

# Kvantifikacija sojeva bakterije *Escherichia coli* uzgojenih simultano in vitro ili in vivo postupkom qPCR-a s ciljem dokaza klonalne selekcije

---

Fajdetić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:015883>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Marija Fajdetić

**Kvantifikacija sojeva bakterije *Escherichia coli* uzgojenih  
simultano *in vitro* ili *in vivo* postupkom qPCR-a s ciljem dokaza  
klonalne selekcije**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

**Zavod za bolesti peradi s klinikom**

**Predstojnik:** doc. dr. sc. Željko Gottstein

**Mentor:** doc. dr. sc. Željko Gottstein

**Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:**

1. izv. prof. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić
2. doc. dr. sc. Maja Lukač
3. doc. dr. sc. Željko Gottstein
4. izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš

## **Zahvala**

Zahvaljujem mentoru, doc. dr. sc. Željku Gottsteinu i asistentici Liči Lozici, dr. med. vet. na velikoj pomoći i podršci u izradi diplomskog rada. Hvala vam na pruženoj prilici za istraživački rad, svim stručnim i prijateljskim savjetima i vremenu kojeg ste uložili kako bi mi pomogli.

Hvala mojoj obitelji na velikoj podršci tijekom cijelog studija.

**Popis kratica**

APEC – (avian pathogenic *Escherichia coli*)

BHI - (brain heart infusion)

CFU - (colony forming units)

Ct - (cycle treshold)

DEC – (diarrheagenic *Escherichia coli*)

DNK - (deoksiribonukleinska kiselina)

EnPEC – (endometrial pathogenic *Escherichia coli*)

ExPEC - (extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*)

McF - (McFarland)

MPEC – (mammary pathogenic *Escherichia coli*)

mRNK - (glasnička ribonukleinska kiselina)

NMEC – (newborn meningitis-associated *Escherichia coli*)

PCR - (lančana reakcija polimerazom)

qPCR - (lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu)

SePEC – (sepsis-associated pathogenic *Escherichia coli*)

SPF - (specific pathogen free)

UPEC – (uropathogenic *Escherichia coli*)

WGS - (whole genome sequencing)

**Popis tablica i slika:**

Tablica 1. Prikaz filogenetskih skupina i gena virulencije kod sojeva korištenih u istraživanju

Tablica 2. Sekvence početnica korištenih u qPCR reakciji

Tablica 3. Prikaz uginuća komercijalnih zametaka, sojevi 46 i 333.

Tablica 4. Prikaz uginuća SPF zametaka, sojevi 46 i 333.

Tablica 5. Prikaz uginuća komercijalnih zametaka, sojevi 344 i 347.

Tablica 6. Prikaz uginuća SPF zametaka, sojevi 344 i 347.

Slika 1. Ct vrijednosti nakon inokulacije sojeva 46 i 333 pojedinačno ili u kombinaciji (+) *in vitro*.

Slika 2. Ct vrijednosti nakon inokulacije sojeva 344 i 347 pojedinačno ili u kombinaciji (+) *in vitro*.

Slika 3. Ct vrijednosti nakon inokulacije sojeva 46 i 333 pojedinačno ili u kombinaciji (+) na komercijalnim zamecima.

Slika 4. Ct vrijednosti nakon inokulacije sojeva 46 i 333 pojedinačno ili u kombinaciji na SPF zamecima.

Slika 5. Ct vrijednosti nakon inokulacije sojeva 344 i 347 pojedinačno ili u kombinaciji na komercijalnim zamecima.

Slika 6. Ct vrijednosti nakon inokulacije sojeva 344 i 347 pojedinačno ili u kombinaciji na SPF zamecima.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	3
2.1. Podjela sojeva <i>E. coli</i> .....	3
2.2. Čimbenici virulencije .....	3
2.3. Bakteriocini .....	5
2.4. Klonalnost sojeva na farmama.....	5
2.5. Interakcija vrsta .....	5
2.6. Metode detekcije i kvantifikacije.....	6
3. MATERIJALI I METODE .....	7
3.1. Sojevi <i>E. coli</i> korišteni u istraživanju .....	7
3.2. <i>In vitro</i> uzgoj <i>E. coli</i> u BHI mediju .....	8
3.3. <i>In vivo</i> uzgoj <i>E. coli</i> u kokošjim zametcima.....	8
3.4. Izdvajanje DNK.....	8
3.5. qPCR.....	9
3.6. Statistička analiza .....	9
4. REZULTATI.....	10
5. RASPRAVA.....	19
6. ZAKLJUČAK .....	21
7. LITERATURA.....	22
8. SAŽETAK.....	27
9. SUMMARY .....	28
10. ŽIVOTOPIS .....	29

## 1. UVOD

*Escherichia coli* (*E. coli*) je bakterija koja kao komenzal nastanjuje probavni trakt i površine sluznica sisavaca i većine ptica, no postoje brojni sojevi *E. coli* koji su primarno patogeni. Među njima je i ptičja patogena *E. coli* (APEC) koja u peradi uzrokuje kolibacilozu. Kao jedna od najčešćih baterijskih bolesti u uzgoju peradi, kolibaciloza ima veliki ekonomski značaj na svjetskoj razini zbog brojnih gubitaka tijekom uzgoja te prilikom obrade mesa (NOLAN i sur., 2020.). Gubitci tijekom uzgoja uključuju uginuća zametaka i jednodnevnih pilića (čak do 50 %), uginuća pilenki i nesilica, prestanak nesenja te troškove cijepljenja i liječenja (BIĐIN, 2008.; GUABIRABA i SCHOULER, 2015.; LANDMAN i VAN ECK, 2015.). Određeni ptičji patogeni sojevi imaju mnogo zajedničkih karakteristika s izvancrijevnim patogenim sojevima *E. coli* u ljudi koji uzrokuju infekcije mokraćnog sustava, septikemiju i meningitis novorođenčadi, pa se iz tog razloga smatra da APEC sojevi imaju zoonotski potencijal (GUABIRABA i SCHOULER, 2015.; SINGER, 2015.). APEC sojevi posjeduju plazmide koji mogu nositi gene za rezistenciju na antibiotike i dezinficijense, a oni se konjugacijom mogu prenijeti na izvancrijevne patogene sojeve koji uzrokuju bolesti u ljudi (NOLAN i sur., 2020).

Pojavi kolibaciloze pogoduju prethodne infekcije drugim uzročnicima, te stres i loši zoohigijenski uvjeti (NOLAN i sur., 2020.). Do infekcije u peradi dolazi nakon oštećenja kože ili sluznice, te inhalacijom prašine onečišćene izmetom (BIĐIN, 2008.), a moguća je i ascendentna infekcija reproduktivnog trakta preko kloake (TRAMPEL i sur., 2007; PIRES-DOS-SANTOS i sur., 2012.) kao i zaraza tijekom embrionalnog razvoja nakon kontaminacije rasplodnih jaja (BIĐIN, 2008.). Kolibaciloza se javlja u obliku septikemije ili lokalizirane bolesti kao infekcija reproduktivnog trakta, omfalitis, upala žumanjčane vreće (GUABIRABA i SCHOULER, 2015.), zatim koligranulomatoza, upala zračnih vrećica, sindrom otečene glave, koliformni celulitits, peritonitis, osteomijelitis/sinovitis, panoftalmitis i enteritis (NOLAN i sur., 2020.). Profilaksa kolibaciloze temelji se na strogoj kontroli roditeljskih jata, provođenju biosigurnosnih i zoohigijenskih mjera, te cijepljenju. Komercijalno dostupna cjepiva često nisu učinkovita zbog heterogenosti terenskih sojeva u odnosu na cijepni. Učinkovitija je primjena autogenih cjepiva koja se posebno pripremaju za individualne uzgoje odnosno jata (GUABIRABA i SCHOULER, 2015.; LANDMAN i VAN ECK, 2017.). Usprkos raznolikosti sojeva, pojedina istraživanja su dokazala klonalnost malog broja sojeva na određenom geografskom području ili na razini jata (RONCO i sur., 2017.; TRAMPEL i sur., 2007.; EWERS i sur., 2004.). Na tim saznanjima temelji se i ovo istraživanje simultanog uzgoja sojeva



*E. coli* različite virulencije i različitih filogenetskih grupa. Cilj je zabilježiti njihovo umnažanje i interakciju kako bi dokazali klonalnu selekciju. Pretpostavka je da će se virulentniji sojevi zbog posjedovanja određenih gena virulencije, prilikom zajedničkog nasađivanja *in vitro* ili *in vivo* s manje virulentnim sojevima, bolje umnažati i moguće potiskivati drugi soj.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Podjela sojeva *E. coli*

Patogeni sojevi *E. coli* podijeljeni su u dvije glavne skupine: crijevni (eng. diarrheagenic *E. coli*, DEC) i izvancrijevni (eng. extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC). Skupina ExPEC sadrži šest patotipova u koje spadaju: uropatogena *E. coli* (eng. uropathogenic *E. coli*, UPEC), *E. coli* koja uzrokuje meningitis novorođenčadi (eng. newborn meningitis-associated *E. coli*, NMEC), ptičja patogena *E. coli* (eng. avian pathogenic *E. coli*, APEC), *E. coli* koja uzrokuje sepsu (eng. sepsis-associated pathogenic *E. coli*, SePEC), *E. coli* patogena za mliječnu žlijezdu (eng. mammary pathogenic *E. coli*, MPEC) i *E. coli* patogena za endometriju (eng. endometrial pathogenic *E. coli*, EnPEC) (KUNERT FILHO i sur., 2015). S obzirom na genetsku sličnost izvancrijevnih sojeva, mnoga istraživanja su usmjerena na utvrđivanje gena virulencije koji definiraju patotipove, stoga se i klasifikacija vrlo često mijenja.

APEC patotip trenutno sadrži 8 filogrupa- A, B1, B2, C, D, E, F i G, te pet „cryptic clade“ skupina koje se fenotipski ne razlikuju od ostalih filogrupa. Identifikacija osnovne četiri filogrupe (A, B1, B2, F) vrši se pomoću quadruplex PCR reakcije, a temelji se na prisutnosti četiri gena virulencije u raznim kombinacijama, dok se identifikacija ostalih filogrupa vrši pomoću dodatnih setova specifičnih PCR početnica (CLERMONT i sur., 2013., 2019.). Ciljani geni u PCR reakciji su *arpA*, *chuA*, *yjaA* i TspE4.C2. Filotipizacija se može provoditi i *in silico* na temelju sekvence čitavog genoma (eng. whole genome sequencing, WGS), pri čemu se prati prisutnost određenih gena virulencije. Izvancrijevni patogeni sojevi *E. coli* najčešće spadaju u filogrupe B2, F, D i G (CLERMONT i sur., 2013., 2019.).

### 2.2. Čimbenici virulencije

Čimbenici virulencije su određene fenotipske ili genotipske karakteristike povezane s virulencijom (DHO-MOULIN i FAIRBROTHER, 1999.). Tu spadaju sposobnost adhezije, invazivnost, sustav za vezanje i transport željeza, preživljavanje u serumu, antifagocitna aktivnost te prisutnost temperaturno osjetljivog hemaglutinina (*Tsh*). Fimbrije olakšavaju adheziju na stanice domaćina, a tu spadaju F1, P, AC/1 i *Stg* fimbrije te tip IV pili. F1 fimbrije prisutne su u gotovo svih patogenih, ali često i u komenzalnih sojeva, stoga je njihova uloga u virulenciji upitna (DZIVA i STEVENS, 2008.). Do ekspresije F1 fimbrija dolazi u dišnim organima (dušnik, pluća, zračne vrećice), a u ostalim organima i krvi ta ekspresija izostaje. P

fimbrije nisu zaslužne za početne stadije infekcije jer u dušniku ne dolazi do njihove ekspresije odnosno ona je izražena tek u plućima, zračnim vrećicama i unutarnjim organima, pa se smatra da imaju ulogu u patogenosti tijekom kasnijih stadija infekcije (DHO-MOULIN i FAIRBROTHER, 1999.). Fimbrije AC/1, *Stg* i tip IV pili imaju ulogu u adheziji APEC sojeva na stanice, a njihova uloga u patogenezi još se istražuje (DZIVA i STEVENS, 2008.). *Curli* su tanke nitaste uvijene tvorevine na površini bakterije koje posreduju u vezanju bakterija na izvanstanični matriks i proteine seruma. Njihova uloga u patogenosti *E. coli* još nije razjašnjena, a prisutni su u većine patogenih i komenzalnih sojeva. (DHO-MOULIN i FAIRBROTHER, 1999.). Sustav za vezanje i transport željeza smatra se ključnim za virulenciju (DZIVA i STEVENS, 2008.). Taj sustav omogućuje preživljavanje bakterija u fiziološkim tekućinama domaćina gdje je koncentracija slobodnog željeza nedostatna za njihov opstanak i razmnožavanje. Definirani su brojni geni unutar sustava za iskorištavanje željeza među kojima je i *chuA* koji kodira protein za iskorištavanje i transport hema (LI i sur., 2005.). Kapsula određenih sojeva *E. coli* štiti ih od aktivacije sustava komplementa, a njezin K1 antigen je slabo imunogen što pridonosi obrani od imunološkog odgovora domaćina tijekom infekcije. *Tsh* je gen koji određuje svojstvo hemaglutinacije osjetljive na temperaturu (iznad 42 °C hemaglutinacija je inhibirana), a češće ga nalazimo u patogenih *E. coli* sojeva nego u komenzalnih (DHO-MOULIN i FAIRBROTHER, 1999.). Važan je u početnim stadijima infekcije i pri kolonizaciji zračnih vrećica (DOZOIS i sur., 2020.). Na površini bakterija nalazimo tvorbe kao što su kapsula, lipopolisaharidi i vanjski proteini, koji uz ColV plazmid doprinose otpornosti APEC sojeva na baktericidni učinak seruma. Svojstvo otpornosti na baktericidni učinak seruma često se javlja u patogenih sojeva te kod slučajeva kolispetikemije. U istraživanju Dho Moulin i Fairbrother (1999.), toksini nisu detektirani u većoj količini u slučajevima septikemije, iako se smatraju značajnima pri pojavi sindroma otečene glave uzrokovanog APEC sojevima. Nasuprot tome, novija istraživanja su pokazala visok udio toksina u sojevima izdvojenim iz kokoši oboljelih od koliseptikemije i salpingitis-peritonitis sindroma (LOZICA i sur., 2021.). Različite kombinacije čimbenika virulencije često se koriste u identifikaciji APEC sojeva. Ne postoji jedinstvena kombinacija gena virulencije za sve APEC sojeve (DZIVA i STEVENS, 2008.), a pojedini patogeni sojevi imaju iste kombinacije gena virulencije kao i komenzalni sojevi što ukazuje na to da geni virulencije nisu jedina odrednica patogenosti (KEMMET i sur., 2013.).

### **2.3. Bakteriocini**

Mnogi APEC sojevi imaju sposobnost sinteze bakteriocina- kolicina i mikrocina, s citotoksičnim učinkom prema srodnim vrstama (CAMERON i sur., 2019; KATHAYAT i sur., 2021.), odnosno prema drugim *E. coli* sojevima (NAKAZATO i sur., 2009.). Kako bi se zaštitile od letalnog učinka vlastitih bakteriocina bakterije sintetiziraju i specifične imuno-proteine. Pojedini *E. coli* sojevi sintetiziraju samo te proteine kako bi izbjegli citotoksičan učinak kompetitivnih sojeva (PAQUETTE i sur., 2018.). Svojestvo sinteze bakteriocina koristi se i u istraživanjima za proizvodnju probiotika kao metode borbe protiv patogenih sojeva, pa je tako zabilježen pozitivan učinak genetski modificirane *E. coli* s genom za sintezu kolicina za obranu domaćina od određenih APEC sojeva (KUZNETSOVA i sur., 2020.). Na temelju ovih saznanja možemo pretpostaviti da sposobnost sinteze kolicina i mikrocina ima ulogu u klonalnoj selekciji APEC sojeva.

### **2.4. Klonalnost sojeva na farmama**

Značajna karakteristika APEC sojeva je njihova velika heterogenost (PAUDEL i sur., 2016). Unatoč velikoj genetskoj raznolikosti sojeva pojedina istraživanja dokazuju kako brojni sojevi određenog geografskog područja pripadaju jednoj skupini ili manjem broju skupina (eng. *cluster*), a zajednička im je i jedinstvena kombinacija gena virulencije (RONCO i sur., 2017.) Dokazana je i klonalnost manjeg broja sojeva na razini jata, tj. objekta na istoj farmi (TRAMPEL i sur., 2007.). Iako je dokazana visoka prevalencija pojedinih APEC sojeva na farmama, još nije razjašnjena interakcija različitih APEC sojeva i mehanizam koji dovodi do prevladavanja jednog soja nad drugim, no postoje brojna istraživanja o međudjelovanju različitih vrsta bakterija.

### **2.5. Interakcija vrsta**

Različite vrste bakterija mogu utjecati jedna na drugu kada se nađu zajedno u okolišu, odnosno domaćinu. Tako su Keogh i sur. (2016.) dokazali da *Enterococcus faecalis* olakšava tvorbu biofilma i preživljavanje *E. coli* na način da prenosi L- ornitin, odnosno pomaže u prikupljanju željeza kada su zajedno uzgajani u uvjetima s manjkom željeza. Osim direktnog međudjelovanja bakterija, važan je i učinak na domaćina putem kojeg jedna vrsta može utjecati na umnažanje druge. Primjer je imunosupresivni učinak *Enterococcus faecalis* blokadom NF-

kb signalizacije pri infekciji mokraćnog mjehura miša uz prisutnost komenzalnog soja *E. coli* što pomaže umažanju *E. coli* (TIEN i sur., 2017.). U peradi s kolibacilozom se također često izdvajaju i *Enterococcus spp.* Walker i sur. su dokazali učinak *E. faecalis* na lakše umnažanje APEC sojeva u uvjetima siromašnim željezom odnosno na povećanje APEC virulencije pri simultanoj infekciji kokošnjih zametaka. *E. faecalis* je pozitivno utjecao i na rast APEC sojeva koji nisu sadržavali niti jedan od 5, za to istraživanje korištenih, gena virulencije, stoga bi simultano umnažanje moglo biti objašnjenje mnogim slučajevima kolibaciloze uzrokovane sojevima *E. coli* u kojih nisu dokazani poznati čimbenici virulencije (WALKER i sur., 2020.). Vidimo da postoje brojni mehanizmi kojima različite vrste bakterija utječu jedna na drugu pri infekciji domaćina stoga možemo pretpostaviti da postoje i mehanizmi međudjelovanja različitih sojeva *E. coli* koji bi mogli dovesti do prevladavanja nekih sojeva.

## 2.6. Metode detekcije i kvantifikacije

Metoda serotipizacije u svrhu detekcije patogenih sojeva *E. coli* danas se smatra nepouzdanom, stoga se sve više pažnje posvećuje drugim metodama među kojima je i detekcija čimbenika virulencije pomoću PCR-a. Iako se isti geni virulencije mogu naći u sojeva različite patogenosti, uočeno je da neki geni u određenim kombinacijama mogu upućivati na virulenciju soja, pa su tako razvijene metode detekcije i kvantifikacije APEC sojeva pomoću PCR-a u stvarnom vremenu (eng. Real-Time PCR ili quantitative PCR, qPCR) (SCHOUER i sur., 2012.; Ikuta i sur., 2014.). Često se koriste qPCR metode u svrhu detekcije i kvantifikacije *E. coli* u hrani i vodi, razlikovanja patotipova *E. coli* koji uzrokuju bolesti u ljudi te detekcije *E. coli* u domaćih životinja (VERSTRAETE, 2014.; MÜLLER i sur., 2006.; BARBAU-PIEDNOIR i sur., 2018.; WALKER i sur., 2017.; LOPES i sur., 2018.).

Na temelju gena virulencije, prema istraživanjima Clermonta i suradnika (CLERMONT i sur., 2000.; 2013.; 2015.; 2019.), napravljen je protokol za kvantifikaciju ciljanih sojeva u svrhu dokaza selekcije za potrebe ovog istraživanja.

Slijedeći korak u istraživanju virulencije APEC sojeva, mogla bi biti analiza metatranskriptoma. Metatranskriptom se temelji na očitavanju ukupnih mRNK kopija gena u trenutku uzorkovanja, što omogućuje praćenje ekspresije gena u određenim uvjetima. Subashchandrabose i sur. (2014.) koristili su ovu metodu za detekciju specifične ekspresije određenih gena uropatogene *E. coli* pri infekciji mokraćnog sustava u ljudi, te su pronašli nekoliko novih gena do čije ekspresije dolazi za vrijeme infekcije.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Sojevi *E. coli* korišteni u istraživanju

U istraživanju smo koristili čiste kulture sojeva *E. coli* iz zbirke Zavoda za bolesti peradi s klinikom Veterinarskog fakulteta. Sojevi su prethodno dobiveni izolacijom iz različitih organa lešina kokoši roditeljskih jata teške linije dostavljenih na patomorfološku pretragu, a do izvođenja pokusa čuvani su u Brain Heart Infusion (BHI) bujonu (Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo) s dodatkom 50% glicerola na temperaturi od -20°C. Koristili smo sojeve s oznakama 46, 333, 344, 347 (Tablica 1.). Sojevi su nasadeni na Brilliant Green agar (Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo) i Columbia agar (Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo) s dodatkom 5% ovčje krvi (Biognost, Hrvatska), a zatim inkubirani preko noći pri temperaturi od 37°C.

Tablica 1. Prikaz filogenetskih skupina i gena virulencije kod sojeva korištenih u istraživanju.

		Sojevi			
Oznaka		46	333	344	347
Filogenetska skupina		A	F	A	B2
Geni virulencije	Adhezini i invazini	2/9	6/9	5/9	6/9
	Zaštitni faktori	2/6	5/6	3/6	6/6
	Vežanje i transport željeza	1/10	9/10	6/10	9/10
	Toksini	1/5	4/5	1/5	4/5
Ukupno		6/30	24/30	15/30	25/30

### **3.2. *In vitro* uzgoj *E. coli* u BHI mediju**

Nakon inkubacije bakterija na krutim hranjivim podlogama, pripremili smo suspenzije bakterija za inokulaciju u BHI bujon. Za mjerenje gustoće suspenzija korišten je denzitometar (bioMérieux, Francuska). Suspenzije bakterija napravljene su u gustoći od 0,1 McF, te je po 0,5 ml suspenzije svakog soja zasebno (46, 344, 333, 347), te dvije kombinacije sojeva (46+333 i 344+347), inokulirano u 48 ml BHI bujona. Sve suspenzije su rađene u triplikatu. Potom je izmjerena gustoća i uzet je uzorak od 2 ml neposredno nakon inokulacije, te nakon 3, 6, 12 i 24 sati. Uzeti uzorci su centrifugirani 5 minuta na 8 000 okretaja u mikrocentrifugi Z 233 M-2 (Hermle, Njemačka), nakon čega je uklonjen supernatant, a peleta je zamrznuta na -20°C do izdvajanja DNK.

### **3.3. *In vivo* uzgoj *E. coli* u kokošjim zametcima**

Za provođenje pokusa korišteno je 35 komercijalnih kokošjih zametaka teške linije i 35 SPF (eng. specific pathogen-free) kokošjih zametaka lake linije dobi 9 dana. Jaja su prethodno lampirana kako bi potvrdili vitalnost zametaka. Za inokulaciju smo koristili sojeve 46, 333, 344, 347 te kombinacije 46+333 i 344+347. Svaka skupina sastojala se od pet zametka i svaki pokus je imao jednu skupinu kao negativnu kontrolu koja nije inokulirana. Napravljena je suspenzija pojedinih sojeva u fiziološkoj otopini u koncentraciji 5000 CFU/ml. U alantoisnu šupljinu svakog zametka inokulirano je 0,1 ml suspenzije. Nakon inokulacije, zametci su inkubirani pri 37°C tijekom 72 sata pri čemu je pri 3, 6, 24, 48 i 72 sata od inokulacije uzeto 100 µl alantoisne tekućine od 4 zametka iz svake skupine u svrhu kvantifikacije pojedinih sojeva primjenom qPCR reakcije. Uzorci su također centrifugirani 5 minuta na 8000 okretaja u mikrocentrifugi Z 233 M-2 (Hermle, Njemačka), supernatant je uklonjen, a peleta je zamrznuta na -20 °C do izdvajanja DNK. Prije svakog uzorkovanja provedeno je lampiranje s ciljem praćenja uginuća zametaka.

### **3.4. Izdvajanje DNK**

DNK iz peleta je izdvojena metodom kuhanja u 0,1 ml vode slobodne od nukleaza (Promega, SAD) tijekom 20 minuta na 98 °C. Uzorci su zatim centrifugirani 5 minuta na 1000 rpm u mikrocentrifugi Z 233 M-2 (Hermle, Njemačka), nakon čega je supernatant s DNK prebačen u nove tubice i spremljen na -20 °C do daljnje analize.

### 3.5. qPCR

qPCR rađen je u duplikatu za svaki uzorak, korištenjem specifičnih početnica (Tablica 2) za svaki soj, i GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, SAD) kita s BRYT Green interkalirajućom bojom za dokaz umnažanja specifičnih odsječaka, prema uputama proizvođača. Reakcija je izvedena u 8 µl smjese uz 2 µl DNK, u ukupnom volumenu od 10 µl. Kao negativna kontrola korištena je voda slobodna od nukleaza. qPCR reakcije izvedene su prema protokolu Clermont i sur. (2013.) za quadruplex: aktivacija na 94 °C 5 min, potom 40 ciklusa: taljenje na 94 °C 30 sek, vezanje na 55 °C 30 sek, elongacija na 60 °C 30 sek uz očitavanje fluorescencije za interkalirajuću boju u reakcijskoj smjesi.

Tablica 2. Sekvence početnica korištenih u qPCR reakciji

Početnica	Gen	Sekvenca	PCR produkt (pb)	Referenca
AceK.f	<i>arpA</i>	5'-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3'	400	Clermont i sur., 2013.
ArpA1.r		5'-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3'		Clermont i sur., 2004.
chuA.1b	<i>chuA</i>	5'-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3'	288	Clermont i sur., 2013.
chuA.2		5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'		Clermont i sur., 2000.

### 3.6. Statistička analiza

Normalnost raspodjele dobivenih rezultata testirana je Kolmogorov-Smirnov testom, a značajnost razlika među skupinama testirana je ANOVA LSD testom te Kruskal-Wallis testom primjenom računalnog programa Statistica 13.5.0.17. (TIBCO Software Inc., Tulsa, SAD).



## 4. REZULTATI

### 4.1. *In vitro* pokus

Rezultati pokazuju da su Ct vrijednosti bile niže kod soja 333 (filogrupa F) u odnosu na soj 46 (filogrupa A) prilikom samostalne inkubacije sojeva u BHI bujonu, osim u uzorcima od 6. sata (Slika 1), a naročito 12. i 24. sata, no bez statističke značajnosti. Prilikom zajedničke inkubacije navedenih sojeva gotovo da nema razlika među njima do kraja inkubacije.

Kod individualne inkubacije sojeva 344 i 347 utvrđene su neznatno niže Ct vrijednosti za soj 347 (filogrupa B2) u odnosu na soj 344 (filogrupa A) osim za 6. sat inkubacije (Slika 2). Prilikom zajedničke inkubacije sojeva 344 i 347, soj 344 pokazivao je tijekom čitavog pokusa neznatno niže Ct vrijednosti osim na početku inkubacije (0. sat).

### 4.2. *In vivo* pokus

U pokusu s komercijalnim zametcima Ct vrijednosti soja 333 u odnosu na soj 46 su pri individualnoj inokulaciji neznatno niže gotovo tijekom čitavog pokusa. No, prilikom zajedničke inokulacije u komercijalne zametke do 6. sata nema značajnih razlika, ali od 24. sata sojevi u kombiniranom uzorku se više ne umnažaju proporcionalno, u korist soja 333 (Slika 3), koji ima značajno niže Ct vrijednosti, tj. postiže značajno više koncentracije navedenog soja u odnosu na soj 46. Kod SPF zametaka Ct vrijednosti soja 46 u kombiniranom uzorku niže su u prvih 6 sati od inokulacije u usporedbi sa sojem 333. Nakon 24 sata vidljiv je obrat umnažanja, odnosno soj 333 se umnaža znatno brže od soja 46 (Slika 4), da bi razlika između njih bila statistički značajna 48 sati nakon inokulacije.

Pokus sa sojevima 344 i 347 na komercijalnim zametcima pokazuje brže umnažanje soja 344 (filogrupa A) u odnosu na soj 347 (filogrupa B2) u svim pojedinačnim i kombiniranim uzorcima, osim za 24. sat od inokulacije kada je umnažanje pojedinačnog soja 347 brže od pojedinačnog soja 344 i za 72. sat kada je prilikom zajedničke inokulacije brže umnažanje soja 347 (Slika 5). Na SPF zametcima brže se umnaža soj 347 kod pojedinačne inokulacije, a kod zajedničke se prvih 6 sati brže umnaža soj 344, a nakon 24 sata soj 347 (Slika 6).

Rezultati praćenja uginuća zametaka nakon inokulacije pojedinačnih ili kombinacije sojeva prikazani su tablicama 3-6. Kod inokulacije sojeva 46 i 333 na komercijalne zametke utvrđeno je manje uginuće zametaka kod soja 46 do 72 sata danog individualno u odnosu na soj 333 ili kombiniranu inokulaciju (Tablica 3). Prilikom inokulacije na SPF zametke do 48 sata nisu uočene razlike između individualne i kombinirane inokulacije (Tablica 4).

Kod inokulacije sojeva 344 i 347 nisu uočene razlike u mortalitetu između sojeva, ni kod inokulacije u komercijalne, niti u SPF zametke (Tablica 5 i 6).

Tablica 3. Prikaz uginuća komercijalnih zametaka, sojevi 46 i 333.

ZAMETAK	46			333			46 + 333			Negativna kontrola		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
2.	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
3.	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
4.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
5.	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-

Tablica 4. Prikaz uginuća SPF zametaka, sojevi 46 i 333.

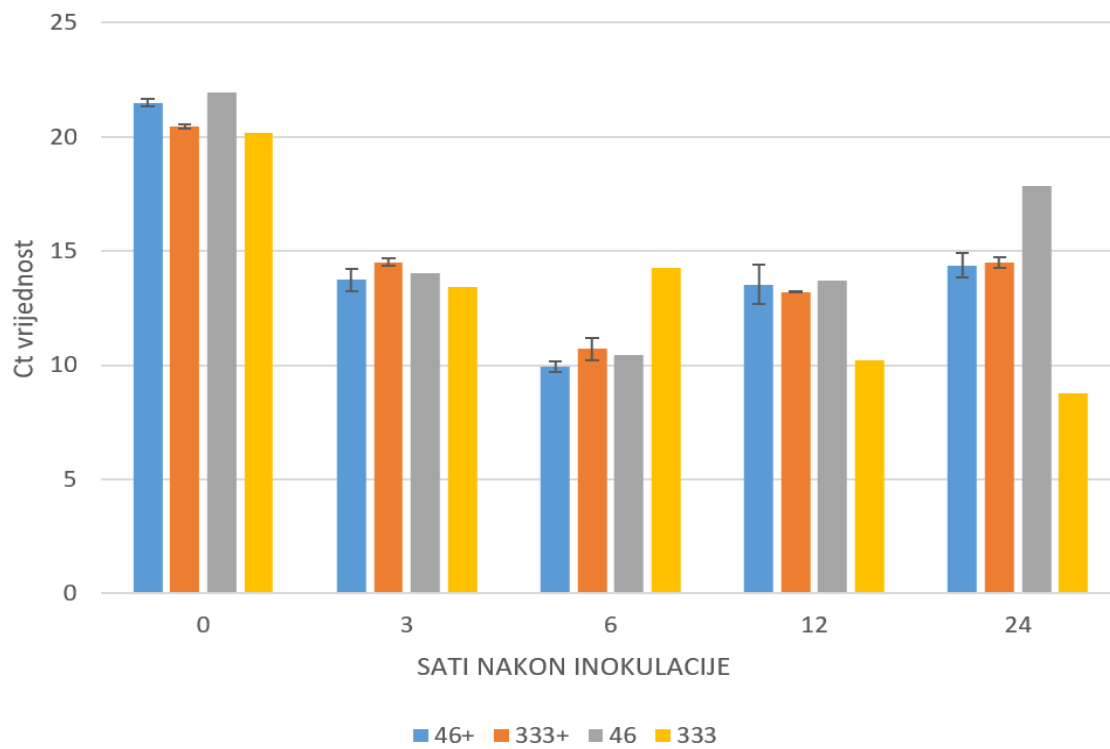
	46		333		46 + 333		negativna kontrola	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
1.	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	+	+	-	-	+	-	-	-
3.	-	-	-	-	-	-	+	+
4.	+	-	+	-	-	-	+	+
5.	-	-	+	-	+	+	+	+

Tablica 5. Prikaz uginuća komercijalnih zametaka, sojevi 344 i 347.

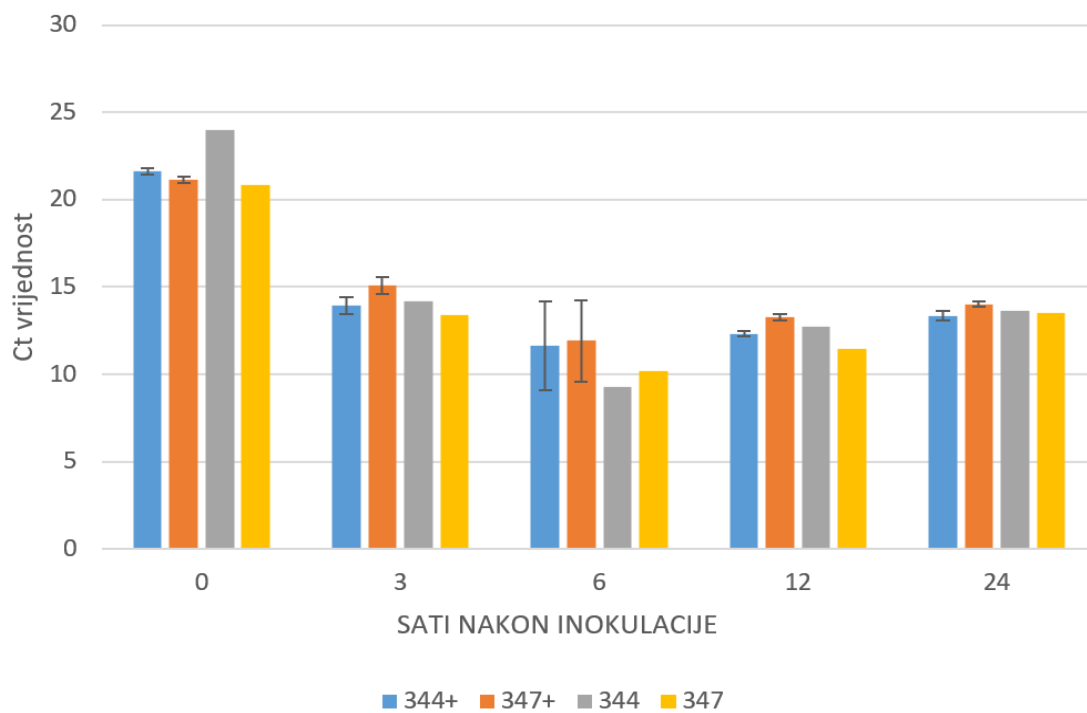
	344			347			344 + 347			negativna kontrola		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
3.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
4.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
5.	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-

Tablica 6. Prikaz uginuća SPF zametaka, sojevi 344 i 347.

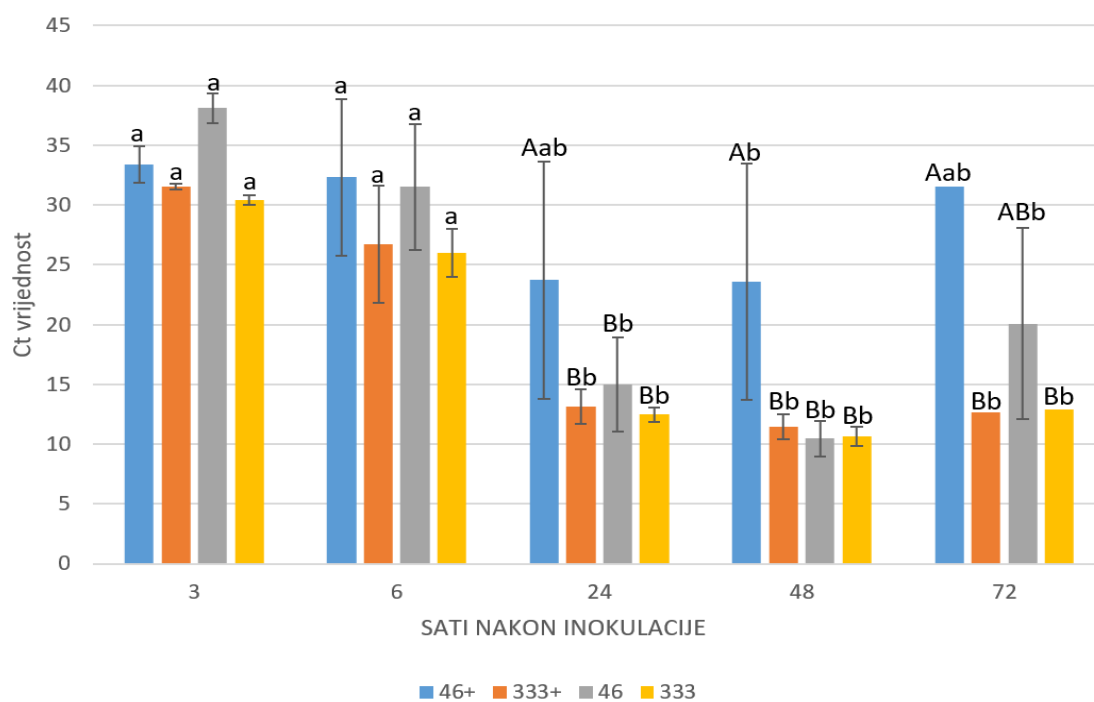
	344		347		344 + 347		negativna kontrola	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
1.	-	-	+	-	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	-	-	+	-	-	-	+	+
4.	+	-	-	-	+	+	+	+
5.	+	+	-	-	+	-	+	+



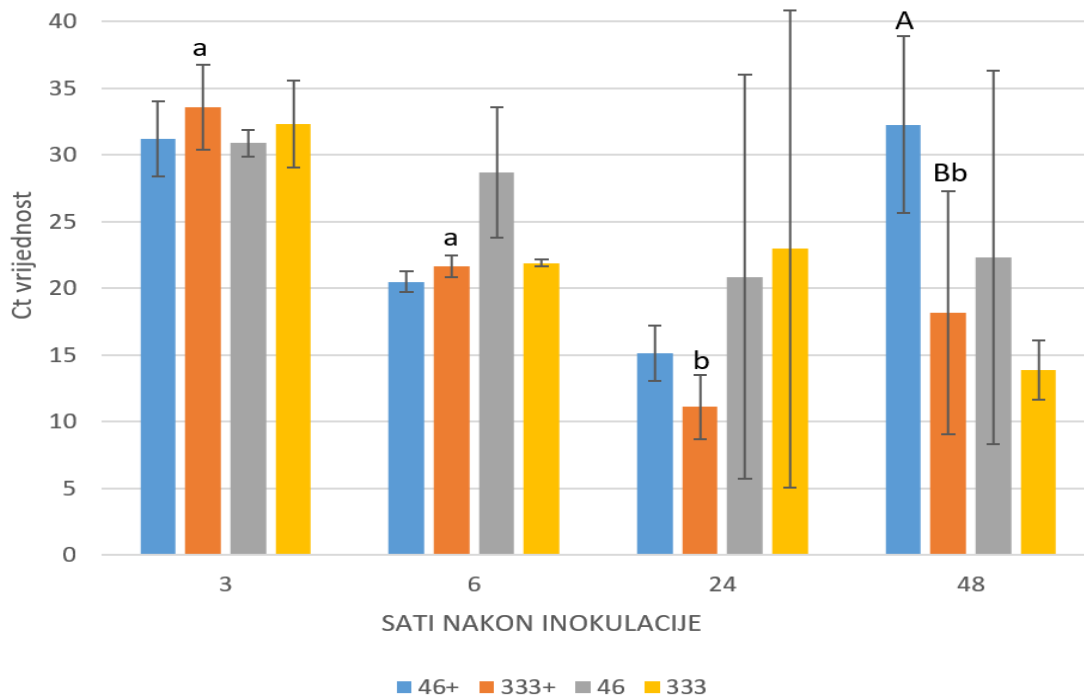
Slika 1. Ct vrijednosti nakon inokulacije sojeva 46 i 333 pojedinačno ili u kombinaciji (+) *in vitro*.



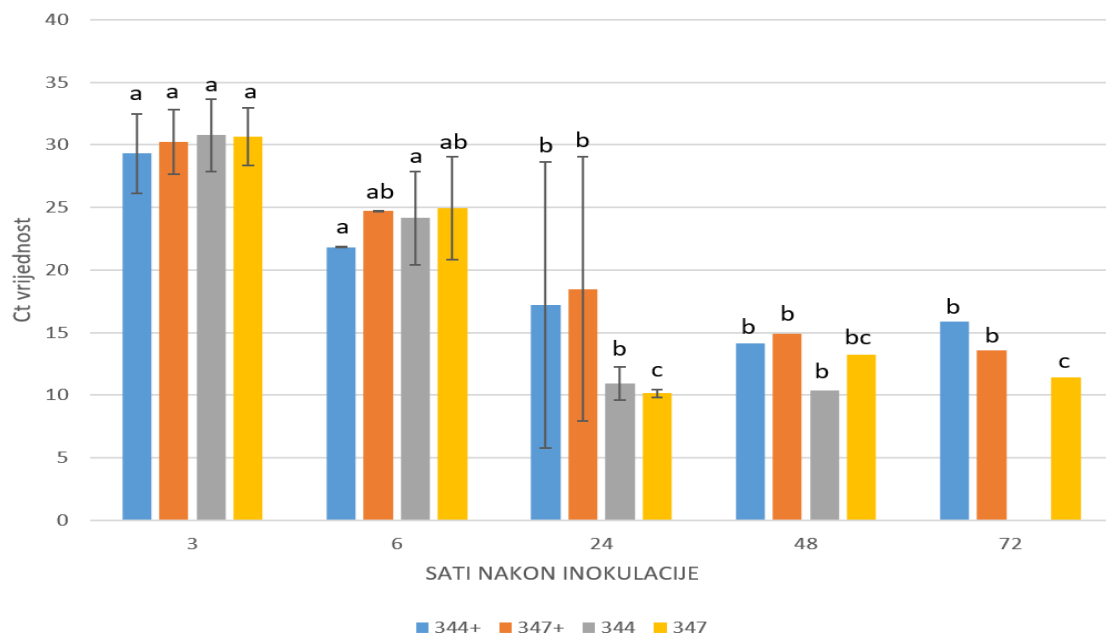
Slika 2. Ct vrijednosti nakon inokulacije sojeva 344 i 347 pojedinačno ili u kombinaciji (+) *in vitro*.



Slika 3. Ct vrijednosti nakon inokulacije sojeva 46 i 333 pojedinačno ili u kombinaciji (+) na komercijalnim zamcima. Statistički značajne razlike između skupina za pojedine sate označene su različitim velikim slovima abecede (A, B...), dok su statistički značajne razlike unutar skupine između pojedinih sati označene različitim malim slovima abecede (a,b...).

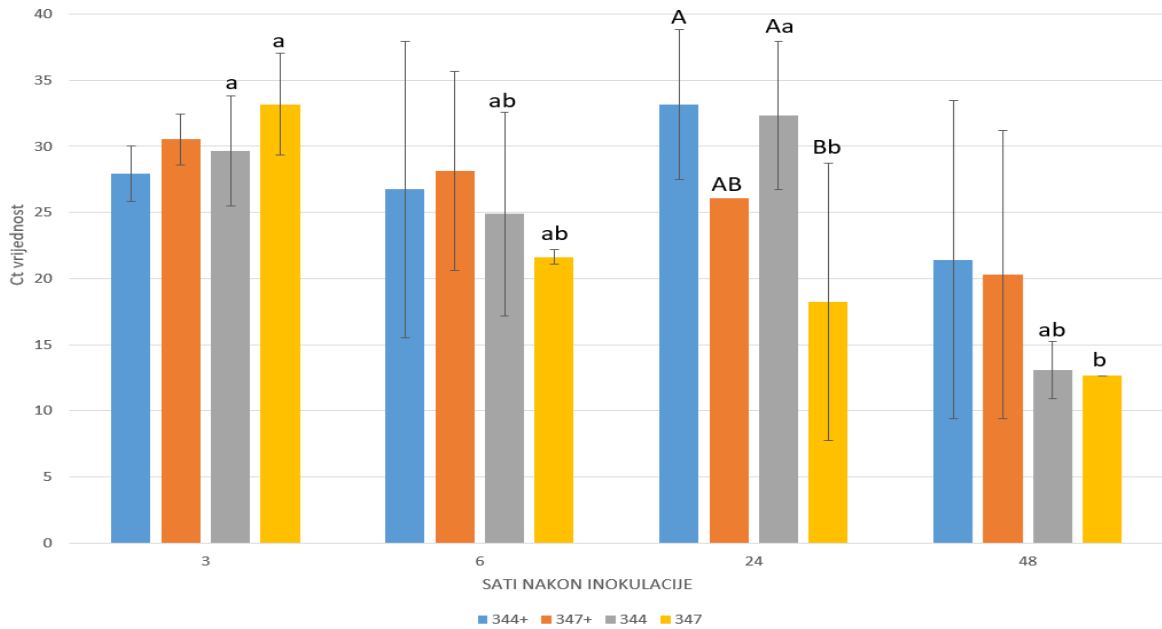


Slika 4. Ct vrijednosti nakon inokulacije sojeva 46 i 333 pojedinačno ili u kombinaciji na SPF zamecima. Statistički značajne razlike između skupina za pojedine sate označene su različitim velikim slovima abecede (A, B...), dok su statistički značajne razlike unutar skupine između pojedinih sati označene različitim malim slovima abecede (a,b...).



Slika 5. Ct vrijednosti nakon inokulacije sojeva 344 i 347 pojedinačno ili u kombinaciji na komercijalnim zamecima. Statistički značajne razlike unutar skupine između pojedinih sati označene su različitim malim slovima abecede (a,b...).





Slika 6. Ct vrijednosti nakon inokulacije sojeva 344 i 347 pojedinačno ili u kombinaciji na SPF zamecima. Statistički značajne razlike između skupina za pojedine sate označene su različitim velikim slovima abecede (A, B...), dok su statistički značajne razlike unutar skupine između pojedinih sati označene različitim malim slovima abecede (a,b...).

## 5. RASPRAVA

Praćenje kliničke slike i istraživanja na farmama ukazuje na postojanje određene klonalne selekcije APEC sojeva s obično jednim ili malim brojem dominantnih sojeva u objektu, farmi ili nekom području (EWERS i sur., 2004.; TRAMPEL i sur., 2007.; RONCO i sur., 2017.). Osnovni obrambeni mehanizmi pileta/kokoši učinkovitije štite organizam u slučaju infekcije sojevima koji posjeduju manji broj gena virulencije. S druge strane, bakterije neprestano razvijaju nove mehanizme kojima se uspješno pokušavaju izboriti s imunim sustavom makroorganizma. Neki APEC sojevi imaju učinkovitije mehanizme patogenosti od drugih, uz to i manja heterogenost gena može raditi značajnu razliku u virulenciji sojeva (Tablica 1). Skupine gena virulencije i rezistencije koji se smatraju specifičnim za APEC sojeve, nalaze se na plazmidima i drugim pokretnim genetičkim elementima, što olakšava horizontalno i vertikalno širenje unutar jata ili farme pa stoga predstavlja veliku opasnost zbog nastanka izrazito virulentnih sojeva (JOHNSON i sur., 2006.; DE OLIVEIRA i sur., 2015.; NOLAN i sur., 2020.). Zbog bliskog kontakta prilikom uzgoja i obrade mesnih prerađevina i jaja, povećava se zoonotski potencijal takvih sojeva prema humanoj populaciji (NOLAN i sur., 2020.). Kako se sojevi mogu u većoj ili manjoj mjeri izboriti s organizmom domaćina za dominaciju, isto se događa i sa sojevima međusobno. Posjedovanje bakteriocina može djelovati na druge sojeve bakterija i onemogućiti ih u brzom umnažanju, što izravno pridonosi klonalnoj selekciji (CAMERON i sur., 2019.).

Oba *in vitro* pokusa pokazuju da nema značajnih razlika u brzini umnažanja među sojevima, niti u krajnjoj koncentraciji prilikom simultane inokulacije u bujon. S druge strane vidimo statistički značajne razlike prilikom simultane inokulacije sojeva 46 i 333 *in vivo* na komercijalnim i SPF zametcima, te sličan obrazac kod simultane inokulacije na SPF zametke sojeva 344 i 347. Ove razlike su kod sojeva 46 i 333 naglašenije kod komercijalnih zametaka. Kako soj 46 posjeduje manji broj gena virulencije, svega 6 od 30, u odnosu na 24 kod soja 333, za očekivati je da će virulentnost soja 46 biti slabija. To se ogleda i u manjem mortalitetu zametaka koji je soj 46 uzrokovao na komercijalnim zametcima, 2 od 5 u odnosu na 4 od 5 kod 333 soja ili kombinacije. Na SPF zametcima je taj mortalitet bio veći i u roku 48 sati preživio je samo jedan zametak prilikom inokulacije soja 46. Prema Wooley i sur. (2000.) embrionalna smrtnost pri inokulaciji avirulentnih sojeva trebala bi biti <10 %, srednje virulentnih 10-29 % i virulentnih >29 %. Autori također navode da je za pokus embrionalne smrtnosti uslijed inokulacije sojeva *E. coli* potrebno minimalno 11 zametaka po svakom soju da bi dobili realnu sliku patogenosti sojeva (WOOLEY i sur., 2000.). S obzirom na ovu konstataciju, soj 46 bi

spadao u srednje virulentnu skupinu, dok bi ostali sojevi bili virulentni, uz potrebu da se pokus ponovi na većem broju zametaka. Rezultati ukazuju na postojanje određene tendencije da se sojevi 46 i 344 umnažaju nešto sporije i prilikom samostalne inokulacije, što je kod SPF zametaka i sojeva 344 i 347 čak i statistički značajno. Navedeni rezultati također idu u prilog konstataciji da slabije virulentni sojevi zaostaju i bivaju potisnuti, što virulentniji sojevi koriste i dominiraju u organizmu.

Rezultati inokulacije zametaka ukazuju i na vjerojatnost postojanja određenog utjecaja obrambenog mehanizma kod zametaka koji sudjeluje u obrani od sojeva, pogotovo slabo virulentnih, te onemogućava naglo umnažanje. To je pogotovo naglašeno kod komercijalnih zametaka i slabo virulentnog soja 46, što je i za očekivati budući navedeni zametci vjerojatno imaju i dio vertikalno prenesene materalne imunosti koja ima ovakvu ulogu, dok je kod SPF zametka ta obrana vjerojatno slabija, što se ogleda i u većem mortalitetu zametaka u odnosu na komercijalne. Stoga značajnu razliku prilikom kvantifikacije soja 46 i 333 u zajedničkoj inokulaciji na zametke, i kod komercijalnih i kod SPF zametaka, potencijalno možemo temeljiti na sinergističkom učinku obrane domaćina i samog konkurentnog soja 333 koji posjeduje značajno veći broj gena virulencije kao i bakteriocina kojima moguće može usporiti umnažanje slabije virulentnog soja. Upravo navedeni učinak dovodi do klonalne selekcije i dominacije jednog ili manjeg broja virulentnih sojeva, što je gotovo redovita situacija na komercijalnim farmama konzumnih nesilica i roditeljskih jata (GOTTSTEIN i sur., neobjavljeno). Kod inokulacije u BHI bujon koji je obogaćen hranjivim tvarima, zbog nepostojanja deficita hranjivih tvari i obrambenih mehanizama domaćina kao što je to u *in vivo* uvjetima, klonalna selekcija vjerojatno nije naglašena. Dodatna istraživanja na većem broju zametaka uz praćenje ekspresije zaštitnih gena domaćina i gena virulencije inokuliranih sojeva moguće će dati bolji uvid u mehanizme klonalne selekcije *in vivo*.

## 6. ZAKLJUČAK

- Sojevi korišteni u ovom istraživanju ne pokazuju značajne razlike u *in vitro* pokusu.
- Postoji značajna razlika u umnažanju i potiskivanju slabije virulentnog soja 46 *in vivo* kada se dva soja *E. coli* nađu zajedno u zametku
- Moguće postoji sinergija između zaštitnih mehanizama zametka i gena virulencije patogenijeg soja u potiskivanju slabije virulentnog soja

## 7. LITERATURA

1. BARBAU-PIEDNOIR, E., S. DENAYER, N. BOTTELDORN, K. DIERICK, S. C. J. DE KEERSMAECKER, N. H. ROOSENS (2018): Detection and discrimination of five *E. coli* pathotypes using a combinatory SYBR Green qPCR screening system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3267–3285.
2. BIĐIN, Z. (2008): Bolesti peradi, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, pp. 238-246.
3. CAMERON, A., R. ZAHEER, E. H. ADATOR, R. BARBIERI, T. REUTER, T. A. MCALLISTER (2019): Bacteriocin occurrence and activity in *Escherichia coli* isolated from bovines and wastewater. *Toxins.* 11, 475-491.
4. CLERMONT, O., S. BONACORSI, E. BINGEN (2000): Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4555–4558.
5. CLERMONT, O., S. BONACORSI, E. BINGEN (2004): Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1770-1772.
6. 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.
7. CLERMONT O., D. GORDON, E. DENAMUR (2015): Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology.* 161, 980-988.
8. CLERMONT, O., O. V. A. DIXIT, B. VANGCHHIA, B. CONDAMINE, S. DION, A. BRIDIER-NAHMIA, E. DENMAUR, D. GORDON (2019): Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ. Microbiol.* 21, 3107-3117.
9. DE OLIVEIRA, A. L., D. A. ROCHA, F. FINKLER, L. B. DE MORAES, N. L. BARBIERI, D. B. PAVANELO, C. WINKLER, T. T. GRASSOTTI, K. C. T. DE BRITO, B. G. DE BRITO, F. HORN (2015): Prevalence of ColV plasmid-linked genes and in vivo pathogenicity of avian strains of *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog. Dis.* 12, 679-685.
10. DHO- MOULIN M., FAIRBROTHER J. M. (1999): Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30, 299-316.

11. DOZOIS, C.M., M. DHO-MOULIN, A. BRÉE, J. M. FAIRBROTHER, C. DESAUTELS, R. CURTIS 3rd (2000.): Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect. Immun.* 68(7):4145-54.
12. DZIVA, F., M. P. STEVENS (2008.): Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol.* 37(4), 355-366.
13. EWERS, C., T. JANßEN, S. KIEßLING, H.-C. PHILIPP, L. H. WIELER (2004): Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet. Microbiol.* 104, 91-101.
14. GUABIRABA R., C. SCHOULER (2015): Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiol. Lett.* 362(15), 1-8.
15. IKUTA N., F. DE OLIVEIRA SOLLA SOBRAL, F. K. M. LEHMANN, P. VINICIUS DA SILVEIRA, S. DE CARLI, Y. S. CASANOVA, Á. J. CELMER, A. S. KAZANTZI FONSECA, V. R. LUNGE (2014): Taqman real-time PCR assays for rapid detection of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Avian Dis.* 58(4), 628-631.
16. JOHNSON, T. J., K. E. SIEK, S. J. JOHNSON, L. K. NOLAN (2006): DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* 188, 745-758.
17. KATHAYAT, D., D. LOKESH, S. RANJIT, G. RAJASHEKARA (2021): Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): an overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies. *Pathogens*..10(4), 467-498.
18. KEMMET, K., T. HUMPHREY, S. RUSHTON, A. CLOSE, P. WIGLEY, N. J. WILLIAMS (2013): A Longitudinal study Simultaneously Exploring the Carriage of APEC Virulence Associated Genes and the Molecular Epidemiology of Faecal and Systemic *E. coli* in Commercial Broiler Chickens. *PLoS ONE* 8(6), e67749.
19. KEOGH, D., W. H. TAY, Y. Y. HO, J. L. DALE, S. CHEN, S. UMASHANKAR, R. B. H. WILLIAMS, S. L. CHEN, G. M. DUNNY, K. A. KLINE (2016): Enterococcal metabolite cues facilitate interspecies niche modulation and polymicrobial infection. *Cell Host Microbe*.20(4), 493-503.
20. KUNERT FILHO, H. C., K. C. T. BRITO, L. S. CAVALLI, B. G. BRITO (2015): Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) - an update on the control, In: *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational*

- Programs. (Méndez-Vilas, A., Ed.), 5th ed., Formatex Research Center, Badajoz, Spain, pp. 598-618.
21. KUZNETSOVA, M. V., I. L. MASLENNIKOVA, J. S. GIZATULLINA, D. ŽGUR BERTOK, M. STARČIČ ERJAVEC (2020): A probiotic based on the *Escherichia coli* ŽP strain. I. Efficiency assessment on the conjugative transfer of the colicin E7 activity gene into avian pathogenic *E. coli* strains in vitro and in vivo. *Agric. Biol.* 5(2), 364-377.
  22. LANDMAN, W. J. M., J. H. H. VAN ECK (2015): The incidence and economic impact of the *Escherichia coli* peritonitis syndrome in Dutch poultry farming. *Avian Pathol.* 44, 370-378.
  23. LANDMAN, W. J. M., J. H. H. VAN ECK (2017): The efficacy of inactivated *Escherichia coli* autogenous vaccines against the *E. coli* peritonitis syndrome in layers. *Avian Pathol.* 46(6), 658-665.
  24. LI, G., C. LATURNUS, C. EWERS, L. H. WIELER (2005): Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* 73(5), 2818-2827.
  25. LOPES, A. T. S. , G. R. ALBUQUERQUE, B. M. MACIEL (2018): Multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous quantification of *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* in different food matrices: Advantages and disadvantages. *Biomed Res. Int.* 2018, e6104015.
  26. LOZICA, L., J. REPAR, Ž. GOTTSTEIN (2021): Longitudinal study on the effect of autogenous vaccine application on the sequence type and virulence profiles of *Escherichia coli* in broiler breeder flocks. *Vet. Microbiol. In press.*
  27. MÜLLER, D., P. HAGEDORN, S. BRAST, G. HEUSIPP, M. BIELASZEWSKA, A. W. FRIEDRICH, H. KARCH, M. A. SCHMIDT (2006): Rapid identification and differentiation of clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), atypical EPEC, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a one-step multiplex PCR method. *J Clin. Microbiol.* 44(7), 2626-2629.
  28. NAKAZATO, G., T. A. CAMPOS, E. G. STEHLING, M. BROCCHI, W. D. SILVEIRA (2009): Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesq. Vet. Bras.* 29(7), 479-486.
  29. NOLAN, L. K., J.-P. VAILLANCOURT, N. L. BARBIERI, C. M. LOGUE (2020): Colibacillosis. In: *Diseases of Poultry* 14th ed. (D.E. Swayne, Ed.), Wiley-Blackwell, Hoboken, pp. 770-860.

30. PAQUETTE, S. J., R. ZAHEER, K. STANFORD, J. THOMAS, T. REUTER (2018): Competition among *Escherichia coli* strains for space and resources. *Vet. Sci.* 5(4), 93.
31. PAUDEL S., B. STESSL, C. HESS, A. ZLOCH, M. HESS (2016): High genetic diversity among extraintestinal *Escherichia coli* isolates in pullets and layers revealed by a longitudinal study. *BMC Vet. Res.* 12(1), 221-233.
32. PIRES-DOS-SANTOS, T., M. BISGAARD, H. CHRISTENSEN (2012): Genetic diversity and virulence profiles of *Escherichia coli* causing salpingitis and peritonitis in broiler breeders. *Vet. Microbiol.* 162, 873-880.
33. RONCO, T., M. STEGGER, R. H. OLSEN, C. SEKSE, A. B. NORDSTOGA, T. POHJANVIRTA, B. LILJE, U. LYHS, P. S. ANDERSEN, K. PEDERSEN (2017): Spread of avian pathogenic *Escherichia coli* ST117 O78:H4 in Nordic broiler production. *BMC Genomics.* 18(13), 1-8.
34. SCHOULER, C., B. SCHAEFFER, N. BRÉE, A. MORA, G. DAHBL, F. BLET, 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(5), 1673-1678.
35. SINGER, R. S. (2015): Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps, *Front. Microbiol.* 6, 28-36.
36. SUBASHCHANDRABOSE, S., T. H. HAZEN, A. R. BRUMBAUGH, S. D. HIMPSL, S. N. SMITH, R.D. ERNST, D. A. RASKO, H. L. T. MOBLEY (2014): Host-specific induction of *Escherichia coli* fitness genes during human urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111(51), 18327-18332.
37. TIEN, B. Y. Q., H. M. S. GOH, K. K. L. CHONG, S. BHADURI-TAGORE, S. HOLEC, R. DRESS, F. GINHOUX, M. A. INGERSOLL, R. B. H. WILLIAMS, K. A. KLINE (2017): *Enterococcus faecalis* promotes innate immune suppression and polymicrobial catheter-associated urinary tract infection. *Infect. Immun.* 85(12), e00378-17.
38. TRAMPEL, D. W., Y. WANNEMUEHLER, L. NOLAN (2007): Characterization of *Escherichia coli* isolates from peritonitis lesions in commercial laying hens, *Avian Dis.* 51(4), 840-844.
39. VERSTRAETE, K., E. VAN COILLIE, H. WERBROUCK, S. VAN WEYENBERG, L. HERMAN, J. DEL-FAVERO, P. DE RIJK, L. DE ZUTTER, M. A. JORIS, M. HEYNDRIKX, K. DE REU (2014): A qPCR assay to detect and quantify Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in cattle and on farms: a potential predictive tool for STEC culture-positive farms. *Toxins (Basel).* 6(4), 1201-1221.



40. WALKER, D. I, J. MCQUILLAN, M. TAIWO, R. PARKS, C. A. STENTON, H. MORGAN, M. C. MOWLEM, D. N. LEES (2017): A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters, *Water Res.* 126, 101-110.
41. WALKER, G. K., M. M. SUYEMOTO, S. GALL, L. CHEN, S. THAKUR, L. B. BORST (2020): The role of *Enterococcus faecalis* during co-infection with avian pathogenic *Escherichia coli* in avian colibacillosis. *Avian Pathol.* 49(6), 589-599.
42. WOOLEY, R. E., P. S. GIBBS, T. P. BROWN, J. J. MAURER (2000): Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* isolates, *Avian Dis.* 44, 318-324.

## 8. SAŽETAK

### Kvantifikacija sojeva bakterije *Escherichia coli* uzgojenih simultano *in vitro* ili *in vivo* postupkom qPCR-a s ciljem dokaza klonalne selekcije

Marija Fajdetić

Kolibacilozu u uzgojima peradi na manjem geografskom području ili na razini jata najčešće uzrokuje jedan ili nekoliko sojeva bakterije *Escherichia coli* koji pokazuju karakteristike klonalnosti. Cilj istraživanja bio je utvrditi da li se pojedini soj bakterije *E. coli* bolje i brže umnaža u *in vivo* i *in vitro* uvjetima prilikom simultanog umnažanja s drugim sojem zbog posjedovanja određenih gena virulencije, te da li potiskuje drugi soj. Za umnažanje sojeva koristili smo Brain Heart Infusion bujon, te komercijalne i SPF kokošje zametke, nakon čega su pojedini sojevi kvantificirani qPCR-om. Koristili smo četiri različita soja *E. coli*. *In vitro* pokus rađen je s uzorcima u triplikatu za svaki soj i kombinaciju, a u *in vivo* pokusu za svaki soj i kombinaciju korišteno je po pet komercijalnih i po pet SPF kokošnjih zametaka. Praćeno je i ugibanje zametaka. *In vitro* pokus pokazao je da nema značajne razlike u simultanom umnažanju dvaju različitih sojeva u bujonu. S druge strane, prilikom simultanog umnažanja dvaju sojeva u kokošnjim zametcima, soj koji je imao više gena virulencije se brže i bolje umnažao, te moguće potisnuo umnažanje drugog soja, što potvrđuje našu hipotezu.

Temeljem dobivenih rezultata, moguće je da na sporije individualno umnažanje slabije patogenih sojeva u zametcima, pogotovo komercijalnim, potencijalno sinergistički djeluje i imunost domaćina, posebice vertikalno prenesena materalna imunost, što treba naknadno utvrditi.

Ključne riječi: *Escherichia coli*, APEC, klonalnost, geni virulencije, qPCR

## 9. SUMMARY

### **Quantification of *Escherichia coli* strains cultivated simultaneously *in vitro* or *in vivo* using qPCR method with aim to prove the clonal selection**

Marija Fajdetić

Colibacillosis in poultry production, in a smaller geographical area or at the flock level, is most often caused by one or few strains of *Escherichia coli* that show clonality. Our goal was to determine whether a single strain of *E. coli* multiplies better and faster in *in vivo* and *in vitro* conditions after simultaneous inoculation with another strain due to the possession of certain virulence genes, and whether it suppresses another strain. Strains were inoculated in the Brain Heart Infusion broth, as well as in commercial and SPF chicken embryos. Afterwards, multiplication was quantified by qPCR. We used four different strains of *E. coli*. An *in vitro* experiment was performed in triplicate samples for each strain and combination of strains. Five commercial and five SPF chicken embryos per strain and combination were used for the *in vivo* experiment. Embryonic lethality was also monitored. An *in vitro* experiment showed no significant difference in the simultaneous multiplication of two different strains when propagated in the broth. On the other hand, during the simultaneous multiplication of two strains in the chicken embryos, the strain that had more virulence genes multiplied faster and better than the other strain, and possibly suppressed its multiplication, which confirms our hypothesis.

Based on the results, we assume that slower individual multiplication of the less pathogenic strains in the embryos, especially in commercial ones, is probably synergistically influenced by immune mechanisms, especially vertically transmitted maternal immunity, what will be further investigated.

Key words: *Escherichia coli*, APEC, clonality, virulence genes, qPCR

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 31. 10. 1992. u Zagrebu gdje sam završila XV. gimnaziju i srednju glazbenu školu Pavla Markovca, instrument harfa. Veterinarski fakultet u Zagrebu upisala sam 2013. godine. Stručnu praksu odradila sam u veterinarskoj ambulanti Klinča sela (Veterinarska stanica Jastrebarsko) pod vodstvom Želimira Mitrovskog, dr. med. vet.