

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240694**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **431942**

(51) Int.Cl.  
**C12Q 1/689 (2018.01)**  
**C12Q 1/10 (2006.01)**  
**C12N 15/11 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **26.11.2019**

---

(54) **Sposób i zestaw do identyfikacji szczepu *E.coli* patogennego dla ptaków**

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**31.05.2021 BUP 11/21**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**23.05.2022 WUP 21/22**

(73) Uprawniony z patentu:

**PROTEON PHARMACEUTICALS  
SPÓŁKA AKCYJNA, Łódź, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**JAROSŁAW DASTYCH, Łódź, PL  
JOANNA KAZIMIERCZAK, Łódź, PL  
KAROLINA POSPIECH, Łódź, PL  
PATRYCJA SOWIŃSKA, Łódź, PL  
EWELINA A. WÓJCIK, Majków Mały, PL  
MAŁGORZATA STAŃCZYK, Łódź, PL  
JUSTYNA ANDRYSIK, Łódź, PL  
DOMINIK STRAPAGIEL, Łódź, PL  
BŁAŻEJ MARCINIAK, Łódź, PL  
PAULINA BORÓWKA, Łódź, PL  
MARCIN WOJCIECH LIS, Wieliczka, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Rafał Witek**

---

**PL 240694 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest szybka metoda pozwalająca na jednoznaczną identyfikację pozajelitowych szczepów *E. coli* patogennych dla drobiu (APEC – Avian Pathogenic *Escherichia coli*), zwłaszcza za pomocą nowej kombinacji genów amplifikowanych w metodzie diagnostycznej PCR typu multiplex.

Patogenne *E. coli* wywołują kolibakteriozę, powszechną chorobę ptactwa domowego, która stanowi istotne zagrożenie w bezpieczeństwie hodowli zwierząt, jest jedną z głównych przyczyn dużej śmiertelności drobiu oraz związanych z tym znaczących strat ekonomicznych w przemyśle drobiarskim (Barnes, HJ. et al., 2008, Ewers, C. et al., 2008, Lutful Kabir, SM., 2010). Dotychczas stwierdzono, że szczepy APEC posiadają wiele podobieństw z innymi, pozajelitowymi szczepami *E. coli* (ang. ExPEC – Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*) chorobotwórczymi dla ludzi, m.in. ze szczepami UPEC (uropathogenic *E. coli*), NMEC (neonatal meningitis-associated *E. coli*), czy SEPEC (sepsis-causing *E. coli*) i stanowią potencjalne ryzyko dla zdrowia człowieka (Mellata, M., 2013).

Patogenne szczepy *E. coli* wykazują oporność na wiele środków przeciwdrobnoustrojowych, dlatego powszechnie stosowane terapie antybiotykowe są na ogół nieefektywne. Dotychczas nie udało się również opracować skutecznej szczepionki przeciwko tym bakteriom (Huja, S. et al., 2015). Coraz więcej dowodów wskazuje również na fakt, że niektóre APEC są patogenami powodującymi zoonozy (Hussein A.H., 2013), a liczba infekcji wywoływanych przez te bakterie ciągle wzrasta (Dziva, F. et al., 2008).

Powszechnym problemem dotyczącym szczepów APEC jest brak jednolitego systemu ich identyfikacji. Wynika to z paru czynników:

- powszechności występowania pałeczki okrężnicy w środowisku zwierząt: *E. coli* stanowi florę komensalną, która może być rezerwuarem czynników patogenności, nie wywołując efektu chorobotwórczego; dodatkowo trudno jest wyizolować z narządów chorych ptaków jedynie szczepy patogene (Lindstedt, BA. et al., 2018, Stromberg, ZR. et al., 2017, Sadowska, J. et al., 2019);
- mnogości serotypów wśród szczepów *E. coli* – istnieją serotypy, które można powiązać z patogennością (np. O1, O2, O78), jednakże wiele szczepów nie daje się typować tradycyjnymi metodami serologicznymi lub istnieją serotypy rzadkie, których nie można powiązać z chorobotwórczością szczepów (Dziva, F. et al., 2012, Jorgensen, S.L. et al., 2017, Iguchi, A. et al., 2015);
- ogromnej genetycznej różnorodności – pozajelitowe szczepy *E. coli* posiadają mechanizmy warunkujące ich patogenność i przystosowujące je do życia w środowisku pozajelitowym; czynniki zjadliwości dotyczą głównie zdolności do przylegania/adhezji, wytwarzania toksyn, czy mechanizmów pozyskiwania żelaza, jednak nie ma powszechnej metody określającej, które czynniki mają bezpośredni wpływ na patogenność, jak również nie określono minimalnej ilości takich czynników, które mogłyby być dobrym predyktorem patogenności; istnieje wiele prac, które wskazują na obecność pewnych wybranych czynników wirulencji w szczepach patogennych, jednak nie określono istotności statystycznej występowania analizowanych genów w szczepach patogennych w stosunku do szczepów niepatogennych (Dissanayake, DR. et al., 2013, Subedi, M. et al., 2018, Silveira, F. et al., 2016, Johnson, TJ. et al., 2008, Huja, S. et al., 2015, Guabiraba R. & Schouler, C., 2015, Paixao, A.C. et al., 2016).

Obecnie najczęściej stosowaną metodą diagnostyczną typowania szczepów APEC jest identyfikacja serologiczna. Metoda ta pozwala jednak na identyfikację jedynie ograniczonej liczby szczepów i nie odzwierciedla obecności czynników wirulencji (Schouler, C. et al., 2012).

W związku z powyższym, bez dokładnej identyfikacji szczepów chorobotwórczych i odróżnienia ich od szczepów komensalnych, nie ma możliwości odpowiedniego doboru terapii – np. zastosowania antybiotyku, wobec którego wrażliwe są szczepy patogene. Jako że szczepy APEC charakteryzuje duża antybiotykooporność, informacja dotycząca patogenności szczepu jest niezwykle istotna (Subedi, M. et al., 2018).

Istotnym markerem umożliwiającym wykrywanie i charakterystykę szczepów APEC może być identyfikacja czynników wirulencji. Najbardziej obiecującą metodą ich wykrywania jest genotypowanie

za pomocą PCR typu multipleks. Przydatność tej metody w identyfikacji APEC potwierdzają liczne doniesienia.

Iguchi i wsp. opracowali multipleks PCR składający się z 20 mieszanin reakcyjnych zawierających od 6 do 9 par starterów w celu identyfikacji i klasyfikacji większości znanych szczepów *E. coli* należących do serotypów O. Walidacja metody z wykorzystaniem serotypów referencyjnych i dzikich wykazała dokładność metody na poziomie odpowiednio 100 i 90,8% (Iguchi, A. et al., 2015).

Metoda PCR typu multipleks została również zastosowana w badaniach Barbieri i wsp., którzy przeprowadzili charakterystykę 144 izolatów *E. coli* pochodzących z zapalenia tkanki łącznej kurczaków z obszaru południowej Brazylii. Genotypowanie przeprowadzone w oparciu o 34 geny wirulencji potwierdziło obecność we wszystkich izolatach genów odpowiedzialnych za adhezję, pozyskiwanie żelaza i odporność na surowicę, których występowanie związane jest z patogennością dla drobiu (Barbieri, N.L. et al., 2013). Ewers i wsp. w metodzie multipleks PCR wykorzystali kombinację genów *papC*, *iucD*, *irp2*, *tsh*, *vat*, *astA*, *iss* i *cva/cvi* do identyfikacji szczepów *E. coli* wyizolowanych z przypadków kolibakteriozy. W celu weryfikacji metody sprawdzano częstość występowania badanych genów w szczepach izolowanych od zdrowych kurcząt oraz w szczepach uropatogennych, enteropatogennych i enterotoksycznych. Uzyskane wyniki potwierdziły obecność od 4 do 8 badanych genów w szczepach *E. coli* wyizolowanych od zwierząt z objawami kolibakteriozy. Natomiast u szczepów niepatogennych potwierdzono obecność maksymalnie 3 badanych genów (Ewers, C. et al., 2005). Podobnych obserwacji potwierdzających większą częstość genów wirulencji (od 5 do 8) w szczepach APEC dostarczyły badania Roussan i wsp. W tym samym badaniu wykazano obecność mniej niż 4 genów wirulencji w szczepach niepatogennych (Roussan, D.A. et al., 2014).

Większą częstość występowania 2 genów wirulencji: *iss* (gen odporności na surowicę) oraz *tsh* (gen kodujący termowrażliwą hemaglutyninę) w izolatach *E. coli* pochodzących od chorych ptaków potwierdziły również badania, w których oceniano częstość występowania genów *iss*, *tsh*, *iucC* i *cvi* (Skyberg, J.A. et al., 2003).

W pracy Westhuizen i wsp. została opisana metoda multipleks PCR, w której w celu przeprowadzenia molekularnej charakterystyki szczepów *E. coli* w izolatach pochodzących z obszarów Afryki Południowej i Zimbabwe, wykorzystano kombinację 18 genów wirulencji. Selekcja genów została przeprowadzona w oparciu o dostępne dane literaturowe, które potwierdzały wysoką częstość występowania badanych genów wśród APEC w innych krajach oraz badania dotyczące roli tych genów w mechanizmie wirulencji (van der Westhuizen, W.A. & Bragg, R.R., 2012).

W badaniach przeprowadzonych na 219 szczepach *E. coli* (153 szczepach APEC, 30 ptasich kałowych *E. coli* (AFEC) i 36 szczepach środowiskowych) wykazano występowanie znacznej przewagi genów wirulencji *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, *iutA* wśród APEC (89,5–94,7%,  $P < 0,001$ ) w porównaniu do AFEC (46,6–53,3%) i szczepów środowiskowych (10–25%) (Hussei, A.H. et al., 2013).

Również w literaturze patentowej wiele opracowań nawiązuje do *E. coli* patogennego dla drobiu. W patencie (EP2298798B1) została opisana metoda izolacji kwasu nukleinowego zawierającego sekwencję genu *yqi*, wykorzystywana w diagnostyce chorób powodowanych przez APEC.

W zgłoszeniu patentowym US 2014/0193824 A1 opisano metodę typowania genetycznego *E. coli* opartą na zmodyfikowanej metodzie MLST (Multilocus Sequence Typing), polegającą na określeniu sekwencji nukleotydowej genu adhezyny fimbrialnej typu 1 w badanej próbce i dalszej selekcji genu z grupy składającej się z genów: *fumC*, *adk*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* i *recA* w celu zidentyfikowania klonotypu *E. coli*.

Lee i wsp. opracowali metodę polegającą na wykorzystaniu chipów DNA do wykrywania i identyfikacji *E. coli*, zawierających sekwencje specyficzne dla tych bakterii (WO2008/084888 A).

Weigl i wsp. (US 2008/0199877 A1) opracowali metodę specyficznej gatunkowo identyfikacji bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuartii* i *Serratia marcescens*), a także wykrywania i diagnostyki infekcji powodowanych przez te bakterie oraz ich oporności na chinolony (US 2008/0199877 A1).

W zgłoszeniu patentowym Lee i wsp. zastosowano technikę hybrydyzacji wykorzystującą sondy kwasów nukleinowych komplementarne do specyficznych regionów w genach kodujących rRNA. Metoda ta może być stosowana do wykrywania i identyfikacji infekcji, które nie są powodowane przez wirusy (US 2007/0065817 A1).

Szczegółowa identyfikacja APEC jest kluczowa dla zrozumienia roli czynników wirulencji i patogenezie chorób powodowanych przez te drobnoustroje. Nadal jednak wiedza dotycząca tych zagadnień jest niewystarczająca, aby w pełni zrozumieć związek pomiędzy występowaniem czynników wirulencji a zdolnością do wywoływania określonych zmian chorobowych (Janßen, T. *et al.*, 2003). Identyfikacja szczepów *E. coli* patogennych dla ptaków jest również istotna ze względu na możliwość zastosowania terapii alternatywnych m.in. bakteriofagów (van der Westhuizen *et al.*, 2012).

Dotychczas opracowane testy diagnostyczne nie pozwalają na przeprowadzenie szybkiej i jednoznacznej diagnostyki APEC z uwzględnieniem zarówno czynników wirulencji, jak i najczęściej występujących serotypów, co może utrudniać m.in. wdrożenie nowych sposobów leczenia. Duża różnorodność szczepów *E. coli* oraz fakt, że niektóre z nich nie są wirulentne, to dodatkowe czynniki utrudniające identyfikację tych bakterii z uwzględnieniem podziału na szczepy patogenne i niepatogenne (Guabiraba, R. & Schouler, C., 2015). Dlatego problemem, który w dalszym ciągu wymaga rozwiązania jest jednoznaczna klasyfikacja bakterii *E. coli* jako APEC, dzięki której możliwe będzie zwiększenie nie tylko bezpieczeństwa żywności, ale również zdrowia ludzi i zwierząt.

Szczególnym celem wynalazku jest dostarczenie skutecznego sposobu identyfikowania APEC pozwalającego na wykrywanie co najmniej 90%, korzystnie ponad 95%, szczepów *E. coli* patogennych dla drobiu. W kontekście niniejszego opisu za szczep patogenny dla drobiu uznaje się szczep bakteryjny *E. coli* powodujący w 19 dobie od zakażenia śmiertelność zarodków kurzych wynoszącą co najmniej 85%, przy czym w teście śmiertelności wykorzystuje 9 dniowe zarodki kurze, które zakaża się jedną dawką zakażającą zawierającą  $5 \times 10^4$  CFU bakterii/zarodek.

Nieoczekiwanie rozwiązaniem przedstawionych problemów jest zastosowanie niniejszego wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest sposób identyfikacji szczepu *E. coli* patogennego dla ptaków (APEC), charakteryzujący się tym, że:

- a) z badanej próbki materiału biologicznego izoluje się DNA,
- b) w próbce wyizolowanego DNA bada się obecność: genów wirulencji *iroC* i *hlyF* oraz genu odpowiedzialnego za serotyp O78,

przy czym stwierdzenie obecności co najmniej jednego genu spośród wspomnianych genów wirulencji lub genu odpowiedzialnego za serotyp O78 świadczy o zidentyfikowaniu w badanej próbce szczepu *E. coli* patogennego dla ptaków (APEC) z dokładnością wynoszącą do 97,7%.

Korzystnie, w etapie a) badaną próbką jest próbka tkanki chorego ptaka lub próbka środowiskowa. Korzystnie, w etapie b) próbka wyizolowanego DNA zawiera genomowy DNA bakteryjny, zwłaszcza DNA *E. coli*. Korzystnie, w etapie b) obecność wspomnianych genów bada techniką PCR.

Korzystnie, w etapie b) stosuje metodę PCR typu multiplex oraz zestaw primerów przedstawionych jako Sekw. Nr Id. 1–6, przy czym:

- obecności genu wirulencji *iroC* świadczy obecność produktu o długości 732 pz,
- obecności genu wirulencji *hlyF* świadczy obecność produktu o długości 458 pz, natomiast
- obecności genu antygeny odpowiedzialnego za serotyp O78 świadczy obecność produktu o długości 994 pz.

Korzystnie, zidentyfikowanie szczepu APEC oznacza stwierdzenie kolibakteriozy u chorego ptaka, zwłaszcza drobiu hodowlanego, korzystnie kury.

Korzystnie, niewykrycie żadnego spośród wspomnianych genów świadczy o zakażeniu szczepem niepatogennym.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zestaw do identyfikacji szczepu *E. coli* patogennego dla ptaków (APEC) charakteryzujący się tym, że zawiera:

- oligonukleotyd zawierający co najmniej 20 kolejnych nukleotydów należących do genu wirulencji *iroC* przedstawionego na Sekw. Nr Id. 7,
- oligonukleotyd zawierający co najmniej 20 kolejnych nukleotydów należących do genu wirulencji *hlyF* przedstawionego na Sekw. Nr Id. 8,
- oligonukleotyd zawierający co najmniej 20 kolejnych nukleotydów należących do genu antygeny odpowiedzialnego za serotyp O78 przedstawionego na Sekw. Nr Id. 9,

przy czym stwierdzenie obecności co najmniej jednego genu spośród wspomnianych genów wirulencji lub genu odpowiedzialnego za serotyp O78 świadczy o zidentyfikowaniu w badanej próbce szczepu *E. coli* patogenego dla ptaków (APEC) z dokładnością wynoszącą do 97,7%.

Korzystnie, zestaw według wynalazku zawiera oligonukleotydy o sekwencjach przedstawionych jako Sekw. Nr Id. 1–6.

Korzystnie, zestaw według wynalazku jest przeznaczony do diagnozowania kolibakteriozy u ptaków, zwłaszcza drobiu hodowlanego, korzystnie kur.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie zestawu zawierającego:

- oligonukleotyd zawierający co najmniej 20 kolejnych nukleotydów należących do genu wirulencji *iroC* przedstawionego na Sekw. Nr Id. 7,
- oligonukleotyd zawierający co najmniej 20 kolejnych nukleotydów należących do genu wirulencji *hlyF* przedstawionego na Sekw. Nr Id. 8,
- oligonukleotyd zawierający co najmniej 20 kolejnych nukleotydów należących do genu antygeny odpowiedzialnego za serotyp O78 przedstawionego na Sekw. Nr Id. 9,

do określania stopnia patogenności szczepu *E. coli* dla ptaków.

Korzystnie, stosowany zestaw zawiera oligonukleotydy o sekwencjach przedstawionych jako Sekw. Nr Id. 1–6.

Szczegółowy opis wynalazku

Ujawniona została szybka metoda diagnostyczna identyfikująca szczepy *E. coli* patogenne dla drobiu (APEC – Avian Pathogenic *Escherichia coli*) oparta na wykrywaniu unikalnej kombinacji dwóch genów wirulencji oraz jednego genu odpowiedzialnego za serotyp O78, wybranych w oparciu o analizę, w trakcie której szczepy klasyfikowano jako patogenne, stosując jako kryterium śmiertelność zarodków wynoszącą co najmniej 85%, korzystnie > 96%, w 19 dobie i powtarzalność wyników. W korzystnej realizacji metoda charakteryzuje się tym, że:

- a) z narządów chorego ptaka izoluje się szczep bakteryjny *E. coli*,
- b) przeprowadza się izolację genomowego DNA (dowolnie wybraną metodą),
- c) wykonuje się test diagnostyczny: PCR typu multipleks na obecność dwóch genów wirulencji (*iroC*, *hlyF*) oraz jednego genu wybranego z klastru genów odpowiedzialnych za syntezę antygeny O dla serotypu O78,
- d) weryfikuje się obecność genów w próbkach w trakcie rozdziału elektroforetycznego, a następnie klasyfikuje się szczep do grupy określającej patogenność: P – patogeny (obecność co najmniej jednego z genów), NP – niepatogeny (komensalny: brak obecności któregośkolwiek z genów).

Jako gen odpowiedzialny za serotyp O78 uznaje się dowolny gen należący do klastru genów odpowiedzialnych za syntezę antygeny O dla serotypu O78.

Nieoczekiwanie ujawniony sposób nadaje się do łatwej, szybkiej i jednoznacznej identyfikacji szczepów jako APEC z dokładnością wynoszącą do 97,7%, co ma istotne znaczenie w diagnostyce kolibakteriozy, która jest jedną z najważniejszych przyczyn strat w drobiarstwie. Pozwala to również na wybór odpowiednich szczepów np. do produkcji efektywnej autoszczepionki lub dobór odpowiedniej terapii.

Ponadto, równie nieoczekiwanie, ujawniona metoda nadaje się do łatwej i szybkiej identyfikacji szczepów *E. coli* jako niepatogenne z dokładnością do 94,1%.

W celu lepszego wyjaśnienia wynalazku został on zilustrowany na przykładach.

**Przykład 1.** Charakterystyka szczepów *E. coli* w oparciu o ich zsekwencjonowane genomy oraz czynniki wirulencji.

*Izolacja i badanie podobieństwa szczepów.*

Na wstępie pozyskano kolekcję 102 szczepów *E. coli* wyizolowanych od chorych ptaków oraz 32 szczepów *E. coli* wyizolowanych od zdrowych ptaków. Następnie z każdego z tych szczepów izolowano genomowy DNA i badano podobieństwo szczepów na podstawie profili uzyskanych metodą MP-PCR (Krawczyk, B. et al., 2006). Szczepy sklasyfikowane jako różniące się od siebie stanowią kolekcję, która zawiera 85 szczepów pozyskanych od chorych ptaków oraz 27 szczepów pozyskanych od zdrowych ptaków (**Tabela 1**).

T a b e l a 1. Szczepy *E. coli* z kolekcji Proteon Pharmaceuticals

	Nr szczepu	zwierzę	data izolacji
szczepy izolowane od chorych ptaków	<i>Escherichia coli</i> _001PP2015	stado kur reprodukcyjnych	19.05.2015
	<i>Escherichia coli</i> _002PP2015	stado kur reprodukcyjnych	19.05.2015
	<i>Escherichia coli</i> _004PP2015	indyki	05.06.2015
	<i>Escherichia coli</i> _005PP2015	stado kur reprodukcyjnych	04.11.2015
	<i>Escherichia coli</i> _007PP2015	indyki	17.11.2015
	<i>Escherichia coli</i> _009PP2015	indyki	17.11.2015
	<i>Escherichia coli</i> _011PP2015	indyki	17.11.2015
	<i>Escherichia coli</i> _012PP2015	stado kur reprodukcyjnych	17.11.2015
	<i>Escherichia coli</i> _014PP2015	stado kur reprodukcyjnych	24.11.2015
	<i>Escherichia coli</i> _015PP2015	stado kur reprodukcyjnych	01.12.2015
	<i>Escherichia coli</i> _016PP2015	stado rodzicielskie brojlerów kurzych	10.12.2015
	<i>Escherichia coli</i> _017PP2015	stado kur reprodukcyjnych	10.12.2015
	<i>Escherichia coli</i> _018PP2015	kury nioski towarowe	14.12.2015
	<i>Escherichia coli</i> _019PP2015	stado kur reprodukcyjnych	22.12.2015
	<i>Escherichia coli</i> _020PP2016	stado rodzicielskie brojlerów kurzych	04.01.2016
	<i>Escherichia coli</i> _021PP2016	kury nioski	04.01.2016
	<i>Escherichia coli</i> _022PP2016	kury nioski	04.01.2016
	<i>Escherichia coli</i> _023PP2016	indyki	11.01.2016
	<i>Escherichia coli</i> _024PP2016	kury nioski konsumpcyjne	02.02.2016
	<i>Escherichia coli</i> _027PP2016	indyki	10.02.2016
	<i>Escherichia coli</i> _028PP2016	kury nioski	17.02.2016
	<i>Escherichia coli</i> _029PP2016	indyki	25.03.2016
	<i>Escherichia coli</i> _030PP2016	indyki	18.02.2016
	<i>Escherichia coli</i> _031PP2016	stado kur reprodukcyjnych	25.02.2016
	<i>Escherichia coli</i> _032PP2016	kury	02.03.2016
	<i>Escherichia coli</i> _033PP2016	stado kur reprodukcyjnych	02.03.2016
	<i>Escherichia coli</i> _034PP2016	stado kur reprodukcyjnych	02.03.2016
	<i>Escherichia coli</i> _035PP2016	broilery	15.03.2016
	<i>Escherichia coli</i> _036PP2016	indyki	15.03.2016
	<i>Escherichia coli</i> _037PP2016	broilery	15.03.2016
	<i>Escherichia coli</i> _038PP2016	broilery	15.03.2016
	<i>Escherichia coli</i> _039PP2016	kury nioski	15.03.2016
	<i>Escherichia coli</i> _040PP2016	kury nioski	15.03.2016
	<i>Escherichia coli</i> _041PP2016	indyki	25.03.2016
	<i>Escherichia coli</i> _043PP2016	kury nioski towarowe	16.03.2016
	<i>Escherichia coli</i> _044PP2016	indyki	16.03.2016
	<i>Escherichia coli</i> _045PP2016	indyki	16.03.2016

Nr szczepu	zwierzę	data izolacji
<i>Escherichia coli</i> _046PP2016	stado kur reprodukcyjnych	16.03.2016
<i>Escherichia coli</i> _047PP2016	kury	24.03.2016
<i>Escherichia coli</i> _048PP2016	kury	24.03.2016
<i>Escherichia coli</i> _049PP2016	kury	30.03.2016
<i>Escherichia coli</i> _050PP2016	kury	30.03.2016
<i>Escherichia coli</i> _051PP2016	kury	05.04.2016
<i>Escherichia coli</i> _052PP2016	kury	08.04.2016
<i>Escherichia coli</i> _053PP2016	stado kur reprodukcyjnych	08.04.2016
<i>Escherichia coli</i> _054PP2016	indyki	21.04.2016
<i>Escherichia coli</i> _057PP2016	kury nioski	21.04.2016
<i>Escherichia coli</i> _059PP2016	kury nioski	21.04.2016
<i>Escherichia coli</i> _062PP2016	kury nioski	21.04.2016
<i>Escherichia coli</i> _063PP2016	kury nioski	21.04.2016
<i>Escherichia coli</i> _065PP2016	kury nioski	21.04.2016
<i>Escherichia coli</i> _066PP2016	kury nioski	21.04.2016
<i>Escherichia coli</i> _067PP2016	kury nioski	21.04.2016
<i>Escherichia coli</i> _069PP2016	kury nioski	21.04.2016
<i>Escherichia coli</i> _070PP2016	kury nioski	21.04.2016
<i>Escherichia coli</i> _073PP2016	indyki	09.05.2016
<i>Escherichia coli</i> _074PP2016	indyki	24.05.2016
<i>Escherichia coli</i> _075PP2016	kury	24.05.2016
<i>Escherichia coli</i> _076PP2016	indyki	24.05.2016
<i>Escherichia coli</i> _077PP2016	indyki	24.05.2016
<i>Escherichia coli</i> _078PP2016	kury	30.05.2016
<i>Escherichia coli</i> _079PP2016	kury	30.05.2016
<i>Escherichia coli</i> _080PP2016	indyki	13.06.2016
<i>Escherichia coli</i> _081PP2016	indyki	09.07.2016
<i>Escherichia coli</i> _082PP2016	indyki	16.06.2016
<i>Escherichia coli</i> _083PP2016	gęsi	22.06.2016
<i>Escherichia coli</i> _084PP2016	indyki	02.08.2016
<i>Escherichia coli</i> _085PP2016	kury	04.08.2016
<i>Escherichia coli</i> _086PP2016	kury	04.08.2016
<i>Escherichia coli</i> _087PP2016	kury nioski	28.09.2016
<i>Escherichia coli</i> _088PP2016	kury nioski	28.09.2016
<i>Escherichia coli</i> _089PP2016	indyki	29.09.2016
<i>Escherichia coli</i> B _001PP2016	kury	17.02.2016
<i>Escherichia coli</i> B _002PP2016	stado kur reprodukcyjnych	28.09.2016
<i>Escherichia coli</i> _105PP2016	kury zielononózki	02.11.2016

	Nr szczepu	zwierzę	data izolacji
	<i>Escherichia coli</i> _113PP2016	stado kur reprodukcyjnych	17.11.2016
	<i>Escherichia coli</i> _114PP2016	stado kur reprodukcyjnych	24.11.2016
	<i>Escherichia coli</i> _130PP2017	kury	02.01.2017
	<i>Escherichia coli</i> _131PP2017	kury	17.01.2017
	<i>Escherichia coli</i> _154PP2017	indyki	03.03.2017
	<i>Escherichia coli</i> _155PP2017	kury	03.03.2017
	<i>Escherichia coli</i> _156PP2017	indyki	03.03.2017
	<i>Escherichia coli</i> _157PP2017	stado rodzicielskie brojlerów kurzych	09.03.2017
	<i>Escherichia coli</i> _158PP2017	kury nioski konsumpcyjne	15.03.2017
	<i>Escherichia coli</i> _159PP2017	kury nioski reprodukcyjne	15.03.2017
szczepki izolowane od zdrowych ptaków	<i>Escherichia coli</i> _106PP2016	indyki	17.11.2016
	<i>Escherichia coli</i> _107PP2016	indyki	17.11.2016
	<i>Escherichia coli</i> _108PP2016	indyki	17.11.2016
	<i>Escherichia coli</i> _110PP2016	indyki	17.11.2016
	<i>Escherichia coli</i> _120PP2016	kury	12.12.2016
	<i>Escherichia coli</i> _121PP2016	kury	12.12.2016
	<i>Escherichia coli</i> _123PP2016	kury	12.12.2016
	<i>Escherichia coli</i> _124PP2016	kury	12.12.2016
	<i>Escherichia coli</i> _126PP2016	kury	12.12.2016
	<i>Escherichia coli</i> _127PP2016	kury	12.12.2016
	<i>Escherichia coli</i> _134PP2017	kury	06.02.2017
	<i>Escherichia coli</i> _135PP2017	kury	06.02.2017
	<i>Escherichia coli</i> _137PP2017	kury	06.02.2017
	<i>Escherichia coli</i> _138PP2017	kury	06.02.2017
	<i>Escherichia coli</i> _139PP2017	kury	06.02.2017
	<i>Escherichia coli</i> _140PP2017	kury	06.02.2017
	<i>Escherichia coli</i> _141PP2017	kury	06.02.2017
	<i>Escherichia coli</i> _142PP2017	kury	06.02.2017
	<i>Escherichia coli</i> _143PP2017	kury	06.02.2017
	<i>Escherichia coli</i> _144PP2017	kury	06.02.2017
	<i>Escherichia coli</i> _145PP2017	kury	06.02.2017
	<i>Escherichia coli</i> _146PP2017	kury	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _147PP2017	kury	06.02.2017	
<i>Escherichia coli</i> _149PP2017	kury	06.02.2017	

Nr szczepu	zwierzę	data izolacji
<i>Escherichia coli</i> _151PP2017	kury	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _152PP2017	kury	06.02.2017
<i>Escherichia coli</i> _153PP2017	kury	06.02.2017

#### Sekwencjonowanie szczepów i obróbka post-sekwencyjna.

DNA szczepów poddano reakcji sekwencjonowania metodą NGS (Next Generation Sequencing). Uzyskane wyniki składano *de novo* (SPAdes 3.7.1 i 3.8.0) oraz poddano manualnej obróbce (FA\_TOOL), a otrzymane sekwencje adnotowano (RAST). Każdą z sekwencji zapisywano w postaci plików fasta (sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe).

#### Badanie występowania 175 genów wirulencji w zsekwencjonowanych genomach.

Na podstawie doniesień literaturowych przygotowano listę 175 czynników wirulencji występujących w szczepach APEC (Tabela 2). Aminokwasową sekwencję odpowiadającą każdemu z genów zapisywano w formacie fasta, na podstawie sekwencji dostępnych w bazie danych UniProt.

**T a b e l a 2.** Czynniki wirulencji szczepów APEC

Grupa genowa	Nazwa gen
adhezyny	aufA, aufB, aufC, aufD, aufE, aufF, aufG, cri, csgA, csgB, csgC, csgD, csgE, csgF, csgG, eaeH, ecpA, ecpB, ecpC, ecpD, ecpE, ecpR, fimA, fimB, fimC, fimD, fimE, fimF, fimG, fimH, fimI, fmlA, fmlD, focA, focB, focC, focD, foci, hcpA, hcpB, hra, htrA, htrB, htrC, htrE, mat, papA, papB, papC, papD, papE, papF, papGII, papHpapI, papK, papX, sfaB, sfaC, sfaG, sfaH, stgA, stgB, stgD, tsh, yehA, yehB, yehC, yehD, yehE, yqi
inwazyjne	ibeA, ibeB, ibeC, ibeR, tia
związane z Fe	chuA, chuS, chuT, chuU, chuW, chuX, chuY, eitA, eitB, eitC, eitD, feoA, feoB, feoC, fepA, fepB, fepC, fepD, fepE, fyuA, ireA, iroB, iroC, iroD, iroE, iroN, irp1, irp2, iucA, iucB, iucC, iucD, iutA, sitA, sitB, sitC, sitD, ybtA, ybtE, ybtP, ybtS, ybtT, ybtU, ybtX
inne	etsA, etsB, etsC, fliC, malX
protektyny	bor, kpsE, kpsM, kpsT, neuC, neuS, ompT, traT
białka sekrecyjne	aec14, aec15, aec16, aec17, aec18, aec19, aec22, aec23, aec24, aec25, aec26, aec27, aec28, aec29, aec30, aec31, aec32, aec7, aec8
toksyny	astA, astB, astC, astD, astE, cba, cbi, cdtA, cdtB, cdtC, cma, cmi, cvaA, cvaB, cvaC, hlyD, hlyE, hlyF, pic, pilQ, sat, usp, vat

Następnie badano obecność poszczególnych czynników wirulencji (w postaci sekwencji aminokwasowych) w adnotowanych sekwencjach genomów wszystkich szczepów. Przeprowadzone badanie pozwoliło na jednoczesną analizę wszystkich wybranych czynników wirulencji we wszystkich analizowanych genomach. Obecność czynników wirulencji określano w sposób zero-jedynkowy, gdzie 0 – brak obecności danego czynnika wg przyjętych założeń, zaś 1 – obecność danego czynnika wg przyjętych założeń.

#### Serotypowanie *in silico* na podstawie zsekwencjonowanych genomów.

W celu oceny przynależności badanych szczepów do poszczególnych serotypów oraz sprawdzenia, czy pewne serotypy są powiązane z patogennością szczepów przeprowadzono analizę serotypowania *in silico*.

**Przykład 2.** Podział szczepów *E. coli* na patogenne i niepatogenne na podstawie danych uzyskanych z testu żywotności zarodków kurzych w modelu *in ovo*.

Celem weryfikacji pierwotnej informacji dotyczącej klasyfikacji szczepów na patogenne i komensalne (izolaty pozyskane od chorych i zdrowych ptaków) przeprowadzono test na żywotność zarodków kurzych w modelu *in ovo*. Doświadczenie 1. polegało na optymalizacji dawki zakażającej, natomiast kolejne doświadczenia na ocenie patogenności szczepów.

Przebieg doświadczenia 1 (UR, Kraków) – optymalizacja dawki zakażającej

Przeprowadzono doświadczenie polegające na zakażeniu 9-dniowych zarodków kurzych czterema szczepami *E. coli* (2 szczepy zaklasyfikowane pierwotnie jako niepatogenne: wzorcowy szczep K-12 i 139PP2017 oraz 2 szczepy zaklasyfikowane pierwotnie jako patogenne: 002PP2015 i 053PP2016 w 4 dawkach zakażających:  $1 \times 10^7$  CFU/zarodek,  $1 \times 10^6$  CFU/zarodek,  $1 \times 10^5$  CFU/zarodek i  $1 \times 10^4$  CFU/zarodek (po 60 zarodków w przypadku każdej badanej dawki każdego szczepu).

Zawiesiny bakterii (po 100  $\mu$ l/jajko) zostały użyte do zakażenia zarodków 24 h po zawieszeniu w soli fizjologicznej.

1080 zależnych jaj podzielono na 18 grup po 60 jaj. 16 grup zakażano badanymi szczepami, dodatkowe 2 grupy stanowiły grupy kontrolne: grupę ujemną zerową (niczym nie traktowaną) oraz ujemną kontrolną (traktowaną 0,85% NaCl, w którym rozcieńczano szczepy do zakażenia). Następnie (w kolejnych dniach) oceniano śmiertelność zarodków. Eksperyment zakończono w 10 dniu od zakażenia.

Dane dotyczące śmiertelności na koniec eksperymentu przedstawiono w **Tabeli 3**. Uzyskane wyniki potwierdziły patogenność 2 szczepów *E. coli* oznaczonych numerami: 002PP2015 i 053PP2016 (wysoka śmiertelność zarodków) oraz znacząco niższy efekt 2 pozostałych szczepów. Ponadto, w oparciu o uzyskane wyniki do kolejnych badań patogenności szczepów *E. coli* w modelu *in ovo* wytypowano dawkę zakażającą:  $5 \times 10^4$  CFU/zarodek.

**T a b e l a 3. Śmiertelność zarodków kurzych podczas doświadczenia 1**

Szczep <i>E. coli</i>	Zakładana dawka [CFU/zarodek]	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia (E14) [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu (E19) [%]	Odchylenie standardowe [%]
K-12	$1 \times 10^7$	43,3	79,6	12,7
139PP2017		80,7	82,6	17,7
002PP2015		91,7	98,3	4,1
053PP2016		98,3	100,0	0,0
K-12	$1 \times 10^6$	68,7	78,9	12,2
139PP2017		48,5	64,6	28,6
002PP2015		89,6	100,0	0,0
053PP2016		79,1	100,0	0,0
K-12	$1 \times 10^5$	77,5	86,0	10,2
139PP2017		51,3	79,6	15,2
002PP2015		91,7	100,0	0,0
053PP2016		96,7	98,3	4,1
K-12	$1 \times 10^4$	63,1	72,0	4,63
139PP2017		36,7	65,0	20,7
002PP2015		84,6	100,0	0,0
053PP2016		96,7	100,00	0,0

### Przebieg doświadczenia 2 (UR, Kraków)

Przeprowadzono doświadczenie polegające na zakażeniu 9-dniowych zarodków kurzych szesnastoma szczepami *E. coli* (004PP2015, 009PP2015, 011PP2015, 015PP2015, 039PP2016, 047PP2016, 053PP2016, 075PP2016, 077PP2016, 082PP2016, 087PP2016, 105PP2016, 108PP2016, 138PP2017, 139PP2017 i 144PP2017) w jednej dawce zakażającej  $5 \times 10^4$  CFU/zarodek (po 60 zarodków w przypadku każdego badanego szczepu, miano bakterii  $5 \times 10^5$  CFU/ml).

Zawiesiny bakterii (po 100  $\mu$ l/jajko) zostały użyte do zakażenia zarodków 24 h po zawieszeniu w soli fizjologicznej.

1080 zależnych jaj podzielono na 18 grup po 60 jaj. 16 grup zakażano badanymi szczepami, dodatkowo 2 grupy stanowiły grupy kontrolne: grupę negatywną zerową (niczym nie traktowaną) oraz negatywną kontrolną (traktowaną 0,85% NaCl, w którym przygotowywano szczepy do zakażenia). Podczas trwania całego eksperymentu oceniano śmiertelność zarodków. Eksperyment zakończono w 10 dniu od zakażenia.

Dane dotyczące śmiertelności na koniec eksperymentu przedstawiono w **Tabeli 4**. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że śmiertelność zarodków jest uzależniona od przynależności szczepu do odpowiedniej grupy patogenności. Szczepy uporządkowano w tabeli wraz z malejącą śmiertelnością. Część szczepów wywołuje śmierć 88,3–100% zarodków w przyjętej dawce, natomiast inne szczepy powodują w tej samej dawce śmierć 63,4–85% zarodków, co stanowi zauważalną różnicę.

**T a b e l a 4. Podsumowanie wyników doświadczenia 2.**

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia (E14) [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu (E19) [%]	Odchylenie standardowe [%]
0 – kontrola negatywna	3,5	3,5	5,5
K – 0,85% NaCl	23,3	29,2	16,0
009PP2015	100,0	100,0	0,0
015PP2015	100,0	100,0	0,0
039PP2016	100,0	100,0	0,0
053PP2016	100,0	100,0	0,0
087PP2016	100,0	100,0	0,0
004PP2015	98,3	100,0	0,0
075PP2016	98,3	100,0	0,0
105PP2016	95,0	100,0	0,0
144PP2017	91,7	100,0	0,0
077PP2016	88,3	95,0	8,4
108PP2016	71,7	89,8	6,3
047PP2016	60,0	88,3	11,7
138PP2017	60,0	85,0	8,4
011PP2015	55,0	78,3	19,4
139PP2017	35,0	73,3	5,2
082PP2016	21,7	63,4	13,1

### Przebieg doświadczenia 3 (UR, Kraków)

Przeprowadzono doświadczenie polegające na zakażeniu 9-dniowych zarodków kurzych dwudziestoma dwoma szczepami *E. coli* (002PP2015, 017PP2015, 018PP2015, 022PP2016, 029PP2016, 030PP2016, 032PP2016, 036PP2016, 040PP2016, 044PP2016, 045PP2016, 048PP2016,

049PP2016, 051PP2016, 054PP2016, 063PP2016, 070PP2016, 074PP2016, 076PP2016, 084PP2016, 110PP2016 i 120PP2016) w jednej dawce zakażającej  $5 \times 10^4$  CFU/zarodek (po 30 zarodków w przypadku każdego badanego szczepu, miano bakterii  $5 \times 10^5$  CFU/ml).

Zawiesiny bakterii (po 100  $\mu$ l/jajko) zostały użyte do zakażenia zarodków 24 h po zawieszeniu w soli fizjologicznej.

720 zależonych jaj podzielono na 24 grupy po 30 jaj. 22 grupy zakażano badanymi szczepami, dodatkowe 2 grupy stanowiły grupy kontrolne: grupę negatywną zerową (niczym nie traktowaną) oraz negatywną kontrolną (traktowaną 0,85% NaCl, w którym przygotowywano szczepy do zakażenia). Podczas trwania całego eksperymentu oceniano śmiertelność zarodków. Eksperyment zakończono w 10 dniu od zakażenia.

Dane dotyczące śmiertelności na koniec eksperymentu przedstawiono w **Tabeli 5**. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że śmiertelność zarodków jest uzależniona od przynależności szczepu do odpowiedniej grupy patogenności. Szczepy uporządkowano w tabeli wraz z malejącą śmiertelnością. W przyjętej dawce część szczepów wywołuje śmierć 93,3–100% zarodków, natomiast inne szczepy powodują śmierć 52,2–83,3%, co stanowi zauważalną różnicę.

**T a b e l a 5. Podsumowanie wyników doświadczenia 3.**

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia (E14) [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu (E19) [%]	Odchylenie standardowe [%]
0 – kontrola negatywna	0,0	0,0	0,0
K – 0,85% NaCl	13,3	13,3	15,3
002PP2015	100,0	100,0	0,0
017PP2015	100,0	100,0	0,0
022PP2016	100,0	100,0	0,0
040PP2016	100,0	100,0	0,0
044PP2016	100,0	100,0	0,0
076PP2016	100,0	100,0	0,0
029PP2016	96,7	100,0	0,0
045PP2016	96,7	100,0	0,0
070PP2016	95,8	100,0	0,0
063PP2016	92,6	100,0	0,0
018PP2015	91,1	100,0	0,0
110PP2016	83,3	100,0	0,0
030PP2016	82,6	100,0	0,0
084PP2016	80,0	100,0	0,0
054PP2016	86,7	96,7	5,8
036PP2016	86,3	96,7	5,8
032PP2016	61,1	93,3	11,6
074PP2016	72,6	83,3	20,8
051PP2016	62,6	75,9	5,3
049PP2016	47,8	74,8	28,1
048PP2016	36,3	57,4	17,9
120PP2016	27,4	52,2	13,5

#### Przebieg doświadczenia 4 (UR, Kraków)

Przeprowadzono doświadczenie polegające na zakażeniu 9-dniowych zarodków kurzych dwudziestoma dwoma szczepami *E. coli* (014PP2015, 024PP2016, 035PP2016, 043PP2016, 050PP2016, 057PP2016, 078PP2016, 079PP2016, 080PP2016, 081PP2016, 086PP2016, 114PP2016, 135PP2017, 137PP2017, 141PP2017, 142PP2017, 143PP2017, 151PP2017, 152PP2017, 155PP2017, 159PP2017 i B001PP2016) w jednej dawce zakażającej  $5 \times 10^4$  CFU/zarodek (po 30 zarodków w przypadku każdego badanego szczepu, miano bakterii  $5 \times 10^5$  CFU/ml).

Zawiesiny bakterii (po 100  $\mu$ l/jajko) zostały użyte do zakażenia zarodków 24 h po zawieszeniu w soli fizjologicznej.

720 zależonych jaj podzielono na 24 grupy po 30 jaj. 22 grupy zakażano badanymi szczepami, dodatkowe 2 grupy stanowiły grupy kontrolne: grupę ujemną zerową (niczym nie traktowaną) oraz ujemną kontrolną (traktowaną 0,85% NaCl, w którym przygotowywano szczepy do zakażenia). Podczas trwania całego eksperymentu oceniano śmiertelność zarodków. Eksperyment zakończono w 10 dniu od zakażenia.

Dane dotyczące śmiertelności na koniec eksperymentu przedstawiono w **Tabeli 6**. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że śmiertelność zarodków jest uzależniona od przynależności szczepu do odpowiedniej grupy patogenności. Szczepy uporządkowano w tabeli wraz z malejącą śmiertelnością. W przyjętej dawce część szczepów wywołuje śmierć 93,3–100%, natomiast inne szczepy powodują śmierć 70–83,3%, co stanowi zauważalną różnicę.

**T a b e l a 6. Podsumowanie wyników doświadczenia 4.**

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia (E14) [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu (E19) [%]	Odchylenie standardowe [%]
0 – kontrola ujemna	0,0	0,0	0,0
K – 0,85% NaCl	3,4	3,7	6,4
014PP2015	100,0	100,0	0,0
024PP2016	100,0	100,0	0,0
035PP2016	100,0	100,0	0,0
050PP2016	100,0	100,0	0,0
086PP2016	100,0	100,0	0,0
159PP2017	100,0	100,0	0,0
B001PP2016	100,0	100,0	0,0
043PP2016	90,0	100,0	0,0
078PP2016	96,7	100,0	0,0
079PP2016	96,7	100,0	0,0
080PP2016	96,7	100,0	0,0
155PP2016	93,4	100,0	0,0
081PP2016	86,7	100,0	0,0
152PP2017	80,0	100,0	0,0
057PP2016	96,3	96,3	6,4
137PP2017	93,4	96,3	6,4
151PP2017	93,4	96,3	6,4
143PP2017	80,0	96,3	6,4
114PP2016	90,0	93,3	11,5

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia (E14) [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu (E19) [%]	Odchylenie standardowe [%]
142PP2017	76,7	93,3	11,5
135PP2017	56,7	83,3	5,8
141PP2017	69,0	70,0	26,5

#### Przebieg doświadczenia 5 (UR, Kraków)

Przeprowadzono doświadczenie polegające na zakażeniu 9-dniowych zarodków kurzych dwudziestoma ośmioma szczepami *E. coli* (001PP2015, 005PP2015, 007PP2015, 027PP2016, 052PP2016, 059PP2016, 069PP2016, 083PP2016, 085PP2016, 106PP2016, 107PP2016, 113PP2016, 123PP2016, 124PP2016, 126PP2016, 127PP2016, 130PP2017, 131PP2017, 134PP2017, 140PP2017, 145PP2017, 146PP2017, 147PP2017, 149PP2017, 153PP2017, 154PP2017, 156PP2017 i B002PP2016) w jednej dawce zakażającej  $5 \times 10^4$  CFU/zarodek (po 30 zarodków w przypadku każdego badanego szczepu, miano bakterii  $5 \times 10^5$  CFU/ml zarodków).

Zawiesiny bakterii (po 100  $\mu$ l/jajko) zostały użyte do zakażenia zarodków 24 h po zawieszeniu w soli fizjologicznej.

900 zależonych jaj podzielono na 30 grup po 30 jaj. 28 grup zakażano badanymi szczepami, dodatkowe 2 grupy stanowiły grupy kontrolne: grupę negatywną zerową (niczym nie traktowaną) oraz negatywną kontrolną (traktowaną 0,85% NaCl, w którym przygotowywano szczepy do zakażenia). Podczas trwania całego eksperymentu oceniano śmiertelność zarodków. Eksperyment zakończono w 10 dniu od zakażenia.

Dane dotyczące śmiertelności na koniec eksperymentu przedstawiono w **Tabeli 7**. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że śmiertelność zarodków jest uzależniona od przynależności szczepu do odpowiedniej grupy patogenności. Szczepy uporządkowano w tabeli wraz z malejącą śmiertelnością. W przyjętej dawce część szczepów wywołuje śmierć 93,3–100% zarodków, natomiast inne szczepy powodują około śmierć 34,4–83,3% zarodków, co stanowi zauważalną różnicę.

**T a b e l a 7. Podsumowanie wyników doświadczenia 5.**

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia (E14) [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu (E19) [%]	Odchylenie standardowe [%]
0 – kontrola negatywna	0,0	0,0	0,0
K – 0,85% NaCl	16,7	16,7	15,3
154PP2017	100,0	100,0	0,0
156PP2017	100,0	100,0	0,0
005PP2015	95,8	100,0	0,0
123PP2016	93,3	100,0	0,0
124PP2016	93,3	100,0	0,0
146PP2017	93,3	100,0	0,0

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia (E14) [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu (E19) [%]	Odchylenie standardowe [%]
145PP2017	92,6	100,0	0,0
126PP2016	86,7	100,0	0,0
106PP2016	83,3	100,0	0,0
131PP2017	82,2	100,0	0,0
127PP2016	80,0	100,0	0,0
134PP2017	78,5	100,0	0,0
113PP2016	76,7	100,0	0,0
059PP2016	66,7	100,0	0,0
069PP2016	66,3	100,0	0,0
153PP2017	65,0	100,0	0,0
083PP2016	93,3	96,7	5,8
085PP2016	89,6	96,7	5,8
149PP2017	90,0	93,3	5,8
130PP2017	73,3	93,3	5,8
107PP2016	63,0	93,3	11,5
B002PP2016	53,3	93,3	5,8
001PP2015	76,7	83,3	11,5
052PP2016	52,6	80,0	17,3
007PP2015	54,2	70,8	8,8
027PP2016	60,0	70,0	10,0
147PP2017	50,0	66,7	15,3
140PP2017	16,7	34,4	15,0

#### Przebieg doświadczenia 6 (UR, Kraków)

Przeprowadzono doświadczenie polegające na zakażeniu 9-dniowych zarodków kurzych trzydziestoma trzema szczepami *E. coli* (001PP2015, 012PP2015, 014PP2015, 016PP2015, 019PP2015, 020PP2015, 021PP2016, 023PP2016, 028PP2016, 031PP2016, 032PP2016, 033PP2016, 034PP2016, 038PP2016, 041PP2016, 046PP2016, 047PP2016, 051PP2016, 052PP2016, 062PP2016, 065PP2016, 066PP2016, 067PP2016, 073PP2016, 088PP2016, 089PP2016, 121PP2016, 135PP2017, 137PP2017, 138PP2017, 141PP2017, 157PP2017 i 158PP2017) w jednej dawce zakażającej  $5 \times 10^4$  CFU/zarodek (po 30 zarodków w przypadku każdego badanego szczepu, miano bakterii  $5 \times 10^5$  CFU/ml).

Zawiesiny bakterii (po 100  $\mu$ l/jajko) zostały użyte do zakażenia zarodków 24 h po zawieszeniu w soli fizjologicznej.

1050 zależonych jaj podzielono na 35 grup po 30 jaj. 33 grupy zakażano badanymi szczepami, dodatkowe 2 grupy stanowiły grupy kontrolne: grupę negatywną zerową (niczym nie traktowaną) oraz negatywną kontrolną (traktowaną 0,85% NaCl, w którym przygotowywano szczepy do zakażenia). Podczas trwania całego eksperymentu oceniano śmiertelność zarodków. Eksperyment zakończono w 10 dniu od zakażenia.

Dane dotyczące śmiertelności na koniec eksperymentu przedstawiono w **Tabeli 8**. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że śmiertelność zarodków jest uzależniona od przynależności szczepu do odpowiedniej grupy patogenności. Szczepy uporządkowano w tabeli wraz z malejącą śmiertelnością. W przyjętej dawce część szczepów wywołuje śmierć 86,7–100% zarodków, natomiast inne szczepy powodują śmierć 26,7–71,9% zarodków, co stanowi zauważalną różnicę.

**T a b e l a 8. Podsumowanie wyników doświadczenia 6.**

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia (E14) [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu (E19) [%]	Odchylenie standardowe [%]
0 – kontrola negatywna	0,0	10,7	0,64
K – 0,85% NaCl	10,0	24,1	15,1
016PP2015	100,0	100,0	0,0
028PP2016	100,0	100,0	0,0
031PP2016	100,0	100,0	0,0
033PP2016	100,0	100,0	0,0
041PP2016	100,0	100,0	0,0
066PP2016	100,0	100,0	0,0
067PP2016	100,0	100,0	0,0
121PP2016	100,0	100,0	0,0
157PP2017	100,0	100,0	0,0
046PP2016	96,7	100,0	0,0
062PP2016	96,7	100,0	0,0
088PP2016	96,7	100,0	0,0
158PP2017	96,7	100,0	0,0
052PP2016	86,7	100,0	0,0
073PP2016	96,7	96,7	5,8
135PP2017	90,0	96,3	6,4
021PP2016	86,7	96,3	6,4

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia (E14) [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu (E19) [%]	Odchylenie standardowe [%]
051PP2016	66,7	90,0	10,0
012PP2015	60,0	86,7	5,8
023PP2016	60,0	71,9	17,3
014PP2015	71,3	71,3	19,7
089PP2016	50,0	63,3	5,8
034PP2016	40,0	56,7	15,3
019PP2015	40,0	43,3	20,8
038PP2016	23,3	43,3	20,8
020PP2015	43,3	43,3	23,4
032PP2016	16,7	46,3	11,6
138PP2017	44,8	44,8	29,3
047PP2016	13,3	42,2	29,1
065PP2016	20,0	37,5	22,2
137PP2017	26,7	34,8	13,0
001PP2015	20,0	31,1	20,1
141PP2017	23,3	26,7	5,8

#### Przebieg doświadczenia 7 (UR, Kraków)

Przeprowadzono doświadczenie polegające na zakażeniu 9-dniowych zarodków kurzych trzyletostoma trzema szczepami *E. coli* (011PP2015, 012PP2015, 014PP2015, 019PP2015, 020PP2016, 023PP2016, 027PP2016, 034PP2016, 038PP2016, 049PP2016, 050PP2016, 052PP2016, 059PP2016, 073PP2016, 074PP2016, 075PP2016, 077PP2016, 081PP2016, 084PP2016, 089PP2016, 106PP2016, 108PP2016, 114PP2016, 121PP2016, 123PP2016, 124PP2016, 126PP2016, 127PP2016, 137PP2017, 141PP2017, 146PP2017, 149PP2017 i 154PP2017) w jednej dawce zakażającej  $5 \times 10^4$  CFU/zarodek (po 30 zarodków w przypadku każdego badanego szczepu, miano bakterii  $5 \times 10^5$  CFU/ml).

Zawiesiny bakterii (po 100  $\mu$ l/jajko) zostały użyte do zakażenia zarodków 24 h po zawieszeniu w soli fizjologicznej.

1050 zależnych jaj podzielono na 35 grup po 30 jaj. 33 grupy zakażano badanymi szczepami, dodatkowe 2 grupy stanowiły grupy kontrolne: grupę negatywną zerową (niczym nie traktowaną) oraz negatywną kontrolną (traktowaną 0,85% NaCl, w którym przygotowywano szczepy do zakażenia). Podczas trwania całego eksperymentu oceniano śmiertelność zarodków. Eksperyment zakończono w 10 dniu od zakażenia.

Dane dotyczące śmiertelności na koniec eksperymentu przedstawiono w **Tabeli 9**. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że śmiertelność zarodków jest uzależniona od przynależności szczepu do odpowiedniej grupy patogenności. Szczepy uporządkowano w tabeli wraz z malejącą śmiertelnością. W przyjętej dawce część szczepów wywołuje śmierć 85,5–100% zarodków, natomiast inne szczepy powodują śmierć 3,3–82,5% zarodków, co stanowi zauważalną różnicę.

T a b e l a 9. Podsumowanie wyników doświadczenia 7.

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia (E14) [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu (E19) [%]	Odchylenie standardowe [%]
0 – kontrola negatywna	0,0	0,0	0,0
K – 0,85 NaCl	0,0	3,3	5,8
089PP2016	80,0	100,0	0,0
074PP2016	74,4	100,0	0,0
126PP2016	71,7	100,0	0,0
127PP2016	66,7	100,0	0,0
124PP2016	65,6	100,0	0,0
081PP2016	42,2	100,0	0,0
154PP2017	90,0	96,7	5,8
038PP2016	86,3	96,7	5,8
084PP2016	85,9	96,7	5,77
020PP2016	73,3	93,3	11,5
023PP2016	63,3	93,3	11,5
123PP2016	60,7	93,0	6,1
034PP2016	48,1	93,0	6,1
059PP2016	37,8	93,0	6,1
077PP2016	75,2	92,6	12,8
014PP2015	73,1	92,6	12,8
012PP2015	57,4	89,3	11,1
075PP2016	60,0	88,4	11,1
146PP2017	57,8	86,3	15,2
027PP2016	52,7	85,5	4,8
121PP2016	51,1	82,5	10,9
149PP2017	40,0	76,7	15,3
019PP2015	37,8	75,9	25,1
052PP2016	63,8	73,3	37,9

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia (E14) [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu (E19) [%]	Odchylenie standardowe [%]
050PP2016	63,3	73,3	11,5
011PP2015	48,5	65,6	15,0
073PP2016	38,1	58,5	20,2
141PP2017	14,9	49,0	11,9
137PP2017	20,0	30,0	20,0
049PP2016	13,7	20,4	9,4
106PP2016	3,3	19,9	8,7
108PP2016	0,0	3,3	5,8
114PP2016	3,3	3,3	5,8

#### Przebieg doświadczenia 8 (UR, Kraków)

Przeprowadzono doświadczenie polegające na zakażeniu 9-dniowych zarodków kurzych dwudziestoma dwoma szczepami *E. coli* (001PP2015, 019PP2015, 020PP2016, 023PP2016, 027PP2016, 032PP2016, 034PP2016, 037PP2016 – powt. A, 037PP2016 – powt. B, 038PP2016, 047PP2016, 049PP2016, 050PP2016, 051PP2016, 073PP2016, 089PP2016, 106PP2016, 108PP2016, 114PP2016, 138PP2017, 142PP2017 i 149PP2017) w jednej dawce zakażającej  $5 \times 10^4$  CFU/zarodek (po 30 zarodków w przypadku każdego badanego szczepu, miano bakterii  $5 \times 10^5$  CFU/ml).

Zawiesiny bakterii (po 100  $\mu$ l/jajko) zostały użyte do zakażenia zarodków 24 h po zawieszeniu w soli fizjologicznej.

720 zależonych jaj podzielono na 24 grupy po 30 jaj. 22 grupy zakażano badanymi szczepami, dodatkowe 2 grupy stanowiły grupy kontrolne: grupę negatywną zerową (niczym nie traktowaną) oraz negatywną kontrolną (traktowaną 0,85% NaCl, w którym przygotowywano szczepy do zakażenia). Podczas trwania całego eksperymentu oceniano śmiertelność zarodków. Eksperyment zakończono w 10 dniu od zakażenia.

Dane dotyczące śmiertelności na koniec eksperymentu przedstawiono w **Tabeli 10**. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że śmiertelność zarodków jest uzależniona od przynależności szczepu do odpowiedniej grupy patogenności. Szczepy uporządkowano w tabeli wraz z malejącą śmiertelnością. W przyjętej dawce część szczepów wywołuje śmierć 85,6%–100% zarodków, natomiast inne szczepy powodują śmierć 65,7%–83% zarodków, co stanowi zauważalną różnicę.

T a b e l a 10. Podsumowanie wyników doświadczenia 8.

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia (E14) [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu (E19) [%]	Odchylenie standardowe [%]
0 – kontrola negatywna	bd	0,0	0,0
K – 0,85% NaCl	bd	7,0	6,12
019PP2015	bd	100,0	0,0
023PP2016	bd	100,0	0,0
037PP2016 - A	bd	100,0	0,0
073PP2016	bd	100,0	0,0
114PP2016	bd	100,0	0,0
149PP2017	bd	100,0	0,0
138PP2017	bd	100,0	0,0
020PP2016	bd	96,7	5,8
037PP2016 - B	bd	96,7	5,8
038PP2016	bd	96,7	5,8
089PP2016	bd	96,7	5,8
034PP2016	bd	96,3	6,4
106PP2016	bd	93,3	5,8
050PP2016	bd	93,0	6,1
001PP2015	bd	90,0	17,3
108PP2016	bd	90,0	17,3
142PP2017	bd	90,0	10,0
051PP2016	bd	85,6	17,1
027PP2016	bd	83,0	11,2
047PP2016	bd	83,0	5,1
049PP2016	bd	76,9	11,2
032PP2016	bd	65,7	28,9

Po przeprowadzonych doświadczeniach zweryfikowano pierwotną klasyfikację szczepów na patogenne i niepatogenne opartą o stan zdrowia ptaków, od których szczep został wyizolowany (ptak zdrowy/chory). Zgromadzoną kolekcję szczepów reklasyfikowano w oparciu o wyniki testu żywotności zarodków kurzych w modelu *in ovo*.

Po reklasyfikacji wytypowano ostateczną grupę do analizy, którą stanowiło 105 szczepów.

T a b e l a 11. Patogenność szczepów po reklasyfikacji.

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [%]	Nr eksperymentu	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja
<b>OSTATECZNA GRUPA SZCZEPÓW</b>							
001PP2015	76,7	83,3	11,5	5	P	NP	NP
	20,0	31,1	20,1	6		NP	
	bd	90,0	17,3	8		P	
002PP2015	91,7	98,3	4,1	1	P	P	P
	89,6	100,0	0,0	1		P	
	91,7	100,0	0,0	1		P	
	84,6	100,0	0,0	1		P	
	100,0	100,0	0,0	3		P	
004PP2015	98,3	100,0	0,0	2	P	P	P
005PP2015	95,8	100,0	0,0	5	P	P	P
007PP2015	54,2	70,8	8,8	5	P	NP	NP
009PP2015	100,0	100,0	0,0	2	P	P	P
011PP2015	55,0	78,3	19,4	2	P	NP	NP
	48,5	65,6	15,0	7		NP	
012PP2015	60,0	86,7	5,8	6	P	P	P
	57,4	89,3	11,1	7		P	
014PP2015	100,0	100,0	0,0	4	P	P	P
	bd	71,3	19,7	6		NP	
	73,1	92,6	12,8	7		P	
015PP2015	100,0	100,0	0,0	2	P	P	P
016PP2015	100,0	100,0	0,0	6	P	P	P
017PP2015	100,0	100,0	0,0	3	P	P	P
018PP2015	91,1	100,0	0,0	3	P	P	P
020PP2015	bd	42,2	23,4	6	P	NP	P
	73,3	93,3	11,5	7		P	
	bd	96,7	5,8	8		P	
021PP2016	86,7	96,3	6,4	6	P	P	P
022PP2016	100,0	100,0	0,0	3	P	P	P
023PP2016	60,0	71,9	17,3	6	P	NP	P
	63,3	93,3	11,5	7		P	
	bd	100,0	0,0	8		P	
024PP2016	100,0	100,0	0,0	4	P	P	P
028PP2016	100,0	100,0	0,0	6	P	P	P
029PP2016	96,7	100,0	0,0	3	P	P	P
030PP2016	82,6	100,0	0,0	3	P	P	P
031PP2016	100,0	100,0	0,0	6	P	P	P
032PP2016	61,1	93,3	11,6	3	P	P	NP

Szczep <i>S. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [%]	Nr eksperymentu	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja
	16,7	46,3	11,6	6		NP	
	bd	65,7	28,9	8		NP	
033PP2016	100,0	100,0	0,0	6	P	P	P
034PP2016	40,0	56,7	15,3	6	P	NP	P
	48,1	93,0	6,1	7		P	
	bd	96,3	6,4	8		P	
035PP2016	100,0	100,0	0,0	4	P	P	P
036PP2016	86,3	96,7	5,8	3	P	P	P
037PP2016	bd	100,0	0,0	8	P	P	P
	bd	96,7	5,8	8		P	
038PP2016	23,3	43,3	20,8	6	P	NP	P
	86,3	96,7	5,8	7		P	
	bd	96,7	5,8	8		P	
039PP2016	100,0	100,0	0,0	2	P	P	P
040PP2016	100,0	100,0	0,0	3	P	P	P
041PP2016	100,0	100,0	0,0	6	P	P	P
043PP2016	90,0	100,0	0,0	4	P	P	P
044PP2016	100,0	100,0	0,0	3	P	P	P
045PP2016	96,7	100,0	0,0	3	P	P	P
046PP2016	96,7	100,0	0,0	6	P	P	P
047PP2016	60,0	88,3	11,7	2	P	P	NP
	13,3	42,2	29,1	6		NP	
	bd	83,0	5,1	8		NP	
048PP2016	36,3	57,4	17,9	3	P	NP	NP
049PP2016	47,8	74,8	28,1	3	P	NP	NP
	13,7	20,4	9,4	7		NP	
	bd	76,9	11,2	8		NP	
050PP2016	100,0	100,0	0,0	4	P	P	P
	63,3	73,3	11,5	7		NP	
	bd	93,0	6,1	8		P	
052PP2016	52,6	80,0	17,3	5	P	NP	NP
	86,7	100,0	0,0	6		P	
	63,8	73,3	37,9	7		NP	
053PP2016	98,3	100,0	0,0	1	P	P	P
	79,1	100,0	0,0	1		P	
	96,7	98,3	4,1	1		P	
	96,7	100,00	0,0	1		P	
	100,0	100,0	0,0	2		P	
054PP2016	86,7	96,7	5,8	3	P	P	P
057PP2016	96,3	96,3	6,4	4	P	P	P
059PP2016	66,7	100,0	0,0	5	P	P	P

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [%]	Nr eksperymentu	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja
	37,8	93,0	6,1	7		P	
062PP2016	96,7	100,0	0,0	6	P	P	P
063PP2016	92,6	100,0	0,0	3	P	P	P
065PP2016	20,0	37,5	22,2	6	P	NP	NP
066PP2016	100,0	100,0	0,0	6	P	P	P
067PP2016	100,0	100,0	0,0	6	P	P	P
069PP2016	66,3	100,0	0,0	5	P	P	P
070PP2016	95,8	100,0	0,0	3	P	P	P
073PP2016	96,7	96,7	5,8	6	P	P	P
	38,1	58,5	20,2	7		NP	
	bd	100,0	0,0	8		P	
075PP2016	98,3	100,0	0,0	2	P	P	P
	60,0	88,4	11,1	7		P	
076PP2016	100,0	100,0	0,0	3	P	P	P
077PP2016	88,3	95,0	8,4	2	P	P	P
	75,2	92,6	12,8	7		P	
078PP2016	96,7	100,0	0,0	4	P	P	P
079PP2016	96,7	100,0	0,0	4	P	P	P
080PP2016	96,7	100,0	0,0	4	P	P	P
081PP2016	86,7	100,0	0,0	4	P	P	P
	42,2	100,0	0,0	7		P	
082PP2016	21,7	63,4	13,1	2	P	NP	NP
083PP2016	93,3	96,7	5,8	5	P	P	P
084PP2016	80,0	100,0	0,0	3	P	P	P
	85,9	96,7	5,77	7		P	
085PP2016	89,6	96,7	5,8	5	P	P	P
086PP2016	100,0	100,0	0,0	4	P	P	P
087PP2016	100,0	100,0	0,0	2	P	P	P
088PP2016	96,7	100,0	0,0	6	P	P	P
089PP2016	50,0	63,3	5,8	6	P	NP	P
	80,0	100,0	0,0	7		P	
	bd	96,7	5,8	8		P	
105PP2016	95,0	100,0	0,0	2	P	P	P
106PP2016	83,3	100,0	0,0	5	NP	P	P
	3,3	19,9	8,7	7		NP	
	bd	93,3	5,8	8		P	
107PP2016	63,0	93,3	11,5	5	NP	P	P
108PP2016	71,7	89,8	6,3	2	NP	P	P
	0,0	3,3	5,8	7		NP	
	bd	90,0	17,3	8		P	
110PP2016	83,3	100,0	0,0	3	NP	P	P

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [%]	Nr eksperymentu	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja
113PP2016	76,7	100,0	0,0	5	P	P	P
114PP2016	90,0	93,3	11,5	4	P	P	P
	3,3	3,3	5,8	7		NP	
	bd	100,0	0,0	8		P	
120PP2016	27,4	52,2	13,5	3	NP	NP	NP
123PP2016	93,3	100,0	0,0	5	NP	P	P
	60,7	93,0	6,1	7		P	
124PP2016	93,3	100,0	0,0	5	NP	P	P
	65,6	100,0	0,0	7		P	
126PP2016	86,7	100,0	0,0	5	NP	P	P
	71,7	100,0	0,0	7		P	
127PP2016	80,0	100,0	0,0	5	NP	P	P
	66,7	100,0	0,0	7		P	
130PP2017	73,3	93,3	5,8	5	P	P	P
131PP2017	82,2	100,0	0,0	5	P	P	P
134PP2017	78,5	100,0	0,0	5	NP	P	P
137PP2017	93,4	96,3	6,4	4	NP	P	NP
	26,7	34,8	13,0	6		NP	
	20,0	30,0	20,0	7		NP	
138PP2017	60,0	85,0	8,4	2	NP	NP	NP
	bd	45,9	29,3	6		NP	
	bd	100,0	0,0	8		P	
139PP2017	80,7	82,6	17,7	1	NP	NP	NP
	48,5	64,6	28,6	1		NP	
	51,3	79,6	15,2	1		NP	
	36,7	65,0	20,7	1		NP	
	35,0	73,3	5,2	2		NP	
140PP2017	16,7	34,4	15,0	5	NP	NP	NP
141PP2017	69,0	70,0	26,5	4	NP	NP	NP
	23,3	26,7	5,8	6		NP	
	14,9	49,0	11,9	7		NP	
142PP2017	76,7	93,3	11,5	4	NP	P	P
	bd	90,0	10,0	8		P	
143PP2017	80,0	96,3	6,4	4	NP	P	P
144PP2017	91,7	100,0	0,0	2	NP	P	P
147PP2017	50,0	66,7	15,3	5	NP	NP	NP
149PP2017	90,0	93,3	5,8	5	NP	P	P
	40,0	76,7	15,3	7		NP	
	bd	100,0	0,0	8		P	
151PP2017	93,4	96,3	6,4	4	NP	P	P
152PP2017	80,0	100,0	0,0	4	NP	P	P

Szczep <i>E. coli</i>	Śmiertelność po 5 dniach od zakażenia [%]	Śmiertelność na zakończenie eksperymentu [%]	Odchylenie standardowe [%]	Nr eksperymentu	Klasyfikacja wg pozyskania szczepu	Klasyfikacja wg wyników <i>in ovo</i>	Ostateczna klasyfikacja
153PP2017	65,0	100,0	0,0	5	NP	P	P
154PP2017	100,0	100,0	0,0	5	P	P	P
	90,0	96,7	5,8	7		P	
155PP2016	93,4	100,0	0,0	4	P	P	P
156PP2017	100,0	100,0	0,0	5	P	P	P
157PP2017	100,0	100,0	0,0	6	P	P	P
158PP2017	96,7	100,0	0,0	6	P	P	P
159PP2017	100,0	100,0	0,0	4	P	P	P
B001PP2016	100,0	100,0	0,0	4	P	P	P
B002PP2016	53,3	93,3	5,8	5	P	P	P
<b>SZCZEPY USUNIĘTE Z ANALIZY</b>							
019PP2015	40,0	43,3	20,8	6	P	NP	? (wysokie SD>20% poszczególnych powtórzeń; SD całościowe =28%)
	37,8	75,9	25,1	7		NP	
	bd	100,0	0,0	8		P	
027PP2016	52,7	85,5	4,8	7	P	P?	? (NP/P)
	60,0	70,0	10,0	5		NP	
	bd	83,0	11,2	8		NP	
051PP2016	62,6	75,9	5,3	3	P	NP	? (NP/P)
	66,7	90,0	10,0	6		P	
	bd	85,6	17,1	8		P?	
074PP2016	72,6	83,3	20,8	3	P	NP	? (NP/P)
	74,4	100,0	0,0	7		P	
121PP2016	100,0	100,0	0,0	6	NP	P	? (NP/P)
	51,1	82,5	10,9	7		NP	
135PP2017	56,7	83,3	5,8	4	NP	NP	? (NP/P)
	90,0	96,3	6,4	6		P	
145PP2017	92,6	100,0	0,0	5	NP	P	USUNIĘTE Z ANALIZY ZE WZGLĘDU NA MOŻLIWOŚĆ ZAMIANY STOCKÓW
146PP2017	93,3	100,0	0,0	5	NP	P	
	57,8	86,3	15,2	7		P	

**Przykład 3.** Dobór genów pozwalających na jednoznaczne określenie patogenności szczepów *E. coli*.

W celu wytypowania maksymalnie 5 genów wirulencji, które same bądź w połączeniu z oznaczeniem serotypu badanego szczepu będą pozwalały na skuteczne i niezawodne określenie patogenności *Escherichia coli* u drobiu, przeprowadzono analizę dyskryminacyjną (Linear Discriminant Analysis; LDA).

Analiza pozwoliła stwierdzić iż najlepszymi dyskryminantami w modelu przewidywania patogenności szczepów *E. coli* są geny **związane** z metabolizmem żelaza: *iroB*, *iroC*, *iroD*, *iroE*, *iroN*, oraz *hlyF* (hemolysin), *bor* (prophage lipoprotein) i *ompT* (protease able to cleave colicin) (**Tabela 12; Załącznik 01 – Analiza\_LDA\_wszystkie\_geny**). Aby uniknąć sytuacji, w której w modelu przewidywania mamy

do czynienia z genami jednej rodziny, **do modelu predykcyjnego wybrano geny: *iroC*, *hlyF*, *ompT*, *bor* oraz serotyp O78.**

Ostatecznie w celu zapewnienia wysokiej skuteczności przewidywania przez algorytm patogenności szczepów w każdej populacji przy jednoczesnym utrzymaniu łatwości oznaczenia, w oparciu o wyniki wykonanych badań i analiz zdecydowano o wyborze do testu dwóch genów (*iroC*, *hlyF*) oraz serotypu O78.

**Przykład 4.** Opracowanie testu diagnostycznego.

#### Projektowanie

Bazując na przeprowadzonej analizie patogenności, zaprojektowano nowy test diagnostyczny opierający się na reakcji PCR typu multipleks w celu analizy obecności wybranych genów odpowiedzialnych za wirulencję. W **Tabeli 15** zaprezentowano sekwencje oryginalnych starterów służących do amplifikacji wybranych genów.

Ostateczny test na określenie patogenności szczepów *E. coli* izolowanych u drobiu wygląda następująco: próbki DNA pochodzące ze szczepów *E. coli* poddawane są reakcji PCR typu multipleks w celu amplifikacji 2 genów wirulencji (*iroC*, *hlyF*) oraz genu odpowiedzialnego za serotyp **O78**. Następnie, weryfikowana jest obecność tych genów w próbkach poprzez rozdział elektroforetyczny, a szczep przyporządkowywany jest do odpowiedniej grupy określającej patogenność, tj. do szczepów patogennych (P) – w przypadku obecności dowolnego z trzech genów lub do szczepów niepatogennych (NP) – w przypadku braku obecności któregośkolwiek z ww. genów.

**Tabela 12.** Startery wykorzystane w teście diagnostycznym

Etap testu	Nazwa	Sekwencja 5'→3'	Spodziewana wielkość produktu (bp)
I etap	<i>iroC</i> -F (Sekw. Nr Id. 1)	ACTATGTGCGCCGTGGTTAT	732
	<i>iroC</i> -R (Sekw. Nr Id. 2)	GTGAACGGGTGTCGATCAGT	
	<i>hlyF</i> -F (Sekw. Nr Id. 3)	GAGCACCTACTCCACAAGCG	458
	<i>hlyF</i> -A-R (Sekw. Nr Id. 4)	TCGGGCAACCAACAAAGGTA	
II etap	O78-A-F (Sekw. Nr Id. 5)	CACAACTCTCGGCAATATATCATCA	994
	O78-A-R (Sekw. Nr Id. 6)	TATGGGTTTGGTGGTACGTAGT	

#### Weryfikacja

Zaprojektowany test diagnostyczny w postaci PCR multipleks wykonano na wszystkich szczepach z kolekcji, przyporządkowując szczepy do odpowiednich grup patogenności P lub NP. Otrzymane wyniki porównano z wynikami analiz bioinformatycznych. Podsumowanie uzyskanych wyników przedstawiono w **Tabeli 13**. Stwierdzono, że obie analizy są ze sobą zgodne, tj. przyporządkowują szczepy do odpowiednich grup patogenności w identyczny sposób.

T a b e l a 13. Wyniki testu multipleks PCR

NR SZCZEPU <i>E. coli</i>	Produkty i ich wielkości po reakcji multipleks PCR			Patogenność szczepów <i>Escherichia coli</i> (N- szczep niepatogenny; P-szczep patogenny)		
	iroC (732 bp)	hlyF (824 bp)	O78 (992 bp)	Grupa patogenności	SEROTYP	Uwagi
001PP2015	-	-	-	NP	-	
002PP2015	+	+	-	P	-	
004PP2015	+	+	-	P	-	
005PP2015	+	+	-	P	-	
007PP2015	-	-	-	NP	-	
009PP2015	+	+	+	P	O78	
011PP2015	-	-	-	NP	-	
012PP2015	+	+	-	P	-	
014PP2015	+	+	+	P	O78	
015PP2015	+	+	-	P	-	
016PP2015	+	+	+	P	O78	
017PP2015	+	+	-	P	-	
018PP2015	+	+	-	P	-	
019PP2015	+	+	+	P	O78	
020PP2016	+	+	-	P	-	
021PP2016	+	+	-	P	-	
022PP2016	+	+	+	P	O78	
023PP2016	+	+	-	P	-	
024PP2016	+	+	-	P	-	
027PP2016	+	+	-	P	-	
028PP2016	+	+	-	P	-	
029PP2016	+	+	-	P	-	
030PP2016	+	+	-	P	-	
031PP2016	+	+	+	P	-	
032PP2016	-	-	-	NP	-	
033PP2016	+	+	-	P	-	
034PP2016	+	+	-	P	-	
035PP2016	+	+	+	P	O78	
036PP2016	+	+	-	P	-	

037PP2016	+	+	-	P	-	
038PP2016	+	+	-	P	-	
039PP2016	+	+	+	P	O78	
040PP2016	+	+	+	P	O78	
041PP2016	+	+	+	P	O78	
043PP2016	+	+	+	P	O78	
044PP2016	+	+	+	P	O78	
045PP2016	+	+	-	P	-	
046PP2016	+	+	-	P	-	
047PP2016	-	-	-	NP	-	
048PP2016	-	-	-	NP	-	
049PP2016	-	-	-	NP	-	
050PP2016	+	+	-	P	-	
051PP2016	-	-	-	NP	-	
052PP2016	-	-	-	NP	-	
053PP2016	+	+	-	P	-	
054PP2016	+	+	-	P	-	
057PP2016	+	+	-	P	-	
059PP2016	+	+	-	P	-	
062PP2016	+	+	-	P	-	
063PP2016	+	+	-	P	-	
065PP2016	-	-	-	NP	-	
066PP2016	+	+	-	P	-	
067PP2016	+	+	-	P	-	
069PP2016	+	+	-	P	-	
070PP2016	+	+	-	P	-	
073PP2016	+	+	-	P	-	
074PP2016	+	+	-	P	-	
075PP2016	+	+	-	P	-	
076PP2016	+	+	+	P	O78	
077PP2016	+	+	-	P	-	
078PP2016	+	+	-	P	-	
079PP2016	+	+	-	P	-	

080PP2016	+	+	-	P	-	
081PP2016	+	+	-	P	-	
082PP2016	-	-	-	NP	-	
083PP2016	+	+	+	P	O78	
084PP2016	+	+	-	P	-	
085PP2016	+	+	-	P	-	
086PP2016	+	+	-	P	-	
087PP2016	+	+	+	P	O78	
088PP2016	+	+	+	P	O78	
089PP2016	+	+	-	P	-	
8_001PP2016	+	+	-	P	-	
8_002PP2016	+	+	-	P	-	
105PP2016	+	+	-	P	-	
106PP2016	+	+	-	P	-	
107PP2016	+	+	-	P	-	
108PP2016	-	-	-	NP	-	
110PP2016	+	+	-	P	-	
113PP2016	+	+	-	P	-	
114PP2016	+	+	-	P	-	
120PP2016	-	+	-	P	-	
121PP2016	+	+	-	P	-	
123PP2016	+	+	-	P	-	
124PP2016	+	+	-	P	-	
126PP2016	-	+	-	P	-	
127PP2016	-	+	-	P	-	
130PP2017	+	+	-	P	-	
131PP2017	+	+	-	P	-	
134PP2017	+	+	-	P	-	
135PP2017	+	+	-	P	-	
137PP2017	-	-	-	NP	-	
138PP2017	-	-	-	NP	-	
139PP2017	-	-	-	NP	-	
140PP2017	-	-	-	NP	-	

141PP2017	+	+	-	<b>P</b>	-	
142PP2017	+	+	-	<b>P</b>	-	
143PP2017	+	+	-	<b>P</b>	-	
144PP2017			+	<b>P</b>	O78	
147PP2017	-	-	-	<b>NP</b>	-	
149PP2017	-	-	-	<b>NP</b>	-	
151PP2017	-	-	+	<b>P</b>	O78	
152PP2017	-	-	+	<b>P</b>	O78	
153PP2017	+	+	-	<b>P</b>	-	
154PP2017	+	+	-	<b>P</b>	-	
155PP2017	+	+	-	<b>P</b>	-	
156PP2017	+	+	+	<b>P</b>	O78	
157PP2017	+	+	-	<b>P</b>	-	
158PP2017	+	+	+	<b>P</b>	O78	
159PP2017	+	+	-	<b>P</b>	-	
K12	-	-	-	<b>NP</b>	-	

#### Ocena skuteczności testu

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wykazano wysoką skuteczność metody diagnostycznej identyfikującej szczepy *E. coli* jako patogenne dla drobiu (APEC) – test pozwala ocenić szczep jako patogenny lub niepatogenny z dokładnością, odpowiednio do 97,7% oraz 94,1%.

#### Literatura

Antao, EM., Ganwu, L., Wieler, L., Preisinger, R., Ewers, C. Identification and characterization of a novel avian pathogenic *E. coli* (APEC) fimbrial adhesion. EP2298798B1.

Barbieri, N. L., de Oliveira, A. L., Tejkowski, T. M., Pavanelo, D. B., Rocha, D. A., Matter, L. B., ... Horn, F. (2013). Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. PloS one, 8(8), e72322. doi:10.1371/journal.pone.0072322.

Barnes, H.J., Nolan, L.K., Vaillancourt, JP. (2008). Colibacillosis in Diseases of Poultry, 12<sup>th</sup> Edition, Blackwell Publishing.

Dissanayake, DR., Octavia, S., Lan, R. (2014). Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka. Veterinary Microbiology 168, 403–412; doi:10.1016/j.vetmic.2013.11.028.

Dziva, F., Stevens, MP. (2008). Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. Avian Pathol. 2008 Aug; 37(4):355–66. doi:10.1080/03079450802216652.

Dziva, F., Hauser, H., Connor, T. R., van Diemen, P. M., Prescott, G., Langridge, G. C., ... Stevens, M. P. (2013). 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. Infection and immunity, 81(3), 838–849. doi:10.1128/IAI.00585-12.

Ewers, C., Janssen, T., Kiessling, S., Philipp, H.C., Wieler, L.H. (2005). Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. Avian Dis. Jun; 49(2): 269–73. doi:10.1637/7293-102604R.

Ewers, C., Antão, E. M., Diehl, I., Philipp, H. C., & Wieler, L. H. (2008). Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Applied and environmental microbiology*, 75(1), 184–192. doi:10.1128/AEM.01324-08.

Guabiraba, R., Schouler, C. (2015). Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiology Letters*, 362, fnv118; doi:10.1093/femsle/fnv118.

Huja, S., Oren, Y., Trost, E., Brzuszkiewicz, E., Biran, D., Blom, J.,... Dobrindt, U. (2015). Genomic avenue to avian colisepticemia. *mBio*, 6(1), e01681-14. doi:10.1128/mBio.01681-14.

Hussein, AH., Ghanem, IA., Eid, AA., Ali, MA., Sherwood, JS., U, G., Nolan, LK., Logue, CM. (2013). Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken flocks in Egypt. *Avian Dis.* 57(3): 602–11. doi:10.1637/10503-012513-Reg.1.

Iguchi, A., Iyoda, S., Seto, K., Morita-Ishihara, T., Scheutz, F., Ohnishi, M., & Pathogenic E. coli Working Group in Japan (2015). *Escherichia coli* O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping. *Journal of clinical microbiology*, 53(8), 2427–2432. doi:10.1128/JCM.00321-15.

Janßen, T., Dr Hans, C. P., Voss, M., Preisinger, R., Lothar H., Wieler, L. (2003). Multiplex PCR is the first technique to allow the specific and sensitive detection of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *LOHMANN Information*, 28/2003, 1–5.

Joensen, K. G., Tetzschner, A.M., Iguchi, A., Aarestrup, F.M. and Scheutz, F. (2015). Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* using whole genome sequencing (WGS) data. *J.Clin.Microbiol.* 53(8):2410–2426. doi:JCM.00008-15 [pii];10.1128/JCM.00008-15 [doi].

Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., & Nolan, L. K. (2008). Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of clinical microbiology*, 46(12), 3987–3996. doi:10.1128/JCM.00816-08.

Jørgensen, S. L., Kudirkiene, E., Li, L., Christensen, J. P., Olsen, J. E., Nolan, L., & Olsen, R. H. (2017). Chromosomal features of *Escherichia coli* serotype O2:K2, an avian pathogenic *E. coli*. *Standards in genomic sciences*, 12, 33. doi:10.1186/s40793-017-0245-3.

Krawczyk, B., Samet, A., Leibner, J., Sledzińska, A., & Kur, J. (2006). Evaluation of a PCR melting profile technique for bacterial strain differentiation. *Journal of clinical microbiology*, 44(7), 2327–2332. doi:10.1128/JCM.00052-06.

Lee, SY., Yoo, SM., Chang, KH., Yoo, SY., Yo, NCh., Yoo, WM., Keum, KCh., Kim, JM., Lee, G. Nucleic acid probes for detection of non-viral organisms. US 2007/0065817 A1.

Lee, SY., Yoo, SM., Shin, SY., Keum, KCh., Yoo, NCh., Yoo, WM., Kim, JM., Choi, JY. DNA chip for detection of *Escherichia coli*. WO2008/084888 A.

Lindstedt, B. A., Finton, M. D., Porcellato, D., & Brandal, L. T. (2018). 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 infectious diseases*, 18(1), 544. doi:10.1186/s12879-018-3449-2.

Lutful Kabir S. M. (2010). Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *International journal of environmental research and public health*, 7(1), 89–114. doi:10.3390/ijerph7010089.

Mellata M. (2013). Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne pathogens and disease*, 10(11), 916–932. doi:10.1089/fpd.2013.1533.

Paixão, AC., Ferreira, AC., Fontes, M., Themudo, P., Albuquerque, T., Soares, MC., Fevereiro, M., Martins, L., Corrêa de Sá, Ml. (2016). Detection of virulence-associated genes in pathogenic and commensal avian *Escherichia coli* isolates. *Poultry Science* 95:1646–1652. doi:10.3382/ps/pew087.

Roussan, D.A., Zakaria, H., Khawaldeh, G., Shaheen, I. (2014). Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* strains from broiler chickens by multiplex polymerase chain reaction (PCR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) *Open J. Vet. Med.* 4: 211–219. doi:10.4236/ojvm.2014.410025.

Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmieciak, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Plokskowska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut pathogens*, 11, 10. doi:10.1186/s13099-019-0290-0.

Schouler, C., Schaeffer, B., Brée, A., Mora, A., Dahbi, G., Biet, F., ... Moulin-Schouleur, M. (2012). Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *Journal of clinical microbiology*, 50(5), 1673–1678. doi:10.1128/JCM.05057-11.

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

Skyberg, JA., Horne, SM., Giddings, CW., Wooley, RE., Gibbs, PS., Nolan, LK. (2003). Characterizing avian *Escherichia coli* isolates with multiplex polymerase chain reaction. *Avian Dis.* Oct-Dec; 47(4): 1441-7. doi:10.1637/7030.

Sokurenko, E., Johnson, J.R., Weissman, S., Tchesnokova, V. High-Resolution Clonal Typing of *Escherichia coli*. US 2014/0193824 A1.

Stromberg, Z. R., Johnson, J. R., Fairbrother, J. M., Kilbourne, J., Van Goor, A., Curtiss, R., Rd, & Mellata, M. (2017). Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *PLoS one*, 12(7), e0180599. doi:10.1371/journal.pone.0180599.

Subedi, M., Luitel, H., Devkota, B., Bhattarai, R. K., Phuyal, S., Panthi, P., ... Chaudhary, D. K. (2018). Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. *BMC veterinary research*, 14(1), 113. doi:10.1186/s12917-018-1442-z.

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

Weigel, LM., Tenover, FC. Oligonucleotide probes for detecting Enterobacteraceae and quinolone-resistant Enterobacteraceae. US 2008/0199877 A1.

## SEQUENCE LISTING

<110> Proteon Pharmaceuticals S.A.

<120> Sposób i zestaw do wykrywania pozajelitowych szczepów E. coli patogennych dla drobiu

<130> PK/7222/RW

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> primer

<400> 1  
actatgtgcg ccgtggttat 20

<210> 2  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> primer

<400> 2  
gtgaacgggt gtcgatcagt 20

<210> 3  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> primer

<400> 3  
gagcacctac tccacaagcg 20

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
 <223> primer  
  
 <400> 4  
 tcgggcaacc aacaaaggta 20  
  
 <210> 5  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> primer  
  
 <400> 5  
 cacaactctc ggcaatatat catca 25  
  
 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> primer  
  
 <400> 6  
 tatgggtttg gtggtacgta gt 22  
  
 <210> 7  
 <211> 3786  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
  
 <400> 7  
 atgataatca tatgccagca cccatccagg agtcatgcat ccataacaat gcgggaccgg 60  
 agcgtgctgg cttttttgcg gaacgatccg gccagtggat cgtattttac agacggagga 120  
 ggcttaatgc ctgcgaatca cactcccaca ccggctcagt catggatagt tcgcctggcg 180  
 cgcgtgtgct gggaacgtaa gaaacttagt gtcatcgtgg tggtagcgtc agtatcgact 240  
 attttgctgg ctgcgctgac gccactgctg acaagacagg ctgtgaatga cgactggcg 300  
 ggcaatccgg cccgcctgcc gtggctggcc tgcgggttac tgttgatcgc ttttttgat 360  
 ttcacggtga actatgtgcg ccgtggttat gccgggatgc tctcactctg ggtgcagcat 420  
 accctcagag gacgggtatt cgacagtatt cagaaacttg acggcgcagg ccaggatgcg 480  
 ctgcgcaccg ggcaggtgat ttcacggacc aacagcagtc tgcagcaggt gcataccctg 540

ctgcagatgt gcccggtgcc gctggcagtg ttcacttatt acattgccgg cattgccgtg 600  
 atgctgtgga tgtcccctgc catgacgctt atcgtcgtgt gcgtactggt atgcctggcg 660  
 atcaccgcgc ttcgtgcgcg tcgtagggtc ttcgcgcaaa ccgggctggc ctcggaccaa 720  
 ctggcgaatc tcaccgaaca tatacgcgag gtgctggcac agatctcagt ggtaaaatcc 780  
 tgtgtggcag agatgcgtga aacgcactgg ctcgataggc agtcgcggca gattgtgcgt 840  
 gtacgcatcg gtgcggttat ctcgcaggcg atgcctgggg ccaccatgct ggcgctaccg 900  
 gtgctcgggc aaatcgtcct gctgtgctac ggcgggtggt cggtcatgca cgggcggatc 960  
 gatctcggta ccttcgttgc attcgcacgc ttcctcgcga tgctgaccgg gccaacccgc 1020  
 gtactggcat cgtttctggt taticgcacag cgcactcagg cgtccgtgga gcgggtgttt 1080  
 gcaactgatcg acacccttc acagatggag gacgggacgg agtcgattaa cagtcaggtt 1140  
 gtcggactgg aactggagaa tatgagcttt gactaccacc atggcgacag acatatactc 1200  
 agcaatatct cttttccct gcgcgccggt gaaaccgtgg cggtggtggg cgcacccggg 1260  
 tcaggaaaat cgaccctggt gatgctactg gcgcgttttt atgatccctg ctccggaaag 1320  
 atatggctca acaccagcga aggccgacaa aatcttcgcg atatcagact ggaggcgctt 1380  
 cgtcgcggg taggcatcgt atttgaagat gcttttctgt ttgccggtac ggtggcggaa 1440  
 aatatgcct atggccaccc tcaggcaacg gcggacgaca ttcgccgtgc ggcagctgct 1500  
 gcaggagcca gcgattttat taacgccctg ccgaaaggct tcgatagcct gtaaacgaa 1560  
 cggggtacga atctttccgg cgggcagagg cagcgaatag cgctggcgcg ggcgctcatt 1620  
 actgcaccgg acgtgttaat cctggatgat actacctcag cggttgatgc tgttacggaa 1680  
 gcggagatta ataccgcgt gggtcgctat gctgacgaag ggcatatgct gctggtgatt 1740  
 gcccgacggc gttcaacact tcagctagcc agccgggttg tggctctgga taaggccgt 1800  
 atggtggata ccggaacccc ggcagaactt gaagcgcgct gtccggcggt ccgcgactg 1860  
 atgaccggcg acagcgattt tctggccacg tcccacaata gccacaacga attgtggccg 1920  
 gctgaaccag cgacacaaga cgatgtaacg gatacggggg ataaaggttt tgtcgccgt 1980  
 atgaccgcg taccggaaaa tgcagtacag caggcgtggt ccggtaaagg tcgcaaagtc 2040  
 acgtcactac tgaagcctgt ggcgtggatg ttcgtcatcg ccgctctgct gatcgcactc 2100  
 gattctgcgg caggcgtagg ggtactgata ctgttcagc acggcattga ctccggtgct 2160

gccgcaggcg atatgtcgat catcggcctc tgtgccctgc tcgccctgtg cctggtcatt 2220  
gtgggctggg gcagttattc tctgcagacg gtcttcgccg ccagagcggc ggaatcagtt 2280  
cagcattcgg tgcgcttgcg cagcttcggc cataatgctgc gtcttggaact cccctggcat 2340  
gaaaagcatg ccgattcgcg tcttaccgcg atgaccgttg atgtggactc tctcgcccgc 2400  
tttctgcaaa acggccttgc cggtgcggcc accagtctgg tgacgatgtt cgcaatcgcc 2460  
gccaccatgt tctggctcga cccgttcctg gcgctgacgg cattaagcgc agtgccagtg 2520  
gccgcactgg caaccatgat ttatcgccgc ctgagttacc ctgcttatgc acaggcacgg 2580  
ctggaaatag gcaaagtcaa cagcaccctg caggaaaaag tctctggcct gcgtgtcgtg 2640  
caatcgcatg gtcagcagga actggagggc gcccgctgc gcgcgttatc ggagcgtttc 2700  
cgcgcaaccg gtgtgcgagc acaaaaatac cttgcagtct attttccggt cctgacattc 2760  
tgcaccgagg cctcctatgc cgtgttctg ttagtgggag cttcgcaggc cgccgctgga 2820  
gaaatgactg ccgggggtact ggcggtttc ttctgttgc tggggcaatt ctatggggca 2880  
gtgcagcagt tatcagggat tgtcgacgcc tggcagcagg cgacagccag cggcaaacat 2940  
attgatgaac tactggcgac agaaggcact gagaacctcg ggtcctcttc ggtcctcct 3000  
gtcaccgggtg cactgcatct tgatgaggtc acgttcagtt atcccagacg tcacgagcca 3060  
gctctgaaca aacttacct gacgatccct gagggaaatg ttgtcgcggc cgtcggctgc 3120  
agcgggtcgg gtaagtcgac gctgattaag ctgattgccg ggttgtattt cccacgcac 3180  
ggcaacatca gaatcggtgt gcaaatgctc gatgatgcct cgctcactga gtatcgtcgc 3240  
cagattgggc ttgtcgatca ggatgtagca ctgttagta gtgatattgc agaaaacatt 3300  
cgttattcac ggccatccgc caccaatgaa gacgttgaaa ttgcctcaca gcgggcaggg 3360  
ctgtatgaga tgggtgtgcaa tctgccgcag ggaticcgga caccggtgaa taacggcggg 3420  
gccgatctgc ccgcagggtca gcgccagttg attgcgctgg cccgcgcgca actggcgaat 3480  
gcccacatcc tgctgctcga cgaagccacg tcatgtctgg atcgcacatc cgaagaacga 3540  
ctgatgtcat cgtaacaga tgtcgtgcat gccgggaagc actcggcgct gattgttgca 3600  
catcgtctga ccaccgcgca acgctcgat ctgattgccg ttattgataa ggggttactt 3660  
gcggaatacg gaaccacga acagctgtta tctgcgggcg gcctctatac ccgcttatgg 3720  
catgacagcg tcagcagtac tgctctccat cgccagcaca acatgaagga ggaaaccccg 3780

ggatag 3786

<210> 8  
 <211> 1110  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

<400> 8  
 atgaaattat tattacttac aggtgcaaca ggattttcttg gtggcgcggt cctggataag 60  
 ctgctggata actgtaataa tataaatttg ctacttttag tacgagcacc tactccacaa 120  
 gcgggactgg aaagaattaa agaaaatatg cgtaaattta atgtttgtga ggaaaggttg 180  
 catgcattaa ctaatgataa catcttgctt ggggatctaa ataatccgga agcctttctc 240  
 atggatcctc gtcttgatga agtcactcat gttataaact gtgcggctat agcttctttt 300  
 ggtaataatc cttttatatg gaatgtgaat gttacaggta cacttgcttt tgcaagaaga 360  
 atggcaaaag tggcaggact gaaacgcttc cttcatgttg gtactgctat gtcttgtaaca 420  
 cctcatacgg ggtcgttagt taaggaagag tctgcttcat cagaaacagg tgaacattta 480  
 gtggagtata cgcattcaaa agcaacaata gaatatctga tgcgtaagca gtgtcctgat 540  
 ttacctttgt tggttgcccg accatcaatt attgttggcc acagtcgttt agggtgctta 600  
 ccttcaacca gtattttctg ggtattcaga atggggttaa tgttgcaaaa atttatgtgc 660  
 tctctggatg ataaaataga tgttatccct gtagattatt gtgctgatgc attgctaattg 720  
 ttgcttgaaa gctcgttaat taatggtgag attgttcata tadcagcagg taaagaaagt 780  
 agtgtgacgt tctctgctat tgacgaagct gtagcccggtg ctttgaactg tgatcctggt 840  
 ggagacagat atactaaagt cagttatgac atactggcaa tgagccgtca tgattttaaa 900  
 aatatttttg gtccctgtaa cgaacgcctt atgttaaaag ccattcgttt atatggagcg 960  
 ttcagtatgc tcaatgtttg tttcagtaac gacaagctac tgagtatcgg aatgcctaaa 1020  
 ccgcaaaagt ttactgatta tattaataac tgtatagaaa cgacaaaaca cctttcaatt 1080  
 caacaacaaa tggaagttga ttttaataa 1110

<210> 9  
 <211> 1000  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

```

<400> 9
agaatcacia ctctcggcaa tatatcatca ttttgaaaat ataaccccat aaaaataaga      60
gtcaacataa accaaaagtg caccattaat cttttaatat aattaacttt atctaatacca    120
atTTTTtTTta taacacgttt agggttataa ataaagcatg taaagaattg agatataatg    180
atactataca tcaaaccctc agcattgtaa tgaggTatta aaaaacatga cagaattaaa     240
accataactg ctgatataat actttgccta tgaaaaatcgt aaataccaat ggCagtGCCa    300
attgaggTta gaataacctg acatgtttca atatagaata taataattat tgctactata     360
taatagtagg atattacatc tattttccc ttaagaatat actccgcaac aggaatacct      420
aacaatGCCa caaaagaagt agaaataaca gatataagca cactgatatc taatagtTta     480
agtgtgagag ggataacatc aacaccatca tggaaacgct ttgagagcgt aggcataaaa     540
taacttGca ccaaaataat tatcaaatta taaacattaa atatttGcaa aaagaaacca     600
tatataatag tagaactaga actgctttct gaaccaaata ttttcaaata atatataGac    660
aatgtataga tgaaaattgc aggaaaaaca gtaaaaaaaaa gcttaaggTt atacttgaat    720
ggtagatGga atgatttttc gctcctgttg acagacttct tatgcttaag gagtaaaaat     780
gacaaagaat atattaagca gaatagtgag ctcaaaaacc atacaagagt taaatcatac     840
aaatcaatgt ttttatcaga atgataaaac aagaaaagga aagcagttgg cataattatg     900
gcgtacagaa atcgataaac tttatcgata ataataTTTT gttttgcata tacacatGca    960
ttaataatat tcgatatact acgtaccacc aaaccatac                               1000

```

### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób identyfikacji szczepu *E. coli* patogennego dla ptaków (APEC), **znamienny tym**, że:
  - a) z badanej próbki materiału biologicznego izoluje się DNA,
  - b) w próbce wyizolowanego DNA bada się obecność: genów wirulencji *iroC* i *hlyF* oraz genu odpowiedzialnego za serotyp O78,
 przy czym stwierdzenie obecności co najmniej jednego genu spośród wspomnianych genów wirulencji lub genu odpowiedzialnego za serotyp O78 świadczy o zidentyfikowaniu w badanej próbce szczepu *E. coli* patogennego dla ptaków (APEC) z dokładnością wynoszącą do 97,7%.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie a) badaną próbką jest próbka tkanki chorego ptaka lub próbka środowiskowa.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie b) próbką wyizolowanego DNA zawiera genomowy DNA bakteryjny, zwłaszcza DNA *E. coli*.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie b) obecność wspomnianych genów bada techniką PCR.

5. Sposób według zastrz. 1 albo 4, **znamienny tym**, że w etapie b) stosuje metodę PCR typu multiplex oraz zestaw primerów przedstawionych jako Sekw. Nr Id. 1–6, przy czym:
  - o obecności genu wirulencji *iroC* świadczy obecność produktu o długości 732 pz,
  - o obecności genu wirulencji *hlyF* świadczy obecność produktu o długości 458 pz, natomiast
  - o obecności genu antygeny odpowiedzialnego za serotyp O78 świadczy obecność produktu o długości 994 pz.
6. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że zidentyfikowanie szczepu APEC oznacza stwierdzenie kolibakteriozy u chorego ptaka, zwłaszcza drobiu hodowlanego, korzystnie kury.
7. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że niewykrycie żadnego spośród wspomnianych genów świadczy o zakażeniu szczepem niepatogennym.
8. Zestaw do identyfikacji szczepu *E. coli* patogennego dla ptaków (APEC), **znamienny tym**, że zawiera:
  - oligonukleotyd zawierający co najmniej 20 kolejnych nukleotydów należących do genu wirulencji *iroC* przedstawionego na Sekw. Nr Id. 7,
  - oligonukleotyd zawierający co najmniej 20 kolejnych nukleotydów należących do genu wirulencji *hlyF* przedstawionego na Sekw. Nr Id. 8,
  - oligonukleotyd zawierający co najmniej 20 kolejnych nukleotydów należących do genu antygeny odpowiedzialnego za serotyp O78 przedstawionego na Sekw. Nr Id. 9,przy czym stwierdzenie obecności co najmniej jednego genu spośród wspomnianych genów wirulencji lub genu odpowiedzialnego za serotyp O78 świadczy o zidentyfikowaniu w badanej próbce szczepu *E. coli* patogennego dla ptaków (APEC) z dokładnością wynoszącą do 97,7%.
9. Zestaw według zastrz. 8, **znamienny tym**, że zawiera oligonukleotydy o sekwencjach przedstawionych jako Sekw. Nr Id. 1–6.
10. Zestaw według zastrz. 8, **znamienny tym**, że jest przeznaczony do diagnozowania kolibakteriozy u ptaków, zwłaszcza drobiu hodowlanego, korzystnie kur.
11. Zastosowanie zestawu zawierającego:
  - oligonukleotyd zawierający co najmniej 20 kolejnych nukleotydów należących do genu wirulencji *iroC* przedstawionego na Sekw. Nr Id. 7,
  - oligonukleotyd zawierający co najmniej 20 kolejnych nukleotydów należących do genu wirulencji *hlyF* przedstawionego na Sekw. Nr Id. 8,
  - oligonukleotyd zawierający co najmniej 20 kolejnych nukleotydów należących do genu antygeny odpowiedzialnego za serotyp O78 przedstawionego na Sekw. Nr Id. 9,do określania stopnia patogenności szczepu *E. coli* dla ptaków.
12. Zastosowanie zestawu według zastrz. 11, **znamienny tym**, że zestaw zawiera oligonukleotydy o sekwencjach przedstawionych jako Sekw. Nr Id. 1–6.