohna; mają zdolności adhezyjno-inwazyjne;
- Dyfuzyjno-adherentne *E. coli* (DAEC) – dzielą się na dwie klasy, z których jedna odpowiedzialna jest za wywołanie biegunek u dzieci, natomiast druga związana jest z ZUM.

Szczepy pozajelitowe (ExPEC) uważane są za patogeny fakultatywne, które stanowią część naturalnej mikroflory bakteryjnej gospodarza, jednak ich kompleksowa struktura filogenetyczna, mnogość czynników wirulencji oraz znaczna plastyczność genomu powodują, że mogą łatwo przystosować się do funkcjonowania jako patogeny. W ostatnich latach nastąpił gwałtowny przyrost zakażeń spowodowanych pozajelitowymi szczepami *E. coli* zarówno u ludzi, jak i u drobiu. Szczepy te dzielą się na następujące patotypy (Baldy-Chudzik i wsp., 2015, Cunha i wsp., 2017, Sarowska i wsp., 2019):

- Uropatogenne *E. coli* (UPEC) – powodują około 80% zakażeń związanych z ZUM i, z uwagi na rosnącą antybiotykooporność, stanowią obecnie poważny problem medyczny i społeczny; odsetek ZUM wśród zakażeń szpitalnych to obecnie aż 40%, a na infekcje z reguły narażone są kobiety w wieku 16 – 35 lat (81% przypadków); koszty związane z opieką medyczną dotyczącą ZUM wynoszą 4 – 5 miliardów USD

rocznie na terenie Stanów Zjednoczonych; patotyp ten zawiera wiele czynników wirulencji oraz mobilnych elementów genetycznych w różnych kombinacjach, co powoduje, że bardzo rzadko występuje on u bakterii komensalnych;

- *E. coli* wywołujące zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków (NMEC) – główna przyczyna zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków z powikłaniami neurologicznymi; posiadają antygen otoczkowy K1;
- *E. coli* wywołujące sepsę (SEPEC) – szczepy wywołujące bakterieję wykazują wiele podobieństw do szczepów NMEC, jednak posiadają inny antygen otoczkowy (K2) oraz kodują kolicynę V;
- **Ptasie *E. coli* (APEC)** – wywołują kolibakteriozę – jedną z głównych przyczyn śmiertelności i strat ekonomicznych w hodowli drobiu; wykazują wiele podobieństw z patogenami ludzkimi (np. UPEC), stąd uważa się, że szczepy ExPEC są pochodzenia odzwierzęcego; jednoznaczny genotyp i mechanizmy wirulencji nie są ustalone; grupa ta jest heterogenna, charakteryzuje ją ogromna różnorodność – podobnie jak UPEC, szczepy APEC zawierają wiele czynników zjadliwości, jednak są one zróżnicowane pomiędzy poszczególnymi izolatami chorobotwórczymi.

1.2.2. Czynniki wirulencji szczepów APEC

Jeśli chciano by opisać jednym słowem charakterystykę szczepów APEC, to byłaby to różnorodność. Grupa ta jest niezwykle heterogenna – różne szczepy mogą charakteryzować się obecnością różnych czynników wirulencji, a każdy z nich jest w stanie wywołać kolibakteriozę – nie istnieje archetypowy szczep APEC. Wynika to z opisywanego już faktu, że w swoim genomie *E. coli* posiada duży procent ruchomej puli genów nabywanych w wyniku HTG. W związku z powyższym, szczepy dostosowują się do zmieniającego się środowiska, a poprzez nowe kombinacje genów wirulencji wykazują coraz to większą zjadliwość. Co więcej, istnieje hipoteza, że obecność pewnych określonych czynników warunkujących patogenność zmienia się wraz z wiekiem ptaków i trudno jest wskazać geny, które odpowiadają za wirulencję, niezależnie od stadium rozwoju (Schouler i wsp., 2012, Kemmet i wsp., 2013, Baldy-Chudzik i wsp., 2015, Guabiraba i Schouler, 2015, Vila i wsp., 2016, Ibrahim i wsp., 2019).

Czynniki wirulencji najczęściej rozpoznawane są na wyspach patogenności i transpozonach, które mogą być zakodowane na chromosomie bakterii lub plazmidach. Powszechnie występują zakonserwowane plazmidowe regiony wirulencji CVP (*ang.*

Conserved Virulence Plasmid), które kodują grupy genów odpowiedzialnych za zjadliwość. Wyspy patogenności zawierają między 10 a 200 kpz, otoczone są przez sekwencje flankujące i nabywane w procesie HTG. Wśród patotypu APEC wyróżniono chromosomalne wyspy patogenności: VAT-PAI – o wielkości 22 kpz zawierająca gen *vat*, PAI I_{APEC-O1} – o wielkości 56 kpz z operonem *pap* oraz genami *tia* i *ireA* oraz AGI-3 o wielkości 49,6 kpz. Wyspy patogenności zidentyfikowano również na plazmidach wirulencji, charakterystycznych dla szczepów APEC. Pierwszym z nich jest plazmid ColV (lub pAPEC-O2-ColV) o wielkości 180 kpz, posiadający region 93 kpz z następującymi genami wirulencji: *hlyF*, *ompT*, *iss*, *tsh*, operonem ColV i czterema mechanizmami pozyskiwania żelaza. Bardzo podobna wyspa patogenności została znaleziona w plazmidzie ColBM (174 kpz), znanym też jako pAPEC-O1-ColBM. Uważa się, że plazmidy ColBM wyewoluowały z plazmidu ColV, a punktem różnicującym są geny kodujące kolicynę V w przypadku plazmidu ColV i kolicyny B oraz M w przypadku plazmidu ColBM. Plazmidy te są często związane z antybiotykoopornością szczepów APEC (Johnson i wsp., 2006, Barnes i wsp., 2008).

Czynniki wirulencji szczepów APEC można podzielić na następujące grupy (Barnes i wsp., 2008, Dziva i Stevens, 2008, Baldy-Chudzik i wsp., 2015, Paixão i wsp., 2016, Sarowska i wsp., 2019):

- adhezyny – fimbrialne lub afimbrialne; odgrywają kluczową rolę na początku infekcji i są istotne z punktu widzenia kolonizacji gospodarza przez szczepy APEC, gdyż umożliwiają przyleganie drobnoustrojów do komórek nabłonka; najczęściej występują fimbrie typu 1 (posiada je pomiędzy 70 a 100% szczepów patogennych), których ekspresja następuje podczas kolonizacji komórek nabłonka tchawicy ptaka – adhezyna tych fimbrii wykazuje powinowactwo do mannozy; fimbrie typu 1 kodowane są przez operon *fim* złożony z 9 genów; fimbrie typu P (kodowane przez 11 genów operonu *pap* znajdującego się na wyspie patogenności PAI I_{APEC-O1}) wiążą się do antygeny P erytrocytów, prowadząc do kolonizacji bakterii w organach wewnętrznych (za wyjątkiem tchawicy); ich ekspresja następuje później niż ekspresja fimbrii typu 1, w późnym stadium choroby, prowadząc do kolisepticemii; kolejną grupą są fimbrie typu S umożliwiające bakteriom APEC swoistą adhezję do komórek nabłonka ptaków; wyróżnić można też adhezyny afimbrialne typu Afa oraz hemaglutyninę Tsh (*ang.* temperature-sensitive hemagglutinin), która pełni podwójną rolę – działa jako adhezyna i proteaza, pośrednicząc w kolonizacji

worków powietrznych ptaka na początku infekcji, wiążąc się do erytrocytów oraz do macierzy pozakomórkowych;

- inwazyjność – literatura nie podaje jednoznacznych wyjaśnień, jak szczepy APEC dostają się do krwioobiegu, uważa się jednak, że patogeny są w stanie przetrwać aktywność makrofagów; pewnym jest natomiast, że klaster genów *ibeA* pomaga szczepom NMEC w penetracji bariery krew-mózg; przypuszcza się, że geny te pełnią podobną rolę w szczepach *E. coli* patogennych dla ptaków, a także regulują ekspresję fimbrii typu 1; kolejną inwazyjną jest białko Tia, znajdujące się na wyspie patogenności PAI I_{APEC-01}, występujące w szczepach wywołujących objawy chorobowe;
- czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza – żelazo potrzebne jest w większości szlaków metabolicznych, a zdolność szczepów *E. coli* do pozyskiwania tego pierwiastka w środowiskach, gdzie jest on ograniczony, jest charakterystyczna dla wszystkich patotypów ExPEC, natomiast o wiele rzadziej występuje wśród szczepów komensalnych, co sugeruje, że jest to istotny czynnik w patogenezie chorób wywołanych przez patogeny pozajelitowe; do charakterystycznych genów warunkujących systemy pozyskiwania żelaza występujących w szczepach APEC zaliczają się geny sideroforów: aerobaktyny (*iuc*), yersiniabaktyny (*ybt*) i salmocheliny (*iro*) oraz systemu transportu jonów żelaza (*sit*) i mechanizmu wykorzystania hemu – najbardziej powszechnego źródła żelaza *in vivo* (*chu* i *hma*); najlepiej scharakteryzowanymi systemami są aerobaktyna oraz salmochelina, znajdujące się na plazmidzie ColV, natomiast yersiniabaktyna znajduje się na chromosomalnej wyspie patogenności;
- protektyny – białka błony zewnętrznej pełniące rolę ochronną wobec mechanizmów obronnych organizmu ptaka, które często występują u patotypu APEC; wśród genów kodujących je wyróżnić należy te związane z plazmidem ColV: *traT* – gen kodujący białko błony zewnętrznej TraT, działające jako inhibitor fagocytozy i *iss* – nieidentyfikowany wśród szczepów komensalnych gen kodujący lipoproteinę Iss, warunkującą odporność na surowicę i stanowiącą ochronę przed fagocytozą; uważa się, że obecność Iss znacznie zwiększa wirulencję danego szczepu; dodatkowo, szczepy APEC mogą zawierać antygeny otoczkowe K1;
- toksyny – zjadliwość szczepów uwarunkowana jest produkcją różnorodnych toksyn – jak dotąd zidentyfikowano około kilkanaście genów kodujących toksyny

charakterystyczne dla APEC; gen kodujący hemolizynę *hlyF* jest powszechnie występującym wśród tego patotypu i znajduje się na plazmidach ColV i ColBM w klastrze CVP; kolejnym istotnym czynnikiem wirulencji jest toksyna autotransportera wakuolarnego Vat (znajdująca się na wyspie patogenności VAT-PAI) wywołująca cytotoksyczność – szczepy pozbawione genu *vat* wykazują niższą zjadliwość; spośród innych istotnych toksyn wymienić należy cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący typu 1, toksyny CDT (*ang.* cytolethal distending toxin) oraz różne hemolizyny;

- inne.

W Tabeli 1. podsumowano najbardziej powszechne i charakterystyczne geny wirulencji szczepów APEC oraz potencjalne czynniki zjadliwości, wraz z opisem ich funkcji oraz podziałem na grupy opisane powyżej.

Tabela 1. Wybrane czynniki wirulencji szczepów APEC

Numer porządkowy	Grupa czynników wirulencji	Gen kodujący czynnik wirulencji	Nazwa czynnika wirulencji (ang.)	Odniesienie literaturowe
1	adhezyny	<i>afaE</i>	afimbrial adhesin	Barnes i wsp., 2008
2	adhezyny	<i>aufA</i>	Auf fimbriae major subunit	Lindstedt i wsp., 2018
3	adhezyny	<i>aufB</i>	putative fimbrial chaperone	
4	adhezyny	<i>aufC</i>	outer membrane usher protein	
5	adhezyny	<i>aufD</i>	putative minor fimbrial subunit	
6	adhezyny	<i>aufE</i>	Auf fimbriae minor subunit	
7	adhezyny	<i>aufF</i>	putative fimbrial chaperone	
8	adhezyny	<i>aufG</i>	putative fimbrial-like adhesin protein	
9	adhezyny	<i>bmaE</i>	blood group M-specific adhesin	Barnes i wsp., 2008
10	adhezyny	<i>cfaA</i>	CfA/I fimbrial subunit A	Lindstedt i wsp., 2018
11	adhezyny	<i>cfaB</i>	CfA/I fimbrial subunit B	
12	adhezyny	<i>cfaC</i>	CfA/I fimbrial subunit C	
13	adhezyny	<i>cfaD</i>	CfA/I fimbrial subunit D	
14	adhezyny	<i>crl</i>	sigma-factor binding protein	Sarowska i wsp., 2019
15	adhezyny	<i>csgA</i>	major curlin subunit	

Numer porządkowy	Grupa czynników wirulencji	Gen kodujący czynnik wirulencji	Nazwa czynnika wirulencji (ang.)	Odniesienie literaturowe
16	adhezyny	<i>csgB</i>	minor curlin subunit	
17	adhezyny	<i>csgC</i>	curli assembly protein	
18	adhezyny	<i>csgD</i>	csgAB operon transcriptional regulatory protein	
19	adhezyny	<i>csgE</i>	curli assembly protein	
20	adhezyny	<i>csgF</i>	curli assembly protein	
21	adhezyny	<i>csgG</i>	curli assembly protein	
22	adhezyny	<i>eaeH</i>	attaching and effacing protein, pathogenesis factor	Barnes i wsp., 2008
23	adhezyny	<i>ecpA</i>	common pillus major fimbrillin subunit	Guabiraba i Schouler, 2015
24	adhezyny	<i>ecpB</i>	probable fimbrial chaperone	
25	adhezyny	<i>ecpC</i>	probable outer membrane usher protein	
26	adhezyny	<i>ecpD</i>	yad-type fimbriae periplasmic chaperone protein	
27	adhezyny	<i>ecpE</i>	probable fimbrial chaperone	
28	adhezyny	<i>ecpR</i>	HTH-type transcriptional regulator EcpR	
29	adhezyny	<i>fimA</i>	Type 1 fimbriae major subunit	Sarowska i wsp., 2019
30	adhezyny	<i>fimB</i>	Type 1 fimbriae regulatory protein	
31	adhezyny	<i>fimC</i>	chaperone protein	
32	adhezyny	<i>fimD</i>	outer membrane usher protein	
33	adhezyny	<i>fimE</i>	Type 1 fimbriae regulatory protein	
34	adhezyny	<i>fimF</i>	fimbrial protein	
35	adhezyny	<i>fimG</i>	fimbrial protein	
36	adhezyny	<i>fimH</i>	D-mannose specific adhesin of Type 1 fimbriae	
37	adhezyny	<i>fimI</i>	fimI fimbrial protein	
38	adhezyny	<i>fmlA</i>	putative Fml fimbriae subunit	Lindstedt i wsp., 2018
39	adhezyny	<i>fmlD</i>	putative Fml fimbrial adhesin	
40	adhezyny	<i>focA</i>	major fimbrial subunit	Barnes i wsp., 2008
41	adhezyny	<i>focB</i>	predicted formate transporter	

Numer porządkowy	Grupa czynników wirulencji	Gen kodujący czynnik wirulencji	Nazwa czynnika wirulencji (ang.)	Odniesienie literaturowe
42	adhezyny	<i>focC</i>	chaperone protein	
43	adhezyny	<i>focD</i>	outer membrane usher protein	
44	adhezyny	<i>focI</i>	fimbrial regulatory gene	
45	adhezyny	<i>hcpA</i>	Type IV pillin	Peng i wsp., 2016
46	adhezyny	<i>hcpB</i>	Type IV fimbrial assembly	
47	adhezyny	<i>hcpC</i>	putative chaperone protein	
48	adhezyny	<i>hra</i>	heat-resistant agglutinin	Silveira i wsp., 2016
49	adhezyny	<i>htrA</i>	periplasmic serine protease, heat shock protein	Dziva i wsp., 2013
50	adhezyny	<i>htrB</i>	lipid A biosynthesis lauroyltransferase	
51	adhezyny	<i>htrC</i>	heat shock protein C	
52	adhezyny	<i>htrE</i>	outer membrane usher protein	
53	adhezyny	<i>mat</i>	maturation protein	Maciel i wsp., 2017
54	adhezyny	<i>papA</i>	pap fimbrial major pillin protein	Sarowska i wsp., 2019
55	adhezyny	<i>papB</i>	major pilus subunit operon regulator	
56	adhezyny	<i>papC</i>	outer membrane usher protein	
57	adhezyny	<i>papD</i>	pilus assembly protein chaperone	
58	adhezyny	<i>papE</i>	fimbrial protein	
59	adhezyny	<i>papF</i>	fimbrial adapter	
60	adhezyny	<i>papGII</i>	pilus tip adhesin	
61	adhezyny	<i>papH</i>	fimbrial minor pillin protein	
62	adhezyny	<i>papI</i>	major pilus subunit operon regulator	
63	adhezyny	<i>papJ</i>	pilus protein	
64	adhezyny	<i>papK</i>	fimbrial adapter	
65	adhezyny	<i>papX</i>	putative regulator papX protein	
66	adhezyny	<i>sfa</i>	pilus tip adhesin of S fimbriae	
67	adhezyny	<i>sfaA</i>	S-fimbrial protein subunit	
68	adhezyny	<i>sfaB</i>	putative S-fimbrial switch regulatory protein	

Numer porządkowy	Grupa czynników wirulencji	Gen kodujący czynnik wirulencji	Nazwa czynnika wirulencji (ang.)	Odniesienie literaturowe
69	adhezyny	<i>sfaC</i>	putative S-fimbrial switch regulatory protein	
70	adhezyny	<i>sfaG</i>	S-fimbrial protein subunit	
71	adhezyny	<i>sfaH</i>	S-fimbrial protein subunit	
72	adhezyny	<i>sfaS</i>	S-fimbrial adhesin protein	
73	adhezyny	<i>stgA</i>	protein of stg fimbrial operon	Guabiraba i Schouler, 2015
74	adhezyny	<i>stgB</i>	putative fimbrial chaperone	
75	adhezyny	<i>stgD</i>	stg adhesin	
76	adhezyny	<i>tsh</i>	temperature-sensitive hemagglutinin	
77	adhezyny	<i>yehA</i>	putative Yeh fimbrial adhesin	Huja i wsp., 2015
78	adhezyny	<i>yehB</i>	putative outer membrane usher protein	
79	adhezyny	<i>yehC</i>	probable fimbrial chaperone	
80	adhezyny	<i>yehD</i>	putative Yeh fimbriae subunit	
81	adhezyny	<i>yehE</i>	yeh adhesin	Guabiraba i Schouler, 2015
82	adhezyny	<i>yqi</i>	putative yqi fimbrial adhesin	
83	inwazyjny	<i>aatA</i>	AatA outer membrane protein	Sarowska i wsp., 2019
84	inwazyjny	<i>ibeA</i>	invasion protein of brain microvascular endothelial cells	
85	inwazyjny	<i>ibeB</i>	invasin of brain endothelial cells	
86	inwazyjny	<i>ibeC</i>	invasin of brain endothelial cells	
87	inwazyjny	<i>ibeR</i>	putative regulatory protein	Dziva i Stevens, 2008
88	inwazyjny	<i>tia</i>	invasion determinant	
89	inwazyjny	<i>ycho</i>	invasin (uncharacterised)	Pilatti i wsp., 2016
90	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>chuA</i>	outer membrane hemoglobin receptor	Guabiraba i Schouler, 2015
91	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>chuS</i>	putative hemoglobin transport protein	
92	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>chuT</i>	putative periplasmic binding protein	

Numer porządkowy	Grupa czynników wirulencji	Gen kodujący czynnik wirulencji	Nazwa czynnika wirulencji (ang.)	Odniesienie literaturowe
93	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>chuU</i>	putative permease of iron compound ABC transport system	
94	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>chuW</i>	putative oxygen independent coproporphyrinogen III oxidase	
95	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>chuX</i>	putativ heme iron utilization protein	
96	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>chuY</i>	hemin uptake protein	
97	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>eitA</i>	ABC iron transporter	Barnes i wsp., 2008
98	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>eitB</i>	ABC transporter permease	
99	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>eitC</i>	ABC transporter	
100	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>eitD</i>	ABC iron transporter system permease protein	
101	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>feoA</i>	ferrous iron transport protein A	Lutful Kabir, 2010
102	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>feoB</i>	ferrous iron transport protein B	
103	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>feoC</i>	probable [F-S] dependent transcriptional repressor	
104	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>fepA</i>	ferrienterobactin receptor	Nakazato i wsp., 2009
105	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>fepB</i>	ferric enterobactin binding protein	
106	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>fepC</i>	ferric enterobactin transport ATP-binding protein	
107	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>fepD</i>	ferric enterobactin transport system permease protein	
108	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>fepE</i>	ferric enterobactin transport protein	

Numer porządkowy	Grupa czynników wirulencji	Gen kodujący czynnik wirulencji	Nazwa czynnika wirulencji (ang.)	Odniesienie literaturowe
109	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>fyuA</i>	ferric yersiniabactin uptake receptor	Barnes i wsp., 2008
110	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>ireA</i>	iron regulated outer membrane virulence protein	Sarowska i wsp., 2019
111	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>iroB</i>	Salmochellin siderophore protein	
112	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>iroC</i>	Salmochellin siderophore protein	
113	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>iroD</i>	Enterocholin esterase	
114	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>iroE</i>	Salmochellin siderophore protein	
115	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>iroN</i>	catecholate siderophore receptor gene	
116	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>irp1</i>	yersiniabactin biosynthetic protein	
117	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>irp2</i>	iron repressible gene associated with yersiniabactin synthesis	Lutful Kabir, 2010
118	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>iucA</i>	aerobactin siderophore biosynthesis	Sarowska i wsp., 2019
119	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>iucB</i>	aerobactin biosynthesis protein	
120	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>iucC</i>	aerobactin synthase	
121	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>iucD</i>	aerobactin synthase	
122	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>iutA</i>	ferric aerobactin outer membrane receptor gene	Lutful Kabir, 2010
123	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>sitA</i>	iron ABC transporter substrate-binding protein	Sarowska i wsp., 2019
124	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>sitB</i>	chelated iron transport system membrane protein	

Numer porządkowy	Grupa czynników wirulencji	Gen kodujący czynnik wirulencji	Nazwa czynnika wirulencji (ang.)	Odniesienie literaturowe	
125	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>sitC</i>	chelated iron transport system membrane protein		
126	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>sitD</i>	chelated iron transport system membrane protein		
127	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>ybtA</i>	AraC type regulator of yersniabactin gene cluster (HPI)	Lindstedt i wsp., 2018	
128	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>ybtE</i>	yersiniabactin siderophore biosynthetic protein		
129	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>ybtP</i>	putative inner membrane ABC transporter		
130	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>ybtQ</i>	inner membrane ABC transporter		
131	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>ybtS</i>	putative salicylate synthase		
132	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>ybtT</i>	yersniabactin biosynthetic protein		
133	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>ybtU</i>	yersniabactin biosynthetic protein		
134	czynniki związane z pozyskiwaniem żelaza	<i>ybtX</i>	putative permease of yersniabactin operon		
135	protektyny	<i>bor</i>	prophage lipoprotein		Barnes i wsp., 2008
136	protektyny	<i>iss</i>	increased serum survival protein		Sarowska i wsp., 2019
137	protektyny	<i>kpsE</i>	capsule polysaccharide export inner-membrane protein	Sarowska i wsp., 2019	
138	protektyny	<i>kpsM</i>	polysialic acid transport protein		
139	protektyny	<i>kpsT</i>	polysialic acid transport ABC-binding protein		
140	protektyny	<i>neuC</i>	polysialic acid biosynthesis protein	Maciel i wsp., 2017	
141	protektyny	<i>neuS</i>	polysialic acid capsule biosynthesis polysialyltransferase		
142	protektyny	<i>ompA</i>	outer membrane protein A	Barnes i wsp., 2008	
143	protektyny	<i>ompT</i>	protease able to cleave colicin		

Numer porządkowy	Grupa czynników wirulencji	Gen kodujący czynnik wirulencji	Nazwa czynnika wirulencji (ang.)	Odniesienie literaturowe
144	protektyny	<i>rfc</i>	O-antigen polymerase	Rodriguez-Siek i wsp., 2005
145	protektyny	<i>traT</i>	complement resistance protein	Sarowska i wsp., 2019
146	protektyny	<i>aec7</i>	protein of type VI secretion system	Ma i wsp., 2015; Guabiraba i Schouler, 2015
147	protektyny	<i>aec8</i>	protein of type VI secretion system	
148	protektyny	<i>aec11</i>	protein of type VI secretion system	
149	protektyny	<i>aec14</i>	protein of type VI secretion system	
150	protektyny	<i>aec15</i>	protein of type VI secretion system	
151	protektyny	<i>aec16</i>	protein of type VI secretion system	
152	protektyny	<i>aec17</i>	protein of type VI secretion system	
153	protektyny	<i>aec18</i>	protein of type VI secretion system	
154	protektyny	<i>aec19</i>	protein of type VI secretion system	
155	protektyny	<i>aec22</i>	protein of type VI secretion system	
156	protektyny	<i>aec23</i>	protein of type VI secretion system	
157	protektyny	<i>aec24</i>	protein of type VI secretion system	
158	protektyny	<i>aec25</i>	protein of type VI secretion system	
159	protektyny	<i>aec26</i>	protein of type VI secretion system	
160	protektyny	<i>aec27</i>	protein of type VI secretion system	
161	protektyny	<i>aec28</i>	protein of type VI secretion system	
162	protektyny	<i>aec29</i>	protein of type VI secretion system	
163	protektyny	<i>aec30</i>	protein of type VI secretion system	
164	protektyny	<i>aec31</i>	protein of type VI secretion system	
165	protektyny	<i>aec32</i>	protein of type VI secretion system	
166	toksyny	<i>astA</i>	arginine N-succinyl transferase	Paixão i wsp., 2016

Numer porządkowy	Grupa czynników wirulencji	Gen kodujący czynnik wirulencji	Nazwa czynnika wirulencji (ang.)	Odniesienie literaturowe
167	toksyny	<i>astB</i>	N-succinylarginine dihydrolase	
168	toksyny	<i>astC</i>	succinylornithine transaminase	
169	toksyny	<i>astD</i>	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase	
170	toksyny	<i>astE</i>	Succinylglutamate desuccinylase	
171	toksyny	<i>cba</i>	colicin-B	Schramm i wsp., 1987
172	toksyny	<i>cbi</i>	immunity gene of the ColB operon	Barnes i wsp., 2008
173	toksyny	<i>cdtA</i>	Cytolethal distending toxin subunit A	
174	toksyny	<i>cdtB</i>	Cytolethal distending toxin subunit B	
175	toksyny	<i>cdtC</i>	Cytolethal distending toxin type IV subunit C	
176	toksyny	<i>cma</i>	structural gene of the ColM activity	
177	toksyny	<i>cmi</i>	colicin-M immunity protein	Öschläger i Braun, 1987
178	toksyny	<i>cvaA</i>	gene of colicinV operon	Sarowska i wsp., 2019
179	toksyny	<i>cvaB</i>	gene of colicinV operon	
180	toksyny	<i>cvaC</i>	gene of colicinV operon	
181	toksyny	<i>cvi</i>	colicinV immunity protein	Silveira i wsp., 2016
182	toksyny	<i>hlyD</i>	hemolysin secretion protein	Lutful Kabir, 2010
183	toksyny	<i>hlyE</i>	hemolysin E	
184	toksyny	<i>hlyF</i>	hemolysin	
185	toksyny	<i>pic</i>	serine protease pic autotransporter	Silveira i wsp., 2016
186	toksyny	<i>pilQ</i>	secretion protein	Dziva i Stevens, 2008
187	toksyny	<i>sat</i>	serine protease sat autotransporter	Sarowska i wsp., 2015
188	toksyny	<i>usp</i>	uropathogenic-specific protein	Barnes i wsp., 2008
189	toksyny	<i>vat</i>	vacuolating autotransporter toxin	Sarowska i wsp., 2019
190	inne	<i>etsA</i>	ABC transporter, efflux pump protein	Barnes i wsp., 2008
191	inne	<i>etsB</i>	macrolide export ATP-binding protein	
192	inne	<i>etsC</i>	ABC transporter	

Numer porządkowy	Grupa czynników wirulencji	Gen kodujący czynnik wirulencji	Nazwa czynnika wirulencji (ang.)	Odniesienie literaturowe
193	inne	<i>fliC</i>	flagellin protein associated with H7 antigen group	Guabiraba i Schouler, 2015
194	inne	<i>malX</i>	pathogenicity island marker	Barnes i wsp., 2008

1.2.3. Serotypy *E. coli* związane z kolibakteriozą

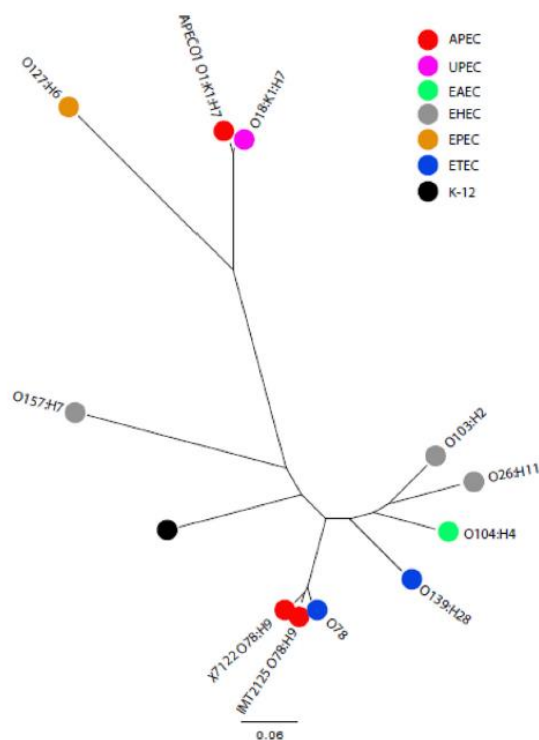
Pomimo coraz większej liczby badań nad molekularnymi determinantami wirulencji w szczepach APEC, serotypowanie nadal pozostaje istotnym elementem diagnostyki. Informacja o serotypie jest ważna, ponieważ odpowiedź immunologiczna organizmu ptaka jest skierowana przeciwko antygenom O bakterii. Dodatkowo, serotypy szczepów *E. coli* są bardzo zróżnicowane, w zależności od patogenności szczepu oraz od rejonu geograficznego, z którego one pochodzą (Barnes i wsp., 2008, Guabiraba i Schouler, 2015, Fratamico i wsp., 2016).

Dotychczas ustalono, że w Europie wśród serotypów *E. coli* powiązanych z kolibakteriozą najczęściej identyfikuje się serotypy O1, O2, O5, O8, O18 i O78, które odpowiadają za ponad 50% zakażeń. Dane ze wschodnich Chin wskazują na szczepy o serotypach O1, O2, O18 i O78 jako przyczynę ponad 85% infekcji, zaś w Jordanii serotypy O78, O1 i O2 identyfikowane są dla ponad połowy szczepów wywołujących kolibakteriozę. Jednakże wiele szczepów nie daje się typować tradycyjnymi metodami serologicznymi, a ponadto istnieją serotypy rzadkie, których nie można powiązać z chorobotwórczością szczepów (Barnes i wsp., 2008, Wang i wsp., 2014, Guabiraba i Schouler, 2015, Ibrahim i wsp., 2019).

Pierwszym zsekwencjonowanym genomem szczepu związanego z kolibakteriozą był APEC O1:K1:H7. Wykorzystano go w badaniach związanych z podobieństwem szczepów APEC do ludzkich ExPEC, stwierdzając, że wiele tych samych czynników wirulencji obecnych jest w genomach szczepów APEC, UPEC i NMEC (Johnson i wsp., 2007, Manges i Johnson, 2012, Zhu Ge i wsp., 2014). W analizie porównawczej genomów kolejnego z powszechnych serotypów – APEC O2:K2 – ze szczepami ExPEC oraz IPEC ujawniono, że szczep ten jest nie tylko podobny do innych szczepów ExPEC, ale również do patotypu AIEC, zupełnie innego od patotypów pozajelitowych, co przemawia

za hipotezą, że szczepy jelitowe mogą być rezerwuarem genów patogenności (Jørgensen i wsp., 2017, Lindstedt i wsp., 2018).

Kolejnym istotnym w diagnostyce kolibakteriozy jest serotyp O78. Mimo że szczepy o tym serotypie odpowiadają za wiele zakażeń na całym świecie, to analizy porównawcze zsekwencjonowanych genomów szczepów o serotypie O78 i szczepów o serotypach O1 lub O2 często charakteryzują się brakiem obecności tych samych genów wirulencji. Dodatkowo, posiadają też inną liczbę determinant patogenności i ruchomych elementów genetycznych. Szczepy O78 wykazują wyższe podobieństwo do szczepów ETEC niż do szczepu APEC O1, który klastruje się ze szczepami uropatogennymi (Rysunek 6.). W związku z powyższym, wydaje się, że szczepy o tym serotypie mają inne, niezdefiniowane jeszcze mechanizmy zjadliwości. Potwierdza to również hipotezę, że szczepy APEC stanowią heterogenną grupę i korzystają z różnej kombinacji genów wirulencji, by wywołać infekcję. Analizy całego genomu wydają się być niezbędne w celu ustalenia kombinacji genów odpowiedzialnych za patogenność szczepu, zaś informacje dotyczące serotypu nie są wystarczające, by można było zaklasyfikować dany szczep jako wirulentny (Dziva i wsp., 2013, Huja i wsp., 2015, Ronco i wsp., 2017).



Rysunek 6. Drzewo filogenetyczne wybranych patotypów *E. coli*
[Dziva i wsp., 2013]

1.2.4. Podział szczepów *E. coli* na grupy filogenetyczne

W latach 80. ubiegłego wieku opublikowano wyniki badań dotyczących występowania różnych grup w obrębie struktury genetycznej *E. coli* (Whittam i wsp., 1983). Wyróżniono cztery grupy filogenetyczne: A, B1, B2 i D. Zaobserwowano również, że rozkład tych grup nie jest losowy – patogeny jelitowe były najczęściej reprezentowane w grupie D, szczepy pozajelitowe w grupach B2 i D, zaś szczepy komensalne występowały w grupie A lub B1. W 2012 roku wyodrębniono grupy dodatkowe: grupę E związaną z grupą główną D, grupę F – siostrzaną dla grupy B2 oraz grupę C – siostrzaną dla B1. Uwzględniono też kład I, w którym klasyfikuje się szczepy różne genetycznie od pozostałych grup, ale podobne fenotypowo (Barnes i wsp., 2008, Clermont i wsp., 2013, Baldy-Chudzik i wsp., 2015).

Ponieważ grupy filogenetyczne różnią się między sobą, a szczepy do nich należące wykazują różny stopień wirulencji, to klasyfikacja ich do grup filogenetycznych z wykorzystaniem metodyki opracowanej przez Clermont'a i wsp. (opisanej w punkcie 1.3.1. Diagnostyka) stanowi istotny element charakterystyki *E. coli*. Jednak z uwagi na brak jednoznacznego powiązania grup filogenetycznych z patogennością, podział szczepów wg tej metody nie jest wystarczający do określenia patotypu APEC.

1.2.5. Typy sekwencyjne szczepów APEC

W ostatnich latach, ze względu na zwiększoną dostępność sekwencjonowania, badane są również geny metabolizmu podstawowego i ich mutacje metodą MLST (*ang.* MultiLocus Sequence Typing). Analiza ta pozwala na zaklasyfikowanie szczepów *E. coli* do typów sekwencyjnych (ST – sequence type) i, co ważne, jest dokładniejsza niż typowanie filogenetyczne.

Na podstawie przeprowadzonych dotychczas analiz wykazano, że wśród patogenów pozajelitowych najczęściej występującym typem sekwencyjnym jest ST131. Często spotykane są też typy: ST23, ST95 i ST117 (Dziva i wsp., 2013, Zhu Ge i wsp., 2014, Ronco i wsp., 2017, Sarowska i wsp., 2019). Jednak, podobnie jak w przypadku grup filogenetycznych, nie ma jasno sprecyzowanego związku pomiędzy występowaniem danego typu sekwencyjnego, a patogennością szczepu APEC. Ewers i wsp. (2009) w swoich badaniach, za pomocą techniki MLST, wskazali na potencjalny rezerwuar genów patogenności w jelitowych szczepach *E. coli*. Równocześnie pokazali, że użycie tej metody nie pozwala na jednoznaczne różnicowanie pomiędzy szczepami patogennymi,

a potencjalnie komensalnymi. Ponadto, typy sekwencyjne są również bardzo zróżnicowane. W badaniach Solà-Ginésa i wsp. (2015) na 22 przebadane izolaty APEC zidentyfikowano 18 ST, a w badaniach Kemmeta i wsp. (2013) wśród szczepów patogennych udowodniono występowanie nowego typu sekwencyjnego, co uniemożliwia jednoznaczne powiązanie typu sekwencyjnego z patotypem APEC.

1.2.6. Antybiotykooporność szczepów APEC

Antybiotyki w chowie i hodowli drobiu stosowane były od połowy lat 50. XX wieku, aby zredukować straty wywołane przez bakteryjne patogeny, w tym APEC, co doprowadziło do powstania szczepów antybiotykoopornych oraz wielolekoopornych. W konsekwencji, wiele terapeutyków stosowanych dawniej z powodzeniem, nie działa dzisiaj na chore ptaki, a na rynku nie ma nowych leków, gdyż badania związane z ich poszukiwaniem nie są rozwijane (Barnes i wsp., 2008). Obecnie *E. coli* jest jednym z 9 antybiotykoopornych mikroorganizmów, które na całym świecie powodują infekcje na różnych poziomach: zakażenia u ludzi, zakażenia szpitalne czy zakażenia przenoszone przez układ pokarmowy (Vila i wsp., 2016).

Nabywanie oraz rozpowszechnianie genów oporności następuje w procesie HTG. Co ciekawe, oporność na antybiotyki jest większa wśród szczepów patogennych niż komensalnych, w związku z tym zakłada się, że istnieje korelacja pomiędzy posiadaniem przez bakterie czynników wirulencji i nabywaną przez nie antybiotykoopornością. Interakcje te nie są do końca wyjaśnione, prawdopodobnie zależą od struktury filogenetycznej szczepu, jak również od rejonu geograficznego, w którym dany szczep występuje. Możliwym jest, że w środowisku pod wpływem obecności czynnika, jakim jest antybiotyk, plazmidy kodujące geny wirulencji i antybiotykooporności podlegają tej samej selekcji i dzięki temu możliwe jest utrzymanie czynników patogenności (Baldy-Chudzik i wsp., 2015, Awad i wsp., 2016).

Często obserwuje się, że pozajelitowe patogeny *E. coli* wykazują oporność na tetracykliny, sulfonamidy, antybiotyki β -laktamowe, streptomycynę, cefalosporyny trzeciej generacji, czy fluorochinolony przy jednoczesnym najczęstszym użyciu penicylin i cefalosporyn w weterynarii. Szczepy *E. coli* najczęściej wytwarzają ESBL – β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (*ang.* Extended Spectrum Beta-Lactamases), które zdolne są do inaktywacji antybiotyków β -laktamowych oraz cefalosporyn II, III i IV generacji. Wiele spośród tych szczepów identyfikuje się jako wielolekooporne (MDR –

MultiDrug Resistant). Badania Awada i wsp. pokazują, że nawet 58,6% antybiotykoopornych pozajelitowych szczepów *E. coli* pochodzi od brojlerów, co stanowi bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia człowieka (Barnes i wsp., 2008, Baldy-Chudzik i wsp., 2015, Solà-Ginés i wsp., 2015, Awad i wsp., 2016).

1.3. Diagnostyka, profilaktyka i leczenie kolibakteriozy

Ze względu na to, że pozajelitowe szczepy *Escherichia coli* (opisywane w punkcie 1.2.1. Patotypy *E.coli*) wywołujące kolibakteriozę są bardzo zróżnicowane, nie ma jednej powszechnej metodyki w diagnostyce, profilaktyce i leczeniu zakażeń.

1.3.1. Diagnostyka

Poprawna diagnostyka kolibakteriozy i identyfikacja szczepów *E. coli* odpowiedzialnych za zakażenie stanowi duże wyzwanie. W pierwszym etapie izoluje i identyfikuje się szczepy z miejsc zajętych chorobowo, jednak należy zwracać szczególną uwagę, aby nie dopuścić do zanieczyszczeń fekalnych prób. Izolacja szczepów z narządów wewnętrznych obarczona jest ryzykiem pobrania izolatów komensalnych, ponieważ *E. coli* z łatwością rozprzestrzenia się z jelit na inne narządy martwych ptaków. Pamiętać należy, że istnieje szereg innych chorób bakteryjnych i wirusowych powodujących objawy podobne do kolibakteriozy, dlatego próby powinny zostać poddane ukierunkowanej diagnostyce *E.coli* (posiew mikrobiologiczny na podłoże różnicujące, np. na podłoże MacConkey'a, na którym *E. coli* rośnie w postaci różowych lub różowo-czerwonych kolonii z osadem soli żółciowych wokół). Wybrane kolonie poddaje się weryfikacji biochemicznej (testy API) (Barnes i wsp., 2008).

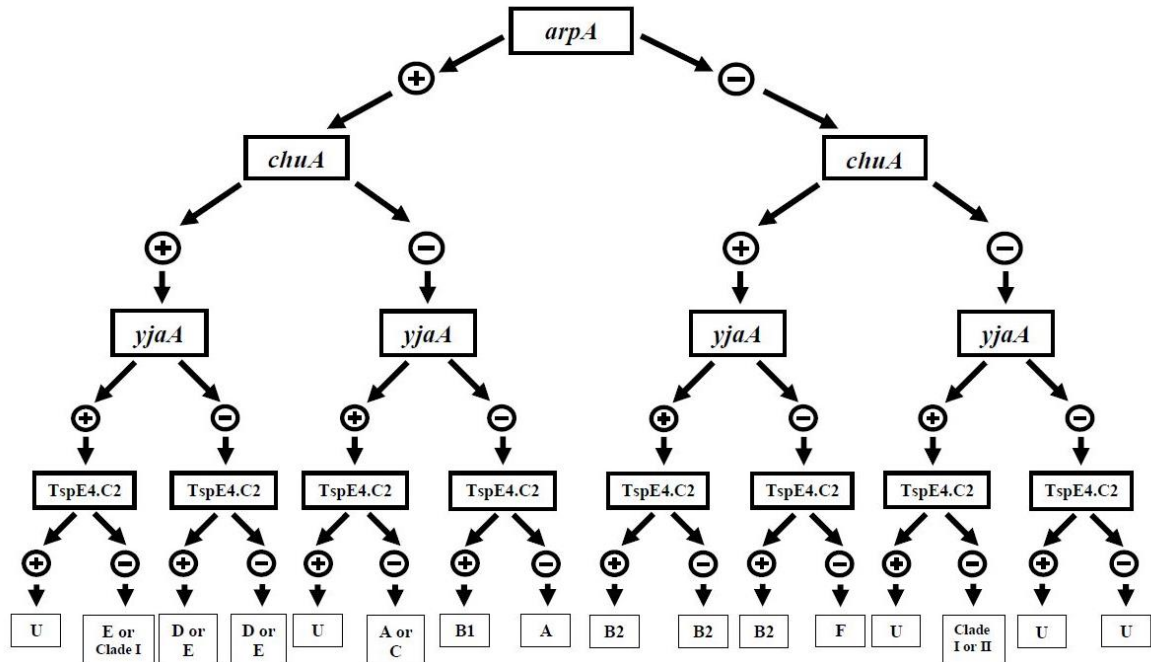
Dopiero szczepy pobrane z miejsca zakażenia, potwierdzone jako *E. coli*, można poddać dalszej charakterystyce w kierunku APEC. Poprawne różnicowanie szczepów patogennych i odróżnienie ich od komensalnych jest istotne z punktu widzenia hodowcy i ponoszonych przez niego kosztów leczenia, a także z uwagi na ocenę ryzyka rozprzestrzeniania się patogenu w stadzie. Ponieważ nie istnieje jednolity schemat diagnostyczny, w ocenie patogenności szczepów wykorzystywane są różne techniki, m.in. serotypowanie, analiza filogenetyczna, czy ocena występowania genów wirulencji (Fratamico i wsp., 2016).

Serotypowanie

Tradycyjna metoda serotypowania polegająca na aglutynacji antygeny O z przeciwciałami jest stosunkowo prosta do przeprowadzenia, jednak czasochłonna oraz podatna na wiele błędów, dlatego obecnie wypierana jest przez serotypowanie molekularne. Metodyka ta oparta jest o reakcję PCR i analizę klastra genów O-ACG, a w szczególności genów *wzx*, *wzy* oraz *wzm* i *wzt*, które kodują odpowiednio flipazę, polimerazę i transportery ABC (*ang.* ATP-binding cassette transporter) w operonie biosyntezy antygeny O oraz o gen *fliC*, kodujący białko strukturalne rzęsek. Grupa Iguchiego i wsp., bazując na zakonserwowanych sekwencjach genów *wzx*, *wzy* i *wzm-wzt*, opracowała 162 pary starterów do identyfikacji i charakterystyki serotypów *E. coli*. Startery pogrupowano w celu zaprojektowania 20 reakcji PCR typu multipleks, umożliwiając szybką i taną metodę serotypowania molekularnego (Iguchi i wsp., 2015, Fratamico i wsp., 2016).

Analiza filogenetyczna

Analiza filogenetyczna jest cennym narzędziem, mogącym stanowić wsparcie w klasyfikacji szczepów *E. coli* jako patogenne lub komensalne. Nie determinuje jednak jednoznacznie zjadliwości badanego izolatu, dlatego w celu potwierdzenia wyników należy uwzględnić zastosowanie równolegle innej, uzupełniającej techniki diagnostycznej. Z uwagi na duże zróżnicowanie struktury genetycznej szczepów *E. coli* skonstruowano prostą metodę typowania opartą o reakcję PCR. W 2000 r. Clermont i wsp. opracowali, a następnie w 2012 r. rozwinęli metodę, w której zaprojektowali pary starterów do markerów genetycznych dla danych grup filogenetycznych. Na Rysunku 7. przedstawiono schemat przyporządkowania szczepów do grup na podstawie wyników reakcji PCR typu tetrapleks (Clermont i wsp., 2013).



Rysunek 7. Schemat typowania filogenetycznego
[Clermont i wsp., 2013]

MLST

Technika MLST opiera się na analizie porównawczej sekwencji 5 – 10 genów metabolizmu podstawowego, zazwyczaj o długości do 500 pz, które uważa się za reprezentatywne dla całego genomu. Technika ta jest czuła i powtarzalna między laboratoriami oraz zapewnia większą siłę dyskryminującą niż analiza filogenetyczna. Typy sekwencyjne (ST) umieszczane są w publicznych repozytoriach do celów porównawczych. Przy niewątpliwych zaletach, do wad tej metody zaliczyć można wysokie koszty i czasochłonność, dlatego nie jest ona stosowana w standardowym postępowaniu diagnostycznym (Brzozowski i wsp., 2017, Sarowska i wsp., 2019).

Analiza VAGs

Dzięki mnogości poznanych genów wirulencji (VAG – Virulence Associated Genes), na bieżąco projektowane są kolejne testy oparte o reakcję PCR, które mają służyć szybkiej, efektywnej i stosunkowo taniej klasyfikacji szczepów jako APEC. Testowane są różne kombinacje genów przedstawionych w Tabeli 1., charakteryzujące szczepy APEC i różnicujące je od szczepów AFEC (*ang.* Avian Fecal *Escherichia coli*).

Pomimo tego, że literatura wskazuje na wiele czynników chorobotwórczości, nie została opracowana powszechna metoda określająca, które czynniki mają bezpośredni wpływ

na patogenność, jak również nie określono minimalnej liczby takich czynników, które mogłyby być dobrym predyktorem patogenności dla całego patotypu APEC. W literaturze dostępnych jest wiele prac, które wskazują na obecność pewnych wybranych czynników wirulencji w szczepach patogennych, jednak nie wybrano jednej uniwersalnej kombinacji, która pozwoliłaby w jednoznaczny sposób zdefiniować szczep jako wirulentny. Zazwyczaj wybierane są geny z różnych grup czynników zjadliwości (adhezyny, toksyny, mechanizmy pozyskiwania żelaza itd.), a odpowiednia liczba takich genów decyduje o klasyfikacji szczepu jako APEC. Najczęściej weryfikowane są geny związane z mechanizmami pozyskiwania żelaza oraz geny z plazmidu ColV (Johnson i wsp., 2008, Schouler i wsp., 2012, Dissanayake i wsp., 2014, De Carli i wsp., 2015, Paixão i wsp., 2016, Silveira i wsp., 2016, LeStrange i wsp., 2017, Mohamed i wsp., 2018, Subedi i wsp., 2018, Azam i wsp., 2019).

Analizy in silico

Wsparciem tradycyjnych metod diagnostycznych mogą być analizy *in silico* wykonywane dzięki uzyskaniu sekwencji całych genomów (WGS) w wyniku sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Posiadając dostęp do informacji o sekwencjach genomów, można przeprowadzić analizy serotypowania, filogenetyczne, MLST, antybiotykooporności, czy występowania określonych genów wirulencji, np. korzystając z zasobów strony Center for Genomic Epidemiology Duńskiego Uniwersytetu Technicznego DTU (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>; dostęp: 03.2020). Coraz większa liczba genomów APEC w publicznych repozytoriach daje możliwości przeprowadzania analiz porównawczych i określenia czynników wirulencji szczepów. W bazie danych NCBI dostępnych jest 13 złożeń genomów oznaczonych jako APEC oraz 1397 BioSamples zgrupowanych w 63 projektach zawierających dane z sekwencjonowań WGS (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=apec>, dostęp: 03.2021).

Dostępne są doniesienia o wykorzystaniu WGS do analizy różnorodności genetycznej wśród szczepów APEC oraz wyborze determinant wirulencji w szczepach ExPEC i IPEC (Cordoni i wsp., 2016, Ronco i wsp., 2017, Lindstedt i wsp., 2018). Jednak, mimo iż cena sekwencjonowania (NGS) genomu na całym świecie maleje, to koszty tej metody wraz z analizą bioinformatyczną są dosyć wysokie w porównaniu do technik tradycyjnych, i dlatego metoda ta nie jest powszechnie stosowana w diagnostyce APEC.

1.3.2. Profilaktyka

Zanieczyszczenie fekalne jaj lęgowych w wylęgarni jest najbardziej powszechnym źródłem zakażeń *E. coli*, dlatego działania profilaktyczne zacierają w pierwszej kolejności do ich zabezpieczenia. Jaja powinny być czyste, a te popękane lub zanieczyszczone odchodami eliminowane. Następnie, w ciągu dwóch godzin po lęgu przeprowadzana jest fumigacja. Zaleca się również wietrzenie inkubatorów oraz posiadanie jak najmniej licznych stad zarodowych na danej powierzchni (Barnes i wsp., 2008, Lutful Kabir, 2010, Osman i wsp., 2018).

Zapewnienie właściwych warunków środowiskowych w kurniku stanowi fundamentalny czynnik w przeciwdziałaniu kolibakteriozie. Dobra jakość powietrza (zapewniona przez odpowiednią wentylację) oraz ściółki minimalizują ryzyko wystąpienia choroby odpowiednio poprzez mniejszą ekspozycję na związki amoniaku, toksyczne dla dróg oddechowych ptaków oraz poprzez brak adhezji bakterii do pyłów (Barnes i wsp., 2008, <https://www.mojekurczaki.pl/kolibakterioza>, dostęp: 03.2020).

Dodatkowo, w profilaktyce kolibakteriozy ważna jest ochrona ptaków przed innymi chorobami, które predysponują do rozwoju infekcji, jak np. utrzymywanie stad wolnych od mykoplazmy i chorób wirusowych, takich jak choroba Gumboro i choroba Mareka, którym można zapobiec poprzez szczepienia (Lutful Kabir, 2010). Właściwe odżywianie i suplementacja ptaków jest kolejnym elementem profilaktyki. Szczególnie istotna jest dieta wysokobiałkowa, z zawartością selenu oraz witamin A i E (Barnes i wsp., 2008, Filho i wsp., 2015).

Z uwagi na dużą różnorodność szczepów należących do patotypu APEC, możliwości przygotowania szczepionek zabezpieczających przed kolibakteriozą są ograniczone i nie są one w powszechnym użytku. Jednym z nielicznych produktów dostępnych w Europie, przeznaczonym dla brojlerów jest Noblis[®] *E. coli* inac, zawierający antygeny F11 (*ang.* fimbrial antigen PapA – antygen fimbrialny PapA) oraz FT (*ang.* flagellar toxin antigen - antygen rzęskowy) wywołujący uodpornienie bierne. Produkowane są też inaktywowane szczepionki przeciwko szczepom o serotypach O2:K1 i O78:K80, jednak zapewniają one ochronę tylko przed zakażeniem szczepami o homologicznych serotypach. Istnieją również doniesienia o próbach stosowania żywych i rekombinowanych szczepionek, przygotowywanych m.in. ze zmutowanego komensalnego szczepu *E. coli* J5, ale, jak do tej pory, nie weszły one do użytku komercyjnego (Barnes i wsp., 2008, Ahmed i wsp., 2015,

Filho i wsp., 2015, https://www.msd-animal-health.co.in/nobilis_e.coli_inac/020_product_details.aspx; dostęp: 03.2020).

1.3.3. Leczenie

W związku z powszechną antybiotykoopornością szczepów APEC, przed wdrożeniem terapii istotna jest izolacja bakterii chorobotwórczych, diagnostyka oraz określenie wrażliwości danego szczepu na antybiotyki. Leki wdrażane są na podstawie antybiogramu oraz podawane w optymalnej dawce; zbyt małe stężenie terapeutycznego powoduje dalsze uodparnianie się szczepów. Korzystne jest równoległe podawanie prebiotyków i probiotyków oraz olejków eterycznych i suplementacja witaminami. W przyszłości, możliwe będzie powszechne stosowanie fagoterapii, jednak do dnia dzisiejszego, na terenie Unii Europejskiej produkty fagowe nie są dopuszczone do powszechnego stosowania (Barnes i wsp., 2008, <https://www.mojekurczaki.pl/kolibakterioza>, dostęp: 03.2020). Poza Unią Europejską (m.in. w Indiach) przeciwko kolibakteriozie stosowany jest preparat BAFACOL[®], a uzyskiwane efekty są obiecujące (niepublikowane dane, Proteon Pharmaceuticals S.A.).

W krajach UE od 2006 roku zakazane jest stosowanie antybiotyków w profilaktyce lub jako stymulatorów wzrostu, jednak w krajach rozwijających się, np. w Egipcie, nadal jest to powszechna praktyka. W ciągłym użyciu są: ampicylina, tetracyklina, kwas nalidyksowy, chloramfenikol, streptomycyna, gentamycyna, kanamycyna, trimetoprym, czy cyprofloksacyna (Awad i wsp., 2016, Osman i wsp., 2018). W innych krajach, takich jak Nepal, nadużywane są amikacyna, nitrofurantoina, cyprofloksacyna, lewofloksacyna, gentamycyna, ampicylina, kotrimoksazol i kolistyna (Subedi i wsp., 2018). Z uwagi na powszechność występowania szczepów wielolekoopornych (MDR) w tych regionach, trudno jest myśleć o uzyskaniu pożądanego efektu terapeutycznego.

Kolibakterioza stanowi istotne zagadnienie epidemiologiczne oraz ekonomiczne w chowie i hodowli drobiu. Powszechnym problemem dotyczącym szczepów *E. coli* wywołujących tę chorobę – APEC – jest brak jednolitego systemu ich identyfikacji, wynikający z przynajmniej kilku czynników. Pałeczka okrężnicy występuje powszechnie w środowisku zwierząt, więc szczepy komensalne mogą być rezerwuarem czynników patogenności, nie wywołując efektu chorobotwórczego. Dodatkowo, trudno jest wyizolować z narządów chorych ptaków jedynie szczepy zjadliwe. Szczepy *E. coli* charakteryzuje ogromna różnorodność na każdym badanym poziomie: występują różnorodne serotypy, grupy filogenetyczne, typy sekwencyjne oraz kombinacje czynników wirulencji powodujących chorobę. Brak jest jednoznacznie wyznaczonych cech, które można powiązać z patogennością.

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

2. Cel pracy

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

Cel ten zrealizowano poprzez następujące cele cząstkowe:

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

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

3.1.1. Szczepy bakteryjne

Szczepy bakteryjne *E. coli* z kolekcji Proteon Pharmaceuticals S.A. wykorzystywane w badaniach pochodziły od drobiu (brojlery, kury nioski, indyki, gęsi) i izolowane były zarówno od zwierząt z kolibakteriozą, jak również od zdrowych osobników w celu uzyskania szczepów komensalnych (Tabela 2.). Większość izolatów pozyskano dzięki współpracy z Vet-Lab Brudzew. Bakterie izolowano od martwych ptaków. Dodatkowo, w badaniach wykorzystywano wzorcowy szczep *E. coli* K-12 i szczep *E. coli* O157:H7 (zakupione w PCM).

Tabela 2. Wykaz szczepów wykorzystywanych do badań

Nazwa szczepu	Źródło	Objawy chorobowe	Data izolacji
<i>Escherichia coli</i> _001PP2015	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	19.05.2015
<i>Escherichia coli</i> _002PP2015	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	19.05.2015
<i>Escherichia coli</i> _003PP2015	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	19.05.2015
<i>Escherichia coli</i> _004PP2015	Indyki; Polska	TAK	05.06.2015
<i>Escherichia coli</i> _005PP2015	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	04.11.2015
<i>Escherichia coli</i> _006PP2015	Indyki; Polska	TAK	10.11.2015
<i>Escherichia coli</i> _007PP2015	Indyki; Polska	TAK	17.11.2015
<i>Escherichia coli</i> _008PP2015	Indyki; Polska	TAK	17.11.2015
<i>Escherichia coli</i> _009PP2015	Indyki; Polska	TAK	17.11.2015
<i>Escherichia coli</i> _010PP2015	Indyki; Polska	TAK	17.11.2015
<i>Escherichia coli</i> _011PP2015	Indyki; Polska	TAK	17.11.2015
<i>Escherichia coli</i> _012PP2015	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	17.11.2015
<i>Escherichia coli</i> _013PP2015	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	17.11.2015
<i>Escherichia coli</i> _014PP2015	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	24.11.2015

Nazwa szczepu	Źródło	Objawy chorobowe	Data izolacji
<i>Escherichia coli_015PP2015</i>	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	01.12.2015
<i>Escherichia coli_016PP2015</i>	Stado rodzicielskie brojlera kurzego; Polska	TAK	10.12.2015
<i>Escherichia coli_017PP2015</i>	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	10.12.2015
<i>Escherichia coli_018PP2015</i>	Kury nioski towarowe; Polska	TAK	14.12.2015
<i>Escherichia coli_019PP2015</i>	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	22.12.2015
<i>Escherichia coli_020PP2016</i>	Stado rodzicielskie brojlera kurzego; Polska	TAK	04.01.2016
<i>Escherichia coli_021PP2016</i>	Kury nioski; Polska	TAK	04.01.2016
<i>Escherichia coli_022PP2016</i>	Kury nioski; narządy wewnętrzne; Polska	TAK	04.01.2016
<i>Escherichia coli_023PP2016</i>	Indyki; Polska	TAK	11.01.2016
<i>Escherichia coli_024PP2016</i>	Kury nioski konsumpcyjne; Polska	TAK	02.02.2016
<i>Escherichia coli_025PP2016</i>	Kury nioski konsumpcyjne; Polska	TAK	02.02.2016
<i>Escherichia coli_027PP2016</i>	Indyki; Polska	TAK	10.02.2016
<i>Escherichia coli_028PP2016</i>	Kury nioski; Polska	TAK	17.02.2016
<i>Escherichia coli_029PP2016</i>	Indyki; Polska	TAK	25.03.2016
<i>Escherichia coli_030PP2016</i>	Indyki; Polska	TAK	18.02.2016
<i>Escherichia coli_031PP2016</i>	Kury, stado reprodukcyjne; Polska	TAK	25.02.2016
<i>Escherichia coli_032PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	02.03.2016
<i>Escherichia coli_033PP2016</i>	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	02.03.2016
<i>Escherichia coli_034PP2016</i>	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	02.03.2016
<i>Escherichia coli_035PP2016</i>	Brojlery; Ukraina	TAK	15.03.2016
<i>Escherichia coli_036PP2016</i>	Indyki; Ukraina	TAK	15.03.2016
<i>Escherichia coli_037PP2016</i>	Brojlery; Ukraina	TAK	15.03.2016
<i>Escherichia coli_038PP2016</i>	Brojlery; Ukraina	TAK	15.03.2016
<i>Escherichia coli_039PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	15.03.2016

Nazwa szczepu	Źródło	Objawy chorobowe	Data izolacji
<i>Escherichia coli_040PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	15.03.2016
<i>Escherichia coli_041PP2016</i>	Indyki; Ukraina	TAK	25.03.2016
<i>Escherichia coli_042PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	15.03.2016
<i>Escherichia coli_043PP2016</i>	Kury nioski towarowe; Polska	TAK	16.03.2016
<i>Escherichia coli_044PP2016</i>	Indyki; Polska	TAK	16.03.2016
<i>Escherichia coli_045PP2016</i>	Indyki; Polska	TAK	16.03.2016
<i>Escherichia coli_046PP2016</i>	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	16.03.2016
<i>Escherichia coli_047PP2016</i>	Kury nioski; Polska	TAK	24.03.2016
<i>Escherichia coli_048PP2016</i>	Kury nioski; Polska	TAK	24.03.2016
<i>Escherichia coli_049PP2016</i>	Kury nioski; Polska	TAK	30.03.2016
<i>Escherichia coli_050PP2016</i>	Kury nioski; Polska	TAK	30.03.2016
<i>Escherichia coli_051PP2016</i>	Kury nioski; Polska	TAK	05.04.2016
<i>Escherichia coli_052PP2016</i>	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	08.04.2016
<i>Escherichia coli_053PP2016</i>	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	08.04.2016
<i>Escherichia coli_054PP2016</i>	Indyki; Polska	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_056PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_057PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_058PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_059PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_060PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_061PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_062PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_063PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_064PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016

Nazwa szczepu	Źródło	Objawy chorobowe	Data izolacji
<i>Escherichia coli_065PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_066PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_067PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_068PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_069PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_070PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_071PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_072PP2016</i>	Kury nioski; Ukraina	TAK	21.04.2016
<i>Escherichia coli_073PP2016</i>	Indyki; Polska	TAK	09.05.2016
<i>Escherichia coli_074PP2016</i>	Indyki; Polska	TAK	24.05.2016
<i>Escherichia coli_075PP2016</i>	Kury nioski; Polska	TAK	24.05.2016
<i>Escherichia coli_076PP2016</i>	Indyki; Polska	TAK	24.05.2016
<i>Escherichia coli_077PP2016</i>	Indyki; Polska.	TAK	24.05.2016
<i>Escherichia coli_078PP2016</i>	Kury nioski; Polska	TAK	30.05.2016
<i>Escherichia coli_079PP2016</i>	Kury nioski; Polska	TAK	30.05.2016
<i>Escherichia coli_080PP2016</i>	Indyki; Polska	TAK	13.06.2016
<i>Escherichia coli_081PP2016</i>	Indyki; Polska	TAK	09.07.2016
<i>Escherichia coli_082PP2016</i>	Indyki; Polska	TAK	16.06.2016
<i>Escherichia coli_083PP2016</i>	Gęsi; Polska	TAK	22.06.2016
<i>Escherichia coli_084PP2016</i>	Indyki; Polska	TAK	02.08.2016
<i>Escherichia coli_085PP2016</i>	Kury nioski; Polska	TAK	04.08.2016
<i>Escherichia coli_086PP2016</i>	Kury nioski; Polska	TAK	04.08.2016
<i>Escherichia coli_087PP2016</i>	Kury nioski; Polska	TAK	28.09.2016
<i>Escherichia coli_088PP2016</i>	Kury nioski; Polska	TAK	28.09.2016

Nazwa szczepu	Źródło	Objawy chorobowe	Data izolacji
<i>Escherichia coli</i> _089PP2016	Indyki; Polska	TAK	29.09.2016
<i>Escherichia coli</i> β_001PP2016	Kury nioski; Polska	TAK	17.02.2016
<i>Escherichia coli</i> β_002PP2016	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	28.09.2016
<i>Escherichia coli</i> _105PP2016	Stado kur zielononózek; Polska	TAK	02.11.2016
<i>Escherichia coli</i> _106PP2016	Indyki; Polska	NIE	17.11.2016
<i>Escherichia coli</i> _107PP2016	Indyki; Polska	NIE	17.11.2016
<i>Escherichia coli</i> _108PP2016	Indyki; Polska	NIE	17.11.2016
<i>Escherichia coli</i> _109PP2016	Indyki; Polska	NIE	17.11.2016
<i>Escherichia coli</i> _110PP2016	Indyki; Polska	NIE	17.11.2016
<i>Escherichia coli</i> _111PP2016	Indyki; Polska	NIE	17.11.2016
<i>Escherichia coli</i> _113PP2016	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	17.11.2016
<i>Escherichia coli</i> _114PP2016	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	24.11.2016
<i>Escherichia coli</i> _120PP2016	Brojlery; Polska	NIE	12.12.2016
<i>Escherichia coli</i> _121PP2016	Brojlery; Polska	NIE	12.12.2016
<i>Escherichia coli</i> _123PP2016	Brojlery; Polska	NIE	12.12.2016
<i>Escherichia coli</i> _124PP2016	Brojlery; Polska	NIE	12.12.2016
<i>Escherichia coli</i> _126PP2016	Brojlery; Polska	NIE	12.12.2016
<i>Escherichia coli</i> _127PP2016	Brojlery; Polska	NIE	12.12.2016
<i>Escherichia coli</i> _130PP2017	Kury nioski; Polska	TAK	02.01.2017
<i>Escherichia coli</i> _131PP2017	Kury nioski; Polska	TAK	17.01.2017
<i>Escherichia coli</i> _134PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _135PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _136PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _137PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017

Nazwa szczepu	Źródło	Objawy chorobowe	Data izolacji
<i>Escherichia coli</i> _138PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _139PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _140PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _141PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _142PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _143PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _144PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _145PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _146PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _147PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _148PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _149PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _150PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _151PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _152PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _153PP2017	Kury nioski; Polska	NIE	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _154PP2017	Indyki; Polska	TAK	03.03.2017
<i>Escherichia coli</i> _155PP2017	Kury nioski; Polska	TAK	03.03.2017
<i>Escherichia coli</i> _156PP2017	Indyki; Polska	TAK	03.03.2017
<i>Escherichia coli</i> _157PP2017	Stado rodzicielskie brojlerów kurzych; Polska	TAK	09.03.2017
<i>Escherichia coli</i> _158PP2017	Kury nioski konsumpcyjne; Polska	TAK	15.03.2017
<i>Escherichia coli</i> _159PP2017	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	15.03.2017
<i>Escherichia coli</i> _160PP2017	Stado kur reprodukcyjnych; Polska	TAK	15.03.2017

3.1.2. Podłoża mikrobiologiczne i odczynniki do hodowli szczepów *E. coli*

- Podłoże LB – BioMaxima, skład na 1L:
Trypton (Pankreatynowy hydrolizat kazeiny) – 10,00 g
Ekstrakt drożdżowy – 5,00 g
Chlorek sodu – 5,00 g
- Agar – BioMaxima

W prowadzonych badaniach stosowano podłoża płynne (20g ± 1% podłoża na 1000 ml wody), jak i zestalone, uzyskiwane przez 2% dodatek agaru. Podłoża sterylizowano w 121°C w czasie 20 minut.

3.1.3. Zestaw do izolacji DNA

- Zestaw do izolacji genomowego DNA z różnych typów próbek (m.in. bakterii Gram-ujemnych): Wizard SV Genomic DNA Purification System firmy Promega.

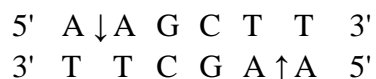
3.1.4. Enzymy

3.1.4.1. Enzymy wykorzystywane do izolacji (spoza zestawu komercyjnego)

- Proteinaza K firmy Sigma Aldrich – roztwór ≥ 10 mg/ml, ≥ 800 U/ml

3.1.4.2. Enzymy restrykcyjne

- HindIII – enzym typu FastDigest (ThermoFisher Scientific) z następującą rozpoznawalną sekwencją nukleotydową i miejscem cięcia:



3.1.4.3. Enzymy do ligacji

- Ligaza DNA T4 (5 U/ μ l) – ThermoFisher Scientific

3.1.4.4. Enzymy i mieszaniny wykorzystywane w reakcjach PCR

- Polimeraza DNA Taq (0,04 U/ μ l) wchodząca w skład 2xPCR TaqNova-RED Master Mix (2x stężona, gotowa do użycia mieszanina do reakcji PCR, zawierająca: bufor do reakcji PCR, chlorek magnezu, dNTPs oraz rekombinowaną polimerazę DNA Taq) – DNA-Gdańsk
- Polimeraza DNA Hypernova (2 U/ μ l) – DNA-Gdańsk

3.1.5. Oligonukleotydy

Wykaz oligonukleotydów używanych w reakcjach amplifikacji przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Oligonukleotydy stosowane w badaniach

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja 5'→3'	Tm [°C]	Zastosowanie	Odniesienie literaturowe
AD-H	AGCTGTTCGACGTTGG	n/d	Przygotowanie adaptora do ligacji	Krawczyk i wsp., 2008
AD-T	CTCACTCTCACCAACAACGTCGAC	n/d		
AD-P	CTCACTCTCAACAACGTCGACAGCTT	n/d		
ChuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	53,5	Analiza filogenetyczna szczepów <i>E. coli</i>	Clermont i wsp., 2013
ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	53,8		
YjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTTCAGGAG	51,8		
YjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG	51,8		
TspE4C2.1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC	49,7		
TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	55,9		
AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	53,8		
ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA	53,8		
ArpAgpE.f	GATTCATCTTGTCAAATATGCC	52,3		
ArpAgpE.r	GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGA G	50,6		
trpAgpC.1	AGTTTTATGCCAGTGCAG	51,8		
trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTACGCCC	59,4		
trpBA.f	CGGCGATAAAGACATCTTAC	52,4		
trpBA.r	GCAACGCGCCTGGCGGAAG	62,0		
iroC-F	ACTATGTGCGCCGTGGTTAT	51,3	Podział szczepów <i>E. coli</i> na patogenne i niepatogenne	Zaprojektowane w ramach projektu
iroC-R	GTGAACGGGTGTTCGATCAGT	53,8		
hlyF-F	GAGCACCTACTCCACAAGCG	55,9		
hlyF-A-R	TCGGGCAACCAACAAAGGTA	51,8		
O78-A-F	CACAACCTCTCGGCAATATATCATC A	57,0		
O78-A-R	TATGGGTTTGGTGGTACGTAGT	57,0		

3.1.6. Bufory i roztwory

- Sól fizjologiczna – 0,85% NaCl
- Bufor PBS, pH = 7
- 10 mM bufor Tris-HCl, pH = 8,5; Molecular Biology Grade (EurX)
- Bufor do trawienia typu FastDigest 10x (Thermo Fisher Scientific)
- Bufor do ligacji DNA T4 10x (Thermo Fisher Scientific)

- Bufor Shark dla polimerazy Hypernova (DNA-Gdańsk)

3.1.7. Mieszanki reakcyjne

3.1.7.1. Trawienie enzymami restrykcyjnymi

DNA	1 µg
Bufor typu FastDigest 10x	2,5 µl
Enzym HindIII typu FastDigest	1 µl
H ₂ O	do końcowej objętości 25 µl

3.1.7.2. Ligacja DNA

Mieszanka po trawieniu	25 µl
Bufor do ligacji 10x	3,3 µl
Adaptor (oligonukleotyd ligowany AD-H i oligonukleotyd pomocniczy AD-T w wodzie)	4 µl
Ligaza T4 (5U/µl)	2 U (0,4 µl)

3.1.7.3. MP PCR

Bufor Shark 10x	2,5 µl
2,5 mM dNTPs mix	2 µl
50 mM MgCl ₂	1 µl
100 µM starter AD-P	0,25 µl
Polimeraza DNA Hypernova	1 U
Produkt ligacji	4 µl
Woda PCR-grade	do objętości końcowej 25 µl

3.1.7.4. PCR typu multipleks

2xPCR TaqNova-RED Master Mix	25 µl
10 µM startery F i R	po 1 µl - w ilości odpowiadającej ilości genów amplifikowanych w reakcji typu multipleks
DNA	1 ng
Woda PCR-grade	do objętości końcowej 50 µl

3.1.8. Odczynniki do przeprowadzenia elektroforezy poziomej

- Agarozą (EurX)
- Bufor TAE 50x stężony: 2M Tris, 1 M CH₃COOH, 50 mM EDTA, pH = 8,0
- Barwnik Simply Safe (EurX)
- Żele agarozowe: agarozą (1, 1,5 lub 2,5%), bufor TAE 1x stężony, barwnik Simply Safe: 5 µl/100 ml żelu
- Barwnik obciążający DNA: Loading Buffer 6x (Thermo Fisher Scientific)
- Standardy do określania wielkości DNA:
 - GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder – mieszanina fragmentów DNA o wielkościach: 75, 200, 300, 400, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 7000, 10000, 20000
 - GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder – mieszanina fragmentów DNA o wielkościach: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000

3.1.9. Oprogramowania komputerowe i algorytmy typu *open source*

- BioNumerics, wersja 6.01, Applied Maths, Belgium
- QUASt (Gurevich i wsp., 2013)
- TrimGalore (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>)
- SPAdes 3.7.1 i 3.8.0 (Nurk i wsp., 2013)
- CONTIGuator (Galardini i wsp., 2011)
- FA_TOOL (Marciniak i Strapagiel, 2016)
- myRAST, wersja 36 (Aziz RK i wsp., 2008)
- ResFinder, wersja 2.0 (Zankari i wsp., 2012)
- SerotypeFinder, wersja 1.1 (Joensen i wsp., 2015)
- UniProt (UniProt Consortium, 2019)
- blastp (API BLAST; wersja 2.2.31+)
- blastp-input.py (<https://github.com/BiobankLab/DIFFIND>; skrypt napisany przez mgra Błażeja Marciniaka, Biobank, UŁ)
- Primer-BLAST (Ye i wsp., 2012)
- RStudio, wersja 1.2.5033
- ROC_AUC.py (skrypt napisany przez inż. Bogumiła Zimonia, Proteon Pharmaceuticals S.A.)

3.2. Metody

3.2.1. Hodowle bakteryjne

Hodowle *E. coli* prowadzono w temperaturze 37°C przez 24 godziny w płynnym podłożu LB na wytrząsarce o ruchu posuwisto-zwrotnym (140 rpm) lub w postaci posiewów redukcyjnych na zestalonym podłożu LB z dodatkiem agaru.

3.2.2. Przygotowanie szczepów *E. coli* do zakażenia w modelu *in ovo*

Szczepy *E. coli* przygotowywane do zakażenia w modelu *in ovo* namnażano w płynnym podłożu LB do osiągnięcia gęstości optycznej $OD_{600} \sim 1,0$, jako inokulum stosując biomasę z posiewów redukcyjnych. Następnie hodowle bakteryjne wirowano (15 min, 4°C, 4754 RCF), osad zawieszano w 0,85% NaCl do osiągnięcia miana bakterii 5×10^5 CFU/ml. Tak przygotowane zawiesiny używano do zakażania zarodków kurzych w modelu *in ovo* (opisanego w punkcie 3.2.12. Testy *in ovo*).

3.2.3. Izolacja genomowego DNA

Genomowy DNA z bakterii izolowano przy użyciu zestawu komercyjnego (punkt 3.1.3. Zestaw do izolacji DNA) wg zmodyfikowanej w Proteon Pharmaceuticals metodyki. Bakterie wysiane na podłoże stałe pobierano z płytki (jedno oczko ezy) i zawieszano w 200 µl buforu PBS do uzyskania jednolitej zawiesiny. Do probówki dodawano: 200 µl Nuclei Lysis Solution, 50 µl 0.5 M EDTA o pH 8,0, 2 µl Proteinazy K i 5 µl Rnazy A (4 mg/ml), a następnie delikatnie mieszano przez odwracanie. Inkubowano przez 15 min w 55°C, dodawano 250 µl Wizard SV Lysis Buffer, mieszano i wirowano (5 min, 15 800 RCF). Lizat przenoszono na złożę kolumny, wirowano (3 min, 15 800 RCF) i dwukrotnie oczyszczano, dodając 650 µl Column Wash Solution, wirując (1 min, 15 800 RCF) i wylewając przesącz z odbieralnika. Kolumnę wraz ze złożem zawierającym wyizolowany DNA przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf, dodawano 100 µl buforu Tris-HCl, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min i wirowano (2 min, 15 800 RCF). Uzyskany DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

3.2.4. Pomiar stężenia DNA

Pomiar stężenia DNA wykonywano na spektrofotometrze BioPhotometer® D30 (Eppendorf).

3.2.5. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

W celu przeprowadzenia reakcji PCR MP reakcje trawienia DNA enzymem restrykcyjnym HindIII prowadzono w zalecanym przez producenta buforze, w temperaturze 37°C przez 45 min, w objętości końcowej 25 µl (punkt 3.1.7.1. Trawienie enzymami restrykcyjnymi).

3.2.6. Ligacja DNA

Reakcje ligacji DNA w celu przeprowadzenia reakcji PCR MP prowadzono z udziałem ligazy DNA T4, w zalecanym przez producenta buforze, w temperaturze 16°C przez 1 godzinę, w objętości końcowej 32,7 µl (punkt 3.1.7.2. Ligacja DNA).

3.2.7. Amplifikacja DNA w reakcjach PCR

3.2.7.1. PCR MP

Do różnicowania szczepów *E. coli* wykorzystano jedną z metod *fingerprinting* („genomowy odcisk palca”) – PCR MP (PCR Melting Profiles) wg Krawczyk i wsp., (2008). Technika ta opiera się na różnicach w temperaturach topnienia fragmentów powstałych po trawieniu restrykcyjnym, zostawiającym wolne 5'-końce, i zastosowaniu obniżonej temperatury denaturacji, uzyskując w ten sposób ograniczoną liczbę amplifikowanych fragmentów. Genomy różnych szczepów różnią się zawartością procentową par GC i mają różną stabilność termiczną, dlatego uzyskane profile prążkowe są charakterystyczne dla danego szczepu i zastosowanego enzymu restrykcyjnego.

Przed przystąpieniem do amplifikacji genomów metodą PCR MP izolowano DNA (punkt 3.2.3. Izolacja genomowego DNA), wykonywano trawienie restrykcyjne enzymem HindIII (punkt 3.2.5. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi) oraz przeprowadzano reakcję ligacji krótkiego adaptora o sekwencji komplementarnej do wiszących 5'-końców (punkt 3.2.6. Ligacja DNA). Następnie przygotowywano mieszaninę reakcyjną zgodnie z opisem w punkcie 3.1.7.3. MP PCR. Reakcje prowadzono w termocyklerze Mastercycler nexus gradient (Eppendorf) w warunkach przedstawionych w Tabeli 4.

Tabela 4. Warunki reakcji PCR MP

Temperatura [°C]	Czas [s]	Etap	Ilość cykli
72	420	Oddysocjowanie niezligowanych fragmentów (pre-PCR)	1

Temperatura [°C]	Czas [s]	Etap	Ilość cykli
86	90	Denaturacja wstępna	1
86	60	Denaturacja	24
72	120	Przyłączanie startera	
72	135	Wydłużanie	
72	300	Wydłużanie końcowe	1
4	∞	Chłodzenie	1

3.2.7.2. PCR typu multipleks

Reakcje amplifikacji DNA typu multipleks wykonywano w celu przeprowadzenia analizy filogenetycznej badanych szczepów oraz w celu optymalizacji i weryfikacji zaprojektowanej metody diagnostycznej do określania szczepów *E. coli* jako patogennych dla drobiu (APEC). Mieszaniny reakcyjne przygotowywano zgodnie z opisem w punkcie 3.1.7.4. PCR typu multipleks. Reakcje prowadzono w termocyklerze Mastercycler nexus gradient (Eppendorf) w warunkach przedstawionych w Tabelach 5 i 6.

Tabela 5. Warunki reakcji PCR typu multipleks – analiza filogenetyczna

Temperatura [°C]	Czas [s]	Etap	Ilość cykli
Kwadrupleks oraz grupa E			
95	300	Wstępna denaturacja	1
95	60	Denaturacja	30
55 (kwadrupleks), 53 (grupa E)	60	Przyłączanie starterów	
72	120	Wydłużanie	
72	420	Końcowe wydłużanie	
4	∞	Chłodzenie	1
Grupa C			
95	180	Wstępna denaturacja	1
95	5	Denaturacja	30
59	20	Przyłączanie starterów i wydłużanie	
72	420	Końcowe wydłużanie	
4	∞	Chłodzenie	1

Tabela 6. Warunki reakcji PCR typu multipleks – metoda diagnostyczna

Temperatura [°C]	Czas [s]	Etap	Ilość cykli
95	300	Wstępna denaturacja	1
95	60	Denaturacja	30
57	60	Przyłączanie starterów	

Temperatura [°C]	Czas [s]	Etap	Ilość cykli
72	120	Wydłużanie	
4	∞	Chłodzenie	1

3.2.8. Elektroforeza pozioma w żelu agarozowym

Elektroforeza pozioma w żelu agarozowym wykorzystywana była do rozdzielania fragmentów DNA w oparciu o różnice ich wielkości po izolacji genomowego DNA oraz amplifikacji PCR typu MP i multipleks. Rozdziały elektroforetyczne prowadzono w jednokrotnie stężonym buforze TAE przy napięciu 5 V/cm odległości między elektrodami. Dodatek barwnika Simply Safe do żelu agarozowego umożliwiał wizualizację rozdzielania cząsteczek DNA o różnych wielkościach w świetle UV (Proxima 2650, Isogen Life Science).

3.2.9. Różnicowanie szczepów w oprogramowaniu BioNumerics

Elektroforegramy z profilami prążkowymi po różnicowaniu DNA szczepów *E. coli* metodą PCR MP porównywano w oprogramowaniu BioNumerics (wersja 6.01, Pracownia Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*, IBM PAN, Łódź). Generowano dendrogramy określające pokrewieństwo epidemiologiczne szczepów w oparciu o współczynnik Dice'a i metodę klastrowania UPGMA (*ang.* Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean – metoda średnich połączeń) z tolerancją 1% dla wysokości prążków. W metodzie tej dendrogram konstruowany jest w oparciu o porównania parami. Wielokrotnie powtarza się czynności grupowania obiektów, podczas których łączy się krawędzią każde dwa obiekty, które dzieli najmniejszy dystans spośród wszystkich obliczonych. Po kolejnych powtórzeniach następują przyłączenia obiektów lub grup obiektów aż do wyczerpania danych i uzyskania drzewa (Zdziennicki i Misiewicz, 2014).

3.2.10. Sekwencjonowanie całych genomów technologią NGS

Sekwencjonowanie genomów *E. coli* zostało przeprowadzone w Pracowni Biobank Uniwersytetu Łódzkiego w ramach współpracy naukowej.

Genomy szczepów oznaczonych jako różne podczas analizy PCR MP poddano reakcji sekwencjonowania całych genomów (WGS). W tym celu przygotowano biblioteki genomowe dla każdej próbki DNA szczepu z wykorzystaniem zestawu Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, USA). Poprawność przygotowania bibliotek oceniano na podstawie wyników elektroforezy kapilarnej. W celu odpowiedniej normalizacji

bibliotek i zapewnienia odpowiedniej liczby odczytów podczas sekwencjonowania dla każdej biblioteki, oceniano molarność bibliotek z użyciem metody qPCR. Biblioteki sekwencjonowano z wykorzystaniem technologii NGS na platformie Illumina NextSeq 500 w trybie sparowanych odczytów 2 x 150 pz.

3.2.11. Analiza bioinformatyczna

3.2.11.1. Składanie genomów

Składanie *de novo* genomów *E. coli* przeprowadzono z wykorzystaniem algorytmu SPAdes oraz narzędzi do korygowania złożenia: CONTIGuator i FA_TOOL (punkt 3.1.9. Oprogramowania komputerowe i algorytmy typu *open source*). Jakość złożenia weryfikowano każdorazowo w programie QUAST. Dla każdego z genomów otrzymano zbiór kontigów, który zapisywano w formacie FASTA.

3.2.11.2. Adnotacja

Adnotację genomów przeprowadzono w systemie RAST (Rapid Annotation System Technology), stosując wersję API myRAST. W ten sposób, dla każdego szczepu, otrzymano listę sekwencji aminokwasowych w postaci pliku multi-FASTA.

3.2.11.3. Analizy genomów z wykorzystaniem narzędzi CGE

Do analizy genomów bakteryjnych *in silico*, z użyciem posiadanych złożów genomów (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>, dostęp: 06.2017 – 06.2018) wykorzystano część narzędzi dostępnych online na stronie Center for Genomic Epidemiology (CGE) Uniwersytetu DTU.

SerotypeFinder

W celu serotypowania *in silico* szczepów *E. coli* wykorzystano narzędzie SerotypeFinder 1.1 i złożenia sekwencji genomów. Wyszukiwano w ten sposób geny kodujące antygeny O i H z bazy danych NCBI. Baza danych CGE zawiera informacje o serotypach O1 – O187 (z wykluczeniem O14 i O57) w różnych wariantach genów oraz o 53 antygenach H, w ponad 100 wariantach genów. Stosowano następujące ustawienia: organizm *E. coli*, próg identyczności sekwencji: 85%, minimalne pokrycie sekwencji genu: 60%.

ResFinder

W celu określenia występowania genów antybiotykooporności w badanych szczepach *E. coli in silico* wykorzystano narzędzie ResFinder 2.0 i złożenia sekwencji genomów. Baza danych tego narzędzia jest połączeniem istniejących wcześniej baz danych dotyczących antybiotykooporności (m.in. ARDB) i jest na bieżąco uzupełniania. Stosowano następujące ustawienia: wybierano wszystkie dostępne grupy antybiotyków (antybiotyki aminoglikozydowe, antybiotyki β -laktamowe, kolistynę, fluorochinolony, fosfomycynę, kwas fusydowy, glikopeptydy, antybiotyki makrolidowe, nitromidazol, linezolid, chloramfenikol, rifampicynę, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym), próg identyczności sekwencji: 90%, minimalne pokrycie sekwencji genu: 60%.

3.2.11.4. Baza czynników wirulencji

Bazę czynników wirulencji szczepów APEC (wymienionych w Tabeli 1.) przygotowano w postaci pliku multi-FASTA z sekwencjami aminokwasowymi, aby móc ocenić ich obecność w każdym z analizowanych szczepów. Sekwencje aminokwasowe, a nie nukleotydowe wybrano z powodu ich mniejszego zróżnicowania, gdyż założeniem była ocena istotnych zmian, które mogą wpływać na funkcję białka, a nie zmian synonimicznych. Korzystano z bazy danych UniProt (<https://www.uniprot.org/>; dostęp: 01.2017 – 06.2018). Nazwy czynników oraz odpowiadające im numery dostępów dla sekwencji pobranych z UniProt przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Czynniki wirulencji szczepów APEC z bazy UniProt

Numer porządkowy	Gen kodujący czynnik wirulencji	Numer dostępu UniProt
1	<i>afaE</i>	P08180
2	<i>aufA</i>	A0A0H2Z3F5
3	<i>aufB</i>	A0A0H2Z3Z0
4	<i>aufC</i>	A0A0H2Z3Q6
5	<i>aufD</i>	A0A0H2Z3N7
6	<i>aufE</i>	A0A0H2Z4G0
7	<i>aufF</i>	A0A0H2Z3E8
8	<i>aufG</i>	A0A0H2Z3Q1
9	<i>bmaE</i>	P05818
10	<i>cfaA</i>	P25732
11	<i>cfaB</i>	P0CK93
12	<i>cfaC</i>	P25733
13	<i>cfaD</i>	P25393

Numer porządkowy	Gen kodujący czynnik wirulencji	Numer dostępu UniProt
14	<i>crl</i>	A1A7V1
15	<i>csgA</i>	P28307
16	<i>csgB</i>	P0ABK8
17	<i>csgC</i>	A1A9U1
18	<i>csgD</i>	P52106
19	<i>csgE</i>	P0AE96
20	<i>csgF</i>	P0AE99
21	<i>csgG</i>	P0AEA3
22	<i>caeH</i>	A0A0U4KUV1
23	<i>ecpA</i>	A1A7X6
24	<i>ecpB</i>	A1A7X5
25	<i>ecpC</i>	D5CVJ8
26	<i>ecpD</i>	P33128
27	<i>ecpE</i>	D5CVJ6
28	<i>ecpR</i>	A1A7X7
29	<i>fimA</i>	A0A0H2Z679
30	<i>fimB</i>	P0ADH5
31	<i>fimC</i>	P59590
32	<i>fimD</i>	P30130
33	<i>fimE</i>	P0ADH8
34	<i>fimF</i>	P08189
35	<i>fimG</i>	P08190
36	<i>fimH</i>	P08191
37	<i>fimI</i>	P39264
38	<i>fmlA</i>	A0A1Q4PP62
39	<i>fmlD</i>	Q1RBS0
40	<i>focA</i>	P0AC24
41	<i>focB</i>	P77733
42	<i>focC</i>	A0A070V0L1
43	<i>focD</i>	P46009
44	<i>focI</i>	Q1A662
45	<i>hcpA</i>	Q8X974
46	<i>hcpB</i>	C8UGX6
47	<i>hcpC</i>	A0A0K4H038
48	<i>hra</i>	B1LRF8
49	<i>htrA</i>	P0C0V1
50	<i>htrB</i>	I2WKQ7
51	<i>htrC</i>	P27375
52	<i>htrE</i>	P33129
53	<i>mat</i>	A0A153AXN8
54	<i>papA</i>	A0A4C6XGT6
55	<i>papB</i>	P04744

Numer porządkowy	Gen kodujący czynnik wirulencji	Numer dostępu UniProt
56	<i>papC</i>	P07110
57	<i>papD</i>	A0A0H2Z2C6
58	<i>papE</i>	A0A0H3MKT1
59	<i>papF</i>	A0A0H3MUA6
60	<i>papGII</i>	A0A0H2Z2C2
61	<i>papH</i>	P07111
62	<i>papI</i>	P62585
63	<i>papJ</i>	P17543
64	<i>papK</i>	P62533
65	<i>papX</i>	A0A0H2Z642
66	<i>sfa</i>	P0AAA5
67	<i>sfaA</i>	P12730
68	<i>sfaB</i>	Q1RDH2
69	<i>sfaC</i>	Q1RDH3
70	<i>sfaG</i>	P13429
71	<i>sfaH</i>	P13431
72	<i>sfaS</i>	P13430
73	<i>stgA</i>	Q8VPB9
74	<i>stgB</i>	Q693A9
75	<i>stgD</i>	I6LB51
76	<i>tsh</i>	Q47692
77	<i>yehA</i>	P33340
78	<i>yehB</i>	P33341
79	<i>yehC</i>	P33342
80	<i>yehD</i>	A0A4Q2TPX3
81	<i>yehE</i>	P33344
82	<i>yqi</i>	B7MAC2
83	<i>aataA</i>	D3H594
84	<i>ibeA</i>	A0A0H2Z644
85	<i>ibeB</i>	P77211
86	<i>ibeC</i>	A0A0H3MNT5
87	<i>ibeR</i>	A0A0H2Z696
88	<i>tia</i>	D7ZCU8
89	<i>ycho</i>	P39165
90	<i>chuA</i>	A0A376LDL4
91	<i>chuS</i>	A0A5D8M9N4
92	<i>chuT</i>	Q1R5A2
93	<i>chuU</i>	A0A3S4M5Z1
94	<i>chuW</i>	A0A384LP51
95	<i>chuX</i>	D3H0V2
96	<i>chuY</i>	H4JEB3
97	<i>eitA</i>	A0A4V0GUC9

Numer porządkowy	Gen kodujący czynnik wirulencji	Numer dostępu UniProt
98	<i>eitB</i>	A0A0H2XL36
99	<i>eitC</i>	Q5DQI9
100	<i>eitD</i>	A0A4V0GT26
101	<i>feoA</i>	P0AEL4
102	<i>feoB</i>	Q8FCT7
103	<i>feoC</i>	P0C602
104	<i>fepA</i>	P05825
105	<i>fepB</i>	P0AEL7
106	<i>fepC</i>	A0A0H2Z2Q4
107	<i>fepD</i>	P23876
108	<i>fepE</i>	P26266
109	<i>fyuA</i>	A0A376J4K6
110	<i>ireA</i>	A0A403NZ20
111	<i>iroB</i>	A0A3F3NSF2
112	<i>iroC</i>	A0A0H2XJX4
113	<i>iroD</i>	A0A5E8M7F3
114	<i>iroE</i>	A0A418H0X8
115	<i>iroN</i>	A0A366YKT6
116	<i>irp1</i>	A0A0H2Z037
117	<i>irp2</i>	Q1RAG0
118	<i>iucA</i>	A0A244BH71
119	<i>iucB</i>	A0A1S5SL02
120	<i>iucC</i>	A0A0H2VAK1
121	<i>iucD</i>	P11295
122	<i>iutA</i>	A0A0H2XK75
123	<i>sitA</i>	A0A0H2YY81
124	<i>sitB</i>	Q3L7K3
125	<i>sitC</i>	A0A0H2YXX3
126	<i>sitD</i>	A0A0H2YYP3
127	<i>ybtA</i>	B7NBX1
128	<i>ybtE</i>	A0A0H2YZZ2
129	<i>ybtP</i>	A0A0J3Y1U7
130	<i>ybtQ</i>	A0A0E1L970
131	<i>ybtS</i>	Q1RAG5
132	<i>ybtT</i>	A0A0H2Z0N8
133	<i>ybtU</i>	A0A0A1A6P5
134	<i>ybtX</i>	A0A0H2Z032
135	<i>bor</i>	A0A0H2YXV5
136	<i>iss</i>	Q9XDL2
137	<i>kpsE</i>	A0A0H2Z3F2
138	<i>kpsM</i>	A0A178QCZ1
139	<i>kpsT</i>	P24586

Numer porządkowy	Gen kodujący czynnik wirulencji	Numer dostępu UniProt
140	<i>neuC</i>	Q47400
141	<i>neuS</i>	A0A0H2Z3F7
142	<i>ompA</i>	B7N3B9
143	<i>ompT</i>	A0A0H2V511
144	<i>rfc</i>	P37748
145	<i>traT</i>	E1QMY9
146	<i>aec7</i>	Q6TKW1
147	<i>aec8</i>	A0A0H2YVX4
148	<i>aec11</i>	Q6TKV7
149	<i>aec14</i>	Q6TKV4
150	<i>aec15</i>	A0A0H2YVX0
151	<i>aec16</i>	A0A0H2YWV7
152	<i>aec17</i>	A0A0H2YVT9
153	<i>aec18</i>	A0A0H2YWC0
154	<i>aec19</i>	A0A0H2YW09
155	<i>aec22</i>	A0A0H2YWV2
156	<i>aec23</i>	A0A454A187
157	<i>aec24</i>	A0A0H2YWB6
158	<i>aec25</i>	A0A2X6EKN2
159	<i>aec26</i>	A0A0H2YVW0
160	<i>aec27</i>	A0A0H2YWU8
161	<i>aec28</i>	A0A0H2YVT2
162	<i>aec29</i>	A0A0H2YWB1
163	<i>aec30</i>	A0A0H2YW00
164	<i>aec31</i>	A0A0H2YVV6
165	<i>aec32</i>	B7MC47
166	<i>astA</i>	A1ABS8
167	<i>astB</i>	A1ABS6
168	<i>astC</i>	P77581
169	<i>astD</i>	L3Q7D8
170	<i>astE</i>	A1ABS5
171	<i>cba</i>	D9Z4Y8
172	<i>cbi</i>	P22426
173	<i>cdtA</i>	A0A0H2YYU1
174	<i>cdtB</i>	A0A0H2YZD9
175	<i>cdtC</i>	A0A0H2YYM2
176	<i>cma</i>	D9Z4Z0
177	<i>cmi</i>	D9Z4Z1
178	<i>cvaA</i>	B1P7M4
179	<i>cvaB</i>	B1P7M5
180	<i>cvaC</i>	P22522
181	<i>cvi</i>	P22521

Numer porządkowy	Gen kodujący czynnik wirulencji	Numer dostępu UniProt
182	<i>hlyD</i>	A0A0H2YYP7
183	<i>hlyE</i>	D7X2P4
184	<i>hlyF</i>	A0A0H2XJH4
185	<i>pic</i>	Q7BS42
186	<i>pilQ</i>	D9Z517
187	<i>sat</i>	A1AEU5
188	<i>usp</i>	A0A0H2YVZ8
189	<i>vat</i>	A0A0H2YWF4
190	<i>etsA</i>	A0A5B9T4K7
191	<i>etsB</i>	B7LID9
192	<i>etsC</i>	A0A0H2XK18
193	<i>fliC</i>	A0A0H2YZY9
194	<i>malX</i>	B7NB74

Obecność sekwencji aminokwasowych przedstawionych w Tabeli 7. oceniano w adnotowanych sekwencjach szczepów *E. coli* z niniejszego projektu. Stosowano algorytm blastp w wersji lokalnej API BLAST z następującymi parametrami: pokrycie sekwencji: 70%, próg identyczności sekwencji: 70%. Następnie, za pomocą skryptu blastp-input.py klastrowano szczepy oraz wizualizowano obecność czynników wirulencji na mapie ciepła. W klastrowaniu szczepów zastosowano metodę najdalszego sąsiedztwa (*ang.* farthest point algorithm), gdzie odległość między szczepami była określona przez odległość między szczepami najbardziej od siebie oddalonymi. Gałęzie dendrogramu były rozdzielane, jeśli dystans pomiędzy dwoma poszczególnymi węzłami przekraczał 70% maksymalnego dystansu między wszystkimi węzłami. Niezależne klastry szczepów do siebie podobnych oznaczano różnymi kolorami.

3.2.11.5. Projektowanie starterów

Startery dla metody diagnostycznej opartej o PCR projektowano przy użyciu narzędzia Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; dostęp 01.2018-06.2019), dobierając parametry wielkości spodziewanych produktów oraz temperatur topnienia, tak by móc przeprowadzić reakcję typu multipleks.

3.2.12. Testy *in ovo*

Testy na modelu zarodka kurzego zostały przeprowadzone przez dra hab. Marcina Lisa w Laboratorium Higieny Lęgów, Katedry Zoologii i Dobrostanu Zwierząt, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie w ramach współpracy naukowej.

Schemat eksperymentów podczas testów *in ovo* przyjęto na podstawie pracy Polakowskiej i wsp., (2012), gdzie zarodki kurczaków zakażano szczepami *S. aureus* i oceniano ich zamieralność w czasie.

Ekspertymenty przeprowadzano na kurzych jajach wylęgowych, które inkubowano w inkubatorach handlowych (PreformPoldrob) przez 8 dni poprzedzających doświadczenia. Następnie wykonywano świetlenia, aby do testów przeznaczyć tylko jaja z prawidłowo rozwijającymi się zarodkami. W 9. dobie inkubacji przeprowadzano doświadczenia polegające na wprowadzeniu zakażenia szczepami *E. coli* drogą iniekcji do worków owodniowych jaj w jednej dawce zakażającej 5×10^4 CFU/zarodek. Do zakażenia zarodków stosowano zawiesiny bakterii przygotowane zgodnie z opisem w punkcie 3.2.2. Przygotowanie szczepów *E. coli* do zakażenia w modelu *in ovo* (po 100 μ l/jajo). Zalęzione jaja dzielono na grupy po 30 jaj. Każdorazowo kilkanaście grup zakażano badanymi szczepami, a dodatkowe 2 grupy stanowiły kontrole: grupę negatywną zerową (niczym nie traktowaną) oraz negatywną kontrolną (traktowaną sterylnym roztworem 0,85% NaCl, w którym przygotowywano szczepy do zakażenia). Przed iniekcją skorupy jaj dezynfekowano 70% roztworem alkoholu etylowego i wykonywano otwór igłą o grubości 1,2 mm. Iniekcje zawiesin wykonywano igłą o średnicy 0,5 mm oraz przy pomocy strzykawek insulinowych o pojemności 1 ml. Następnie, otwór w każdym jaju zalepiono woskiem, a inkubacja była kontynuowana w laboratoryjnych aparatach lęgowych typu Mesalles 65 w temperaturze 37,8°C i wilgotności względnej 50%.

Podczas trwania całego eksperymentu oceniano śmiertelność zarodków na podstawie świetleń lampą ovoskopową. Ekspertymenty kończono w 10. dniu od zakażenia (19. doba inkubacji), przed rozpoczęciem wykluwania. Wtedy otwierano wszystkie jaja. Fazę rozwojową zarodka w momencie śmierci oceniano na podstawie analizy embriopatologicznej. Dokumentację fotograficzną wykonywano przy pomocy aparatu Canon EOS 600D + Obiektyw: Canon EF 50mm f/1.8 STM z pierścieniem pośrednim 21mm.

3.2.13. Analiza w RStudio i ocena testu

Dla zweryfikowania założenia, że możliwym jest wybranie takich genów, które pozwolą na określenie patogenności szczepów *E. coli* (klasyfikacja na szczepy: patogenne i niepatogenne) zastosowano dokładny test Fisher'a, pozwalający na zweryfikowanie hipotezy zerowej, mówiącej o takiej samej częstości występowania danego genu w badanych populacjach (szczepy patogenne, niepatogenne). W tym celu wykorzystano narzędzie RStudio, pakiet *stats*, wersja 3.6.2. Dodatkowo, przeprowadzono analizę częstości występowania poszczególnych serotypów u szczepów *E. coli*.

W celu wytypowania maksymalnie kilku (2-6) genów wirulencji, które same bądź w połączeniu z oznaczeniem serotypu badanego szczepu będą pozwalały na skuteczne i niezawodne określenie patogenności *Escherichia coli* u drobiu, analizowano różne układy genów, których częstość występowania w istotny sposób różniła się w obu populacjach. Poszczególne predykcje oceniano, stosując następujące parametry:

- czułość = $\frac{TP}{TP+FN}$,
- specyficzność = $\frac{TN}{FP+TN}$,
- wartość predykcyjna dodatnia PPV = $\frac{TP}{TP+FP}$,
- wartość predykcyjna ujemna NPV = $\frac{TN}{FN+TN}$,
- dokładność = $\frac{TP+TN}{n}$,

gdzie:

- TP (true positive) – liczba prawdziwie dodatnich wyników,
- TN (true negative) – liczba prawdziwie ujemnych wyników,
- FP (false positive) – liczba fałszywie dodatnich wyników,
- FN (false negative) – liczba fałszywie ujemnych wyników,
- n – liczba wszystkich analizowanych prób.

W wypadku opisywanych badań, czułość opisuje zdolność wykrywania szczepów *E. coli* patogennych dla drobiu (APEC), zaś specyficzność zdolność wykrywania szczepów *E. coli* niebędących patogenami. Wartość predykcyjna dodatnia określa prawdopodobieństwo, że badany szczep *E. coli* jest rzeczywiście szczepem patogennym (APEC) przy pozytywnym wyniku testu, zaś wartość predykcyjna ujemna prawdopodobieństwo, że badany szczep *E. coli* jest rzeczywiście szczepem niepatogennym, przy negatywnym

wyniku testu. Natomiast dokładność opisuje prawdopodobieństwo otrzymania prawidłowego wyniku w teście diagnostycznym (zarówno pozytywnego, jak i negatywnego). Przyjęto, że dokładność powyżej 90% jest akceptowalnym kryterium (Stefaniuk i wsp., 2015).

3.2.14. Analiza ROC-AUC

W celu oceny poprawności poszczególnych klasyfikatorów (predykcji) zastosowano autorski algorytm ROC-AUC.py, dzięki któremu wykreślono krzywe ROC (*ang.* Receiver Operating Characteristic), które ilustrują związek pomiędzy czułością a specyficznością danego modelu. Dla każdej kombinacji genów wyliczono pole pod wykresem AUC (*ang.* Area Under Curve) przyjmujące wartości z przedziału [0,1].

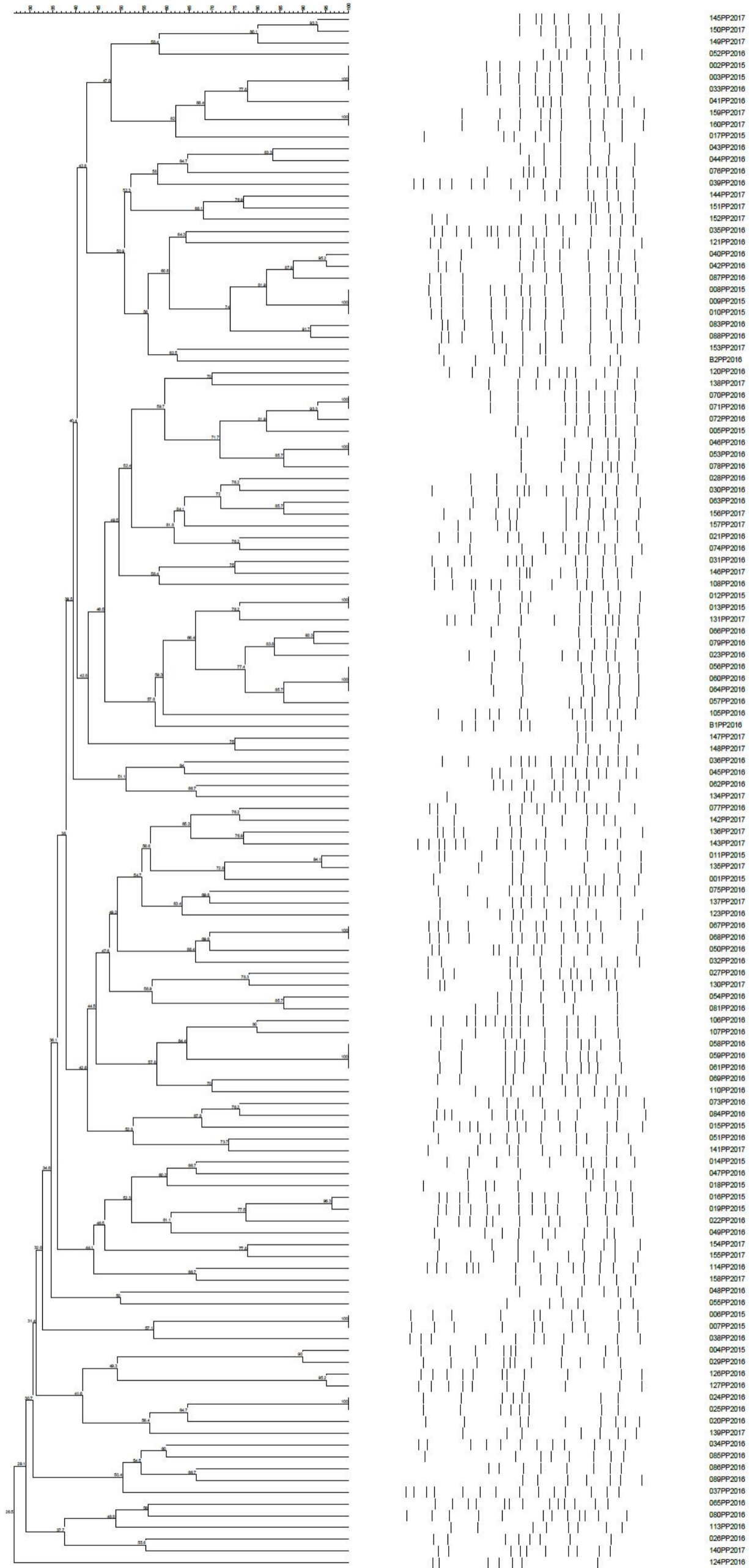
4. Wyniki

Doniesienia literaturowe wskazują, że istnieje duża trudność w klasyfikacji szczepów *E. coli* patogennych dla drobiu. Wiele ptaków może być nosicielami szczepów APEC, a ich jelita stanowią mogą rezerwuarem bakterii potencjalnie chorobotwórczych (Guabiraba i Schouler, 2015). Dodatkowo, istotnej części zachorowań nie da się powiązać z serotypem *E. coli*, a nie ma powszechnej metody alternatywnej w diagnostyce zakażeń. Jednakże istnieje grupa genów związanych z patogennością, których wykrycie w genomie może różnicować szczepy APEC od komensalnych (Barnes i wsp., 2008). W związku z tym, na podstawie analizy DNA można wykryć znaczną część patogennych *E. coli*. Szeroka dostępność metod sekwencjonowania nowej generacji powoduje, że badania te można prowadzić *in silico*.

W prezentowanej pracy, na podstawie analiz *in silico* oraz testu przeżywalności w modelu *in ovo*, przeprowadzono różnicowanie szczepów *E. coli* na patogenne i niepatogenne dla drobiu, które pomogło zaprojektować metodę diagnostyczną w oparciu o występowanie pewnych charakterystycznych czynników wirulencji.

4.1. Różnicowanie szczepów bakteryjnych w oparciu o metodę PCR MP

Pierwszym etapem prowadzonych badań było zgromadzenie kolekcji szczepów pochodzących od zdrowych i chorych ptaków z powszechnie występujących gatunków drobiu: *Gallus gallus domesticus*, *Meleagris gallopavo* i *Anser domesticus*. Szczepy bakteryjne zdefiniowane jako *E. coli* przedstawione w Tabeli 2. poddano różnicowaniu w celu wytypowania szczepów unikatowych. Genomy tych szczepów poddano reakcji sekwencjonowania. Przeprowadzono izolację materiału genetycznego każdego ze 132 szczepów (zgodnie z opisem w punkcie 3.2.3. Izolacja genomowego DNA), a następnie poddano je reakcji PCR MP (zgodnie z opisem w punkcie 3.2.7.1. PCR MP). Uzyskane produkty PCR wizualizowano w żelach agarozowych, uzyskując profile prążkowe charakterystyczne dla każdej z badanych prób. Podobieństwo profili prążkowych analizowano, korzystając z oprogramowania BioNumerics (zgodnie z opisem w punkcie 3.2.9. Różnicowanie szczepów w oprogramowaniu BioNumerics) w celu wygenerowania dendrogramu i określenia stopnia podobieństwa epidemiologicznego szczepów (Rysunek 8.). Na tym etapie badań kolekcję stanowiło 112 unikatowych szczepów *E. coli*, których DNA został poddany reakcji sekwencjonowania (Tabela 8.).



Rysunek 8. Dendrogram podobieństwa dla 132 szczepów *E. coli* w oparciu o profile PCR MP (BioNumerics, UPGMA)

Tabela 8. Unikatowe szczepy *E. coli* wykorzystane w badaniach

Numer porządkowy	Nazwa szczepu
1	<i>Escherichia coli_001PP2015</i>
2	<i>Escherichia coli_002PP2015</i>
3	<i>Escherichia coli_004PP2015</i>
4	<i>Escherichia coli_005PP2015</i>
5	<i>Escherichia coli_007PP2015</i>
6	<i>Escherichia coli_009PP2015</i>
7	<i>Escherichia coli_011PP2015</i>
8	<i>Escherichia coli_012PP2015</i>
9	<i>Escherichia coli_014PP2015</i>
10	<i>Escherichia coli_015PP2015</i>
11	<i>Escherichia coli_016PP2015</i>
12	<i>Escherichia coli_017PP2015</i>
13	<i>Escherichia coli_018PP2015</i>
14	<i>Escherichia coli_019PP2015</i>
15	<i>Escherichia coli_020PP2016</i>
16	<i>Escherichia coli_021PP2016</i>
17	<i>Escherichia coli_022PP2016</i>
18	<i>Escherichia coli_023PP2016</i>
19	<i>Escherichia coli_024PP2016</i>
20	<i>Escherichia coli_027PP2016</i>
21	<i>Escherichia coli_028PP2016</i>
22	<i>Escherichia coli_029PP2016</i>
23	<i>Escherichia coli_030PP2016</i>
24	<i>Escherichia coli_031PP2016</i>
25	<i>Escherichia coli_032PP2016</i>
26	<i>Escherichia coli_033PP2016</i>
27	<i>Escherichia coli_034PP2016</i>
28	<i>Escherichia coli_035PP2016</i>
29	<i>Escherichia coli_036PP2016</i>
30	<i>Escherichia coli_037PP2016</i>
31	<i>Escherichia coli_038PP2016</i>
32	<i>Escherichia coli_039PP2016</i>
33	<i>Escherichia coli_040PP2016</i>
34	<i>Escherichia coli_041PP2016</i>
35	<i>Escherichia coli_043PP2016</i>
36	<i>Escherichia coli_044PP2016</i>
37	<i>Escherichia coli_045PP2016</i>
38	<i>Escherichia coli_046PP2016</i>
39	<i>Escherichia coli_047PP2016</i>

Numer porządkowy	Nazwa szczepu
40	<i>Escherichia coli</i> _048PP2016
41	<i>Escherichia coli</i> _049PP2016
42	<i>Escherichia coli</i> _050PP2016
43	<i>Escherichia coli</i> _051PP2016
44	<i>Escherichia coli</i> _052PP2016
45	<i>Escherichia coli</i> _053PP2016
46	<i>Escherichia coli</i> _054PP2016
47	<i>Escherichia coli</i> _057PP2016
48	<i>Escherichia coli</i> _059PP2016
49	<i>Escherichia coli</i> _062PP2016
50	<i>Escherichia coli</i> _063PP2016
51	<i>Escherichia coli</i> _065PP2016
52	<i>Escherichia coli</i> _066PP2016
53	<i>Escherichia coli</i> _067PP2016
54	<i>Escherichia coli</i> _069PP2016
55	<i>Escherichia coli</i> _070PP2016
56	<i>Escherichia coli</i> _073PP2016
57	<i>Escherichia coli</i> _074PP2016
58	<i>Escherichia coli</i> _075PP2016
59	<i>Escherichia coli</i> _076PP2016
60	<i>Escherichia coli</i> _077PP2016
61	<i>Escherichia coli</i> _078PP2016
62	<i>Escherichia coli</i> _079PP2016
63	<i>Escherichia coli</i> _080PP2016
64	<i>Escherichia coli</i> _081PP2016
65	<i>Escherichia coli</i> _082PP2016
66	<i>Escherichia coli</i> _083PP2016
67	<i>Escherichia coli</i> _084PP2016
68	<i>Escherichia coli</i> _085PP2016
69	<i>Escherichia coli</i> _086PP2016
70	<i>Escherichia coli</i> _087PP2016
71	<i>Escherichia coli</i> _088PP2016
72	<i>Escherichia coli</i> _089PP2016
73	<i>Escherichia coli</i> β _001PP2016
74	<i>Escherichia coli</i> β _002PP2016
75	<i>Escherichia coli</i> _105PP2016
76	<i>Escherichia coli</i> _106PP2016
77	<i>Escherichia coli</i> _107PP2016
78	<i>Escherichia coli</i> _108PP2016
79	<i>Escherichia coli</i> _110PP2016
80	<i>Escherichia coli</i> _113PP2016
81	<i>Escherichia coli</i> _114PP2016

Numer porządkowy	Nazwa szczepu
82	<i>Escherichia coli</i> _120PP2016
83	<i>Escherichia coli</i> _121PP2016
84	<i>Escherichia coli</i> _123PP2016
85	<i>Escherichia coli</i> _124PP2016
86	<i>Escherichia coli</i> _126PP2016
87	<i>Escherichia coli</i> _127PP2016
88	<i>Escherichia coli</i> _130PP2017
89	<i>Escherichia coli</i> _131PP2017
90	<i>Escherichia coli</i> _134PP2017
91	<i>Escherichia coli</i> _135PP2017
92	<i>Escherichia coli</i> _137PP2017
93	<i>Escherichia coli</i> _138PP2017
94	<i>Escherichia coli</i> _139PP2017
95	<i>Escherichia coli</i> _140PP2017
96	<i>Escherichia coli</i> _141PP2017
97	<i>Escherichia coli</i> _142PP2017
98	<i>Escherichia coli</i> _143PP2017
99	<i>Escherichia coli</i> _144PP2017
100	<i>Escherichia coli</i> _145PP2017
101	<i>Escherichia coli</i> _146PP2017
102	<i>Escherichia coli</i> _147PP2017
103	<i>Escherichia coli</i> _149PP2017
104	<i>Escherichia coli</i> _151PP2017
105	<i>Escherichia coli</i> _152PP2017
106	<i>Escherichia coli</i> _153PP2017
107	<i>Escherichia coli</i> _154PP2017
108	<i>Escherichia coli</i> _155PP2017
109	<i>Escherichia coli</i> _156PP2017
110	<i>Escherichia coli</i> _157PP2017
111	<i>Escherichia coli</i> _158PP2017
112	<i>Escherichia coli</i> _159PP2017

4.2. Analiza filogenetyczna

W celu określenia struktury filogenetycznej szczepów oraz skonfrontowania jej z pierwotną klasyfikacją (ptaki zdrowe/ z objawami infekcji) i z projektowaną metodą diagnostyczną, wykonano typowanie metodą PCR wg Clermont'a i wsp., przyporządkowując szczepy do grup A, B1, B2, D, C, E, F i kład I (3.2.7.2 PCR typu multipleks). Wyniki przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Wyniki analizy filogenetycznej szczepów *E. coli*

Klasyfikacja szczepów na podstawie źródła izolacji	Nr szczepu <i>E. coli</i>	Kwadrupleks PCR				Dupleks dla grupy E		Dupleks dla grupy C		Grupa filogenetyczna	Ocena wg Clermont'a i wsp., 2013
		<i>arpA</i> (400 bp)	<i>chuA</i> (288 bp)	<i>yjaA</i> (211 bp)	TSPE4.C2 (152 bp)	ArpAgpE (301 bp)	trpBA (internal control) (489 bp)	trpAgpC (219 bp)	trpBA (internal control) (489 bp)		
PATOGENNE	001PP2015	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	002PP2015	-	+	+	+	-	+	-	+	B2	patogen
	004PP2015	-	+	+	-	-	+	-	+	B2	patogen
	005PP2015	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen
	007PP2015	+	+	-	-	-	+	-	-	D	patogen
	009PP2015	+	-	+	-	-	+	+	+	C	komensal
	011PP2015	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	012PP2015	-	+	-	-	-	+	-	-	F	patogen
	014PP2015	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen
	015PP2015	+	-	-	+	-	+	-	-	B1	komensal
	016PP2015	+	-	+	-	-	+	+	+	C	komensal
	017PP2015	-	+	+	-	-	-	+	+	B2	patogen
	018PP2015	-	+	+	-	-	-	+	+	B2	patogen
	019PP2015	+	-	+	-	-	-	+	+	C	komensal
	020PP2015	+	-	-	-	-	-	-	-	A	komensal
	021PP2016	+	+	-	+	+	+	-	-	E	patogen
	022PP2016	+	-	+	-	-	-	+	+	C	komensal
	023PP2016	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen
	024PP2016	+	-	-	-	-	-	-	-	A	komensal
	027PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	028PP2016	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen
029PP2016	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen	
030PP2016	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen	
031PP2016	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen	

Klasyfikacja szczepów na podstawie źródła izolacji	Nr szczepu <i>E. coli</i>	Kwadrupleks PCR				Dupleks dla grupy E		Dupleks dla grupy C		Grupa filogenetyczna	Ocena wg Clermont'a i wsp., 2013
		<i>arpA</i> (400 bp)	<i>chuA</i> (288 bp)	<i>yjaA</i> (211 bp)	TSPE4.C2 (152 bp)	ArpAgpE (301 bp)	trpBA (internal control) (489 bp)	trpAgpC (219 bp)	trpBA (internal control) (489 bp)		
PATOGENNE	032PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	033PP2016	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen
	034PP2016	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen
	035PP2016	+	-	+	-	-	-	+	+	C	komensal
	036PP2016	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen
	037PP2016	+	+	+	-	+	+	-	-	E	patogen
	038PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	039PP2016	+	-	+	-	-	-	+	+	C	komensal
	040PP2016	+	-	+	-	-	-	+	+	C	komensal
	041PP2016	+	-	+	-	-	-	+	+	C	komensal
	043PP2016	+	-	+	-	-	-	+	+	C	komensal
	044PP2016	+	-	+	-	-	-	+	+	C	komensal
	045PP2016	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen
	046PP2016	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen
	047PP2016	+	-	+	-	-	-	-	+	A	komensal
	048PP2016	+	-	+	-	-	-	-	+	A	komensal
	049PP2016	+	+	-	-	+	+	-	-	E	patogen
	050PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	051PP2016	+	-	+	-	-	-	+	+	C	komensal
	052PP2016	+	-	-	-	-	-	-	+	A	komensal
	053PP2016	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen
	054PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	057PP2016	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen
	059PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	062PP2016	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen
063PP2016	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen	

Klasyfikacja szczepów na podstawie źródła izolacji	Nr szczepu <i>E. coli</i>	Kwadrupleks PCR				Dupleks dla grupy E		Dupleks dla grupy C		Grupa filogenetyczna	Ocena wg Clermont'a i wsp., 2013
		<i>arpA</i> (400 bp)	<i>chuA</i> (288 bp)	<i>yjaA</i> (211 bp)	TSPE4.C2 (152 bp)	ArpAgpE (301 bp)	trpBA (internal control) (489 bp)	trpAgpC (219 bp)	trpBA (internal control) (489 bp)		
PATOGENNE	065PP2016	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen
	066PP2016	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen
	067PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	069PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	070PP2016	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen
	073PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	074PP2016	+	-	+	-	-	-	-	+	A	komensal
	075PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	076PP2016	+	-	+	-	-	-	+	+	C	komensal
	077PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	078PP2016	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen
	079PP2016	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen
	080PP2016	+	+	-	-	+	+	-	-	E	patogen
	081PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	082PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	083PP2016	+	-	+	-	-	-	+	+	C	komensal
	084PP2016	+	+	-	-	-	+	-	-	D	patogen
	085PP2016	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen
	086PP2016	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen
	087PP2016	+	-	+	-	-	-	-	-	A/C	komensal
	088PP2016	+	-	+	-	-	-	+	+	C	komensal
	089PP2016	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen
	β_001PP2016	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen
	β_002PP2016	+	-	+	-	-	-	+	+	C	komensal
105PP2016	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen	
113PP2016	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen	

Klasyfikacja szczepów na podstawie źródła izolacji	Nr szczepu <i>E. coli</i>	Kwadrupleks PCR				Dupleks dla grupy E		Dupleks dla grupy C		Grupa filogenetyczna	Ocena wg Clermont'a i wsp., 2013
		<i>arpA</i> (400 bp)	<i>chuA</i> (288 bp)	<i>yjaA</i> (211 bp)	TSPE4.C2 (152 bp)	ArpAgpE (301 bp)	trpBA (internal control) (489 bp)	trpAgpC (219 bp)	trpBA (internal control) (489 bp)		
PATOGENNE	114PP2016	+	-	+	-	-	-	-	+	A	komensal
	130PP2017	+	+	-	+	+	+	-	-	E	patogen
	131PP2017	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen
	154PP2017	+	-	-	-	-	-	-	-	A	komensal
	155PP2017	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	156PP2017	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen
	157PP2017	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen
	158PP2017	+	-	+	-	-	-	+	+	C	komensal
	159PP2017	-	+	+	-	-	-	-	-	B2	patogen
KOMENSALNE	106PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	107PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	108PP2016	+	+	-	+	-	+	-	-	D	patogen
	110PP2016	-	+	+	-	-	+	+	+	B2	patogen
	120PP2016	+	-	-	-	-	-	-	-	A	komensal
	121PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	123PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	124PP2016	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	126PP2016	+	-	-	-	-	-	-	-	A	komensal
	127PP2016	+	-	-	-	-	-	-	-	A	komensal
	134PP2017	-	+	-	-	-	-	-	-	F	patogen
	135PP2017	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	137PP2017	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	138PP2017	+	-	+	-	-	-	-	+	A	komensal
	139PP2017	+	-	-	-	-	-	-	-	A	komensal
	140PP2017	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
141PP2017	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal	

Klasyfikacja szczepów na podstawie źródła izolacji	Nr szczepu <i>E. coli</i>	Kwadrupleks PCR				Dupleks dla grupy E		Dupleks dla grupy C		Grupa filogenetyczna	Ocena wg Clermont'a i wsp., 2013
		<i>arpA</i> (400 bp)	<i>chuA</i> (288 bp)	<i>yjaA</i> (211 bp)	TSPE4.C2 (152 bp)	ArpAgpE (301 bp)	trpBA (internal control) (489 bp)	trpAgpC (219 bp)	trpBA (internal control) (489 bp)		
KOMENSALNE	142PP2017	+	-	+	-	-	-	-	+	A	komensal
	143PP2017	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
	144PP2017	+	-	-	-	-	-	-	-	A	komensal
	145PP2017	+	-	+	-	-	-	-	+	A	komensal
	146PP2017	+	+	-	-	-	+	-	-	D	patogen
	147PP2017	+	+	-	-	-	+	-	-	D	patogen
	149PP2017	+	-	-	-	-	-	-	-	A	komensal
	151PP2017	+	-	-	-	-	-	-	-	A	komensal
	152PP2017	+	-	-	-	-	-	-	-	A	komensal
	153PP2017	+	-	-	+	-	-	-	-	B1	komensal
Modelowy szczep komensalny	K12	+	-	+	-	-	-	-	+	A	komensal
Modelowy szczep patogenny	O157:H7	+	+	-	-	+	+	-	-	E	patogen

Już na podstawie tej analizy można stwierdzić, że klasyfikacja szczepów *E. coli* jako APEC nie jest jednoznaczna. Znaczna część szczepów izolowanych od chorych zwierząt została sklasyfikowana jako komensalna (aż 42 szczepy spośród 85 pierwotnie uznanych za patogeny), natomiast spośród szczepów izolowanych od zdrowych ptaków znaleziono potencjalne patogeny (5 szczepów spośród 27 pozyskanych od zdrowych ptaków). W związku z powyższym, zdecydowano o dalszej charakterystyce szczepów metodami *in silico* oraz o wybraniu modelu eksperymentalnego, dzięki któremu możliwe będzie jednoznaczne zaklasyfikowanie szczepów do grup patogenności przed przystąpieniem do zaprojektowania metody diagnostycznej.

4.3. Charakterystyka szczepów *E. coli* metodami *in silico*

Do dalszej charakterystyki szczepów posłużyły złożenia genomów otrzymane w wyniku przeprowadzonych analiz (zgodnie z opisem w punkcie 3.2.11.1. Składanie genomów). W pierwszej kolejności oceniano, czy spośród szczepów zdefiniowanych jako patogene lub komensalne na podstawie źródła izolacji występują charakterystyczne serotypy powiązane z APEC (np. O1, O2, O78) oraz czy szczepy te posiadają geny antybiotykooporności wobec powszechnie stosowanych w chowie i hodowli drobiu antybiotyków. Wyniki analiz otrzymanych wg narzędzi SerotypeFinder i ResFinder przedstawiono w Tabeli 10.

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi (punkt 1.2.3 Serotypy *E. coli* związane z kolibakteriozą) w Europie najczęściej identyfikowane są serotypy O1, O2, O5, O8, O18 i O78 (ponad 50% zakażeń). Przeprowadzone analizy *in silico* wykazały, że spośród badanych w niniejszej pracy szczepów najczęściej spotykanymi były serotypy: O78 (21 prób), O2 lub O50/O2 (14 prób) oraz O8 (7 prób). Nie zaobserwowano serotypu O1 ani O5, natomiast O18 wystąpił w jednym przypadku. Dla 15 genomów nie udało się uzyskać informacji o serotypie O. Dla zidentyfikowanych 97 szczepów wspomniane wyżej serotypy stanowiły 44,3% wszystkich przypadków, co potwierdza istotność ich występowania w Europie. Nadal jest to jednak tylko wskazówka w ocenie patogenności szczepów, gdyż serotypy te występują zarówno wśród szczepów pozyskanych od ptaków potencjalnie zdrowych, jak i z objawami infekcji. Dodatkowo, dla pozostałych 55,7% szczepów zidentyfikowane serotypy nie są tak charakterystyczne i trudno na tej podstawie byłoby zaklasyfikować je jako patogene lub niepatogene.

Zgodnie z doniesieniami przedstawionymi w punkcie 1.2.6 Antybiotykooporność szczepów APEC, u większości analizowanych szczepów zidentyfikowano geny antybiotykooporności na co najmniej kilka grup antybiotyków (m.in. tetracykliny, sulfonamidy, antybiotyki β -laktamowe i aminoglikozydowe). Geny te zidentyfikowano również u szczepów potencjalnie komensalnych. Mnogość antybiotyków, na które badane szczepy posiadają geny oporności, wskazuje na istotność stosowania terapii celowanej w hodowli drobiu. Zaprojektowanie metody diagnostycznej, która mogłaby jednoznacznie wskazać szczepy patogenne, ułatwiłoby dobór takiej terapii.

Tabela 10. Charakterystyka szczepów *E. coli* na podstawie SerotypeFinder i ResFinder

Klasyfikacja szczepu na podstawie źródła izolacji	Numer szczepu <i>E. coli</i>	Serotyp	Antybiotykooporność
PATOGENNE	001PP2015	O?:H16	Antybiotyki MLS
	002PP2015	O50/O2:H5	Antybiotyki β -laktamowe, fluorochinolony
	004PP2015	O117:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, MLS, chinolony, sulfonamidy, tetracykliny
	005PP2015	O161:H4	Antybiotyki β -laktamowe, fluorochinolony, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny
	007PP2015	O17/O44:H18	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, kolistyna, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	009PP2015	O78:H9	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, kolistyna, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny
	011PP2015	O21:H21	Antybiotyki aminoglikozydowe, MLS, chinolony, tetracykliny
	012PP2015	O161:H4	Antybiotyki β -laktamowe, fluorochinolony, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny
	014PP2015	O78:H4	Antybiotyki β -laktamowe, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy
	015PP2015	O88:H8	Nie znaleziono genów warunkujących antybiotykooporność.
	016PP2015	O78:H9	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, MLS, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	017PP2015	O50/O2:H5	Antybiotyki MLS
	018PP2015	O2:H7	Antybiotyki MLS
	019PP2015	O78:H4	Antybiotyki MLS
	020PP2016	O88:H28	Antybiotyki β -laktamowe, MLS, chinolony

Klasyfikacja szczepu na podstawie źródła izolacji	Numer szczepu <i>E. coli</i>	Serotyp	Antybiotykooporność
PATOGENNE	021PP2016	O?:H2	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, fluorochinolony, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny
	022PP2016	O78:H9	Antybiotyki MLS
	023PP2016	O33:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, kolistyna, MLS, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	024PP2016	O88:H28	Antybiotyki MLS
	027PP2016	O76:H14	Antybiotyki β-laktamowe, MLS, sulfonamidy, tetracykliny
	028PP2016	O161:H4	Antybiotyki β-laktamowe, fluorochinolony, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny
	029PP2016	O117:H4	Antybiotyki β-laktamowe, MLS, chloramfenikol, tetracykliny
	030PP2016	O4:H1	Antybiotyki MLS, fluorochinolony, chloramfenikol, tetracykliny
	031PP2016	O78:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, MLS, sulfonamidy, tetracykliny
	032PP2016	O159:H28	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, MLS, sulfonamidy, trimetoprym
	033PP2016	O2:H5	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, MLS, chinolony, tetracykliny
	034PP2016	O2:H5	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, MLS, chinolony, tetracykliny
	035PP2016	O78:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	036PP2016	O2:H1	Antybiotyki MLS, tetracykliny
	037PP2016	O2:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	038PP2016	O88:H10	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, MLS, sulfonamidy, trimetoprym
	039PP2016	O78:H4	Antybiotyki MLS
	040PP2016	O78:H4	Antybiotyki MLS
	041PP2016	O78:H4	Antybiotyki β-laktamowe, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny
	043PP2016	O78:H9	Antybiotyki β-laktamowe, MLS, tetracykliny
	044PP2016	O78:H9	Antybiotyki β-laktamowe, kolistyna, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny

Klasyfikacja szczepu na podstawie źródła izolacji	Numer szczepu <i>E. coli</i>	Serotyp	Antybiotykooporność
PATOGENNE	045PP2016	O?:H34	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, kolistyna, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny
	046PP2016	O25:H4	Antybiotyki MLS
	047PP2016	O128ac:H4	Nie znaleziono genów warunkujących antybiotykooporność
	048PP2016	O185:H45	Antybiotyki β -laktamowe, MLS, chinolony
	049PP2016	O169/O183:H9	Nie znaleziono genów warunkujących antybiotykooporność.
	050PP2016	O123:H10	Antybiotyki β -laktamowe, MLS
	051PP2016	O8:H9	Nie znaleziono genów warunkujących antybiotykooporność.
	052PP2016	O?:H37	Antybiotyki β -laktamowe, MLS, chinolony, tetracykliny
	053PP2016	O25:H4	Antybiotyki MLS
	054PP2016	O23:H16	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, kolistyna, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	057PP2016	O?:H4	Tetracykliny
	059PP2016	O?:H9	Antybiotyki β -laktamowe, MLS, sulfonamidy
	062PP2016	O83:H42	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, MLS, sulfonamidy, trimetoprym
	063PP2016	O?:H4	Antybiotyki MLS, tetracykliny
	065PP2016	O?:H45	Antybiotyki MLS
	066PP2016	O?:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, MLS, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	067PP2016	O88:H21	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, MLS, tetracykliny, trimetoprym
	069PP2016	O?:H9	Antybiotyki β -laktamowe, MLS, chinolony, sulfonamidy
	070PP2016	O?:H4	Antybiotyki MLS, tetracykliny
	073PP2016	O?:H21	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	074PP2016	O89:H9	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, kolistyna, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	075PP2016	O140:H23	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, MLS, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	076PP2016	O78:H4	Antybiotyki MLS

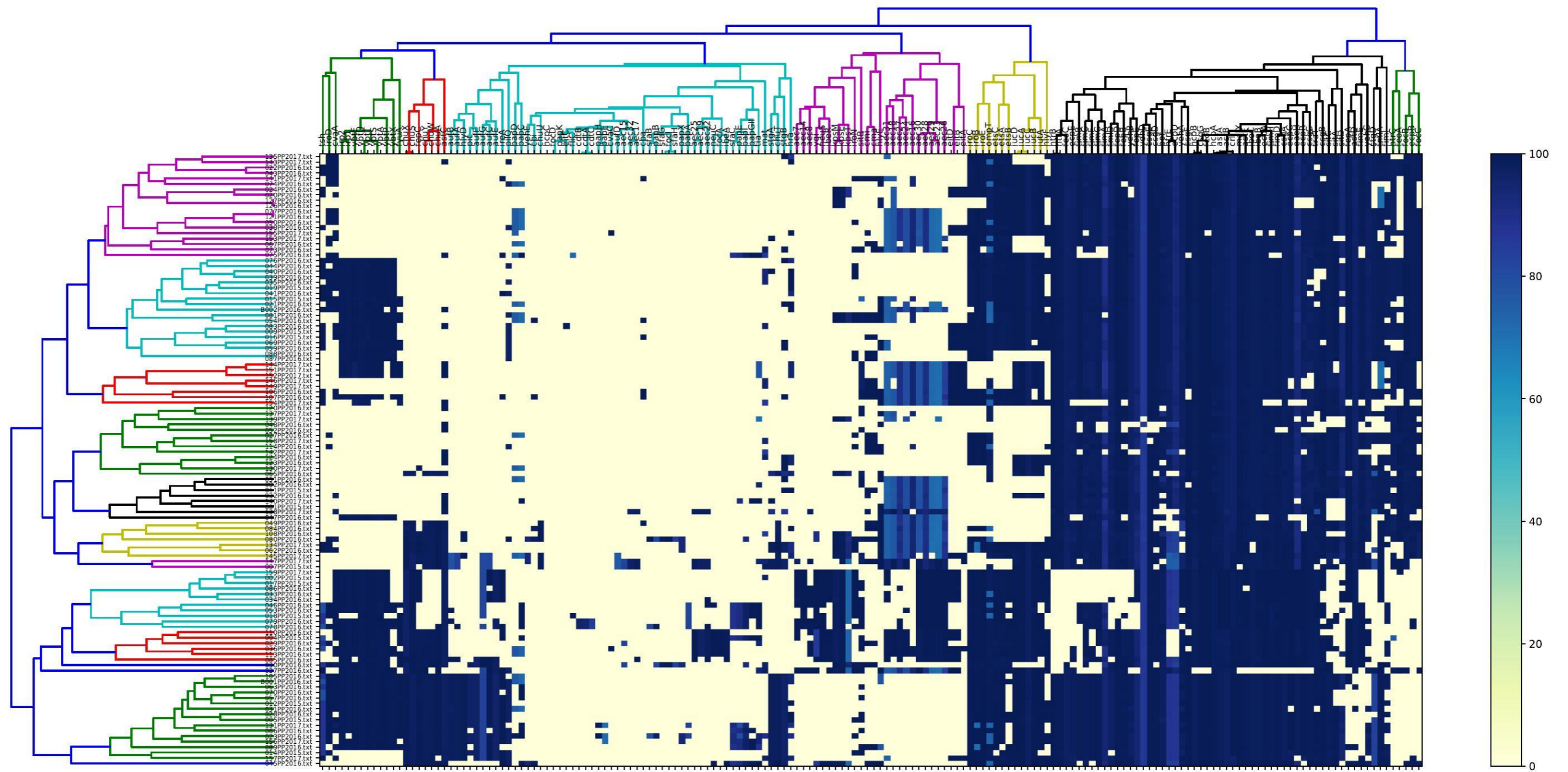
Klasyfikacja szczepu na podstawie źródła izolacji	Numer szczepu <i>E. coli</i>	Serotyp	Antybiotykooporność
PATOGENNE	077PP2016	O109:H51	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, kolistyna, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	078PP2016	O50/O2:H4	Nie znaleziono genów warunkujących antybiotykooporność
	079PP2016	O50/O2:H4	Nie znaleziono genów warunkujących antybiotykooporność
	080PP2016	O13:H15	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, MLS, sulfonamidy
	081PP2016	O23:H16	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, kolistyna, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	082PP2016	O49:H37	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, kolistyna, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	083PP2016	O78:H9	Antybiotyki MLS
	084PP2016	O8:H16	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, MLS, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	085PP2016	O50/O2:H5	Antybiotyki MLS
	086PP2016	O2:H5	Antybiotyki MLS
	087PP2016	O78:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, MLS, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	088PP2016	O78:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, MLS, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	089PP2016	O111:H4	Antybiotyki MLS, sulfonamidy, tetracykliny
	Escherichia coli β _001PP2016	O8:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, MLS, chloramfenikol, chinolony, sulfonamidy, tetracykliny
	Escherichia coli β _002PP2016	O161:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny
	105PP2016	O161:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, sulfonamid, tetracykliny
	113PP2016	O50/O2:H1	Nie znaleziono genów warunkujących antybiotykooporność
	114PP2016	O8:H9	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, chloramfenikol, sulfonamid, tetracykliny, trimetoprym
	130PP2017	O76:H14	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny

Klasyfikacja szczepu na podstawie źródła izolacji	Numer szczepu <i>E. coli</i>	Serotyp	Antybiotykooporność
PATOGENNE	131PP2017	O24:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, tetracykliny
	154PP2017	O?:H21	Antybiotyki β-laktamowe, kolistyna, MLS, chinolony, sulfonamidy, tetracykliny
	155PP2017	O91:H19	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, MLS, chloramfenikol, chinolony, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	156PP2017	O78:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, MLS, chloramfenikol, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	157PP2017	O?:H4	Antybiotyki β-laktamowe, MLS, chinolony, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	158PP2017	O78:H9	Antybiotyki β-laktamowe, sulfonamid
	159PP2017	O2:H5	Antybiotyki aminoglikozydowe, MLS, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
KOMENSALNE	106PP2016	O153/O178:H16	Antybiotyki aminoglikozydowe i tetracykliny
	107PP2016	O8:H10	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, MLS i tetracykliny
	108PP2016	O166:H15	Antybiotyki MLS
	110PP2016	O117:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, MLS i tetracykliny
	120PP2016	O69:H38	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, sulfonamid
	121PP2016	O?:H19	Antybiotyki aminoglikozydowe, MLS, chloramfenikol, trimetoprym
	123PP2016	O112ab:H8	Nie znaleziono genów warunkujących antybiotykooporność
	124PP2016	O112ab:H8	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, fosfomycyna, sulfonamid, tetracykliny, trimetoprym
	126PP2016	O7:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, MLS, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	127PP2016	O7:H4	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, MLS, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	134PP2017	O83:H42	Antybiotyki aminoglikozydowe, β-laktamowe, MLS, sulfonamidy, trimetoprym
	135PP2017	O159:H25	Nie znaleziono genów warunkujących antybiotykooporność

Klasyfikacja szczepu na podstawie źródła izolacji	Numer szczepu <i>E. coli</i>	Serotyp	Antybiotykooporność
KOMENSALNE	137PP2017	O82:H8	Nie znaleziono genów warunkujących antybiotykooporność
	138PP2017	O117:H42	Antybiotyki MLS
	139PP2017	O7:H4	Antybiotyki β -laktamowe, MLS, chinolony
	140PP2017	O18ac:H49	Antybiotki aminoglikozydowe, tetracykliny
	141PP2017	O88:H8	Antybiotyki MLS
	142PP2017	O8:H11	Antybiotyki MLS
	143PP2017	O39:H28	Nie znaleziono genów warunkujących antybiotykooporność
	144PP2017	O78:H4	Antybiotyki MLS
	145PP2017	O50/O2:H6	Antybiotyki MLS, chinolony
	146PP2017	O63:H4	Nie znaleziono genów warunkujących antybiotykooporność
	147PP2017	O17/O44:H18	Antybiotyki aminoglikozydowe, β -laktamowe, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprym
	149PP2017	O63:H4	Antybiotyki MLS
	151PP2017	O78:H4	Antybiotyki MLS
	152PP2017	O78:H4	Antybiotyki MLS
	153PP2017	O8:H28	Nie znaleziono genów warunkujących antybiotykooporność

4.4. Występowanie czynników wirulencji w badanych szczepach

W celu zbadania obecności wybranych czynników wirulencji (Tabela 7.) przeprowadzono analizę występowania sekwencji aminokwasowych w adnotowanych sekwencjach badanych szczepów *E. coli* za pomocą narzędzia blastp. Wyniki zapisano w sposób binarny, gdzie 0 oznaczało brak obecności danego czynnika, natomiast 1 występowało danego czynnika w szczepie. Następnie, tabelę binarną dla wszystkich szczepów zwizualizowano w postaci mapy ciepła (Rysunek 9.) za pomocą skryptu blastp-input.py, wg kryteriów opisanych w punkcie 3.2.11.4. Baza czynników wirulencji. Metoda ta pozwoliła podzielić szczepy na klastry wg posiadanych przez nie determinant wirulencji. Na mapie ciepła zakolorowano jedynie czynniki wirulencji, dla których pokrycie oraz podobieństwo wybranych sekwencji było większe lub równe 70%. Natężenie koloru niebieskiego odpowiada procentowi podobieństwa sekwencji i jest zgodne ze skalą przedstawioną po prawej stronie mapy ciepła.



Rysunek 9. Analiza obecności wybranych czynników wirulencji w szczepach E. coli (mapa ciepła)

Z przeprowadzonej analizy widać wyraźnie, że na podstawie różnic w występowaniu badanych czynników wirulencji, szczepy różnicowały się na 10 głównych klastrow oznaczonych różnymi kolorami. Patrząc od góry, klaster I (fioletowy) zawiera szczepy uznane zarówno za komensalne, jak i patogenne na podstawie źródła izolacji, wg analizy filogenetycznej znajdują się tu tylko komensale, natomiast serotypy szczepów patogennych są niecharakterystyczne. W klastrze II (seledynowym) znalazły się głównie szczepy o serotypie O78, wskazywanym w literaturze na serotyp charakterystyczny dla zakażeń APEC, zaś oznaczone grupy filogenetyczne w tym klastrze wskazują na szczepy komensalne, co jest zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na bliższe podobieństwo szczepów o tym serotypie do szczepów jelitowych niż do patogenów pozajelitowych (punkt 1.2.3 Serotypy *E. coli* związane z kolibakteriozą). Klaster III (czerwony) reprezentują szczepy pozyskane od zdrowych ptaków, bez charakterystycznych serotypów oraz komensalne wg analizy filogenetycznej. W klastrze IV (zielonym) występuje przewaga szczepów niepatogennych wg źródła izolacji oraz grupy filogenetyczne typowe dla szczepów komensalnych, bez charakterystycznych serotypów. Klaster V (czarny) zawiera przewagę szczepów pozyskanych od ptaków z objawami infekcji, natomiast wg analizy filogenetycznej zawiera tylko szczepy komensalne, co może wskazywać albo na potencjał patogeny szczepów komensalnych albo na pozyskanie szczepów niepatogennych z miejsc zmienionych chorobowo. Klaster VI (żółty) reprezentuje grupę mieszaną jeśli chodzi o źródło pozyskania szczepów, z niecharakterystycznymi serotypami, natomiast przeważają tam grupy filogenetyczne charakterystyczne dla szczepów komensalnych. Klaster VII (fioletowy) reprezentuje tylko dwa szczepy *E. coli* i zbliżony jest do klastra VI. Klaster VIII (seledynowy) zawiera szczepy pozyskane jedynie od ptaków z objawami kolibakteriozy; występują tu charakterystyczne dla APEC serotypy O2 lub O50/O2 oraz grupy filogenetyczne B2 i F, przypisywane patogenom pozajelitowym. W klastrze IX (czerwonym) występuje przewaga szczepów patogennych wg źródła izolacji, dominuje serotyp O50/O2 i grupa filogenetyczna B2 typowa dla patogenów. Dwa szczepy *E. coli* (030PP2016 i 037PP2016) nie sklastrowały się z innymi, ale znajdują się blisko klastra IX i również zawierają szczepy patogenne. Klaster X (zielony) reprezentowany jest głównie przez patogeny wg źródła izolacji, znajduje się tu też stosunkowo dużo szczepów o nieznanym serotypie, występuje grupa filogenetyczna F (szczepy patogenne). Szczep o numerze 045PP2016 nie sklastrował się z pozostałymi, ale jest podobny do szczepów z klastra X.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że ani źródło izolacji szczepu, ani analiza filogenetyczna, ani serotyp, ani zawartość genów wirulencji nie dają klarownego obrazu patotypu APEC, który jest uwarunkowany dużą heterogennością szczepów *E. coli*. Analiza *in silico* genomów potwierdziła, że szczepy pozyskane od ptaków bez objawów infekcji mogą mieć potencjał patogenny i w sprzyjających warunkach wywoływać infekcje, natomiast prawdopodobnie część szczepów sklasyfikowanych pierwotnie jako patogenne, jest w rzeczywistości komensalna. Opieranie się tylko na jednej klasyfikacji daje ryzyko otrzymania wyników fałszywie negatywnych – np. wg analizy filogenetycznej szczepu o serotypie O78 pochodzące od ptaków z kolibakteriozą traktowane są jako komensalne. Istnieją oczywiście szczepy, dla których klasyfikacja nie powinna stanowić większego problemu – klastry VIII–X reprezentują szczepy pozyskane od chorych ptaków, o charakterystycznych serotypach i grupach filogenetycznych typowych dla patogenów pozajelitowych, jednak jest to zaledwie część badanej grupy. Zaobserwować można również, że mimo iż szczepy sklastrowano wg zawartości poszczególnych czynników wirulencji, to powstały dendrogram dobrze odzwierciedla ich strukturę filogenetyczną. Gałęzie układają się od komensalnych do patogennych wg przeprowadzonej analizy PCR, jednak układ ten nie odzwierciedla patogenności szczepów *E. coli*.

Na podstawie analizy mapy ciepła można stwierdzić, że istnieją geny różnicujące oraz nieróżnicujące szczepy. Do tej drugiej grupy zaliczyć można czynniki, których nie znaleziono w badanych szczepach oraz te, które obecne są w każdym z nich. Widać wyraźnie, że układ genów wirulencji jest istotny dla patogenności szczepu, np. geny związane z metabolizmem żelaza występują tylko u części szczepów z serotypami charakterystycznymi dla APEC. Jednak, aby do metody diagnostycznej opartej o PCR wytypować odpowiednie geny czy grupy genów, należy jednoznacznie zdefiniować grupy szczepów patogennych i niepatogennych, a następnie zweryfikować występowanie wybranych czynników w tych szczepach. W związku z powyższym, zdecydowano o przeprowadzeniu weryfikacji patogenności szczepów *E. coli* w modelu *in ovo* i wyborze genów, które w istotny sposób różnicują szczepy.

Dodatkowo, po przeprowadzeniu analiz *in silico* stwierdzono, że szczepy *E. coli*_126PP2016 i *E. coli*_127PP2016 są tożsame, w związku z tym szczepu o numerze 127PP2016 nie poddawano dalszym analizom (dalsze badania prowadzono dla 111 szczepów).

4.5. Wyniki z eksperymentów w modelu *in ovo*

Celem weryfikacji pierwotnej informacji dotyczącej podziału szczepów na patogenne i komensalne (izolaty pozyskane od chorych i zdrowych ptaków), przeprowadzono 12 kolejnych eksperymentów mających na celu określenie przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami *E. coli* w modelu *in ovo*. Badanie 1. polegało na optymalizacji dawki zakażającej, natomiast kolejne na ocenie patogenności szczepów. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono wg schematu opisanego w punkcie 3.2.12. Testy *in ovo*.

Otrzymane wyniki dotyczące patoembriogenezy udokumentowano na zdjęciach (UR, Kraków). Rysunek 10. pokazuje przykładowe zarodki zmarłe w kolejnych fazach rozwoju. Pierwszy zarodek zmarł bezpośrednio po iniekcji szczepem *E. coli* (zdjęcie a). Na drugim zdjęciu (b) widoczna jest hemoliza naczyń krwionośnych oraz zmieniony kolor płynu owodniowego. Zarodek zmarły w 13. dobie inkubacji (c) ma widoczne przebarwienia (krwotoki podskórne). W drugim rzędzie (d-f) prezentowane są zarodki bardziej dojrzałe, ale z zahamowaną fazą rozwoju. Zaobserwować można też krwotoki z naczyń omocznio-kosmówki oraz zmętnienie płynu owodniowego.



Rysunek 10. Zarodki zmarłe w 9. (a), 10. (b), 13. (c), 16. (d), 16./17. (e) i 17. (f) dobie inkubacji (zdjęcia wykonane przez Kamila Kustrę, UR, Kraków)

4.5.1. Dobór dawki zakażającej

Celem pierwszego doświadczenia było dobranie optymalnej dawki zakażającej zarodki kurczaków. Opierano się na pracy Polakowskiej i wsp., (2012), gdzie stosowano dawki 10^4 i 10^6 CFU/zarodek. Schemat eksperymentu opisano w części metodycznej pracy (punkt 3.2.12 Testy *in ovo*). Testowano 4 dawki zakażające 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 i 1×10^7 CFU/zarodek. Do badania wybrano 4 szczepy: 2 szczepy komensalne – wzorcowy szczep *E. coli* K-12 i badany szczep *E. coli*_139PP2017 pozyskany od zdrowych ptaków o grupie filogenetycznej A charakterystycznej dla szczepów komensalnych, należący do klastra IV (Rysunek 9.), gdzie zgrupowano szczepy niepatogenne w oparciu o grupowanie się czynników wirulencji oraz 2 szczepy będące potencjalnie silnymi patogenami: *E. coli*_002PP2015 i *E. coli*_053PP2016 – oba przyporządkowane do grupy filogenetycznej B2 związanej z patogenami pozajelitowymi, należące do klastra VIII (Rysunek 9.). Szczep o numerze 002PP2015 posiadał dodatkowo charakterystyczny dla kolibakteriozy serotyp O50/O2.

Dane dotyczące średniej doby zamierania oraz śmiertelności zarodków na koniec eksperymentu przedstawiono w Tabeli 11. Uzyskane wyniki pozwoliły zaobserwować różnicę pomiędzy działaniem dwóch patogennych szczepów: *E. coli*_002PP2015 i *E. coli*_053PP2016, a szczepami komensalnymi: *E. coli* K-12 i *E. coli*_139PP2017. W oparciu o uzyskane wyniki, do kolejnych badań patogenności szczepów *E. coli* w modelu *in ovo* wytypowano dawkę zakażającą: 5×10^4 CFU/zarodek, będącą wartością pomiędzy dwiema niższymi analizowanymi dawkami, dla których można było zaobserwować znaczące różnice w działaniu szczepów w przeprowadzonym wcześniej eksperymencie.

Tabela 11. Podsumowanie wyników doświadczenia mającego na celu dobranie optymalnej dawki zakażającej zarodki kurczaków

Szczep <i>E. coli</i>	Zakładana dawka [CFU/zarodek]	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [%]
K-12	1×10^7	12,8	77,8	4,6
139PP2017		11,5	80,0	17,7
002PP2015		10,3	100,0	0,0
053PP2016		10,2	100,0	0,0
K-12	1×10^6	12,1	78,9	12,2
139PP2017		12,8	79,6	15,2
002PP2015		10,1	100,0	0,0
053PP2016		10,2	100,0	0,0

Szczep <i>E. coli</i>	Zakładana dawka [CFU/zarodek]	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [%]
K-12	1x10 ⁵	11,6	86,0	10,2
139PP2017		13,8	64,6	28,6
002PP2015		9,9	100,0	0,0
053PP2016		10,0	98,3	4,1
K-12	1x10 ⁴	12,5	68,8	34,9
139PP2017		14,1	65,0	20,7
002PP2015		10,1	98,3	4,1
053PP2016		9,7	100,0	0,0

4.5.2. Analiza wyników uzyskanych z poszczególnych eksperymentów

Dane zbiorcze dotyczące średniej doby zamierania i śmiertelności na koniec eksperymentów przedstawiono w Tabeli 12.

Po przeprowadzonych doświadczeniach i analizie otrzymanych wyników zweryfikowano pierwotną klasyfikację szczepów na patogenne i niepatogenne, opartą o stan zdrowia ptaków, od których szczep został wyizolowany (ptak zdrowy/chory). Nadrzędnie potraktowano wyniki uzyskane w teście żywotności zarodków kurzych w modelu *in ovo*. Jako informacje uzupełniające traktowano wyniki uzyskane z analizy filogenetycznej oraz obecność serotypów charakterystycznych dla APEC. W oparciu o wyniki testu *in ovo* zgromadzoną kolekcję szczepów reklasyfikowano zgodnie z poniższymi założeniami:

- dla szczepów, dla których współczynnik zmienności CV < 30% brano pod uwagę jedynie wartości śmiertelności i średniej doby zamierania (na podstawie Stefaniuk i wsp., 2015),
- za szczepy niepatogenne uznawano te, dla których obserwowana śmiertelność w 19. dobie (na zakończenie eksperymentu) wynosiła <75%, a wyniki były powtarzalne (tj. minimum dwa powtórzenia pozwalające zaklasyfikować dany szczep jako niepatogenne); dodatkowym kryterium decyzyjnym w przypadkach, gdy śmiertelność zawierała się w przedziale <75%, 85%> była średnia doba zamierania >12,
- za patogenne uznawano szczepy, dla których obserwowano śmiertelność w 19. dobie (na zakończenie eksperymentu) wynosiła >85% i wyniki były powtarzalne (tj. minimum dwa powtórzenia pozwalające zaklasyfikować dany szczep jako

patogeny); dodatkowym kryterium decyzyjnym w przypadkach, gdy śmiertelność zawierała się w przedziale <75%, 85%> była średnia doba zamierania ≤ 12 ,

- dla szczepów, dla których uzyskano spójną klasyfikację dla dwóch spośród trzech powtórzeń, nie przeprowadzano trzeciego doświadczenia,
- dla szczepów, dla których nie uzyskano spójnej klasyfikacji z dwóch powtórzeń, przeprowadzano kolejne eksperymenty, a niespójne powtórzenia odrzucano jako wartości odstające,
- dla szczepów, dla których nie uzyskano spójnych klasyfikacji z poszczególnych powtórzeń albo dla których odrzucono powtórzenia z uwagi na CV >30%, uznawano, iż nie można wiarygodnie sklasyfikować szczepu i usuwano go z puli rekasyfikowanych szczepów (oznaczenie „Nie określono” w Tabeli 12).

Ostateczną grupę po rekasyfikacji, dla której przeprowadzono analizy, stanowiło 100 szczepów (83 szczepy patogenne „P” i 17 szczepów niepatogennych „NP”). Kolekcję tę wykorzystano do opracowania metody diagnostycznej pozwalającej na jednoznaczną identyfikację szczepów *E.coli* patogennych dla drobiu (APEC).

25 szczepom zaklasyfikowanym do ostatecznej kolekcji zmieniono pierwotną klasyfikację. Dla 9 szczepów nie udało się określić grupy (P/NP), dodatkowo 2 szczepy wykluczono z badań z uwagi na prawdopodobną zamianę podczas badań *in ovo*.

Tabela 12. Podsumowanie wyników w oparciu o testy przeżywalności zarodków kurzych i ostateczna klasyfikacja wszystkich szczepów

Szczep <i>E. coli</i>	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg analizy filogenetycznej	Serotyp charaktery- styczny (+/-)	Wyniki testu przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami <i>E.coli</i> w modelu <i>in ovo</i>					Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja	Uwagi
				Nr eksperymentu	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [p.p.]	Współczynnik zmienności (CV) [%]			
001PP2015	P	NP	-	5	12,7	83,3	11,5	13,8	NP	NP	Odrzucono eksperyment 6. z uwagi na CV>30%. Reklasyfikacja z P na NP.
				6	16,6	31,1	20,1	64,6	n/d		
				11	11,4	86,7	5,8	6,7	P		
				12	13,4	80,0	5,8	7,3	NP		
002PP2015	P	P	+	1	10,3	100,0	0,0	0,0	P	P	
				1	10,1	100,0	0,0	0,0	P		
				1	9,9	100,0	0,0	0,0	P		
				1	10,3	98,3	4,1	4,2	P		
				3	10,3	100,0	0,0	0,0	P		
004PP2015	P	P	-	2	10,1	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	12,4	96,7	5,8	6,0	P		
005PP2015	P	P	-	5	10,9	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	11,3	100,0	0,0	0,0	P		
007PP2015	P	P	-	5	13,8	70,8	8,8	12,4	NP	NP	Reklasyfikacja z P na NP.
				9	16,7	43,3	11,5	26,6	NP		
009PP2015	P	NP	+	2	9,6	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	11,9	100,0	0,0	0,0	P		
011PP2015	P	NP	-	2	12,4	80,0	16,7	20,9	NP	NP	Reklasyfikacja z P na NP.
				7	13,5	65,6	15,0	22,9	NP		
012PP2015	P	P	-	6	11,7	86,7	5,8	6,7	P	P	

Szczep <i>E. coli</i>	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg analizy filogenetycznej	Serotyp charaktery- styczny (+/-)	Wyniki testu przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami <i>E.coli</i> w modelu <i>in ovo</i>					Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja	Uwagi
				Nr eksperymentu	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [p.p.]	Współczynnik zmienności (CV) [%]			
				7	11,6	89,3	11,1	12,4	P		
014PP2015	P	P	+	4	11,1	100,0	0,0	0,0	P	P	
				6	13,0	71,3	19,7	27,6	NP		
				7	11,6	92,6	12,8	13,8	P		
015PP2015	P	NP	-	2	9,8	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	10,5	100,0	0,0	0,0	P		
016PP2015	P	NP	+	6	10,1	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	11,0	100,0	0,0	0,0	P		
017PP2015	P	P	+	3	10,1	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	11,5	87,5	6,3	7,2	P		
018PP2015	P	P	+	3	10,9	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	13,5	90,0	10,0	11,1	P		
019PP2015	P	NP	-	6	15,4	43,3	20,8	48,0	n/d	P	Odrzucono eksperyment y 6. i 7. z uwagi na CV>30%
				7	13,7	75,9	25,1	33,1	n/d		
				8	10,4	100,0	0,0	0,0	P		
				11	10,4	100,0	0,0	0,0	P		
020PP2015	P	NP	-	6	15,5	43,3	23,4	54,0	n/d	P	Odrzucono eksperyment 6. z uwagi na CV>30%
				7	10,7	93,3	11,5	12,3	P		
				8	10,2	96,7	5,8	6,0	P		
021PP2016	P	P	-	6	10,6	96,3	6,4	6,6	P	P	
				9	13,6	93,3	5,8	6,2	P		
022PP2016	P	NP	+	3	10,2	100,0	0,0	0,0	P	P	

Szczep <i>E. coli</i>	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg analizy filogenetycznej	Serotyp charaktery- styczny (+/-)	Wyniki testu przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami <i>E.coli</i> w modelu <i>in ovo</i>					Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja	Uwagi
				Nr eksperymentu	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [p.p.]	Współczynnik zmienności (CV) [%]			
				9	10,8	92,9	5,8	6,2	P		
023PP2016	P	P	-	6	12,7	71,9	17,3	21,9	NP	P	
				7	11,2	93,3	11,5	12,3	P		
				8	10,3	100,0	0,0	0,0	P		
024PP2016	P	NP	-	4	11,4	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	12,6	90,0	10,0	11,1	P		
027PP2016	P	NP	-	5	13,9	70,0	10,0	14,3	NP	NP	Reklasyfikacja z P na NP.
				7	12,7	85,5	4,8	5,6	P		
				8	13,7	83,0	11,2	13,5	NP		
028PP2016	P	P	-	6	10,0	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	10,5	96,7	5,8	6,0	P		
029PP2016	P	P	-	3	10,6	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	13,9	76,7	5,8	7,6	NP		
				11	13,6	86,7	5,8	6,7	P		
030PP2016	P	P	-	3	11,7	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	12,6	86,2	5,8	6,7	P		
031PP2016	P	P	+	6	9,9	100,0	0,0	0,0	P	P	Odrzucono eksperyment 9. z uwagi na CV>30%.
				9	13,9	66,7	20,8	31,2	n/d		
				11	11,3	100,0	0,0	0,0	P		
032PP2016	P	NP	-	3	12,7	93,3	11,6	12,4	P	NP	Odrzucono eksperyment 8. z uwagi na CV>30%.
				6	16,7	46,3	11,6	25,1	NP		
				8	16,3	65,7	28,9	44,0	n/d		

Szczep <i>E. coli</i>	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg analizy filogenetycznej	Serotyp charaktery- styczny (+/-)	Wyniki testu przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami <i>E.coli</i> w modelu <i>in ovo</i>					Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja	Uwagi
				Nr eksperymentu	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [p.p.]	Współczynnik zmienności (CV) [%]			
				11	14,3	66,7	5,8	8,7	NP		Reklasyfikacja z P na NP.
033PP2016	P	P	+	6	10,0	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	12,8	90,0	10,0	11,1	P		
034PP2016	P	P	+	6	14,8	56,7	15,3	27,0	NP	P	
				7	11,1	93,0	6,1	6,6	P		
				8	10,7	96,3	6,4	6,6	P		
035PP2016	P	NP	+	4	10,8	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	11,8	96,7	5,8	6,0	P		
036PP2016	P	P	+	3	12,0	96,7	5,8	6,0	P	P	
				10	11,1	93,3	5,8	6,2	P		
037PP2016	P	P	+	8	10,1	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	12,4	79,3	20,0	25,2	NP		
				11	11,3	83,3	5,8	7,0	P		
038PP2016	P	NP	-	6	15,4	43,3	20,8	48,0	NP	P	Odrzucono eksperyment 6. z uwagi na CV>30%
				7	9,7	96,7	5,8	6,0	P		
				8	10,6	96,7	5,8	6,0	P		
039PP2016	P	NP	+	2	10,0	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	9,7	96,7	5,8	6,0	P		
040PP2016	P	NP	+	3	10,2	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	10,9	90,0	0,0	0,0	P		
041PP2016	P	NP	+	6	10,0	100,0	0,0	0,0	P	P	

Szczep <i>E. coli</i>	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg analizy filogenetycznej	Serotyp charaktery- styczny (+/-)	Wyniki testu przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami <i>E.coli</i> w modelu <i>in ovo</i>					Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja	Uwagi
				Nr eksperymentu	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [p.p.]	Współczynnik zmienności (CV) [%]			
				10	11,1	90,0	10,0	11,1	P		
043PP2016	P	NP	+	4	11,6	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	12,1	80,0	0,0	0,0	NP		
				11	12,0	90,0	0,0	0,0	P		
044PP2016	P	NP	+	3	10,6	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	9,8	100,0	0,0	0,0	P		
045PP2016	P	P	-	3	10,8	100,0	0,0	0,0	P	NP	Reklasyfikacja z P na NP.
				11	14,4	70,0	10,0	14,3	NP		
				12	13,7	80,0	10,0	12,5	NP		
046PP2016	P	P	-	6	9,9	100,0	0,0	0,0	P	P	
				11	11,3	96,7	5,8	6,0	P		
047PP2016	P	NP	-	2	12,4	88,3	11,7	13,3	P	NP	Odrzucono eksperyment 6. z uwagi na CV>30%. Reklasyfikacja z P na NP.
				6	16,9	42,2	29,1	69,0	n/d		
				8	12,9	83,0	5,1	6,1	NP		
				11	15,0	70,0	10,0	14,3	NP		
048PP2016	P	NP	-	3	15,8	57,4	13,6	23,7	NP	NP	Reklasyfikacja z P na NP.
				10	17,8	20,0	5,8	29,0	NP.		
049PP2016	P	P	-	3	14,1	74,8	28,1	37,6	n/d	Nie określono	Odrzucono eksperymenty 3. i 7. z uwagi na CV>30%.
				7	17,6	20,4	9,4	46,1	n/d		
				8	13,4	76,9	11,2	14,6	NP		
050PP2016	P	NP	-	4	10,9	100,0	0,0	0,0	P	P	
				7	12,2	73,3	11,5	15,7	NP		

Szczep <i>E. coli</i>	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg analizy filogenetycznej	Serotyp charaktery- styczny (+/-)	Wyniki testu przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami <i>E.coli</i> w modelu <i>in ovo</i>					Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja	Uwagi
				Nr eksperymentu	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [p.p.]	Współczynnik zmienności (CV) [%]			
				8	11,4	93,0	6,1	6,6	P		
051PP2016	P	NP	+	3	13,6	75,9	5,3	7,0	NP	NP	Reklasyfikacja z P na NP.
				6	11,9	90,0	10,0	11,1	P		
				8	12,5	82,1	20,0	24,4	NP		
052PP2016	P	NP	-	5	14,1	80,0	17,3	21,6	NP	NP	Odrzucono eksperyment 7. z uwagi na CV>30%. Reklasyfikacja z P na NP.
				6	10,6	100,0	0,0	0,0	P		
				7	12,4	73,3	37,9	37,9	n/d		
				11	17,3	26,7	4,5	4,5	NP		
053PP2016	P	P	-	1	10,2	100,0	0,0	0,0	P	P	
				1	10,2	100,0	0,0	0,0	P		
				1	10,0	98,3	4,1	4,2	P		
				1	9,7	100,0	0,0	0,0	P		
				2	9,9	100,0	0,0	0,0	P		
054PP2016	P	NP	-	3	11,9	96,7	5,8	6,0	P	P	
				9	11,5	93,3	11,5	12,3	P		
057PP2016	P	P	-	4	11,5	96,3	6,4	6,6	P	P	
				10	11,1	96,7	5,8	6,0	P		
059PP2016	P	NP	-	5	12,5	100,0	0,0	0,0	P	P	
				7	12,0	93,1	6,1	6,6	P		
062PP2016	P	P	-	6	10,1	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	10,0	100,0	0,0	0,0	P		
063PP2016	P	P	-	3	11,4	100,0	0,0	0,0	P	P	

Szczep <i>E. coli</i>	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg analizy filogenetycznej	Serotyp charaktery- styczny (+/-)	Wyniki testu przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami <i>E.coli</i> w modelu <i>in ovo</i>					Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja	Uwagi
				Nr eksperymentu	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [p.p.]	Współczynnik zmienności (CV) [%]			
				10	16,1	36,7	20,0	54,5	n/d		Odrzucono eksperyment 10. z uwagi na CV>30%
				11	9,8	100,0	0,0	0,0	P		
065PP2016	P	P	-	6	16,3	37,5	22,2	59,2	n/d	Nie określono	Odrzucono eksperyment 6. z uwagi na CV>30%
				10	15,3	80,0	17,3	21,6	NP		
066PP2016	P	P	-	6	10,1	100,0	0,0	0,0	P	P	
				11	11,2	93,3	11,5	12,3	P		
067PP2016	P	NP	-	6	10,0	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	10,5	96,7	5,8	6,0	P		
069PP2016	P	NP	-	5	12,3	100,0	0,0	0,0	P	NP	Reklasyfikacja z P na NP.
				10	14,8	80,0	0,0	0,0	NP		
				11	15,2	66,7	5,8	8,7	NP		
070PP2016	P	P	-	3	10,6	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	10,8	93,3	5,8	6,2	P		
073PP2016	P	NP	-	6	10,2	96,7	5,8	6,0	P	P	Odrzucono eksperyment 7. z uwagi na CV>30%
				7	14,6	58,5	20,2	34,5	n/d		
				8	10,8	100,0	0,0	0,0	P		
074PP2016	P	NP	-	3	13,1	83,3	20,8	25,0	NP	Nie określono	Odrzucono eksperyment 11. z uwagi na CV>30%
				7	10,5	100,0	0,0	0,0	P		
				11	14,8	70,0	26,5	37,9	n/d		
075PP2016	P	NP	-	2	10,1	100,0	0,0	0,0	P	P	

Szczep <i>E. coli</i>	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg analizy filogenetycznej	Serotyp charaktery- styczny (+/-)	Wyniki testu przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami <i>E.coli</i> w modelu <i>in ovo</i>					Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja	Uwagi
				Nr eksperymentu	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [p.p.]	Współczynnik zmienności (CV) [%]			
				7	11,1	88,4	11,1	12,6	P		
076PP2016	P	NP	+	3	10,2	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	11,1	90,0	17,3	19,2	P		
077PP2016	P	NP	-	2	10,9	95,0	8,4	8,8	P	P	
				7	11,3	92,6	12,8	13,8	P		
078PP2016	P	P	+	4	10,6	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	12,0	90,0	10,0	11,1	P		
079PP2016	P	P	+	4	11,3	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	9,8	100,0	0,0	0,0	P		
080PP2016	P	P	-	4	11,0	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	10,9	93,3	5,8	6,2	P		
081PP2016	P	NP	-	4	11,6	100,0	0,0	0,0	P	P	
				7	11,5	100,0	0,0	0,0	P		
082PP2016	P	NP	-	2	13,7	63,4	13,1	20,7	NP	NP	Odrzucono eksperymenty 9. i 11. z uwagi na CV>30%. Reklasyfikacja z P na NP.
				9	16,2	46,7	15,3	32,8	n/d		
				11	16,9	40,0	23,1	57,8	n/d		
				12	16,2	53,3	11,5	21,6	NP		
083PP2016	P	NP	+	5	11,4	96,7	5,8	6,0	P	P	
				10	11,2	89,7	10,0	11,1	P		
084PP2016	P	P	-	3	11,5	100,0	0,0	0,0	P	P	
				7	10,2	96,7	5,8	6,0	P		

Szczep <i>E. coli</i>	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg analizy filogenetycznej	Serotyp charaktery- styczny (+/-)	Wyniki testu przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami <i>E.coli</i> w modelu <i>in ovo</i>					Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja	Uwagi
				Nr eksperymentu	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [p.p.]	Współczynnik zmienności (CV) [%]			
085PP2016	P	P	+	5	11,2	96,7	5,8	6,0	P	P	
				10	11,7	96,7	5,8	6,0	P		
086PP2016	P	P	+	4	10,4	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	9,5	100,0	0,0	0,0	P		
087PP2016	P	NP	+	2	9,9	100,0	0,0	0,0	P	P	Odrzucono eksperyment 10. z uwagi na CV>30%
				10	16,6	27,6	14,1	51,1	n/d		
				11	10,3	96,7	5,8	6,0	P		
088PP2016	P	NP	+	6	10,0	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	11,0	100,0	0,0	0,0	P		
089PP2016	P	P	-	6	14,3	63,3	5,8	9,2	NP	P	
				7	10,3	100,0	0,0	0,0	P		
				8	10,8	96,7	5,8	6,0	P		
105PP2016	P	P	-	2	10,6	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	12,0	90,0	7,1	7,9	P		
106PP2016	NP	NP	-	5	11,8	100,0	0,0	0,0	P	P	Odrzucono eksperyment 7 z uwagi na CV>30%
				7	18,5	19,9	8,7	43,7	n/d		
				8	10,9	93,3	5,8	6,2	P		
107PP2016	NP	NP	+	5	12,9	93,3	11,5	12,3	P	NP	
				9	17,2	46,7	10,0	21,4	NP		
				11	14,0	80,0	0,0	0,0	NP		
108PP2016	NP	P	-	2	11,2	89,8	6,3	7,0	P	Nie określono	
				7	14,4	80,0	10,0	12,5	NP		

Szczep <i>E. coli</i>	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg analizy filogenetycznej	Serotyp charaktery- styczny (+/-)	Wyniki testu przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami <i>E.coli</i> w modelu <i>in ovo</i>					Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja	Uwagi
				Nr eksperymentu	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [p.p.]	Współczynnik zmienności (CV) [%]			
				8	12,4	90,0	17,3	19,2	P		
				12	13,0	72,4	17,3	23,9	NP		
110PP2016	NP	P	-	3	11,7	100,0	0,0	0,0	P	P	Reklasyfikacja z NP na P.
				9	15,8	56,7	15,3	27,0	NP		
				11	11,9	100,0	0,0	0,0	P		
113PP2016	P	P	+	5	12,2	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	12,5	90,0	10,0	11,1	P		
114PP2016	P	NP	+	4	11,6	93,3	11,5	12,3	P	P	
				8	10,5	100,0	0,0	0,0	P		
120PP2016	NP	NP	-	3	16,2	52,2	13,5	25,9	NP	Nie określono	
				10	11,0	96,7	5,8	6,0	P		
				11	17,0	24,1	10,9	45,2	n/d		
				12	15,4	40,0	17,3	43,3	n/d		
121PP2016	NP	NP	-	6	9,9	100,0	0,0	0,0	P	P	Reklasyfikacja z NP na P.
				7	11,9	82,5	10,9	13,2	P		
123PP2016	NP	NP	-	5	10,9	100,0	0,0	0,0	P	P	Reklasyfikacja z NP na P.
				7	10,8	93,0	6,1	6,6	P		
124PP2016	NP	NP	-	5	11,5	100,0	0,0	0,0	P	P	Reklasyfikacja z NP na P.
				7	10,6	100,0	0,0	0,0	P		
126PP2016	NP	NP	-	5	11,1	100,0	0,0	0,0	P	P	Reklasyfikacja z NP na P.
				7	10,4	100,0	0,0	0,0	P		
130PP2017	P	P	-	5	11,7	93,3	5,8	6,2	P	P	

Szczep <i>E. coli</i>	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg analizy filogenetycznej	Serotyp charaktery- styczny (+/-)	Wyniki testu przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami <i>E.coli</i> w modelu <i>in ovo</i>					Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja	Uwagi
				Nr eksperymentu	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [p.p.]	Współczynnik zmienności (CV) [%]			
				10	12,6	90,0	10,0	11,1	P		
131PP2017	P	P	-	5	11,8	100,0	0,0	0,0	P	P	
				10	11,8	93,1	5,8	6,2	P		
134PP2017	NP	P	-	5	12,1	100,0	0,0	0,0	P	P	Reklasyfikacja z NP na P.
				9	11,0	100,0	0,0	0,0	P		
135PP2017	NP	NP	-	4	13,9	83,3	5,8	7,0	NP	NP	
				6	10,4	96,3	6,4	6,6	P		
				11	14,3	80,0	10,0	12,5	NP		
137PP2017	NP	NP	-	4	11,4	96,3	6,4	6,6	P	Nie określono	Odrzucono eksperymenty 6. i 7. z uwagi na CV>30%
				6	16,5	34,8	13,0	37,4	n/d		
				7	16,6	30,0	20,0	66,7	n/d		
138PP2017	NP	NP	-	2	12,5	85,0	8,4	9,9	NP	Nie określono	Odrzucono eksperyment 6. z uwagi na CV>30%
				6	15,0	45,9	29,3	63,8	n/d		
				8	10,8	100,0	0,0	0,0	P		
139PP2017	NP	NP	-	1	11,5	80,0	17,7	22,1	NP	NP	Odrzucono 2 powtórzenia eksperymentu 1. z uwagi na CV>30%
				1	12,8	79,6	15,2	19,1	NP		
				1	13,8	64,6	28,6	44,3	n/d		
				1	14,1	65,0	20,7	31,8	n/d		
				2	13,0	73,3	5,2	7,1	NP		
140PP2017	NP	NP	+	5	16,7	34,4	15,0	43,6	n/d	Nie określono	Odrzucono oba eksperymenty
				9	17,9	19,4	10,0	51,5	n/d		

Szczep <i>E. coli</i>	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg analizy filogenetycznej	Serotyp charaktery- styczny (+/-)	Wyniki testu przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami <i>E.coli</i> w modelu <i>in ovo</i>					Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja	Uwagi
				Nr eksperymentu	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [p.p.]	Współczynnik zmienności (CV) [%]			
										z uwagi na CV>30%	
141PP2017	NP	NP	-	4	13,4	70,0	26,5	37,9	n/d	NP	Odrzucono eksperyment 4. z uwagi na CV>30%
				6	16,8	26,7	5,8	21,7	NP		
				7	16,2	49,0	11,9	24,3	NP		
142PP2017	NP	NP	+	4	12,3	93,3	11,5	12,3	P	P	Reklasyfikacja z NP na P.
				8	12,4	90,0	10,0	11,1	P		
143PP2017	NP	NP	-	4	11,8	96,3	6,4	6,6	P	P	Reklasyfikacja z NP na P.
				9	11,9	90,0	10,0	11,1	P		
144PP2017	NP	NP	+	2	11,0	100,0	0,0	0,0	P	P	Reklasyfikacja z NP na P.
				9	12,0	96,9	4,8	5,0	P		
147PP2017	NP	P	-	5	14,1	66,7	15,3	22,9	NP	NP	
				9	16,3	56,7	15,3	27,0	NP		
149PP2017	NP	NP	-	5	11,5	93,3	5,8	6,2	P	P	Reklasyfikacja z NP na P.
				8	10,4	100,0	0,0	0,0	P		
151PP2017	NP	NP	+	4	11,8	96,3	6,4	6,6	P	P	Reklasyfikacja z NP na P.
				10	12,5	86,7	5,8	6,7	P		
152PP2017	NP	NP	+	4	12,1	100,0	0,0	0,0	P	P	Reklasyfikacja z NP na P.
				10	12,6	82,8	5,8	7,0	NP		
				11	13,3	93,3	11,5	12,3	P		
153PP2017	NP	NP	+	5	12,7	100,0	0,0	0,0	P	P	Reklasyfikacja z NP na P.
				10	13,8	90,0	10,0	11,0	P		

Szczep <i>E. coli</i>	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg analizy filogenetycznej	Serotyp charaktery- styczny (+/-)	Wyniki testu przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami <i>E.coli</i> w modelu <i>in ovo</i>					Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja	Uwagi
				Nr eksperymentu	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [p.p.]	Współczynnik zmienności (CV) [%]			
154PP2017	P	NP	-	5	10,9	100,0	0,0	0,0	P	P	
				7	13,8	96,7	5,8	6,0	P		
155PP2016	P	NP	-	4	11,4	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	14,4	93,3	5,8	6,2	P		
156PP2017	P	P	+	5	11,4	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	12,0	83,3	11,5	13,8	NP		
				11	10,9	93,3	5,8	6,2	P		
157PP2017	P	P	-	6	9,9	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	10,6	100,0	0,0	0,0	P		
158PP2017	P	NP	+	6	10,0	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	13,2	90,0	10,0	11,1	P		
159PP2017	P	P	+	4	10,6	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	11,5	86,7	5,8	6,7	P		
β001PP2016	P	P	+	4	10,6	100,0	0,0	0,0	P	P	
				9	12,0	93,1	5,8	6,2	P		
β002PP2016	P	NP	-	5	13,0	93,3	5,8	6,2	P	Nie określono	
				10	16,4	56,7	5,8	10,2	NP		
				11	15,6	55,2	31,4	56,9	n/d		
				12	14,8	55,2	19,0	34,4	n/d		
145PP2017	NP	NP.	+	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	Nie określono	Usunięte z analizy ze względu na możliwość
146PP2017	NP	P	-	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d			

Szczep <i>E. coli</i>	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg analizy filogenetycznej	Serotyp charaktery- styczny (+/-)	Wyniki testu przeżywalności zarodków kurzych po zakażeniu szczepami <i>E.coli</i> w modelu <i>in ovo</i>					Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja	Uwagi
				Nr eksperymentu	Średnia doba zamierania	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [p.p.]	Współczynnik zmienności (CV) [%]			
										zamiany podczas badań <i>in ovo</i>	

P – szczep patogenny

NP – szczep niepatogenny

+ – serotyp określany wg danych literaturowych jako charakterystyczny dla szczepów APEC

- – serotyp określany wg danych literaturowych jako niecharakterystyczny dla szczepów APEC lub brak przyporządkowanego serotypu

n/d – nie dotyczy

Kursywą oznaczono wyniki uzyskane w 1. eksperymencie (optymalizacyjnym).

4.6. Wybór genów różnicujących

4.6.1. Test Fisher'a

Dla zweryfikowania założenia, że możliwe jest wybranie kilku genów, które pozwolą na określenie patogenności szczepów *E. coli* (klasyfikacja P/NP), zastosowano dokładny test Fisher'a, pozwalający na zweryfikowanie hipotezy zerowej, mówiącej o takiej samej częstości występowania danego genu w obu populacjach. Zaobserwowano statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) w częstości występowania 51 genów (w tym, dla 27 genów na poziomie $p < 0,001$) w szczepach patogennych i niepatogennych.

Dodatkowo, przeprowadzono analizę częstości występowania poszczególnych serotypów u szczepów *E. coli*. Wśród analizowanych populacji zaobserwowano 36 różnych serotypów, z wyraźną przewagą serotypu O78 ($n=21$); następnie O2 lub O50/O2 ($n=12$), O88 ($n=5$), O161 ($n=5$), O8 ($n=4$) oraz O117 ($n=3$). Dla najliczniej rozpowszechnionych serotypów testowano zależność między ich występowaniem, a patogennością szczepów (dokładny test Fisher'a). Analiza ta wykazała istotne statystycznie różnice jedynie w częstości występowania serotypu O78 ($p = 0,020$). Ponadto, serotyp ten był silnie skorelowany z patogennością (21/21), a w 14% przypadków niezależny od obecności genów wirulencji, dlatego postanowiono włączyć go do analizy i potraktować jako jeden z analizowanych czynników.

Wyniki częstości występowania analizowanych czynników we wszystkich szczepach wraz z wartością p (p -value) przedstawiono w Tabeli 13. (nie uwzględniono genów z Tabeli 1., które nie występowały w żadnym ze szczepów). Na podstawie analizy wyników można stwierdzić, iż najlepszymi dyskryminantami w modelu predykcyjnym przewidywania patogenności szczepów *E. coli* są geny związane z metabolizmem żelaza i geny kodujące toksyny. Aby uniknąć sytuacji, w której w modelu przewidywania mamy do czynienia z genami jednej rodziny czy operonu, do ostatecznego modelu predykcyjnego wybrano geny: *iroC*, *hlyF*, *etsA*, *iucB*, *ompT*, *iutA*, *fyuA*, *ybtE*, *irp1* oraz gen kodujący flipazę antygeny O w serotypie O78 (*wzx*).

Tabela 13. Częstość występowania czynników wirulencji w obu populacjach wraz z p-value

Gen	Liczba szczepów patogennych, w których obecny jest dany czynnik (n = 83)	Liczba szczepów niepatogennych, w których obecny jest dany czynnik (n = 17)	p-value (Test Fisher'a)
<i>iroC</i>	78	6	2,756E-07
<i>hlyF</i>	78	6	2,756E-07
<i>iroB</i>	77	6	7,301E-07
<i>iroD</i>	77	6	7,301E-07
<i>iroE</i>	77	6	7,301E-07
<i>iroN</i>	76	6	8,165E-07
<i>etsA</i>	69	5	2,529E-05
<i>etsB</i>	69	5	2,529E-05
<i>etsC</i>	68	5	4,274E-05
<i>iucB</i>	70	6	9,007E-05
<i>ompT</i>	80	10	1,081E-04
<i>iucA</i>	71	7	2,863E-04
<i>iucC</i>	71	7	2,863E-04
<i>iucD</i>	71	7	2,863E-04
<i>iutA</i>	71	7	2,863E-04
<i>fyuA</i>	54	3	4,046E-04
<i>ybtE</i>	54	3	4,046E-04
<i>ybtT</i>	54	3	4,046E-04
<i>hlyD</i>	35	0	4,475E-04
<i>focB</i>	50	17	5,793E-04
<i>ybtP</i>	53	3	8,236E-04
<i>ybtS</i>	53	3	8,236E-04
<i>ybtU</i>	53	3	8,236E-04
<i>ybtX</i>	53	3	8,236E-04
<i>irp1</i>	52	3	9,524E-04
<i>irp2</i>	52	3	9,524E-04
<i>ybtA</i>	52	3	9,524E-04
<i>aufE</i>	30	0	0,002
<i>aufF</i>	30	0	0,002
<i>bor</i>	82	13	0,003
<i>tsh</i>	46	3	0,007
<i>fepC</i>	39	2	0,007
<i>vat</i>	46	2	0,009
<i>csgB</i>	82	14	0,015
<i>cvaA</i>	48	4	0,015
<i>wzx(O78)</i>	21	0	0,020
<i>focC</i>	49	15	0,026
<i>csgD</i>	83	15	0,027
<i>fimB</i>	79	13	0,027
<i>yehD</i>	83	15	0,027
<i>hlyE</i>	29	11	0,030
<i>chuA</i>	39	3	0,031
<i>chuS</i>	39	3	0,031
<i>chuT</i>	39	3	0,031
<i>chuU</i>	39	3	0,031

Gen	Liczba szczepów patogennych, w których obecny jest dany czynnik (n = 83)	Liczba szczepów niepatogennych, w których obecny jest dany czynnik (n = 17)	p-value (Test Fisher'a)
<i>chuW</i>	39	3	0,031
<i>chuX</i>	39	3	0,031
<i>chuY</i>	39	3	0,031
<i>htrC</i>	45	14	0,034
<i>sitC</i>	78	13	0,043
<i>cba</i>	5	4	0,043
<i>hra</i>	32	2	0,048
<i>aec31</i>	42	13	0,063
<i>csgE</i>	82	15	0,074
<i>cdtA</i>	2	0	0,074
<i>cdtB</i>	2	0	0,074
<i>cdtC</i>	2	0	0,074
<i>aufA</i>	30	2	0,084
<i>aufB</i>	30	2	0,084
<i>aufC</i>	29	2	0,084
<i>aufG</i>	29	2	0,084
<i>pilQ</i>	30	2	0,084
<i>aufD</i>	28	2	0,087
<i>kpsM</i>	28	2	0,087
<i>fmlA</i>	76	13	0,089
<i>traT</i>	76	13	0,089
<i>aec18</i>	34	11	0,108
<i>usp</i>	20	1	0,113
<i>pic</i>	14	0	0,119
<i>sitD</i>	73	12	0,127
<i>ireA</i>	30	3	0,167
<i>yqi</i>	19	1	0,182
<i>neuC</i>	18	1	0,182
<i>aec22</i>	18	1	0,182
<i>sitB</i>	77	12	0,193
<i>yehC</i>	80	15	0,199
<i>fimC</i>	80	15	0,200
<i>cbi</i>	3	2	0,200
<i>aec14</i>	12	0	0,211
<i>cma</i>	17	6	0,211
<i>cmi</i>	21	7	0,236
<i>papC</i>	27	3	0,262
<i>eitA</i>	27	3	0,262
<i>eitB</i>	27	3	0,262
<i>eitC</i>	27	3	0,262
<i>eitD</i>	27	3	0,262
<i>kpsE</i>	27	3	0,262
<i>ecpR</i>	79	15	0,269
<i>fimE</i>	79	15	0,269
<i>neuS</i>	17	1	0,296
<i>aec23</i>	37	10	0,301
<i>aec24</i>	37	10	0,301

Gen	Liczba szczepów patogennych, w których obecny jest dany czynnik (n = 83)	Liczba szczepów niepatogennych, w których obecny jest dany czynnik (n = 17)	p-value (Test Fisher'a)
<i>ecpE</i>	82	16	0,313
<i>aec15</i>	5	2	0,340
<i>papA</i>	8	0	0,345
<i>papX</i>	8	0	0,345
<i>papD</i>	26	3	0,381
<i>kpsT</i>	25	3	0,383
<i>csgC</i>	78	15	0,400
<i>fimA</i>	78	15	0,400
<i>stgA</i>	53	13	0,406
<i>stgB</i>	53	13	0,406
<i>aec26</i>	30	8	0,422
<i>stgD</i>	49	12	0,426
<i>csgA</i>	81	16	0,432
<i>ecpA</i>	81	16	0,432
<i>ecpB</i>	81	16	0,432
<i>ibeB</i>	81	16	0,432
<i>fepE</i>	81	16	0,432
<i>aec27</i>	35	9	0,435
<i>aec30</i>	35	9	0,435
<i>ibeR</i>	13	1	0,453
<i>aec8</i>	13	1	0,453
<i>sfaC</i>	14	1	0,456
<i>papE</i>	12	1	0,459
<i>papF</i>	12	1	0,459
<i>papI</i>	12	1	0,459
<i>ibeA</i>	12	1	0,459
<i>fepA</i>	71	16	0,459
<i>sitA</i>	71	13	0,465
<i>fimI</i>	69	13	0,501
<i>aec17</i>	18	2	0,512
<i>aec19</i>	18	2	0,512
<i>aec25</i>	18	2	0,512
<i>aec32</i>	18	2	0,512
<i>aec7</i>	19	2	0,514
<i>mat</i>	17	2	0,515
<i>ecpC</i>	80	16	0,531
<i>fimD</i>	80	16	0,531
<i>fimH</i>	78	17	0,585
<i>ecpD</i>	77	17	0,586
<i>aec28</i>	36	9	0,594
<i>aec16</i>	41	10	0,597
<i>papH</i>	7	0	0,599
<i>aec29</i>	37	9	0,599
<i>htrE</i>	77	15	0,621
<i>fliC</i>	3	0	1,000
<i>crl</i>	83	17	1,000
<i>csgF</i>	83	17	1,000

Gen	Liczba szczepów patogenicznych, w których obecny jest dany czynnik (n = 83)	Liczba szczepów niepatogenicznych, w których obecny jest dany czynnik (n = 17)	p-value (Test Fisher'a)
<i>csgG</i>	82	17	1,000
<i>eaeH</i>	78	16	1,000
<i>fimF</i>	80	17	1,000
<i>fimG</i>	79	17	1,000
<i>fmlD</i>	80	17	1,000
<i>focA</i>	83	17	1,000
<i>focD</i>	2	0	1,000
<i>focI</i>	2	0	1,000
<i>hcpA</i>	83	17	1,000
<i>hcpB</i>	82	17	1,000
<i>htrA</i>	82	17	1,000
<i>htrB</i>	83	17	1,000
<i>papB</i>	4	0	1,000
<i>papGII</i>	8	1	1,000
<i>papK</i>	3	0	1,000
<i>sfaB</i>	4	0	1,000
<i>sfaG</i>	2	0	1,000
<i>sfaH</i>	2	0	1,000
<i>yehA</i>	79	17	1,000
<i>yehB</i>	79	16	1,000
<i>yehE</i>	30	6	1,000
<i>ibeC</i>	82	17	1,000
<i>tia</i>	19	4	1,000
<i>feoA</i>	83	17	1,000
<i>feoB</i>	81	17	1,000
<i>feoC</i>	83	17	1,000
<i>fepB</i>	83	17	1,000
<i>fepD</i>	83	17	1,000
<i>malX</i>	82	17	1,000
<i>astA</i>	83	17	1,000
<i>astB</i>	83	17	1,000
<i>astC</i>	82	17	1,000
<i>astD</i>	83	17	1,000
<i>astE</i>	82	17	1,000
<i>cvaB</i>	2	0	1,000
<i>cvaC</i>	3	0	1,000
<i>sat</i>	82	17	1,000

Ponieważ liczba szczepów patogenicznych i komensalich nie była porównywalna w zdefiniowanej kolekcji, dla sprawdzenia, czy rozbieżność w liczebności badanych grup ma znaczenie dla wyników otrzymanych w teście Fisher'a, przeprowadzono eksperyment z równolicznymi zbiorami, losując dziesięciokrotnie 17 z 83 szczepów patogenicznych oraz wykorzystując wszystkie 17 szczepów niepatogenicznych do analizy. W trakcie badania analizowano częstość występowania odpowiednich genów wirulencji w taki sposób,

jak opisano wyżej. Wyniki zawężono jedynie do genów, dla których istotność $p < 0,05$. Uwzględniono również wartości uzyskiwane dla genu *wzx* serotypu O78. Wyniki przedstawiono w Tabeli 14. Pogrubioną czcionką zaznaczono geny, które wybrano na podstawie pierwszego testu Fisher'a, wykonanego na nierównolicznych zbiorach.

Tabela 14. Wybrane geny o $p < 0,05$ dla równoliczbowych zbiorów szczepów *E.coli*

Numer losowania	Numery szczepów <i>E.coli</i> (P)	Numery szczepów <i>E.coli</i> (NP)	Geny, dla których $p < 0,05$
1	004PP2015, 019PP2015, 020PP2016, 022PP2016, 023PP2016, 031PP2016, 035PP2016, 036PP2016, 040PP2016, 041PP2016, 050PP2016, 062PP2016, 066PP2016, 088PP2016, 110PP2017, 158PP2017, β 001PP2016	001PP2015, 007PP2015, 011PP2015, 027PP2016, 032PP2016, 045PP2016, 047PP2016, 048PP2016, 051PP2016, 052PP2016, 069PP2016, 082PP2016, 107PP2016, 135PP2017, 139PP2017, 141PP2017, 147PP2017	<i>iroB</i> , <i>iroC</i> , <i>iroD</i> , <i>iroE</i> , <i>hlyF</i> , <i>iroN</i> , <i>etsA</i> , <i>etsB</i> , <i>etsC</i> , <i>vat</i> , <i>wzx(O78)</i> , <i>iucB</i> , <i>tsh</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp1</i> , <i>irp2</i> , <i>ybtE</i> , <i>ybtP</i> , <i>ybtS</i> , <i>ybtT</i> , <i>ybtU</i> , <i>ybtX</i> , <i>focB</i> , <i>ompT</i> , <i>hlyD</i> , <i>iucA</i> , <i>iucC</i> , <i>iucD</i> , <i>iutA</i> , <i>ybtA</i> , <i>aec31</i> , <i>cvaA</i>
2	016PP2015, 018PP2015, 030PP2016, 041PP2016, 043PP2016, 067PP2016, 078PP2016, 079PP2016, 081PP2016, 083PP2016, 089PP2016, 113PP2017, 130PP2017, 131PP2017, 134PP2017, 156PP2017, β 001PP2016	001PP2015, 007PP2015, 011PP2015, 027PP2016, 032PP2016, 045PP2016, 047PP2016, 048PP2016, 051PP2016, 052PP2016, 069PP2016, 082PP2016, 107PP2016, 135PP2017, 139PP2017, 141PP2017, 147PP2017	<i>iroC</i> , <i>hlyF</i> , <i>etsA</i> , <i>etsB</i> , <i>etsC</i> , <i>vat</i> , <i>iroB</i> , <i>iroD</i> , <i>iroE</i> , <i>iroN</i> , <i>focB</i> , <i>tsh</i> , <i>fyuA</i> , <i>ybtA</i> , <i>ybtE</i> , <i>ybtP</i> , <i>ybtS</i> , <i>ybtT</i> , <i>ybtU</i> , <i>ybtX</i> , <i>aufE</i> , <i>aufF</i> , <i>hlyD</i> , <i>fepC</i> , <i>iucB</i> , <i>irp1</i> , <i>irp2</i> , <i>ompT</i> , <i>iucA</i> , <i>iucC</i> , <i>iucD</i> , <i>iutA</i> , <i>chuA</i> , <i>focC</i> , <i>papD</i> , <i>chuS</i> , <i>chuT</i> , <i>chuU</i> , <i>chuW</i> , <i>chuX</i> , <i>chuY</i> , <i>cvaA</i> , <i>papI</i> , <i>sfaC</i> , <i>wzx(O78)</i>
,3	012PP2015, 020PP2016, 022PP2016, 023PP2016, 030PP2016, 031PP2016, 034PP2016, 053PP2016, 066PP2016, 070PP2016, 075PP2016, 105PP2016, 123PP2016, 131PP2017, 142PP2017, 153PP2017, 156PP2017	001PP2015, 007PP2015, 011PP2015, 027PP2016, 032PP2016, 045PP2016, 047PP2016, 048PP2016, 051PP2016, 052PP2016, 069PP2016, 082PP2016, 107PP2016, 135PP2017, 139PP2017, 141PP2017, 147PP2017	<i>aufE</i> , <i>aufF</i> , <i>focB</i> , <i>iroB</i> , <i>iroC</i> , <i>iroD</i> , <i>iroE</i> , <i>iroN</i> , <i>hlyF</i> , <i>hlyD</i> , <i>etsA</i> , <i>etsB</i> , <i>etsC</i> , <i>vat</i> , <i>aec31</i> , <i>pic</i> , <i>aufA</i> , <i>aufB</i> , <i>aufG</i> , <i>focC</i> , <i>fepC</i> , <i>htrC</i> , <i>tsh</i> , <i>ompT</i> , <i>aufC</i> , <i>aufD</i> , <i>chuA</i> , <i>chuS</i> , <i>chuT</i> , <i>chuU</i> , <i>chuW</i> , <i>chuX</i> , <i>chuY</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp1</i> ,

Numer losowania	Numery szczepów <i>E.coli</i> (P)	Numery szczepów <i>E.coli</i> (NP)	Geny, dla których $p < 0,05$
			<i>irp2, iucB, ybtA, ybtE, ybtP, ybtS, ybtT, ybtU, ybtX, aec18, cvaA, ireA, iucA, iucC, iucD, iutA, aec16, aec23, aec24, hlyE, sfaC</i>
4	004PP2015, 009PP2015, 014PP2015, 020PP2016, 046PP2016, 050PP2016, 063PP2016, 066PP2016, 067PP2016, 073PP2016, 075PP2016, 083PP2016, 084PP2016, 126PP2016, 144PP2017, 149PP2017, 158PP2017	001PP2015, 007PP2015, 011PP2015, 027PP2016, 032PP2016, 045PP2016, 047PP2016, 048PP2016, 051PP2016, 052PP2016, 069PP2016, 082PP2016, 107PP2016, 135PP2017, 139PP2017, 141PP2017, 147PP2017	<i>iroB, iroC, iroD, iroE, iroN, hlyF, etsB, etsA, vat, iucB, hlyE, etsC, ompT, focB, sitB, sitD, hlyD, wxz(O78)</i>
5	021PP2016, 030PP2016, 036PP2016, 037PP2016, 038PP2016, 059PP2016, 066PP2016, 073PP2016, 084PP2016, 087PP2016, 105PP2016, 113PP2016, 124PP2016, 126PP2016, 152PP2017, 159PP2017, β 001PP2016	001PP2015, 007PP2015, 011PP2015, 027PP2016, 032PP2016, 045PP2016, 047PP2016, 048PP2016, 051PP2016, 052PP2016, 069PP2016, 082PP2016, 107PP2016, 135PP2017, 139PP2017, 141PP2017, 147PP2017	<i>hlyF, iroB, iroC, iroD, iroE, fyuA, irp1, irp2, ybtA, ybtE, ybtP, ybtS, ybtT, ybtU, ybtX, aec31, focB, hlyD, iroN, etsA, etsB, etsC, aufE, aufF, yehE, vat, iucB, ompT</i>
6	014PP2015, 017PP2015, 022PP2016, 036PP2016, 038PP2016, 039PP2016, 040PP2016, 043PP2016, 059PP2016, 077PP2016, 078PP2016, 081PP2016, 131PP2017, 149PP2017, 152PP2017, 155PP2017, β 001PP2016	001PP2015, 007PP2015, 011PP2015, 027PP2016, 032PP2016, 045PP2016, 047PP2016, 048PP2016, 051PP2016, 052PP2016, 069PP2016, 082PP2016, 107PP2016, 135PP2017, 139PP2017, 141PP2017, 147PP2017	<i>iucB, iucA, iucC, iucD, iutA, etsA, etsB, iroB, iroC, iroD, iroE, vat, etsC, tsh, iroN, hlyF, focB, hlyD, wxz(O78), fyuA, irp1, irp2, ybtA, ybtE, ybtP, ybtS, ybtT, ybtU, ybtX, ompT, aufE, aufF, sitB, sitD</i>
7	009PP2015, 020PP2015, 041PP2016, 043PP2016, 044PP2016, 046PP2016, 053PP2016, 054PP2016, 057PP2016, 073PP2016,	001PP2015, 007PP2015, 011PP2015, 027PP2016, 032PP2016, 045PP2016, 047PP2016, 048PP2016, 051PP2016, 052PP2016,	<i>iroB, iroC, iroD, iroE, iroN, iucB, hlyE, hlyF, iucA, iucC, iucD, iutA, etsA, etsB, etsC, wxz(O78), fyuA, irp1,</i>

Numer losowania	Numery szczepów <i>E.coli</i> (P)	Numery szczepów <i>E.coli</i> (NP)	Geny, dla których $p < 0,05$
	085PP2016, 110PP2016, 124PP2016, 144PP2017, 149PP2017, 155PP2017, 158PP2017	069PP2016, 082PP2016, 107PP2016, 135PP2017, 139PP2017, 141PP2017, 147PP2017	<i>irp2</i> , <i>ybtE</i> , <i>ybtP</i> , <i>ybtS</i> , <i>ybtT</i> , <i>ybtU</i> , <i>ybtX</i> , <i>ompT</i> , <i>focB</i> , <i>hlyD</i>
8	002PP2015, 022PP2016, 023PP2016, 028PP2016, 029PP2016, 033PP2016, 036PP2016, 044PP2016, 057PP2016, 059PP2016, 063PP2016, 078PP2016, 086PP2016, 123PP2016, 142PP2017, 154PP2017, 157PP2017	001PP2015, 007PP2015, 011PP2015, 027PP2016, 032PP2016, 045PP2016, 047PP2016, 048PP2016, 051PP2016, 052PP2016, 069PP2016, 082PP2016, 107PP2016, 135PP2017, 139PP2017, 141PP2017, 147PP2017	<i>focB</i> , <i>iroB</i> , <i>iroC</i> , <i>iroD</i> , <i>iroE</i> , <i>hlyD</i> , <i>hlyF</i> , <i>iroN</i> , <i>iucB</i> , <i>aufE</i> , <i>aufF</i> , <i>etsA</i> , <i>etsB</i> , <i>etsC</i> , <i>vat</i> , <i>htrC</i> , <i>fyuA</i> , <i>iucA</i> , <i>iucC</i> , <i>iucD</i> , <i>iutA</i> , <i>ybtE</i> , <i>ybtT</i> , <i>ybtX</i> , <i>focC</i> , <i>fepC</i> , <i>tsh</i> , <i>irp1</i> , <i>irp2</i> , <i>ybtA</i> , <i>ybtP</i> , <i>ybtS</i> , <i>ybtU</i> , <i>ompT</i> , <i>chuS</i> , <i>chuT</i> , <i>chuU</i> , <i>chuW</i> , <i>chuX</i> , <i>chuY</i> , <i>aufA</i> , <i>aufB</i> , <i>aufC</i> , <i>aufD</i> , <i>aufG</i> , <i>chuA</i> , <i>aec18</i> , <i>usp</i>
9	016PP2015, 019PP2015, 022PP2016, 041PP2016, 050PP2016, 053PP2016, 066PP2016, 077PP2016, 085PP2016, 089PP2016, 113PP2016, 130PP2017, 144PP2017, 151PP2017, 152PP2017, 153PP2017, 154PP2017	001PP2015, 007PP2015, 011PP2015, 027PP2016, 032PP2016, 045PP2016, 047PP2016, 048PP2016, 051PP2016, 052PP2016, 069PP2016, 082PP2016, 107PP2016, 135PP2017, 139PP2017, 141PP2017, 147PP2017	<i>iucB</i> , <i>iucA</i> , <i>iucC</i> , <i>iucD</i> , <i>iutA</i> , <i>hlyE</i> , <i>fyuA</i> , <i>ybtE</i> , <i>ybtT</i> , <i>wzx(O78)</i> , <i>iroC</i> , <i>irp1</i> , <i>irp2</i> , <i>ybtA</i> , <i>ybtP</i> , <i>ybtS</i> , <i>ybtU</i> , <i>ybtX</i> , <i>hlyF</i> , <i>etsA</i> , <i>etsB</i> , <i>etsC</i> , <i>iroB</i> , <i>iroD</i> , <i>iroE</i> , <i>iron</i> , <i>focB</i> , <i>hlyD</i>
10	002PP2015, 014PP2015, 015PP2015, 017PP2015, 021PP2016, 033PP2016, 037PP2016, 059PP2016, 067PP2016, 081PP2016, 087PP2016, 106PP2016, 121PP2016, 126PP2016, 149PP2017, 153PP2017, 154PP2017	001PP2015, 007PP2015, 011PP2015, 027PP2016, 032PP2016, 045PP2016, 047PP2016, 048PP2016, 051PP2016, 052PP2016, 069PP2016, 082PP2016, 107PP2016, 135PP2017, 139PP2017, 141PP2017, 147PP2017	<i>etsA</i> , <i>etsB</i> , <i>iroB</i> , <i>iroC</i> , <i>iroD</i> , <i>iroE</i> , <i>iroN</i> , <i>hlyF</i> , <i>etsC</i> , <i>ompT</i> , <i>fyuA</i> , <i>iucA</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>ybtE</i> , <i>ybtT</i> , <i>iucB</i> , <i>iucD</i> , <i>aufE</i> , <i>aufF</i> , <i>hlyD</i>

Jak wynika z przeprowadzonej analizy, zauważono statystycznie istotne różnice dla wybranych genów: *iroC*, *hlyF*, *etsA*, *iucB* we wszystkich przedstawionych losowaniach,

dla genów: *ompT*, *fyuA*, *ybtE*, *irp1* w 9 spośród 10 losowań, dla genu *iutA* w 7 spośród 10 losowań, a dla genu *wzx* serotypu O78 w 6 spośród 10 losowań. Wobec powyższego, uznano, że wyniki uzyskane w pierwszym teście Fisher'a przeprowadzonym na nierównolicznych zbiorach są wiarygodne i mogą posłużyć do opracowania modeli predykcyjnych patogenności szczepów *E.coli*.

4.6.2. Weryfikacja skuteczności modeli predykcyjnych

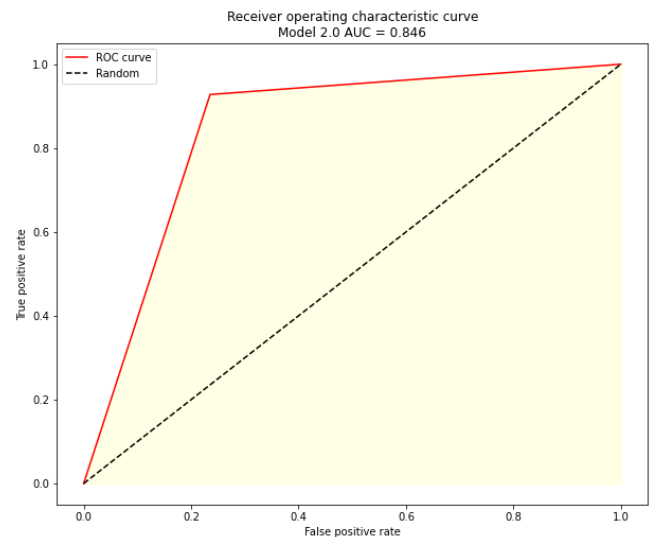
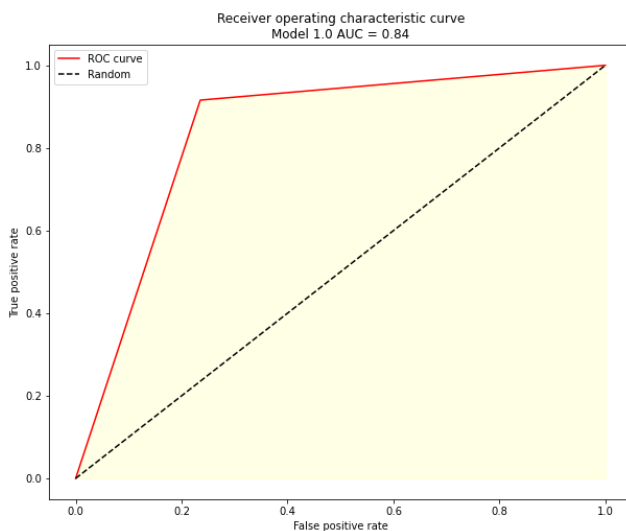
Testowano różne kombinacje wybranych 11 czynników wirulencji i oceniano skuteczność przewidywania patogenności szczepów *E. coli* za pomocą wybranych genów. Analizowane układy wraz z opisanymi parametrami oceny testu przedstawiono w Tabeli 15., natomiast krzywe ROC i pola pod wykresem AUC na Rysunku 11.

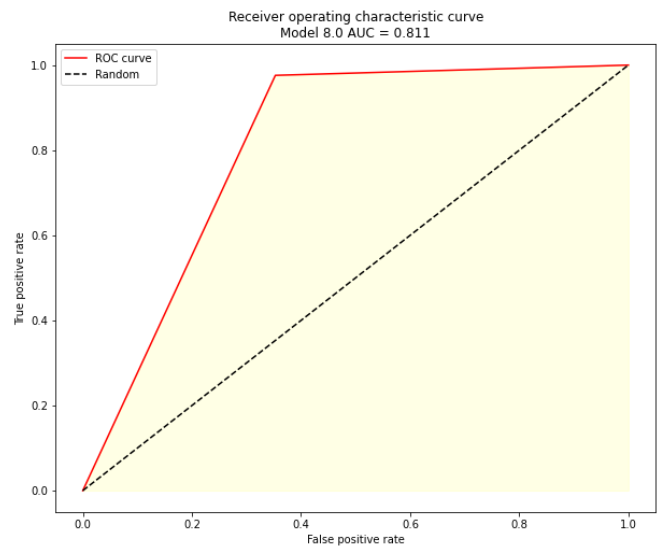
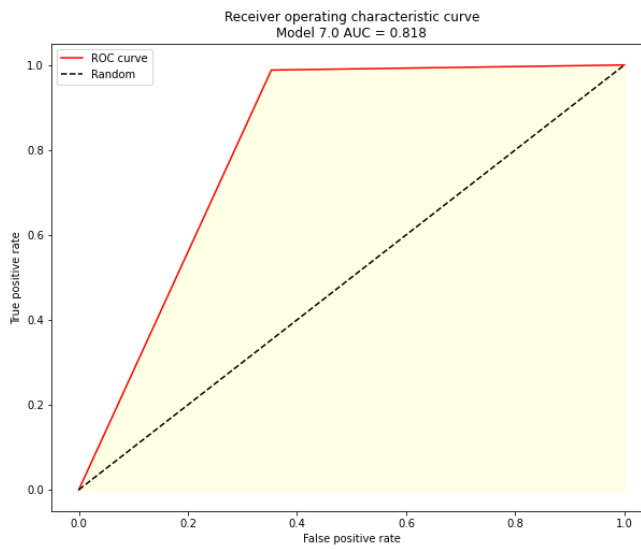
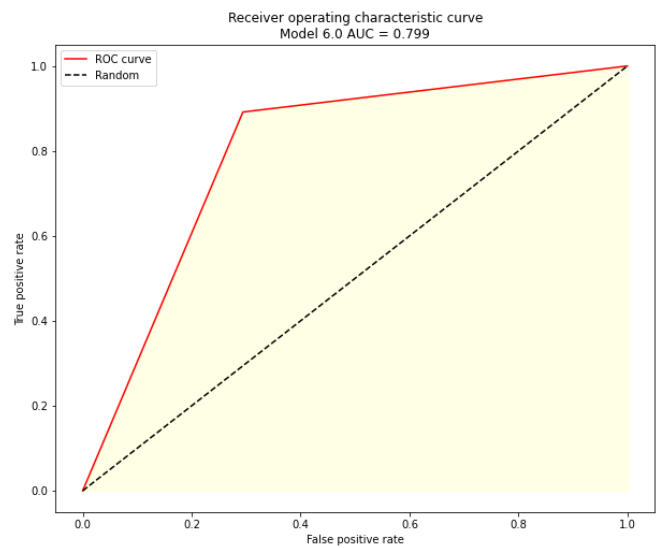
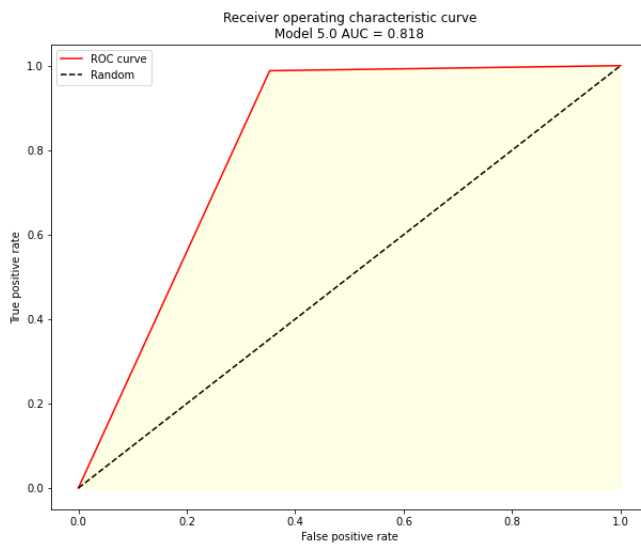
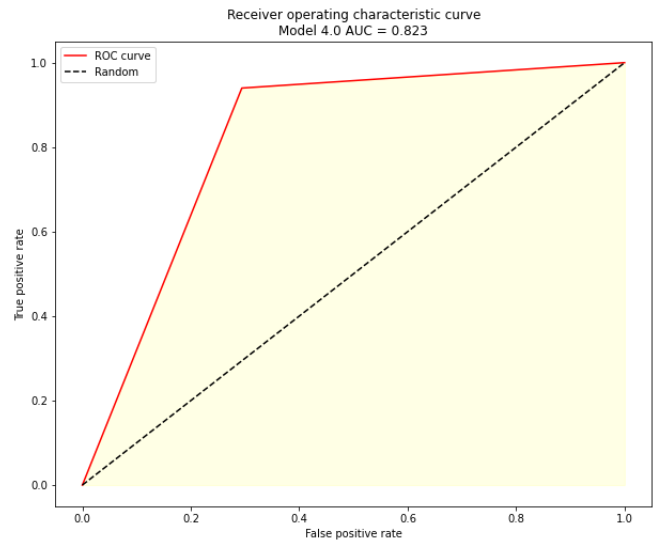
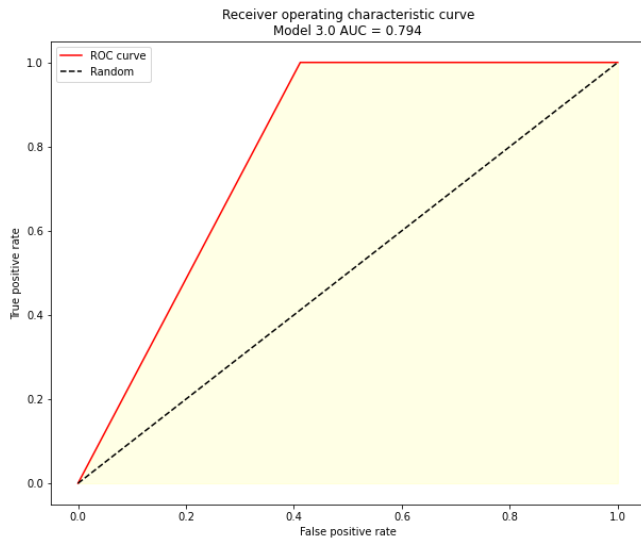
Tabela 15. Ocena skuteczności modeli predykcyjnych

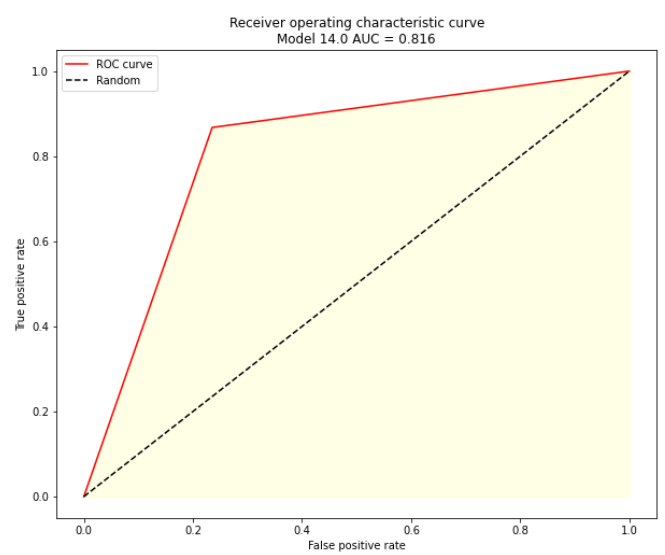
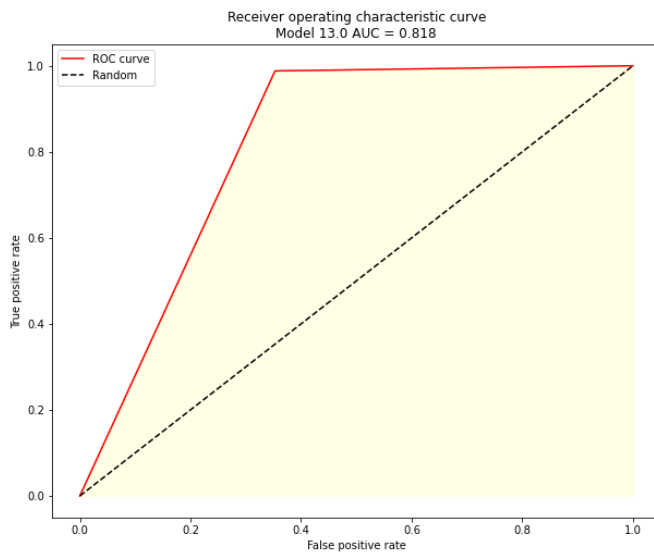
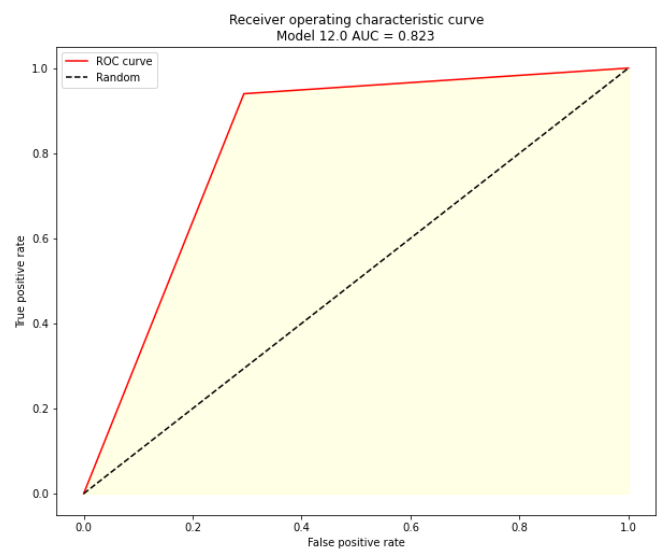
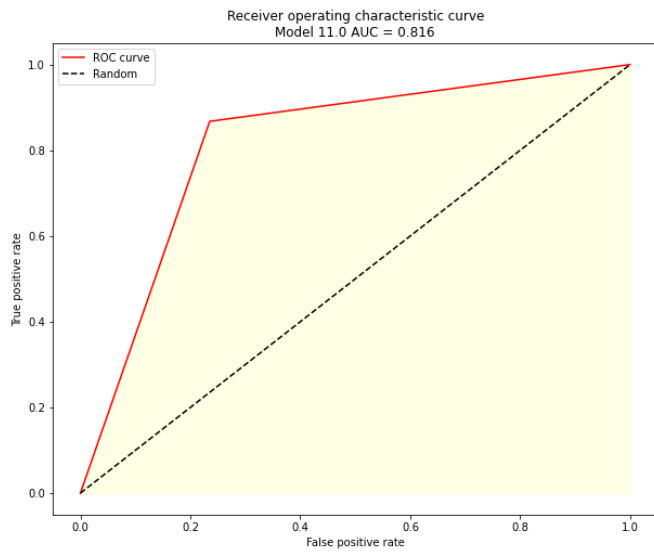
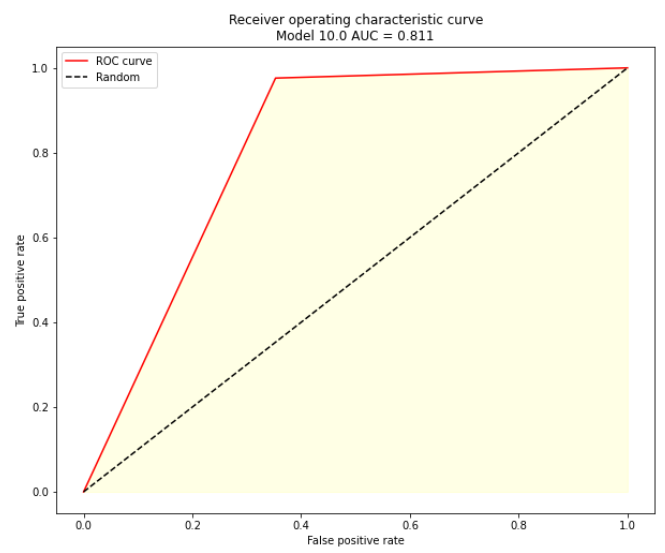
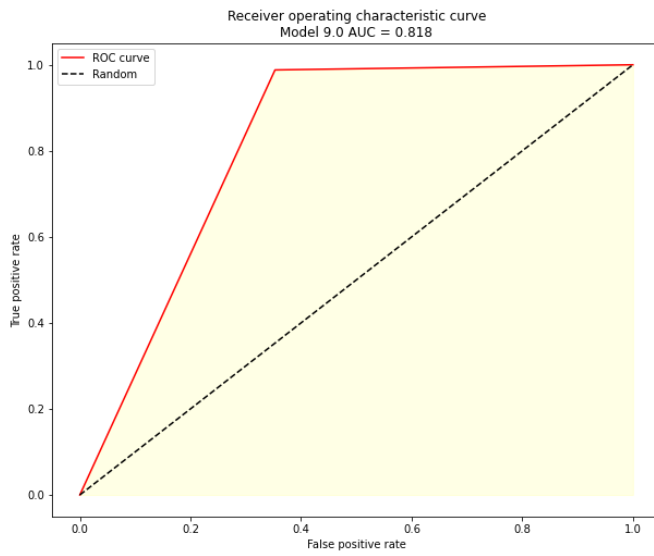
Wersja	Wybrane geny	Kryterium P/NP	Czułość [%]	Specyficzność [%]	PPV [%]	NPV [%]	Dokładność [%]
1	<i>iroC</i> , <i>hlyF</i> , <i>etsA</i> , <i>iucB</i> , <i>ompT</i> , <i>iutA</i> , <i>fyuA</i> , <i>ybtE</i> , <i>irp1</i> , <i>wzx(O78)</i>	0-4 geny wirulencji – szczep NP; 5-9 genów wirulencji lub O78 – szczep P	91,57%	76,47%	95,00%	65,00%	89,00%
2	<i>iroC</i> , <i>hlyF</i> , <i>etsA</i> , <i>iucB</i> , <i>ompT</i> , <i>iutA</i> , <i>fyuA</i> , <i>ybtE</i> , <i>wzx(O78)</i>	0-3 geny wirulencji – szczep NP; 4-8 genów wirulencji lub O78 – szczep P	92,77%	76,47%	95,06%	68,42%	90,00%
3	<i>iroC</i> , <i>hlyF</i> , <i>etsA</i> , <i>iucB</i> , <i>ompT</i> , <i>iutA</i> , <i>wzx(O78)</i>	0-2 geny wirulencji – szczep NP; 3-6 genów wirulencji lub O78 – szczep P	100,00%	58,82%	92,22%	100,00%	93,00%
4	<i>iroC</i> , <i>hlyF</i> , <i>etsA</i> , <i>iucB</i> , <i>wzx(O78)</i>	0-2 geny wirulencji – szczep NP; 3-4 geny wirulencji	93,98%	70,59%	93,98%	70,59%	90,00%

Wersja	Wybrane geny	Kryterium P/NP	Czułość [%]	Specyficzność [%]	PPV [%]	NPV [%]	Dokładność [%]
		lub O78 – szczep P					
5	<i>iroC, hlyF, etsA, iucB, wzx(O78)</i>	0-1 gen wirulencji – szczep NP; 2-4 geny wirulencji lub O78 – szczep P	98,80%	64,71%	93,18%	91,67%	93,00%
6	<i>iroC, hlyF, etsA, wzx(O78)</i>	0-2 geny wirulencji – szczep NP; 3 geny wirulencji lub O78 – szczep P	89,16%	70,59%	93,67%	57,14%	86,00%
7	<i>iroC, hlyF, etsA, wzx(O78)</i>	0-1 gen wirulencji – szczep NP; 2-3 geny wirulencji lub O78 – szczep P	98,80%	64,71%	93,18%	91,67%	93,00%
8	<i>iroC, hlyF, wzx(O78)</i>	0-1 gen wirulencji – szczep NP; 2 geny wirulencji lub O78 – szczep P	97,59%	64,71%	93,10%	84,62%	92,00%
9	<i>iroC, hlyF, wzx(O78)</i>	Brak genów – szczep NP; dowolny z genów – szczep P	98,80%	64,71%	93,18%	91,67%	93,00%
10	<i>iroC, hlyF, ompT, wzx(O78)</i>	0-2 geny wirulencji – szczep NP; 3 geny wirulencji lub O78 – szczep P	97,59%	64,71%	93,10%	84,62%	92,00%
11	<i>iroC, hlyF, iucB, fyuA,</i>	0-2 geny wirulencji	86,75%	76,47%	94,74%	54,17%	85,00%

Wersja	Wybrane geny	Kryterium P/NP	Czułość [%]	Specyficzność [%]	PPV [%]	NPV [%]	Dokładność [%]
	<i>irp1</i> , <i>wzx(O78)</i>	– szczep NP; 3-5 genów wirulencji lub O78 – szczep P					
12	<i>iroC</i> , <i>hlyF</i> , <i>etsA</i> , <i>iucB</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp1</i> , <i>wzx(O78)</i>	0-2 geny wirulencji – szczep NP; 3-6 genów wirulencji lub O78 – szczep P	93,98%	70,59%	93,98%	70,59%	90,00%
13	<i>iroC</i> , <i>hlyF</i> , <i>iucB</i> , <i>ybtE</i> , <i>wzx(O78)</i>	0-1 geny wirulencji – szczep NP; 2-4 geny wirulencji lub O78 – szczep P	98,80%	64,71%	93,18%	91,67%	93,00%
14	<i>iroC</i> , <i>iucB</i> , <i>ybtE</i> , <i>wzx(O78)</i>	0-1 gen wirulencji – szczep NP; 2-3 geny wirulencji lub O78 – szczep P	86,75%	76,47%	94,74%	54,17%	85,00%







Rysunek 11. Krzywe ROC-AUC dla wszystkich wersji testu

Wg prezentowanych wyników wersje proponowanych testów o numerach: 3, 5, 7, 9 i 13 charakteryzowały się najwyższą dokładnością: na poziomie 93%. Spośród nich, wersja 3. osiągnęła najniższą specyficzną (58,82%), pozostałe wersje uznano za równoważne. Każda z pozostałych kombinacji (5, 7, 9 i 13) charakteryzowała się tym samym polem pod wykresem AUC = 0,818. Do zaprojektowania testu PCR wybrano wersję 9., tj. analizę obecności genów: *iroC*, *hlyF* i *wzx* – flipazy antygeny O serotypu O78, gdzie obecność któregośkolwiek z nich świadczy o zaklasyfikowaniu szczepu jako patogenny. Wersja ta charakteryzuje się najmniejszą liczbą analizowanych produktów, co ułatwia analizę i obniża koszty diagnostyki. W Tabeli 16. przedstawiono analizę obecności genów oraz klasyfikację danego szczepu w oparciu o ich obecność lub brak, zaś w Tabeli 17. macierz pomyłek dla tej wersji testu. Wybrany model charakteryzuje się wysoką czułością (98,80%), dodatnią i ujemną wartością predykcyjną (odpowiednio 93,18% i 91,67%) oraz dokładnością (93,00%). Jedyne parametry testu o niższych wartościach stanowi specyficzną (64,71%, 6 wyników fałszywie dodatnich). Spośród wyników fałszywie dodatnich, 3 dotyczyły szczepów, gdzie pierwotna klasyfikacja wskazywała na szczep patogenny (ptaki chore), natomiast 3 zostały już wstępnie zaklasyfikowane jako niepatogenne (ptaki zdrowe).

Tabela 16. Analiza obecności wybranych czynników wirulencji i klasyfikacja szczepów w oparciu o ich obecność lub brak

Numer szczepu <i>E. coli</i>	Gen			Klasyfikacja na podstawie wykrycia analizowanych czynników wirulencji	Poprawność przewidywania
	<i>iroC</i>	<i>hlyF</i>	<i>wzx</i> (O78)		
001PP2015	0	0	0	NP	TAK
002PP2015	1	1	0	P	TAK
004PP2015	1	1	0	P	TAK
005PP2015	1	1	0	P	TAK
007PP2015	0	0	0	NP	TAK
009PP2015	1	1	1	P	TAK
011PP2015	0	0	0	NP	TAK
012PP2015	1	1	0	P	TAK
014PP2015	1	0	1	P	TAK
015PP2015	1	1	0	P	TAK
016PP2015	1	1	1	P	TAK
017PP2015	1	1	0	P	TAK
018PP2015	1	1	0	P	TAK

Numer szczepu <i>E. coli</i>	Gen			Klasyfikacja na podstawie wykrycia analizowanych czynn timer wirulencji	Poprawność przewidywania
	<i>iroC</i>	<i>hlyF</i>	<i>wzx (O78)</i>		
019PP2015	1	1	1	P	TAK
020PP2016	1	1	0	P	TAK
021PP2016	1	1	0	P	TAK
022PP2016	1	1	1	P	TAK
023PP2016	1	1	0	P	TAK
024PP2016	1	1	0	P	TAK
027PP2016	1	1	0	P	NIE
028PP2016	1	1	0	P	TAK
029PP2016	1	1	0	P	TAK
030PP2016	1	1	0	P	TAK
031PP2016	1	1	1	P	TAK
032PP2016	0	0	0	NP	TAK
033PP2016	1	1	0	P	TAK
034PP2016	1	1	0	P	TAK
035PP2016	1	1	1	P	TAK
036PP2016	1	1	0	P	TAK
037PP2016	1	1	0	P	TAK
038PP2016	1	1	0	P	TAK
039PP2016	1	1	1	P	TAK
040PP2016	1	1	1	P	TAK
041PP2016	1	1	1	P	TAK
043PP2016	1	1	1	P	TAK
044PP2016	1	1	1	P	TAK
045PP2016	1	1	0	P	NIE
046PP2016	1	1	0	P	TAK
047PP2016	0	0	0	NP	TAK
048PP2016	0	0	0	NP	TAK
050PP2016	1	1	0	P	TAK
051PP2016	0	0	0	NP	TAK
052PP2016	0	0	0	NP	TAK
053PP2016	1	1	0	P	TAK
054PP2016	1	1	0	P	TAK
057PP2016	1	1	0	P	TAK
059PP2016	1	1	0	P	TAK
062PP2016	1	1	0	P	TAK
063PP2016	1	1	0	P	TAK
066PP2016	1	1	0	P	TAK

Numer szczepu <i>E. coli</i>	Gen			Klasyfikacja na podstawie wykrycia analizowanych czynn timer wirulencji	Poprawność przewidywania
	<i>iroC</i>	<i>hlyF</i>	<i>wzx (O78)</i>		
067PP2016	1	1	0	P	TAK
069PP2016	1	1	0	P	NIE
070PP2016	1	1	0	P	TAK
073PP2016	1	1	0	P	TAK
075PP2016	1	1	0	P	TAK
076PP2016	1	1	1	P	TAK
077PP2016	1	1	0	P	TAK
078PP2016	1	1	0	P	TAK
079PP2016	1	1	0	P	TAK
080PP2016	1	1	0	P	TAK
081PP2016	1	1	0	P	TAK
082PP2016	0	0	0	NP	TAK
083PP2016	1	1	1	P	TAK
084PP2016	1	1	0	P	TAK
085PP2016	1	1	0	P	TAK
086PP2016	1	1	0	P	TAK
087PP2016	1	1	1	P	TAK
088PP2016	1	1	1	P	TAK
089PP2016	1	1	0	P	TAK
105PP2016	1	1	0	P	TAK
106PP2016	1	1	0	P	TAK
107PP2016	1	1	0	P	NIE
110PP2016	1	1	0	P	TAK
113PP2016	1	1	0	P	TAK
114PP2016	1	1	0	P	TAK
121PP2016	1	1	0	P	TAK
123PP2016	1	1	0	P	TAK
124PP2016	1	1	0	P	TAK
126PP2016	0	1	0	P	TAK
130PP2017	1	1	0	P	TAK
131PP2017	1	1	0	P	TAK
134PP2017	1	1	0	P	TAK
135PP2017	1	1	0	P	NIE
139PP2017	0	0	0	NP	TAK
141PP2017	1	1	0	P	NIE
142PP2017	1	1	0	P	TAK
143PP2017	1	1	0	P	TAK

Numer szczepu <i>E. coli</i>	Gen			Klasyfikacja na podstawie wykrycia analizowanych czynników wirulencji	Poprawność przewidywania
	<i>iroC</i>	<i>hlyF</i>	<i>wzx (O78)</i>		
144PP2017	0	0	1	P	TAK
147PP2017	0	0	0	NP	TAK
149PP2017	0	0	0	NP	NIE
151PP2017	0	0	1	P	TAK
152PP2017	0	0	1	P	TAK
153PP2017	1	1	0	P	TAK
154PP2017	1	1	0	P	TAK
155PP2017	1	1	0	P	TAK
156PP2017	1	1	1	P	TAK
157PP2017	1	1	0	P	TAK
158PP2017	1	1	1	P	TAK
159PP2017	1	1	0	P	TAK
β001PP2016	1	1	0	P	TAK

P – szczep patogenny

NP – szczep niepatogenny

0 – brak obecności danego czynnika wirulencji w szczepie

1 – obecność danego czynnika wirulencji w szczepie

Tabela 17. Macierz pomyłek dla modelu w wersji 8.

		STAN FAKTYCZNY	
		<i>P</i>	<i>NP</i>
PRZEWIDYWANIE	<i>P</i>	82 <i>TP</i>	6 <i>FP</i>
	<i>NP</i>	1 <i>FN</i>	11 <i>TN</i>

P – szczep patogenny

NP – szczep niepatogenny

TP – true positive

FP – false positive

FN – false negative

TN – true negative

4.7. Opracowanie testu PCR typu multipleks

Startery do reakcji PCR zaprojektowano zgodnie z opisem w punkcie 3.2.11.5. Projektowanie starterów, aby mogły działać w reakcji typu multipleks. Ich sekwencje przedstawiono w Tabeli 3 (punkt 3.1.5. Oligonukleotydy).

Przeprowadzono analizę PCR, amplifikując wybrane geny wirulencji w badanej kolekcji *E.coli* w celu weryfikacji zgodności z klasyfikacją *in silico*. Reakcję prowadzono tak, jak opisano w punkcie 3.2.7.2. PCR typu multipleks, zgodnie z warunkami z Tabeli 6. Wyniki uzyskane po przeprowadzonej analizie PCR typu multipleks przedstawiono w Tabeli 18. Otrzymano 100% zgodności z wynikami *in silico*, w tym 93 prawidłowe wyniki oraz 7 nieprawidłowych (6 fałszywie pozytywnych i 1 fałszywie negatywny) w stosunku do klasyfikacji opartej o model *in ovo*.

Tabela 18. Klasyfikacja szczepów *E. coli* w oparciu o zaprojektowaną metodę PCR typu multipleks

Nr szczepu <i>E. coli</i>	Produkty reakcji PCR			Klasyfikacja szczepów w oparciu o analizę PCR	
	<i>iroC</i> (732 bp)	<i>hlyF</i> (458 bp)	<i>wzx</i> (O78) (994bp)	P/NP	Zgodność klasyfikacji z analizą <i>in silico</i>
001PP2015	–	–	–	NP	√
002PP2015	+	+	–	P	√
004PP2015	+	+	–	P	√
005PP2015	+	+	–	P	√
007PP2015	–	–	–	NP	√
009PP2015	+	+	+	P	√
011PP2015	–	–	–	NP	√
012PP2015	+	+	–	P	√
014PP2015	+	+	+	P	√
015PP2015	+	+	–	P	√
016PP2015	+	+	+	P	√
017PP2015	+	+	–	P	√
018PP2015	+	+	–	P	√
019PP2015	+	+	+	P	√
020PP2016	+	+	–	P	√
021PP2016	+	+	–	P	√
022PP2016	+	+	+	P	√
023PP2016	+	+	–	P	√
024PP2016	+	+	–	P	√
027PP2016	+	+	–	P	√

Nr szczepu <i>E. coli</i>	Produkty reakcji PCR			Klasyfikacja szczepów w oparciu o analizę PCR	
	<i>iroC</i> (732 bp)	<i>hlyF</i> (458 bp)	<i>wzx</i> (O78) (994bp)	P/NP	Zgodność klasyfikacji z analizą <i>in silico</i>
028PP2016	+	+	-	P	√
029PP2016	+	+	-	P	√
030PP2016	+	+	-	P	√
031PP2016	+	+	+	P	√
032PP2016	-	-	-	NP	√
033PP2016	+	+	-	P	√
034PP2016	+	+	-	P	√
035PP2016	+	+	+	P	√
036PP2016	+	+	-	P	√
037PP2016	+	+	-	P	√
038PP2016	+	+	-	P	√
039PP2016	+	+	+	P	√
040PP2016	+	+	+	P	√
041PP2016	+	+	+	P	√
043PP2016	+	+	+	P	√
044PP2016	+	+	+	P	√
045PP2016	+	+	-	P	√
046PP2016	+	+	-	P	√
047PP2016	-	-	-	NP	√
048PP2016	-	-	-	NP	√
050PP2016	+	+	-	P	√
051PP2016	-	-	-	NP	√
052PP2016	-	-	-	NP	√
053PP2016	+	+	-	P	√
054PP2016	+	+	-	P	√
057PP2016	+	+	-	P	√
059PP2016	+	+	-	P	√
062PP2016	+	+	-	P	√
063PP2016	+	+	-	P	√
066PP2016	+	+	-	P	√
067PP2016	+	+	-	P	√
069PP2016	+	+	-	P	√
070PP2016	+	+	-	P	√
073PP2016	+	+	-	P	√
075PP2016	+	+	-	P	√
076PP2016	+	+	+	P	√

Nr szczepu <i>E. coli</i>	Produkty reakcji PCR			Klasyfikacja szczepów w oparciu o analizę PCR	
	<i>iroC</i> (732 bp)	<i>hlyF</i> (458 bp)	<i>wzx</i> (O78) (994bp)	P/NP	Zgodność klasyfikacji z analizą <i>in silico</i>
077PP2016	+	+	-	P	√
078PP2016	+	+	-	P	√
079PP2016	+	+	-	P	√
080PP2016	+	+	-	P	√
081PP2016	+	+	-	P	√
082PP2016	-	-	-	NP	√
083PP2016	+	+	+	P	√
084PP2016	+	+	-	P	√
085PP2016	+	+	-	P	√
086PP2016	+	+	-	P	√
087PP2016	+	+	+	P	√
088PP2016	+	+	+	P	√
089PP2016	+	+	-	P	√
105PP2016	+	+	-	P	√
106PP2016	+	+	-	P	√
107PP2016	+	+	-	P	√
110PP2016	+	+	-	P	√
113PP2016	+	+	-	P	√
114PP2016	+	+	-	P	√
121PP2016	+	+	-	P	√
123PP2016	+	+	-	P	√
124PP2016	+	+	-	P	√
126PP2016	-	+	-	P	√
130PP2017	+	+	-	P	√
131PP2017	+	+	-	P	√
134PP2017	+	+	-	P	√
135PP2017	+	+	-	P	√
139PP2017	-	-	-	NP	√
141PP2017	+	+	-	P	√
142PP2017	+	+	-	P	√
143PP2017	+	+	-	P	√
144PP2017	-	-	+	P	√
147PP2017	-	-	-	NP	√
149PP2017	-	-	-	NP	√
151PP2017	-	-	+	P	√
152PP2017	-	-	+	P	√

Nr szczepu <i>E. coli</i>	Produkty reakcji PCR			Klasyfikacja szczepów w oparciu o analizę PCR	
	<i>iroC</i> (732 bp)	<i>hlyF</i> (458 bp)	<i>wzx</i> (O78) (994bp)	P/NP	Zgodność klasyfikacji z analizą <i>in silico</i>
153PP2017	+	+	–	P	√
154PP2017	+	+	–	P	√
155PP2017	+	+	–	P	√
156PP2017	+	+	+	P	√
157PP2017	+	+	–	P	√
158PP2017	+	+	+	P	√
159PP2017	+	+	–	P	√
β001PP2016	+	+	–	P	√

+ – obecność produktu PCR

– – brak produktu PCR

P – szczep patogenny

NP – szczep niepatogenny

Wyniki uzyskane z przeprowadzonych badań pozwoliły na opracowanie szybkiej i niekosztownej metody diagnostycznej, opartej o PCR typu multipleks, która w efektywny sposób pozwala na wykrycie szczepów *Escherichia coli* mogących być patogenami drobiu (APEC). Proponowany test wymaga dalszej walidacji przed wprowadzeniem do praktyki.

5. Dyskusja

Kolibakterioza, jako jedna z najczęściej występujących chorób bakteryjnych ptactwa, stanowi poważny problem w chowie i hodowli drobiu, przyczyniając się do ogromnych strat ekonomicznych (Barnes i wsp., 2008, Stromberg i wsp., 2017). W ostatnich latach obserwuje się wzrost przypadków tej choroby m.in. wśród brojlerów, co może być spowodowane postępującą antybiotykoopornością bakterii *Escherichia coli*. Dodatkowo, szczepy APEC wywołujące kolibakteriozę są ogromnie zróżnicowane, co wpływa na trudności diagnostyczne (Vila i wsp., 2016, Ronco i wsp., 2017). W związku z powyższym, bardzo istotne jest zbadanie mechanizmów warunkujących tę chorobę, co może doprowadzić do ujednoliconej diagnostyki i możliwości zastosowania celowanej terapii.

W prezentowanej pracy wykorzystano sekwencjonowanie całych genomów (WGS) szczepów *E. coli* do przeprowadzenia analizy bioinformatycznej w kierunku obecności wybranych czynników wirulencji, zaprojektowania metody diagnostycznej opartej o PCR oraz jej oceny. Dodatkowo, zweryfikowano przynależność szczepów do odpowiednich grup patogenności w oparciu o testy przeżywalności zarodków w modelu *in ovo*. Zastosowana w pracy metoda stanowi nowatorskie podejście do oceny patogenności szczepów i doboru odpowiednich determinant wirulencji.

Szczepy *E. coli* powodujące kolibakteriozę stanowią heterogenną grupę – nawet izolaty pozyskane z tych samych lokalizacji mogą posiadać inny profil genów wirulencji. Dodatkowo, bakterie *E. coli* obecne są we florze jelitowej ptaków jako niegroźne komensale, jednak w określonych warunkach również te bakterie mogą wywoływać efekt chorobotwórczy (Guabiraba i Schouler, 2015). Pomimo różnych lokalizacji w organizmie, podczas izolacji szczepów patogennych łatwo jest pozyskać równolegle szczepy komensalne, jak również pobrać wiele niezależnych izolatów pochodzących od tego samego szczepu. W niniejszej pracy pozyskiwano izolaty z terenu Polski i Ukrainy, w tym kilkakrotnie z tych samych ferm, zarówno od chorego, jak i zdrowego ptactwa, a w pierwszym etapie pracy przeprowadzono różnicowanie szczepów. Pierwotna klasyfikacja na izolaty reprezentujące szczepy różne lub tożsame wykonana została przy użyciu metody PCR MP. O wyborze tej techniki zdecydowano na podstawie doniesień literaturowych, gdzie siła różnicująca PCR MP została porównana z metodą elektroforezy pulsacyjnej (PFGE) i okazała się posiadać wyższą wartość współczynnika HGDI (0,939

do 0,608). Dodatkowo, metoda PCR MP została oceniona pozytywnie w różnicowaniu bardzo zbliżonych do siebie geograficznie szczepów *Salmonella enterica* (Żaczek i wsp., 2015), co stanowi analogiczną sytuację do szczepów *E. coli* analizowanych w tej pracy. Uzyskane wyniki (Rysunek 8.) w postaci różnych profili na elektroforegramach potwierdziły możliwość wykorzystania tej techniki do zróżnicowania szczepów oraz pozwoliły ograniczyć liczbę próbek poddanych reakcji sekwencjonowania NGS.

Mimo coraz większej powszechności, metoda sekwencjonowania, zastosowana w tej pracy, nie jest metodą pierwszego wyboru przy analizie czynników wirulencji szczepów APEC, głównie z uwagi na koszty. W literaturze istnieje wiele podejść diagnostycznych opierających się o metodę PCR, które zazwyczaj koncentrują się na analizie tylko kilku lub kilkunastu genów patogenności (m.in. Rodriguez-Siek i wsp., 2005, Johnson i wsp., 2008, Dissanayake i wsp., 2014, De Carli i wsp., 2015, Paixão i wsp., 2016). Analogiczne podejście do problemu, jakie zastosowano w przedstawionej pracy, opisano w publikacji Ronco i wsp. (2017). Autorzy tej pracy zsekwencjonowali genomy 114 izolatów *E. coli*, jednak skupili się głównie na analizie jednego serotypu O78:H4, typu sekwencyjnego ST117 oraz kilkunastu genach wirulencji. Grupa Cordoniego i wsp. (2016) również sekwencjonowała genomy 95 szczepów APEC pochodzących z Europy oraz projektowała testy PCR, definiujące te szczepy w oparciu o analizy *in silico*. W niniejszej pracy przeprowadzono szeroką analizę bioinformatyczną genomów *E. coli*: serotypowanie, analizę genów odpowiedzialnych za antybiotykooporność oraz obecność 194 wybranych czynników wirulencji. Warto zaznaczyć, że podczas oceny obecności determinant patogenności w szczepach analizowano sekwencje aminokwasowe, aby móc ocenić istotne zmiany, które mogą wpływać na funkcję białka, a nie zmiany synonimiczne, co stanowiło innowacyjne podejście.

Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że spośród analizowanych czynników wirulencji istnieją takie, które nie miały bezpośredniego wpływu na zjadliwość analizowanych szczepów – były to geny obecne we wszystkich próbach, niezależnie od grupy patogenności oraz geny, których obecności nie stwierdzono w żadnym ze szczepów. Natomiast najbardziej różnicującymi czynnikami wskazującymi na patogenność, były geny kodujące mechanizmy pozyskiwania żelaza: siderofory *iro*, *iuc*, *fyuA*, *ybt*, transportery *ets* oraz hemolizyna *hlyF* i białko błony zewnętrznej *ompT*. Wyniki te znajdują potwierdzenie w danych literaturowych. Szeroko opisywana jest zdolność szczepów APEC do pozyskiwania żelaza, a geny wymienionych wyżej operonów odnajdywane są

najczęściej w szczepach patogennych, w przeciwieństwie do szczepów komensalnych. Sugeruje to, że cecha ta może odgrywać istotną rolę w patogenezie kolibakteriozy. Wiele opisywanych testów PCR określających patogenność szczepów APEC skupia się na amplifikacji części z wyżej wymienionych genów. Wśród najnowszych badań takie podejście można spotkać m.in. u Subedi i wsp. (2018), którzy badali obecność 11 genów wirulencji, w tym *iucD*, *ompT* i *hlyF*. W pracy De Carli i wsp. (2015) skupiono się na analizie 10 genów, m.in. *iroN*, *fyuA*, *ompT* i *hlyF*. Analizę kilku do kilkunastu genów odpowiedzialnych za patogenność kolibakteriozy i wyborze takiej liczby genów, która pozwalała na przyporządkowanie szczepu do odpowiedniej grupy patogenności opisali w swoich pracach: Johnson i wsp., 2008, Paixão i wsp., 2016, Maciel i wsp., 2017 oraz Mohamed i wsp., 2018. W dostępnej literaturze nie odnaleziono jednak badań, w których przanalizowano kilkaset czynników wirulencji równocześnie, badając ich wpływ na patogenność szczepu. W przedstawianej tutaj pracy przeprowadzoną taką analizę *in silico* opartą na sekwencjonowaniu NGS genomów wszystkich (112) szczepów.

Dodatkowym czynnikiem patogenności było występowanie serotypu O78. Stwierdzono, że spośród wielu innych, jedynie ten serotyp jest obecny w szczepach APEC ze statystycznie większą częstością oraz, że sam może być determinantą patogenności – w 14% przypadków występował niezależnie od innych czynników zjadliwości. Ta obserwacja zgodna jest z danymi literaturowymi o obecności serotypu O78 w szczepach APEC. W pracy Ronco i wsp. (2017), podobnie jak w przedstawionych w niniejszej pracy wynikach, zauważono przewagę serotypu O78 w stosunku do innych serotypów, zdefiniowanych dla szczepów APEC (obecność w 43% badanych izolatów u Ronco i wsp. i w 25% izolatów w niniejszej pracy). W badaniach Huja i wsp. (2015) zauważono natomiast, że spośród serotypów *E. coli* najczęściej wywołujących kolibakteriozę (O1, O2 i O78), szczepy zdefiniowane jako O78 różnią się od dwóch pozostałych grup. Nie posiadają one genów kodujących polisacharydowy antygen otoczkowy K1; ich otoczka zbudowana jest podobnie jak antygen somatyczny O, co wydaje się mieć istotne znaczenie dla patogenności. Analiza genomów szczepów *E. coli* o serotypie O78 pozwoliła stwierdzić, że są one bliżej spokrewnione z enterotoksycznymi szczepami jelitowymi niż z pozajelitowymi patogenami o serotypie O1. W pracy Dziva i wsp. (2013) zasugerowano, że niezbędna jest dogłębna analiza sekwencji genomów bakterii APEC, aby móc ustalić mechanizmy odpowiedzialne za patogenność kolibakteriozy tej heterogennej grupy. W związku z powyższym, w prowadzonych badaniach zdecydowano o włączeniu serotypu

O78 do analiz, jako jednego z czynników wirulencji szczepów APEC. W dotychczas opublikowanych pracach nie znaleziono informacji o połączeniu w jednym teście PCR analizy genów wirulencji, jak i występowania odpowiednich serotypów. W badaniach opublikowanych przez Dissanayake i wsp. (2014) zastosowano oparte o PCR wykrywanie obecności 13 genów wirulencji i równolegle serotypu O78 w szczepach patogennych w analizie populacji szczepów APEC z terytorium Sri Lanki .

W doniesieniach literaturowych znaleźć można wiele prób opracowania testu diagnostycznego w kierunku wykrywania szczepów APEC, jednak w zdecydowanej większości przypadków brak jest weryfikacji patogenności szczepów analizowanych w eksperymentach. Chorobotwórczość szczepu oceniana jest najczęściej na podstawie źródła jego uzyskania (zmienione narządy wewnętrzne/próbki odchodów) i objawów klinicznych (ptak zdrowy/chory) (Johnson i wsp., 2008, De Carli i wsp., 2015, Paixão i wsp., 2015, LeStrange i wsp., 2017). Równocześnie można znaleźć prace, które wskazują na potencjał patogenny wśród szczepów komensalnych w odpowiednich warunkach środowiskowych (Mohamed i wsp., 2018, Stromberg i wsp., 2017, Lindstedt i wsp., 2018). Część badaczy podejmowało próbę ewaluacji wirulencji szczepów *E.coli* w modelach *in vitro* lub *in vivo*, jak np. Stromberg i wsp. (2017), którzy poprzez worki powietrzne zakażali 5-tygodniowe kurczaki wybranymi szczepami i oceniali ich wpływ na rozwój narządów wewnętrznych ptaków.

W przedstawionej pracy wstępnej klasyfikacji szczepów bakteryjnych dokonano również na podstawie źródła pozyskania izolatów – od ptaków z kolibakteriozą lub zdrowych, ale w następnym kroku, aby wprowadzić model różnicujący szczepy na dwie grupy (patogenne i niepatogenne), przeprowadzono eksperymentalną ocenę patogenności wszystkich szczepów celem ich lepszego rozgraniczenia na szczepy APEC i pozostałe. Wybierając sposób eksperymentalnej oceny zjadliwości badanych szczepów, poszukiwano metody jednoznacznej, nieobarczonej wpływem innych czynników (jak np. w przypadku metod *in vivo*) oraz stosunkowo niedrożej, ze względu na konieczność przebadania ponad stu szczepów z kolekcji stworzonej na potrzeby tego projektu. Zdecydowano zaadoptować metodę opisaną w publikacji Polakowskiej i wsp., opartej na analizie wirulencji szczepów bakteryjnych w modelu zarodków kurzych i podjęto współpracę z dr. hab. Marcinem Lisem z Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Ponieważ stwierdzono, że szczepy *E. coli* wywołują wyższą śmiertelność zarodków niż szczepy *S. aureus* (Polakowska i wsp., 2012), dlatego w kolejnych eksperymentach zdecydowano o rezygnacji z wyższych dawek

zakażających. Dopiero na podstawie wyników uzyskanych z eksperymentów zakażenia zarodków szczepami *E. coli*, podjęto ostateczną decyzję dotyczącą klasyfikacji szczepów na patogenne i niepatogenne oraz przystąpiono do opracowania metody diagnostycznej. Zauważono, że część szczepów zmieniła swoje przyporządkowanie, co zgodne jest z publikacjami wskazującymi na potencjał patogenny wśród szczepów komensalnych, jak również z możliwością izolacji szczepów komensalnych z narządów ptaków objętych kolibakteriozą (Barnes i wsp., 2008, Stromberg i wsp., 2017). Jednakże, pomimo iż przyjęto test letalności embrionalnej *in ovo* jako rozstrzygający, model ten posiadał pewne ograniczenia. Zarodki kurze były bardzo czułe na wszelką manipulację, nawet w kontrolach z solą fizjologiczną, dlatego do stwierdzenia, że szczep jest patogenny przyjęto dosyć wysoki próg odcięcia (śmiertelność na poziomie >85%). Jednak nawet przy tak dobranej wartości, nie udało się uzyskać większej liczby szczepów niechorobotwórczych w ostatecznej klasyfikacji. Tym samym, możliwe jest, że opracowana metoda wskazuje raczej na potencjał chorobotwórczy szczepów APEC, a niektóre ze szczepów klasyfikowanych jako patogeny mogą wywołać chorobę jedynie w sprzyjających warunkach (np. u osłabionych osobników).

W ramach przeprowadzonych badań, poza oceną obecności wybranych czynników wirulencji w szczepach, przeprowadzono również analizę filogenetyczną wg Clermont'a i wsp., by zweryfikować możliwość klasyfikacji szczepów na patogenne i niepatogenne tą metodą (Clermont i wsp., 2013). Po konfrontacji otrzymanych wyników z analizą *in ovo* stwierdzono, że część szczepów sklasyfikowanych ostatecznie jako patogenne, rzeczywiście należała do „patogennych” grup filogenetycznych, tj. B2 i F. Jednakże część próbek, którym przypisano grupy komensalne B1 i C, w rzeczywistości były patogenami. Dotyczy to w szczególności szczepów o serotypie O78, co potwierdzają dane literaturowe wskazujące na wyższe podobieństwo tych szczepów do patogenów jelitowych niż pozajelitowych (Huja i wsp., 2015). Dodatkowo, badania prowadzone przez Rodriguez-Siek i wsp. (2005) ujawniły, że większość z przebadanych 524 izolatów szczepów APEC przypisanych została do grup filogenetycznych reprezentowanych standardowo przez szczepy komensalne. Ponadto uważa się, że z uwagi na występowanie grup hybrydowych, nawet 80 – 85% szczepów *E. coli* może być źle przypisywanych do grup filogenetycznych (Ewers i wsp., 2007, Sarowska i wsp., 2019). W związku z powyższym, analizę filogenetyczną należy traktować jedynie jako dopełnienie charakterystyki *E. coli*.

Oparcie klasyfikacji szczepu jako APEC wyłącznie o taką analizę, może powodować uzyskanie wielu wyników fałszywie negatywnych.

Serotypowanie metodą klasyczną albo *in silico* stanowi również metodę wspierającą diagnostykę szczepów APEC. Może być szczególnie pomocne w przypadku serotypów charakterystycznych, takich jak O1, O2, O8, czy O78. Jednak, jak pokazały przeprowadzone badania, wiele patogennych dla drobiu szczepów *E. coli* posiada serotypy niecharakterystyczne albo nieznanne. Stąd opieranie diagnostyki tylko na serotypowaniu również nie daje wiarygodnych wyników. Dodatkowo, poznanie profilu antybiotykooporności szczepów stanowi cenny element poznawczy w charakterystyce APEC, ale w dobie rosnącej wielolekooporności bakterii, nie można na tej podstawie wnioskować o patogenności szczepu.

Podczas oceny doboru odpowiednich czynników wirulencji do testu diagnostycznego zastosowano dokładny test Fisher'a. Zdecydowano o wyborze tego testu, ponieważ służy on do badania przypadkowości między dwoma rodzajami klasyfikacji i stosuje się go do tablic o wymiarach 2x2. Istotność odchylenia od hipotezy zerowej (p-value) można w tym wypadku obliczyć w sposób dokładny (<https://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/fisher.test.html>, dostęp: 02.2021; Gambin, 2012). W ten sposób wytypowano geny, dla których znaleziono statystycznie istotne różnice w występowaniu w grupach patogennych i niepatogennych. Spośród nich wybrano kilka zestawów genów, które mogłyby stanowić dyskryminanty w teście PCR. Każdy zestaw genów oceniano *in silico* poprzez obliczenie parametrów czułości, specyficzności i dokładności testu oraz wartości predykcyjnych dodatniej i ujemnej, jak również poprzez analizę pola pod wykresem (AUC) dla krzywej ROC. Ostatecznie wybrano wersję z najmniejszą liczbą analizowanych genów – w tym 2 genów wirulencji (*iroC* i *hlyF*) oraz genu kodującego flipazę antygeny O serotypu O78 (*wzx*). Wynikało to z przewagi praktycznej tej kombinacji genów nad innymi ze względu na liczbę analizowanych genów, przy zachowaniu akceptowalnych parametrów metody. Mała liczba analizowanych genów jest korzystna z punktu widzenia szybkości diagnostyki oraz obniżania jej kosztów.

Opracowany test diagnostyczny posiada wysoką dokładność (93,00%) i czułość (98,80%), zaś niższą specyficzność (64,71%). Zdecydowano się na pozostawienie metody w jej obecnym kształcie i przesunięcie punktu odcięcia w kierunku czułości, ponieważ kolibakterioza jest poważną chorobą drobiu, powodującą ogromne straty,

zaś wysoka czułość metody zwiększa szansę na bardzo wczesne wykrycie zakażenia, co ma istotne znaczenie dla efektywnej terapii. Dodać należy, że rozgraniczenie grup na patogenne i niepatogenne wskazuje na potencjał do wywołania choroby przez analizowany szczep *E. coli*, a nie na samą chorobę. Poza tym, podczas badań dysponowano wspomnianą już znacznie większą liczbą szczepów zjadliwych niż komensalnych (83 do 17), zaś aby dokonać właściwego porównania, ich liczba powinna być zbliżona do siebie. Możliwe, że odsetek wyników fałszywie pozytywnych byłby mniejszy przy większej liczbie szczepów niepatogennych. W pierwotnej klasyfikacji szczepów komensalnych było więcej i tym samym liczba szczepów w grupach P i NP była bardziej zrównoważona. Po reklasyfikacji szczepów nie udało się uzyskać większej liczby reprezentantów niechorobotwórczych, dlatego zdecydowano o dziesięciokrotnym przeprowadzeniu testu Fisher'a również dla zawężonej liczby szczepów patogennych, osiągając zbliżone wyniki. Podejście zastosowane w opisywanej pracy nie jest odosobnione. W danych literaturowych również można znaleźć problem dotyczący niezrównoważenia zbiorów. Silveira i wsp. (2016), porównując szczepy APEC i AFEC z różnych regionów Brazylii, dysponowali 91 szczepami patogennymi i 29 niepatogennymi. Wytlumaczeniem przewagi szczepów zjadliwych nad komensalnymi może być fakt, iż nawet izolaty pozyskane z flory jelitowej zdrowego ptactwa mogą nieść ze sobą istotne czynniki wirulencji, co udowodniono w badaniach Stromberga i wsp. (2017). W pracy tej jelitowy izolat *E. coli* MM218, pochodzący od zdrowego kurczaka, wywołał bakteriemię i zapalenie opon mózgowych w modelu mysim, zaś inny izolat MM29 wywołał sepsę u kurczaków w czasie krótszym niż 20 godzin. Z uwagi na trudność znalezienia wzorcowych szczepów niewirulentnych, w przedstawionej pracy dopuszczono możliwość niezrównoważenia zbiorów patogennych i niepatogennych. Dodatkowo, dowodzi to istotności przeprowadzonych badań w kontekście bezpieczeństwa żywności i jego wpływu na zdrowie człowieka.

Weryfikację testu opracowanego *in silico* przeprowadzono w laboratorium, stosując metodę PCR typu multipleks i autorskie, zaprojektowane na rzecz tego projektu, startery. Wykazano 100% zgodności wyników, co dowodzi poprawności przeprowadzonych analiz bioinformatycznych.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania potwierdziły możliwość wykorzystania sekwencji całych genomów *Escherichia coli* do zaprojektowania niekosztownej metody diagnostycznej opartej o PCR. Jednakże podjęte działania wymagały weryfikacji zjadliwości sekwencjonowanych szczepów *E. coli* w modelu *in ovo*, gdyż inaczej nie

byłoby możliwe właściwe zaklasyfikowanie badanych grup szczepów do odpowiednich grup patogenności, a tym samym zaprojektowanie wiarygodnej metody diagnostycznej. Warto podkreślić, iż wykorzystanie analiz *in silico* do przeprowadzenia szerokiej analizy bioinformatycznej, w tym badania kilkuset czynników wirulencji, stanowi nowatorskie ujęcie rozwiązania problemu diagnostyki szczepów *E. coli* patogennych dla drobiu.

Przed wprowadzeniem testu do praktyki, niezbędne jest przeprowadzenie dodatkowej walidacji z wykorzystaniem danych eksperymentalnych i klinicznych poszerzonych o inne modele niż test żywotności zarodka kurzego, ponieważ ma on swoje ograniczenia opisane powyżej.

6. Wnioski

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

Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać, że:

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

7. 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

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 rekasyfikację 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 multiplex 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.

8. Summary

Colibacillosis, as a common bacterial disease causing high mortality among poultry, is a significant epidemiologic problem contributing to large economic losses for breeders. The disease occurs as a result of infection with Avian Pathogenic *E. coli* (APEC). These strains are classified as extraintestinal pathogens (ExPEC), which carry virulence factors important for the pathogenesis, such as: adhesins, toxins, protectins, or factors related to the iron uptake from the environment. The proper diagnosis of colibacillosis is extremely important for disease prevention in flocks, application of targeted therapy and microbiological safety of food. At the same time, the identification of the strains responsible for the infection is very difficult due to the fact that APEC constitute a heterogeneous group with a multifactorial mechanism of pathogenesis. In addition, the spread of commensal *E. coli* in the environment causes problems in isolation of strains and assessing their pathogenicity, as these strains can also cause infection under certain conditions. Therefore, it is extremely important to develop a diagnostic method that will quickly and unambiguously identify pathogenic strains causing infection in flocks.

The main goal of the presented thesis was to develop a diagnostic method based on PCR reaction that will allow for the identification of Avian Pathogenic *E. coli* (APEC). For this purpose, a collection of strains from birds affected by colibacillosis as well as from healthy birds was collected. Then the strains were differentiated, their genomes were sequenced and a bioinformatic analysis was carried out to select the appropriate virulence factors responsible for causing colibacillosis. The diagnostic test, developed using *in silico* method, was verified by laboratory methods.

Differentiation of *E. coli* strains was performed based on the MP PCR method, analyzing the resulting band profiles in the BioNumerics software. It allowed to reject identical strains from further studies of and reduce the number of samples subjected to sequencing. Next Generation Sequencing (NGS) of whole genomes (WGS) was performed on the Illumina platform and genome assemblies were prepared in the SPAdes software with the necessary manual editing. The obtained results allowed to carry out a series of *in silico* analyzes: the assessment of the presence of selected virulence factors, serotyping or the presence of antibiotic resistance genes. Additionally, PCR analysis of the phylogenetic groups of the studied *E. coli* strains was performed according to the method of Clermont et al., (2013).

In order to be able to construct a correct model for predicting the pathogenicity of *E. coli* strains, they were reclassified from the original division based on the strains' source to the one based on the results of studies in the *in ovo* model. The obtained results allowed to divide the strains into two groups (83 pathogenic strains and 17 non-pathogenic strains) and to select such virulence factors that correctly differentiate bacteria into these two groups.

The diagnostic test was designed based on the multiplex PCR amplification of 2 virulence genes (*iroC* and *hlyF*) and the gene encoding the O-antigen flipase in O78 strains. According to the designed method, the presence of any of these genes indicates that the strain belongs to the group of pathogens, otherwise the sample is a commensal strain. During the verification of the results from the model in relation to the chicken embryo model, the method accuracy was 93.00% and the sensitivity and specificity equal to 98.80% and 64.71%, respectively. The shift of the cut-off point towards sensitivity results from the fact that quick identification of a sick flock and the possibility of implementing treatment was a priority during the research. The method was optimized and a 100% agreement of the laboratory results with the *in silico* results was obtained.

In conclusion, the use of whole genome sequencing of *E. coli* allows to develop a quick diagnostic method to identify pathogenic strains for poultry: APEC. The developed test, based on PCR, together with the isolation site of strains and clinical symptoms of the disease, can be used in practice after validation.

9. Bibliografia

- Ahmed HA, Ali AHM, Abdel Baky MH. Efficacy of a live *Escherichia coli* vaccine for protection of turkeys against homologous and heterologous field strains infection. *BVMJ*. 2015;29(2): 11-16.
- Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(12):6235–6254. doi:10.3390/ijerph10126235
- Awad A, Arafat N, Elhadidy M. Genetic elements associated with antimicrobial resistance among avian pathogenic *Escherichia coli*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15(1):59. Published 2016 Nov 25. doi:10.1186/s12941-016-0174-9
- Azam M, Mohsin M, Sajjad-Ur-Rahman, Saleemi MK. Virulence-associated genes and antimicrobial resistance among avian pathogenic *Escherichia coli* from colibacillosis affected broilers in Pakistan. *Trop Anim Health Prod*. 2019;51(5):1259–1265. doi:10.1007/s11250-019-01823-3
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 2008;9:75. Published 2008 Feb 8. doi:10.1186/1471-2164-9-75
- Baldy-Chudzik K, Bok E, Mazurek J. Znane i nowe warianty patogennych *Escherichia coli* jako konsekwencja plastycznego genomu. *Postepy Hig Med Dosw* (online), 2015; 69: 345-361
- Barnes HJ, Nolan LK, Vaillancourt J-P. Colibacillosis. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR et al. *Diseases of Poultry*. 12th edition. AMES, Iowa, USA: *Blackwell Publishing*, 2008, 691-737
- Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 1997;277(5331):1453–1462. doi:10.1126/science.277.5331.1453
- Brzozowski M, Kwiatkowski P, Kosik-Bogacka D, Jursa-Kulesza J. Metody genotypowe i fenotypowe wykorzystywane w typowaniu drobnoustrojów do celów epidemiologicznych. *POST. MIKROBIOL*. 2017;56, 3, 353–366

- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*. 2013;5(1):58–65. doi:10.1111/1758-2229.12019
- Cordoni G, Woodward MJ, Wu H, Alanazi M, Wallis T, La Ragione RM. Comparative genomics of European avian pathogenic *E. coli* (APEC). *BMC Genomics*. 2016;17(1):960. Published 2016 Nov 22. doi:10.1186/s12864-016-3289-7
- Cunha MPV, Saidenberg AB, Moreno AM, et al. Pandemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178970. Published 2017 Jun 8. doi:10.1371/journal.pone.0178970
- De Carli S, Ikuta N, Lehmann FK, et al. Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil. *Poult Sci*. 2015;94(11):2635–2640. doi:10.3382/ps/pev256
- Dissanayake DR, Octavia S, Lan R. Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka. *Vet Microbiol*. 2014;168(2-4):403–412. doi:10.1016/j.vetmic.2013.11.028
- Dziva F, Stevens MP. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol*. 2008;37(4):355–366. doi:10.1080/03079450802216652
- Dziva F, Hauser H, Connor TR, et al. Sequencing and functional annotation of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O78 strains reveal the evolution of *E. coli* lineages pathogenic for poultry via distinct mechanisms. *Infect Immun*. 2013;81(3):838–849. doi:10.1128/IAI.00585-12
- Ewers C, Li G, Wilking H, et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they?. *Int J Med Microbiol*. 2007;297(3):163–176. doi:10.1016/j.ijmm.2007.01.003
- Ewers C, Antão EM, Diehl I, Philipp HC, Wieler LH. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(1):184–192. doi:10.1128/AEM.01324-08

- Filho HCK, Brito KCT, Cavalli LS, Brito BG. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) - an update on the control. In: *The Battle against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*; 2015. p. 598–618
- Fratamico PM, DebRoy C, Liu Y, Needleman DS, Baranzoni GM, Feng P. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2016;7:644. Published 2016 May 3. doi:10.3389/fmicb.2016.00644
- Galardini M, Biondi EG, Bazzicalupo M, Mengoni A. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. *Source Code Biol Med.* 2011;6:11. Published 2011 Jun 21. doi:10.1186/1751-0473-6-11
- Gambin A. Statystyczna analiza danych (molekularnych) – podstawowe testy statystyczne. 18 marca 2012
- Guabiraba R, Schouler C. Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiol Lett.* 2015;362(15):fzv118. doi:10.1093/femsle/fzv118
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 2013;29(8):1072–1075. doi:10.1093/bioinformatics/btt086
- Huja S, Oren Y, Trost E, et al. Genomic avenue to avian colisepticemia. *mBio.* 2015;6(1):e01681-14. Published 2015 Jan 13. doi:10.1128/mBio.01681-14
- Hussain A, Shaik S, Ranjan A, et al. Risk of Transmission of Antimicrobial Resistant *Escherichia coli* from Commercial Broiler and Free-Range Retail Chicken in India. *Front Microbiol.* 2017;8:2120. Published 2017 Nov 13. doi:10.3389/fmicb.2017.02120
- Ibrahim RA, Cryer TL, Lafi SQ, Basha EA, Good L, Tarazi YH. Identification of *Escherichia coli* from broiler chickens in Jordan, their antimicrobial resistance, gene characterization and the associated risk factors. *BMC Vet Res.* 2019;15(1):159. Published 2019 May 22. doi:10.1186/s12917-019-1901-1
- Iguchi A, Iyoda S, Seto K, et al. *Escherichia coli* O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping. *J Clin Microbiol.* 2015;53(8):2427–2432. doi:10.1128/JCM.00321-15

- Jakobsen L, Garneau P, Bruant G, et al. Is Escherichia coli urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(6):1121–1129. doi:10.1007/s10096-011-1417-5
- Joensen KG, Tetzschner AM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F. Rapid and Easy In Silico Serotyping of Escherichia coli Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol*. 2015;53(8):2410–2426. doi:10.1128/JCM.00008-15
- Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian Escherichia coli strains. *J Bacteriol*. 2006;188(2):745–758. doi:10.1128/JB.188.2.745-758.2006
- Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, et al. The genome sequence of avian pathogenic Escherichia coli strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic E. coli genomes. *J Bacteriol*. 2007;189(8):3228–3236. doi:10.1128/JB.01726-06
- Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK. Identification of minimal predictors of avian pathogenic Escherichia coli virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J Clin Microbiol*. 2008;46(12):3987–3996. doi:10.1128/JCM.00816-08
- Jørgensen SL, Kudirkiene E, Li L, et al. Chromosomal features of Escherichia coli serotype O2:K2, an avian pathogenic E. coli. *Stand Genomic Sci*. 2017;12:33. Published 2017 May 10. doi:10.1186/s40793-017-0245-3
- Jørgensen SL, Stegger M, Kudirkiene E, et al. Diversity and Population Overlap between Avian and Human Escherichia coli Belonging to Sequence Type 95. *mSphere*. 2019;4(1):e00333-18. Published 2019 Jan 16. doi:10.1128/mSphere.00333-18
- Kaufmann F. The serology of E. coli group. *J. Immunol.*, 1947; 57 71–100
- Kemmett K, Humphrey T, Rushton S, Close A, Wigley P, Williams NJ. A longitudinal study simultaneously exploring the carriage of APEC virulence associated genes and the molecular epidemiology of faecal and systemic E. coli in commercial broiler chickens. *PLoS One*. 2013;8(6):e67749. Published 2013 Jun 25. doi:10.1371/journal.pone.0067749

- Krawczyk B, Stojowska K, Leibner-Ciszak J. Opracowanie zestawu diagnostycznego do genetycznego typowania szczepów bakteryjnych metodą PCR MP. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2008;60: 139 - 154
- LeStrange K, Markland SM, Hoover DG, Sharma M, Kniel KE. An evaluation of the virulence and adherence properties of avian pathogenic *Escherichia coli*. *One Health.* 2017;4:22–26. Published 2017 Aug 21. doi:10.1016/j.onehlt.2017.08.001
- Lindstedt BA, Finton MD, Porcellato D, Brandal LT. High frequency of hybrid *Escherichia coli* strains with combined Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* (IPEC) and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) virulence factors isolated from human faecal samples. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):544. Published 2018 Nov 1. doi:10.1186/s12879-018-3449-2
- Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW. Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb Ecol.* 2010;60(4):708–720. doi:10.1007/s00248-010-9717-3
- Lutful Kabir SM. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int J Environ Res Public Health.* 2010;7(1):89–114. doi:10.3390/ijerph7010089
- Ma J, Bao Y, Sun M, et al. Two functional type VI secretion systems in avian pathogenic *Escherichia coli* are involved in different pathogenic pathways [published correction appears in *Infect Immun.* 2015 Aug;83(8):3340]. *Infect Immun.* 2014;82(9):3867–3879. doi:10.1128/IAI.01769-14
- Maciel JF, Matter LB, Trindade MM, et al. Virulence factors and antimicrobial susceptibility profile of extraintestinal *Escherichia coli* isolated from an avian colisepticemia outbreak. *Microb Pathog.* 2017;103:119–122. doi:10.1016/j.micpath.2016.12.020
- Manges AR, Johnson JR. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin Infect Dis.* 2012;55(5):712–719. doi:10.1093/cid/cis502
- Manges AR. *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(2):122–129. doi:10.1016/j.cmi.2015.11.010
- Marciniak B, Strapagiel D. FA_TOOL – simple command line tool for fasta file editing, 2016. https://github.com/BiobankLab/FA_TOOL

- Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog Dis.* 2013;10(11):916–932. doi:10.1089/fpd.2013.1533
- Mellata M, Johnson JR, Curtiss R 3rd. *Escherichia coli* isolates from commercial chicken meat and eggs cause sepsis, meningitis and urinary tract infection in rodent models of human infections. *Zoonoses Public Health.* 2018;65(1):103–113. doi:10.1111/zph.12376
- Mitchell NM, Johnson JR, Johnston B, Curtiss R 3rd, Mellata M. Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(3):1177–1187. doi:10.1128/AEM.03524-14
- Mituniewicz T. Największe zagrożenia mikrobiologiczne w produkcji drobiarskiej. *Polskie Drobiarstwo.* OID (291) 12/2015ID
- Mohamed L, Ge Z, Yuehua L, et al. Virulence traits of avian pathogenic (APEC) and fecal (AFEC) *E. coli* isolated from broiler chickens in Algeria. *Trop Anim Health Prod.* 2018;50(3):547–553. doi:10.1007/s11250-017-1467-5
- Nakazato G, de Campos TA, Stehling EG, Brocchi M, da Silveira WD. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 2009;29(7), 479-486. doi:10.1590/S0100-736X2009000700001
- Nurk S, Bankevich A, Antipov D, et al. Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads. In: Deng M., Jiang R., Sun F., Zhang X. Research in Computational Molecular Biology. *RECOMB 2013. Lecture Notes in Computer Science, vol 7821. Springer, Berlin, Heidelberg*
- Olschläger T, Braun V. Sequence, expression, and localization of the immunity protein for colicin M. *J Bacteriol.* 1987;169(10):4765–4769. doi:10.1128/jb.169.10.4765-4769.1987
- Osman KM, Kappell AD, Elhadidy M, et al. Poultry hatcheries as potential reservoirs for antimicrobial-resistant *Escherichia coli*: A risk to public health and food safety. *Sci Rep.* 2018;8(1):5859. Published 2018 Apr 11. doi:10.1038/s41598-018-23962-7
- Paixão AC, Ferreira AC, Fontes M, et al. Detection of virulence-associated genes in pathogenic and commensal avian *Escherichia coli* isolates. *Poult Sci.* 2016;95(7):1646–1652. doi:10.3382/ps/pew087

- Peng Y, Wang X, Shou J, et al. Roles of Hcp family proteins in the pathogenesis of the porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* type VI secretion system. *Sci Rep*. 2016;6:26816. Published 2016 May 27. doi:10.1038/srep26816
- Pilatti L, Boldrin de Paiva J, Rojas TC, et al. The virulence factor ychO has a pleiotropic action in an Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. *BMC Microbiol*. 2016;16:35. Published 2016 Mar 10. doi:10.1186/s12866-016-0654-2
- Polakowska K, Lis MW, Helbin WM, et al. The virulence of *Staphylococcus aureus* correlates with strain genotype in a chicken embryo model but not a nematode model. *Microbes Infect*. 2012;14(14):1352–1362. doi:10.1016/j.micinf.2012.09.006
- Rocha Ana CGP, Rocha SLS, Lima-Rosa CAV, et al. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2008;28(3), 183-186. doi:10.1590/S0100-736X2008000300009
- Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res*. 2005;36(2):241–256. doi:10.1051/vetres:2004057
- Ronco T, Stegger M, Olsen RH, et al. Spread of avian pathogenic *Escherichia coli* ST117 O78:H4 in Nordic broiler production. *BMC Genomics*. 2017;18(1):13. Published 2017 Jan 3. doi:10.1186/s12864-016-3415-6
- Russo E. Special Report: The birth of biotechnology. *Nature* 2003;421, 456–457. <https://doi.org/10.1038/nj6921-456a>
- Sarowska J, Futoma-Koloch B, Jama-Kmiecik A, et al. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathog*. 2019;11:10. Published 2019 Feb 21. doi:10.1186/s13099-019-0290-0
- Schouler C, Schaeffer B, Brée A, et al. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *J Clin Microbiol*. 2012;50(5):1673–1678. doi:10.1128/JCM.05057-11
- Schramm E, Mende J, Braun V, Kamp RM. Nucleotide sequence of the colicin B activity gene cba: consensus pentapeptide among TonB-dependent colicins and receptors. *J Bacteriol*. 1987;169(7):3350–3357. doi:10.1128/jb.169.7.3350-3357.1987

Silveira F, Maluta RP, Tiba MR, de Paiva JB, Guastalli EA, da Silveira WD. Comparison between avian pathogenic (APEC) and avian faecal (AFEC) *Escherichia coli* isolated from different regions in Brazil. *Vet J.* 2016;217:65–67. doi:10.1016/j.tvjl.2016.06.007

Singer RS. Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps. *Front Microbiol.* 2015;6:28. Published 2015 Feb 4. doi:10.3389/fmicb.2015.00028

Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Williams iWilkins, Baltimore, USA, 1986

Solà-Ginés M, Cameron-Veas K, Badiola I, et al. Diversity of Multi-Drug Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Causing Outbreaks of Colibacillosis in Broilers during 2012 in Spain. *PLoS One.* 2015;10(11):e0143191. Published 2015 Nov 23. doi:10.1371/journal.pone.0143191

Stefaniuk E, Bosacka K, Hryniewicz W. Walidacja i weryfikacja metod i testów diagnostycznych w laboratorium mikrobiologicznym. *Post. Mikrobiol.* 2015;54(4):415-424.

Stromberg ZR, Johnson JR, Fairbrother JM, et al. Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *PLoS One.* 2017;12(7):e0180599. Published 2017 Jul 3. doi:10.1371/journal.pone.0180599

Subedi M, Luitel H, Devkota B, et al. Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. *BMC Vet Res.* 2018;14(1):113. Published 2018 Mar 27. doi:10.1186/s12917-018-1442-z

Tivendale KA, Logue CM, Kariyawasam S, et al. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infect Immun.* 2010;78(8):3412–3419. doi:10.1128/IAI.00347-10

UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D506–D515. doi:10.1093/nar/gky1049

van der Westhuizen WA, Bragg RR. Multiplex polymerase chain reaction for screening avian pathogenic *Escherichia coli* for virulence genes. *Avian Pathol.* 2012;41(1):33–40. doi:10.1080/03079457.2011.631982

Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, et al. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev.* 2016;40(4):437–463. doi:10.1093/femsre/fuw005

Wang S, Meng Q, Dai J, et al. Development of an allele-specific PCR assay for simultaneous sero-typing of avian pathogenic *Escherichia coli* predominant O1, O2, O18 and O78 strains. *PLoS One.* 2014;9(5):e96904. Published 2014 May 7. doi:10.1371/journal.pone.0096904

Whittam TS, Ochman H, Selander RK. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80(6):1751–1755. doi:10.1073/pnas.80.6.1751

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134. Published 2012 Jun 18. doi:10.1186/1471-2105-13-134

Zankari E, Hasman H, Cosentino S, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11):2640–2644. doi:10.1093/jac/dks261

Zdziennicki F, Misiewicz A. Algorytmy konstruowania dendrogramów stosowanych przy analizie filogenetycznej mikroorganizmów. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego.* 2014;t. 69 nr 1

Zhu Ge X, Jiang J, Pan Z, et al. Comparative genomic analysis shows that avian pathogenic *Escherichia coli* isolate IMT5155 (O2:K1:H5; ST complex 95, ST140) shares close relationship with ST95 APEC O1:K1 and human ExPEC O18:K1 strains. *PLoS One.* 2014;9(11):e112048. Published 2014 Nov 14. doi:10.1371/journal.pone.0112048

Żaczek A, Wojtasik A, Izdebski R, et al. PCR melting profile as a tool for outbreak studies of *Salmonella enterica* in chickens. *BMC Vet Res.* 2015;11:137. Published 2015 Jun 23. doi:10.1186/s12917-015-0451-4

<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>; dostęp: 06.2017-06.2018; 03.2020

<https://www.mojekurczaki.pl/kolibakterioza>; dostęp: 04.2019 i 03.2020

<https://www.sciencephoto.com/media/1003528/view/escherichia-coli-sem>;

dostęp: 03.2020

https://www.msd-animal-health.co.in/nobilis_e.coli_inac/020_product_details.aspx;

dostęp: 03.2020

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=apec>, dostęp: 03.2020

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=Escherichia%20coli>; dostęp: 03.2020

<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore> - dostęp: 04.2016 -06.2017

<https://github.com/BiobankLab/DIFFIND> - dostęp: 06.2019-12.2019

<https://www.uniprot.org/>; dostęp: 01.2017 – 06.2018

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; dostęp: 01.2018-06.2019

<https://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/fisher.test.html>; dostęp: 02.2021