Molekulska karakterizacija APEC sojeva E.Coli izdvojenih na farmama peradi u Republici Hrvatskoj

Lozica, Liča

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:448936

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis







Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

LIČA LOZICA

MOLEKULSKA KARAKTERIZACIJA APEC SOJEVA *E. COLI* IZDVOJENIH NA FARMAMA PERADI U REPUBLICI HRVATSKOJ

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Diplomski rad izrađen je na Zavodu za bolesti peradi s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Željka Gottsteina i doc.dr.sc. Danijele Horvatek Tomić.

Naziv zavoda: Zavod za bolesti peradi s klinikom

Predstojnik zavoda: Doc.dr.sc. Željko Gottstein

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Dr.sc. Maja Lukač

2. Doc.dr.sc. Danijela Horvatek Tomić

3. Doc.dr.sc. Željko Gottstein

Zahvale

Zahvaljujem mentorima doc.dr.sc. Željku Gottsteinu i doc.dr.sc. Danijeli Horvatek Tomić na nesebičnim, stručnim i prijateljskim savjetima, vodstvu, pristupačnosti, velikom strpljenju i pomoći prilikom pisanja ovog rada. Hvala na predloženoj temi i pruženoj prilici za učenje i stjecanje iskustva. Zahvaljujem dr.sc. Gordani Nedeljković i dr.sc. Maji Lukač na pomoći i korisnim savjetima u laboratoriju.

Najveće hvala mojoj obitelji na beskonačnom razumijevanju, podršci i ohrabrivanju u životu i tijekom studija.

Popis tablica i slika

Tablica 1. Prikaz početnica korištenih u prvoj PCR reakciji.

Tablica 2. Prikaz početnica korištenih u drugoj PCR reakciji.

Tablica 3. Prikaz početnica korištenih u trećoj PCR reakciji.

Tablica 4. Prikaz filogenetskih skupina izdvojenih sojeva *E. coli.*

Tablica 5. Usporedni prikaz učestalosti filogenetskih skupina i podskupine $B2_3$ na Farmama 1, 2 i 3.

Tablica 6. Prikaz učestalosti filogenetskih skupina i $B2_3$ podskupine po organima iz kojih su uzeti obrisci.

Tablica 7. Prikaz učestalosti pojedinih gena virulencije (%).

Tablica 8. Prikaz učestalosti pojedinih gena virulencije na pojedinim farmama.

Slika 1. Prikaz gel elektroforeze dijela uzoraka za PCR reakciju s osam početnica.

Slika 2. Promjene uočene patomorfološkom pretragom. A) Fibrinozni perihepatitis.
B) Fibrinozni poliserozitis, egg peritonitis.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. HIPOTEZA 3

3. CILJEVI RADA 3

4. MATERIJAL I METODE 3

4.1. Uzorci 3

4.2. Izolacija i identifikacija *E. coli* 3

4.3. Izdvajanje i pročišćavanje DNK 4

4.4. Lančana reakcija polimerazom 4

4.5. Gel elektroforeza 7

5. REZULTATI 8

6. RASPRAVA 14

7. ZAKLJUČCI 17

8. LITERATURA 18

9. SAŽETAK 22

10. SUMMARY 23

11. ŽIVOTOPIS 24

1. UVOD

Kolibaciloza je svaka lokalizirana ili sustavna zarazna bolest uzrokovana bakterijom *E. coli* koja naseljava sluzničke površine (BIĐIN, 2008.). *Escherichia coli* je gram negativna, nesporulirajuća, štapićasta bakterija zaobljenih krajeva. Može biti različite veličine i različitih oblika. Patogeni sojevi *E. coli* dijele se na crijevne i izvancrijevne. Sojevi bakterije *E. coli* koji uzrokuju izvancrijevne infekcije (eng. extraintestinal pathogenic *E. coli,* ExPEC) obično su dio fiziološke crijevne mikroflore zdravih životinja. Patogeni sojevi posjeduju čimbenike virulencije pomoću kojih naseljavaju površinu sluznica i uzrokuju bolest. Sojevi koji uzrokuju izvancrijevne infekcije dijele se u četiri patovara- ptičji patogeni sojevi *E. coli* (eng. avian pathogenic *E. coli,* APEC), septikemijski sojevi *E. coli* (eng. septicaemia associated *E. coli,* SePEC), uropatogeni sojevi *E. coli* (eng. uropathogenic *E. coli,* UPEC) i sojevi *E. coli* uzročnici meningitisa novorođenčadi (eng. newborn meningitic *E. coli,* NMEC) (ANTÃO, 2010.). Ptičji patogeni sojevi *E. coli* uzrokuju različite lokalizirane i sistemske infekcije, kao što su upala zračnih vrećica, koliseptikemija, koligranulomatoza, perikarditis, peritonitis, sinovitis, salpingitis, upala žumančane vrećice i sindrom otečene glave. Bolest najčešće započinje infekcijom dišnog sustava u peradi stare 3 do 12 tjedana, nakon čega slijedi sistemska infekcija karakterizirana fibrinoznim lezijama i septikemijom koji dovode do uginuća (MOULIN-SCHOULEUR i sur., 2007.; SCHOULER i sur., 2012.), ali do zaraze može doći i ascendentno putem reproduktivnog trakta (LANDMAN i sur., 2014.). Zaražavanju dišnog sustava često prethodi infekcija mikoplazmama ili nekim virusom, čime dišni sustav postaje osjetljiviji (CORDONI i sur., 2016.). Razlog početka infekcije upalom zračnih vrećica je povećana osjetljivost zbog smanjene količine makrofaga u tom području (ANTÃO, 2010.; MELLATA, 2013.), odnosno smanjene sposobnosti fagocitoze makrofaga i neutrofila (MATTHIJS i sur., 2009.). Isto tako, oštećenje tkiva dišnog sustava virusima karakterizirano je gubitkom cilija i trepetljikavih stanica, čime se smanjenjuje cilijarna aktivnost i čišćenje mukocilijarnog sekreta, te oštećenjem epitela koje omogućava lakše prijanjanje bakterija (MATTHIJS i sur., 2009.). Osim toga, neprikladni zoohigijenski uvjeti, stresni čimbenici i soj pilića utječu na osjetljivost zračnih vrećica prema bakteriji. Kolibaciloza često nastaje kao sekundarna infekcija zbog imunosupresije uzrokovane drugim bolestima kao što su zarazna bolest burze, zarazna anemija pilića ili Marekova bolest. U tom slučaju mogu je uzrokovati i komenzalni sojevi *E. coli* što objašnjava sve češću pojavu A sojeva (DISSANAYAKE i sur., 2014.).

Serotipizacija i određivanje seroloških grupa je dosad već provjerena metoda tipizacije APEC sojeva. Oni najčešće pripadaju serovarovima O1, O2, O18 i O78 (MOULIN- SCHOULEUR i

sur., 2007.; JOHNSON i sur., 2008.; EWERS i sur., 2009.). Serološkom tipizacijom određuju se somatski (O), kapsularni (K), flagelarni (H) i fimbrijski (F) antigeni. Somatske antigene čine termostabilni površinski lipopolisaharidi stanične stijenke koji su sastavljeni od lipida A koji je komponenta endotoksina, središnjeg oligosaharida i polisaharidnih lanaca kao nositelja razlika u antigenskim osobinama. Dosadašnja istraživanja pokazala su da pripadnost nekom patotipu nije određena samo prisutnošću specifičnih čimbenika virulencije, već ovisi i o filogenetskoj skupini kojoj soj pripada. (ANTÃO, 2010.). Sojeve *E. coli* može se podijeliti u četiri filogenetske skupine- A, B1, B2 i D određivanjem prisustva gena *yjaA* i *chuA,* te ulomka DNK TspE4.C2 lančanom reakcijom polimerazom (eng. polymerase chain reaction, PCR) (CLERMONT i sur., 2000.), te u sedam podskupina- A_0, A1, B1, $B2_2$, $B2_3$, D1 i D2 (CARLOS i sur., 2010.), pri čemu se $B2_3$ nalazi samo u ljudi. U novije vrijeme, literatura navodi postojanje čak 8 filogenetskih skupina, i to A, B1, B2, C, D, E, F, te *Escherichia* cryptic clade I (CLERMONT i sur., 2013.). Većina patogenih izvancrijevnih sojeva pripada skupini B2, manji dio skupini D, a komenzalni sojevi skupini A i B1 (PICARD i sur., 1999.; CLERMONT i sur., 2000.; ESCOBAR- PÁRAMO i sur., 2006.; CARLOS i sur., 2010.; MATURANA i sur., 2011.). Imajući na umu da svi izvancrijevni patovarovi imaju isto filogenetsko podrijetlo, može se pretpostaviti da postoji zoonotski potencijal ptičjih patogenih sojeva *E. coli* (MOULIN-SCHOULEUR, 2007.; JOHNSON i sur., 2009.; ANTÃO, 2010.). B2 i D filogenetske skupine posjeduju širok spektar čimbenika virulencije od kojih je veliki dio epidemiološki vezan uz pojavu slučajeva izvancrijevnih infekcija (MANGES i sur., 2007.). Patogeni serovarovi *E. coli* se često mogu izolirati iz crijeva klinički zdravih jedinki, što dokazuje da je često oportunistički patogen. Molekularna epidemiološka istraživanja diljem svijeta utvrdila su nekoliko potencijalnih rezervoara ExPEC- a, kao što su probavni trakt čovjeka, životinje koje se koriste kao izvor hrane, životinjski proizvodi, okoliš kontaminiran otpadnim vodama i kućni ljubimci (MANGES i JOHNSON, 2012.). Najvažniji izvor zaraze zračnih vrećica su feces i kontaminirana prašina (PORTER, 1998.).

Ptičji patogeni sojevi *E. coli* uzrokuju kolibacilozu u nesilica, roditeljskih jata i tovnih pilića, što dovodi do visokog morbiditeta i mortaliteta, a time i velikih ekonomskih gubitaka u peradarskoj industriji. U roditeljskim jatima teških linija, *E. coli* najčešće uzrokuje salpingitis te posljedično peritonitis i septikemiju (GREGERSEN i sur., 2010.). S obzirom na velike gospodarske štete, utvrđivanje proširenosti APEC sojeva i njihova tipizacija može pomoći u provođenju nužnih profilaktičkih mjera kao što je cijepljenje. Zbog raznovrsnosti sojeva, trenutno dostupna komercijalna cjepiva nisu adekvatna, te se sve više podliježe proizvodnji inaktiviranih autogenih cjepiva (LANDMAN, 2014.).

2. HIPOTEZA

Ptičji patogeni sojevi *E. coli* uzrokuju velike gospodarske štete u peradarskoj industriji. Iz tog razloga, utvrđivanje njihove proširenosti i tipizacija s ciljem određivanja raznovrsnosti prisutnih sojeva, vrlo je značajna za provođenje profilaktičkih mjera. Hipoteza ovog istraživanja je da će izolati APEC sojeva biti raznovrsni, odnosno da će se utvrditi pripadnost različitim filogenetskim skupinama na temelju postojanja pojedinih gena virulencije (*chuA, yjaA,* TspE4.C2). Isto tako pretpostavljamo da će biti velikih razlika u prevalenciji određenih gena virulencije između pojedinih izolata.

3. CILJEVI RADA

Cilj rada je tipizacija APEC sojeva da bi odredili gensku raznovrsnost izolata s različitih farmi u svrhu provođenja adekvatnih profilaktičkih mjera.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Uzorci

Izdvojeno je 48 sojeva *E. coli* podrijetlom od lešina dostavljenih na patomorfološku pretragu s dvije farme peradi roditeljskih jata teških linija (genetike Ross, Farma 1 i 2) i jedne farme nesilica lake linije (Farma 3) sakupljenih tijekom 2016. godine. Na Farmi 1 uzorkovanje je provedeno dva puta, kada je perad bila dobi 43 tjedna i u dobi od 55 tjedana, a na Farmi 2 jednom sa 15 tjedana, te na Farmi 3 četiri puta, kada je perad bila dobi 59, 74, 75 i 79 tjedana.

4.2. Izolacija i identifikacija *E. coli*

Prilikom patomorfološke pretrage lešina, uzeti su obrisci organa koji su nasađeni na hranjivi agar (Nutrient Agar, Difco, Francuska) i Brilliant Green agar (Oxoid, Velika Britanija) te inkubirani aerobno kroz 24 sata pri 37°C. Sojevi *E. coli* identificirani su na temelju makroskopskog izgleda kolonija i biokemijskih karakteristika, a identifikacija je dodatno potvrđena metodom MALDI- TOF spektrometrije (eng. matrix- assisted laser desorption/ ionization time of flight) i API testom (Biomerieux, Francuska).

4.3. Izdvajanje i pročišćavanje DNK

Čiste kulture *E. coli* su presađene na ploče hranjivog agara (Nutrient Agar, Difco, Francuska) i korištene za izdvajanja DNK pomoću Chelex 100 (BioRad, Francuska) prema uputi proizvođača. Izdvojena DNK čuvana je na -20˚C do izvođenja pretrage. Neposredno prije pretrage u uzorcima je određena koncentracija DNK pomoću BioDrop uređaja (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), a potom je za PCR reakciju koncentracija u uzorcima prilagođena na 20 µg/ ml.

4.4. Lančana reakcija polimerazom

Izvedene su tri multiplex PCR reakcije prema protokolu CLERMONT i sur. (2000.) za svaki uzorak za sveukupno 22 gena virulencije. U prvoj reakciji korišteno je osampočetnica (R1, R2, R3, R4, K12, *chuA, yjaA,* TspE) (Tablica 1.), u drugoj pet (*iroN, ompT, hlyF, Iss, iutA*) (Tablica 2.), a u trećoj devet (*astA, irp2, papC, iucD, tsh, vat, cvi/cva, ibeA, sitA*) (Tablica 3.). U svakoj PCR reakciji korištene su specifične uzvodne i nizvodne početnice, "master mix" Emerald (Promega, SAD), voda slobodna od RNK/ DNKaza i ranije izdvojena DNK. Ukupan volumen po PCR reakciji bio je 25 µl.

Tablica 1. Prikaz početnica korištenih u prvoj PCR reakciji.

8- plex		
Gen	Sekvenca 5'- 3'	Veličina bp
R1F +	gcgaaaaGAGTAATGTCGGGGCATTCA	551
R1R +	aggccaTTCCTGGCAAGAGAGATAAG	
R2F +	gcgaGATCGACGCCGGAATTTTTT	1141
R2R +	gcgagaAGCTCCATCATCAAGTGAGA	
R3F +	agccaGGCCAAAACACTATCTCTCA	1785
R3R +	agcgccGTGCCTAGTTTATACTTGAA	
R4F +	gcgcgcaTGCCATACTTTATTCATCA	699
R4R +	gcgcTGGAATGATGTGGCGTTTAT	
K12F +	gcaagTTCGCCATTTCGTGCTACTT	916
K12R +	acgcgcTAATCATAATTGGAATGCTGC	
*chuA*F +	aaatttgGACGAACCAACGGTCAGGAT	279
*chuA*R +	atttagTGTGAAGTGTCAGGAGACGCTG	
*yjaA*F +	aaaaaaCCGCCAGTACCAGGGACA	211
*yjaA*R +	gcagaaaaATGGAGAATGCGTTCCTCAA	
TspEF +	gcgaaaaaGAGTAATGTCGGGGCATTCA	152
TspER +	aaggCGCGCCAACAAAGTATTACG	

Tablica 2. Prikaz početnica korištenih u drugoj PCR reakciji.

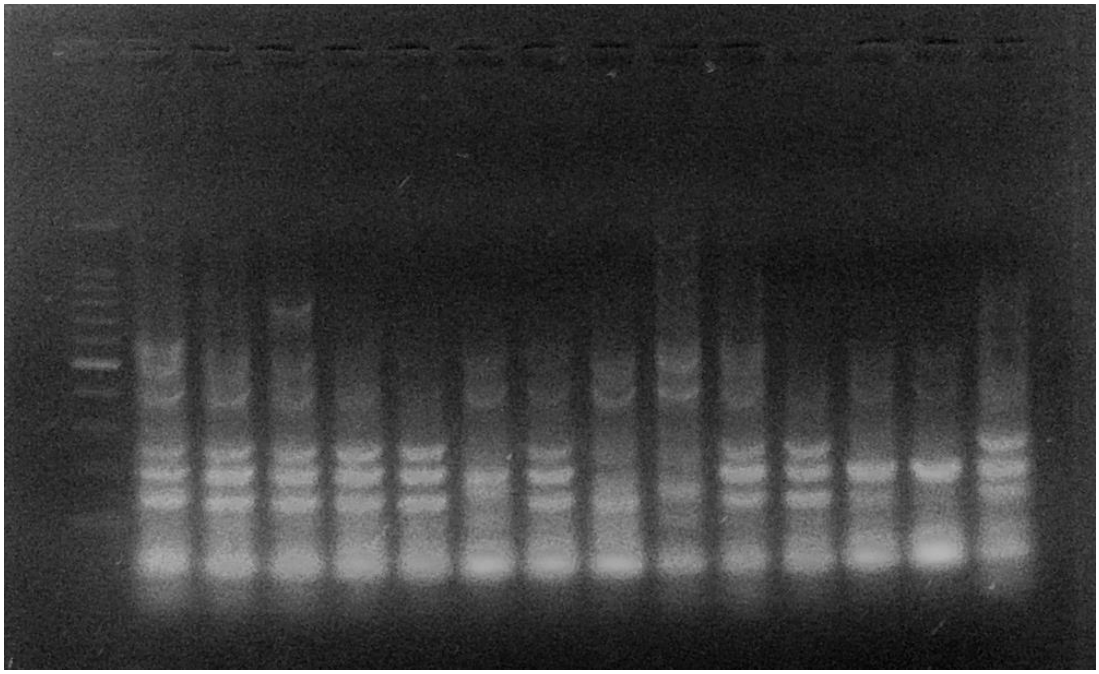
5- plex		
Gen	Sekvenca 5'- 3'	Veličina bp
iroN F	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT	553
iroN R	GTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	
ompT F	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT	496
ompT R	TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	
hlyF F	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC	450
hlyF R	GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	
Iss F	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	323
Iss R	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	
iutA F	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	302
iutA R	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	

Tablica 3. Prikaz početnica korištenih u trećoj PCR reakciji.

9- plex		
Gen	Sekvenca 5'- 3'	Veličina bp
astA F	TGCCATCAACACAGTATATCC	116
astA R	TCAGGTCGCGAGTGACGGC	
irp2 F	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	413
irp2 R	AACTCCTGATACAGGTGGC	
papC F	TGATATCACGCAGTCAGTAGC	501
papC R	CCGGCCATATTCACATAA	
iucD F	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC	714
iucD R	CCTGATCCAGATGATGCTC	
tsh F	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC	824
tsh R	CTTCCGATGTTCTGAACGT	
vat F	TCCTGGGACATAATGGTCAG	981
vat R	GTGTCAGAACGGAATTGT	
cvi/ cva F	TGGTAGAATGTGCCAGAGCAAG	1181
cvi/ cva R	GAGCTGTTTGTAGCGAAGCC	
ibeA F	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	171
ibeA R	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	
sitA F	AGGGGGCACAACTGATTCTCG	608
sitA R	TACCGGGCCGTTTTCTGTGC	

4.5. Gel elektroforeza

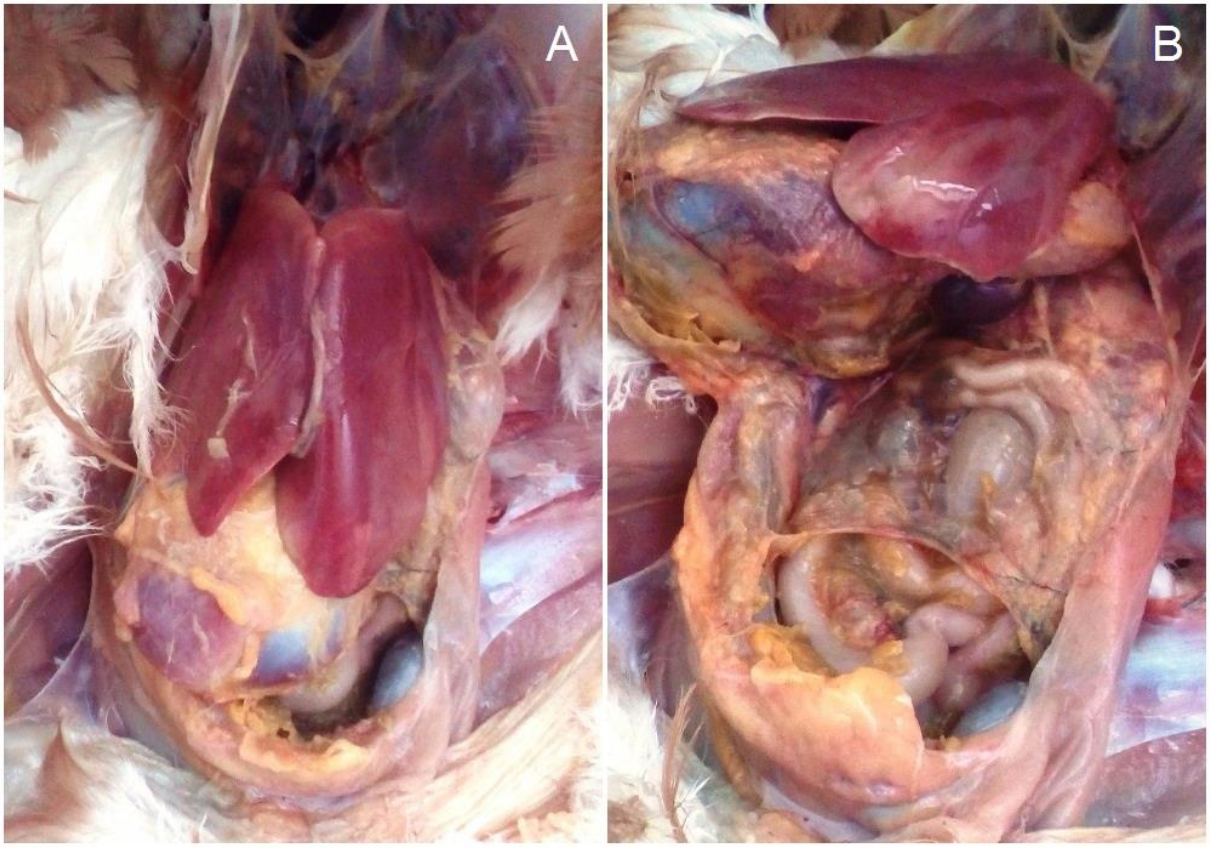
Umnošci PCR reakcija razdvojeni su elektroforezom. Za prvu i treću multiplex reakciju korišten je 2%- tni agarozni gel, a za drugu reakciju 3%- tni gel zbog razlike u veličinama umnožaka. Razdvajanje se izvodilo kroz 30 min na 80 V i 65 mA, a zatim kroz 50 min pri 130 V i 65 mA. Umnošci su vizualizirani primjenom SYBR Safe boje (Invitrogen, SAD). Rezultati jednog dijela umnožaka iz PCR reakcije s osam početnica prikazani su na Slici 1.



Slika 1. Prikaz gel elektroforeze dijela uzoraka za PCR reakciju s osam početnica.

5. REZULTATI

Klinički je na farmama u oboljelih jedinki primijećeno otežano kretanje, otečenost glave, povremeni problemi s disanjem i proljevom. Patoanatomskom pretragom lešina uočene su kronična purulentna pneumonija uz kazeoznu upalu zračnih vrećica, perikarditis, peritonitis, perihepatitis, hepatomegalija, splenomegalija, tendosinovitis, salpingitis i enteritis. Neke od uočenih patoloških promjena prikazane su na Slici 2. Obrisci su uzeti s organa koji su bili patološki promijenjeni ili predstavljaju predilekcijska mjesta za infekciju *E. coli* kao što su jetra, slezena, pluća, crijeva i jajnik. Uočene makroskopske promjene u većine lešina upućivale su na koliseptikemiju što je i potvrđeno izdvajanjem *E. coli* u čistoj kulturi iz pretraživanih organa, a potvrđeno i MALDI- TOF metodom pretrage i API testom.



Slika 2. Promjene uočene patomorfološkom pretragom. A) Fibrinozni perihepatitis. B) Fibrinozni poliserozitis, egg peritonitis.

Na temelju rezultata PCR-a, sojevi su svrstani u filogenetske skupine i podskupine (Tablica 4.). Od ukupno 48 pretražih sojeva *E. coli*, većina ih pripada B2 filogenetskoj skupini (52,08%), a dokazana je i prisutnost drugih skupina- B1 (22,92%), D (16,67%) i A (8,33%). Određena je i učestalost filogenetskih podskupina pri čemu je najzastupljenija bila $B2_3$ podskupina (47,92%).

Tablica 4. Prikaz filogenetskih skupina izdvojenih sojeva *E. coli.*

Oznaka farme	Dob peradi	Organ	Filogenetska skupina	Filogenetska podskupina
1	43 tjedna	jetra	D	D2
		crijevo	B1	B1
		folikul	B2	$B2_3$
		slezena	B2	$B2_3$
		jetra	B2	$B2_3$
		pluća	B2	$B2_3$
	55 tjedana	folikul	D	D2
		jetra	B1	B1
		crijevo	B1	B1
		pluća	D	D2
		folikul	B2	$B2_3$
		jetra	B1	B1
		pluća	B2	$B2_3$
		slezena	B2	$B2_3$
		slezena	B2	$B2_3$
		jetra	B2	$B2_3$
		folikuli	B2	$B2_3$
		pluća	B2	$B2_3$
		jetra	B2	$B2_3$
		jetra	A	A1
		slezena	B2	$B2_3$
		tibiotarzalni zglob	B1	B1
		folikuli	A	A_o
		pluća	B2	$B2_3$
		tibiotarzalni zglob	B2	$B2_3$
		jetra	B1	B1
		slezena	A	A1
		pluća	B2	$B2_3$
		folikuli	B2	$B2_2$

	55 tjedana	zračne vrećice	A	A1
		gušterača	D	D2
		zračne vrećice	B1	B1
2	15 tjedana	jetra	B2	$B2_3$
		crijevo	D	D2
		crijevo	D	D2
3	59 tjedana	jetra	B2	$B2_3$
		folikul	B1	B1
		slezena	B1	B1
	79 tjedana	jajnik	B1	B1
		jajnik	B1	B1
		jajnik	B2	$B2_3$
		jajnik	B2	$B2_3$
	75 tjedana	jajnik	B2	$B2_3$
		jajnik	D	D2
		jajnik	B2	$B2_3$
		jetra	B2	$B2_2$
	74 tjedna	zračne vrećice	B2	$B2_3$
		gornji dišni prohodi	D	D2

U Tablici 5. prikazana je usporedba zastupljenosti filogenetskih skupina i podskupine $B2_3$ na Farmi 1, 2 i 3. Na Farmi 1 bili su primijećeni teži klinički simptomi, te su prilikom patomorfološke pretrage uočene izraženije patološke promjene.

Tablica 5. Usporedni prikaz učestalosti filogenetskih skupina i podskupine $B2_3$ na Farmama 1, 2 i 3.

	Farma 1 (n=32)	Farma 2 (n=3)	Farma 3 (n=13)
B2	17	1	7
B1	7	-	4
D	4	2	2
A	4	-	-
$B2_3$	16	1	6

U Tablici 6. prikazana je učestalost filogenetskih skupina i $B2_3$ podskupine po organima iz kojih su uzeti obrisci, pri čemu se može vidjeti da su najzastupljenija skupina B2 najčešće izolirana iz jetre, slezene, folikula i pluća.

Tablica 6. Prikaz učestalosti filogenetskih skupina i $B2_3$ podskupine po organima iz kojih su uzeti obrisci.

	B2	B1	D	A	$B2_3$
Jetra	6	3	1	1	5
Crijevo	0	2	2	0	0
Folikul	3	1	1	0	2
Slezena	4	1	0	1	4
Pluća	5	0	1	1	5
Tibiotarzalni zglob	1	1	0	0	1
Zračne vrećice	1	1	0	1	1
Gušterača	0	0	1	0	0
Gornji dišni prohodi	0	0	1	0	0

U Tablici 7. prikazana je učestalost nekih od gena virulencije koji se smatraju važnima za patogenost APEC u pojedinih filogenetskih skupina. Može se uočiti vrlo visoka učestalost različitih gena virulencije kod filogenetske skupine B1 i B2, a relativno mala u skupine A.

Tablica 7. Prikaz učestalosti pojedinih gena virulencije (%).

Geni virulencije	Zajednički uzorak (n=48)	Filogenetska skupina				Filogenetska podskupina
		B2 (n=25)	B1 (n=11)	D (n=8)	A (n=4)	$B2_3$ (n=23)
papC	85,4	76	100	100	75	73,9
tsh	22,9	28	0	50	0	26,1
chuA	68,8	100	0	100	0	100
irp2	4,2	8	0	0	0	8,7
iucD	14,6	16	0	25	25	13,4
iutA	93,8	100	90,9	100	50	100
sitA	62,5	56	81,8	87,5	0	52,2
ibeA	43,8	48	36,4	50	50	43,5
ompT	39,6	36	54,5	50	0	39,1
cvi/cva	27,1	16	63,6	25	0	17,4
astA	31,3	24	45,5	37,5	25	17,4
hlyF	52,1	44	63,6	75	25	47,8

U Tablici 8. prikazana je učestalost pojedinih gena virulencije s obzirom na farmu podrijetla i namjenu životinje. Rezultati pokazuju veću zastupljenost *papC, chuA, iutA* i *sitA* gena u teških i lakih linija na svim farmama, s iznimkom *irp2, astA* i *hlyF* gena koji su zastupljeniji kod nesilica.

Tablica 8. Prikaz učestalosti pojedinih gena virulencije na pojedinim farmama.

	Farma 1	Farma 2	Farma 3
Geni	teška linija (n=32)	teška linija (n=3)	laka linija (n=13)
papC	26	3	12
tsh	8	1	2
chuA	21	3	9
irp2	1	3	9
iucD	3	1	3
iutA	29	3	13
sitA	20	1	9
ibeA	13	2	6
ompT	10	3	6
cvi/ cva	8	0	5
astA	5	2	8
hlyF	14	3	8

6. RASPRAVA

Ptičji patogeni sojevi *E. coli* uzrokuju različite lokalizirane i sistemske infekcije, a bolest najčešće započinje infekcijom dišnog sustava koja se razvije u sistemsku infekciju i dovodi do uginuća. Kod nesilica samo nesenje predstavlja izraziti stres, a hormonalni status (visoke razine estrogena) pridonose prijemčivosti na infekciju s *E. coli* koja vrlo često nastupa ascendentno putem jajovoda (ANON., 2014.) Ovakav status životinja u proizvodnji olakšava simultano zaražavanje različitim sojevima. Podjela sojeva *E. coli* u filogenetske skupine omogućava razvrstavanje u komenzale ili različite patotipove (CORDONI i sur., 2016.). Takvu metodu podjele, koja se temelji na dokazu gena *chuA, yjaA* i ulomka DNK TspE4.C2, opisali su CLERMONT i sur. (2000.). Ona je korištena u ovom istraživanju i pokazala se vrlo korisnom.

Unatoč izrazitoj raznovrsnosti APEC izolata, istraživanja su pokazala sličnosti između NMEC, SePEC, UPEC i APEC sojeva u pripadnosti serogrupama, filogenetskim grupama i posjedovanju faktora virulencije, što ukazuje na mogućnost postojanja zoonotskog potencijala APEC sojeva (EWERS i sur., 2007.; MELLATA i sur., 2013.; GUABIRABA i sur., 2015.). Nasuprot tome, CORDONI i sur. (2016.) smatraju tu teoriju netočnom jer nisu pronašli nijedan soj podrijetlom iz domaćih životinja koji bi pripadao skupini $B2_3$ koju čine samo sojevi humanog podrijetla. Istog su mišljenja CARLOS i sur. (2010.) i STOPPE i sur. (2014.) koji zaključuje da su sojevi te skupine posljedica kontaminacije vode fekalijama ljudskog podrijetla, za razliku od B1 sojeva koji su prisutni zbog fekalne kontaminacije podrijetlom od domaćih životinja. Nasuprot tome, DERAKHSHANDE i sur. (2013.) komparativnom analizom izolata E. coli iz fecesa izolirali su $B2_3$ skupinu u preživača, pasa i ljudi, ali ne i peradi. Istraživanje provedeno na APEC sojevima izdvojenim u Njemačkoj, Italiji i Velikoj Britaniji dokazalo je da su u navedenim zemljama najčešće prisutne filogenetske skupine B2 (56,1% u Velikoj Britaniji i 35,3% u Njemačkoj) i A1 (53,3% u Italiji) (CORDONI i sur., 2016.). PIRES-DOS-SANTOS i sur. (2013.) istraživali su genetsku raznolikost APEC sojeva izdvojenih iz roditeljskih jata teških linija u Danskoj, te također navode nalaz filogrupa B2 (u 52.9% slučajeva), D (22.1%), te A (19.1%) i B1 (5.9%). Rezultati iz Tablice 6. pokazuju da je najzastupljenija filogenetska skupina (B2) najčešće izolirana iz jetre, folikula, slezene i pluća, gdje su obično i najizraženije patološke promjene. U ovom smo istraživanju, zbog velike zastupljenosti B2 filogenetske skupine, provjerili i kojim podskupinama pripadaju APEC sojevi koje smo izdvojili. Metoda utvrđivanja podskupina se zasniva na dokazu sva tri gena koja se koriste i za određivanje filogenetskih skupina (*chuA, yjaA,* TspE4.C2). Na temelju dokaza navedenih gena, utvrdili smo da je prevalencija $B2_3$ skupine čak 47,92% od ukupno pretraženih sojeva, odnosno da 23 od 25

izolata iz skupine B pripada spomenutoj podskupini. U dosadašnjim istraživanjima nijedan APEC soj nije svrstan u $B2_3$ skupinu za koju se smatra da joj pripadaju samo humani sojevi. Takav rezultat ima veliku važnost jer ukazuje na veliku genetsku srodnost izoliranih sojeva različitih životinjskih vrsta i ljudi, a uz to je dodatni pokazatelj zoonotskog potencijala ptičjih patogenih sojeva. SINGER (2015.) u svom radu napominje da pronalazak sličnosti gena virulencije u ExPEC sojevima kod ljudi i životinja nije nužno dokaz zoonotskog potencijala. Postojanje takvih sličnosti je očekivano s obzirom na njihovu važnost u omogućavanju preživljavanja bakterija u ekstraintestinalnim uvjetima. Unatoč tome, potvrđuje da postoji mogućnost prijenosa ExPEC sojeva na ljude kao rezultat neadekvatnog postupanja sa životinjama, odnosno manipulacijom lešinama i mesom koje se koristi za prehranu ljudi.

Prevalencija gena virulencije koje smo određivali, a koji se smatraju važnima za patogenost APEC sojeva, djelomično se slaže s rezultatima sličnih istraživanja drugih autora. U Tablici 7. prikazana je njihova učestalost u zajedničkom uzorku i pojedinim filogenetskim skupinama. Može se uočiti veća učestalost različitih gena virulencije kod filogenetske skupine B1 i B2, a relativno mala u skupine A za koju se smatra da joj pripadaju samo komenzalni sojevi *E. coli*. Geni *papC* i *tsh* su adhezini potrebni za prianjanje bakterija na epitelne stanice domaćina, *chuA, irp2, uicD, iutA* imaju ulogu u vezanju željeza u organizmu uz *sitA* koji je važan za njegov i manganov transport. Gen *ibeA* je odgovoran za invazivnost bakterije, dok *ompT* i *cvi/cva* imaju zaštitnu ulogu. Važni su još i toksin *astA*, te hemolizin *hlyF*. U Tablici 7. prikazana je usporedba učestalosti spomenutih gena virulencije u teških i lakih linija s obje farme. Rezultati su pokazali veću zastupljenost *papC, chuA, iutA* i *sitA* gena u teških linija i nesilica s obje farme, za razliku od *irp2, astA* i *hlyF* gena koji su zastupljeniji samo kod nesilica s Farme 2. MITCHELL i sur. (2015.) su u svom istraživanju uspoređivali tvorbu biofilma crijevnih i izvancrijevnih sojeva. Biofilm štiti bakterije od obrambenih mehanizama domaćina, antibiotika i nekih dezinficijensa, te im omogućava stjecanje novog genetskog materijala u blizini drugih patogena da bi postali što virulentniji i rezistentniji. Primijetili su da je biofilm crijevnih sojeva *E. coli* bio gušći što omogućava bolje preživljavanje i zaštitu na površini jaja. Miješanjem crijevnih i izvancrijevnih sojeva dolazi do međusobne izmjene genetskog materijala i prilagodbe komenzalnih sojeva koji onda postaju sposobni za infekciju. EWERS i sur. (2009.) su istraživali da li sojevi izdvojeni iz fecesa klinički zdrave peradi predstavljaju rezervoar izvancrijevnih infekcija i zaključili da zdrava perad može služiti kao genska zaliha (eng. gene pool) za ExPEC sojeve. Jedan od mogućih načina širenja zaraze je i u klaonici putem trupova kontaminiranih fecesom i sadržajem crijeva (JOHNSON i sur., 2009.). Isto tako domestifikacija životinja imala je neposredan utjecaj na mikrofloru životinja putem pasminske selekcije, prilagodbe hranidbe i

zoohigijenskih uvjeta u uzgoju, te izloženosti različitim antibioticima. Učestala upotreba antimikrobnih preparata u intenzivnom uzgoju u peradarskoj industriji dovela je do toga da konzumacijom mesa dolazi do razvoja sve veće antimikrobne rezistencije jer perad ima ulogu rezervoara ExPEC- a (MANGES i sur., 2007.; MANGES i JOHNSON, 2012.). SKURNIK i sur. (2006.) su istraživanjem antropogenog utjecaja na pojavu antimikrobne rezistencije došli do zaključka da su izolati podrijetlom od domaćih životinja rezistentniji na antibiotike od izolata divljih životinja. U mikroflori domaćih životinja veća je učestalost A i B1 filogenetskih skupina koji predstavljaju komenzalne sojeve, za razliku od divljih životinja kod kojih su zastupljeniji B2 i D skupine (ESCOBAR- PÁRAMO i sur., 2006.).

Upravo zbog pojave miješanja sojeva između različitih životinjskih vrsta i ljudi, te komenzalnih sojeva iz okoliša, važno je pristupiti takvom općezdravstvenom i gospodarskom problemu na prikladan način. Iz dosadašnjih istraživanja poznato je da se sve češće komenzalni sojevi (B1, A skupine) izdvajaju kao uzročnici bolesti, što znači da na problem treba gledati i s ekološke strane, a ne samo ekonomske i zdravstvene. Iz tog razloga mnogi autori predlažu tzv. "One Health" pristup. Onečišćenjem okoliša, kontaminira se voda i hrana domaćih životinja, preko kojih se u konačnici indirektno djeluje na zdravlje ljudi.

Rezultati upućuju na veliku raznolikost filogenetskih skupina *E. coli* u istim jatima peradi što otežava mogućnost imunoprofilakse. Na prve dvije farme uključene u epizootiološko istraživanje korišteno je živo i inaktivirano komercijalno cjepivo koji su dostupni na tržištu, ali bez pozitivnog ishoda. Zbog toga se kao trenutačno najbolje rješenje preporuča korištenje inakvitiranih autogenih cjepiva pripremljenih od "stajskih sojeva" *E. coli*. Adekvatnim cijepljenjem peradi mogla bi se smanjiti pojavnost bolesti primarno u peradi, a time i pritisak na ljudsku populaciju kod koje su sve češće infekcije urinarnog trakta uzrokovane ExPEC sojevima genetski vrlo srodnim ptičjim patogenim sojevima *E. coli*. Preventivnim cijepljenjem smanjuje se potreba za antimikrobnom terapijom zaraženih jata. Na taj način bi smanjena upotreba antibiotika imala pozitivan utjecaj i na zdravlje ljudi, te smanjila stvaranje antimikrobne rezistencije koja predstavlja sve veći problem. Iz tog razloga je bitno kontinuirano provoditi epizootiološka istraživanja kako bi se pratila i kontrolirala pojavnost i širenje potencijalno opasnih sojeva za samu perad ali i ljudsku populaciju.

7. ZAKLJUČCI

- Rezultati pokazuju veliku raznolikost filogenetskih skupina *E. coli.*
- Utvrđene su razlike u učestalosti određenih gena virulencije između pojedinih sojeva *E. coli*.
- Korištena metoda određivanja filogenetskih skupina lančanom reakcijom polimerazom na temelju dokaza gena *chuA, yjaA* i ulomka DNK TspE4.C2 je vrlo efikasna.
- Raznolikost utvrđenih filogenetskih skupina *E. coli* otežava imunoprofilaksu na farmama peradi i opravdava primjenu autogenih cjepiva.
- Utvrđivanje proširenosti pojedinih sojeva epizootiološkim istraživanjem može pomoći u provođenju adekvatnih preventivnih mjera.
- Rezultati potvrđuju mogućnost postojanja zoonotskog potencijala APEC sojeva.

8. LITERATURA

ANONYMOUS (2014): Colibacillosis in layers: an overview. Hy-Line Technical Update, 1-8.

ANTÃO E.- M. (2010): Identification of Avian Pathogenic E. coli (APEC) genes important for the colonization of the chicken lung and characterization of the novel ExPEC adhesin I. Dissertation. Humboldt- Universität zu Berlin, Berlin, Njemačka.

BIĐIN Z.; Bolesti peradi; Veterinarski fakultet; Zagreb, 2008.

CARLOS, C., M. M. PIRES, N. C. STOPPE, E. M. HACHICH, M. I. Z. SATO, T. A. T. GOMES, L. A. AMARAL, L. M. M. OTTOBONI (2010): Escherichia coli phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. BMC Microbiol., 10:161.

CLERMONT, O., S. BONACORSI, E. BINGEN (2000): Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. Appl. Environ. Microbiol., 66, 4555–4558.

CLERMONT, O., J. K. CHRISTENSON, E. DENAMUR, D. M. GORDON (2013): The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ. Microbiol. Rep., 5(1), 58-65.

CORDONI, G., M. J. WOODWARD, H. WU, M. ALANAZI, T. WALLS, R. M. LA RAGIONE (2016): Comparative genomics of European avian pathogenic E. coli (APEC). BMC Genomics, 17, 960.

DE CASTRO STOPPE, N., J. S. SILVA, T. T. TORRES, C. CARLOS, E. M. HACHICHI, M. I. ZANOLI SATO, A. M. SARAIVA (2014): Clustering of water bodies in unpolluted and polluted environments based on Escherichia coli phylogroup abundance using a simple interaction database. Genet. Mol. Biol., 37 (4), 694-701.

DISSANAYAKE, D. R. A., S. OCTAVIA, R. LAN (2014): Population structure and virulence content of avian pathogenic Escherichia coli isolated from outbreaks in Sri Lanka. Vet. Microbiol., 168, 403–412.

ESCOBAR-PÁRAMO, P., A. LE MENAC'H, T. LE GALL, C. AMORIN, S. GOURIOU, B. PICARD, D. SKURNIK, E. DENAMUR (2006): Identification of forces shaping the commensal Escherichia coli genetic structure by comparing animal and human isolates. Environ. Microbiol., 8(11), 1975-1984.

EWERS, C., G. LI, H. WILKING, S. KIEßLING, K. ALT, E. M. ANTÃO, C. LATURNUS, I. DIEHL, S. GLODDE, T. HOMEIER, U. BÖHNKE, H. STEINRÜCK, H. C. PHILIPP, L. H. WIELER (2007): Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis- causing Escherichia coli: How closely related are they? Int. J. Med. Microbiol., 297, 163–176.

EWERS, C., E. M. ANTÃO, I. DIEHL, H. C. PHILIPP, L. H. WIELER (2009): Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains with zoonotic potential. Appl. Environ. Microbiol., 75,184–192.

GREGERSEN, R. H., H. CHRISTENSEN, C. EWERS, M. BISGAARD (2010): Impact of Escherichia coli vaccine on parent stock mortality, first week mortality of broilers and population diversity of E. coli in vaccinated flocks. Avian Pathol. 39, 287–295.

GUABIRABA, R. i C. SCHOULER (2015): Avian colibacillosis: still many black holes. FEMS Microbiol. Lett., 2015, 362, 15.

JOHNSON, T. J., Y. WANNEMUEHLER, C. DOETKOTT, S. J. JOHNSON, S. C. ROSENBERGER, L. K. NOLAN (2008): Identification of minimal predictors of avian pathogenic Escherichia coli virulence for use as a rapid diagnostic tool. J. Clin. Microbiol., 46, 3987–3996.

JOHNSON T. J., C. M. LOGUE, Y. WANNEMUEHLER, S. KARIYAWASAM, C. DOETKOTT, C. DEBROY, D. G. WHITE, L. K. NOLAN (2009): Examination of the source and extended virulence genotypes of Escherichia coli contaminating retail poultry meat. Foodborne Pathog. Dis., 6, 657-667.

LANDMAN, W. J. M., G. J. BUTER, R. DIJKMAN, J. H. H. VAN ECK (2014): Molecular typing of avian pathogenic Escherichia coli colonies originating from outbreaks of E. coli peritonitis syndrome in chicken flocks. Avian Pathol., 43, 345–356.

MANGES A.R. i J. R. JOHNSON (2012): Food- borne origins of Escherichia coli causing extraintestinal infections. Clin. Infect. Dis., 55 (5), 712–719.

MANGES A. R., S. P. SMITH, B. J. LAU, C. J. NUVAL, J. N. S. EISENBERG, P. S. DIETRICH, L. W. RILEY (2007): Retail meat consumption and the cquisition of antimicrobial resistant Escherichia coli causing urinary tract infections: A case– control study. Foodborne. Pathog. Dis., 4, 419-431.

MATTHIJS, M., M. P. ARIAANS, R. M. DWARS, J. H. H. VAN ECK, A. BOUMA, A. STEGEMAN, L. VERVELDE (2009): Course of infection and immune responses in the respiratory tract of IBV infected broilers after superinfection with E. coli. Vet. Immunol. Immunopathol., 127, 77–84.

MATURANA, V. G., F. DE PACE, C. CARLOS, M. M. PIRES (2011): Subpathotypes of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) exist as defined by their syndromes and virulence traits. Open. Microbiol. J., 5, 55-64.

MELLATA, M. (2013): Human and avian extraintestinal pathogenic Escherichia coli: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. Foodborne Pathog. Dis. 10 (11), 916-932.

MITCHELL, N. M., J. R. JOHNSON, B. JOHNSTON, R. CURTISS III, M. MELLATA (2015): Zoonotic potential of Escherichia coli isolates from retail chicken meat products and eggs. Appl. Environ. Microbiol., 81, 1177–1187.

MOULIN- SCHOULEUR, M., M. RÉPÉRANT, S. LAURENT, A. BRÉE, S. MIGNON-GRASTEAU, P. GERMON, D. RASSCHAERT, C. SCHOULER (2007): Extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. J. Clin. Microbiol., 45, 3366-3376.

PICARD, B., J. S. GARCIA, S. GOURIOU, P. DURIEZ, N. BRAHIMI, E. BINGEN, J. ELION, E. DENAMUR (1999): The link between phylogeny and virulence in Escherichia coli extraintestinal infection. Infect. Immun., 67,546–553.

PIRES-DOS-SANTOS T., M. BISGAARD, H. CHRISTENSEN (2013): Genetic diversity and virulence profiles of Escherichia coli causing salpingitis and peritonitis in broiler breeders. Vet. Microbiol. 162, 873–880.

PORTER, R. A. JR. (1998): Bacterial enteritides of poultry. Poult. Sci., 77, 1159–1165.

SCHOULER, C., B. SCHAEFFER, A. BRÉE, A. MORA, G. DAHBI, F. BIET, E. OSWALD, J. MAINIL, J. BLANCO, M. MOULIN-SCHOULEUR (2012): Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic Escherichia coli based on four patterns of virulence genes. J. Clin. Microbiol., 50, 1673-1678.

SINGER, R.S. (2015): Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps. Front. Microbiol., 6, doi: 10.3389/fmicb.2015.00028

SKURNIK, D., R. RUIMY, A. ANDREMONT, C. AMORIN, P. ROUQUET, B. PICARD, E. DENAMUR (2006): Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal Escherichia coli. J. Antimicrob. Chemoth., 57, 1215–1219

9. SAŽETAK

MOLEKULSKA KARAKTERIZACIJA APEC SOJEVA *E.COLI* IZDVOJENIH NA FARMAMA PERADI U REPUBLICI HRVATSKOJ

Kolibaciloza uzrokovana APEC (Avian Pathogenic *Escherichia coli*) sojevima stvara velike gospodarske gubitke u intenzivnoj peradarskoj proizvodnji. Često nastaje kao sekundarna infekcija zbog imunosupresije uzrokovane drugim bolestima. Osim toga, neadekvatni zoohigijenski uvjeti i drugi stresni čimbenici kao što je nesivost mogu utjecati na pojavu bolesti. S obzirom na velike štete koje uzrokuje i postojanje zoonotskog potencijala, utvrđivanje proširenosti APEC sojeva i njihova tipizacija, može pomoći u provođenju nužnih profilaktičkih mjera kao što je cijepljenje. U ovom istraživanju izdvojeni su sojevi *E. coli* iz lešina dostavljenih na patomorfološku pretragu s farmi peradi koje imaju probleme s kolibacilozom. Iz bakterijskih kultura je izdvojena ukupna DNK i određena pripadnost filogenetskim skupinama (A, B1, B2, D) dokazivanjem gena *chuA, yjaA* i ulomka DNK Tspe4.C2 primjenom PCR reakcije. Utvrđeno je i postojanje pojedinih gena virulencije koji mogu biti pokazatelj patogenosti sojeva. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da postoji velika raznovrsnost filogenetskih skupina *E. coli* što otežava provođenje imunoprofilakse, te su utvrđene razlike u prevalenciji određenih gena virulencija između pojedinih sojeva.

Ključne riječi: *E. coli,* APEC, filogenetska raznolikost, lančana reakcija polimerazom

10. SUMMARY

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF APEC STRAINS ISOLATED FROM POULTRY FARMS IN CROATIA

APEC strains can cause serious loses in poultry production. It often begins as a secondary infection caused by imunosupression. Moreover, inadequate zoohygienic conditions and stress, as laying period, can cause problems. Because of great loses and possible zoonotic potential of APEC, molecular characterization and determination of phylogenetic diversity is very important for it can help in conducting profilactic measures. During this epizootiological survey, *E. coli* strains were isolated and afterwards molecular characterization was done. Some of the most frequent virulence genes which can be indicators of strain pathogenicity were determined. Results showed contamination with different *E. coli* phylogroups according to phylogenetic group markers *(chuA, yjaA,* Tspe4.C2*),* with predominant finding of B2 phylogroup. In addition, some differences in frequency of certain virulence genes between isolated strains were determined, which also affects efficiency of immunoprophylactic measures.

Key words: *E. coli,* APEC, phylogenetic diversity, PCR

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 5.2.1993. u Korčuli. Pohađala sam Osnovnu školu Petra Kanavelića u Korčuli, a nakon toga Opću gimnaziju Korčula. 2011. godine upisala sam Veterinarski fakultet Sveuličišta u Zagrebu. Zbog posebnog interesa za bolesti peradi odabrala sam izraditi ovaj diplomski rad u Zavodu za bolesti peradi s klinikom pod mentorstvom doc.dr.sc. Željka Gottsteina i doc.dr.sc. Danijele Horvatek Tomić, za koji sam 2017. godine dobila Rektorovu nagradu.