

UNIwersytet PRZYRODniczy w LUBLINIE

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Dyscyplina naukowa: weterynaria

dr n. farm. Tomasz Nowak

*rozprawa doktorska*

**Identyfikacja i charakterystyka antygenowa oraz profile  
lekowrażliwości i wirulencji szczepów *Erysipelothrix*  
*rhusiopathiae* izolowanych od drobiu wodnego w Polsce**

**Identification, antigenic characterization and susceptibility and  
virulence profiles of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated  
from water poultry in Poland**

Rozprawa doktorska wykonana  
w Katedrze Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków  
na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Promotor: dr hab. Marta Dec, prof. uczelni

Lublin, 2023

***Składam serdeczne podziękowania:***

*dr hab. Marcie Dec, prof. uczelni  
za życzliwą promotorską opiekę i wszechstronną pomoc na  
każdym etapie realizacji tej pracy*

*dr Piotrowi Kwiecińskiemu  
za życzliwość i możliwość realizacji badań naukowych  
w Vet-Lab Brudzew*

*dr Karolinie Wódz  
za pomoc, cenne uwagi i życzliwość*

*dr Yoshihiro Shimoji  
z Narodowego Instytutu Zdrowia Zwierząt w Tsukuba, Japonia,  
za udostępnienie DNA wzorcowych szczepów *Erysipelothrix* spp.*

*Pracę tę dedykuję Żonie oraz Paulince i Szymonkowi*

### Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem  
i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data .....

Podpis promotora .....

### Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami,
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego,
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data .....

Podpis autora .....

## SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów.....	6
Streszczenie pracy w języku polskim.....	8
Summary.....	12
<b>1. WSTĘP.....</b>	<b>16</b>
1.1. Hodowla drobiu wodnego w Polsce.....	16
1.2. Charakterystyka bakterii <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> .....	18
1.2.1. Rys historyczny, taksonomia.....	18
1.2.2. Morfologia, hodowla, właściwości biochemiczne, siedliska.....	19
1.2.3. Serotypy.....	21
1.2.4. Czynniki wirulencji.....	22
1.2.5. Immunogenność bakterii <i>E. rhusiopathiae</i> .....	28
1.3. Różycza u drobiu.....	29
1.3.1. Gospodarze, rys historyczny.....	29
1.3.2. Czynniki usposabiające.....	30
1.3.3. Drogi zakażenia.....	30
1.3.4. Objawy.....	31
1.3.5. Zmiany sekcyjne.....	32
1.3.6. Zmiany histopatologiczne.....	32
1.3.7. Diagnostyka.....	33
1.3.8. Leczenie.....	34
1.3.9. Prewencja.....	35
1.4. Różycza jako zoonoza.....	37
<b>2. CEL BADAŃ.....</b>	<b>40</b>
<b>3. MATERIAŁ I METODY.....</b>	<b>42</b>
3.1. Materiał badawczy.....	42
3.2. Inne materiały wykorzystywane w badaniach.....	43
3.3. Określenie rozkładu notowanych przypadków różyczy w grupach.....	48
3.4. Badania sekcyjne.....	48
3.5. Izolacja szczepów <i>E. rhusiopathiae</i> .....	49
3.6. Identyfikacja szczepów <i>E. rhusiopathiae</i> .....	50
3.6.1. Real-time PCR.....	50
3.6.2. Spektrometria mas typu MALDI-TOF.....	52
3.6.3. Identyfikacja przy użyciu kart VITEK® 2 GP.....	52

3.7. Serotypowanie izolatów <i>E. rhusiopathiae</i> .....	56
3.8. Określanie lekowrażliwości szczepów <i>E. rhusiopathiae</i> .....	58
3.9. Detekcja genów oporności.....	62
3.9.1. Analiza sekwencji genu <i>gyrA</i> .....	65
3.10. Detekcja genów wirulencji.....	65
3.11. Analiza sekwencji genu <i>spaA</i> .....	67
3.11.1. Analiza porównawcza sekwencji białkowych SpaA.....	69
3.12. Genotypowanie izolatów <i>E. rhusiopathiae</i> za pomocą rep-PCR i RAPD.....	71
<b>4. WYNIKI</b> .....	74
4.1. Rozkład notowanych przypadków różycy.....	74
4.2. Zmiany sekcyjne w przebiegu różycy u gęsi i kaczek.....	77
4.3. Izolacja i identyfikacja szczepów <i>E. rhusiopathiae</i> .....	86
4.3.1. Identyfikacja <i>E. rhusiopathiae</i> za pomocą testów real-time PCR.....	86
4.3.2. Identyfikacja <i>E. rhusiopathiae</i> za pomocą spektrometrii mas MALDI-TOF.....	89
4.3.3. Identyfikacja <i>E. rhusiopathiae</i> przy użyciu kart VITEK® 2 GP.....	90
4.3.4. Porównanie zastosowanych metod identyfikacji bakterii <i>E. rhusiopathiae</i> .....	96
4.4. Serotypy izolatów <i>E. rhusiopathiae</i> .....	97
4.5. Antybiotykooporność izolatów <i>E. rhusiopathiae</i> .....	99
4.6. Geny oporności u izolatów <i>E. rhusiopathiae</i> .....	103
4.7. Genotypowe profile wirulencji izolatów <i>E. rhusiopathiae</i> .....	105
4.8. Wielkość i sekwencja genu <i>spaA</i> .....	109
4.8.1. Sekwencje białka SpaA.....	111
4.9. Zróznicowanie genetyczne izolatów <i>E. rhusiopathiae</i> .....	119
4.9.1. Rep-PCR.....	119
4.9.2. RAPD.....	120
<b>5. DYSKUSJA</b> .....	128
<b>6. WNIOSKI</b> .....	148
<b>7. PIŚMIENNICTWO</b> .....	150
Życiorys naukowy.....	164

## Wykaz skrótów

aa - aminokwasy lub aminokwas

Acc. No. (ang. *accession number*) - numer dostępu

Ala - alanina

ang. - angielski

API® (analytical profile index) - test biochemiczny

Asn - asparagina

ATTC (ang. *American Type Culture Collection*) - Amerykańska Kolekcja Czystych Kultur

BHI (ang. *Brain heart infusion broth*) - bulion mózgowo-sercowy

CA-SFM (fr. *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*) - Komitet ds. Oznaczania Wrażliwości Drobnoustrojów Francuskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego

CbpA i CbpB (ang. *choline-binding protein A/B*) - białko wiążące choline A/B

CLSI (ang. *Clinical & Laboratory Standards Institute*) - Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych

CNA (ang. colistin and nalidixic acid) - kolistyna i kwas nalidyksynowy

CPS (ang. *capsular polysaccharide*) – otoczka polisacharydowa

dATP (ang. *deoxyadenosine triphosphate*) - trifosforan deoksyadenozyny

dCTP (ang. *deoxycytidine triphosphate*) - trifosforan deoksycytydyny

dGTP (ang. *deoxyguanosine triphosphate*) - trifosforan deoksyguanozyny

dNTP (ang. *deoxynucleotide triphosphate*) - deoksynukleotyd lub nukleotyd

dTTP (ang. *deoxythymidine triphosphate*) - trifosforan deoksytymidyny

EUCAST - (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) - Europejski Komitet ds. Testowania Wrażliwości Drobnoustrojów

EUROSTAT (ang. *European Statistical Office*) - Europejski Urząd Statystyczny

ERIC (ang. *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) - międzygenowe konsensusowe sekwencje powtórzone enterobakterii

FAM (ang. *carboxyfluorescein*) - karboksylfluoresceina

FbpA (ang. *fibronectin-binding protein*) - białko wiążące fibronektynę

Gln - glutamina

Glu - kwas glutaminowy

Gly – glicyna

GP – Gram-positive

GTP - guanozyno-5'-trifosforan

GUS - Główny Urząd Statystyczny

HEX (ang. *Hexachlorofluorescein*) - sześciochlorofluoresceina

I (ang. *intermediate*) - średniowrażliwy

IC (ang. *internal control*) - kontrola wewnętrzna

Ile - izoleucyna

jtk - jednostka tworząca kolonię

Leu - leucyna

Lys - lizyna

MALDI-TOF (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight* - desorpcja/ionizacja laserem wspomagana matrycą z pomiarem czasu przelotu jonów

m.c. - masa ciała

MDR (ang. *multidrug resistant*) - wielolekooporny

Met - metionina

MIC (ang. *minimal inhibitory concentration* - minimalne stężenie hamujące

MSP (ang. *Main Spectrum Profile*) - główny profil spektrum

*nanH.1, nanH2* (ang. *neuraminidase*) - geny neuraminidazy

NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*) - Narodowe Centrum Informacji Biologicznej

NCTC (ang. *National Collection of Type Culture*) - Narodowa Kolekcja Czystych Kultur

PCR (ang. *polymerase chain reaction*) - reakcja łańcuchowa polimerazy

PFGE (ang. *pulsed-field gel electrophoresis*) - elektroforeza żelowa w polu pulsacyjnym

pz - pary zasad

Pro - prolina

QRDR (ang. *quinolone resistance-determining region*) - region warunkujący oporność na chinolony

R (ang. *resistant*) - oporny

RAPD (ang. *random amplified of polymorphic DNA*) - losowa amplifikacja polimorficznego DNA

real-time PCR – PCR w czasie rzeczywistym

rep-PCR (ang. *repetitive extragenic palindromic-pcr*) - pozagenowe powtórzone elementy palindromowe-PCR

Rspa, Rspb (ang. *rhusiopathiae surface protein A/B*) - powierzchniowe białko włoskowca A/B

S (ang. *susceptible*) - wrażliwy

Ser - seryna

SpaA, SpaB, SpaC (ang. *surface protective antigen A/B/C*) - antygen immunoprotekcyjny A/B/C

Thr – treonina

UPGMA (ang. *unweighted pair group method with arithmetic mean*) - metoda średnich połączeń

UV/VIS (ang. *UV-visible spectrometer*) - spektrometr UV-VIS

Val - walina

wsp. – współautorzy

## Streszczenie pracy w języku polskim

**Wstęp.** Zakażenia szczepami *Erysipelothrix rhusiopathiae* od wielu lat stanowią problem w hodowli drobiu wodnego w Polsce. Choroba wywoływana przez te bakterie, zwana różycą, występuje głównie w stadach gęsi, rzadziej u kaczek. Infekcja ma postać posocznicy ze zmianami naczyniowymi i narządowymi (Bobrek i wsp. 2016). Schorzenie jest przyczyną znacznych strat ekonomicznych wynikających z upadków i leczenia ptaków, a w przypadku stad reprodukcyjnych także ze spadku nieśności. Z obserwacji własnych wynika, że różycą najczęściej dotyka ptaki odchowane, a patogen jest trudny do wyeliminowania w stadzie. Antybiotykoterapia zazwyczaj przynosi oczekiwane efekty, jednakże po zaprzestaniu podawania leku często odnotowuje się nawroty choroby. Aktualnie w Polsce nie jest dopuszczona do obrotu żadna komercyjna szczepionka przeciwko różycy dla drobiu. Stąd, niektórzy lekarze weterynarii podejmują próby ochrony stada przez zastosowanie szczepionek zarejestrowanych dla trzody chlewnej. Z doniesień z terenu wynika jednak, że działania te nie zawsze przynoszą efekt w postaci immunizacji chroniącej przed zakażeniem.

Bakterie *E. rhusiopathiae* to Gram-dodatnie pałeczki o wysokich wymaganiach wzrostowych. Wywołują zakażenia u ssaków, w tym u człowieka, ptaków i ryb, a za ich główny rezerwuuar uznaje się trzodę chlewną. Pozycje literaturowe dotyczące różycy świń są aktualnie głównym źródłem wiedzy na temat serotypów, lekowrażliwości i czynników wirulencji szczepów *E. rhusiopathiae*. U tego gatunku bakterii wyróżnia się 17 serotypów, a szczepy zakażające świnię z reguły przynależą do serotypu 1a, 1b oraz 2. Wśród czynników zjadliwości *E. rhusiopathiae* wymienia się białka ułatwiające inwazję włoskowca różycy do tkanek gospodarza oraz czynniki determinujące oporność bakterii na fagocytozę i dopełniacz. Jednym z najlepiej poznanych czynników wirulencji jest powierzchniowe białko Spa, przeciwko któremu w organizmie gospodarza generowana jest odpowiedź immunologiczna. Występowanie różycy u drobiu wodnego zostało dotychczas opisane jedynie w kilku pracach kazuistycznych (Bobrek i wsp. 2016, Bobrek i Gawęł. 2015, Janowska i wsp. 1978).

Głównym **celem pracy** była charakterystyka serotypowa i określenie lekowrażliwości, genotypowych profili oporności i wirulencji oraz wariantów antygenowego białka SpaA szczepów *E. rhusiopathiae* wyizolowanych z klinicznych przypadków różycy u gęsi i kaczek hodowanych w Polsce. Praca zakłada także ocenę zmian sekcyjnych i określenie rozkładu notowanych przypadków różycy w poszczególnych grupach wiekowych ptaków oraz przedziałach roku kalendarzowego.



**Materiał i metody.** Materiałem wyjściowym do badań były padłe sztuki gęsi i kaczek dostarczone do Laboratorium Weterynaryjnego Vet-Lab Brudzew dr Piotr Kwieciński w celach diagnostycznych w okresie od 01.2019 do 12.2021. Na podstawie zgromadzonych danych klinicznych określono rozkład przypadków różycy w grupach wiekowych ptaków oraz okresach roku kalendarzowego. W badaniu anatomopatologicznym u padłych ptaków oceniano zmiany w narządach wewnętrznych, skórze, tkance podskórnej i stawach. Szczepy *E. rhusiopathiae* wyizolowane z tkanek martwych ptaków identyfikowano za pomocą testów real-time PCR, spektrometrii mas typu MALDI-TOF oraz kart z panelem biochemicznym VITEK® 2 GP. Lekowrażliwość izolatów *E. rhusiopathiae* (n=60) określono za pomocą metody mikrorozcieńczeń w bulionie, a genotypowe profile oporności i wirulencji oraz serotyp - przy wykorzystaniu techniki PCR. Gen *spaA* kodujący immunogenne białko SpaA został zsekwencjonowany, a sekwencja DNA przetłumaczona na sekwencję białkową. Na podstawie analizy uzyskanych sekwencji białkowych określono warianty SpaA występujące u izolatów terenowych oraz homologię pomiędzy badanymi izolatami a szczepem szczepionkowym *E. rhusiopathiae* R32E11. Ostatni etap badań stanowiło genotypowanie szczepów włoskowca różycy przy użyciu metod rep-PCR oraz RAPD.

**Wyniki.** Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano szereg istotnych wyników. Najważniejsze z nich wymieniono w punktach poniżej.

- Rozkład przypadków różycy w poszczególnych grupach wiekowych gęsi i okresach roku kalendarzowego istotnie różnił się od zakładanego rozkładu równomiernego; największą liczbę przypadków odnotowano w sierpniu i we wrześniu w grupie wiekowej między 11 a 13 tygodniem życia.
- W badaniu sekcyjnym u ptaków zakażonych włoskowcem różycy odnotowano zmiany anatomopatologiczne charakterystyczne dla zakażenia uogólnionego, z zajęciem wielu narządów.
- Wszystkie badane izolaty zostały przyporządkowane do gatunku *E. rhusiopathiae*; w trzech zastosowanych metodach identyfikacji (ww.) uzyskano pełną zgodność wyników. W przypadku metody z użyciem kart VITEK® 2 GP odnotowano ograniczoną powtarzalność w zakresie procentowej wartości prawdopodobieństwa poprawnej identyfikacji jak i czasu analizy.
- Badane izolaty *E. rhusiopathiae* (n=60) przynależały do siedmiu serotypów, wśród których dominował serotyp 5 (38,3%), 1b (28,3%) i 8 (15%)
- Wszystkie izolaty *E. rhusiopathiae* odznaczały się wrażliwością na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe i florfenikol. Ogromna większość izolatów wykazywała oporność na

tetracyklinę (85%) oraz enrofloksacynę (80%). Odsetek szczepów opornych na pozostałe substancje przeciwdrobnoustrojowe wahała się od 3,3% do 16,7%. Dziesięć szczepów (16,7%) uznano za wielolekooporne.

- Genotypowe profile lekooporności badanych szczepów *E. rhusiopathiae* (n=60) korespondowały z ich opornością fenotypową. U wszystkich szczepów opornych na tetracyklinę wykryto gen *tetM*. Gen *lnuB* występował u 10 z 11 szczepów opornych na linkozamidy, a gen *lsaE* - u wszystkich izolatów opornych na tiamulinę. U jednego szczepu opornego na makrolidy i linkozamidy wykryto gen *ermB*. U czterech izolatów z wysokimi wartościami MIC streptomycyny i spektynomycyny wykryto gen *ant(6)-Ia*. U szczepów opornych na enrofloksacynę występowała mutacja w genie *gyrA*.
- Izolaty *E. rhusiopathiae* były bardzo słabo zróżnicowane pod względem genotypowych profili wirulencji. U 59 szczepów wykryto gen *spaA* kodujący immunogenne białko powierzchniowe SpaA, a tylko jeden izolat zawierał gen *spaB*. Od 98,3 do 100% szczepów posiadało geny *nanH.1* i *nanH.2* kodujące neuraminidazę oraz inne geny, których produkty mogą ułatwiać inwazję włoskowca różycy do tkanek gospodarza, tj. *sub*, *hlyA*, *fbpA*, ERH\_1356, *intI*, *hlyIII*, *rspA*, *rspB* lub determinować oporność komórek bakterii na fagocytozę i działanie układu dopełniacza – *cpsA* i *algI*.
- Na podstawie wykrytych mutacji niesynonimicznych w sekwencji genów *spaA* u badanych izolatów wyróżniono 9 wariantów białka SpaA. Sekwencja domeny immunoprotekcyjnej (antygenowej) SpaA wszystkich szczepów terenowych różniła się od sekwencji szczepu szczepionkowego R32E11, a w przypadku ogromnej większości izolatów (91,5%) różnica dotyczyła aż 7, 8 lub 9 aminokwasów
- Metoda genotypowania rep-PCR wykazała, że zastosowanie startera (GTG)<sub>5</sub> umożliwia dyskryminację szczepów *E. rhusiopathiae* *spaA*-pozytywnych i *spaB*-pozytywnych, jednak nie pozwala na różnicowanie w obrębie izolatów *spaA*-pozytywnych. W przypadku RAPD najlepsze wyniki różnicowania wewnątrzgatunkowego uzyskano przy zastosowaniu startera M13.

**Wnioski.** Uzyskane w toku realizacji pracy doktorskiej wyniki dotyczące charakterystyki szczepów *E. rhusiopathiae* oraz występowania różycy u drobiu wodnego i zmian sekcyjnych dostarczają nowych cennych informacji i wzbogacają wiedzę z zakresu chorób drobiu, mikrobiologii weterynaryjnej i epidemiologii, a także mają istotne znaczenie w praktyce weterynaryjnej, zarówno w diagnostyce jak i leczeniu różycy. Dane na temat czynnika etiologicznego mogą być wykorzystane do opracowania skutecznych strategii kontroli zakażeń u drobiu wodnego.



## Summary

**Introduction.** Infection with strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* has been a problem in waterfowl farming in Poland for many years. The disease induced by these bacteria, known as erysipelas, occurs mainly in flocks of geese, and less often in ducks. The infection takes the form of sepsis with vascular and organ lesions (Bobrek et al. 2016). It causes considerable economic losses associated with deaths and treatment of birds, and in the case of breeding flocks, also due to declines in laying rates. Our own observations indicate that the disease most often affects birds after rearing, and that the pathogen is difficult to eliminate from the flock. Antibiotic treatment is usually effective, but after it is terminated recurrence of the disease is common. Currently no erysipelas vaccine for poultry is authorized for marketing in Poland. For this reason, some veterinarians attempt to protect the flock by using vaccines registered for use in pigs. However, field reports indicate that these measures do not always provide effective immunization against infection.

*E. rhusiopathiae* bacteria are Gram-positive rods with high growth requirements. They cause infection in mammals, including humans, birds, and fish, and their main reservoir is considered to be pigs. Literature reports on erysipelas in pigs are currently the main source of knowledge about the serotypes, drug susceptibility and virulence factors of *E. rhusiopathiae* strains. This bacterial species includes 17 serotypes. Strains infecting pigs usually belong to serotypes 1a, 1b and 2. Virulence factors of *E. rhusiopathiae* include proteins facilitating infection of host tissues and factors determining resistance to phagocytosis and complement. One of the best-known virulence factors is surface protein Spa, against which an immune response is generated in the host. The occurrence of erysipelas in waterfowl has been reported only in a few case studies (Bobrek et al. 2016, Bobrek and Gawel 2015, Janowska et al. 1978).

The main **aim of the study** was the serotypic characterization and determination of antibiotic susceptibility, genotypic profiles of resistance and virulence as well as variants of the antigenic SpaA protein of *E. rhusiopathiae* strains from clinical cases of erysipelas in geese and ducks raised in Poland. The work also assumes the analysis of anatomopathological changes and the determination of the distribution of erysipelas cases in age groups of birds and periods of calendar year.

**Material and methods.** The starting material for the research was dead geese and ducks delivered to the Vet-Lab Brudzew Dr Piotr Kwieciński veterinary laboratory for diagnostic purposes during the period from January 2019 to December 2021. The clinical

data collected were used to determine the distribution of erysipelas cases in birds in several age groups and periods of the calendar year. Anatomopathological examination of the dead birds was performed to assess lesions in the internal organs, skin, subcutaneous tissue, and joints. *E. rhusiopathiae* strains from the tissues of dead birds were identified using commercial real-time PCR tests, MALDI-TOF mass spectrometry, and the VITEK® 2 GP cards with a biochemical panel. The drug susceptibility of *E. rhusiopathiae* isolates (n=60) was determined by the microdilution method in broth, and genotypic resistance and virulence profiles and serotypes were determined by PCR. The gene *spaA* encoding the immunogenic protein SpaA was sequenced, and the DNA sequence was translated to the protein sequence. Based on the analysis of the obtained protein sequences, the SpaA variants found in field isolates and the homology between the field isolates and the vaccine strain *E. rhusiopathiae* R32E11 were determined. The final stage of the research was genotyping of *E. rhusiopathiae* strains, using rep-PCR and RAPD.

**Results.** A number of significant results were obtained. The most important of these are listed below.

- The distribution of erysipelas cases in age groups of geese and periods of the calendar year differed significantly from the assumed even distribution; the most cases were noted in August and September in the age group between 11 and 13 weeks.
- Necropsy of birds infected with *E. rhusiopathiae* showed anatomopathological lesions characteristic of generalized infection, affecting multiple organs.
- All isolates tested were identified as *E. rhusiopathiae*; the results of the three identification methods used (named above) were in full agreement. In the case of the method using VITEK® 2 GP cards, repeatability in terms of the percentage probability of correct identification and analysis time was limited.
- The *E. rhusiopathiae* isolates (n = 60) belonged to seven serotypes, among which serotypes 5 (38.3%), 1b (28.3%) and 8 (15%) predominated.
- All *E. rhusiopathiae* isolates were susceptible to  $\beta$ -lactam antibiotics and florfenicol. The vast majority of isolates were resistant to tetracycline (85%) and enrofloxacin (80%). The percentages of strains resistant to the remaining antimicrobials ranged from 3.3% to 16.7%. Ten strains (16.7%) were found to be multi-drug resistant.
- The genotypic drug-resistance profiles of the *E. rhusiopathiae* strains (n = 60) corresponded to their phenotypic resistance. The gene *tetM* was detected in all tetracycline-resistant strains. The gene *lnuB* was present in 10 of 11 lincosamide-resistant strains, and *lsaE* was detected in all isolates resistant to tiamulin. The gene *ermB* was detected in one strain resistant to macrolides and lincosamides. The gene *ant(6)-Ia* was

present in four isolates with high MICs for streptomycin and spectinomycin. In enrofloxacin-resistant strains, there was a mutation in the *gyrA* gene.

- There was very little variation between the genotypic virulence profiles of the *E. rhusiopathiae* isolates. The gene *spaA* encoding the immunogenic protein SpaA was detected in 59 strains, while only one isolate contained the *spaB* gene. From 98.3% to 100% of strains possessed the *nanH.1* and *nanH.2* genes coding for neuraminidase and other genes whose products could facilitate *E. rhusiopathiae* infection of host tissues, i.e. *sub*, *hlyA*, *fbpA*, ERH\_1356, *intI*, *hlyIII*, *rspA* and *rspB*, or determine the resistance of bacterial cells to phagocytosis and complement activation – *cpsA* and *algI*.

- Based on the nonsynonymous mutations detected in the *spaA* sequences of the isolates, 9 variants of the SpaA protein were distinguished. The sequences of the SpaA immunoprotective domain (antigenic) of all field strains differed from the sequence of the vaccine strain R32E11, and in the vast majority of isolates (91.5%) there were differences in 7, 8 or 9 amino acids.

- The rep-PCR genotyping method showed that the use of the primer (GTG)<sub>5</sub> makes it possible to distinguish *spaA*-positive and *spaB*-positive strains of *E. rhusiopathiae*, but does not enable differentiation among *spaA*-positive isolates. In the case of RAPD, the best intraspecific differentiation results were obtained using the primer M13.

**Conclusions.** The results obtained during the research for the doctoral thesis, pertaining to characteristics of *E. rhusiopathiae* strains, the occurrence of erysipelas in waterfowl, and pathological lesions in the course of the disease, provide valuable new information contributing to knowledge in the areas of poultry diseases, veterinary microbiology, and epidemiology, and are also important for veterinary practice, both in diagnosis and treatment of erysipelas. Data on the aetiological agent of erysipelas can be used to develop effective strategies for controlling infections in waterfowl.



## 1. WSTĘP

### 1.1. Hodowla drobiu wodnego w Polsce

Polska jest jednym z czołowych producentów drobiu wodnego w UE. Aktualnie wytwarzamy ok. 45 000 ton gęsiny i ponad 80 000 ton mięsa kaczego rocznie, a ich głównym importerem są Niemcy, ale także Francja, Hongkong, Dania, Wielka Brytania, Czechy i Litwa. Równie cennym produktem eksportowym jest puch i pierze (<https://kipdip.org.pl/pl>, <https://www.gov.pl/web/rolnictwo>). O ile w przeciągu ostatnich kilku lat produkcja gęsi utrzymywała się na podobnym poziomie (6-7 mln wylęgów rocznie), to produkcja kaczek z roku na rok wzrasta. W 2017 r. wylęgi piskląt kaczyczych wynosiły nieco ponad 11 mln sztuk, w r. 2020 było to już blisko 18,5 mln sztuk, a w 2022 r. - ponad 30 mln sztuk (Tab. 1.1). Tak wysokie wskaźniki stawiają Polskę, tuż obok Francji i Węgier, w czołówce europejskich producentów mięsa kaczego (Sawicka-Durkalec i wsp. 2023). Duże zainteresowanie hodowlą drobiu wodnego wynika ze stosunkowo niskich kosztów utrzymania ptaków w porównaniu z ceną żywca gęsiego, która utrzymuje się na wysokim poziomie.

**Tabela 1.1.** Liczba wylęgów gęsi i kaczek w przeciągu ostatnich kilku lat w Polsce wg danych EUROSTAT (Biuletyn Informacyjny Krajowej Rady Drobiarstwa, Izby Gospodarczej 2023)

Liczba wylęgów (tys. szt.)	2017	2018	2019	2020	2021	2022
gęsi	6 293,2	8 191,5	8 325,2	7 496,0	6 189,8	6 793,0
kaczki	11 835,6	13 005,7	15 435,3	18 479,9	17 986,9	30 834,8

#### *Hodowla gęsi*

W Polsce najczęściej hoduje się gęś białą włoską (Biała Kołudka® Owsiana). Mieszaniec towarowy W-31 (wywodzący się z rodów: męskiego W-33 i żeńskiego W-11) stanowi ~98% populacji gęsi reprodukcyjnych w kraju. Pozostałe 5% to stada zachowawcze odmian rodzimych lub pochodzenia obcego. W celach reprodukcyjnych gęsi użytkowane są przez 4 sezony (dane Zakładu Doświadczalnego w Kołudzie Wielkiej, [www.koluda.pl](http://www.koluda.pl)). Na krajowych fermach spotkać można także inne rodzime rasy i odmiany gęsi, których nazwy wywodzą się od regionów, tj. Biłgorajska (Bi), Zatorska (ZD-1), Garbonosa (Ga), Kartuska (Ka), Kielecka (Ki), Lubelska (Lu), Podkarpacka (Pd), Pomorska (Po), Rypińska (Ry), Suwalska (Su), Słowacka (Sł), Romańska (Ro), Kubańska



(Ku), Landes (LsD-01). Aktualnie Instytut Zootechniki, Państwowy Instytut Badawczy prowadzi Program Ochrony Zasobów Genetycznych Zwierząt Gospodarskich dla 14 ras/rodów/linii gęsi (<http://www.bioroznorodnosc.izoo.krakow.pl/drob/gesi>, Książkiewicz 2006).

Wstawienia piskląt gęsich rozpoczynają się w marcu i trwają do lipca. Ptaki przez pierwsze 4-5 tyg. przetrzymywane są w pomieszczeniach zamkniętych, a następnie wypuszczane są na wybiegi. System chowu gęsi zależy od długości trwania tuczu i warunków utrzymania. Chów intensywny trwa do 10 tyg., co pozwala uzyskać masy ciała około 5,5 kg. Tucz gęsi owsianej trwa ok. 15-16 tyg., aż do wagi około 6,5-7 kg. Gęsi hodowane są w tradycyjny sposób, spędzają czas na świeżym powietrzu, a w ostatnich tygodniach tuczu dokarmiane są owsem, zbożem o cennych właściwościach odżywczych (Utnik-Banaś i Żmija, 2018). Miesiące jesienno-zimowe (październik-grudzień) to najlepszy okres na sprzedaż tych ptaków, gdyż wówczas ich tłuszcz ma najwyższą jakość, a mięso najlepszy smak (Klonecki 2021). Wg danych GUS w 2020 r. poddano ubojowi 6 961 501 szt. innego drobiu, w tym gęsi, a w 2021 r. 6 516 710 szt., co stanowiło odpowiednio 37 809 oraz 34 175 ton wagi żywej. Dane z Izby Administracji Skarbowej wskazują, że w latach 2020-2022 wyeksportowano ponad 50 tyś. ton gęsiny (średnio 16 813 ton w ciągu roku) (Biuletyn Informacyjny Krajowej Rady Drobiarstwa - Izby Gospodarczej 2023).

### *Hodowla kaczek*

W polskich hodowlach najczęściej spotkać można dwie rasy kaczek ogólnoużytkowych, tj. kaczka Pekin (~98% hodowli krajowych) i kaczka Piżmowa (~2%). Obie te rasy mają charakterystyczną dobrą mięsność. Najwięcej ferm kaczyczych znajduje się w województwie wielkopolskim, świętokrzyskim i mazowieckim. Stada liczą od kilku do kilkunastu tys. sztuk. Aktualnie Instytut Zootechniki, Państwowy Instytut Badawczy prowadzi Program Ochrony Zasobów Genetycznych Zwierząt Gospodarskich dla 10 ras/rodów/linii kaczek, tj. Pomniejszone (K-2), Mieszańce (Kh0-01), Pekin angielski (LsA), Pekin duński (P-8), Pekin francuski (P-9), Pekin krajowy (P-33), Pekin krajowy (P-11, P-22, P-44 i P-55) (Książkiewicz, 2006).

Cykl hodowlany kaczek przeznaczonych na tucz trwa ok. 6-8 tyg. i zazwyczaj podzielony jest na dwa etapy. Pierwszy okres podobny do intensywnej hodowli brojlerów kurzych, przebiega w zamkniętych budynkach i trwa ok. 3 tygodnie. W drugim etapie chowu, ptaki wypuszczane są na wybiegi, na których znajdują się wiaty chroniące przed

niekorzystnymi warunkami środowiska. Waga kaczkę Pekin w końcowej fazie cyklu produkcyjnego wynosi 3,2–3,4 kg po 7-tyg. okresie odchowu i 3,6–3,7 kg podczas odchowu trwającego dodatkowo siedem dni, tj. do wieku 8 tyg. (Biesiada-Drzazga i wsp. 2017). Dane z Izby Administracji Skarbowej w zakresie eksportu mięsa i podrobów kaczek, wskazują, że w 2021 r. 27 243 ton, a w 2022 r. aż 37 819 ton, co stanowi wzrost o 28% w stosunku do roku poprzedniego (Biuletyn Informacyjny Krajowej Rady Drobiarstwa, Izby Gospodarczej, 2023).

## 1.2. Charakterystyka bakterii *Erysipelothrix rhusiopathiae*

### 1.2.1. Rys historyczny, taksonomia

Nazwa *Erysipelothrix rhusiopathiae*, czyli włoskowiec różycy, wywodzi się z języka greckiego od „*erysipelas*” – róża/czerwona skóra, „*trix*” – włos/nić, „*rhusius*” – zaczerwienienie oraz „*pathus*” – choroba (Opriessing i wsp. 2020). Za odkrywcę tych bakterii uważa się Roberta Kocha, który w 1876 roku wyizolował tę drobnoustrój z krwi myszy z posocznicą i nadał mu nazwę *E. murseptica*. Kilka lat później – w 1882 r. Pasteur i Dumas wyizolowali bakterie o pałeczkowatym kształcie od świń z objawami różycy, a Friedricha Löfflera w 1886 r. uznał włoskowca różycy za czynnik chorobotwórczy dla trzody chlewnej (Stackebrandt i wsp. 2006). Rosenbach wprowadził termin „różycy”, aby odróżnić infekcję paciorkowcową od zaobserwowanego przez siebie wykwit. Wyodrębnił gatunki: *E. muriseptica*, *E. porci* oraz *E. erysipeloid*, w oparciu o ich izolację od myszy, świń i ludzi. Wkrótce potem ze względu na wysokie podobieństwo tych izolatów uznano je za jeden gatunek, któremu w 1885 r. Trivisan nadał nazwę *E. insidiosa*. Obecnie używana nomenklatura - *E. rhusiopathiae* została zaproponowana przez Buchanan’a w 1918 r, a oficjalnie przyjęta w 1966 (Wang i wsp. 2010, Stackebrandt i wsp. 2006, Zautner i wsp. 2022).

Zgodnie z aktualnie obowiązującą klasyfikacją pałeczki *E. rhusiopathiae* przynależą do rodzaju *Erysipelothrix*, rodziny *Erysipelotrichaceae*, rzędu *Erysipelotrichales*, klasy *Erysipelotrichia*, gromady (ang. *phylum*) *Bacillota* (dawniej *Firmicutes*). Rodzaj *Erysipelothrix* aktualnie obejmuje 11 gatunków, tj:

- 1) *Erysipelothrix rhusiopathiae*,
- 2) *Erysipelothrix tonsillarum*,
- 3) *Erysipelothrix inopinata*,

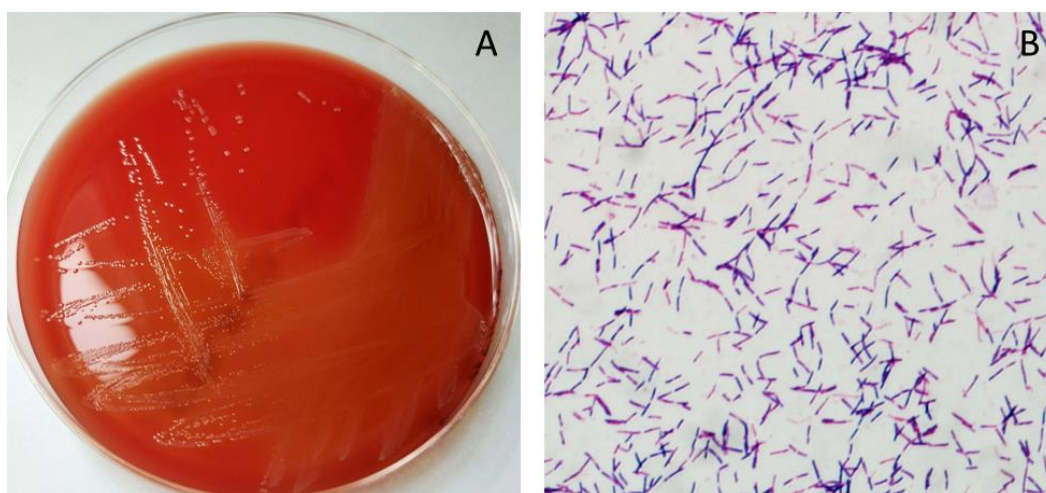
- 4) *Erysipelothrix larvae*,
- 5) *Erysipelothrix sp. strain 1*,
- 6) *Erysipelothrix pisciscarius sp. nov.*, (dawniej *Erysipelothrix sp. strain 2*),
- 7) *Erysipelothrix sp. strain 3*,
- 8) *Erysipelothrix anatis sp. nov.*,
- 9) *Erysipelothrix aquatica sp. nov.*,
- 10) *Erysipelothrix urinaevulpis*
- 11) *Erysipelothrix muris* (Eisenberg i wsp. 2022, Shimoji i wsp. 2020, Zautner i wsp. 2022).

Należy jednak zaznaczyć, że choć gatunek *E. muris* został wprowadzony do bazy NCBI (NCBI: txid380638) to informacje na jego temat nie zostały dotychczas opublikowane (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>).

### 1.2.2. Morfologia, hodowla, właściwości biochemiczne, siedliska

Bakterie z gatunku *Erysipelothrix rhusiopathiae* to wąskie Gram-dodatnie nieruchliwe nieprzetrwalnikujące pałeczki. Komórki mają długość od 1,5-3,0  $\mu\text{m}$ , średnicę 0,5  $\mu\text{m}$  i wykazują tendencję do tworzenia filamentów o długości nawet ponad 60  $\mu\text{m}$  (Zautner i wsp. 2022) (Ryc. 1.1). Włoskowiec różycy jest fakultatywnym beztlenowcem – słabo rośnie w warunkach tlenowych, lepiej w atmosferze z dodatkiem 5-10%  $\text{CO}_2$  (Stackebrandt 2015). Ze względu na wysokie wymagania wzrostowe tych bakterii hodowle prowadzi się na podłożach wzbogaconych krwią (5%), surowicą (5–10%) lub Tween 80 (0,1%, monooleinian polioksyetylenosorbitan). Pałeczki rosną w szerokim zakresie temperatur od 5°C do 44°C, ale optimum to 30-37°C; preferują środowisko alkaliczne, w przedziale 7,2-7,6 (Stackebrandt 2015). Na podłożu Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej, Scheadler KV lub agarze czekoladowym włoskowiec różycy rośnie w postaci drobnych półtransparentnych lśniących kolonii o wielkości 0,1-0,5 mm średnicy po 24-godzinnej inkubacji oraz 0,5-1,5 mm po 48 godz.; na podłożu z krwią po 48-godz. inkubacji zazwyczaj widoczna jest strefę alfa-hemolizy. Kolonie mogą przybierać dwie formy - gładką (postać S) lub szorstką (postać R). Te ostatnie mają nieregularne brzegi i obserwowane są zazwyczaj w posiewach z zakażeń o charakterze przewlekłym oraz po wielokrotnym pasażowaniu. Forma S występuje głównie w hodowlach pierwotnych z ostrych przypadków różycy (Zautner i wsp. 2022, Stackebrandt 2015).

Włoskowce nie wykazują aktywności katalazy, oksydazy, żelatynazy (z wyjątkiem *E. inopinata*), nie wytwarzają indolu, nie hydrolizują eskuliny (z wyjątkiem *E. inopinata*). Większość gatunków *Erysipelothrix* wytwarza siarkowodór. Włoskowce przeprowadzają kwaśną fermentację węglowodanów bez produkcji gazu. Gatunki *E. rhusiopathiae* i *E. tonsillarum* są bardzo podobne pod względem właściwości biochemicznych, jedyna potwierdzona różnica dotyczy aktywność  $\beta$ -glukozydazy, którą cechuje się *E. tonsillarum* (Stockebrandt 2015).



**Rycina 1.1.** A. Wzrost *E. rhusiopathiae* na podłożu Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej; B. preparat mikroskopowy *E. rhusiopathiae* barwiony metodą Grama (fot. Marta Dec)

### Siedliska

*E. rhusiopathiae* jest patogenem występującym na całym świecie. Jego rezerwuarami są głównie zwierzęta hodowlane, ale także myszy, szczury, ryby czy skorupiaki wodne. Włoskowce są wydalane przez chore zwierzęta wraz z kałem, moczem, śliną i wydzieliną z nosa, które mogą zanieczyszczać żywność, wodę, glebę i ściółkę (Wood i wsp. 1978). Za najważniejsze źródło tych bakterii uznaje się jednak hodowlę trzody chlewnej. Z danych literaturowych wynika, że od 10,5% do nawet 98% świń jest bezobjawowymi nosicielami włoskowca różycy (Stephenson i Berman 1978, Takahashi i wsp. 1987a, Takahashi i wsp. 1999). Drobnoustroje lokalizowane są zwykle w tkankach limfatycznych, głównie w migdałkach, skąd mogą przedostawać się do krwiobiegu i innych narządów (Shimoji 2000). Wraz z odchodami zwierząt (gnojowica) dostają się do gleby i wód gruntowych (Bender i wsp. 2010) Pałeczki *E. rhusiopathiae* były także izolowane z migdałków bydła, zapalenia wsierdza u psów, zapalenia wielostawowego jagniąt i cieląt, posocznicy u drobiu, posocznicy i pokrzywki u delfinów oraz zmian

skórnych u ludzi (Stackebrandt 2015). Rezerwuarem *E. rhusiopathiae* może być także mączka rybna i dzikie ptaki (Bisgaard i wsp. 1980), a także zwłoki zwierząt. Wykazano, że włoskowiec różycy przeżywa w rozkładającej się tuszy przez 4 miesiące, a w przypadku zwłok zakopanych w ziemi – przez 9 miesięcy (Brooke i Riley 1999).

### 1.2.3. Serotypy

Pierwotnie w obrębie rodzaju *Erysipelothrix* wydzielono dwa serotypy, tj. A i B. Podstawą tego podziału była obecność gatunkowo-swoistego ciepłochwiejnego białka oraz antygeny polisacharydowego wykazującego stabilność w wysokiej temperaturze oraz niskim pH. Do trzeciej grupy N kwalifikowano wszystkie izolaty, które nie reagowały z antysurowicą A lub B. Schemat ten szybko stał się niepraktyczny, ponieważ coraz większa liczba izolatów należała do grupy N. Różne grupy badawcze zaczęły wprowadzać kolejne oznaczenia w oparciu o metody ekstrakcji antygenów. Ostatecznie przyjęto jednolity schemat serotypowania zaproponowany w 1973 r. przez Kucsera. Metoda oparta była na podwójnej immnodyfuzji (precypitacja w żelu agarowym) z użyciem antysurowic króliczych swoistych dla serotypu i antygenów, pozyskanej na drodze ekstrakcji wodnej w wysokiej temperaturze. Serotypy oznaczano kolejnymi cyframi arabskimi od 1 do 26, a w przypadku szczepów nie reagujących z żadną antysurowicą – literą N (Wang i wsp. 2010). Obecnie serotypy są oznaczone kolejnymi cyframi arabskimi, w kolejności ich odkrycia (1-26), a serotypy 1 i 2 mogą być dalej podzielone i oznaczone małymi literami (tj. 1a, 1b, 2a, 2b). W obrębie gatunku *E. rhusiopathiae* wyróżnia się 16 serotypów (1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21, 23), a u *E. tonsillarum* – 9 serotypów (3, 7, 10, 14, 20, 22, 24, 25, 26). Serotypy 13 i 18 zostały potwierdzone u szczepów gatunku *E. species 1* i *E. piscisicarius sp. nov.*, odpowiednio (Tab. 1.2). Serotypy nie zostały dotychczas opisane dla szczepów pozostałych gatunków *Erysipelothrix* (Wang i wsp., 2010, Shimoji i wsp. 2020).

**Tabela 1.2.** Serotypy bakterii z rodzaju *Erysipelothrix* (Shimoji i wsp. 2020)

Gatunek bakterii	Serotyp
<i>E. rhusiopathiae</i>	1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21, 23
<i>E. tonsillarum</i>	3, 7, 10, 14, 20, 22, 24, 25, 26
<i>E. piscisicarius sp. nov.</i>	13
<i>E. species 1</i>	18

Obecnie do serotypowania włośkowców w badaniach taksonomicznych i epidemiologicznych wykorzystuje się technikę PCR, zgodnie z metodyką opracowaną przez Shimoji i wsp. (2020) oraz Shirava i wsp. (2018).

W oparciu o szereg badań wykazano, z pewnymi różnicami geograficznymi, że u świń najszerszej rozpowszechnione są szczepy reprezentujące serotyp 1a, 1b i 2 (Opriessing i wsp. 2020). Ogawa i wsp. (2018) potwierdzili, że sekwencje DNA determinujące antygen 1a i 2 są związane ze zjadliwością *E. rhusiopathiae*. Jednakże korelacja pomiędzy serotypem a chorobotwórczością u tych bakterii jest dalece niejasna (Dec i wsp. 2023). Niektórzy autorzy donoszą, że szczepy serotypu 1a są odpowiedzialne za ostrą postać różycy, podczas gdy szczepy serotypu 2a są izolowane głównie od świń z chorobą przewlekłą. Jednakże, badania innych autorów bazujące na wynikach eksperymentalnego zakażenia wykazały, że u świń oba stany kliniczne mogą być wywołane przez szczepy różnych serotypów (1a, 2, 21) (Wang i wsp. 2010).

Z dotychczasowych badań wynika, że serotypy *E. rhusiopathiae* nie są specyficzne dla gatunku gospodarza - szczepy serotypu 1b, 5, 2 izolowano zarówno od ssaków jak i od ptaków (Dec i wsp. 2023, Hess i wsp. 2023).

#### 1.2.4. Czynniki wirulencji

Bakterie z gatunku *E. rhusiopathiae* są uznawane za drobnoustroje chorobotwórcze, lecz mechanizmy odpowiadające za ich patogenność nie są jeszcze w pełni poznane. Dotychczas opisano u nich szereg czynników, które są lub mogą być odpowiedzialnych za wywoływanie stanu chorobowego. Ułatwiają one patogenowi inwazję tkanek gospodarza (poprzez adhezję do komórek gospodarza lub destrukcję tkanek), determinują oporność komórek bakterii na fagocytozę i działanie układu dopełniacza, a także umożliwiają im przeżycie wewnątrz komórek żernych. Najlepiej poznane czynniki wirulencji *E. rhusiopathiae* przedstawiono poniżej.

**Otoczka polisacharydowa** (CPS, ang. *capsular polysaccharide*) uważana jest za kluczowy czynnik w patogenezie różycy. Jej udział w chorobotwórczości *Erysipelothrix* spp. został po raz pierwszy opisany jeszcze w 1986 r. (Lachmann i Deicher 1986). W latach późniejszych Shimoji i wsp. (1994 i 2002) wykazali, że bezotoczkowe mutanty były niezjadliwe dla myszy, traciły oporność na fagocytozę i zdolność do przeżywania wewnątrz makrofagów. Otoczka bakterii *E. rhusiopathiae* jest heterogenna – jej główne komponenty to kwas galakturonowy, galaktoza, mannoza, glukoza, arabinoza, ksyloza

i N-acetyloglukozamina (Shi i wsp. 2012). Za syntezę otoczki u włoskowców różycy odpowiedzialne są najprawdopodobniej glikozylotransferazy kodowane przez geny *cpsA*, *cpsB*, *cpsC* (Ding i wsp. 2015). Powszechne występowanie tych genów u szczepów włoskowca różycy potwierdzili Ding i wsp. (2015) oraz Yang i wsp. (2020).

Pałeczki *E. rhusiopathiae* wykazują zdolność do przeżywania wewnątrz granulocytów świń oraz makrofagów mysich (Shimoji i wsp. 1996). Mechanizmy obronne włoskowca różycy przed bójącym działaniem fagocytów wydają się być złożone, ale pewną rolę w tym zjawisku może odgrywać bakteryjna **dysmutaza ponadtlenkowa** - enzym usuwający reaktywne formy tlenu wytwarzane w komórkach żernych podczas fagocytozy (Shimoji 2000).

Potencjalnym czynnikiem zjadliwości *E. rhusiopathiae* jest także **O-acetylotransferaza alginianowa** (produkt genu *algI*) (Janßen i wsp. 2015). Enzym ten przeprowadza acetylację alginianu – egzopolisacharydu pierwotnie opisanego u *Pseudomonas aeruginosa*. Acetylacja alginianu ma istotne znaczenie w tworzeniu biofilmu oraz zapewnia ochronę przed fagocytozą (Balducci i wsp. 2023). Udział O-acetylotransferazy alginianowej w patogenezie różycy nie został jednak dotychczas potwierdzony. Sekwencja białka kodowanego przez gen *algI* szczepu *E. rhusiopathiae* Fujisawa (GenBank: AP012027.1, ERH\_0402) jest w 35% homologiczna z sekwencją O-acetylotransferazy alginianowej *P. aeruginosa* (GenBank WP\_185296717.1) przy stopniu pokrycia 82% (na podstawie analizy własnej protein-protein BLAST).

**Neuraminidaza** to enzym odpowiedzialny za odłączanie kwasów sialowych z glikoprotein, glikolipidów i oligosacharydów obecnych na komórkach gospodarza (Shimoji 2000); jego aktywność prowadzi do zaburzenia funkcjonowania komórek (Wang i wsp. 2010). Wykazano, że poziom wytwarzania neuraminidazy jest ściśle powiązany ze zjadliwością szczepów *E. rhusiopathiae* (Muller i Krasemann 1976). Ważnej roli tego enzymu w patogenezie różycy dowodzą także wyniki Nakato i wsp. (1987), którzy zaobserwowali, że adhezja włoskowca różycy do komórek nabłonkowych u szczurów była zahamowana przez N-acetyloneuramin-laktozę - substrat dla neuraminidazy.

**Hialuronidaza** – to enzym z grupy liaz hialuronianowych odpowiedzialny za depolimeryzację (rozkład) kwas hialuronowego – polisacharydowego komponentu macierzy zewnątrzkomórkowej (Cavallini i wsp. 2013). Hialuronidazy są wytwarzane

przez wiele bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, lecz sugestie na temat ich udziału patogenezie zakażeń rzadko są poparte właściwymi badaniami (Hynes i Walton 2000). Również w przypadku różycy udział tego enzymu jest kontrowersyjny. Pierwotnym doniesieniem o jego istotnej roli w chorobotwórczości (Mann 1969) *E. rhusiopathiae* zaprzeczają badania Norrung'a (1970), który nie stwierdził związku pomiędzy wytwarzaniem hialuronidazy a zjadliwością bakterii (obecność enzymu potwierdzono zarówno w szczepach zjadliwych jak i niezjadliwych). Do podobnych wniosków doszli później także Shimoji i wsp. (2002) oraz Li i wsp. (2016).

Wśród enzymów, które mogą uczestniczyć w patogenezie różycy oprócz powyższych wymienia się także **subtylizynę** – proteazę serynową, która prawdopodobnie występuje na powierzchni komórek włoskowca różycy (Janßen i wsp. 2015) (GenBank: AP012027.1, ERH\_0260). Pozakomórkowe subtylizyny są dobrze znanymi czynnikami wirulencji dermatofitów (Łagowski i wsp. 2021), ale także opisano ich udział w zjadliwości niektórych bakterii, np. *Streptococcus suis* (Bonifait i wsp. 2010) czy *Streptococcus pneumoniae* (Ali i wsp. 2021).

Dotychczas nie stwierdzono wytwarzania toksyn przez włoskowce różycy, jednakże według informacji zawartych na stronie GenBanku (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) w genomie referencyjnego szczepu *E. rhusiopathiae* Fujisawa (GenBank AP012027.1) występuje gen (ERH\_0649) kodujący **hemolizynę**, którą Janßen i wsp. (2015) zakwalifikowali do grupy HlyIII. Tego typu toksyny są wytwarzane przez wiele bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Hemolizyna III *Bacillus cereus* wywołuje lizę erytrocytów poprzez tworzenie porów w ich błonie komórkowej (Baida i Kuzmin 1996), a inaktywacja genu hemolizyny III u wysoce wirulentnego szczepu *Vibrio vulnificus* skutkowałą osłabieniem jego właściwości chorobotwórczych (Lee i wsp. 2004). Sekwencja aminokwasowa hemolizyny szczepu *E. rhusiopathiae* Fujisawa (GenBank AP012027.1, ERH\_0649) jest w ok. 45% homologiczna z sekwencją hemolizyny III *S. aureus* (*yqfA*) oraz w ok. 35% z sekwencją hemolizyny III *Bacillus cereus* i *Vibrio vulnificus* (na podstawie analizy własnej protein-protein BLAST).

**Adhezyny.** Bratberg i wsp. (1981) wykazali, że *E. rhusiopathiae* wyizolowane od świń z zapaleniem wsierdzia lub posocznicą silniej przylegają do świeżych zastawek serca świń niż szczepy izolowane z innych źródeł. W innych badaniach zaobserwowano silniejsze przyleganie szczepów wirulentnych dla świń i myszy do linii komórkowych



nerek świni niż szczepów niezdajliwych (Takahashi i wsp., 1987). Aktualnie wiadomo, że za przyleganie włoskowca różycy do komórek gospodarza odpowiada szereg białek, wśród których wymienia się:

- SpaA (ang. *surface protective antigen*) (Harada i wsp. 2014, Zhu i wsp. 2017a),
- RspA (ang. *rhusiopathiae surface protein A*) i RspB (ang. *rhusiopathiae surface protein B*) (Shimoji i wsp. 2003),
- białko podobne do internaliny HP1472 (Zhu i wsp. 2018),
- GAPDH (ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (Zhu i wsp. 2017b),
- CbpB (ang. *choline-binding proteins*) (Zhu i wsp. 2019).

Domniemane funkcje adhezyjne posiadają także: transporter ABC (*locus taq* w genomie szczepu Fujisawa ERH\_1356) (Ding i wsp. 2015), białko FbpA (ang. *fibronectin-binding protein*), lipoproteina kodowana przez gen *ewlA*, białka błonowe kodowane przez geny *mviN1* i *dnaB* (Janßen i wsp. 2015).

W badaniach z udziałem rekombinowanych białek **RspA** i **RspB** wykazano ich zdolność do wiązania się z polistyrenem, fibronektyną, a także kolagenem typu I i IV. Dzięki właściwościom adhezyjnym i wiązaniu się z macierzą zewnątrzkomórkową, RspA oraz RspB uznawane są za czynniki zapoczątkowujące tworzenie biofilmu bakteryjnego (Shimoji i wsp. 2003). W genomie wzorcowego szczepu *E. rhusiopathiae* Fujisawa (GenBank AP012027.1) występuje także gen *rspC* kodujący białko RspC (ang. *rhusiopathiae surface protein C*), które podobnie jak RspA i RspB, może mieć właściwości adhezyjne.

**Białko HP1472** (produkt genu *intl*, locus *taq* ERH\_1472 w genomie szczepu Fujisawa, GenBank AP012027.1), którego obecność potwierdzono na powierzchni komórek *E. rhusiopathiae* najprawdopodobniej działa jak adhezyna. Zhu i wsp. (2018) wykazali, że rekombinowane białko HP1472 przylega do świńskich komórek śródbłonna, a we wcześniejszych badaniach potwierdzono istotnie wyższą ekspresję genu kodującego to białko u wysoce zjadliwego szczepu *E. rhusiopathiae* w porównaniu do jego awirulentnej formy bądź szczepu o niskim potencjale chorobotwórczym (Li i wsp. 2016, Wang i wsp. 2017). Białko HP1472 wykazuje podobieństwo do internaliny *Listeria monocytogenes* – czynnika ułatwiającego inwazję patogenu do komórek nabłonkowych (Bierne i wsp. 2007).

**Dehydrogenaza-gliceraldehydu-3-fosforanu (GAPDH)** (ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) to wielofunkcyjny enzym glikolityczny, którego obecność potwierdzono na powierzchni komórek *E. rhusiopathiae*. W badaniach z wykorzystaniem rekombinowanego białka GAPDH (rGAPDH) wykazano, że bierze ono udział w adhezji *E. rhusiopathiae* do komórek śródbłonna naczyń krwionośnych świni, a także posiada zdolność do wiązania fibronektyny (białko macierzy pozakomórkowej) oraz plazminogenu. Białka te uczestniczą w zapaleniu i mogą odgrywać rolę w kolonizacji tkanek gospodarza przez *E. rhusiopathiae* (Zhu i wsp. 2017b).

**Cbps** (ang. *choline-binding proteins*) to bakteryjne białka, które wiążą się fosforylcholiną występującą w ścianie komórkowej bakterii. Są one istotnymi czynnikami wirulencji *Streptococcus pneumoniae* – mutanty pozbawione zdolności wytwarzania białek Cbp traciły zdolność do kolonizacji jamy nosowo-gardłowej (Gosink i wsp. 2000). Wykazano, że występujące u *E. rhusiopathiae* białko CbpB ułatwia adhezję bakterii do świńskich komórek śródbłonna naczyń przez co może inicjować rozwój infekcji. CbpB wiąże się także z plazminogenem (nieaktywny prekursor plazminy), który w następstwie aktywacji ulega przekształceniu w plazminę (fibrylizynę) – enzym proteolityczny odpowiedzialny za degradację skrzepu (włóknika), a także białek macierzy pozakomórkowej (Zhu i wsp. 2019). Shi i wsp. (2013) potwierdziło również immunogenne działanie białka CbpB. Aktualnie jest ono uznawane za antygen immunoprotekcyjny *E. rhusiopathiae* (Shi i wsp. 2013).

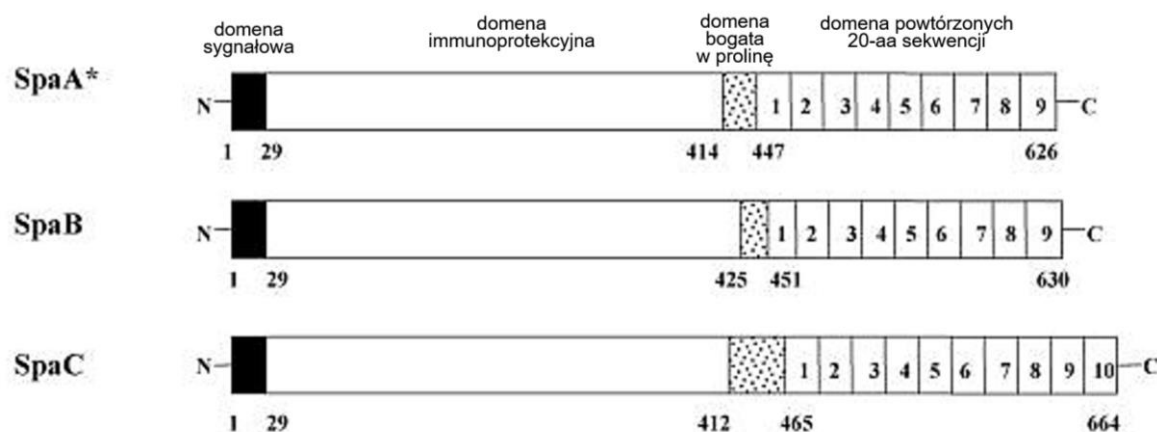
**Białko powierzchniowe Spa** (ang. *surface protective antigen*) jest najlepiej poznanym antygenem ochronnym *E. rhusiopathiae*. Dotychczas opisano 3 typy Spa, tj.: SpaA, SpaB oraz SpaC. SpaA jest charakterystyczne dla serotypów 1a, 1b, 2, 5, 8, 9, 12, 15, 16, 17, i N. SpaB występuje głównie u szczepów serotypu 4, 6, 11, 19, and 21, a obecność SpaC dotychczas potwierdzono tylko u szczepów *Erysipelothrix piscisicarius* serotyp 18 (To i Nagai 2007). Shen i wsp. (2010) w obrębie SpaB wyodrębnili jeszcze dwa podtypy, tj. SpaB1 (w serotypach 4, 6, 8, 19 i 21) i SpaB2 (serotyp 11). Białko Spa nie występuje u szczepów *E. tonsillarum* (To i Nagai 2007).

W doświadczeniach na modelach zwierzęcych wykazano, że immunizacja określonym typem Spa zapewnia ochronę przed rozwojem choroby po ekspozycji na szczepki zawierające homologiczne Spa, podczas gdy ochrona przed zakażeniem szczepami zawierającymi inny typ Spa jest ograniczona (Ingebritson i wsp. 2010). Stąd

określenie typu białka Spa u szczepów terenowych jest istotne z epidemiologicznego punktu widzenia.

Pomimo znacznych różnic w antygenowości, białka SpaA, SpaB i SpaC mają podobną strukturę (To i Nagai 2007) (Ryc.1.2). W ich łańcuchu aminokwasowym wyróżnia się następujące domeny:

- 1) domenę sygnałową – zlokalizowana w N-końcowym odcinku białka i liczy 29 aa; prawdopodobnie odpowiada za sekrecję białka SpaA (To i Nagai 2007),
- 2) domenę immunoprotekcyjną – odcinek o długości, 384 (SpaA), 395 aa (SpaB) lub 382 aa (SpaC) o wysoce zmiennej sekwencji (domena hiperzmienna), jest epitopem, wobec którego w organizmie osobnika zakażonego włoskowcem różycy wytwarzane są swoiste przeciwciała (Imada i wsp. 1999),
- 3) hydrofobową domenę bogatą w prolinę – odcinek o długości 34 aa (SpaA), 27 aa (SpaB) lub 54 aa (SpaC) o niejasnej funkcji (Forde 2020),
- 4) domenę powtórzonych sekwencji – zawiera od 7 do 19 powtórzonych 20-aminokwasowych sekwencji zawierających moduł GW (glicyna, tryptofan); ostatnio wykazano, że liczba tandemów jest dodatnio skorelowana z właściwościami adhezyjnymi *E. rhusiopathiae* (Wu i wsp. 2022) (Ryc. 1.2.).



**Rycina 1.2.** Budowa białek SpaA, SpaB i SpaC. N-koniec z sekwencją sygnałową zaznaczono na czarno (długość 29 aa), kolejno na biało domenę immunoprotekcyjną (SpaA 384 aa, SpaB 395 aa, SpaC 382 aa), obszar zakropkowany odpowiada domenom bogatym w prolinę (SpaA 34 aa, SpaB 27 aa, SpaC 54 aa), C-koniec z 20-aminokwasowymi powtórzonymi sekwencjami oznaczono ponumerowanymi polami (rycina zaczerpnięta z pracy To i Nagai 2007)

Podobieństwo sekwencji aminokwasowej w obrębie danego typu Spa występującego u różnych szczepów wynosi 96-99%, natomiast homologia pomiędzy poszczególnymi typami Spa wynosi od 60% do 67%. Największym zróżnicowaniem cechuje się N-końcowa domena immunoprotekcyjna (odcinek w pozycji 30-411/413/424 aa) (To i Nagai, 2007).

Spośród trzech typów Spa (A, B i C) u szczepów *E. rhusiopathiae* izolowanych od świń oraz drobiu (kury, indyki) najczęściej (u >90% szczepów) występuje wariant SpaA (Forde i wsp. 2020, Janßen i wsp. 2015, Dec i wsp. 2023). Poza działaniem immunoprotekcyjnym białko SpaA zwiększa także oporność komórek włoskowca różycy na fagocytozę oraz ułatwia adhezję bakterii do komórek nabłonkowych (Forde i wsp. 2020). Dotychczas w oparciu o analizę mutacji niesynonimicznych występujących w immunoprotekcyjnej domenie SpaA opisano kilka wariantów tego białka (Dec i wsp. 2023, Uchiyama i wsp. 2014; Janßen i wsp. 2015, Forde i wsp. 2020).

#### **1.2.5. Immunogenność bakterii *E. rhusiopathiae***

W odpowiedzi immunologicznej przeciwko włoskowcom ważną rolę odgrywa odpowiedź humoralna związana z produkcją przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom powierzchniowym (Forde i wsp. 2020, Ingebritson i wsp. 2010). Najlepiej poznanym immunogenem *E. rhusiopathiae* jest opisane wcześniej białko SpaA, ale wśród antygenów włoskowca różycy wymienia się także: GAPDH, RspA, białka wiążące cholinę CbpB, CbpA, Plp, Atsp, neuraminidazę (Neu),  $\beta$ -galaktozydazę (Bga), aminopetydaza dipeptydylowa (Da), CwpA, CwpB (Forde i wsp. 2020). Wszystkie wymienione białka generowały odporność swoistą w następstwie immunizacji zwierząt -eksperymenty wykonywano najczęściej na myszach (Hu i wsp. 2017, Forde i wsp. 2020). W ostatnim czasie Forde i wsp. (2020) przeprowadzili interesujące badania mające na celu wytypowanie immunogenów *E. rhusiopathiae*, które mogłyby zostać wykorzystane do opracowania szczepionki podjednostkowej przeciwko różycy dla trzody chlewnej. Analizy dotyczyły dwunastu wyżej wymienionych białek i zostały wykonane na puli 45 izolatów pochodzących od świń w Wielkiej Brytanii. Za najbardziej konserwatywne, a tym optymalne do produkcji szczepionki, uznano białko GAPDH (zmiennosc w 1 pozycji aa), natomiast największą zmiennością aminokwasową cechowało się białko CwpB (zmiennosc w 276 pozycjach) (Forde i wsp. 2020).

Antygen otoczkowy *E. rhusiopathiae* jest słabym immunogenem, a przeciwciała antyotoczkowe generowane w organizmie gospodarza nie wykazują działania protekcyjnego (Shimoji i wsp. 1994, Shi i wsp. 2012). Takie wnioski wyciągnięto na podstawie badań *in vivo*, podczas których zaobserwowano, że immunizacja myszy oczyszczonym antygenem otoczkowym *E. rhusiopathiae* nie chroniła tych zwierząt przed śmiertelnym skutkiem zakażenia włoskowcem różycy; przeciwciała generowane w następstwie immunizacji myszy należały wyłącznie do klasy IgM (Shimoji 2000).

### 1.3. Różycyca u drobiu

#### 1.3.1. Gospodarze, rys historyczny

Różycyca to choroba występująca u różnych gatunków drobiu. Szczególnie duże straty wywołuje na fermach indyckich, ale także wśród kur, kaczek i gęsi. Na zakażenie włoskowcem różycy wrażliwe są także bażanty, przepiórki, ptaki dzikie, ozdobne oraz gołębie, i strusie. Uważa się, że ptaki, tuż obok świń są głównym rezerwuarem *E. rhusiopathiae* (Jordan i Bisgaard 2011, Wood 1992).

Pierwsze wzmianki na temat różycy u drobiu pochodzą z lat 40 XX w. z USA, kiedy to zakażenie włoskowcem opisano u indyków (Beaudette i Hudson 1936), a następnie u kaczek (Graham i wsp. 1939). Wkrótce potem chorobę zaobserwowano także w stadach kur (Breed 1943). Pierwsze doniesienie nt. różycy u gęsi pochodzą początku lat 70 XX w. kiedy to Bailie i wsp. (1970) odnotowali przypadek zakażenia włoskowcem u gąsiąt w USA, a Polner i wsp. (1972) – u dorosłych gęsi na Węgrzech. W Polsce różycę drobiu opisano dopiero w 1961 r. w odniesieniu do kur (Małanowska 1961), a kilka lat później u indyków (Jaworowski i Maciejczuk 1971). Pierwszy krajowy przypadek zakażenia włoskowcem różycy u gęsi odnotowali Janowska i wsp. w 1978 r. w stadzie liczącym 80 sztuk ptaków w wieku 6-7 miesięcy. W oparciu o wynik precypitacji w żelu agarowym stwierdzono przynależność wyizolowanego szczepu włoskowca do serotypu B. Prawdopodobnym źródłem zakażenia były świny z objawami ostrej różycy hodowane w tym samym gospodarstwie oraz w kilku sąsiednich (Janowska i wsp. 1978). Kolejne trzy przypadki różycy u gęsi w Polsce opisano dopiero ponad 35 lat później w pracach autorstwa Bobrek i Gawęł (2015) oraz Bobrek i wsp. (2016). W literaturze krajowej brak jest doniesień na temat występowania różycy u kaczek.

Do niedawno uważano, że spośród znanych 11 gatunków bakterii rodzaju *Erysipelothrix* dla drobiu patogenny jest jedynie *E. rhusiopathiae*. W ostatnich latach

pojawiło się jednak doniesienie o występowaniu u indyków w Brazylii zakażenia wywołanego przez szczep *Erysipelothrix sp. strain 2* (aktualnie *E. piscisicarius sp. nov.*) (Hoepers i wsp. 2019).

### 1.3.2. Czynniki usposabiające

Zakażenia na tle *E. rhusiopathiae* obserwowane są u ptaków w każdym wieku, ale najczęściej w późniejszym etapie życia i u dojrzałych osobników (Kurian i wsp. 2012). Wydaje się, że duży wpływ na rozwój zakażenia u drobiu mogą mieć czynniki stresogenne, zarówno środowiskowe (nieodpowiednie warunki hodowli) jak i stres temperaturowy w okresie dojrzewania płciowego, w okresie koralenia czy podskubu (Żbikowski i wsp. 2011). Czynnikiem usposabiającym do rozwoju różycy są także okresowe spadki odporności związane z przeziębieniem, złymi warunkami pogodowymi, równoczesną infekcją bakteryjną lub wirusową. W przypadku stad kur niosek wydaje się, że wybuchy choroby mogą być wynikiem spadku odporności do jakiego dochodzi na skutek obciążenia organizmu w okresach intensywnej nieśności (Schmucker i wsp. 2021, Bobrek i wsp. 2013). Różycy występuje także u ptaków z jednoczesnym zakażeniem pasożytami jelitowymi, które mogą uszkadzać błonę śluzową przewodu pokarmowego i w ten sposób ułatwiać wniknięcie włoskowca do tkanek gospodarza (Jordan i Bisgaard 2011). Obserwowany w ostatniej dwóch dekadach wzrost liczby zachorowań na różycę w stadach drobiu może mieć związek ze zmieniającymi się warunkami środowiska, intensyfikacją produkcji drobiu i prowadzeniem jej na zewnątrz (przede wszystkim gęsi) oraz zwiększonym stosowaniem środków przeciwdrobnoustrojowych. U kur niosek wzrosła liczba przypadków różycy po zmianie chowu z konwencjonalnego systemu klatkowego na alternatywne systemy utrzymania (Eriksson i wsp. 2014). Różycę obserwuje się częściej w obiektach hodowlanych z nieutwardzonym podłożem, rzadziej w budynkach z betonową podłogą (Jordan i Bisgaard 2011).

### 1.3.3. Drogi zakażenia

Droga zakażenia włoskowcem różycy u ptaków wciąż pozostaje niejasna, ale najprawdopodobniej dochodzi do niego ze środowiska przez uszkodzoną skórę lub błony śluzowe, głównie przewodu pokarmowego. Urazy skóry mogą powstawać podczas walk ptaków, skubania przez nie piór lub w zaburzeniach behawioralnych związanych z kanibalizmem (Eriksson i wsp. 2014). Do infekcji może także dochodzić podczas

szczepień oraz sztucznej inseminacji stosowanej głównie u indyczek (Jordan i Bisgaard 2011). Źródłem zakażenia może być woda, gleba i ściółka, do której dostały się odchody i/lub wydzieliny zwierząt zakażonych *E. rhusiopathiae*. Rola wektorów w przenoszeniu choroby jest niejasna. Postuluje się, że ptaszyniec kurzy (*Dermanyssus gallinae*) może przenosić *E. rhusiopathiae* na fermach drobiu i pomiędzy nimi (Eriksson i wsp. 2010). W eksperymentach *in vivo* wykazano, że różycza może rozwinąć się u ptaków w następstwie zakażenia *per os*, jak również po podskórnym i domięśniowym podaniu patogenu (Bricker i Saif 1997). Zaobserwowano przy tym, że zachorowalność i śmiertelność uzależniona jest od drogi zakażenia oraz wieku ptaków. [brak rozwinięcia info o wieku] W przypadku indyków dawka letalna wynosiła od  $10^4$  do  $10^6$  jtk podanych podskórnym lub *per os*. Upadki występowały po 44-120 godzinach od ekspozycji na patogen. W następstwie zakażenia *per os* objawy (depresja, znużenie, stroszenie piór, opadanie skrzydeł) występowały później, a śmiertelność była niższa niż w przypadku podania parenteralnego (Bricker i Saif, 1997).

#### 1.3.4. Objawy

Różycza u ptaków o zazwyczaj rozpoczyna się nagle. Na fermie pojawiają się martwe osobniki, a ich liczba w stadzie wzrasta w ciągu 48 godzin. Zakażenie ma postać posocznicy, której może towarzyszyć depresja, problemy z poruszaniem i koordynacją (Bobrek i wsp. 2013), a niekiedy również pociemnienie i zgrubienie skóry. Na nieopierzonych częściach skóry pojawiają się różnej wielkości zasinienia. U indyków obserwuje się sinicę tkanek głowy oraz obrzęk i zasinienie prącia i koralu (Jordan i Bisgaard, 2011). U kaczek mogą występować obszary ciemnego przebarwienia błony pławnej pomiędzy palcami. Janowska i wsp. (1978) u gęsi zakażonych włoskowcem różycy zaobserwowano osowiałość, całkowitą utratę apetytu, powłóczenie nogami oraz charakterystyczne pochylenie całego tułowia ku przodowi. U niosek występuje obrzęk spojówek i spadek produkcji jaj (Crespo i wsp. 2019). U indyczek spadek nieśności podczas różycy może sięgać nawet 50–70% (Bobrek i wsp. 2013). U ptaków dotkniętych chorobą obserwuje się wybroczyny i przekrwienia w mięśniach piersiowych i nóg. U indyków może występować wegetatywne zapalenie wsierdzia, zazwyczaj bezobjawowe, ale prowadzące do nagłych upadków (Bobrek i wsp. 2013). Zakażenie mające postać ostrej posocznicy charakteryzuje się wysoką śmiertelnością – upadki w stadzie mogą sięgać nawet 50%. W przypadku szybkiego wdrożenia leczenia upadki

zazwyczaj nie przekraczają kilku procent. U ozdowieńców, a także osobników dotkniętych przewlekłą postacią chorobą może dochodzić do stopniowej utraty masy ciała, zmniejszenia nieśności i przewlekłej kulawizny (Jordan i Bisgaard 2011). Po przechorowaniu ptaki są nosicielami patogenu przez okres kilku tygodni i wydają włoskowce z kałomoczem (Pattison i wsp. 2008).

### **1.3.5. Zmiany sekcyjne**

Zmiany sekcyjne u ptaków chorych na różycę są charakterystyczne dla wielonarządowej, rozsianej infekcji o posocznicowym przebiegu (Bricker i Saif 1997). Podczas badania obserwuje się liczne przekrwienia i wybroczyny, zarówno w narządach wewnętrznych jak i mięśniach (piersiowych i nóg) i tkance podskórnej. Wybroczyny widoczne są również w tłuszczu trzewnym i trzustce, która jest biała (Janowska i wsp. 1978). W worku osierdziowym notuje się obecność surowiczego płynu. Wątroba i śledziona są powiększone i przekrwione, podobnie jak nerki. W wątrobie i śledzionie mogą być widoczne punktowe ogniska martwicy wielkości główki szpilki (Takahashi i wsp. 1994). Płuca są zwykle przekrwione. U niosek uszkodzeniu ulega układ rozrodczy, obserwuje się przekrwienie kul żółtkowych oraz zapalenie jajowodu. W zajętych przez włoskowce stawach pojawia się surowiczy lub włóknikowy płyn, najczęściej podczas przewlekłej postaci choroby (Saif i Bricker 2008).

### **1.3.6. Zmiany histopatologiczne**

Zmiany obserwowane w badaniu histopatologicznym zmienionych makroskopowo narządów wewnętrznych potwierdzają ich uszkodzenie w następstwie procesu zapalnego wywołanego przez włoskowce. W mięszu narządów wewnętrznych - wątroby, śledziony i nerek, występują uogólnione zmiany naczyniowe. Śledziona bywa całkowicie zniszczona, w miazdze obserwuje się przerostowe komórki siatkowate i znaczne uszczuplenie puli limfocytów. W trzustce dochodzi do zmian degeneracyjnych, martwicy oraz nacieku granulocytów i leukocytów jednojądrzastych, głównie wokół naczyń krwionośnych, już po 24 godz. od zakażenia (Derakhshanfar i wsp. 2004). Nacieki komórek jednojądrzastych i agregaty bakterii w worku osierdziowym oraz degradację kardiomiocytów we wsierdziu obserwuje się kilka dni po infekcji. Naciekom zapalnym towarzyszą wylewy, przekrwienia, wewnątrznacyniowe skrzepy, złogi kwasochłonnego włóknika. W naczyniach włosowatych i mniejszych naczyniach tętniczych i żylnych



widoczne są także agregaty włoskowców otoczone trombocytami. Zmiany w płucnej wskazują na obrzęk, niedodmę; w badaniu histologicznym tego narządu zauważalne są przekrwienia z rozproszonymi naciekami limfocytarnymi. W mózgu obok przekrwień obserwuje się proliferację komórek glejowych w obszarach okołokomorowych. Naciek zapalny występuje również w błonie maziowej stawów (Bobrek i wsp. 2015).

### 1.3.7. Diagnostyka

Rozpoznanie różycy opiera się na informacjach z wywiadu, ocenie objawów klinicznych i zmian anatomopatologicznych oraz wynikach badania bakteriologicznego. W rozpoznaniu różnicowym bierze się pod uwagę nadostrą postać choroby Newcastle, grypę ptaków oraz infekcję na tle *E. coli*, *P. multocida* lub *R. anatipestifer*. W celu potwierdzenia zakażenia *E. rhusiopathiae* z tkanek padłych ptaków pobiera się wymazy i wykonuje ich posiewy na podłoża hodowlane (najczęściej agar Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej). Próbkę są zazwyczaj pobierane z kilku narządów, w tym wątroby, śledziony, płuc, serca i mózgu, a także ze stawów skokowych. Po uzyskaniu wzrostu bakterii (24-48 godz., w temp. 35-37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>) dokonuje się wstępnej oceny mikrobiologicznej na podstawie morfologii kolonii oraz analizy preparatów barwionych metodą Grama. Sprawdza się także obecność katalazy i oksydazy (wynik negatywny w przypadku *E. rhusiopathiae*) oraz zdolność do wytwarzania siarkowodoru (H<sub>2</sub>S) na podłożu TSI (Triple Sugar Iron Agar) (Jordan i Bisgaard 2011). Do identyfikacji bakterii *E. rhusiopathiae* stosuje się metody biochemiczne (API® Coryne, Biomerieux, Francja) (Bobrek i wsp. 2016), technikę spektrometrii mas MALDI-TOF (Hess i wsp. 2023, Dec i wsp. 2023) lub techniki biologii molekularnej umożliwiające detekcję sekwencji gatunkowo swoistych (PCR standardowy, sekwencjonowanie DNA) (Fidalgo i Riley 2004). Wymienione metody bazują na czystych kulturach bakteryjnych, których pozyskanie zajmuje zwykle 48 godz. Jako alternatywę, w 2010 r. opracowano metodę szybkiej detekcji i identyfikacji *E. rhusiopathiae* na drodze analizy DNA pozyskanego bezpośrednio z tkanek zakażonych zwierząt. Metoda oparta jest na technice multipleks real-time PCR (Pal i wsp. 2010). Analiza sekwencji 16S rDNA uważana za standard w identyfikacji bakterii nie ma zastosowania w przypadku włoskowca różycy, gdyż nie pozwala na zróżnicowanie pomiędzy *E. rhusiopathiae* i *E. tonsillarum* (Kiuchi i wsp. 2000). Aktualnie na rynku dostępne są także gotowe zestawy do identyfikacji włoskowca różycy za pomocą real-time PCR (EryRhu dtec-qPCR, genetic PCR solutions™,

Hiszpania; EXOone *Erysipelothrix rhusiopathiae*, Exopol, Hiszpania, Kylt® *Erysipelothrix rhusiopathiae*, San Group, Niemcy) bądź analiz biochemicznych (VITEK® 2 GP, API® Rapid ID 32 STREP, Biomerieux, Francja) (Zautner i wsp. 2022). Przy wyborze metody identyfikacji patogenu istotnym kryterium jest czas wykonania analizy oraz siła dyskryminacji, koszty i uwarunkowania sprzętowe danego laboratorium.

### 1.3.8. Leczenie

W leczeniu różycy u drobiu stosuje się antybiotykoterapię, najczęściej przy użyciu preparatów zawierających antybiotyki  $\beta$ -laktamowe – penicylinę lub amoksycylinę (Żbikowski i wsp. 2011). Nawet w przypadku wystąpienia różycy u pojedynczych osobników leczeniu poddaje się całe stado. Lekiem z wyboru w terapii różycy są antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, najczęściej amoksycylina. Wykazano, że substancje przeciwdrobnoustrojowe z innych grup niż penicyliny mogą powodować wzrost liczby bezobjawowych nosicieli w stadzie (Corstvet i wsp. 1974). U indyków możliwe jest podanie iniekcyjne penicyliny w dawce ok. 20 000 IU na 1 kg m.c. przez 3 dni łącznie ze szczepionką przeciwko różycy (Ruvax 0,3–0,5 ml na ptaka w zależności od masy ciała). W leczeniu podtrzymującym stosuje się penicylinę w wodzie do picia w dawce 250 000 IU na 1 L wody przez 4–5 dni. Gawel i wsp. (2007) oraz Bobrek i Gawel (2015) w leczeniu gęsi zakażonych włoskowcem różycy stosowali amoksycylinę (w dawce 20 mg/kg m.c. przez 5 dni) oraz enrofloksacynę (w dawce 10 mg/kg m.c., przez 5 kolejnych dni). W badaniach z udziałem pojedynczych (n=3) szczepów *E. rhusiopathiae* wyizolowanych od gęsi z różycą w Polsce stwierdzono ich wrażliwość na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe oraz linkomycynę ze spektynomycyną; izolaty były natomiast odporne na tetracykliny i antybiotyki aminoglikozydowe i różniły się stopniem wrażliwości na fluorochinolony (Rzewuska i wsp. 2010, Bobrek i wsp. 2016).

Z obserwacji własnych wynika, że antybiotykoterapia zazwyczaj przynosi oczekiwane efekty, jednakże po zaprzestaniu podawania leku często odnotowuje się nawroty choroby. Uważa się, że włoskowiec różycy może utrzymywać się w stadzie nawet przez kilka miesięcy. Dodatkowy problem w leczeniu różycy drobiu wodnego stanowi dość długi okres karencji dla antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, w tym amoksycyliny, który w przypadku gęsi wynosi 14 dni, a dla kaczek 9 dni (Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/6 z dn. 11 grudnia 2018 r. w sprawie weterynaryjnych produktów leczniczych i uchylające dyrektywę 2001/82/WE, Dz.U.UE.L.2019.4.43, wersja obowiązująca od 28 stycznia 2022 r.). W sytuacji kiedy różycyca nawraca w okresie

karencji tuż przed terminem uboju, hodowcy i lekarze weterynarii mając na szali z jednej strony zdrowie leczonych stad, a z drugiej przestrzeganie czasu karencji antybiotyku, często popadają w błędne koło.

### 1.3.9. Prewencja

W profilaktyce różycy ważne jest zachowywanie zasad bioasekuracji, które zapobiegają transmisji szczepów *E. rhusiopathiae* do stad drobiu i pomiędzy nimi. Fermy drobiu wodnego nie powinny znajdować się w bezpośrednim sąsiedztwie hodowli trzody chlewnej, tak aby ograniczyć bezpośredni lub pośredni kontakt ptaków ze sprzętem chlewni i gnojownicą świńską. Do dezynfekcji budynków należy używać 1–2% roztworu sody kaustycznej, skuteczne są także fenole, krezole i ich pochodne. Zalecane jest także odkażanie wybiegów za pomocą wapna palonego (1 kg na 10<sup>2</sup> powierzchni), którym posypuje się glebę, a następnie przekopuje lub zaoruje (Żbikowski i wsp. 2011). Tego typu zabieg wydaje się być jednak bezzasadny z racji tego, iż wapno palone podnosi pH gleby, a włoskowiec różycy preferuje pH alkaiczne (rośnie w zakresie pH 6,8–8,2) (Stackebrandt i wsp. 2015).

Prewencja różycy wymaga także zapewnienia ptakom prawidłowych warunków zoohigienicznych, tak by w jak największym stopniu ograniczyć ich stres, który uważany jest za ważny czynnik uspasabiający do rozwoju zakażenia na tle *E. rhusiopathiae* (Żbikowski i wsp. 2011).

W profilaktyce różycy u drobiu stosuje się także szczepionki - z reguły preparaty zarejestrowane dla trzody chlewnej. Zawierają one szczepy *E. rhusiopathiae* stereotypu 1a i 2, które są najczęściej izolowane z przypadków różycy u świń i uważane za najbardziej zjadliwe dla tych zwierząt. W skład szczepionki zazwyczaj wchodzi inaktywowane bakteryny jednego lub kilku szczepów, ale w niektórych krajach dostępne są także szczepionki zawierające atenuowane drobnoustroje. Szczepionki inaktywowane podaje się iniekcyjnie, a atenuowane wraz z wodą pitną. W Japonii dostępne są także szczepionki podjednostkowe, zawierające w swoim składzie rekombinowane białko SpaA (Opriessing i wsp. 2020). W Polsce zarejestrowanych jest kilka preparatów przeznaczonych do immunizacji świń; wszystkie są szczepionkami inaktywowanymi (Tab. 1.3). Nie ma natomiast ani jednej szczepionki przeciwko różycy dla drobiu. Stąd, niektórzy lekarze weterynarii podejmują próby ochrony stada przez zastosowanie szczepionek zarejestrowanych dla trzody chlewnej. Z obserwacji własnych wynika jednak, że w przypadku gęsi taka immunizacja zazwyczaj nie przynosi pożądanego efektu, a ponadto

niesie za sobą dodatkowe koszty i jest silnym czynnikiem stresogennym dla ptaków. Według Gawła i wsp. (2007) natomiast dwukrotne podanie podskórnie gęsiom szczepionki inaktywowanej Ruvax, w odstępie trzech tygodni, w dawce 0,5 ml na ptaka, dawało zabezpieczenie przed zachorowaniem na fermach z endemicznie występującą różycą. W przypadku emu, Swan i Lindsey (1998) zastosowali komercyjną szczepionkę zawierającą inaktywowany szczep 2b, uzyskując zadowalające efekty. Szczepionki przeciwko różycy bywają stosowane także u indyków ze stad reprodukcyjnych, którym preparat podaje się na cztery tygodnie przed rozpoczęciem nieśności; szczepienia rzadziej stosuje się u kur niosek. Ptaki wymagają co najmniej dwukrotnej immunizacji w odstępie 2–4 tygodni (Bricker i Saif, 1988).

**Tabela 1.3.** Monowalentne i poliwalentne szczepionki przeciwko różycy świń dostępne w Polsce

Nazwa	Rodzaj szczepionki	Szczepy <i>E. rhusiopathiae</i> i ich serotypy (zgodnie z ulotką producenta)	Producent
Erysin Single Shot	inaktywowana	2-64 serotyp 2a; 2-5 serotyp 2a; 2-II serotyp 2a; 1-203 serotyp 1a	Bioveta, Czechy
Ruvax	inaktywowana	<i>E. rhusiopathiae</i> serotyp 2	Merial S.A.S., Boehringer-Ingelheim Vetmedica, Francja
Eryseng®	inaktywowana	R32E11	Laboratorios Hipra S.A., Hiszpania
Porcilis Ery	inaktywowana	M2, serotyp 2	Intervet International B.V., Holandia
Suibiovac Ery	inaktywowana	OV1, serotyp 1 OV2, serotyp 2	Drwalewskie Zakłady Przemysłu Bioweterynaryjnego S.A., Polska

#### *Autoszczepionki dla drobiu*

Ze względu na brak komercyjnych szczepionek przeciwko różycy dla drobiu coraz częściej w celu ochrony stad stosuje się autoszczepionki, czyli preparaty przygotowane na bazie szczepów wyizolowanych ze stada, dla którego szczepionka jest przeznaczona. Autoszczepionki są dopuszczone do obrotu bez konieczności uzyskania pozwolenia. Zawierają drobnoustroje inaktywowane i podawane są iniekcyjne (Ustawa z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne, Dz.U. nr 45 z dnia 27 lutego 2008 r.). Przygotowaniem takich preparatów, w tym szczepionek na bazie szczepów *E. rhusiopathiae*, zajmuje się w Polsce kilka firm, m.in. Labo-Wet (<http://www.labowet.pl>), RB VAC (<http://rbvac.pl>), Proteon Pharmaceuticals (<https://www.proteonpharma.com/>), Vet Lab Group

(<https://www.vetlabgroup.pl/>) czy Lab-Vet w Tarnowie Podgórnym. Przy produkcji autoszczepionki przeciwko różycy istotne jest, aby szczepy terenowe nie były wielokrotnie pasażowane, ze względu na możliwość zachodzenia podczas tego zabiegu zmian właściwości antygenowych (Zautner i wsp. 2022).

#### 1.4. Różycy jako zoonoza

Włoskowce różycy są bezwzględnie chorobotwórcze dla ludzi. Źródłem zakażenia są zwierzęta, głównie trzoda chlewna i drób, rzadziej ryby. Dlatego w grupie szczególnego ryzyka są hodowcy i pracownicy ferm, lekarze weterynarii, pracownicy ubojni, diagnosty laboratoryjni i rybacy (Taguchi i wsp. 2020). Do zakażenia zwykle dochodzi przez uszkodzone powłoki ciała. Infekcja przebiega jako postać skórna (miejscowe zakażenie skóry; róża, erysipeloid), rzadziej jako rozsiane zakażenie skóry oraz uogólnione zakażenie. W przypadku róży, w miejscu wnikięcia bakterii – najczęściej w obrębie dłoni, pojawia się bolesny, palący i poszerzający się rumień i obrzęk, bez zmian ropnych. Czasem występują objawy ogólne, takie jak bóle stawów, bóle mięśni, zapalenie węzłów chłonnych, gorączka i złe samopoczucie (Zautner i wsp. 2022). Mniej powszechna rozsiana postać skórna przebiega z rozsianymi zmianami obrzękowymi, gorączką, bólem stawów i limfadenopatią. Znacznie rzadziej rozwija się postać uogólniona podczas której dochodzi do zapalenia wsierdza i zajęcia zastawki aortalnej (Oh 2021) lub trójdzielnej (Karambelkar i wsp. 2020). Postać posocznicowa rozwija się zazwyczaj u osób z niedoborami immunologicznymu, starszych, chorujących na nadciśnienie tętnicze, diabetyków oraz nadużywających alkoholu i palaczy (Zautner i wsp. 2022).

#### *Przypadki różycy u ludzi w Polsce*

Polska należy do nielicznej grupy krajów, które w latach 1966-2008 prowadziły ewidencję i rejestrację przypadków różycy objawiającej się u ludzi. Na podstawie otrzymanych danych stwierdzono, że choroba wywoływana przez bakterie *E. rhusiopathiae* jest jedną z najczęściej występujących zoonoz na terenie kraju. W latach 1999-2008 odnotowano 1121 zachorowań, a średnia zapadalność na 100 tys. mieszkańców wynosiła 0,25; 181 osób zostało poddanych hospitalizacji (Knap, 2013). W literaturze istnieje jedno doniesienie nt. zakażenia się człowieka szczepem *E. rhusiopathiae* od gęsi; była to technik laboratoryjna, która skaleczyła się gęsim zębem podczas wykonywania sekcji. W miejscu urazu na dłoni pojawiła się postępująca czerwona zmiana skórna. Dzięki zastosowaniu terapii amoksycylinowej róża ustąpiła

u pacjentki po 5 dniach (Meier i wsp. 2021). O istnieniu takiej drogi zakażenia Autor niniejszej dysertacji przekonał się osobiście, kiedy podczas wykonywania sekcji gęsi na potrzeby doktoratu, zakłuł się w palec wskazujący (Ryc. 1.3.).



**Rycina 1.3.** Zmiany skórne w przebiegu różycy u człowieka (fot. Tomasz Nowak)



## 1. CEL PRACY

Znikome informacje literaturowe na temat występowania różycy u drobiu wodnego oraz cech szczepów *E. rhusiopathiae*, jak również obserwowane w terenie problemy dotyczące kontroli zakażeń włoskowcem różycy w stadach gęsi i kaczek przyczyniły się do wyboru tematu niniejszej pracy doktorskiej.

Występowanie różycy u drobiu wodnego zostało dotychczas opisane jedynie w kilku pracach kazuistycznych, w tym krajowych autorstwa Kamili Bobrek i Andrzeja Gawła (2015), Kamili Bobrek i wsp. (2016) oraz Ireny Janowskiej i wsp. (1978). Wspomniane doniesienia dotyczą zakażeń w stadach gęsi i zawierają głównie opisy zmian sekcyjnych oraz histopatologicznych, a analizy bakteriologiczne obejmują pojedyncze izolaty włoskowca różycy. W dostępnej literaturze nie ma ani jednej pozycji kompleksowo opisującej serotypy, lekowrażliwość, genotypowe profile oporności i czynniki wirulencji szczepów *E. rhusiopathiae* wywołujących różycę u drobiu wodnego. Brak jest również zbiorczych opracowań dotyczących obrazu klinicznego zakażeń i czynników usposabiających do wystąpienia choroby.

Celem badań była identyfikacja i charakterystyka fenotypowa i genotypowa szczepów *E. rhusiopathiae* wyizolowanych z klinicznych przypadków różycy u gęsi i kaczek hodowanych w Polsce, a także analiza zmian sekcyjnych u zakażonych ptaków i określenie rozkładu notowanych przypadków różycy w poszczególnych grupach wiekowych ptaków oraz w poszczególnych przedziałach roku kalendarzowego.

Cele szczegółowe obejmowały:

- izolację bakterii *E. rhusiopathiae* od padłych gęsi i kaczek,
- identyfikację izolatów do poziomu gatunku
- określenie rodzaju i częstotliwości występowania zmian anatomopatologicznych u ptaków zakażonych włoskowcem różycy,
- określenie serotypu izolatów *E. rhusiopathiae*,
- określenie lekowrażliwości badanych izolatów oraz wyjaśnienie ewentualnych mechanizmów oporności,
- określenie genotypowych profili wirulencji izolatów *E. rhusiopathiae*,

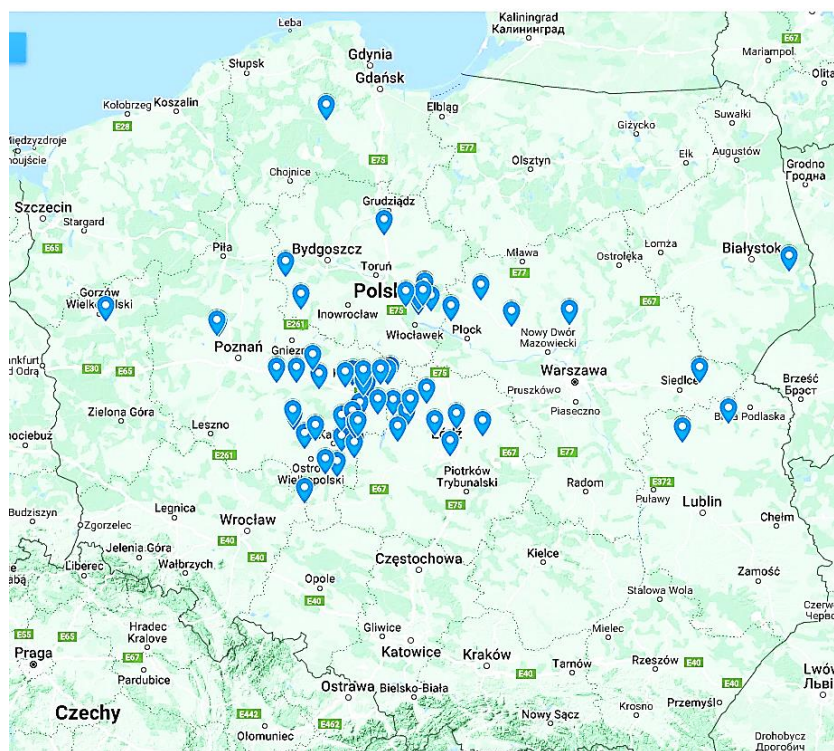


- określenie wariantów białka SpaA występujących u izolatów terenowych i charakterystykę porównawczą sekwencji SpaA w odniesieniu do szczepu szczepionkowego *E. rhusiopathiae* R32E11,
- określenie zróżnicowania genetycznego zebranych izolatów za pomocą rep-PCR i/lub RAPD,
- określenie rozkładu odnotowanych przypadków różycy u gęsi w poszczególnych przedziałach wiekowych oraz w poszczególnych okresach roku kalendarzowego na przestrzeni trzech lat w kontekście próby identyfikacji czynników predysponujących do rozwoju różycy.

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Materiał badawczy

Materiałem wyjściowym do badań były padłe sztuki gęsi i kaczek, dostarczone do Laboratorium Weterynaryjnego Vet-Lab Brudzew dr Piotr Kwieciński w celach diagnostycznych w okresie od 01. 2019 do 12. 2021 r. Ptaki, w tym 286 gęsi (200 sztuk ze stad przeznaczonych na tucz i 86 sztuk ze stad reprodukcyjnych) i 16 kaczek (ze stad reprodukcyjnych), pochodziły z 99 ferm krajowych zlokalizowanych w 59 miejscowościach (w niektórych miejscowościach różycza występowała na więcej niż 1 fermie), głównie w województwie wielkopolskim (Ryc. 3.1). Z danej fermy do badania laboratoryjnego przekazywano od 1 do 4 sztuk ptaków.



Ryc. 3.1. Lokalizacja ferm drobiu wodnego, z których pochodziły ptaki zakażone *E. rhusiopathiae*

Tabela 3.1. Liczba ferm, na których w latach 2019-2021 w Laboratorium Weterynaryjnym Vet-Lab Brudzew dr Piotr Kwieciński zdiagnozowano różycę oraz liczba diagnozowanych ptaków

Gatunek i typ użytkowy ptaków	Liczba ferm, z których pochodziły ptaki (gęsi i kaczki), u których zdiagnozowano różycę	Liczba ptaków z objawami różycy dostarczonych do laboratorium w latach 2019-2021 (1-4 ptaki z danej fermy)
Gęsi ze stad na tucz	66	200
Gęsi ze stad reprodukcyjnych	27	86
Kaczki ze stad reprodukcyjnych	6	16
Razem	99	302

### 3.2. Inne materiały wykorzystywane w badaniach

Podczas realizacji badań wykorzystano szereg materiałów, w tym szczepy wzorcowe (Tab. 3.2), odczynniki i zestawy diagnostyczne (Tab. 3.3), podłoża mikrobiologiczne i bufory (Tab. 3.4) urządzenia laboratoryjne (Tab. 3.5), programy komputerowe i narzędzia bioinformatyczne dostępnych online (Tab. 3.6) oraz materiały pomocnicze (Tab. 3.7).

#### Wzorcowe szczepy *Erysipelothrix spp.*

W badaniach dotyczących fenotypowej i genotypowej charakterystyki terenowych izolatów *E. rhusiopathiae* jako kontrolę pozytywną i/lub negatywną wykorzystywano szczepy wzorcowe przynależne do kilku gatunków *Erysipelothrix*, tj. *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*, *E. inopinata*, *E. piscisicarius* sp. nov., *Erysipelothrix* species 1. W przypadku gatunku *E. rhusiopathiae* zastosowano 3 szczepy referencyjne, tj. Fujisawa, ATCC 19414 oraz szczep szczepionkowy R32E11 (stosowany w szczepionce ERYSENG®, Laboratorios Hipra S.A, Hiszpania) (Tab. 3.2). DNA szczepów wzorcowych zostało udostępnione na potrzeby realizacji niniejszej pracy doktorskiej przez dr Yoshihiro Shimoji z Narodowego Instytutu Zdrowia Zwierząt (*National Institute of Animal Health*) w Tsukuba, Japonia. Szczep *E. rhusiopathiae* ATCC 19414 został zakupiony w firmie Argenta Sp. z o.o. (Polska).

**Tabela. 3.2.** Szczepy wzorcowe wykorzystane w badaniach

Szczep wzorcowy	Źródło	Serotyp	Rodzaj antygeny Spa
<i>E. rhusiopathiae</i> ATCC 19414, (GenBank Acc. No. LR134439.1)	świnia	2	SpaA
<i>E. rhusiopathiae</i> Fujisawa, (GenBank Acc. No. AP012027.1)	świnia	1a	SpaA
<i>E. rhusiopathiae</i> R32E11, szczep szczepionkowy	nieznane	2	SpaA
<i>E. rhusiopathiae</i> Bano 36	owca	21	SpaB
<i>E. rhusiopathiae</i> Tuzok	drop	6	SpaB
<i>E. tonsillarum</i> ATCC 43339	świnia	7	brak
<i>E. tonsillarum</i> 2553	świnia	20	brak
<i>E. tonsillarum</i> Wittling	ryba	3	brak
<i>E. species</i> 1 Pecs 56	świnia	13	brak
<i>E. piscisicarius</i> sp. nov. 715 (dawniej <i>E. species</i> 2 strain 715)	świnia	18	SpaC
<i>E. inopinata</i> DSM 15511	bulion warzywny	N	brak

Tabela 3.3. Odczynniki chemiczne, zestawy diagnostyczne

L.p.	Nazwa	Producent
1	Zestaw EXOone <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> do real-time PCR	Exopol, Hiszpania
2	Zestaw do izolacji DNA genomowego z bakterii DNA Extraction Kit II	Kytl, Anicon, Niemcy
3	Zestaw do izolacji DNA genomowego z bakterii – Gene Matrix Basic DNA Purification Kit	Eurx, Polska
4	Polimeraza Dream Taq Green 5U/μl w zestawie z buforem	Thermo Fisher Scientific, USA
5	Polimeraza Dream Taq 5U/μl w zestawie z buforem	Thermo Fisher Scientific, USA
6	Startery do PCR (stężenie po rozpuszczeniu liofilizatu 100 μM)	Genomed, Polska
7	Mieszanina deoksynukleotydów (dNTP) 8 μM	BLIRT SA, Polska
8	Woda do biologii molekularnej, wolna od DNAz i RNAz	MERCK, Polska
9	PCR Mix Plus	A&A Biotechnology, Polska
10	Wzorzec masowy DNA Nova 100 bp (zakres wielkości 100-3000 pz),	Novazym, Polska
11	Wzorzec masowy DNA Marker 2+ (zakres wielkości 50-1000 pz)	A&A Biotechnology, Polska
12	SimplySafe, barwnik fluorescencyjny do wizualizacji DNA na żelu	Eurx, Polska
13	Agaroza, LE Standard	Blirt, Polska
14	Etanol ≥99,8%; do przygotowywania próbek do identyfikacji bakterii za pomocą spektrometrii masowej typu MALDI-TOF	POCH, Polska
15	Kwas mrówkowy (CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ); do ekstrakcji białek z próbek bakterii	MERCK, Polska
16	Acetonitryl (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N), 99,9%; do rozpuszczania matrycy HCCA; do identyfikacji bakterii za pomocą spektrometrii masowej typu MALDI-TOF	MERCK, Polska
17	Kwas trifluorooctowy (C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ), 0,1%, 10 mg/mL; do identyfikacji bakterii za pomocą spektrometrii masowej typu MALDI-TOF	MERCK, Polska
18	HCCA, ang. α-cyano-4- hydroxycinnamic acid – kwas α-cyano-4- hydroksycynamonowy; matryca do identyfikacji bakterii za pomocą spektrometrii masowej typu MALDI-TOF	Bruker, Niemcy
19	Ultraczysta woda LC-MS CHROMASOLV®	Pol-Aura, Polska
20	Tween 80 (monooleinian polioksyetylenosorbitan)	MERCK, Polska
21	Karty biochemiczne VITEK®2 GP	Biomérieux, Francja
22	Antybiotyki i chemioterapeutyki: ampicylina, amoksycylina, ceftiofur, erytromycyna, tylozyna, gentamycyna, streptomycyna, neomycyna, trimetoprim, sulfametoksazol, florfenikol, linkomycyna, spektynomycyna	MERCK, Polska
21	Dalacin C, klindamycyna 150 mg/ml	Pfizer, USA
22	Taromentin (amoksycylina z kwasem klawulanowym), proszek do sporządzania roztworu do infuzji	Polfa Tarchomin, Polska

23	Biomutin, roztwór tiamuliny 200 mg/ml	BIOWET DRWALEW S.A., Polska
24	EPPIC – zestaw do oczyszczania produktów PCR za pomocą metody enzymatycznej	A&A Biotechnology, Polska
25	Cryobank® do długoterminowego przechowywania szczepów w temperaturze do -80°C	Graso Biotech, Polska
26	Kwas borowy (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	MERCK, Polska
27	Tris (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Chempur, Polska
28	Błękit bromofenolowy (C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S)	Pol-Aura, Polska
29	EDTA (sól disodowa kwasu wersenowego)	POCH, Polska
30	NaCl (chlorek sodu)	POCH, Polska

**Tabela 3.4.** Podłoża mikrobiologiczne i bufony

L.p.	Podłoże/bufor	Przygotowanie
1	Columbia Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej	Podłoże agarowe gotowe do użycia (Graso Biotech, Polska)
2	Bulion mózgowo-sercowy BHI (ang. brain heart infusion) z dodatkiem 0,1% Tween'u 80	52 g proszku rozpuszczano w 1 litrze wody destylowanej, ustalano pH na $7,4 \pm 0,2$ , dodawano 0,1% (v/V) Tween 80 (100 µl na 100 ml bulionu), autoklawowano 15 min w 121 °C
3	Columbia CNA Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej	Podłoże agarowe gotowe do użycia (Graso Biotech, Polska)
4	MacConkey Agar	Podłoże agarowe gotowe do użycia (Graso Biotech, Polska)
3	TBE (Tris Borate EDTA) – bufor do elektroforezy DNA – 10x stężony	108 g Tris i 55 g kwasu borowego rozpuszczano w ~800 ml wody destylowanej, następnie dodawano 40 ml roztworu EDTA o stężeniu 0,5 M i pH 8,0 i uzupełniano wodą do 1000 ml; przed użyciem do elektroforezy bufor rozcieńczano wodą w proporcjach objętościowych 1 cz. buforu + 9 cz. wody
4	Bufor obciążający do próbek DNA, do elektroforezy	Do 5 ml glicerolu dodawano 2 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) i błękit bromofenolowy (ostateczne stężenie 250 mg/ml) i uzupełniano wodą destylowaną do 10 ml (błękit bromofenolowy migruje z fragmentami DNA o wielkości ~300 pz w 1% żelu agarozowym)
5	0,85% NaCl	0,85 g NaCl rozpuszczano w 99,15 ml H <sub>2</sub> O destylowanej, autoklawowano 15 min w 121 °C

**Tabela 3.5.** Urządzenia laboratoryjne

Lp.	Nazwa	Producent
1	Termocykler do real-time PCR, model Applied Biosystems™ 7500 FAST	Thermo Fisher Scientific, USA
2	System VITEK® 2 Compact	Biomerieux, Francja
3	Spektrometr mas MALDI-TOF UltrafleXtreme	Bruker Daltonics, Niemcy
4	Komora laminarna, model BIO 100/130	Alpina, Polska
5	Cieplarka z CO <sub>2</sub> , typ INC 108	Memmert, Niemcy
6	Cieplarka z CO <sub>2</sub> , typ ICO 150	Memmert, Niemcy
7	Termocykler, model T100	BioRad, USA
8	Termocykler, model GeneAmp PCR System 2700	Thermo Scientific, USA
9	Aparat do elektroforezy poziomej WideMini-Sub Cell GT	BioRad, USA
10	PowerPac™ Basic - zasilacz do aparatu do elektroforezy	BioRad, USA
11	Aparat do elektroforezy poziomej Gel casting system S	Analytic Jena
12	zasilacz do aparatu do elektroforezy Stabnap 200	Kucharczyk, Polska
13	System do dokumentacji żeli elektroforetycznych GelDoc Go Imaging System	BioRad, USA
14	Zamrażarka niskotemperaturowa (-80°C), model: U570-86	New BrunswickScientific, Wielka Brytania
15	Spektrofotometr MaestroNano MN-917 (pomiar stężenia DNA)	MaestroGen Inc., Tajwan
16	Spektrofotometr NanoDrop Lite (pomiar stężenia DNA)	Thermo Scientific, USA
17	Łaźnia wodna W820E (do ekstrakcji DNA z bakterii)	Laboplay, Polska
18	Termoblok, RED-HOT 35 Digital	DNA Gdańsk, Polska
19	Lodówko-zamrażarka	Bosch, Niemcy
20	Waga laboratoryjna, WSP 600/C	Radwag, Polska
21	Waga analityczna, WPA 60/C	RADWAG, Polska
22	Wirówka szybkoobrotowa, model: 3K30 (o izolacji DNA genomowego z bakterii)	Sigma, Polska
23	Miniwirówka, model: SBS-MZ-4000/6-1.5	Steinberg Systems, Niemcy
24	Vortex, model: 7-2020	neoLab, Niemcy
25	pH metr	Orion, USA
26	Mieszadło magnetyczne n.s PORCELANA z grzaniem, manual, 06-MS-H-S P	Chemland, Polska
27	Autoklaw TINGET® STE-23L	Tinget, Polska

**Tabela 3.6.** Programy komputerowe i narzędzia bioinformatyczne dostępne online

Lp.	Nazwa	Producent
1	High Resolution Melt (HRM) Software v2.0 – program do zbierania i analizy wyników real-time PCR	Thermo Fisher Scientific, USA
2	ImageLab 6.1 – program do analizy żeli elektroforetycznych	BioRad, USA
3	FlexControl – narzędzie do analizy widm masowych uzyskiwanych w spektrometrii masowej typu MALDI-TOF	Bruker Daltonics, Niemcy
4	MALDI BioTyper 3.1 – system do identyfikacji mikroorganizmów w oparciu o analizę ich widm masowych	Bruker Daltonics, Niemcy
5	ORF Finder - narzędzie do zamiany sekwencji DNA na sekwencje białka	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/</a>
6	MEGA X – program bioinformatyczny do analizy sekwencji DNA i aminokwasowych, pozwala na wykreślenie dendrogramu obrazującego podobieństwo pomiędzy sekwencjami różnych szczepów	<a href="http://www.megasoftware.net">www.megasoftware.net</a> , USA
7	Chromas Lite2.6.6c – program do analizy sekwencji DNA (analiza chromatogramów)	Informer Technologies, Australia
8	Microsoft Word 2019	Microsoft Office 365, USA
9	Nucleotide BLAST, narzędzie online do porównywania uzyskanej sekwencji DNA z sekwencjami zdeponowanymi w bazie GenBank	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
10	BlankIt – narzędzie online do deponowania sekwencji DNA w GenBank	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/</a>
11	BioEdit 7.2 – narzędzie do analizy porównawczej sekwencji DNA i aminokwasowych (ang. alignment)	<a href="https://bioedit.software.informer.com/7.2/">https://bioedit.software.informer.com/7.2/</a>
12	Sequence Reverse and Complement Online Tool – do odwracania sekwencji DNA (ang. reverse complement); zabieg wykorzystywany przy składaniu sekwencji DNA uzyskanych z obu nici DNA w całość (tworzenie konsensusu)	<a href="http://www.cellbiol.com/scripts/complement/dna_sequence_reverse_complement.php">http://www.cellbiol.com/scripts/complement/dna_sequence_reverse_complement.php</a>
13	VITEK®2 Systems, version 8.02.	Biomerieux, Francja

**Tabela 3.7.** Materiały pomocnicze

L.p.	Nazwa	Producent
1	Pipety automatyczne 1-kanalowe (o poj. 2, 10, 100, 100, 1000, 5000 µl)	Eppendorf, Polska
2	Pipeta automatyczna 8-kanalowa i pipeta 12-kanalowa (Discovery Pro)	Corning HTL SA, Polska
3	Końcówki do pipet automatycznych	Eppendorf, Polska i ULPLAST Sp. z o.o., Polska
4	Ezy mikrobiologiczne polistyrenowe 10 µl	Medlab, Polska
5	Probówki do hodowli bakterii	Medlab, Polska

6	Probówki 0,2 ml do PCR	Nest Scientific Biotechnology, Chiny
7	Płytki 96-dołkowe do real-time PCR, MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction	ThermoFisher Scientific, USA
8	Probówki typu eppendorf safe-lock, 1,5 ml	Nest Scientific Biotechnology, Chiny
9	Płytki 384 MTP AnchorChip TF ze stali nierdzewnej do nakładania próbek do spektrometrii mas MALDI-TOF	Bruker Daltonics, Niemcy
10	Płytki titracyjne 96-dołkowe	Anicrin, Włochy
11	Pokrywki do płytek titracyjnych 96-dołkowych	Anicrin, Włochy
12	Jałowe skalpele	Intergos, Polska

### 3.3. Określenie rozkładu notowanych przypadków różycy w grupach

Dane kliniczne dotyczące wszystkich przypadków różycy, potwierdzonych w Laboratorium Weterynaryjnym Vet-Lab Brudzew dr Piotr Kwieciński w latach 2019-2021, były archiwizowane. Zawierały one informacje o dacie wykonania badania diagnostycznego, gatunku i wieku ptaków, a w przypadku wykonywania badania anatomopatologicznego również informacje o rodzaju zmian sekcyjnych. Na podstawie zgromadzonych danych klinicznych określono rozkład przypadków różycy u ptaków w poszczególnych przedziałach wiekowych oraz okresach roku kalendarzowego. Zależność wyników zaobserwowanych z teoretycznie zakładanym rozkładem (założono, że rozkład liczby przypadków różycy w poszczególnych grupach powinien być równomierny) określono za pomocą testu chi<sup>2</sup>; w przypadku występowania małych licznosci oczekiwanych, co miało miejsce w analizie rozkładu przypadków różycy w poszczególnych okresach roku kalendarzowego, zastosowano poprawkę Yatesa. Wynik uznawano za statystycznie istotny przy  $p < 0,05$ . Analizę wykonano w programie Excel (Office 2019, Microsoft Corporation, USA).

### 3.4. Badania sekcyjne

Wybrane padłe gęsi (n=76, z danego stada od 1 do 4 sztuk) i kaczki (n=9, po 3 sztuki z danego stada), u których potwierdzono zakażenie *E. rhusiopathiae* poddawano badaniu anatomopatologicznemu, w którym oceniano zmiany w narządach wewnętrznych (wątroba, śledziona, nerki, jelita, trzustka, płuca, serce), tchawicy, workach powietrznych, skórze, tkance podskórnej, mięśniach oraz kulach żółtkowych w przypadku stad nieśnych.

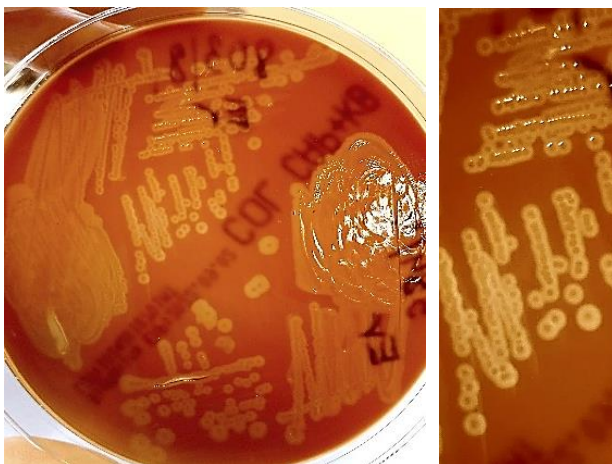


Oceniano także wystąpienie obrzęku lub wydzieliny w stawach skokowych. W badaniach różnicowych brano pod uwagę uogólnioną infekcję *E. coli*, *P. multocida* lub *R. anatipestifer*.

### 3.5. Izolacja szczepów *E. rhusiopathiae*

Padłe ptaki poddawano diagnostyce mikrobiologicznej. W tym celu z ich wątroby i śledziony pobierano materiał przy użyciu wyżarzonej ezy. Dodatkowo przy pomocy jałowych wymazówek bakteriologicznych pobierano wymazy z tkanki mięśnia sercowego lub/i mózgu, worków powietrznych stawów lub kul żółtkowych. Przed pobraniem materiału narządy były nacinane przy pomocy jałowego skalpela, a wymazy pobierane z wnętrza narządów. Wymazy z mózgu pobierano przez kanał kręgowy po uprzednim odkażeniu i nacięciu jałowym skalpelem części potylicznej czaszki.

Wymazy posiewano na podłoże agarowe Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej (GRASO Biotech, Polska), agar MacConkeya (Grasso, Polska) (wykluczenie kolibakteriozy) oraz podłoże agarowe Columbia CNA Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej (GRASO Biotech, Polska) (wykluczenie zakażeń *Streptococcus* sp. i *Enterococcus* sp.) Płytki z podłożem Columbia inkubowano 24 godz. (a w przypadku braku wzrostu 48 godz.) w temp. 37°C, w atmosferze z dodatkiem 5% CO<sub>2</sub>. W przypadku uzyskania wzrostu bakterii o drobnych płaskich (do 1 mm średnicy), szaro-przezroczystych i ewentualnie hemolizujących koloniach (Ryc. 3.2) przesiewano je ponownie na podłoże agarowe Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej w celu izolacji czystych kultur. Po potwierdzeniu tożsamości taksonomicznej szczepy bankowano przy użyciu kriobanku (Biomaxima, Polska) lub poprzez dodanie ~20% (obj./obj.) glicerolu do zawiesiny bakterii w bulionie BHI (obj./obj.) i przechowywano w -75°C do dalszych analiz.



**Rycina 3.2.** Hemoliza alfa wywołana przez szczepy *E. rhusiopathiae* rosnące na agarze Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej, po 48 godz. inkubacji w 37°C (fot. Tomasz Nowak)

### 3.6. Identyfikacja szczepów *E. rhusiopathiae*

Wyizolowane bakterie (łącznie 134 izolaty), które na agarze Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej rosły w postaci małych półprzezroczystych kolonii identyfikowano przy użyciu komercyjnego testu *Erysipelothrix* PCR Detection Kit (Exopol, Hiszpania) opartego na technice PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR).

Dodatkowo, w celu analizy porównawczej szybkich metod identyfikacji *E. rhusiopathiae*, 57 izolatów (52 izolaty od gęsi i 5 izolatów od kaczek) zostało poddanych identyfikacji także za pomocą

- a) metody spektrometrii mas typu MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Niemcy)
- b) kart biochemicznych i systemu VITEK® 2 Compact (Biomerieux, Francja).

#### 3.6.1. Real-time PCR

Identyfikację zebranych izolatów bakteryjnych przeprowadzono za pomocą zestawu EXOone *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Exopol, Hiszpania) i aparatu 7500 FAST (AppliedBiosystems, Thermofisher, USA). Metoda pozwala na detekcję produktu PCR (sekwencje specyficzne dla gatunku *E. rhusiopathiae*) w czasie rzeczywistym. Analiza przebiegu reakcji jest możliwa dzięki detekcji emisji fluorescencji z wyznakowanych sond. Amplikony *E. rhusiopathiae* wykrywane są we fluorescencyjnym kanale dla barwnika FAM (*carboxyfluorescein*, wzbudzenie 493 nm, emisja 517 nm). W przebiegu badania jednocześnie prowadzona jest wewnętrzna kontrola amplifikacji (IC, ang. *internal control*) oparta na powielaniu określonych sekwencji na matrycy syntetycznych oligonukleotydów dodanych przez producenta do mieszaniny reakcyjnej. IC pozwala na ocenę poprawności przebiegu reakcji oraz wykluczenie czynników hamujących PCR. Sonda do detekcji IC wyznakowana jest barwnikiem HEX (*hexachlorofluorescein*, wzbudzenie 533 nm, emisja 559 nm).

#### *Ekstrakcja DNA genomowego z bakterii (dotyczy tylko metody real-time PCR)*

Całkowite DNA *E. rhusiopathiae* wyizolowano za pomocą komercyjnego zestawu DNA Extraction Kit II (Kylt, Niemcy). Z czystej kultury bakteryjnej wyrosłej na podłożu Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej (Graso, Polska) pobierano kolonie i zawieszano w 500 µl DNA Extraction II Mix. Po zworteksowaniu próbkę inkubowano w łaźni wodnej o temperaturze 100 °C przez 15 min., worteksując co 5 min. Po zakończonej inkubacji próbki wirowano 5 min., 12 000 x g, a uzyskany supernatant stanowiący źródło DNA używano do real-time PCR. Stężenie DNA w próbkach mierzone metodą spektrofotometrii

UV/VIS (spektrofotometr nano, Maestrogen, Tajwan) wynosiło od 100 do 800 ng/μl. Do real-time PCR stosowano roztwory DNA o stężeniu 100-200 ng/μl (wyjściowe próbki DNA o wyższym stężeniu DNA były rozcieńczane wodą do biologii molekularnej). Wyizolowane DNA przechowywano w -20 °C.

#### Protokół real-time PCR

Zestaw EXOone *Erysipelothrix rhusiopathiae* zawiera gotową do użycia mieszaninę reakcyjną (na 100 reakcji), zawierającą startery, deoksynukleotydy (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) sondy wyznakowane fluorescencyjnie, bufor zapewniający właściwe środowisko reakcji, polimerazę DNA, oraz określoną liczbę kopii syntetycznych oligonukleotydów (wewnętrznej kontroli amplifikacji, IC). W skład zestawu wchodzi też kontrola pozytywna (syntetyczny łańcuch oligonukleotydów zawierający  $5 \times 10^5$  kopii DNA w 5 μl) w postaci fiolek z liofilizatem, który rozpuszczano w 250 μl ultraczystej wody wolnej od nukleaz, wg rekomendacji producenta. Kontrolę negatywną, którą stanowiła ultraczysta woda wolna od nukleaz, analizowano każdorazowo równolegle z próbkami badanymi i kontrolą pozytywną. Dodatkowo jako drugą kontrolę pozytywną stosowano DNA wyizolowane ze szczepu wzorcowego *E. rhusiopathiae* ATCC® 19414.

Reakcję przeprowadzano na płytkach MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL. Do każdej studzienki nanoszono 15 μl mieszaniny reakcyjnej i 5 μl wyizolowanego DNA. Równolegle nastawiano reakcję dla kontroli pozytywnych i kontroli negatywnej, w tych samym proporcjach: 15 μl mieszaniny reakcyjnej i 5 μl kontroli. Reakcje prowadzono zgodnie z wytycznymi producenta (Exopol, Hiszpania):

- aktywacja polimerazy 95°C – 5 min.
  - denaturacja DNA 95°C – 15 sek.
  - przyłączanie sond i wydłużanie łańcucha 60°C – 1 min  
(całkowity czas trwania cyklu 1 godz. i 29 min)
- } 40 cykli

Obecność produktu PCR wykrywano na kanale FAM, a kontroli IC na kanale HEX. Wynik reakcji był wyrażany w wartości Ct (*threshold cycle*) oznaczającej liczbę cykli reakcji wymaganych do zsyntetyzowania takiej liczby cząsteczek produktu, która generuje sygnał fluorescencyjny o intensywności przekraczającej tzw. wartość progową (Ft, ang. *fluorescence treshold*). Próbkę uznawano za pozytywną dla *E. rhusiopathiae*, jeśli krzywa FAM była pozytywna przy Ct ≤38, niezależnie od krzywej HEX. Próbkę uznawano za negatywną dla *E. rhusiopathiae* gdy krzywa HEX była pozytywna przy Ct 22-37, a krzywa FAM była negatywna. Reakcje uznawano za niemożliwą do oceny w przypadku gdy obie

krzywe – FAM i HEX były negatywne W przypadku uzyskania wyniku wątpliwego (Tab. 3.8) ponownie dokonywano pomiaru stężenia DNA w próbce i oceniano jego czystość (w razie potrzeby DNA rozcieńczano), a jeśli wynik nadal był wątpliwy przeprowadzano ponowną izolację DNA.

**Tabela 3.8.** Kryteria stosowane przy analizie wyników identyfikacji *E. rhusiopathiae* za pomocą real-time PCR

<b>Próbka FAM, pozytywna <math>\leq 38</math></b>	<b>Kontrola pozytywna FAM</b>	<b>Kontrola negatywna FAM</b>	<b>Kontrola wewnętrzna HEX</b>	<b>Wynik</b>
dodatni	dodatni	ujemny	dodatni/ujemny*	dodatni
ujemny	dodatni	ujemny	dodatni	ujemny
ujemny	dodatni	ujemny	ujemny	wynik wątpliwy
dodatni/ujemny	ujemny	ujemny	dodatni/ujemny	wynik wątpliwy
dodatni/ujemny	dodatni	dodatni	dodatni/ujemny	wynik wątpliwy

\* w przypadku pozytywnego sygnału z kanału FAM dla próbki badanej, sygnał kontroli IC (HEX) mógł być negatywny, przy bardzo wysokiej emisji fluorescencji dla FAM

### 3.6.2. Spektrometria mas typu MALDI-TOF

Do identyfikacji szczepów *E. rhusiopathiae* wykorzystano spektrometr masowy UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Niemcy) i standardową metodę z ekstrakcją białek z komórek bakteryjnych (Dec i wsp. 2021).

#### *Przygotowanie próbek bakterii*

Kilkadziesiąt kolonii bakteryjnych, wyprowadzonych z pojedynczej czystej kolonii, wyrosłych na agarze Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej pobierano jednorazową sterylną eżą i zawieszano w 150  $\mu$ l ultraczystej wody (LC-MS CHROMASOLV, Pol-Aura), mieszano przy użyciu worteksu, a następnie dodawano 450  $\mu$ l etanolu (99,8%, POCh S.A.) i ponownie mieszano. W takiej formie próbki przechowywano w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  przez 1-2 tygodnie.

#### *Ekstrakcja białek z próbek bakterii*

Ekstrakcja białek przeprowadzono przy użyciu kwasu mrówkowego i acetonitrylu wg procedury zalecanej przez firmę Bruker Daltonics ([www.bruker.pl](http://www.bruker.pl)). W dniu analizy zawiesiny bakterii odwirowywano ( $13\ 000 \times g$ , 5-7 min), supernatant usuwano, a do osadu bakteryjnego dodawano 40  $\mu$ l 70% kwasu mrówkowego (Merck, Polska); po zamieszaniu (worteks, 1 min) do próbek dodawano 40  $\mu$ l  $\geq 99,9\%$  acetonitrylu (Merck, Polska),

ponownie mieszano (worteks, 1 min) i odwirowywano ( $13\,000 \times g$ , 2,5 min). Supernatant (ekstrakt białkowy) każdego izolatu był наносzony w objętości 1  $\mu\text{l}$  na trzy pozycje dedykowanej płytki ze stali szlachetnej MTP 384 polished steel BC (Bruker Daltonics, Niemcy). Następnie na każdy spot nakładano po 1  $\mu\text{l}$  świeżo przygotowanego roztworu matrycy (kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy HCCA, Bruker Daltonics Niemcy, rozpuszczony w mieszaninie acetonitrylu (50%), kwasu trifluorooctowego (2,5%) i wody (47,5%), 10 mg/mL) i pozostawiano do współkryształizacji na 1 min. Tak przygotowaną płytkę wkładano do urządzenia. Spektrometr masowy kalibrowano przy użyciu wzorca bakteryjnego *E. coli* DH5 alfa (Bruker Daltonics, Niemcy). Finalne widmo masowe było generowane w następstwie 2000 uderzeń wiązki lasera na dany spot. Widma mas o zakresie mas 2-20 kDa zbierano przy pomocy programu FlexControl 4.3 (Bruker Daltonics, Niemcy).

#### *Analiza uzyskanych widm masowych*

Zebrane widma mas zostały przyrównane do widm szczepów wzorcowych z bazy danych MALDI Biotyper 3.1 (Build 66) (Bruker Daltonics) zawierającej łącznie 8468 widm mas, w tym widma 10 szczepów *E. rhusiopathiae* (*E. rhusiopathiae* B9788 IBS, *E. rhusiopathiae* DSM 5055 (ATCC 19414), *E. rhusiopathiae* DSM 5056, *E. rhusiopathiae* DSM 5057, *E. rhusiopathiae* DSM 5058, *E. rhusiopathiae* EDQM Serotyp 1 FLR, *E. rhusiopathiae* EDQM Serotyp 2 FLR, *E. rhusiopathiae* ERY604 IBS, *E. rhusiopathiae* ERYB19478 IBS, *E. rhusiopathiae* FF XI SerotypN FLR) oraz 1 szczep *E. tonsillarum* DSM 14972T (ATCC 43339).

Wiarygodność wyników identyfikacji została określona wg kryteriów zaproponowanych przez firmę Bruker Daltonics (Niemcy): wartość log 2,300-3,000 – wysoce prawdopodobna identyfikacja do poziomu gatunku, 2,000-2,300 – prawdopodobna identyfikacja gatunku, 1,700-1,999 – prawdopodobna identyfikacja do poziomu rodzaju, 0,000-1,699 – niewiarygodna identyfikacja.

#### *Analiza porównawcza widm masowych szczepów E. rhusiopathiae*

Profile widm mas (MSP ang. Main Spectrum) zostały wygenerowane na podstawie trzech widm mas uzyskanych dla danego szczepu. Dopasowanie i grupowanie (generowanie MSP) prowadzono przy zastosowaniu ustawień standardowych, tj. maksymalna tolerancja błędu masy dla każdego widma - 2000 ppm, pożądany błąd masy dla MSP - 200 ppm, pożądana minimalna częstotliwość pików - 25%, maksymalna pożądana liczba pików - 70. Dendrogram obrazujący podobieństwo pomiędzy MSP

poszczególnych szczepów *E. rhusiopathiae* został wygenerowany przy użyciu dedykowanych narzędzi zaimplementowanych do programu MALDI Biotyper 3.1. Hierarchiczną analizę skupień wykonano za pomocą metody średnich połączeń (UPGMA, *unweighted pair group method with arithmetic mean*). Odległość między szczepami została wyrażona w jednostkach arbitralnych.

### 3.6.3. Identyfikacja *E. rhusiopathiae* przy użyciu kart VITEK® 2 GP

Obok spektrometrii mas typu MALDI-TOF i testów real-time PCR zebrane izolaty *E. rhusiopathiae* były także identyfikowane przy użyciu kart z panelem biochemicznym VITEK® 2 GP (ang. *Gram-positive*) i systemu VITEK® 2 Compact (Biomerieux, Francja). W studzienkach karty umieszczone są 43 substraty pozwalające na ocenę zdolności szczepów do utylizacji określonych źródeł węgla, wzrostu w obecności wybranych substancji oraz występowania u nich określonych enzymów (Tab. 4.5). Karty VITEK® 2 GP umożliwiają identyfikację ponad 120 gatunków bakterii Gram-dodatnich ([www.biomerieux.pl](http://www.biomerieux.pl)).

Badanie wykonano wg protokołu producenta. W pierwszym etapie przygotowano zawiesiny bakterii. W tym celu świeże kultury bakteryjne wyrosłe na agarze Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej zawieszano w 3 ml jałowego roztworu NaCl (0,45–0,50%, pH 5) tak by gęstość optyczna zawiesiny wynosiła od 0,50 do 0,63 wg skali McFarlanda. Probówki z zawiesinami bakterii oraz karty VITEK® 2 GP ustawiano w kasecie VITEK® 2 (maksymalnie 10 próbek), którą następnie umieszczano w komorze napełniającej urządzenia. Zawiesina bakterii była zasysana z probówki przez rurkę połączoną z kartą, a po napełnieniu kart rurki były od nich automatycznie odcinane. W kolejnym etapie kasetę przenoszono do modułu inkubacyjnego, gdzie dalsze czynności w postaci inkubacji (35,5°C) i odczytu odbywały się automatycznie, bez udziału użytkownika. Wewnątrz urządzenia karty podlegały skanowaniu w odstępach 15-minutowych, a zmiany kolorymetryczne zachodzące w poszczególnych studzienkach karty zapisywane. Analiza wyników była przeprowadzana automatycznie przy wykorzystaniu oprogramowania VITEK® 2 Systems, version 8.02 (Biomerieux, Francja).

Wynik końcowy uzyskiwany automatycznie po kilku godzinach (ok. 2-8 godz.) miał formę procentowego prawdopodobieństwa poprawnej identyfikacji, a na formularzu odczytu karty dla każdej studzienki był przypisany jeden z czterech symboli, tj.

- „+” – wynik dodatni
- „-” – wynik ujemny
- „(-)” – wynik słabo ujemny
- „(+)” – wynik słabo dodatni

Uzyskiwane wyniki były przypisywane do jednej z kilku kategorii:

- 1) *Excellent* - identyfikacja do poziomu gatunku, wytypowany tylko 1 gatunek, wynik jednoznaczny, wartość identyfikacji 96 to 99 %
- 2) *Very Good* - identyfikacja do poziomu gatunku, wytypowany tylko 1 gatunek, wynik jednoznaczny, wartość identyfikacji 93 to 95 %
- 3) *Good* - identyfikacja do poziomu gatunku, wytypowany tylko 1 gatunek, wynik jednoznaczny, wartość identyfikacji 89 to 92 %
- 4) *Acceptable* - identyfikacja do poziomu gatunku, wytypowany tylko 1 gatunek, wynik jednoznaczny, wartość identyfikacji 85 to 88 %
- 5) *Low Discrimination* - identyfikacja do poziomu gatunku, wytypowane 2-3 gatunki, wynik niejednoznaczny, wartość identyfikacji to suma wyborów = 100; po wskazaniu przez użytkownika jednego gatunku, prawdopodobieństwo procentowe to liczba związana z wybranym drobnoustrojem.
- 6) *Inconclusive*, wynik niejednoznaczny, wytypowane > 3 gatunki, wykazujące ten sam wzór biochemiczny
- 7) *Unidentified* - brak identyfikacji/nieidentyfikowany (atypowy profil biochemiczny, nie pasujący do żadnego ze szczepów wzorcowych z bazy danych). Konieczne dodatkowe barwienie metodą Grama i sprawdzenie czystości izolatu.

Podobieństwo pomiędzy badanymi izolatami (n=57) w zakresie ich cech biochemicznych zostało określone na podstawie analizy skupień i zobrazowane na dendrogramie (Statistica 13.0, StatSoft, USA). Wykonanie analizy było poprzedzone przygotowaniem matrycy w programie Excel (Microsoft Office 2019), gdzie każda reakcja dodatnia (za wynik pozytywny uznawano: +, (+), i (-); przy kwalifikacji kierowano się wolnym wzrostem bakterii *E. rhusiopathiae*) została oznaczona jako 1, a każda cecha ujemna (-) jako 0. Procent niezgodności pomiędzy szczepami został określony za pomocą metody średnich połączeń (UPGMA) w programie Statistica 13 (StatSoft, USA).

### 3.7. Serotypowanie izolatów *E. rhusiopathiae*

Serotypowanie szczepów *E. rhusiopathiae* (n=60) przeprowadzono w oparciu o cztery protokoły multipleks PCR pozwalające na detekcję sekwencji DNA charakterystycznych dla 16 różnych serowarów (1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21, 23) opisanych dla gatunku *E. rhusiopathiae* (Shimoji i wsp. 2020):

- Multipleks 1: serowary 1a, 1b, 2 i 5
- Multipleks 2: serowary 6, 8, 9, 15 i 21
- Multipleks 3: serowary 4, 12, 17, 19 i 23
- Multipleks 4: serowary 10/11, 16

#### *Izolacja DNA z bakterii E. rhusiopathiae (dotyczy protokołów standardowego PCR)*

DNA genomowe ze szczepów *E. rhusiopathiae* izolowano przy użyciu komercyjnego zestawu Gene MATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (Eurx, Polska) według modyfikacji własnej polegającej na wydłużeniu czasu inkubacji bakterii w buforze lizującym z 15 min do 1 godz. (usunięcie grubej ściany komórkowej jaka występuje u bakterii Gram-dodatnich wymaga dłuższej inkubacji z enzymami litycznymi). Analizę ilościową i jakościową próbek wyizolowanego DNA przeprowadzono przy wykorzystaniu spektrofotometru NanoDrop Lite (ThermoScientific, USA). Stężenie DNA w próbkach wynosiło ~15-30 ng/μl. Stosunek A260/280 dla wszystkich próbek wynosił  $\geq 1,7$  (próbka nie zanieczyszczona białkami), a współczynnik A260/230 mieścił się w zakresie 1,7-2,2 (preparat czysty, brak kontaminacji EDTA, etanolu, polisacharydów). Jakość DNA genomowego oceniano także za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym (1,5% w/v). Tylko próbki DNA, w których nie zaobserwowano oznak degradacji materiału genetycznego zostały wykorzystane w dalszych analizach (reakcje PCR).

#### *Warunki PCR*

Sekwencje starterów użytych do serotypowania *E. rhusiopathiae*, wielkość produktów PCR oraz temperatury amplifikacji zamieszczono w Tabeli 3.9. Amplifikację przeprowadzano przy wykorzystaniu polimerazy DremTaq Green (ThermoFisher Scientific, USA, 5 IU/μl). Mieszaniny reakcyjne przygotowywano w objętości 12,5 μl; zawierały po 0,06 μl roztworu polimerazy, 0,35 μl każdego ze starterów (stężenie wyjściowe 10 μM), za wyjątkiem 1b-F i 1b-F, które dodawano w objętości po 0,3 μl, 0,7



μl mieszaniny deoksynukleotydów (dNTP, 8 mM) 0,7 μl genomowego DNA (~20 ng/μl) oraz wodę do biologii molekularnej (objętość uzupełniająca do 12,5 μl).

Zastosowany program temperaturowo-czasowy:

- 94°C - 5 min (wstępna denaturacja)
  - 94°C – 40 s (denaturacja)
  - 58°C lub 60 °C – 35 s (przyłączanie starterów do matrycy DNA)
  - 72°C – 60 s /1000 pz (wydłużanie, synteza DNA)
  - 72°C – 8 min (końcowe wydłużanie)
- } 30 cykli

W kontroli pozytywnej użyto DNA szczepów referencyjnych wymienionych w Tabeli 3.2 (serotyp 1a, 2, 6, 21), a w kontroli negatywnej - wodę do biologii molekularnej.

**Tabela 3.9.** Startery użyte do serotypowania izolatów *E. rhusiopathie* (Shiraiwa i wsp. 2018; Shimoji i wsp. 2020)

	Serotyp	Sekwencja starterów (5'→ 3')	Temp. przyłączania starterów [°C]	Wielkość produktu PCR [pz]
Multipleks I	1a	1a-F: CTCCTAACGCTTTAGCACGC 1a-R: TGATCCTTTGCCACTAATGC	60	356
	1b	1b-F: CGAAAGCATCCCTGTAATCAGTTGC 1b-R: TGCCTGTAAAACCTGATCGTCTAAATC		1357
	2	2F: CCACGTCTTCCCACACTACAAAAAAGTAAATTC 2R: TCATCCTAATGCATATCATTATGTGCATATGAA		541
	5	5F: GCACGTTTCCAAATATTGTATCGAGTCT 5R: GAAATAATGCCGATAGATGGAGCACC		194
Multipleks II	6	6F: CAAGGCTTGCGCGTTTGGAC 6R: TTCATGGCATGGTGGTGGCG	58	573
	8	8F: AGCAATAAGATTGTAGATTAGCCAA 8R: TACCTTCCATCTAGGATAATGAAGG		474
	9	9F: AGTTCCTGCAGAAACGCCTT 9R: TGCGTTACTGGGATAATGGG		1370
	15	15F: ACTTAGCTTCGTCGCGTTAATGGC 15R: TCCTGTTCCGAATGAGCATGTTTAC		834
	21	21F: TGTCTGTTAATGCTATCAACGG 21R: ATTGTTTATGCAGGGAATTTAGG		325
Multipleks III	4	4F: TCATCTTTGCTGGAACACCAACGTA 4R: TGTGGGKATTGGAAATTACTTCGGG	58	311
	12	12F: GCTTGACGTACTIONAAGGTTACGAGT 12R: TGATCAAGTTCGTTTAATTGAACCA		453
	17	17F: ATACGGCTTTAGCAGGGCCA 17R: GTCGATGGGAGTTAACGCTG		640
	19	19F: ATTTCGTATTAGCCTCTGCAAATCCG 19R: TTCCAGCAAAATTTCCATCTTGGCG		796
	23	23F: CCAATCTAGCATAGGATGGGAG 23R: ACATTCTTAGCCCAGGACCAGG		1082

Multipleks IV	10/11	10/11F: TCCGCAAGGAAACCACCGTT 10/11R: GTTGCAGTAGCATTTCAGTGTT	58	293
	16	16F: ACCATAGGTGATGCTTCAAATCAGAACA 16R: TGGGTTGTTCAAACCTCACAACACAA		1055

### Rozdział elektroforetyczny produktów PCR i analiza żeli

Produkty PCR nakładano w objętości 8 µl do studzienek w 1,5% żelu agarozowym zawierającym dodatek barwnika fluorescencyjnego SimpySafe (2,5 µl/50 ml roztworu agarozy) i rozdzielano przy napięciu 100 V w buforze TBE w aparacie Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, USA). Żele skanowano w aparacie GelDoc Go (Bio-Rad, USA). Wielkość produktów PCR określano w odniesieniu wzorca wielkości DNA Nova 100 bp (Novazym, Polska, drabinka DNA o zakresie fragmentów DNA od 100 do 3000 pz) za pomocą programu Image Lab 6.1 (Bio-Rad, USA).

### 3.8. Określanie lekowrażliwości szczepów *E. rhusiopathiae*

Antybiotykowrażliwość izolatów *E. rhusiopathiae* (n=60) określono za pomocą metody mikrorozcieńczeń w bulionie (Dec i wsp 2023, CLSI supplement Vet06 2017) w odniesieniu do 17 substancji przeciwdrobnoustrojowych, tj. ampicylina, amoksycylina, amoksycylina z kwasem klawulanowym, ceftiofur, florfenikol, tetracyklina, erytromycyna, tylozyna, klindamycyna, linkomycyna, tiamulina, enrofloksacyna, streptomycyna, spektynomycyna, gentamycyna, neomycyna, trimetoprim/sulfametoksazol. Przynależą one do kilku grup leków i wykazują różny mechanizm działania (Tab. 3.10); większość z nich jest stosowana w hodowli drobiu.

Użyte antybiotyki i chemioterapeutyki z reguły miały postać suchego proszku i zostały zakupione w firmie Merck (Polska). Jako źródło amoksycyliny z kwasem klawulanowym wykorzystano lek Taromentin (proszek do sporządzania roztworu do infuzji zawierający 500 mg amoksycyliny i 100 mg kwasu klawulanowego, Polfa Tarchomin). Tiamulina (Biomutin, 200 mg/ml, BIOWET DRWALEW S.A., Polska) i spektynomycyna miały postać roztworów gotowych do użycia (Merck, Polska) (Tab. 3.6).

#### Przygotowanie roztworów antybiotyków/chemioterapeutyków

Substancje przeciwdrobnoustrojowe mające postać suchego proszku odważano na wadze analitycznej i rozpuszczano w rozpuszczalnikach wymienionych w Tabeli 3.10 z uwzględnieniem zawartości czystej substancji w produkcie. Roztwory trimetoprimu i sulfametoksazolu mieszało się ze sobą w proporcjach 1:19 (roztwór o stężeniu 20 µg/ml

zawierał 1 µg/ml trimetoprimu i 19 µg/ml sulfametoksazolu). Roztwory wyjściowe były rozcieńczane w bulionie BHI zawierającym dodatek 0,1% Tween 80 tak by uzyskać roztwory robocze o stężeniu 2x wyższym od maksymalnego stężenia antybiotyku/chemioterapeutyki jakie znajdowało się ostatecznie na mikropłytkce.

#### *Przygotowanie inokulum bakterii*

Ze świeżej kultury wyrosłej na agarze Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej jednorazową sterylną eżą pobierano kolonie bakteryjne i zawieszano w 0,85% roztworze NaCl tak by uzyskać zawiesinę o gęstości optycznej 0,5 wg skali McFarlanda (pomiar w densytmetrze). Tak przygotowane bakteryjne zawiesiny były następnie rozcieńczane w bulionie BHI w stosunku 1,5 : 100 (15 µl inokulum na 1 ml pożywki).

Roztwory robocze antybiotyków/chemioterapeutyków wprowadzano po 100 µl do studzienek mikropłytki odpowiadających finalnie maksymalnemu stężeniu substancji przeciwdrobnoustrojowej, a do pozostałych studzienek nakładano po 50 µl bulionu BHI z dodatkiem 0,1% Tween 80. Za pomocą pipety wielokanałowej wykonywano seryjne rozcieńczenia antybiotyków/chemioterapeutyków. Na każdej płytce ostatecznie znajdowało się 10 różnych rozcieńczeń antybiotyku/chemioterapeutyku (Tab. 3.10) w objętości po 50 ul. W ostatnim etapie do studzienek mikropłytki dodawano po 50 µl zawiesiny bakterii (objętość końcowa w każdej studziencie wynosiła 100 µl). Kontrolę dodatnią stanowiły studzienki z podłożem hodowlanym bez dodatku antybiotyku/chemioterapeutyku zaszczerpionym bakteriami, natomiast kontrolę ujemną stanowiła pożywka BHI (100 µl). Kontrolę jakości substancji przeciwdrobnoustrojowych przeprowadzono przy wykorzystaniu referencyjnego szczepu *E. coli* ATCC 25922 i podłoża Müller-Hintona (CLSI 2018).

Płytki inkubowano w temp. 36°C w atmosferze z dodatkiem 5% CO<sub>2</sub>, a wyniki odczytywano po 24-25 godz. Za minimalne stężenie hamujące (MIC, ang. *minimal inhibitory concentration*) uznawano najmniejsze stężenie substancji przeciwdrobnoustrojowej, przy którym nie nastąpiły oznaki wzrostu bakterii (brak osadu bakteryjnego lub zmętnienia pożywki). Wzrost bakterii został oceniony wizualnie oraz dodatkowo poprzez pomiar gęstości optycznej w spektrofotometrze (Microplate Reader model 680, Bio-Rad) przy długości fali 620 nm.

**Tabela 3.10.** Antybiotyki i chemioterapeutyki użyte w badaniu, rozpuszczalniki do przygotowania roztworów wyjściowych oraz finalny zakres stężeń substancji przeciwdrobnoustrojowych

Mechanizm działania	Antybiotyk/ chemioterapeutyk	Grupa antybiotyków	Rozpuszczalnik*	Stężenie wyjściowe (mg/ml)	Zakres stężeń (µg/ml) na mikroplątce
Inhibitory syntezy ściany komórkowej	Ampicylina	β-laktamy	BR II**	10	0,06-32
	Penicylina	β-laktamy	BR I***	10	0,06-32
	Amoksycyлина	β-laktamy	0,1 M NH <sub>4</sub> OH	10	0,03-16
	Amoksycyлина + kwas klawulanowy	β-laktamy	H <sub>2</sub> O	10	0,03-16
	Ceftiofur	β-laktamy	H <sub>2</sub> O	10	0,06-32
	Tetracyklina	tetracykliny	0,1 M HCl	20	0,25-128
	Gentamycyna	aminoglikozydy	BR II	30	1-512
	Neomycyna	aminoglikozydy	BR II	30	1-512
	Streptomycyna	aminoglikozydy	H <sub>2</sub> O	30	1-512
Inhibitory syntezy białka	Spektynomycyna	aminoglikozydy	roztwór gotowy do użycia	100	1-512
	Linkomycyna	linkozamidy	H <sub>2</sub> O	20	0,125-64
	Klindamycyna	linkozamidy	BR II	10	0,06-32
	Erytromycyna	makrolidy	metanol 99,9%	10	0,06-32
	Tylozyna	makrolidy	H <sub>2</sub> O	10	0,06-32
Inhibitory syntezy kwasu foliowego	Tiamulina	peuromutyliny	roztwór gotowy do użycia	200	0,125-64
	Florfenikol	fenikole inhibitory reduktazy dihydrofolianowej	DMSO	10	0,06-32
	Trimetoprim		DMSO	30	1-512
	Sulfametoksazol	sulfonamidy	DMSO	30	
Inhibitor syntezy DNA	Enrofloksacyna	fluorochinolony	0,1 M HCl	20	0,25-128

\* rozpuszczalnik dobierano wg zaleceń opublikowanych w Farmakopea Polska tom V 1990 lub wg rekomendacji producenta antybiotyku/chemioterapeutyku

\*\* bufor BR II: 16,73 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 0,523 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> rozpuszczone w 1 L wody, pH=7,9

\*\*\* bufor BR I: 2,0 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 8,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> rozpuszczone w 1 L wody, pH=6,0.

### Interpretacja wyników

Szczepy *E. rhusiopathiae* były kategoryzowane na wrażliwe, średniowrażliwe i odporne na podstawie wytycznych Instytutu Klinicznych Standardów Laboratoryjnych (CLSI, ang. *Clinical & Laboratory Standards Institute*) (CLSI supplement Vet06, 2017). W przypadku amoksycyliny i amoksycyliny z kwasem klawulanowym oraz tylozyny zaadoptowano punkty odcięcia rekomendowane dla ampicyliny i erytromycyny, odpowiednio. Interpretację wyników uzyskanych dla tetracykliny, linkomycyny i florfenikolu oparto na wytycznych CLSI (2018) i CA-SFM/EUCAST (2021) dla *Staphylococcus* spp. (Dec i wsp. 2023). Punkty odcięcia dla tiamuliny zostały zaproponowane na podstawie rozkładu wartości MIC oraz występowania genu *lsaE* i są

zgodne z punktami granicznymi zaproponowanymi wcześniej dla izolatów *E. rhusiopathiae* pochodzących od świń (Dec i wsp. 2023). W przypadku antybiotyków aminoglikozydowych (gentamycyna, neomycyna, streptomycyna, spektynomycyna) oraz inhibitorów syntezy kwasu foliowego (trimetoprim/sulfametoksazol), ze względu na brak klarownego bimodalnego rozkładu wartości MIC, nie zaproponowano punktów odcięcia (Tab. 3.11).

**Tabela 3.11.** Graniczne wartości MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) zastosowane do kategoryzacji szczepów *E. rhusiopathiae* na wrażliwe (S, ang. *susceptible*), średniowrażliwe (I, ang. *intermediate*) i odporne (R, ang. *resistant*) za pomocą metody mikrorozcieńczeń w bulionie

Antybiotyk/chemioterapeutyk	Punkt graniczny ( $\mu\text{g/ml}$ )			Źródło
	S	I	R	
Penicylina	$\leq 0.12$			CLSI VET06 (2017)
Ampicylina	$\leq 0.25$	–	–	CLSI VET06 (2017)
Amoksyacylina	$\leq 0.25$	–	–	Zaadoptowano punkty graniczne CLSI VET06 (2017) ustanowione dla ampicyliny
Amoksyacylina + kwas klawulanowy	$\leq 0.25$ ( $\leq 0,17/0,08$ )			Zaadoptowano punkty graniczne CLSI VET06 (2017) ustanowione dla ampicyliny
Ceftiofur	$\leq 2$	4	$\geq 8$	CLSI VET06 (2017)
Erytromycyna	$\leq 0.25$	0.5	$\geq 1$	CLSI VET06 (2017)
Tylozyna	$\leq 0.25$	0.5	$\geq 1$	Zaadoptowano punkty graniczne CLSI VET06 (2017) ustanowione dla erytromycyny (Dec i wsp. 2023)
Klindamycyna	$\leq 0.25$	0.5	$\geq 1$	CLSI VET06 (2017)
Linkomycyna	$\leq 2$	4-8	$\geq 16$	Zaadaptowano punkty graniczne CA-SFM/EUCAST (2021) ustanowione dla <i>Staphylococcus</i> spp. (Dec i wsp. 2023)
Tiamulina	$\leq 16$	–	$\geq 32$	Punkty graniczne zaproponowano na podstawie rozkładu wartości MIC oraz obecności genu <i>lsaE</i> , zgodnie z wcześniejszą propozycją (Dec i wsp. 2023)
Enrofloksacylina	$\leq 0.5$	1	$\geq 2$	CLSI VET06 (2017)
Tetracyklina	$\leq 4$	8	$\geq 16$	Zaadaptowano punkty graniczne CLSI (2018) ustanowione dla <i>Staphylococcus</i> spp.; punkt odcięcia $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ został także wcześniej zaproponowany przez innych autorów (Ding i wsp.; Wu i wsp. 2021, Dec i wsp. 2023) w odniesieniu do <i>E. rhusiopathiae</i>
Florfenikol	$\leq 8$	16	$\geq 32$	Zaadaptowano punkty graniczne CLSI (2018) ustanowione dla <i>Staphylococcus</i> spp. i <i>Enterobacteriaceae</i> (Dec i wsp. 2023)
Streptomycyna Spektynomycyna	–	–	–	Punkty odcięcia nie zostały zaproponowane, ponieważ rozkład wartości MIC nie odznaczał się klarowną dwubiegunowością;
Gentamycyna Neomycyna Trimetoprim/sulfametoksazol	–	–	–	W związku z uzyskaniem dla wszystkich badanych izolatów <i>E. rhusiopathiae</i> wysokich wartości MIC ( $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ ) o unimodalnym rozkładzie nie zaproponowano punktów odcięcia

### 3.9. Detekcja genów oporności

Geny oporności wykrywano u szczepów *E. rhusiopathiae* za pomocą pojedynczego PCR lub multipleks PCR z wykorzystaniem starterów, których sekwencje zamieszczono w Tabeli 3.12. Łącznie dokonano detekcji 19 genów, które u bakterii Gram-dodatnich nadają oporność na aminoglikozydy (*aac(6')-Ie-aph(2'')*-*Ia*, *aph(3')*-*IIIa*, *ant(4')*-*Ia*, *aph(2'')*-*Ib*, *aph(2'')*-*Ic*, *aph(2'')*-*Id*, *ant(6)-Ia*, *ant(9)-Ia*, *aadK*), tetracykliny (*tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*), makrolidy i linkozamidy (*ermA*, *ermA-like*, *ermB*, *ermC*, *mefA/E*, *lnuA*, *lnuB*), pleuromutyliny (*lsaE*), chinolony (*gyrA*), a także gen integrazy (*int-Tn*) transpozonu Tn916/Tn1545 (Tab. 3.12).

Ze względu na uzyskanie dla dwóch szczepów fenotypowo opornych na makrolidy negatywnych wyników PCR ze wszystkimi parami starterów do detekcji genów determinujących oporność na tę grupę antybiotyków wykonano dodatkowe analizy mające na celu sprawdzenie komplementarności oligonukleotydów (zaprojektowanych przez innych autorów) do docelowych determinant genetycznych. Analizy wykonano przy wykorzystaniu narzędzia bioinformatycznego Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). W przypadku genu *ermB* (Malhotra-Kumar i wsp. 2005) okazało się, że tylko jeden ze starterów (3'-CTGTGGTATGGCGGGTAAGT-5') hybrydyzował z sekwencją genu *ermB* (numer dostępu GenBank NG\_047842.1), a drugi (3'-TGGTATTCCAAATGCGTAATG-5') był komplementarny do innego genu (kodującego peptyd liderowy atenuacji metylotransferazy 23S rRNA) sąsiadującego z genem *ermB* u bakterii fermentacji mlekowej (*Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillaceae*) (Numer dostępu GenBank CP049223.1, CP119529.1 i AY556392.1). Wyniki analizy wyjaśniły dlaczego mimo braku komplementarności obu starterów do sekwencji genu *ermB* w kontroli pozytywnej, którą stanowił szczep *Ligilactobacillus salivarius* 3aI (Tab. 3.13, Dec i wsp. 2018), uzyskiwano produkt PCR. Nowe startery do detekcji genu *ermB* (Tab. 3.12) zostały zaprojektowane za pomocą narzędzia bioinformatycznego PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), w taki sposób, aby oba oligonukleotydy hybrydyzowały do sekwencji *ermB*. W podobny sposób zaprojektowano startery do detekcji genów *int-Tn* i *ant(6)-Ia*. W celu opracowania multipleks PCR (*ermB* + *int-Tn* i *ant(6)-Ia*) spośród kilku par starterów zaprojektowanych dla każdego genu wybrano te, które nie ulegały krzyżowym reakcjom względem siebie (nie tworzyły self-dimerów i cross-dimerów) i pozwalały na uzyskanie produktów PCR o zróżnicowanej wielkości (tak by prążki na żelu nie nachodziły na siebie).

W celu detekcji genów oporności DNA amplifikowano przy użyciu polimerazy Green DreamTaq (Thermo Fisher Scientific, Litwa) w następujących warunkach: 5 min 95 °C – 5 min, następnie 30 cykli 95 °C – 40 s, 50-64 °C – 35 s (zgodnie z temp. hybrydyzacji poszczególnych starterów, wg Tab. 3.12), 72 °C – 60 s/1000 pz oraz końcowe wydłużane 8 min w 72 °C. Kontrolę pozytywną PCR stanowiły terenowe szczepy *E. rhusiopathiae* oraz szczepy bakterii fermentacji mlekowej zawierające geny oporności (Tab. 3.13). Jako kontrolę negatywną stosowano wodę do biologii molekularnej.

Skład mieszaniny PCR:

- DNA genomowe *E. rhusiopathiae* (~20 ng/μl) – 0,6 μl
- mieszanina deoksynukleotydów o stężeniu wyjściowym 8 mM – 0,7 μl
- startery (każdy o stężeniu wyjściowym 10 μM) – po 0,4 μl w przypadku detekcji pojedynczego genu, po 0,3 μl w przypadku multipleks PCR
- polimeraza DreamTaq DNA o stężeniu wyjściowym 5 U/μl - 0,06 μl
- bufor do polimerazy – 1,25 μl
- woda do biologii molekularnej, wolna od nukleaz – dopełnienie do 12,5 μl

Rozdział elektroforetyczny produktów PCR, skanowanie i analiza obrazu elektroforetycznego wykonano jak opisano w rozdz. 3.6.

**Tabela 3.12.** Sekwencje starterów używanych do detekcji genów oporności oraz temperatura przyłączania starterów i wielkość produktów PCR

Wykrywany gen	Sekwencje starterów (5'→3')	Wielkość produktu PCR (pz)	Temp. przyłączania starterów (°C)	Antybiotyk, na które gen nadaje oporność	Źródło
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	F: CAGAGCCTTGGAAGATGAAG R: CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC	348		GEN	
<i>aph(3')-IIIa</i>	F: GGCTAAAATGAGAATATCACCGG R: CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	523		KAN, NEO	
<i>ant(4')-Ia</i>	F: CAAACTGCTAAATCGGTAGAAGCC R: GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	294	56	NEO, KAN, TOB	Vakulenko i wsp. 2003
<i>aph(2'')-Ib</i>	F: CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC R: GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	867	multipleks	GEN	
<i>aph(2'')-Ic</i>	F: CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC R: CCACAGCTCCGATAGCAAGAG	444		GEN	
<i>aph(2'')-Id</i>	F: GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC R: CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	641		GEN	
<i>ant(6)-Ia</i>	F: CGGGAGAATGGGAGACTTTG R: CTGTGGCTCCACAATCTGAT	563	56	STR	Kobayashi i wsp. 2001
<i>ant(9)-Ia</i>	F: GGTTTCAGCAGTAAATGGTGGT R: TGCCACATTCGAGCTAGGGTT	476	55	SPE	Kobayashi i wsp. 2001
<i>aadK</i>	F: GTCGCAATGAATGGTTCACGA R: GCGATCAGTTGCCGGTATGA	348	54	STR	Dec i wsp. 2023
<i>lsaE</i>	F: TGTCAAATGGTGAGCAAACG R: TGTA AACGGCTTCCTGATG	496	multipleks	TIA	

<i>tetM</i>	F: GTGGACAAAGGTACAACGAG R: CGGTAAAGTTCGTCACACAC	406		TET	
<i>tetW</i>	F: GAGAGCCTGCTATATGCCAGC R: GGGCGTATCCACAATGTTAAC	168	64	TET	Masco i wsp. 2006
<i>tetK</i>	F: GATCAATTGTAGCTTTAGGTGAAGG R: TTTTGTGATTACCAGGTACCATT	155		TET	
<i>tetL</i>	F: TGGTGAATGATAGCCCATT R: CAGGAATGACAGCACGCTAA	229		TET	
<i>tetO</i>	F: AACCTAGGCATTCTGGCTCAC R: TCCCCTGTTCCATATCGTCA	515	60 multipleks	TET	Malhotra- Kumar i wsp. 2009
<i>ermA</i>	F: CCCGAAAAATACGCAAAATTTTCAT R: CCCTGTTTACCCATTTATAAACG	590		MLS <sub>B</sub>	
<i>mefA/E</i>	F: CAATATGGGCAGGGCAAG R: AAGCTGTTCCAATGCTACGC	317		MAK, LIN	
<i>ermA-like</i>	F: ACGAACATTACAGGACAGG R: CAATTAAGGGTGATGACC	NZ	50	MAK	Wu i wsp. 2021
<i>ermT</i>	F: TATTATTGAGATTGGTTCAGGG R: GGATGAAAGTATTCTCTAGGGATT	395	55	MLS <sub>B</sub>	Egervärn i wsp. 2009
<i>ermC</i>	F: AATCGTCAATTCCTGCATGT R: TAATCGTGAATACGGGTTTG	299	58	MLS <sub>B</sub>	Dec i wsp. 2017
<i>ermB</i>	F: GGTTTTTGAAAGCCGTGCGT R: CTGTGGTATGGCGGGTAAGT	203	58	MLS <sub>B</sub>	Ta praca
<i>lnuB</i>	F: CCTACCTATTGTTTGTGGAA R: ATAACGTTACTCTCCTATTC	925	50	LIN	Bozdogan i wsp., 1999
<i>lnuA</i>	F: GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAAGTGG R: GCTTCTTTTGAATACATGGTATTTTCGA	323	61	LIN	Dec i wsp. 2018
<i>Int-Tn</i> (Tn916/Tn1545)	F: GCGTGATTGTATCTCACT R: GACGCTCCTGTTGCTTCT	1028	53	-	Dec i wsp. 2023
<i>gyrA</i>	F: TCGTCTCCTATGCCATGTGC R: AGTAAAAGTGCCCTGTTGGA	613	54	CHI*	Dec i wsp. 2023

Legenda: GEN – gentamycyna; NEO – neomycyna; KAN – kanamycyna; TOB – tobramycyna; STR – streptomycyna; SPE – spektynomycyna; TIA – tiamulina; TET – tetracyklina; MLS<sub>B</sub> – makrolidy, linkozamidy i streptograminy B; MAK – makrolidy; LIN – linkozamidy; CHI\* - chinolony, oporność w przypadku mutacji w regionie QRDR (ang. *quinolone resistance determining region*) genu; NZ – nieznaną

**Tabela 3.13.** Szczepy bakteryjne użyte jako kontrola pozytywna w badaniach dotyczących detekcji genów oporności u izolatów *E. rhusiopathiae*

Szczep	Geny oporności	Nr dostępu GenBank
<i>Enterococcus faecalis</i> 140	<i>tetO</i>	MK091469.1
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> 819	<i>lnuB</i>	MW428252
<i>Lactobacillus ingluviei</i> 22eI	<i>lnuA</i>	MK091470.1
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> 3aI	<i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i>	MK077521, MK077522, MK077523, MK077524.1
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> 5aI	<i>ant(6)-Ia</i>	MK091477
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> 27eCh	<i>aph(2'')-Ic</i>	MK091471
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> Ch3a	<i>lsaE</i>	KY924692
<i>Enterococcus faecium</i> EC254	<i>mefA/E</i>	MN548247
<i>Enterococcus faecalis</i> 3W	<i>aph(3')-IIIa</i> , <i>ant(4')-Ia</i> <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>int-Tn</i>	MK091474, MK091473, MK091475, MK091481
<i>Enterococcus faecium</i> 60	<i>aph(2'')-Id</i>	MK091472



### 3.9.1. Analiza sekwencji genu *gyrA*

Amplikony *gyrA* (613 pz) wybranych szczepów fenotypowo wrażliwych i opornych na enrofloksacynę zostały zsekwencjonowane przy użyciu metody Sangera w laboratorium usługowym Nexbio Sp. z o.o. (Lublin, Polska). Chromatogramy analizowano za pomocą programu Chromas Lite (ver. 2.6.6, Informer Technologies). Uzyskane sekwencje *gyrA* zostały przetłumaczone na sekwencje aminokwasowe przy użyciu narzędzia ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) i zdeponowane w GenBank'u pod numerami dostępu OP921306 - OP921309. Sekwencje białkowe przyrównano względem siebie za pomocą narzędzia ClustalW Multiple Alignment (moduł programu bioinformatycznego MEGA X). Sekwencja genu *gyrA* szczepu referencyjnego *E. rhusiopathiae* ATCC 19414 (wrażliwy na enrofloksacynę) została pobrana z bazy GenBank (numer dostępu LR134439.1) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

### 3.10. Detekcja genów wirulencji

Obecność genów związanych z wirulencją wykrywano u izolatów *E. rhusiopathiae* przy pomocy unipleks lub multipleks PCR i starterów, których sekwencje zamieszczono w Tabeli 3.14. Analiza uwzględniała 15 determinant genetycznych, w tym geny kodujące antygeny powierzchniowe Spa (*spaA*, *spaB*, *spaC*), hialuronidazę (*hlyA*), neuraminidazę (*nanH1*, *nanH2*), hemolizynę (*hlyIII*), subtylizynę (*sub*, peptydaza), internalinę (*intl-like*) i liporoteinę ERH\_1356 (ułatwiają adhezję bakterii do komórek gospodarza), gen białka wykazującego powinowactwo do fibronektyny (*fbpA*), geny kodujące białka powierzchniowe *E. rhusiopathiae* odpowiedzialne za tworzenie biofilmu (*rspA*, *rspB*) oraz geny *cap locus* i *algI* determinujące oporność na fagocytozę i/lub ułatwiające przeżycie bakterii wewnątrz komórek gospodarza. Wymienione geny zostały wybrane na podstawie doniesień literaturowych potwierdzających udział tych genów w patogenezie różycy lub wskazujących na ich przypuszczalne zaangażowanie w rozwój zakażenia (Ding i wsp. 2015, Janßen i wsp. 2015, Li i wsp. 2016, Shimoji 2000, Shimoji 2003, Zhu i wsp. 2017, Zhu i wsp. 2018).

W analizie uwzględniono także szczepy referencyjne różnych gatunków *Erysiplothrrix* (Tab. 3.2). Kontrolę pozytywną stanowiły szczepy *E. rhusiopathiae* Fujisawa (*spaA+*, *nanH.1+*, *nanH.2+*, *cpsA+*, *ERH\_1356+*, *ERH\_1472+*, *rspA+*, *rspB+*, *algI+*, *hlyA+*, *hlyIII+*, *fbpA+*, *sub+*) (GenBank AP012027.1), Tuzok i Bano (*spaB+*) oraz

*E. piscisicarius* 715 (*spaC*<sup>+</sup>). Jako kontrolę negatywną stosowano wodę do biologii molekularnej.

#### Warunki PCR

Geny związane z wirulencją *E. rhusiopathiae* amplifikowano przy wykorzystaniu polimerazy DremTaq Green (ThermoFisher Scientific, USA, 5 IU/μl). Mieszanki reakcyjne przygotowywane w objętości 12,5 μl zawierały po 1,25 μl buforu, 0,06 μl roztworu polimerazy Dream Taq, 0,4 μl każdego ze starterów (stężenie 10 μM) w przypadku pojedynczego PCR, a w przypadku multipleks PCR – po 0,32 μl, 0,7 μl mieszaniny deoksynukleotydów (dNTP, 8 mM), 0,7 μl genomowego DNA (~20 ng/μl) oraz wodę do biologii molekularnej (objętość uzupełniająca do 12,5 μl).

Amplifikację prowadzono wg następującego programu temperaturowo-czasowego:

- 94°C - 5 min (wstępna denaturacja)
  - 94°C - 40 s (denaturacja)
  - 50-56°C – 35 s (przyłączanie starterów, wg Tab. 3.14)
  - 72°C - 60 s /1000 pz (wydłużanie, synteza DNA)
  - końcowe wydłużanie - 8 min.
- } 30 cykli

Rozdział elektroforetyczny produktów PCR, skanowanie i analiza obrazu elektroforetycznego zostały wykonane jak opisano w rozdz. 3.6.

**Tabela 3.14.** Sekwencje starterów użytych do detekcji genów związanych z wirulencją *E. rhusiopathiae*, zastosowana temp. hybrydyzacji i wielkość produktu PCR

Gen i/lub locus tag na pods. GenBank AP012027.1	Produkt genu	Sekwencja starterów (5' → 3')	Temp. hybrydyzacji [°C]	Wielkość produktu PCR [pz]	Źródło
<i>spaA</i> , <i>spaB</i> , <i>spaC</i>	Powierzchniowy antygen A, B i C	<i>spaABC</i> -F: ATGAAAAAGAAAAACACCTATTT CCG		–	
<i>spaA</i>	Powierzchniowy antygen A	<i>spaA</i> -R: GCGATTTCTCCGCATAGCA	56	813	Shen i wsp. 2010
<i>spaB</i>	Powierzchniowy antygen B	<i>spaB</i> -R: CAATACCCTTTAGAGCCTCAACCA	multipleks	904	
<i>spaC</i>	Powierzchniowy antygen C	<i>spaC</i> -R: TGCCTCAACTACGGTTTGATACG		1011	
<i>nanH.1</i>	Neuraminidaza	F: GGAGTGCCAGAAGGTACTTGG R: TGAAGGATGCAGCGGATCAA	56	239	Dec i wsp. 2023
<i>rspB</i>	Powierzchniowe białko B <i>E. rhusiopathiae</i>	F: GTGGTTCATCACCACGTCCT R: TGYAATTGTGAGTGCATCAGT	multipleks (ta praca)	491	Dec i wsp. 2023
<i>nanH.2</i>	Neuraminidaza	F: CGTATGGGTGCTGTTGCTTG R: GCATGGCTTAGTGGCTACCT	55	932	Dec i wsp. 2023

<i>cpsA</i>	Glikozylotransferaza (synteraz otoczki)	F: ATGCGGATGTGCTTTTAGCG R: GCAACTCTCCTTCACCTGCT	55	285	Dec i wsp. 2023
ERH_1356	Transporter ABC	F: ATGCTTGCAGGGTGTTCAGT R: TGCTTTGCAGTTGGCTCAC	53	656	Dec i wsp. 2023
<i>intI</i> ERH_1472	Internalina	F: ACAGTTTCGGATACTTCCGG R: GCTGGTAAATATGACGAGGGT	53	329	Dec i wsp. 2023
<i>rspA</i>	Powierzchniowe białko A <i>E. rhusiopathiae</i>	F: ATCGACTGGTATTCAGTTGG R: ATCACGAGACATACCGCCAA	multipleks	535	Janßen i wsp. 2015
<i>algI</i>	O-acetylotransferaza alginianowa	F: AGTTATCTTGGACTTGGTCC R: AGATAAGTGCGTATTGATCC	50	767	Dec i wsp. 2023
<i>sub</i> ERH_0260	Subtylizyna, peptydaza	F: AAGCCTGAGATATCTGCACC R: TTGTACAATTGGATGAGCCG	53	226	Janßen i wsp. 2015
<i>hlyA</i>	Hialuronidaza	F: AGGATCACTTACCGCTATGG R: CAGCACTCAGCATGTTCTC		941	Janßen i wsp. 2015
<i>fbpA</i>	Białko wiążące fibronektynę	F: ATCTCGCCGCTTTTAGAACG R: GCGTCTTCAACTGTTGCTTG	53	602	Janßen i wsp. 2015
<i>hlyIII</i> ERH_0467	Hemolizyna	F: TACGATTGCGACAAAGTGTGCG R: CAGCCTTCCCTATGTTCCAT		544	Dec i wsp. 2023

### 3.11. Analiza sekwencji genu *spaA*

#### Amplifikacja genu *spaA*

Analiza obejmowała wszystkie terenowe izolaty *E. rhusiopathiae*, u których we wcześniejszym etapie badań wykryto gen *spaA* (n=59) (w multipleks PCR *spaA+spaB+spaC*). Do amplifikacji całego genu *spaA* wykorzystano startery Spa-fw (5'-ATGAAAAG AAAAACACCTA – 3') i Spa-rv (5'-CTATTTTAAACTTCCATCGTT – 3') opracowane przez Janßen i wsp. (2015). PCR przeprowadzono przy zastosowaniu polimerazy DreamTaq (ThermoFisher Scientific, USA) i mieszaniny reakcyjnej o następującym składzie: 2,5 µl buforu, 0,12 µl roztworu polimerazy (5 IU/ µl), 0,8 µl każdego ze starterów (stężenie wyjściowe 10 µM), 1,4 µl mieszaniny deoksynukleotydów (dNTP, 8 mM), 1 µl genomowego DNA (~20 ng/µl) oraz wodę do biologii molekularnej (objętość uzupełniająca do 25 µl).

Amplifikację prowadzono wg następującego programu temperaturowo-czasowego:

- 94°C - 5 min (wstępna denaturacja)
  - 94°C – 40 s (denaturacja),
  - 49°C – 40 s (przyłączanie starterów),
  - 72°C – 1 min 30 s (wydłużanie, synteza DNA);
  - końcowe wydłużanie: 8 min.
- } 30 cykli

Produkty PCR były rozdzielane w 1,3% żelu agarozowym. Skanowanie żeli i analiza obrazów elektroforetycznych zostały wykonane jak opisano w rozdz. 3.6, z tym że próbki

produktu PCR przed nałożeniem na żel były mieszane z buforem obciążającym (około 2 µl buforu obciążającego + 8 µl produktu PCR).

Kontrolę pozytywną stanowiły szczepy *E. rhusiopathiae* Fujisawa i ATCC 19414 (w przypadku obu szczepów referencyjnych wielkość produktu PCR wynosi 1881 pz - wg sekwencji genomowych zdeponowanych w GenBank'u, nr dostępu LR134439.1 i AB019124.1) oraz szczep szczepionkowy *E. rhusiopathiae* R32E11, który jest wykorzystywany do produkcji komercyjnej szczepionki ERYSENG® (Laboratorios Hipra S.A., Hiszpania) przeciwko różycy u świń (szczepionka stosowana u gęsi na niektórych fermach w Polsce). Wielkość genu *spaA* u szczepu R32E11 wynosi ~2200 pz (Dec i wsp. 2023). DNA szczepu R32E11 zostało udostępnione przez dr Shimoji, Narodowy Instytut Zdrowia, Japonia.

#### *Sekwencjonowanie amplikonów spaA*

Sekwencjonowanie amplikonów *spaA* zostało przeprowadzone metodą Sanger w usługowym laboratorium zewnętrznym Genomed S. A. (Warszawa) oraz Nexbio S.A. (Lublin). Ze względu na duży rozmiar (~1900 pz) produkty PCR zostały zsekwencjonowane z obu nici przy wykorzystaniu starterów *forward* (*Spa-fv*) i *reverse* (*Spa-rv*) (sekwencje zamieszczone powyżej). Przed wysłaniem próbek do sekwencjonowania produkty PCR oczyszczano za pomocą mieszaniny enzymatycznej EPPIC (A&A Biotechnology, PL) zawierającej w składzie dwa enzymy degradujące nukleotydy oraz startery pozostałe w mieszaninie reakcyjnej, ale nie naruszające podwójnej helisy produktu PCR. Do każdej próbki zawierającej 8 µl produktu PCR dodawano 1,6 µl mieszaniny EPPIC. Probówki inkubowano przez 15 min w 37°C (degradacja nukleotydów i starterów), a następnie przez 15 min w 70°C (dezaktywacja enzymów zawartych w mieszaninie EPPIC). Oczyszczone produkty PCR od razu dostarczano do laboratorium zewnętrznego lub w razie potrzeby przechowywano przez 1-2 dni w temp. - 20°C.

#### *Analiza sekwencji amplikonów spaA i tworzenie sekwencji konsensusowej*

Jakość uzyskanych sekwencji DNA *forward* i *reverse* analizowano w programie Chromas Lite i w razie konieczności (rozbieżność pomiędzy widmem a sekwencją) korygowano; końcowe nieczytelne fragmenty sekwencji zostały odcięte. W przypadku uzyskania sekwencji o niskiej jakości odczytu analizę powtarzano. Sekwencje *reverse* zostały odwrócone (*reverse complement*) przy wykorzystaniu narzędzia DNA

SequenceReverse and Complement Online Tool, a następnie połączone z sekwencją forward (przy uwzględnieniu odcinka wspólnego dla obu sekwencji) w programie Word (Microsoft Office 2019, USA).

Sekwencje DNA genu *spaA* wszystkich izolatów (n=59) zostały zdeponowane w bazie GenBank'u pod następującymi numerami dostępu: MZ448117-MZ448165, OM248656-OM248659, OP822692-OP822697 (Tab. 4.16). Sekwencję genu *spaA* szczepu szczepionkowego R32E11 zdeponowaliśmy wcześniej pod numerem MZ448116 (Dec i wsp. 2023).

### 3.11.1 Analiza sekwencji białkowych SpaA

Konsensusowe sekwencje nukleotydowe genu *spaA* (n=59) przetłumaczono na sekwencje aminokwasowe (aa) za pomocą narzędzia bioinformatycznego ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Moduł ClustalW Multiple Alignment zaimplementowany do programu MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>) posłużył do przyrównania uzyskanych sekwencji białkowych szczepów terenowych względem sekwencji SpaA szczepu szczepionkowego *E. rhusiopathiae* R32E11, a także wysoce wirulentnego szczepu Fujisawa oraz ATCC 19414. Przy wykorzystaniu modułu do analizy danych programu MEGA X dokonano detekcji polimorfizmów (zmiany pojedynczych aa) w zbiorze domniemanych sekwencji SpaA. Analiza obejmowała odcinek 447 aa na końcu N' obejmujący: a) 29-aa sekwencję sygnałową, b) 384-aa domenę immunoprotekcyjną i c) 34-aa domenę bogatą w prolinę. W przypadku szczepów terenowych analizowane sekwencje miały *de facto* długość 435 aa, co było skutkiem odcięcia nieczytelnych końców chromatogramów (w sekwencjach szczepów terenowych brakowało 12-stu pierwszych aa korespondujących z domeną sygnałową białka SpaA).

#### *Analiza porównawcza sekwencji SpaA*

Analiza porównawcza sekwencji białkowych SpaA obejmowała wszystkie zebrane izolaty terenowe od gęsi i kaczek (n=59) a także 27 szczepów pochodzących od świń (n=21), indyków (n=3), kur (n=1) i kaczek (n=1) z różnych krajów, w tym od dziewięciu świń z Polski. Sekwencje *spaA* i/lub SpaA tych szczepów zostały pobrane z bazy danych GenBank (Tab. 3.15). Grupowanie szczepów w oparciu o podobieństwo sekwencji SpaA wykonano w programie MEGA X za pomocą metody największej wiarygodności (ang. *maximum likelihood method*) i samopróbkowania (ang. *bootstrap*, metoda do szacowania wiarygodności drzewa filogenetycznego) o wartości 500. Analiza obejmowała odcinek

pierwszych 447 aa (j.w.) na końcu N', a wszystkie pozycje zawierajace brakujace dane (aminokwasy) zostaly wyeliminowane (opcja *complete deletion*).

**Tabela 3.15.** Dodatkowe szczepy *E. rhusiopathiae*, które zostały uwzględnione w analizie porównawczej sekwencji białka SpaA (sekwencje *spaA* pobrano z bazy GenBank)

L.p.	Szczep	Gatunek	Serotyp	Kraj izolacji	Rok izolacji	Nr dostępu GenBank	Źródło
1	2S	świnia	6	Polska	2018	OP822680	Dec i wsp. 2023
2	IMT23668	kaczka	ND*	Niemcy	2010	KR606249.1	Janßen i wsp. 2015
3	1S	świnia	N	Polska	2017	OP822679	Dec i wsp. 2023
4	5S	świnia	2	Polska	2019	OP822683	Dec i wsp. 2023
5	9S	świnia	2	Polska	2019	OP822687	Dec i wsp. 2023
6	8S	świnia	8	Polska	2019	OP822686	Dec i wsp. 2023
7	IMT26577	indyk	ND	Niemcy	2011	KR606264.1	Janßen i wsp. 2015
8	12S	świnia	1b	Polska	2018	OP822690	Dec i wsp. 2023
9	3S	świnia	1b	Polska	2018	OP822681	Dec i wsp. 2023
10	4S	świnia	1b	Polska	2019	OP822682	Dec i wsp. 2023
11	10S	świnia	5	Polska	2018	OP822688	Dec i wsp. 2023
12	Ireland	świnia	6	Japonia	ND	LC425606.1	Shimoji i wsp. 2019
13	AQ 150414	świnia	1a	Chiny	ND	KU214208.1	Wei i Li 2016, nieopublikowane
14	IMT28565	indyk	ND	Niemcy	2011	KR606272.1	Janßen i wsp. 2015
15	R32E11	nieznany	2	USA	<1970	MZ448116	Dec i wsp. 2023
16	IMT20385	świnia	ND	Niemcy	2000	KR606212.1	Janßen i wsp. 2015
17	422/1E1	świnia	1b	Japonia	ND	AB259653.1	To i Nagai 2007
18	C43065	świnia	2	Chiny	ND	EF688017.1	Nazierbieke i wsp. 2008
19	Fujisawa	świnia	1a	Japonia	<1972	AP012027.1	Ogawa i wsp. 2011
20	ZJ	świnia	ND	Chiny	ND	CP041995.1	Gu i wsp. 2020
21	LA150627	świnia	1a	Chiny	ND	KU214211.1	Wei i Li 2016 nieopublikowane
22	IMT18232	świnia	ND	Niemcy	2009	KR606199.1	Janßen i wsp. 2015
23	ATCC 19414	świnia	2	UK?	1950	LR134439.1	WTSI**, UK, 2018, nieopublikowane
24	Pecs 67	świnia	5	Japonia	<1992	AB259655.1	To i Nagai 2007
25	IMT25299	kura	ND	Niemcy	2011	KR606260.1	Janßen i wsp. 2015
26	IMT28568	indyk	ND	Niemcy	2012	KR606274.1	Janßen i wsp. 2015
27	FY 150511	świnia	1a	Chiny	ND	KU214210.1	Wei i wsp. 2016 nieopublikowane

\* ND (ang. *not determined*) – nieoznaczony

\*\*Wellcome Trust Sanger Institute

### 3.12. Genotypowanie szczepów *E. rhusiopathiae* za pomocą rep-PCR i RAPD

W niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto próbę oceny zróżnicowania genetycznego izolatów *E. rhusiopathiae* nie tylko na podstawie serotypowania, analizy genotypowych profili oporności, profili wirulencji oraz wariantu SpaA, ale także na podstawie analizy genotypu przy wykorzystaniu metody rep-PCR (ang. *repetitive element sequence-based PCR*) oraz RAPD (ang. *Random Amplified of Polymorphic DNA*). W metodzie rep-PCR wykorzystano starter (GTG)<sub>5</sub>, a RAPD przeprowadzono z użyciem starterów NK51, NK6, M13 i 1254 (Tab. 3.16) (Dec i wsp. 2021, Okatani i wsp. 2000, Torriani i wsp. 1999). Zakładano możliwość uzyskania korelacji pomiędzy profilem elektroforetycznym a serotypem, ewentualnie rodzajem białka Spa (SpaA/SpaB) lub gospodarzem (gęś/kaczka). W metodzie rep-PCR i RAPD oprócz izolatów terenowych *E. rhusiopathiae* wykorzystano także szczepy wzorcowe różnych gatunków *Erysipelothrix* (do oceny siły dyskryminacji metody w różnicowaniu międzygatunkowym).

Wstępne analizy obejmujące optymalizację warunków PCR polegały na ocenie profili elektroforetycznych uzyskanych dla wybranych izolatów *E. rhusiopathiae* przy użyciu polimerazy Dream Taq Green (Termofisher) lub gotowej mieszanki PCR Mix Plus (A&A Biotechnology), z dodatkiem MgCl<sub>2</sub> (finalne stężenie 2,5-3,5 mM) lub bez dodatku (2,0 mM). Jednocześnie testowano różne warianty profilu temperaturowo-czasowego amplifikacji (dane nie zamieszczone). Na podstawie wyników analiz wstępnych, do badania końcowego wybrano protokoły rep-PCR i RAPD uznane za optymalne dla poszczególnych starterów (Tab. 3.16). Amplifikację przeprowadzano w termocyklerze T100 (Bio-Rad) w objętości 12,5 µl przy wykorzystaniu starterów o stężeniu wyjściowym 10 µM, DNA genomowego o stężeniu 18-25 ng/µl i 8 µM deoksynukletydów (dNTP).

**Tabela. 3.16.** Startery użyte do różnicowania szczepów *Erysipelothrix* spp. za pomocą rep-PCR i RAPD-PCR oraz profil czasowo-temperaturowy i skład mieszanki PCR

starter	Sekwencja startera (5'→3')	Warunki czasowo-temperaturowe	Skład mieszanki PCR
(GTG) <sub>5</sub>	GTGGTGGTGGTGGTG	95°C-5 min; 40 cykli: 95°C-45 s, 42°C-35 s, 72°C-2 min; 72°C-8 min	Mieszanka PCR MIX Plus – 5 µl, starter (GTG) <sub>5</sub> – 0,5 µl, DNA – 0,6 µl, H <sub>2</sub> O – 6,4 µl
NK51	GGTGGTGGTATC	94°C-5 min; 35 cykli: 95°C-45 s, 36°C-35 s, 72°C-1 min i 30 s; 72°C-8 min	Bufor Dream Taq (10x) – 1,25 µl, dNTPy – 0,7 µl, starter NK51 – 0,5 µl, polimeraza Dream Taq Green – 0,06 µl, DNA – 0,65 µl, H <sub>2</sub> O – 9,34 µl

NK6	CCCGCGCCCC	94°C-5 min; 4 cykle: 94°C-75 s, 36°C-1 min, 72°C-2 min i 30 s; 36 cykli: 94°C-45 s, 37,5°C-35 s, 72°C-2 min; 72°C-10 min	Bufor Dream Taq (10x) – 1,25 µl, dNTPy – 0,7 µl, starter M13 – 0,5 µl, polimeraza Dream Taq Green – 0,06 µl, DNA – 0,6 µl, MgCl <sub>2</sub> (20 mM) – 0,5 µl, H <sub>2</sub> O – 8,89 µl
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	94°C-5 min; 4 cykle: 94°C-75 s, 42°C-1 min, 72°C-2 min i 40 s; 35 cykli: 94°C-45 s, 42°C-35 s, 72°C-2 min; 72°C-10 min	Bufor Dream Taq (10x) – 1,25 µl, dNTPy – 0,7 µl, starter M13 – 0,5 µl, polimeraza Dream Taq Green – 0,06 µl, DNA – 0,6 µl, H <sub>2</sub> O – 9,4 µl
1254	CCGCAGCCAA	94°C-5 min; 4 cykle: 94°C-70 s, 42°C-70 s, 72°C-2 min i 15 s; 38 cykli: 94°C-55 s, 42°C-40 s, 72°C-1 min i 35 s; 72°C-10 min	Mieszanina PCR MIX Plus – 5,4 µl, starter 1254 – 0,5 µl, DNA – 0,6 µl, H <sub>2</sub> O – 6 µl

Po zakończeniu reakcji amplifikacji dokonywano rozdziału elektroforetycznego produktów PCR w 1,5% lub 1,75% żelu agarozowym w buforze TBE (95V). Do detekcji produktów PCR stosowano barwnik SimplySafe (Eurx). Żele skanowano w aparacie GelDoc Go (Bio-Rad, USA). Wielkość produktów PCR określano w odniesieniu wzorca wielkości DNA Nova 100 bp (Novazym).





## 4. WYNIKI

### 4.1. Rozkład notowanych przypadków różycy

W okresie od stycznia 2019 do grudnia 2021 r. w Laboratorium Weterynaryjnym Vet-Lab Brudzew, dr Piotr Kwieciński, zdiagnozowano łącznie 93 przypadki różycy u gęsi, w tym 66 przypadków u gęsi przeznaczonych na tucz i 27 przypadków u gęsi ze stad reprodukcyjnych, a także 6 przypadków różycy u kaczek ze stad reprodukcyjnych (przypadek = ferma, na której potwierdzono zakażenie ptaków włoskowcem różycy) (Tabela 4.1).

Powyższe dane nie uwzględniają trzech przypadków różycy, które zostały potwierdzone w odstępie kilku tygodni po pierwszym zdiagnozowaniu choroby w danym stadzie. Przypadki te (wymienione poniżej) były wynikiem nawrotu choroby i zostały wyłączone z analiz statystycznych.

- Gęsi, stado na tucz – I diagnoza 09.2020 (gęsi 12 tygodniowe)/II diagnoza 10.2020 (gęsi 15 tygodniowe)
- Gęsi, stado reprodukcyjne – I diagnoza 02.2021/II diagnoza 03.2021
- Kaczki, stado reprodukcyjne – I diagnoza 02.2021 (kaczki 52 tyg.) /II diagnoza 04.2021/III diagnoza 05.2021

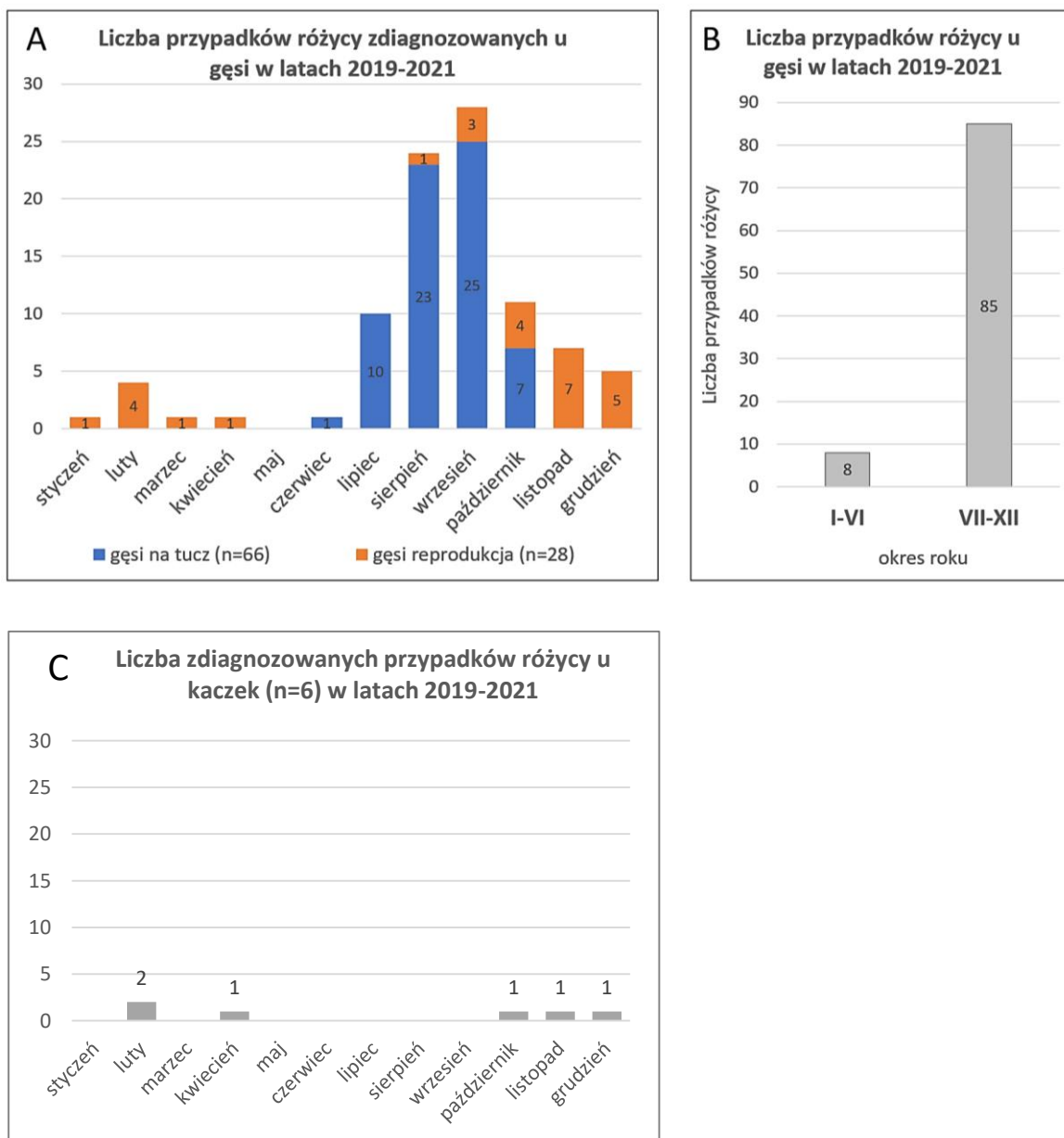
**Tabela 4.1.** Liczba przypadków różycy zdiagnozowanych u gęsi i kaczek w latach 2019-2021 w Laboratorium Weterynaryjnym Vet-Lab Brudzew dr Piotr Kwieciński

	Gęsi tucz			Gęsi reprodukcja			Kaczki reprodukcja		
	2019	2020	2021	2019	2020	2021	2019	2020	2021
styczeń	0	0	0	0	0	1	0	0	0
luty	0	0	0	0	1	3	1	0	1
marzec	0	0	0	0	0	1	0	0	0
kwiecień	0	0	0	0	0	1	0	0	1
maj	0	0	0	0	0	0	0	0	0
czerwiec	0	1	0	0	0	0	0	0	0
lipiec	7	2	1	0	0	0	0	0	0
sierpień	11	9	3	1	0	0	0	0	0
wrzesień	5	15	5	2	1	1	0	0	0
październik	2	3	2	1	2	1	0	1	0
listopad	0	0	0	3	2	2	0	1	0
grudzień	0	0	0	3	2	0	0	1	0
<b>łącznie</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
<b>łącznie</b>		<b>66</b>			<b>27</b>			<b>6</b>	

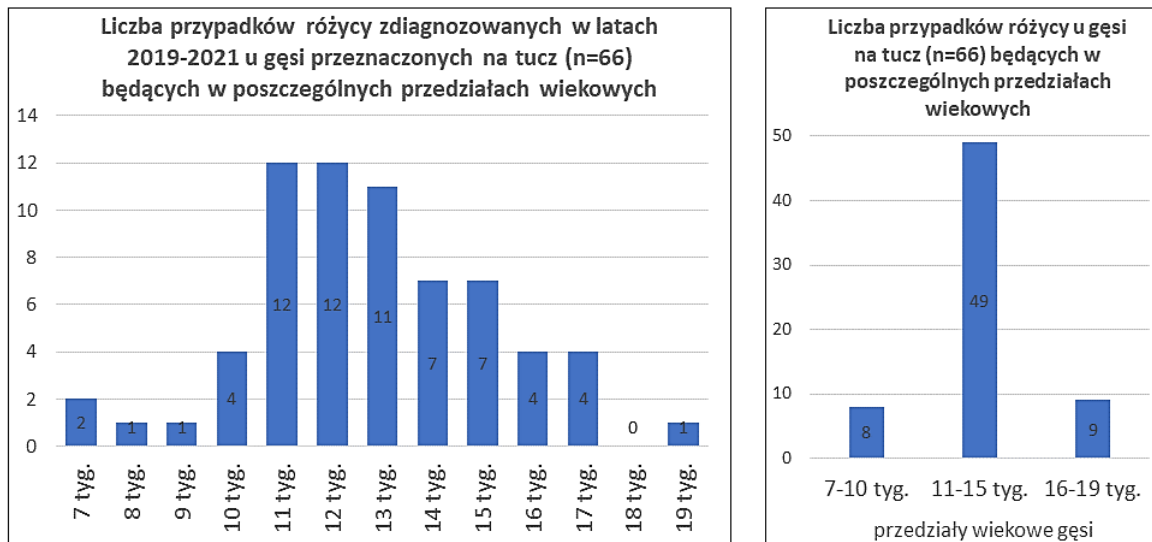
W stadach gęsi hodowanych na tucz różycę diagnozowano w okresie pomiędzy czerwcem a październikiem, przy czym największą liczbę przypadków odnotowano w sierpniu (23/66 przypadków, 34,8%) i we wrześniu (25/66 przypadków, 37,9%) (Ryc. 4.1). W stadach reprodukcyjnych różycę występowała pomiędzy styczniem a kwietniem oraz pomiędzy sierpniem a grudniem, a największą liczbę przypadków zdiagnozowano w lutym (4/27) oraz między wrześniem a grudniem (od 4 do 6 przypadków w ciągu miesiąca/27); w maju, czerwcu i lipcu w ciągu trzech lat nie odnotowano ani jednego przypadku różycy w stadach reprodukcyjnych. U kaczek chorobę zdiagnozowano wyłącznie w stadach reprodukcyjnych (łącznie 6 przypadków w ciągu trzech lat) w okresie zimowo-wiosennym (grudzień, luty, kwiecień) oraz na jesieni (październik, listopad) (Ryc. 4.1.).

Rozkład przypadków różycy zdiagnozowanych u gęsi (na tucz i reprodukcyjnych) ( $n=93$ , w latach 2019-2021) w dwóch przedziałach roku (półrocza: styczeń-czerwiec i lipiec-grudzień) istotnie różnił od zakładanego rozkładu równomiernego ( $\text{Chi}^2 = 39,091$ ,  $p < 0,001$ ). Liczba przypadków różycy zdiagnozowanych w drugiej połowie roku, tj. pomiędzy lipcem a grudniem ( $n=85$ ) była znacznie wyższa od liczby przypadków zdiagnozowanych w pierwszej połowie roku, tj. pomiędzy styczniem a czerwcem ( $n=8$ ) (Ryc. 4.1). Należy jednak zaznaczyć, że wpływ na uzyskany wynik mógł fakt występowania w pewnych okresach roku większej liczby stad gęsi, co automatycznie przekłada się na większą liczbę zachorowań. Przez pierwsze 2 miesiące roku (styczeń-luty) nie prowadzi się hodowli stad gęsi na tucz. Wstawienia piskląt zaczynają się od marca i trwają aż do lipca.

Choroba występowała u gęsi od 7 tygodnia życia, a najczęściej u osobników w wieku 11 tyg. (12/66, 18,2%), 12 tyg. (12/66, 18,2%) i 13 tyg. (11/66, 16,7%) (około 3-ciego miesiąca życia). Rozkład przypadków różycy w poszczególnych grupach wiekowych, tj. 7-10 tyg, 11-15 tyg. i 16-19 tyg., różnił się od zakładanego rozkładu równomiernego ( $\text{Chi}^2 = 22,253$ ,  $p < 0,001$ ). Liczba przypadków różycy odnotowanych u ptaków w wieku od 11 do 15 tyg. życia (49/66; 74,2%) była znacznie większa niż w grupie ptaków młodszych, tj. w wieku 1-10 tyg. życia (8/66; 12%) oraz w grupie gęsi starszych, tj. w wieku 16-19 tyg. życia (9/66, 13,6%) (Ryc. 4.2.).



**Rycina 4.1.** Liczba przypadków różycy zdiagnozowanych u drobiu wodnego w latach 2019-2021 w Laboratorium Weterynaryjnym Vet-Lab Brudzew, dr Piotr Kwieciński. **A.** Liczba przypadków różycy u gęsi (stada hodowane na tucz i reprodukcyjne), w podziale na poszczególne miesiące, **B.** Liczba przypadków różycy u gęsi (stada hodowane na tucz i reprodukcyjne), w podziale na poszczególne półrocza, **C.** Liczba przypadków różycy u kaczek



**Rycina 4.2.** Liczba przypadków różycy zdiagnozowanych w latach 2019-2021 w Laboratorium Weterynaryjnym Vet-Lab Brudzew dr Piotr Kwieciński u gęsi hodowanych na tucz będących w poszczególnych przedziałach wiekowych

Podsumowując należy stwierdzić, że charakter przeprowadzonych analiz nie pozwolił na jednoznaczne określenie czynników predysponujących do rozwoju zakażeń szczepami *E. rhusiopathiae* u gęsi, ponieważ nie określano częstotliwości występowania różycy w poszczególnych grupach wiekowych ptaków czy okresach roku, a jedynie opierano się na przypadkach jakie trafiły do laboratorium. Jednakże, uzyskane wyniki (nierównomierny rozkład przypadków) uprawniają do przypuszczenia, że czynnikami ryzyka w przypadku różycy drobiu wodnego jest zarówno wiek ptaków jak i czynniki atmosferyczne.

#### 4.2. Zmiany sekcyjne w przebiegu różycy u gęsi i kaczek

U gęsi (n=76) i kaczek (n=9) zakażonych włoskowcem różycy odnotowano różnego rodzaju zmiany anatomopatologiczne w tkance podskórnej, mięśniach udowych oraz narządach wewnętrznych (śledziona, wątroba, trzustka, serce) i stawach. Obserwowane zmiany były typowe dla zakażenia uogólnionego. Do najczęściej występujących, tj. odnotowanych u co najmniej 50% gęsi i/lub kaczek, należały:

- przekrwienie wątroby (u 61,8% gęsi i 88,9% kaczek), śledziona (u 33,3% kaczek i 73,7% gęsi), błony śluzowej jelita (u 55,5% kaczek i 65,8% gęsi), nerek (u 55,3% gęsi), tkanki podskórnej (u 51,3% gęsi) (Ryc.4.3),

- powiększenie wątroby (u 44,4% kaczek i 65,8% gęsi), śledziony (u 66,7% kaczek i 92,1% gęsi) i obrzęk nerek (u 33,3% kaczek i 69,7% gęsi),
- nieżytowe zapalenie błony śluzowej jelit, pusty żołądek (u 66,7% kaczek i 43,4% gęsi)
- obrzęk stawów skokowych (u 77,8% kaczek i 18,4% gęsi) (Tab. 4.2).

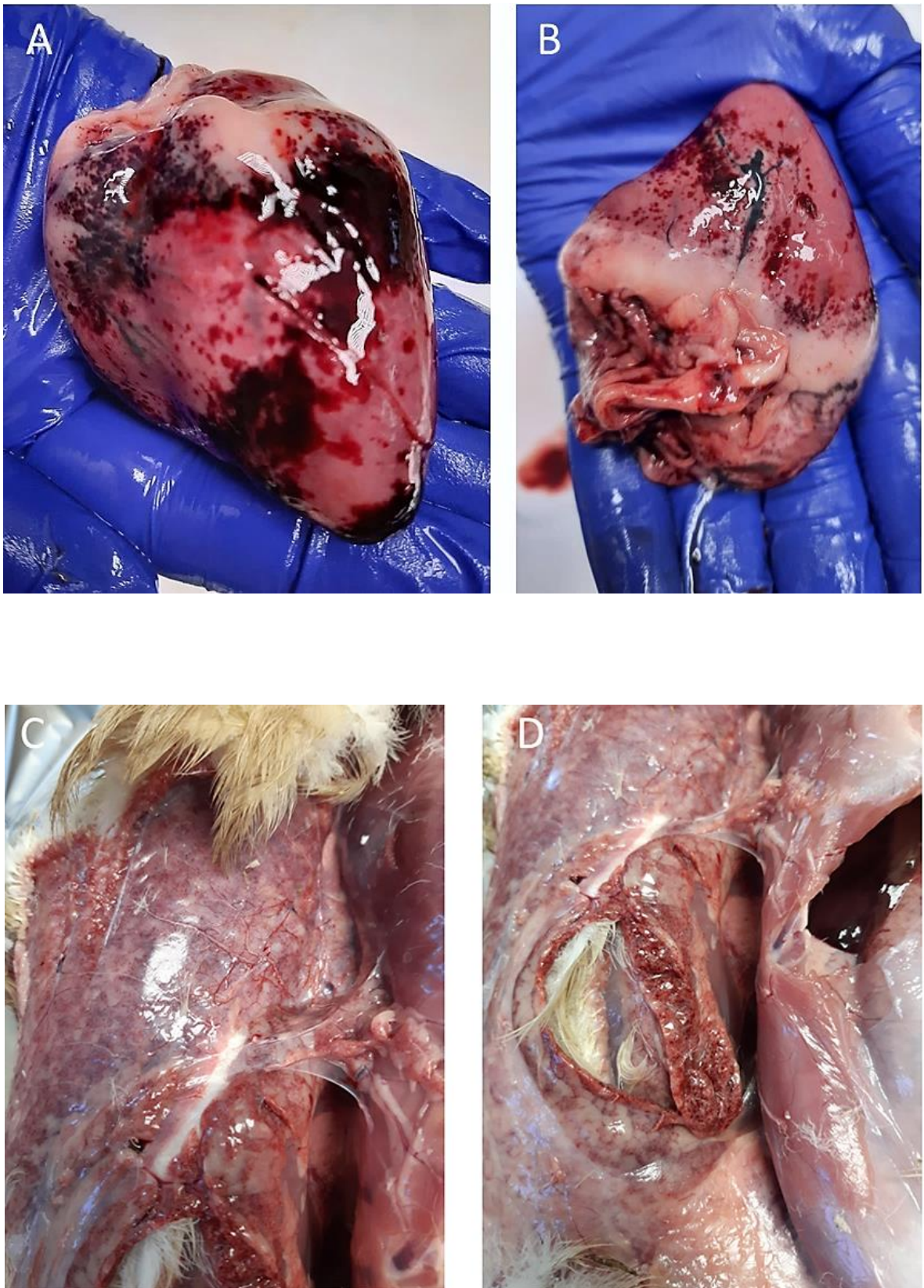
Ponadto u gęsi występowały wybroczyny na sercu, nasierdziu, wsierdziu (32,89%), na trzustce (26,31%) oraz na mięśniach udowych (6,58%). U ok. 1/3 (32%) badanych gęsi odnotowano obecność klarownego, słomkowo-żółtego płynu surowiczego w worku osierdziowym, a u co najmniej 25% - przekrwienia (25%) oraz serowate, włóknikowe naloty w workach powietrznych (u 28,9%). Żołądki jak i jelita  $\geq 33,3\%$  badanych ptaków były pozbawione treści pokarmowej. Dość często notowano także wzdęcia jelit bądź zagazowanie jelit ślepych (18,4-44,4%). W stawach skokowych u 18,4% gęsi i 33,3% kaczek ujawniono surowiczy wysięk w torebkach stawowych i obrzęk (u 18,4% gęsi i aż 77,8% kaczek). U ptaków nieśnych stwierdzono również zmiany w układzie rozrodczym, w postaci przekrwienia jajowodu i kul żółtkowych. Zestawienie wszystkich obserwowanych zmian przedstawiono w Tabeli 4.2.

**Tabela. 4.2.** Zmiany sekcyjne u gęsi i kaczek zakażonych włoskowcem różycy

Zmiany anatomopatologiczne	Liczba i odsetek ptaków	
	GĘSI [n=76]	KACZKI [n=9]
Przekrwienie śledziony	<b>56 [73,68%]</b>	3 [33,33%]
Przekrwienie wątroby	<b>47 [61,84%]</b>	<b>8 [88,88%]</b>
Przekrwienie błony śluzowej jelit na całej długości	<b>50 [65,79%]</b>	<b>5 [55,55%]</b>
Przekrwienie nerek	<b>42 [55,26%]</b>	-
Przekrwienie dwunastnicy	15 [19,74%]	3 [33,33%]
Przekrwienie tkanki płucnej	5 [6,58%]	3 [33,33%]
Przekrwienie worków powietrznych	19 [25%]	-
Przekrwienie błony śluzowej tchawicy	9 [11,84%]	-
Przekrwienie tkanki podskórnej	<b>39 [51,31%]</b>	-
Przekrwienie mięśni piersiowych	4 [5,26%]	-
Wybroczyny na trzustce	20 [26,31%]	-
Wybroczyny na śledzionie	1 [1,31%]	-
Wybroczyny na sercu, nasierdziu, wsierdziu	25 [32,89%]	-
Wybroczyny na tłuszczu pomiędzy jelitami	2 [2,63%]	-
Wybroczyny na mięśniach międzyżebrowych	2 [2,63%]	-
Wybroczyny na mięśniach udowych	5 [6,58%]	-
Powiększenie śledziony	<b>70 [92,1%]</b>	<b>6 [66,67%]</b>
Powiększenie wątroby	<b>50 [65,79%]</b>	4 [44,44%]
Powiększony obrys serca	1 [1,31%]	-
Surowiczy wysięk w worku osierdziowym	25 [32,89%]	-
Włóknikowe zapalenie worka osierdziowego	1 [1,31%]	-

Obrzęk nerek	<b>53 [69,74%]</b>	3 [33,33%]
Marmurkowość nerek	2 [2,63%]	-
Zmętnienie worków powietrznych	5 [6,58%]	-
Serowate naloty na workach powietrznych	22 [28,95%]	3 [33,33%]
Włóknikowe zapalenie worków powietrznych	9 [11,84%]	-
Wytrzewienie jelit	1 [1,31%]	-
Wzdęcie jelit	14 [18,42%]	4 [44,44%]
Zgazowanie jelit ślepych	16 [21,05%]	-
Nieżytowe zapalenie błony śluzowej jelit	33 [43,42%]	<b>6 [66,67%]</b>
Pusty żołądek	<b>41 [53,95%]</b>	3 [33,33%]
Puste jelita	26 [34,21%]	-
Krew w świetle jelit ślepych	1 [1,31%]	-
Pogrubienie błony śluzowej jelit	2 [2,63%]	-
Pasożyty w jelicie	2 [2,63%]	-
Krwista treść jelit ślepych	3 [3,95%]	-
Obrzęk stawów skokowych	14 [18,42%]	<b>7 [77,78%]</b>
Surowiczy wysięk w torebkach stawów skokowych	14 [18,42%]	3 [33,33%]
Włóknik na torebce wątroby	1 [1,31%]	2 [22,22%]
Włóknikowe zapalenie wątroby	1 [1,31%]	-
Zmiany martwicze na trzustce	3 [3,95%]	-
Zmiany martwicze w wątrobie	2 [2,63%]	-
Zmiany martwicze w nerkach	3 [3,95%]	-
Surowiczy wysięk w jamie brzusznej	1 [1,31%]	-
Marmurkowość śledziony	3 [3,95%]	3 [33,33%]
Zmiany nowotworowe w śledzionie	1 [1,31%]	-
Zmiany nowotworowe w wątrobie	1 [1,31%]	-
Zmiany nowotworowe w nerkach	1 [1,31%]	-
Zażółcenie wątroby	1 [1,31%]	-
Zażółcenie nerek	1 [1,31%]	-
Wątroba o tęgiej konsystencji	-	1 [11,11%]
Wątroba o tęgiej konsystencji ze zmianami	-	4 [44,44%]
Śluz w otworach nosowych	4 [5,26%]	3 [33,33%]
Złogi moczanów w moczowodach	7 [9,21%]	-
Śluz w świetle tchawicy	3 [3,95%]	1 [11,11%]
Wodobrzusze	-	1 [11,11%]
Przewód pokarmowy zaczopowany treścią	1 [1,31%]	-
Wydziobany stek	1 [1,31%]	-
Skaleczenie w okolicy kupra	1 [1,31%]	-
Ropna wydzielina w stawach skokowych	7 [9,21%]	2 [22,22%]
Ropna wydzielina w podszwie	3 [3,95%]	-
Obrzęk podszwy	-	3 [33,33%]
Odparzenie podszwy	-	4 [44,44%]
Przekrwienie jajowodu	-	1 [11,11%]
Przekrwienie kul żółtkowych	-	4 [44,44%]
Brak aktywności jajnika	-	2 [22,22%]



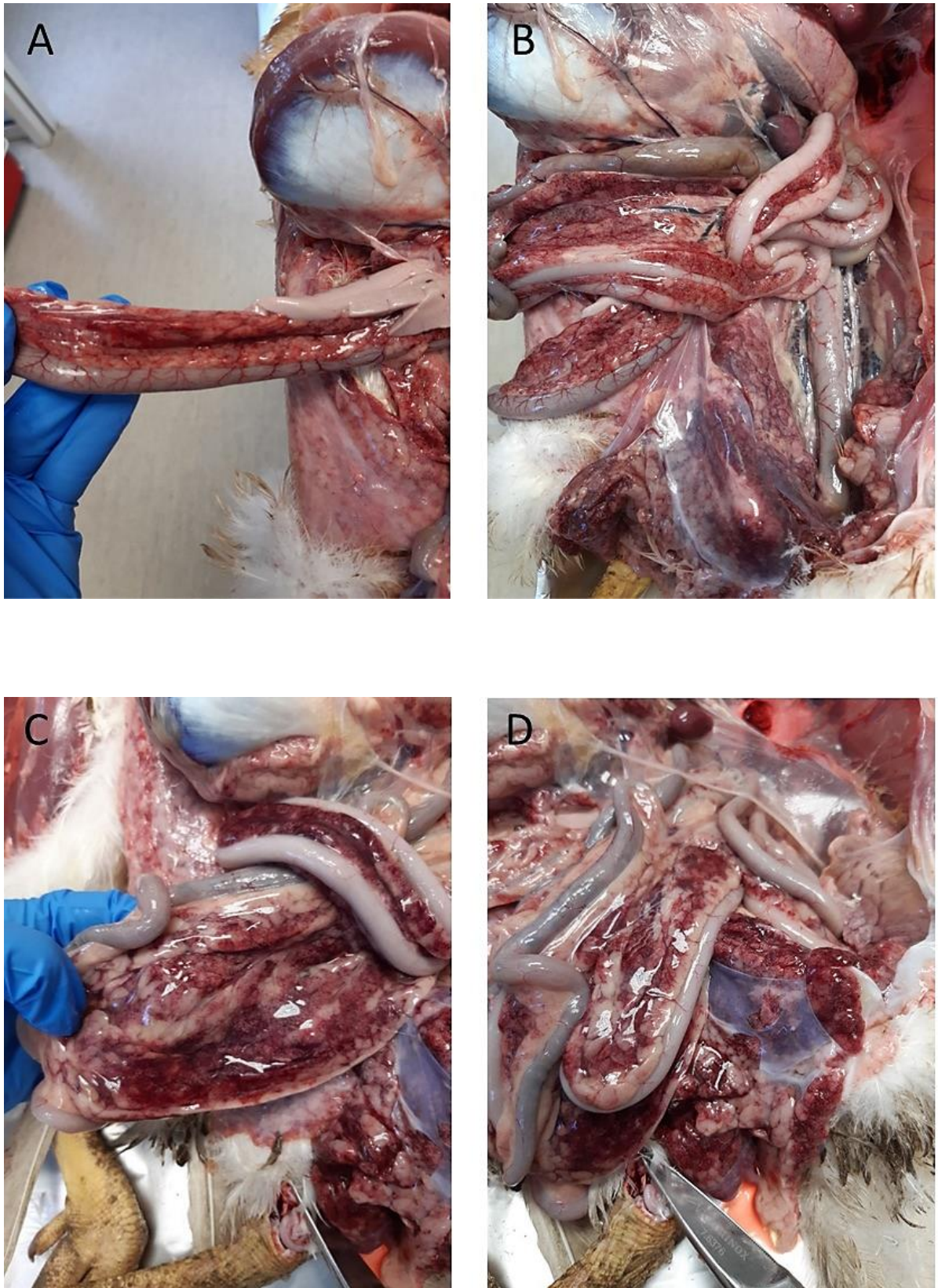


**Rycina 4.3.** Zmiany anatomopatologiczne u gęsi zakażonych włoskowcem różycy. A, B – wybroczyny w obrębie mięśnia sercowego; C, D – przekrwienie tkanki podskórnej



Co ciekawe niektóre obserwowane zmiany występowały tylko u gęsi (np. przekrwienie nerek, tkanki podskórnej, tkanki płucnej (Ryc. 4.4), wybroczyny na trzustce i sercu, surowiczy wysięk w worku osierdziowym), a niektóre stwierdzono tylko u kaczek (np. wątroba o tęgiej konsystencji ze zmianami, wodobrzusze, obrzęk i odparzenia podeszwy) (Tab. 4.2).

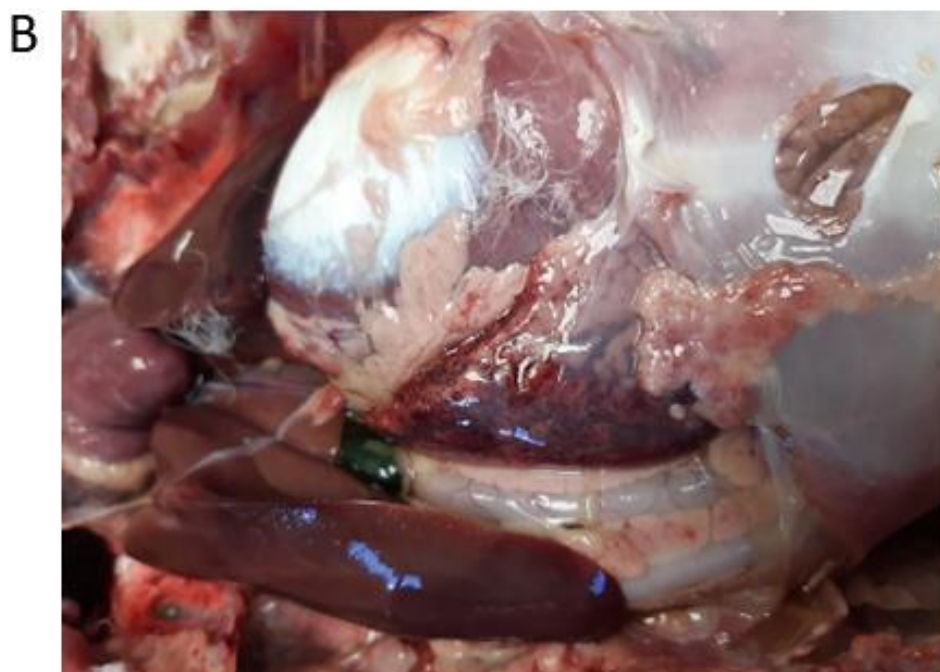
W badaniach różnicowych brano pod uwagę uogólnioną infekcję *E. coli*, przebiegającą najczęściej z obecnością włókniaka w obrębie narządów wewnętrznych i worków powietrznych oraz *R. anatipestifer*, w przebiegu której obserwuje się obecność surowiczego płynu w jamie otrzewnej. W przypadku zakażenia *P. multocida* obserwowane są również, podobnie jak w przypadku różycy, masywne przekrwienia narządów i tkanki płucnej i mięśni. Rzadziej obserwuje się wybroczyny w tkance podskórnej.



**Rycina 4.4.** Zmiany anatomopatologiczne u gęsi zakażonych włoskowcem różycy. A – przekrwienie jelita; B, C i D – krwotoczne zapalenie błony śluzowej dwunastnicy, nieżytowo-martwicze zapalenie jelit cienkich i grubych oraz przekrwienia na tłuszczu pomiędzy jelitami







**Rycina 4.5.** Zmiany anatomopatologiczne u gęsi zakażonej włoskowcem różycy. A – przekrwienia w tkance płucnej; B – wybroczyny na tłuszczu pomiędzy jelitami

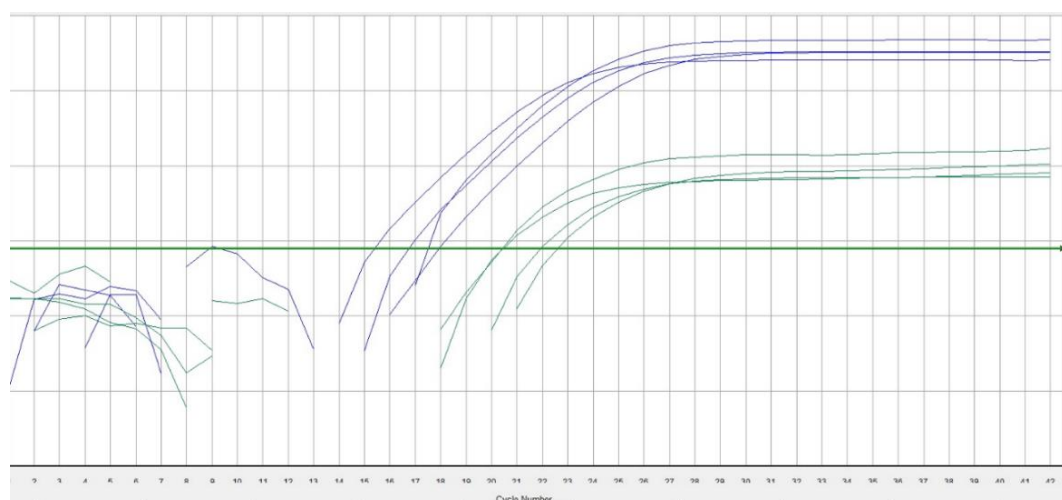


### 4.3. Izolacja i identyfikacja szczepów *E. rhusiopathiae*

Z łącznej liczby gęsi i kaczek z podejrzeniem różycy (n=302, po 1-4 szt. z danej fermy, łączna liczba ferm-99) jakie dostarczono w latach 2019-2021 do Laboratorium Weterynaryjnego Vet-Lab Brudzew, dr Piotr Kwieciński wyizolowano ponad 200 izolatów bakteryjnych, które na agarze Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej rosły w postaci drobnych płaskich szaro-białych półtransparentnych kolonii, z reguły z towarzyszącą hemolizą typu  $\alpha$ . 128 izolatów (po 1-2 izolaty z każdej fermy) poddano identyfikacji za pomocą komercyjnego zestawu real-time PCR (Tab. 4.3).

#### 4.3.1. Identyfikacja bakterii *E. rhusiopathiae* za pomocą testów real-time PCR

Dla wszystkich izolatów identyfikowanych przy użyciu zestawów diagnostycznych real-time PCR (n=128) uzyskano pozytywny sygnał fluorescencji z kanału FAM (Ct  $\leq$  38), przy jednoczesnej pozytywnej detekcji z kanału HEX (Ct 22-33) (Ryc. 4.6). Otrzymane wyniki potwierdziły przynależność wszystkich szczepów do gatunku *E. rhusiopathiae*.



**Rycina 4.6.** Wykres fluorescencji w przebiegu reakcji real-time PCR prowadzonej w celu identyfikacji izolatów *E. rhusiopathiae*. Linia graniczna (threshold, zielona pozioma) wyznacza próg fluorescencji, który odcina cykl kwantyfikacji; oś X – liczba cykli; oś Y – natężenie fluorescencji; krzywe granatowe – sygnał fluorescencji z kanału FAM - detekcja *E. rhusiopathiae*, krzywe zielone – sygnał fluorescencji z kanału HEX - detekcja IC (kontrola wewnętrzna)

Ze 128 zidentyfikowanych izolatów *E. rhusiopathiae* do dalszych analiz wybrano 60, uznając tę liczbę za reprezentatywną. Każdy izolat pochodził z innej fermy, za wyjątkiem izolatów 155 i 818 (różniących się nieznacznie morfologią kolonii), które pozyskano od tego samego osobnika (Tab. 4.3). Dane kliniczne oraz wyniki identyfikacji dotyczące izolatów *E. rhusiopathiae* wybranych do dalszych analiz przedstawiono w Tabeli 4.4.

**Tabela 4.3.** Liczba zebranych izolatów *E. rhusiopathiae*

Liczba ptaków dostarczonych dla laboratorium	Liczba ferm, z których pochodziły ptaki	Liczba izolatów <i>E. rhusiopathiae</i> (identyfikowano po 1-2 izolaty z każdej fermy)	Liczba izolatów wybranych do dalszych analiz
Gęsi ze stad na tucz	66	86	40 szczepów z 40 ferm
Gęsi ze stad reprodukcyjnych	27	34	15 szczepów z 14 ferm
Kaczki ze stad reprodukcyjnych	6	8	5 szczepów z 5 ferm
Razem	99	128	60

**Tabela 4.4.** Izolaty *E. rhusiopathiae* wybrane do dalszych analiz (n=60)

L.p.	Nr szczepu	Gatunek ptaka	Rok izolacji	Miesiąc izolacji	Wiek ptaków	Przeznaczenie	Wyniki identyfikacji izolatów		
							Spektrometria mas MALDI-TOF [log(score)]	karty VITEK® – prawdopodobieństwo poprawnej identyfikacji [%]	real-time PCR - potwierdzenie gatunku <i>E. rhusiopathiae</i>
1	451	kaczka	2021	2	9 tyg.	reprodukcja	2,115	90	+
2	584	kaczka	2021	4	1 rok	reprodukcja	2,097	95	+
3	1023	gęś	2021	4	2 lata	reprodukcja	2,016	88	+
4	267	gęś	2021	8	15 tyg.	tucz	2,135	94	+
5	803	gęś	2021	8	13 tyg.	tucz	2,092	91	+
6	497	gęś	2021	9	1 rok	reprodukcja	2,149	94	+
7	1083	gęś	2021	9	14 tyg.	tucz	2,222	99	+
8	959	gęś	2021	10	17 tyg.	tucz	2,244	98	+
9	1092	gęś	2021	10	12 tyg.	tucz	2,282	94	+
10	633	gęś	2021	11	8 m-cy	reprodukcja	2,353	98	+
11	849	gęś	2020	7	12 tyg.	tucz	2,318	89/99	+
12	136	gęś	2020	8	16 tyg.	tucz	2,048	95	+
13	219	gęś	2020	8	12 tyg.	tucz	2,112	92	+
14	512	gęś	2020	8	11 tyg.	tucz	2,104	89	+
15	670	gęś	2020	8	7 tyg.	tucz	2,114	90/99	+
16	815	gęś	2020	8	15 tyg.	tucz	2,074	94	+
17	877	gęś	2020	8	9 tyg.	tucz	2,102	89	+
18	1154	gęś	2020	8	13 tyg.	tucz	2,212	93	+
19	43	gęś	2020	9	15 tyg.	tucz	2,064	98	+
20	44	gęś	2020	9	7 tyg.	tucz	2,025	98	+
21	95	gęś	2020	9	11 tyg.	tucz	2,023	98	+
22	147	gęś	2020	9	14 tyg.	tucz	2,191	89	+
23	167	gęś	2020	9	14 tyg.	tucz	2,179	98	+
24	176	gęś	2020	9	12 tyg.	tucz	2,006	88	+
25	320	gęś	2020	9	12 tyg.	tucz	1,986	94	+
26	395	gęś	2020	9	14 tyg.	tucz	2,105	95	+
27	489	gęś	2020	9	10 tyg.	tucz	2,066	98	+
28	579	gęś	2020	9	19 tyg.	tucz	2,003	98	+
29	652	gęś	2020	9	13 tyg.	tucz	2,223	98	+
30	784	gęś	2020	9	ok. 4	reprodukcja	2,102	90	+
31	1042	gęś	2020	9	16 tyg.	tucz	2,241	93/99	+
32	1173	gęś	2020	9	13 tyg.	tucz	2,046	90	+

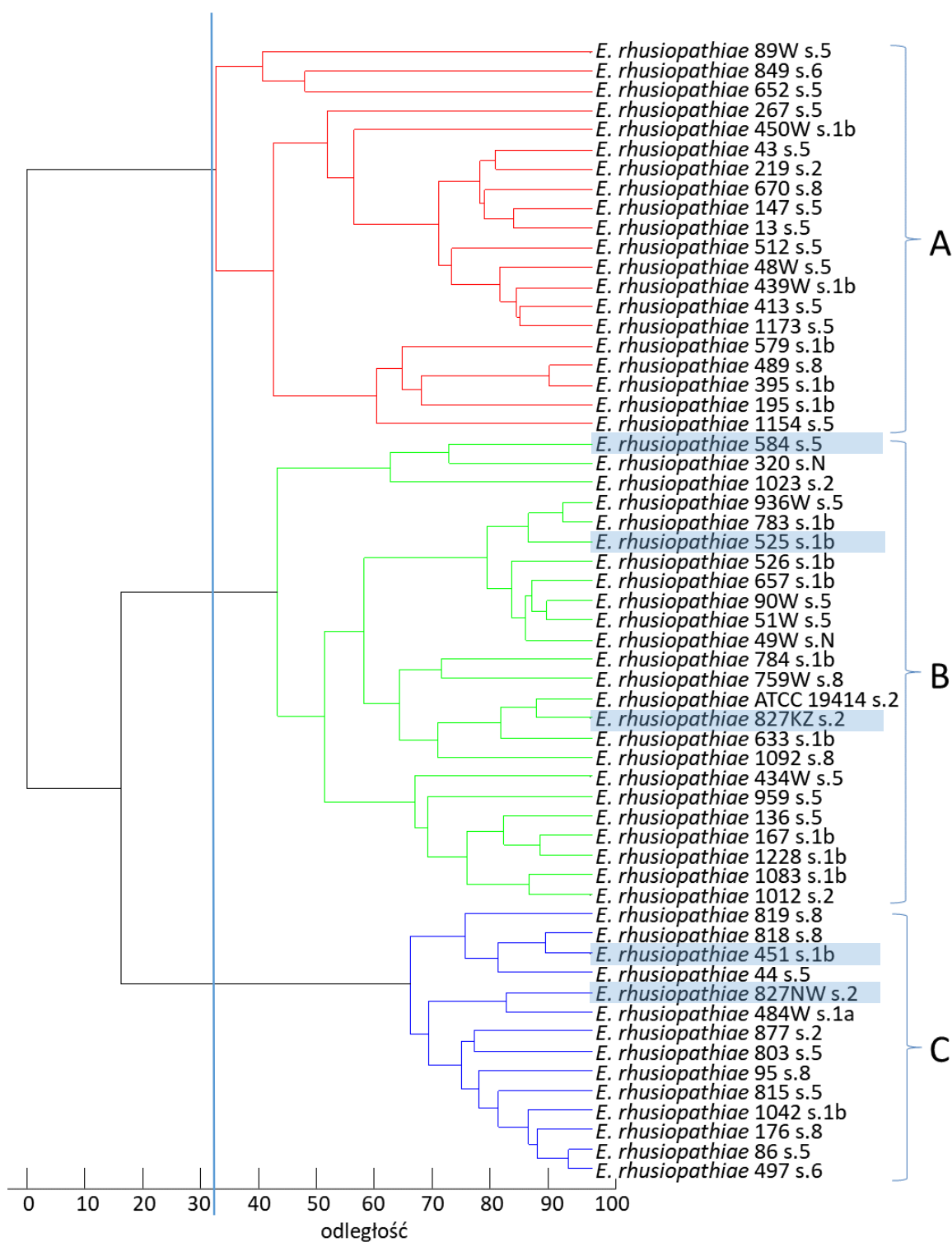
33	1228	gęś	2020	9	12 tyg.	tucz	2,154	90	+
34	13	gęś	2020	10	17 tyg.	tucz	2,2	87	+
35	526	gęś	2020	10	15 tyg.	tucz	2,063	94	+
36	657	gęś	2020	10	17 tyg.	tucz	2,161	95	+
37	783	gęś	2020	10	17 tyg.	tucz	2,198	93	+
38	413	gęś	2020	10	ok. 2	reprodukcja	2,008	85	+
39	1012	gęś	2020	12	9 m-cy	reprodukcja	2,188	94	+
40	827KZ	kaczka	2020	12	9 m-cy	reprodukcja	2,173	95/96	+
41	827NW	kaczka	2020	11	9 m-cy	reprodukcja	2,026	99/98	+
42	525	kaczka	2020	10	7 m-cy	reprodukcja	2,013	90	+
43	195	gęś	2019	7	12 tyg.	tucz	2,104	91	+
44	48W	gęś	2019	7	13 tyg.	tucz	2,112	90	+
45	51W	gęś	2019	8	12 tyg.	tucz	2,004	98	+
46	89W	gęś	2019	8	10 tyg.	reprodukcja	2,018	98	+
47	484W	gęś	2019	8	15 tyg.	tucz	2,053	98	+
48	759W	gęś	2019	8	15 tyg.	tucz	2,197	88	+
49	450W	gęś	2019	8	11 tyg.	tucz	2,033	98	+
50	439W	gęś	2019	9	16 tyg.	tucz	2,105	98	+
51	936W	gęś	2019	9	16 tyg.	tucz	2,101	99	+
52	434W	gęś	2019	9	15 tyg.	tucz	2,068	98	+
53	818	gęś	2019	9	9 tyg.	reprodukcja	2,137	94	+
54	155	gęś	2019	9	9 tyg.	reprodukcja	NT	NT	+
55	819	gęś	2019	10	15 tyg.	tucz	2,108	96	+
56	202	gęś	2019	10	11 tyg.	tucz	NT	NT	+
57	86	gęś	2019	11	11 tyg.	reprodukcja	2,099	88	+
58	90W	gęś	2019	11	ok. 1,5	reprodukcja	2,011	89	+
59	53	gęś	2019	12	12 tyg.	reprodukcja	NT	NT	+
60	49W	gęś	2019	12	8 m-cy	reprodukcja	2,219	98	+

NT – nie testowano

#### 4.3.2. Identyfikacja *E. rhusiopathiae* za pomocą spektrometrii mas MALDI-TOF

Wszystkie izolaty poddane analizie za pomocą spektrometrii mas typu MALDI-TOF (n=57; 3 izolaty z 60 wybranych do analiz obumarły podczas przechowywania w końcowej fazie realizacji badań) zostały przyporządkowane do gatunku *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Dla 56 izolatów uzyskane wartości log(score) mieściły się w zakresie 2,003 do 2,353, co oznacza prawdopodobną lub wysoce prawdopodobną identyfikację do poziomu gatunku. Dla jednego izolatów log(score) wynosił 1,973, co wskazuje na prawdopodobną identyfikację do poziomu rodzaju (Tabela 4.4). Podobieństwo między szczepami *E. rhusiopathiae* w oparciu o uzyskane widma mas MALDI-TOF, przedstawia dendrogram wykreślony na podstawie przeprowadzonej analizy skupień UPGMA. Na poziomie podobieństwa ok. 30%, badane szczepy tworzyły trzy główne klastry (A, B, C) liczące od 14 (klaster C) do 24 szczepów (klaster B). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy serotypem bądź pochodzeniem szczepu (gęś, kaczka) a profilami widm mas (Ryc. 4.7).





**Rycina 4.7.** Dendrogram uzyskany na podstawie analizy skupień (metoda średnich połączeń - UPGMA) widm masowych (MALDI-TOF) terenowych szczepów *E. rhusiopathiae* (n=57) oraz szczepu referencyjnego ATCC 19414. Względna odległość między izolatami została wyrażona za pomocą jednostek arbitralnych. 100 oznacza całkowite podobieństwo, a 0 oznacza maksymalną odmienność. Linia pionowa odpowiada podobieństwu na poziomie ~30%. Kolorem niebieskim podświetlono szczepy pochodzące od kaczek

### 4.3.3. Identyfikacja *E. rhusiopathiae* przy użyciu kart VITEK®2 GP

W metodzie z użyciem kart biochemicznych VITEK®2 GP wszystkie izolaty (n=57, 3 izolaty z 60 wybranych do analiz obumarły podczas przechowywania w końcowej fazie realizacji badań) zostały zidentyfikowane jako *E. rhusiopathiae*, a prawdopodobieństwo poprawnej identyfikacji wahało się od 85% do 99% (mediana 94%) (Tab. 4.4):

- *Excellent* – 21 izolatów (36,8%) (wartość identyfikacji 96 - 99 %)
- *Very Good* – 15 izolatów (26,3%) (wartość identyfikacji 93 - 95 %)
- *Good* – 15 izolatów (26,3%) (wartość identyfikacji 89 - 92 %)
- *Acceptable* – 6 izolatów (10,5%) (wartość identyfikacji 85 - 88 %)
- *Low discrimination* – 0 izolatów

Czas odczytu mieścił się w zakresie od 4,11 (4 godz. i 7 min) do 8,00 godz., przy czym mediana wynosiła 7,6 godz. (7 godz. i 36 min). Dla porównania dla szczepu wzorcowego *E. rhusiopathiae* ATCC 19414 uzyskano wynik identyfikacji na poziomie 97%, a czas odczytu wynosił 4,88 godz. (4 godz. i 53 min).

Ogromna większość badanych izolatów (n=57) wykazywała aktywność

- arylamidazy L-pirolidonylu (96,5%; aminopeptydaza pirolidonylu, aktywność tego enzymu jest wykorzystywana do różnicowania enterokoków, streptokoków i gronkowców)
- arylamidazy tyrozyny (94,7%)  
oraz oporność na:
  - nowobiocynę (antybiotyk wykorzystywany do różnicowania gronkowców) (77,2%)
  - optochinę (na tę substancję wrażliwe są szczepy *Streptococcus pneumoniae*) (94,7%)

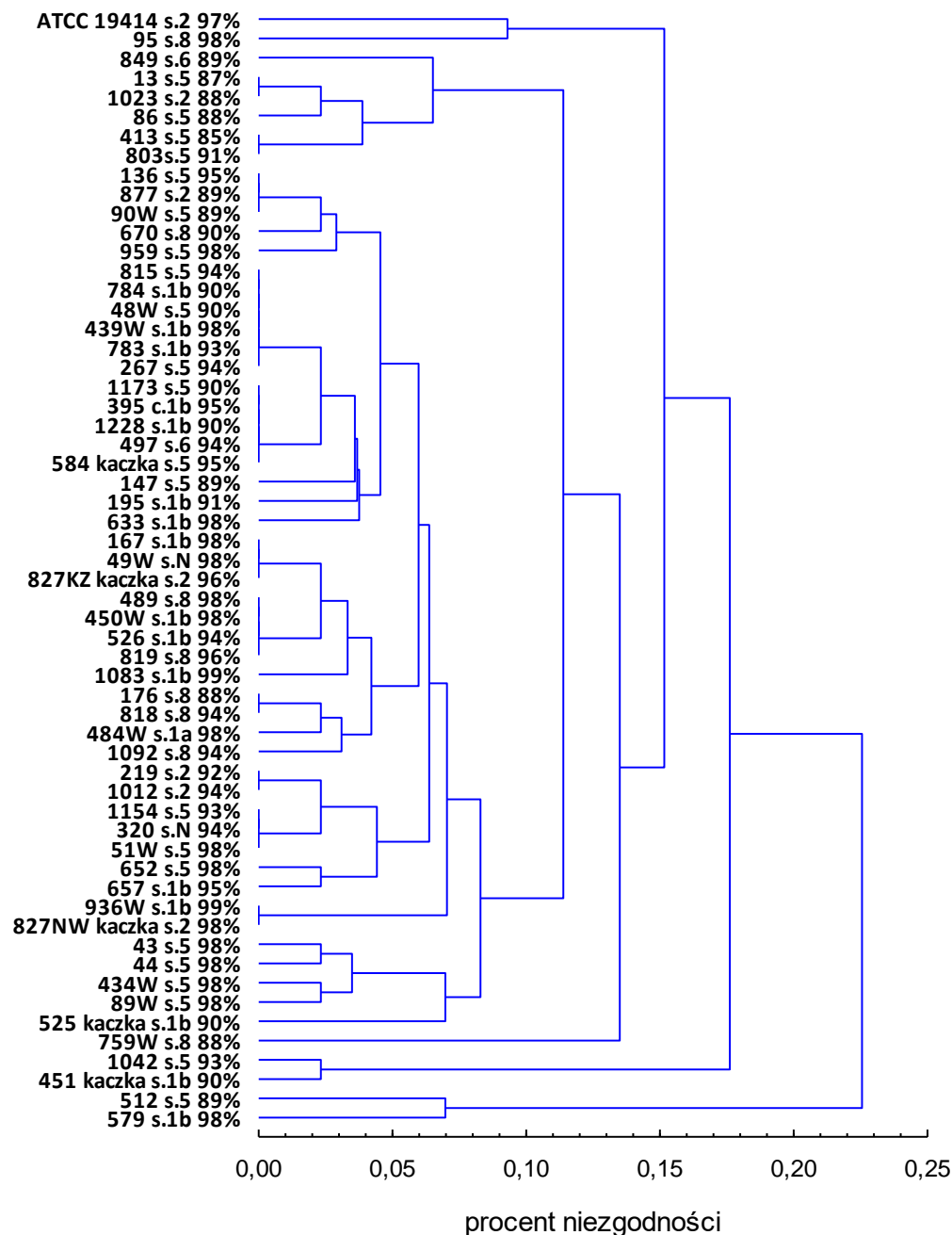
Ok. 30% izolatów wykazywało zdolność do utylizacji N-acetylo-D-glukozy i odznaczało się opornością na bacytracynę - antybiotyk o działaniu bakteriobójczym wobec bakterii Gram-dodatnich. Mniej niż 27% izolatów *E. rhusiopathiae* utylizowało D-trechozę (26,3%), D-sorbitol (14,0%) i D-mannitol (10,5%). 19% izolatów wykazywało aktywność enzymu  $\beta$ -galaktopiranozydazy. Pojedyncze izolaty (3,5-8,8%) wykazywały zdolność do utylizacji sacharozy (8,8%), salicyny (5,3%), D-galaktozy i D-rafinozy (3,5%) oraz D-amigdaliny (1,7%). Żaden izolat nie utylizował D-rybozy, laktozy, D-maltozy, D-ksylozy i D-mannozy (Tab. 4.5). Profile biochemiczne badanych szczepów zostały przedstawione w Tabeli 4.6.

**Tabela 4.5.** Liczba i odsetek izolatów *E. rhusiopathiae* wykazujących określone właściwości biochemiczne (utyliczacja substratów, aktywność enzymów, oporność na wybrane substancje)

	Oznaczenie producenta	Substrat	Liczba izolatów	Odsetek izolatów
1	NAG	N-ACETYLO-D-GLUKOZAMINA	17	29,8%
2	dTRE	D-TREHALOZA	15	26,3%
3	dMAN	D-MANNITOL	6	10,5%
4	dSOR	D-SORBITOL	8	14,0%
5	SAC	SACHAROZA	5	8,8%
6	SAL	SALICIN	3	5,3%
7	AMY	D-AMYGDALINA	1	1,7%
8	dGAL	D-GALAKTOZA	2	3,5%
9	dRAF	D-RAFINOZA	2	3,5%
10	dRIB	D-RYBOZA	0	0%
11	LAC	LACTOSE	0	0%
12	dMAL	D-MALTOZA	0	0%
13	dXYL	D-KSYLOZA	0	0%
14	dMNE	D-MANNOZA	0	0%
15	PUL	PULLULAN (polisachryd)	0	0%
16	CDEX	CYKLODEKSTRYNA	0	0%
17	MDbG	METYLO-B-D-GLUKOPIRANOZYD	0	0%
18	BGAR	$\beta$ -GALAKTOPIRANOZYDAZA	11	19,3%
19	BGAL	$\beta$ -GALAKTOZYDAZA	2	3,5%
20	AGLU	$\alpha$ -GLUKOZYDAZA	0	0%
21	AGAL	$\alpha$ -GALAKTOZYDAZA	0	0%
22	BGURr	$\beta$ -GLUKURONIDAZA 0,0018mg	0	0%
23	BGUR	$\beta$ -GLUKURONIDAZA 0,0378mg	0	0%
24	AMAN	$\alpha$ -MANNOZYDAZA	0	0%
25	APPA	ARYLAMIDAZA Ala-Phe-Pro	0	0%
26	PyrA	ARYLAMIDAZA L-pirolidonylu	55	96,5%
27	TyrA	ARYLAMIDAZA tyrozyny	54	94,7%
28	ProA	ARYLAMIDAZA L-proliny	0	0%
29	AspA	ARYLAMIDAZA L-asparaginianu	3	5,3%
30	AlaA	ARYLAMIDAZA alaniny	2	3,5%
31	LeuA	ARYLAMIDAZA leucyny	0	0
32	ADH1	DIHYDROLAZA ARGININY 1	1	1,7%
33	ADH2s	DIHYDROLAZA ARGININY 2	0	0%
34	PIPL	FOSFOLIPAZA C FOSFATYDYLOINOZYTOLU	0	0%
35	PHOS	FOSFATAZA	0	0%
36	URE	UREAZA	0	0%
37	ILATk	Alkalizacja L-MLECZANU	2	3,5%
38	OPTO	OPORNOŚĆ NA OPTOCHINĘ	54	94,7%
39	NOVO	OPORNOŚĆ NA NOWOBIOCYNĘ	44	77,2%
40	BACI	OPORNOŚĆ NA BACYTRACYNĘ	18	31,6%
41	POLYB	OPORNOŚĆ NA POLIMYKSYNĘ B	1	1,7%
42	O129R	OPORNOŚĆ NA O/129 (środek wibriostatyczny)	0	0%
43	NC6.5	WZROST W OBECNOŚCI 6,5% NaCl	0	0%

Badane izolaty *E. rhusiopathiae* (n=57) reprezentowały 34 profile biochemiczne (Ryc. 4.8, Tab. 4.6); dodatkowy profil uzyskano dla szczepu referencyjnego *E. rhusiopathiae* ATCC 19414. Nie odnotowano zależności pomiędzy serotypem lub pochodzeniem szczepu (gęś/kaczka) a profilem biochemicznym (Ryc. 4.8). Co ciekawe, w przypadku szczepów mających identyczne profile biochemiczne uzyskano wyniki identyfikacji różniące się wartością procentową (Ryc 4.8). Różnice te wynikają z algorytmu oprogramowania systemu VITEK®2 Compact, który do określenia końcowego wyniku wykorzystuje nie tylko reakcje biochemiczne, ale także czas uzyskania sygnału reakcji. Jeśli określona reakcja/reakcje dają opóźniony sygnał, wówczas system może zinterpretować to jako zmianę mniej lub bardziej istotną wpływającą na końcowy wynik. Stąd możliwe są różne procentowe wartości prawdopodobieństwa identyfikacji dla szczepów, dla których reakcje były takie same (na podstawie informacji uzyskanych od przedstawiciela firmy Biomerieux, Polska).

Dendrogram UPGMA obrazujący podobieństwo izolatów  
*E. rhusiopathiae* na podstawie profili biochemicznych



**Rycina 4.8.** Dendrogram przedstawiający podobieństwo cech biochemicznych szczepów *E. rhusiopathiae*, wykreślony na podstawie wyników uzyskanych z 43 studzienek reakcyjnych umieszczonych na kartach VITEK®2 GP. Hierarchiczną analizę skupień wykonano za pomocą metody średnich połączeń (UPGMA). Profile biochemiczne badanych szczepów zostały przedstawione w Tabeli 4.6





#### 4.3.4. Porównanie zastosowanych metod identyfikacji bakterii *E. rhusiopathiae*

Metody identyfikacji bakterii stosowane w weterynaryjnych laboratoriach diagnostycznych powinny odznaczać się nie tylko wysoką siłą dyskryminacji, ale także pozwalać na uzyskanie wyniku w jak najkrótszym czasie, szczególnie w przypadku ostrego przebiegu infekcji w stadzie. Istotne są także koszty wykonania analizy. W Tabeli 4.7 dokonano porównania zastosowanych w toku realizacji pracy doktorskiej metod identyfikacji bakterii *E. rhusiopathiae*. Każda z nich umożliwia identyfikację *E. rhusiopathiae* do poziomu gatunku, jednak na niekorzyść metody z wykorzystaniem kart biochemicznych VITEK®2 GP przemawia uzyskiwana dla niektórych szczepów niska wartość identyfikacji, tj. poniżej 90%, oraz ograniczona powtarzalność w zakresie profilu biochemicznego i czasu analizy. Biorąc pod uwagę czas niezbędny do wykonania oznaczenia najkorzystniejsza wydaje się spektrometria mas MALDI-TOF, która pozwala na uzyskanie wyniku identyfikacji w czasie nieprzekraczającym 1 godz., kolejno metoda PCR. Jednostkowe koszty oznaczeń są trudne do oszacowania ze względu na konieczność zakupu nie tylko odczynników, ale i sprzętu (termocykler do real-time PCR, spektrometr mas, system VITEK®2) oraz ich serwisowania. Koszt identyfikacji bakterii w laboratoriach zewnętrznych jest zróżnicowany, w przypadku spektrometrii mas MALDI-TOF cena waha się od 40 do 70 zł za 1 szczep, natomiast koszty detekcji konkretnych patogenów w materiale klinicznym przy wykorzystaniu techniki real-time PCR zwykle są wyższe (około 200 zł).

**Tabela 4.7.** Porównanie trzech metod użytych w tych badaniach do identyfikacji izolatów *E. rhusiopathiae*

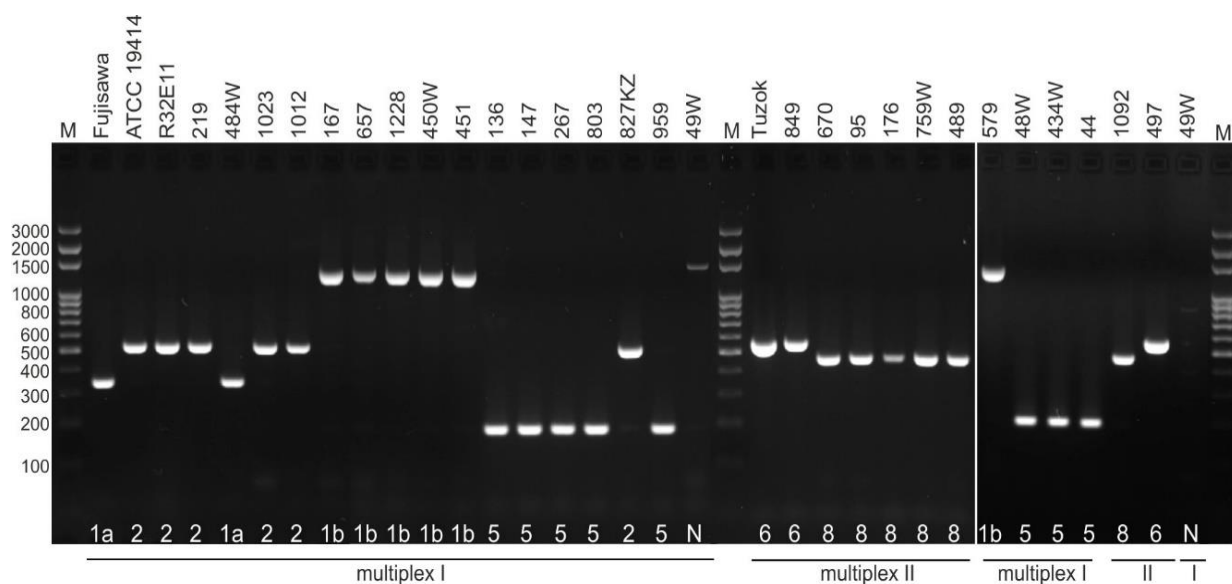
	<b>Real-time PCR przy użyciu gotowego zestawu EXOone <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i></b>	<b>Spektrometria mas typu MALDI-TOF</b>	<b>Analiza profili biochemicznych przy użyciu kart Biomerieux</b>
<b>Zasada identyfikacji</b>	Identyfikacja w oparciu o detekcję w czasie rzeczywistym określonych sekwencji w bakteryjnym DNA	Identyfikacja w oparciu o analizę widm masowych szczepów – przyrównanie widma badanego szczepu do widm szczepów referencyjnych z bazy danych	Identyfikacja w oparciu o analizę profili biochemicznych - przyrównanie profilu badanego szczepu do profili szczepów referencyjnych z bazy danych
<b>Odsetek szczepów prawidłowo zidentyfikowanych</b>	100%	100% [dla 96,5% szczepów $\log(\text{score}) \geq 2,000$ ; dla 3,5% - 1,900-1,999]	100%



<p><b>Czas wykonania od momentu uzyskania czystej kultury bakteryjnej</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Izolacja DNA genomowego i pomiar stężenia (1 szczep): 35 min.</li> <li>▪ Przygotowanie próbek i PCR: 1 godz. 50 min.</li> </ul> <p>Łącznie: 2 godz. 25 min.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Przygotowanie ekstraktu z bakterii: 25 min.</li> <li>▪ Naniesienie na płytkę ekstraktu, matrycy i wzorca masowego: 5 min</li> <li>▪ Kalibracja urządzenia: ~2 min. (jeśli mamy wcześniej przygotowany roztwór wzorca masowego)</li> <li>▪ Analiza-generowanie widm masowych: ~1 min</li> <li>▪ Wczytywanie widm i ich obróbka (ustawienie linii bazowej, wygładzenie) – około 8 min</li> <li>▪ Wczytanie widma do bazy danych – 1 min.</li> <li>▪ Analiza porównawcza widm masowych: około 15 min.</li> </ul> <p>Łącznie: ~ 1 godz.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Przygotowanie zawiesiny bakterii (1 szczep): 5 min.</li> <li>▪ Napelnianie kart zawiesiną bakterii: 2 min.</li> <li>▪ Czas analizy: od. 2 godz. i 7 min. do 8 godz.</li> </ul> <p>Łącznie: od 2 godz. i 14 min do 8 godz. i 7 min.</p>
<p><b>Koszt</b></p>	<p>Termocykler do real-time PCR: około 150 000 zł netto</p> <p>Zestaw do izolacji DNA genomowego z bakterii (100 próbek): ~450 zł</p> <p>Zestaw EXOone <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>: ~2700 zł (na 100 poróbek)</p>	<p>Koszt identyfikacji szczepu w usługowym laboratorium zewnętrznym: 40-70 zł</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Spektrometr masowy typu MALDI-TOF: od 800 000 -1 000 000 zł netto</li> <li>• Płytkę ze stali nierdzewnej do nakładania próbek ~3500 zł</li> <li>• Zestaw odczynników do ekstrakcji białek z bakterii, matryca, wzorzec masowy (po 1 najmniejszym opakowaniu) – około 6000 zł</li> </ul>	<p>Karty biochemiczne VITEK® 2 GP: około 30 zł/1 szt.</p> <p>Aparat VITEK® 2 Compact (Biomeriux) wraz z oprogramowaniem: około 170 000 netto</p>
<p><b>Uwagi</b></p>		<p>W przypadku wysyłania próbek do laboratorium zewnętrznego czas oczekiwania na wynik identyfikacji wydłuża się o czas transportu.</p> <p>Możliwość rozbudowy bazy danych o widma szczepów wzorcowych.</p>	<p>Brak możliwości manualnych ustawienia czasu analizy.</p> <p>Wyniki nie są w pełni powtarzalne - przy powtórzeniach notuje się zmienność w zakresie czasu analizy i % identyfikacji.</p>

#### 4.4. Serotypy izolatów *E. rhusiopathiae*

Przeprowadzone serotypowanie wykazało, że szczepy *E. rhusiopathiae* (n=60) przynależały do siedmiu serotypów, wśród których dominował serotyp 5 (38,3%) oraz 1b (28,3%). 15% szczepów reprezentowało serotyp 8, 10% szczepów – serotyp 2. Szczepy serotypów 6, N i 1a występowały sporadycznie (1,7-3,3%) (Tab. 4.8, Ryc. 4.9).



**Rycina 4.9.** Profile elektroforetyczne produktów PCR uzyskanych w teście serotypowania (multiplex PCR – I i II) dla wybranych szczepów *E. rhusiopathie*. Referencyjne szczepy: Fujisawa - serotyp 1a, ATCC 19414 - serotyp 2, R32E11 - serotyp 2 i Tuzok - serotyp 6, zostały użyte jako kontrola pozytywna; M – marker wielkości DNA

**Tabela 4.8.** Liczba i odsetek szczepów *E. rhusiopathiae* (n=60) reprezentujących poszczególne serotypy

Serotyp	Liczba szczepów [%]	gęsi	kaczki
5	<b>23 [38,3%]</b>	22	1
1b	<b>17 [28,3%]</b>	15	2
8	9 [15,0%]	9	-
2	6 [10,0%]	4	2
6	2 [3,3%]	2	-
N	2 [3,3%]	2	-
1a	1 [1,7%]	1	-
Łącznie:	60 [100%]	55	5

W przypadku jednej próbki, pozyskanej od 9-tygodniowej gęsi ze stada reprodukcyjnego, z której wyizolowano jednocześnie dwa szczepy *E. rhusiopathiae* (nr 818 i 155) różniące się nieznacznie morfologią kolonii. Jeden ze szczepów przynależał do serotypu 8 (818), a drugi reprezentował serotyp 5 (155). Co więcej, dalsze analizy wykazały, że oba szczepy różnią się profilem lekooporności (szczep nr 818 serotyp 8 był wielolekooporny). Przeprowadzone badania wykazały zatem, że różnica u gęsi może być wywoływana przez więcej niż jeden szczep *E. rhusiopathiae* jednocześnie. Możliwe, że równoczesne

zakażenie różnymi szczepami *E. rhusiopathiae* występowało także u innych ptaków, jednak ze względu na brak różnic w morfologii kolonii nie zostało one wykryte (pierwotne kultury bakteryjne były zawsze przesiewane do dalszych analiz z pojedynczej kolonii).

#### 4.5. Antybiotykowrażliwość izolatów *E. rhusiopathiae*

Wszystkie badane izolaty (n=60) były wrażliwe na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, tj. ampicylinę, penicylinę, amoksycylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym, ceftiofur oraz na florfenicol. Większość izolatów wykazywała oporność na tetracyklinę (85%) oraz enrofloksacynę (80%). Odsetek szczepów opornych na pozostałe substancje przeciwdrobnoustrojowe wahała się od 3,3% (erytromycyna) do 16,7% (linkozamidy) (Tab. 4.9).

**Tabela 4.9.** Wartości MIC antybiotyków i chemioterapeutyków uzyskane w teście do oznaczania lekowrażliwości szczepów *E. rhusiopathiae* (po 24 godz. inkubacji) oraz wykryte geny oporności

	≤0.06	≤0.125	≤0.25	0.5	1	2	4	8	≥16	32	≥64	128	256	≥512	Liczba i odsetek izolatów opornych	
PEN	60														0	
AMP	37	22	1													0
AMX	60															
AMC	60														0	
CEF	59														1	0
TET				1	2	6				2 <sup>tetM</sup>	22 <sup>tetM</sup>	27 <sup>tetM</sup>				51 (85%)
ENR	12							29	19							48 (80%)
ERY	2	34	21	1						1	1 <sup>ermB</sup>				2 (3,3%)	
TYL	2	49	5	1	1	1						1 <sup>ermB</sup>			3 (5,0%)	
KLIN	42	7	1	2 <sup>InuB</sup>		5 <sup>InuB</sup>	2 <sup>InuB</sup>	1							10 (16,7%)	
LIN	15		24	8	1	1	1			10 <sup>InuB(9)</sup>	ermB (1)				10 (16,7%)	
TIA	4			10	22	12	3			g <sup>lsaE</sup>					9 (15%)	
FLO	3		50	7											0	
STR									2	9	23	22	4 <sup>ant(6)-Ia</sup>		ND	
SPE									9	28	18	1	2 <sup>ant(6)-Ia</sup>	2 <sup>ant(6)-Ia</sup>	ND	
GEN													1	59	ND	
NEO															60	ND
TR/S															60	ND

Wartości MIC podświetlone na szaro wskazują oporność nabytą, wartości w polach z paskami – średnią wrażliwość. Wartości w nawiasie przy nazwie genu oznaczają liczbę szczepów, u których dany gen wykryto. Brak wartości liczbowej po nazwie genu oznacza, że występował on u wszystkich izolatów.

PEN – penicylina, AMP – ampicylina, AMX – amoksycylina, AMC – amoksycylina z kwasem klawulanowym 2/1, CEF – ceftiofur, TET – tetracyklina, ERY – erytromycyna; TYL – tylozyna, KLIN – klindamycyna, LIN – linkomycyna, TIA – tiamulina, ENR – enrofloksacyna, STR – streptomycyna, SPE – spektynomycyna, GEN – gentamycyna, NEO – neomycyna, TR/S – trimetoprim/sulfametoksazol 1/19, FLO – florfenicol; ND – nie dotyczy

Dla wszystkich izolatów odnotowano wysokie wartości MIC ( $\geq 512$   $\mu\text{g/ml}$ ) neomycyny oraz trimetoprimu/sufametoksazolu. Unimodalny rozkład wartości MIC tych substancji przeciwdrobnoustrojowych wskazuje na występowanie u bakterii *E. rhusiopathiae* oporności naturalnej. Jednobiegunowy rozkład MIC odnotowano także w przypadku streptomycyny i spektynomycyny, jednak wartości MIC były niższe niż w przypadku gentamycyny i neomycyny i wahały się w zakresie od 16 do 256  $\mu\text{g/ml}$ , a tylko dla czterech izolatów MIC wynosiło  $> 512$   $\mu\text{g/ml}$  (Tab. 4.9, Tab. 4.10).

Zgodnie z przyjętymi kryteriami 10 izolatów (16,7%) było wrażliwych na wszystkie substancje przeciwdrobnoustrojowe (z wyłączeniem aminoglikozydów i trimetoprimu/sulfametoksazolu, wobec których izolaty *E. rhusiopathiae* wykazywały oporność naturalną). Dziesięć szczepów (16,7%) uznano za wielolekooporne (MDR, ang. *multidrug resistant*, szczepy odznaczające się opornością na co najmniej jeden antybiotyk/chemioterapeutyk z trzech lub więcej grup leków); reprezentowały one najczęściej serotyp 8 (7 szczepów), rzadziej serotyp 5 (2 szczepy) i 2 (1 szczep) (Tab. 4.10).

U dwóch szczepów opornych na erytromycynę występowała jednoczesna oporność na tylozynę; zaskakująco jeden szczep (nr 1012, serotyp 2) był oporny na tylozynę, ale wrażliwy na erytromycynę. U dziewięciu z dziesięciu szczepów opornych na linkozamidy jednocześnie występowała oporność na tiamulinę (Tab. 4.10). Odnotowano także korelację pomiędzy opornością na tetracyklinę i enrofloksacynę; odstępstwo w tym zakresie dotyczyło jedynie trzech szczepów serotypu 2, które były oporne na tetracyklinę, a wrażliwe na enrofloksacynę (Tab. 4.10).

Ponadto, zaobserwowano częściową zależność pomiędzy profilem oporności a serotypem. Wśród dziesięciu szczepów o profilu oporności LIN/KLIN+TIA, aż siedem (7/9, 77,8%) przynależało do serotypu 8, a jedynie 1 izolat do serotypu 2 (1/9, 11,1%) i do serotypu 5 (1/9, 11,1) (Tab. 4.10).

**Tabela 4.10.** Wartości MIC uzyskane w teście do oznaczania lekowrażliwości szczepów *E. rhusiopathiae* (po 24 godz. inkubacji) oraz wykryte geny oporności. Wartości MIC podświetlone na szaro wskazują oporność nabytą

Szczep	Ser.	AMP	PEN	AMX	AMC	CEF	ERY	TYL	LIN	KLIN	TIA	TET	ENR	STR	SPE	GEN	NEO	TR/S	FLO	Geny oporności
ATCC																				
19414																				
1	484W	1a	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,5	≤0,06	1	≤0,25	≤0,125	128	64	>512	>512	>512	4	aadK
2	219	2	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,25	≤0,06	2	32	≤0,125	64	16	>512	>512	512	4	aadK, tetM, int-Tn
3	877	2	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,5	≤0,06	2	32	≤0,125	128	32	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
4	827KZ	2	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,5	≤0,06	2	32	8	128	32	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
5	827NW	2	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,25	≤0,06	2	16	8	16	32	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
6	1012	2	0,125	≤0,06	≤0,06	0,25	0,25	2	1	0,125	1	16	≤0,125	64	128	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
7	1023	2	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	32	1	>64	2	>64	32	16	>512	256	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn, lnuB, lsaE, ant(6)-la
8	267	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	>32	>32	>64	>16	2	32	8	128	32	512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn, ermB
9	86	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	>64	4	>64	64	8	>512	>512	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn, lnuB, lsaE, ant(6)-la
10	136	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,06	4	0,125	0,5	64	8	>512	256	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn, ant(6)-la
11	147	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	8	≤0,06	0,5	32	8	>512	512	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn, ant(6)-la
12	413	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	0,25	≤0,06	1	32	8	64	64	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
13	512	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,5	≤0,06	2	32	8	64	32	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
14	652	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,25	≤0,06	1	32	8	32	32	512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
15	815	5	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,5	0,25	1	32	8	128	64	512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
16	1154	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	1	0,125	4	32	8	64	64	512	>512	>512	2	aadK, tetM, int-Tn
17	43	5	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,25	0,5	≤0,06	1	32	8	64	16	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
18	44	5	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,25	0,5	≤0,06	2	32	8	64	64	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
19	1173	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,25	≤0,06	0,5	32	8	32	16	256	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
20	13	5	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	0,5	≤0,06	2	32	8	128	64	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
21	48W	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,25	≤0,06	2	32	8	32	16	512	>512	>512	8	aadK, tetM, int-Tn
22	51W	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,25	0,125	2	16	8	32	16	512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
23	89W	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,25	0,5	≤0,06	4	32	8	128	32	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
24	90W	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,25	0,5	≤0,06	4	32	8	64	32	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
25	936W	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,5	0,25	≤0,06	1	16	8	32	16	512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
26	434W	5	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,25	≤0,06	0,5	32	8	32	32	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn
27	959	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	0,5	≤0,06	8	1	≤0,125	128	32	512	>512	>512	4	aadK
28	584	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	0,5	≤0,06	2	1	≤0,125	64	32	512	512	>512	2	aadK
29	803	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,25	1	≤0,06	1	1	≤0,125	128	64	>512	512	>512	2	aadK
30	155	5	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	0,5	≤0,06	4	16	16	32	16	512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn

Tabela 4.10. c.d.

Szczep	Ser.	AMP	PEN	AMX	AMC	CEF	ERY	TYL	LIN	KLIN	TIA	TET	ENR	STR	SPE	GEN	NEO	TRIS	FLO	Geny oporności	
31	95	8	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	>64	1	>64	32	16	64	32	512	>512	>512	8	aadK, tetM, int-Tn, InuB, IsaE	
32	489	8	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	>64	1	64	32	8	16	32	512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn, InuB, IsaE	
33	176	8	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	>64	4	>64	64	8	64	32	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn, InuB, IsaE	
34	670	8	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	>64	2	>64	32	8	128	64	>512	>512	>512	8	aadK, tetM, int-Tn, InuB, IsaE	
35	759W	8	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	>64	2	64	32	8	128	32	>512	>512	>512	8	aadK, tetM, int-Tn, InuB, IsaE	
36	818	8	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	>64	2	>64	32	8	64	32	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn, InuB, IsaE	
37	819	8	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	>64	2	>64	32	8	64	32	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn, InuB, IsaE	
38	1092	8	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,5	≤0,06	4	32	16	64	64	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn, InuB, IsaE	
39	53	8	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,5	≤0,06	8	32	8	64	32	>512	>512	>512	8	aadK, tetM, int-Tn	
40	579	1b	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	0,5	≤0,06	2	32	8	128	32	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn	
41	167	1b	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,25	≤0,06	2	32	16	32	32	512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn	
42	395	1b	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	0,5	≤0,06	4	32	8	128	64	>512	>512	>512	8	aadK, tetM, int-Tn	
43	784	1b	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,25	≤0,06	2	32	8	64	32	512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn	
44	1042	1b	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	0,5	≤0,06	2	32	8	128	64	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn	
45	1228	1b	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,5	0,125	1	≤0,06	2	16	8	128	64	512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn	
46	439W	1b	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,5	≤0,06	2	32	8	64	32	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn	
47	450W	1b	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,25	≤0,06	1	32	8	64	16	512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn	
48	195	1b	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,25	2	0,125	4	1	≤0,125	128	64	>512	>512	>512	4	aadK	
49	657	1b	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,5	≤0,06	2	≤0,25	≤0,125	64	32	>512	>512	>512	4	aadK	
50	1083	1b	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,5	≤0,06	2	≤0,25	≤0,125	64	32	>512	>512	>512	4	aadK	
51	202	1b	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	1	0,125	4	32	8	128	64	>512	>512	>512	8	aadK, tetM, int-Tn	
52	525	1b	0,25	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	0,5	≤0,06	4	32	8	128	64	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn	
53	526	1b	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	1	≤0,06	4	16	16	128	64	512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn	
54	783	1b	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	1	0,125	8	64	16	64	32	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn	
55	633	1b	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	≤0,06	2	32	8	64	32	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn	
56	451	1b	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	0,5	≤0,06	2	32	16	128	64	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn	
57	49W	N	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,125	0,25	≤0,06	1	≤0,25	≤0,125	64	32	512	>512	>512	4	aadK	
58	320	N	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	0,5	≤0,06	4	32	8	128	64	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn	
59	497	6	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,125	0,5	≤0,06	2	32	16	128	64	>512	>512	>512	4	aadK, tetM, int-Tn	
60	849	6	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125	0,25	≤0,06	1	≤0,25	≤0,125	32	16	512	>512	>512	4	aadK	
		0	0	0	0	0	2	3	10	10	9	51	48	ND	ND	ND	ND	ND	0		
							3,3%	5%	16,7%	16,7%	15%	85%	80%								

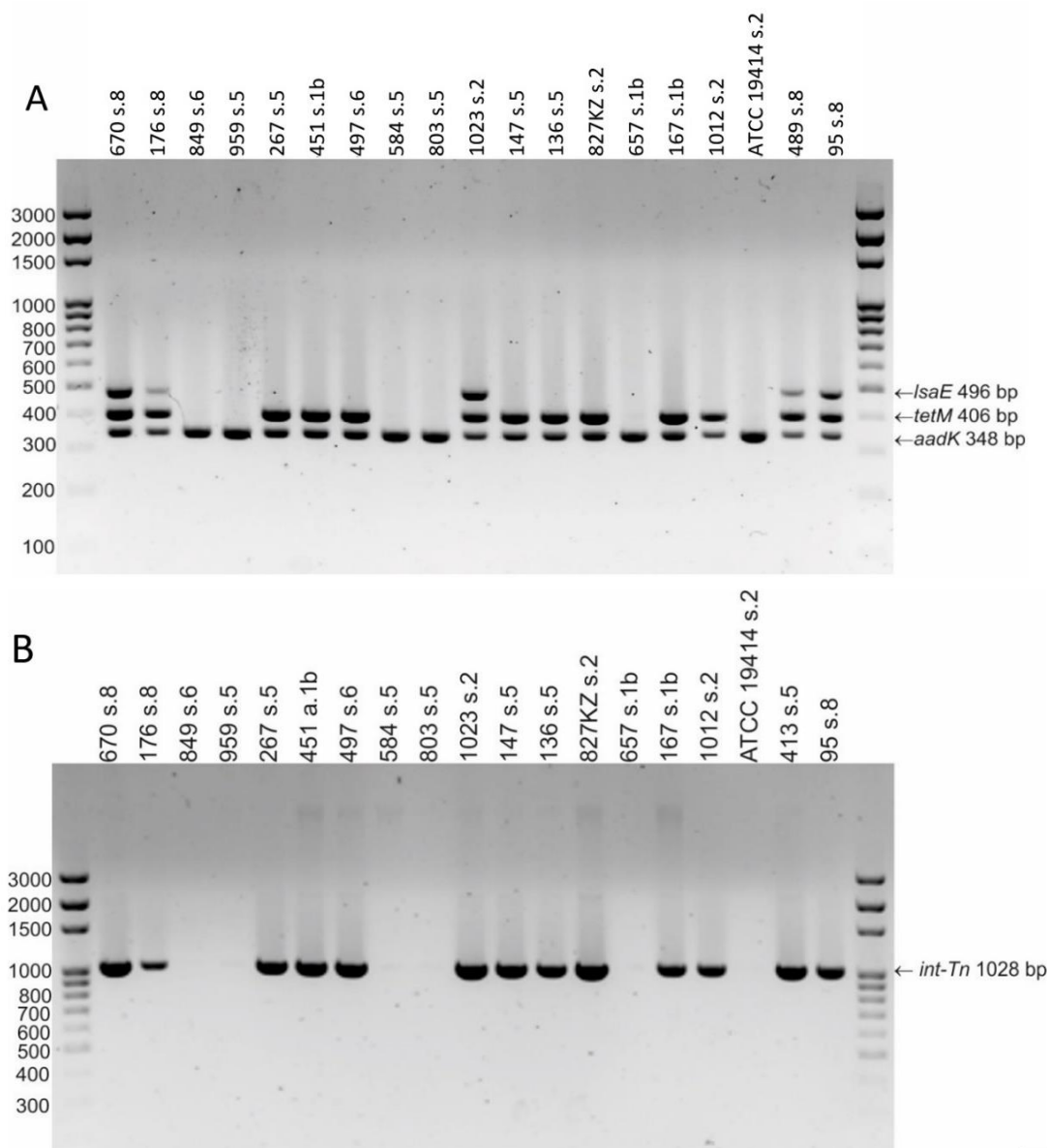
AMP – ampicylina, AMX – amoksylicyna, AMC – amoksylicyna z kwasem klawulanowym 2/1, CEF – ceftiofur, TET – tetracyklina, ERY – erytromycyna, TYL – tylozyna, LIN – klindamycyna, LKIN – linkomycyna, TIA – triamulina, ENR – enrofloksacyna, STR – streptomycyna, SPE – spektynomycyna, GEN – gentamycyna, NEO – neomycyna, TR/S – trimetoprim/sulfametoksazol 1/19, FLO – florfenikol

#### 4.6. Geny oporności u izolatów *E. rhusiopathiae*

Genotypowe profile lekooporności badanych szczepów *E. rhusiopathiae* (n=60) korespondowały z ich opornością fenotypową. U wszystkich szczepów opornych na tetracyklinę (n=51/60, 85%) wykryto gen *tetM* (kodujący białko rybosomalne odpowiedzialne za uwalnianie tetracykliny z rybosomów w sposób zależny od GTP) oraz gen integrazy transpozonu Tn916/Tn1. Gen *lnuB*, który koduje nukleotydylotransferazę linkozamidów, wykryto u 10 z 11 szczepów opornych na linkozamidy, a gen *lsaE* kodujący transporter ABC (*efflux pump*) występował u wszystkich izolatów opornych na tiamulinę (n=10) (Tab. 4.9 i 4.10).

U jednego (szczep 267) z trzech izolatów opornych na erytromycynę i/lub tylozynę wykryto gen *ermB*, który determinuje oporność zarówno na makrolidy jak i na linkozamidy (u tego szczepu nie wykryto genu *lnuB* warunkującego u innych izolatów oporność na linkozamidy) (Tab. 4.10). U żadnego ze szczepów opornych na makrolidy (n=3) nie potwierdzono obecności genów *ermT*, *ermC*, *ermA* i *ermA-like*.

Gen *aadK*, który wg. informacji zawartych w GenBanku dotyczących sekwencji genomowej szczepu *E. rhusiopathiae* Fujisawa (nr dostępu AP012027.1) koduje nukleotydylotransferazę aminoglikozydową, został wykryty u wszystkich izolatów. Jednakże na podstawie uzyskanych rezultatów (unimodalny rozkład wartości MIC gentamycyny, neomycyny, streptomycyny i spektynomycyny) można stwierdzić, że rola tego genu w oporności szczepów *E. rhusiopathiae* na aminoglikozydy jest wątpliwa. Spośród ośmiu pozostałych wykrywanych w tej pracy genów determinujących u bakterii oporność nabytą na antybiotyki aminoglikozydowe, u izolatów *E. rhusiopathiae* potwierdzono obecność jedynie genu *ant(6)-Ia*. Koduje on nukleotydylotransferazę aminoglikozydową, która warunkuje oporność na streptomycynę. Gen *ant(6)-Ia* występował u czterech izolatów *E. rhusiopathiae*, które odznaczały się bardzo wysokimi wartościami MIC streptomycyny, tj. >512 µg/ml, oraz dla spektynomycyny, tj. 256->512 µg/ml (Tab. 4.9 i 4.10).



**Rycina 4.10.** Zdjęcie żeli agarozowych (1,8%) po rozdziale elektroforetycznym amplikonów *lsaE*, *tetM* i *aadK* (A) oraz *int-Tn* (B) dla wybranych terenowych szczepów *E. rhusiopathiae*. Kontrolę stanowił referencyjny szczep *E. rhusiopathiae* ATCC 19414 (*lsaE*<sup>-</sup>, *tetM*<sup>-</sup>, *int-Tn*-ujemny, *aadK*-dodatni, na podst. sekwencji genomowej zdeponowanej w GenBank'u, nr dostępu LR134439.1)

Analiza sekwencji genu *gyrA* (koduje podjednostkę A gyrazy) wybranych szczepów *E. rhusiopathiae* wykazała, że za oporność na enrofloksacynę odpowiada mutacja w pozycji 257 genu (ACA→ATA lub ACA→AAA), która przekłada się na zmianę aminokwasu (tyrozyny na izoleucynę lub na lizynę) w pozycji 86 - Thr86→Ile lub Thr86→Lys86 (Tab. 4.11).



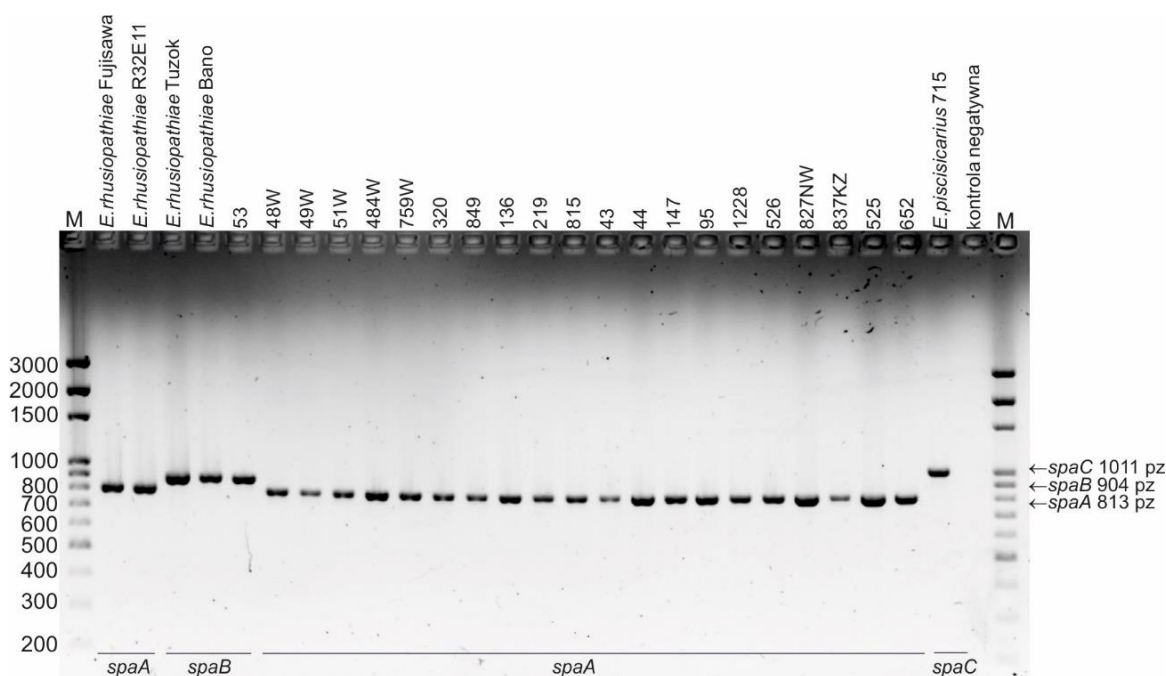
**Tabela 4.11.** Analiza sekwencji genu *gyrA* w obrębie regionu warunkującego oporność na chinolony (QRDR, ang. *quinolone resistance determining region*) u wybranych szczepów *E. rhusiopathiae* fenotypowo wrażliwych i opornych na enrofloksacynę

Izolot	Serotyp	MIC enrofloksacy- ny (µg/ml)	Wrażliwość na enroflo- ksacynę	Mutacje w pozycji 257 genu <i>gyrA</i> i korespondujące zmiany w sekwencji aa	Numer dostępu GenBank
ATCC 19414	2	≤0,125	S	Thr <sub>86</sub> (ACA)	LR134439.1
1012	2	≤0,125	S	Thr <sub>86</sub> (ACA)	OP921306
657	1b	≤0,125	S	Thr <sub>86</sub> (ACA)	OP921309
1023	2	16	R	Thr <sub>86</sub> →Ile (ACA→ATA)	OP921307
95	8	16	R	Thr <sub>86</sub> →Ile (ACA→ATA)	OP921308
267	5	8	R	Thr <sub>86</sub> →Lys (ACA→AAA)	OQ625325

Legenda: S –wrażliwy (ang. susceptible), R – oporny (ang. resistant)

#### 4.7. Genotypowe profile wirulencji izolatów *E. rhusiopathiae*

Genotypowe profile wirulencji badanych izolatów *E. rhusiopathiae* (n=60) były bardzo słabo zróżnicowane. U 59 szczepów wykryto gen *spaA* kodujący immunogenne białko powierzchniowe SpaA, a tylko jeden izolat (nr 53, serotyp 8) posiadał gen *spaB* kodujący immunogenne białko powierzchniowe SpaB (Ryc. 4.11).

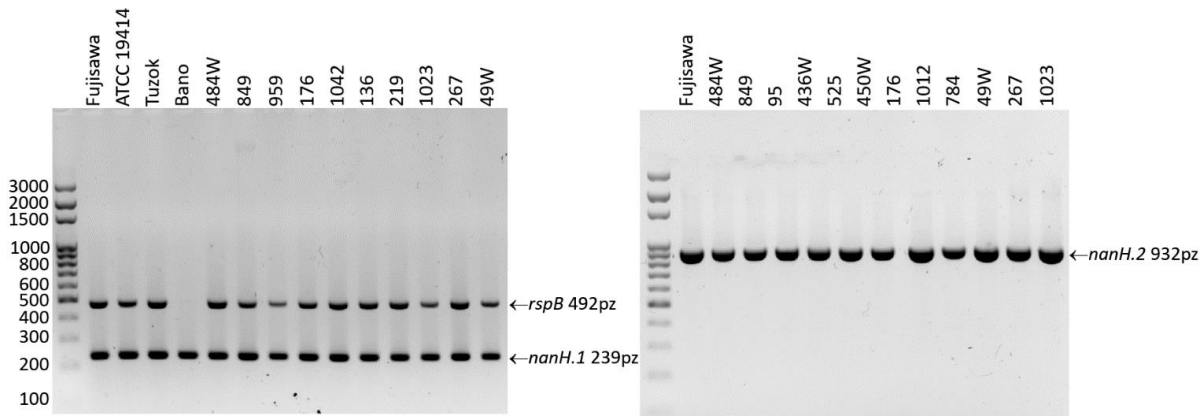


**Rycina 4.11.** Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym (1,5%) amplikonów *spaA*, *spaB* i *spaC* uzyskanych w multipleks PCR dla wybranych terenowych izolatów *E. rhusiopathiae*. Kontrolę pozytywną stanowiły referencyjne szczepy *E. rhusiopathiae* *spaA*-dodatnie, tj. Fujisawa i R32E11 oraz *spaB*-dodatnie, tj. Tuzok, Bano, a także *spaC*-dodatni szczep *E. piscisicarius* 715, a kontrolę negatywną woda wolna od nukleaz

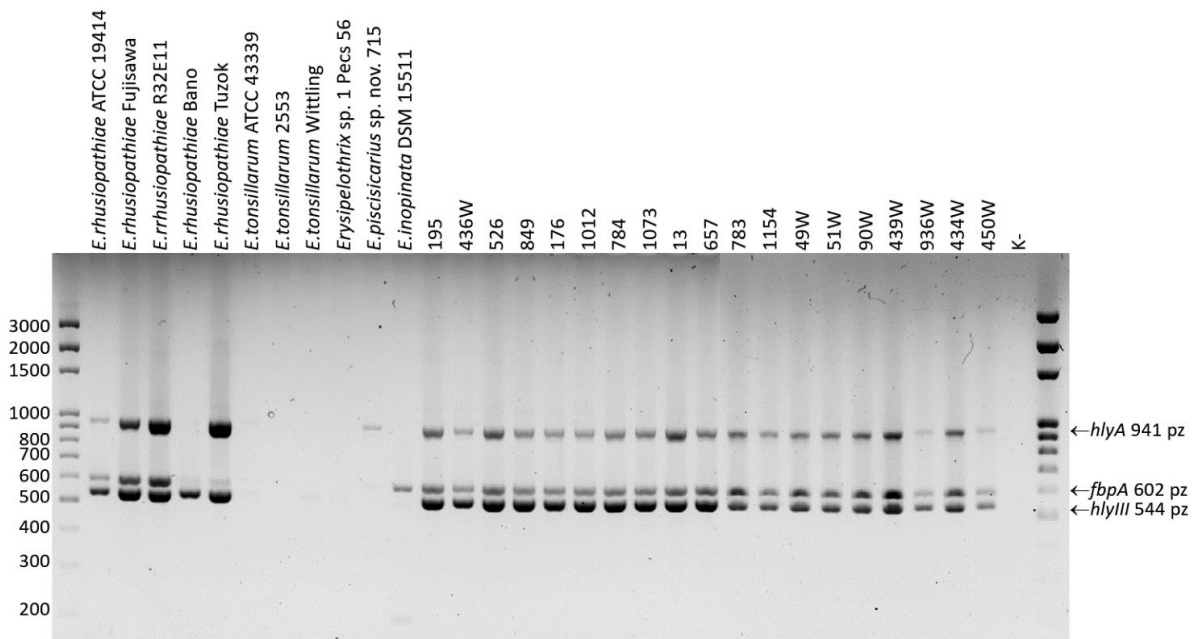
Wszystkie szczepy (n=60) posiadały geny *nanH.1* i *nanH.2* kodujące neuraminidazę (Ryc. 4.12) oraz inne geny, których produkty mogą ułatwiać inwazję włoskowca różycy do tkanek gospodarza, tj. *sub*, *hlyA*, *fbpA*, ERH\_1356, *rspA* i *rspB* lub determinować oporność komórek bakterii na fagocytozę i działanie dopełniacza (*cpsA* and *algI*) (Tab. 4.12, Ryc. 4.13, 4.14, 4.15). U 59/60 szczepów potwierdzono także obecność genu *intI* (ERH\_1471) kodującego internalinę – białko powierzchniowe odpowiedzialne za adhezję bakterii do komórek nabłonkowych (jedynie szczep 959 serotyp 5 nie posiadał tego genu) (Ryc. 4.14, Tab. 4.12).

**Tabela 4.12.** Prewalencja genów wirulencji u badanych izolatów *E. rhusiopathiae* (n=60)

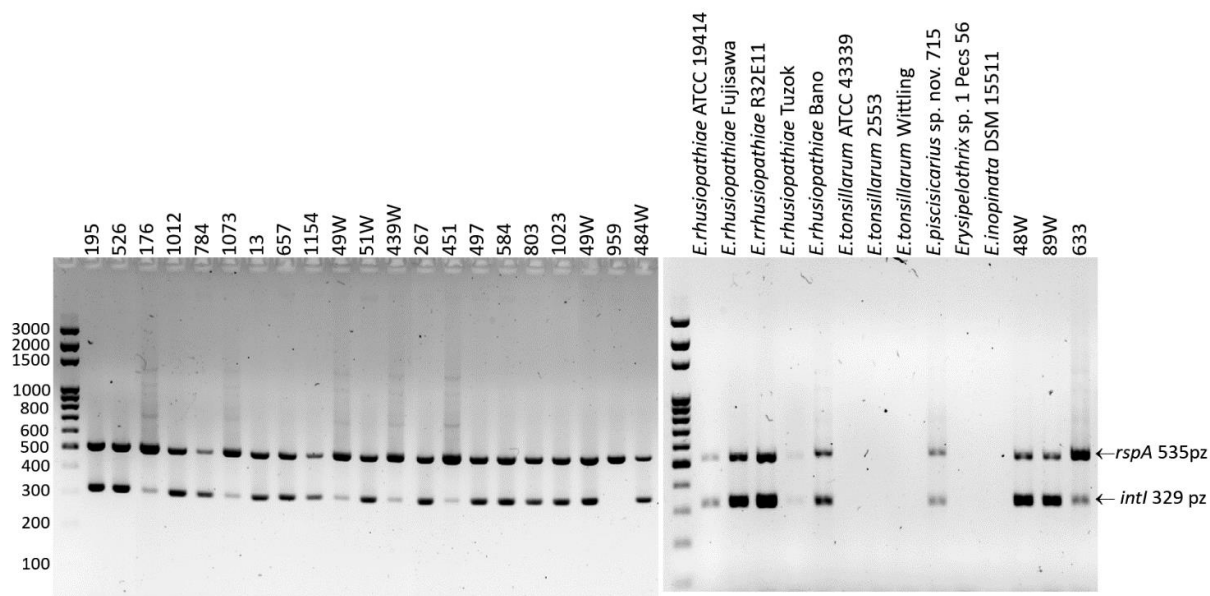
Gen lub identyfikator genu (locus tag) w genomie szczepu Fujisawa- GenBank AP012027.1	Produkt genu/prawdopodobna funkcja	Prewalencja genu
<i>spaA</i>	SpaA - Antygen powierzchniowy A /adhezja do komórek gospodarza	98,3%
<i>spaB</i>	SpaB - Antygen powierzchniowy A	1,7%
<i>spaC</i>	SpaC - Antygen powierzchniowy A	0%
<i>nanH.1</i>	Neuraminidaza/inwazja tkanek	100%
<i>nanH.2</i>	Neuraminidaza/inwazja tkanek	100%
<i>cpsA</i>	Glikozylotransferaza katalizująca syntezę otoczki polisacharydowej/ oporność na atak dopełniacza	100%
ERH_1356	Transporter ABC, lipoproteina / adhezja do komórek gospodarza	100%
<i>intI</i> ERH_1472	Internalina-białko powierzchniowe/inwazja komórek nabłonkowych	98,3%
<i>rspA</i>	Białko powierzchniowe A/tworzenie biofilmu	100%
<i>rspB</i>	Białko powierzchniowe B/tworzenie biofilmu	100%
<i>algI</i>	O-acetylotransferaza alginianowa/oporność na fagocytozę	100%
<i>sub</i>	Proteinaza powierzchniowa z rodziny subtylaz, inwazja tkanek	100%
<i>hlyA</i>	Hialuronidaza/inwazja tkanek	100%
<i>fbpA</i>	Białko wiążące fibronectynectin /adhezja	100%
<i>hlyIII</i>	Hemolizyna/liza erytrocytów	100%



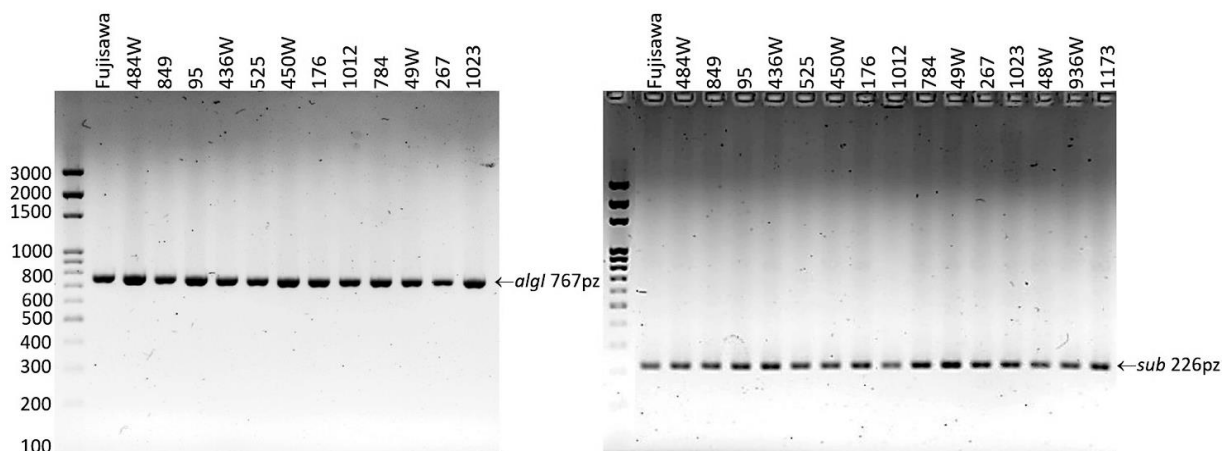
**Rycina 4.12.** Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym (1,5%) ampikonów *nanH.1* i *nanH.2* (geny kodujące neuraminidazę) wybranych terenowych izolatów *E. rhusiopathiae*. Kontrolę pozytywną stanowiły szczepy referencyjne *E. rhusiopathiae* Fujisawa i ATCC 19414



**Rycina 4.13.** Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym (1,8%) ampikonów *hlyA* (gen kodujący hialuronidazę), *fbpA* (gen kodujący białko wiążące fibronektynę) i *hlyIII* (gen kodujący hemolizynę) wybranych terenowych izolatów. Kontrolę pozytywną stanowiły szczepy referencyjne *E. rhusiopathiae* ATCC 19414 i Fujisawa, a kontrolę negatywną woda wolna od nukleaz



**Rycina 4.14.** Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym (1,8%) amplikonów *rspA* (gen kodujący białko powierzchniowe, *rhusiopathiae* protein A) oraz *int1* (gen kodujący internalinę) wybranych terenowych izolatów *E. rhusiopathiae* oraz dla szczepów referencyjnych różnych gatunków *Erysipelothrix*. Kontrolę pozytywną stanowiły szczepy *E. rhusiopathiae* ATCC 19414 i Fujisawa



**Rycina 4.15.** Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym (1,8%) amplikonów *algI* i *sub* wybranych terenowych izolatów *E. rhusiopathiae*. Kontrolę pozytywną stanowił szczep referencyjny *E. rhusiopathiae* Fujisawa

Identyfikacja genów wirulencji została także przeprowadzona dla szczepów referencyjnych różnych gatunków *Erysipelothrix*. Wszystkie rozważane geny wirulencji występowały u referencyjnych szczepów *E. rhusiopathiae*, tj. ATCC 19414, Fujisawa i R32E11, co pozostaje w zgodności z sekwencją genomową dwóch pierwszych wymienionych zdeponowaną w GenBank'u (nr dostępu LR134439.1 i AP012027.1).

Żadnego z wykrywanych genów nie potwierdzono u szczepów z gatunku *E. tonsillarum*, a większość genów wirulencji była nieobecna u szczepów *Erysipelothrix* species 1 Pecs 56, *E. piscisicarius* sp. nov. 715 i *E. inopinata* DSM 15511. Genu ERH\_1336, *rspA*, *intI* i *sub* nie wykryto także u *spaB*-dodatniego szczepu *E. rhusiopathiae* Tuzok (Tab. 4.13, Ryc. 314 i 4.14).

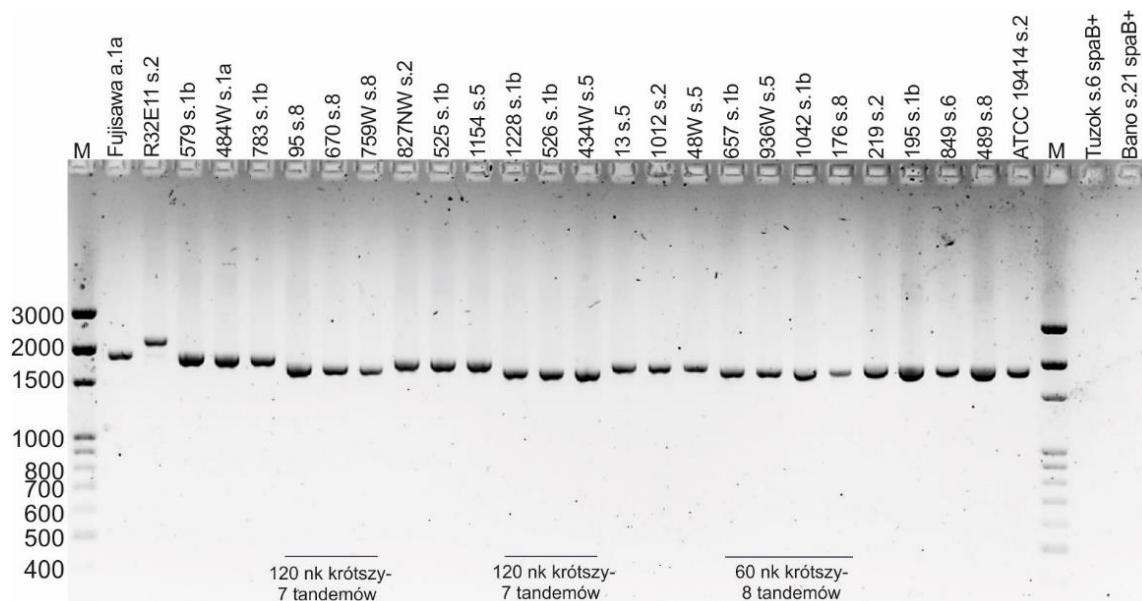
**Tabela 4.13.** Występowanie genów związanych z wirulencją u szczepów referencyjnych różnych gatunków *Erysipelothrix*

Szczep wzorcowy	gospodarz	serotyp	Antygen Spa	<i>nan H.1</i>	<i>nan H.2</i>	<i>cpsA</i>	ERH1356	<i>rspA</i>	<i>rspB</i>	<i>intI</i>	<i>algI</i>	<i>hly III</i>	<i>sub</i>	<i>fbpA</i>	<i>hlyA</i>
<i>E. rhusiopathiae</i> ATCC 19414	świnia	2	SpaA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. rhusiopathiae</i> Fujisawa	świnia	1a	SpaA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. rhusiopathiae</i> R32E11	nieznany	2	SpaA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. rhusiopathiae</i> Bano 36	owca	21	SpaB	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>E. rhusiopathiae</i> Tuzok	drop	6	SpaB	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>E. tonsillarum</i> ATCC 43339	świnia	7	brak	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. tonsillarum</i> 2553	świnia	20	brak	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. tonsillarum</i> Wittling	ryba	3	brak	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. sp.</i> 1 Pecs 56	świnia	13	brak	-	N T	N T	N T	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. piscisicarius</i> sp. nov. 715 (dawniej <i>E. species</i> 2 strain 715)	świnia	18	SpaC	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>E. inopinata</i> DSM 15511	bulion warzywny	N	brak	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

NT – nie testowano

#### 4.8. Wielkość i sekwencja genu *spaA*

Wielkość ampliconów *spaA* u terenowych izolatów *E. rhusiopathiae* (n=60) była zróżnicowana i wahała się od ~1800 do ~1900 pz. Amplikony o tym zakresie wielkości uzyskano także dla szczepów wzorcowych *E. rhusiopathiae*, tj. Fujisawa i ATCC91414, podczas gdy w przypadku szczepu szczepionkowego R32E11 produkt PCR miał wielkość aż 2200 pz. (Ryc. 4.16).



**Rycina 4.16.** Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym (1,3%) amplikonów *spaA* wybranych izolatów *E. rhusiopathiae*. Kontrolę pozytywną stanowiły referencyjne szczepy *E. rhusiopathiae spaA*-dodatnie (Fujisawa, R32E11, ATCC 19414), a kontrolę negatywną szczepy *spaA*-ujemne (Tuzok, Bano)

Analiza sekwencji ampliconów *spaA* pozwoliła na precyzyjne określenie wielkości genu *spaA*. U większości izolatów (76%) miał on długości 1881 pz, u 13% izolatów występował gen *spaA* o długości 1818 pz, a u 10% izolatów *spaA* o wielkości 1761 pz (Tab. 4.14). Przyczyną wariacji w wielkości ampliconów była odmienna liczba tandemowych 60-nk powtórzeń w regionie 3' genu *spaA*, która u badanych izolatów wahała się od 7 do 9, a u szczepu szczepionkowego R32E11 wynosiła 13.

**Tabela 4.14.** Wielkość ampliconów *spaA* występujących u terenowych izolatów *E. rhusiopathiae* (n=59) reprezentujących poszczególne serotypy

Wielkość ampliconu <i>spaA</i> [pz]	Korespondująca długość łańcucha białkowego SpaA [aa]	Liczba tandemowych powtórzeń w C-końcowym odcinku <i>spaA</i>	Liczba izolatów <i>spaA</i> + (n=59)	serotyp						
				5 (n=23)	1b (n=17)	8 (n=8) (1 izolat <i>spaB</i> +) )	2 (n=6)	6 (n=2)	n (n=2)	1a (n=1)
1881	626	9	45 [76%]	21 [91%]	11 [65%]	2 [25%]	6 [100%]	2 [100%]	2 [100%]	1 [100%]
1818	606	8	8 [13%]	1 [4%]	4 [23%]	3 [37%]				
1761	587	7	6 [10%]	1 [4%]	2 [12%]	3 [37%]				

#### 4.8.1. Sekwencje białka SpaA

Na podstawie analizy sekwencji amplikonów *spaA* wykazano, że długość łańcucha aminokwasowego białka SpaA, występującego u badanych szczepów *E. rhusiopathiae* wynosi 587 aa, 606 aa lub 626 aa. U podstawy tego zróżnicowania leży odmienna liczba tandemowych 20-aminokwasowych powtórzeń (zaczynających się od GW, tj. glicyna-tryptofan) na końcu C' łańcucha białkowego. SpaA o długości 626 aa zawierało 9 tandemowych powtórzeń, SpaA o długości łańcucha 606 aa – 8 powtórzeń i SpaA o długości 587 aa – 7 tandemów GW. Większość terenowych izolatów *E. rhusiopathiae* (76%, 45/59), podobnie jak szczepy referencyjne ATCC 19414 i Fujisawa, zawierało białko SpaA o długości łańcucha białkowego 626 aa; u 13% izolatów SpaA liczyło 606 aa, a u 10% - 587 aa (Tab. 4.14).

Liczba tandemowych powtórzeń w cząsteczka białka SpaA, a tym samym całkowita długość łańcucha aminokwasowego SpaA, była w znacznym stopniu skorelowana z serotypem badanych izolatów *E. rhusiopathiae*. U większości szczepów serotypu 5 (91%, 21/23) oraz u wszystkich izolatów serotypu 2 (100%, 6/6), 6 (100%, 2/2), N (100%, 2/2) i 1a (100%, 1/1) łańcuch białka SpaA liczył 626 aa (co odpowiada długości genu 1881 pz) i zawierał 9 tandemowych powtórzeń. U szczepów serotypu 8 najczęściej wykrywano krótszą wersję białka SpaA, tj. o długości 606 aa (37% izolatów, 3/8) lub 587 aa (37% izolatów, 3/8) zawierającą 7 lub 8 tandemowych powtórzeń. U większości szczepów serotypu 1b występowało białko SpaA liczące 9 tandemów (65%, 11/17), ale u znacznego odsetka (35%) wykryto też SpaA zawierające 8 (23%, 4/17) lub 7 powtórzeń GW (12%, 2/17). Wśród łącznej liczby ośmiu szczepów posiadających białko SpaA zawierające 8 tandemów (606 aa; 1818 pz), aż 7 (87,5%) przynależało do serotypu 1b i 8, a tylko 1 izolat (12,5%) reprezentował serotyp 5. Podobną zależność uzyskano w przypadku 7-tandemowego białka SpaA (587 aa; 1761 pz) – połowa szczepów (3/6, 50%) zawierających taką krótką wersję SpaA przynależała do serotypu 8, a pozostałe 50% izolatów reprezentowało serotyp 1b (2/6) i 5 (1/6) (Tab. 4.14).

#### **Analiza występowania mutacji niesynonimicznych w sekwencji białka SpaA**

W celu określenia wariantów białka SpaA występujących u terenowych izolatów *E. rhusiopathiae* (n=59) przyrównano 447-aa N-końcowe odcinki białka SpaA (obejmujące domenę sygnałową, immunoprotekcyjną i bogatą w prolinę) szczepów terenowych względem sekwencji wysoce wirulentnego szczepu referencyjnego *E. rhusiopathiae* Fujisawa serotyp 1a (wyizolowany od świni z różycą w Japonii przed

rokiem 1972) (Ogawa i wsp. 2017). W podobny sposób określono homologię pomiędzy szczepami terenowymi a szczepem szczepionkowym *E. rhusiopathiae* R32E11 (wykorzystywany do produkcji szczepionki ERYSENG®, która bywa stosowana u gęsi). W analizach porównawczych uwzględniono także szczep referencyjny ATCC 19414 serotyp 2 (zdeponowany w kolekcji NCTC, Wielka Brytania, pod numerem 8163 w 1950 r.).

W obrębie **sekwencji sygnałowych** białka SpaA, obejmujących 29 pierwszych aa na końcu N' łańcucha białkowego nie odnotowano zmienności aminokwasowej (sekwencja wszystkich izolatów terenowych była homologiczna z sekwencją szczepu Fujisawa). Należy jednak zaznaczyć, że analizowane w tej pracy regiony sygnałowe zawierały jedynie 17 aa (w analizowanych domniemanych sekwencjach SpaA brakowało pierwszych 12 aa na skutek "odcięcia" nieczytelnych końców chromatogramów sekwencji *spaA*).

W obrębie **regionu hiperzmiennego** odpowiadającego domenie immunoprotekcyjnej (antygen SpaA) (odcinek o długości 384 aa; 30-413 aa) oraz w **regionie bogatym w prolinę** (odcinek o długości 34 aa; 414-447 aa) u izolatów terenowych (w odniesieniu do szczepu Fujisawa) wykryto 15 mutacji niesynonimicznych, w tym

- 12 w obrębie domeny hiperzmiennnej, tj. w pozycjach 38(Pro→Gln), 54(Gly→Ala), 55(Val→Ile), 70(Lys→Asn), 101(Asn→Ser), 139(Gln→Lys), 178(Gly→Asp), 195(Asp→Asn), 203(Ile→Met), 232(Ile→Thr), 257(Leu→Ile), 303(Gly→Glu) oraz
- 3 w obrębie domeny bogatej w prolinę, tj. w pozycjach 423(Pro→Gly), 426(Glu→Lys) i 435(Leu→Pro) (Tab. 415A).

U wszystkich izolatów *E. rhusiopathiae* (n=59) występowała zmienność w poz. 257(Leu→Ile) (nie była dyskryminująca dla badanych izolatów), a u zdecydowanej większości (53-58 szczepów) także w poz. 101, 426 i 435. Mutacja w poz. 54(Gly→Ala) była charakterystyczna dla szczepów serotypu 8 i jednego szczepu serotypu 6. Zmienność w poz. 38(Pro→Gln) była unikatowa dla szczepu 49W serotyp N, mutację w poz. 423(Pro→Gln) wykryto tylko u szczepu nr 219 serotyp 5, mutacja w poz. 203(Ile→Met) wystąpiła tylko u szczepu 484W serotyp 1a, a zmienność w poz. 232(Ile→Thr) – tylko u szczepu 657 serotyp 1b (Tab. 4.15A).

Żaden z izolatów terenowych nie wykazywał 100% homologii do szczepu Fujisawa w zakresie domeny immunoprotekcyjnej i bogatej w prolinę. U badanych izolatów wykryto



od 2 (IX wariant SpaA) do 7 miejsc zmiennych (II wariant SpaA) w regionie hiperzmiennym, natomiast w regionie bogatym w prolinę u wszystkich izolatów *E. rhusiopathiae*, poza szczepem nr 219 serotyp 2 i 484W serotyp 1a, występowały dwie mutacje niesynonimiczne. Największy stopień homologii z sekwencją SpaA szczepu Fujisawa wykazywał szczep 849 serotyp 6, który różnił się tylko jednym aa od szczepu Fujisawa w regionie hiperzmiennym i dwoma aa w regionie bogatym w prolinę (Tab. 4.15A).

Na podstawie wykrytych polimorfizmów u terenowych szczepów *E. rhusiopathiae* wyróżniono 9 wariantów białka SpaA (Tab. 4.15). Większość izolatów (n=40, 67,8%) posiadało VI wariant SpaA; do tej grupy przynależało większość szczepów serotypu 5 (20/23), 1b (14/17), 2 (5/6) i N (1/2). IV wariant białka występował u 9 szczepów (15,2%), z których 8 przynależało do serotypu 8 i jeden do serotypu 6. Wariant I SpaA wykryty u trzech izolatów (5,1%) serotypu 5 był homologiczny z SpaA szczepu referencyjnego *E. rhusiopathiae* ATCC 19414. Warianty SpaA II, III, V, VII i IX występowały u pojedynczych szczepów (Tab. 4.15A).

**Tabela 4.15.** Mutacje niesynonimiczne w N-kończym hiperzmiennym i bogatym w proline odcinku SpaA oraz liczba C-kończym tandemowych powtórzeń u szczepów terenowych w porównaniu do sekwencji wysoce wirulentnego szczepu *E. rhusiopathiae* Fujisawa (A) oraz szczepu szczepionkowego R32E11 (B)

SpaA wariant	Serotyp (liczba szczepów)	Domena immunoprotekcyjna														Region bogaty w prolinę			
		aa 38	aa 54	aa 55	aa 70	aa 101	aa 109	aa 139	aa 178	aa 195	aa 203	aa 232	aa 257	aa 303	aa 423	aa 426	aa 435	Liczba C-kończym powtórzeń	
	Fujisawa, szczep wysoce wirulentny	1a	CCA (Pro)	GGG (Gly)	GTA (Val)	AAA (Lys)	AAC (Asn)	AAT (Asn)	CAG (Gln)	GGT (Gly)	GAT (Asp)	ATT (Ile)	ATC (Ile)	CTT (Leu)	GGG (Gly)	CCA (Pro)	GAA (Glu)	CTA (Leu)	9
	R32E11, szczep szczepionkowy	2			ATA (Ile)	AAT (Asn)		CAT (His)		GAT (Asp)	AAT (Asn)			ATT (Ile)	GAG (Glu)	AAA (Lys)	CCA (Pro)		13
I	959, 584, 803, ATCC 19414	5 (3/23)			ATA (Ile)	AAT (Asn)				GAT (Asp)	AAT (Asn)			ATT (Ile)	GAG (Glu)	AAA (Lys)	CCA (Pro)		9
II	49W	N (1/2)	CAA (Gln)		ATA (Ile)	AAT (Asn)				GAT (Asp)	AAT (Asn)			ATT (Ile)	GAG (Glu)	AAA (Lys)	CCA (Pro)		9
III	849	6 (1/2)												ATT (Ile)		AAA (Lys)	CCA (Pro)		9
IV	489, 670, 95, 759W, 176, 818, 819, 1092, 496	8 (9/9), 6 (1/2)		GCG (Ala)			AGC (Ser)							ATT (Ile)		AAA (Lys)	CCA (Pro)		7, 8 lub 9
V	657	1b (1/17)					AGC (Ser)		AAG (Lys)				ACC (Thr)	ATT (Ile)		AAA (Lys)	CCA (Pro)		8
VI	783, 202, 167, 784, 136, 1023, 877, 815, 633, 1042, 451, 828KZ, 827NW, 525, 43, 1154, 395, 1012, 652, 526, 147, 320, 1173, 1228, 155, 51W, 439W, 90W, 48W, 434W, 450W, 89W, 579, 512, 413, 44, 13, 86, 936W, 267	1b (14/17), 2 (5/6), 5 (20/23), N (1/2)					AGC (Ser)							ATT (Ile)		AAA (Lys)	CCA (Pro)		7, 8 lub 9
VII	219	2					AGC (Ser)							ATT (Ile)		CAA (Gln)	AAA (Lys)	CCA (Pro)	9
VIII	195, 1083	1b (2/17)					AGC (Ser)		AAG (Lys)										8 lub 9
IX	484W	1a											AUG (Met)	ATT (Ile)					9

Wariant SpaA	Szczep	Serotyp (liczba szczepów)	Domena immunoprotekcyjna													Region bogaty w prolinę			Liczba C-końcowych powtórzeń
			aa 38	aa 54	aa 55	aa 70	aa 101	aa 109	aa 139	aa 178	aa 195	aa 203	aa 232	aa 257	aa 303	aa 423	aa 426	aa 435	
XIII	R32E11, szczep szczepionkowy	2	CCA (Pro)	GGG (Gly)	ATA (Ile)	AAT (Asn)	AAC (Asn)	CAT (His)	CAG (Gln)	GAT (Asp)	AAT (Asn)	I (Ile)	ATC (Ile)	ATT (Ile)	GAG (Glu)	CCA (Pro)	AAA (Lys)	CCA (Pro)	13
XI	Fujisawa, szczep referencyjny	1a			GTA (Val)	AAA (Lys)		AAT (Asn)		GGT (Gly)	GAT (Asp)			CTT (Leu)	GGG (Gly)	GAA (Glu)	CTA (Leu)	9	
I	959, 584, 803, ATCC 19414	5 (3/23)						AAT (Asn)										9	
II	49W	N (1/2)	CAA (Gln)					AAT (Asn)										9	
III	849	6 (1/2)			GTA (Val)	AAA (Lys)		AAT (Asn)		GGT (Gly)	GAT (Asp)				GGG (Gly)			9	
IV	489, 670, 95, 759W, 176, 818, 819, 1092, 497	8 (8/8), 6 (1/2)	GCG (Ala)		GTA (Val)	AAA (Lys)	AGC (Ser)	AAT (Asn)		GGT (Gly)	GAT (Asp)				GGG (Gly)			7, 8 lub 9	
V	657	1b (1/17)			GTA (Val)	AAA (Lys)	AGC (Ser)	AAT (Asn)	AAG (Lys)	GGT (Gly)	GAT (Asp)		ACC (Thr)		GGG (Gly)			8	
VI	783, 202, 167, 784, 136, 1023, 877, 815, 633, 1042, 451, 828KZ, 827NW, 525, 43, 1154, 395, 1012, 652, 526, 147, 320, 1173, 1228, 155, 51W, 439W, 90W, 48W, 434W, 450W, 89W, 579, 512, 413, 44, 13, 86, 936W, 267	1b (14/17), 2 (5/6), 5 (20/23), N (1/2)			GTA (Val)	AAA (Lys)	AGC (Ser)	AAT (Asn)		GGT (Gly)	GAT (Asp)				GGG (Gly)			7, 8 lub 9	
VII	219	2			GTA (Val)	AAA (Lys)	AGC (Ser)	AAT (Asn)		GGT (Gly)	GAT (Asp)				GGG (Gly)	CAA (Gln)		9	
VIII	195, 1083	1b (2/17)			GTA (Val)	AAA (Lys)	AGC (Ser)	AAT (Asn)	AAG (Lys)	GGT (Gly)	GAT (Asp)				GGG (Gly)			8 lub 9	
IX	484W	1a			GTA (Val)	AAA (Lys)	AGC (Ser)	AAT (Asn)		GGT (Gly)	GAT (Asp)	AUG (Met)			GGG (Gly)	GAA (Glu)		9	

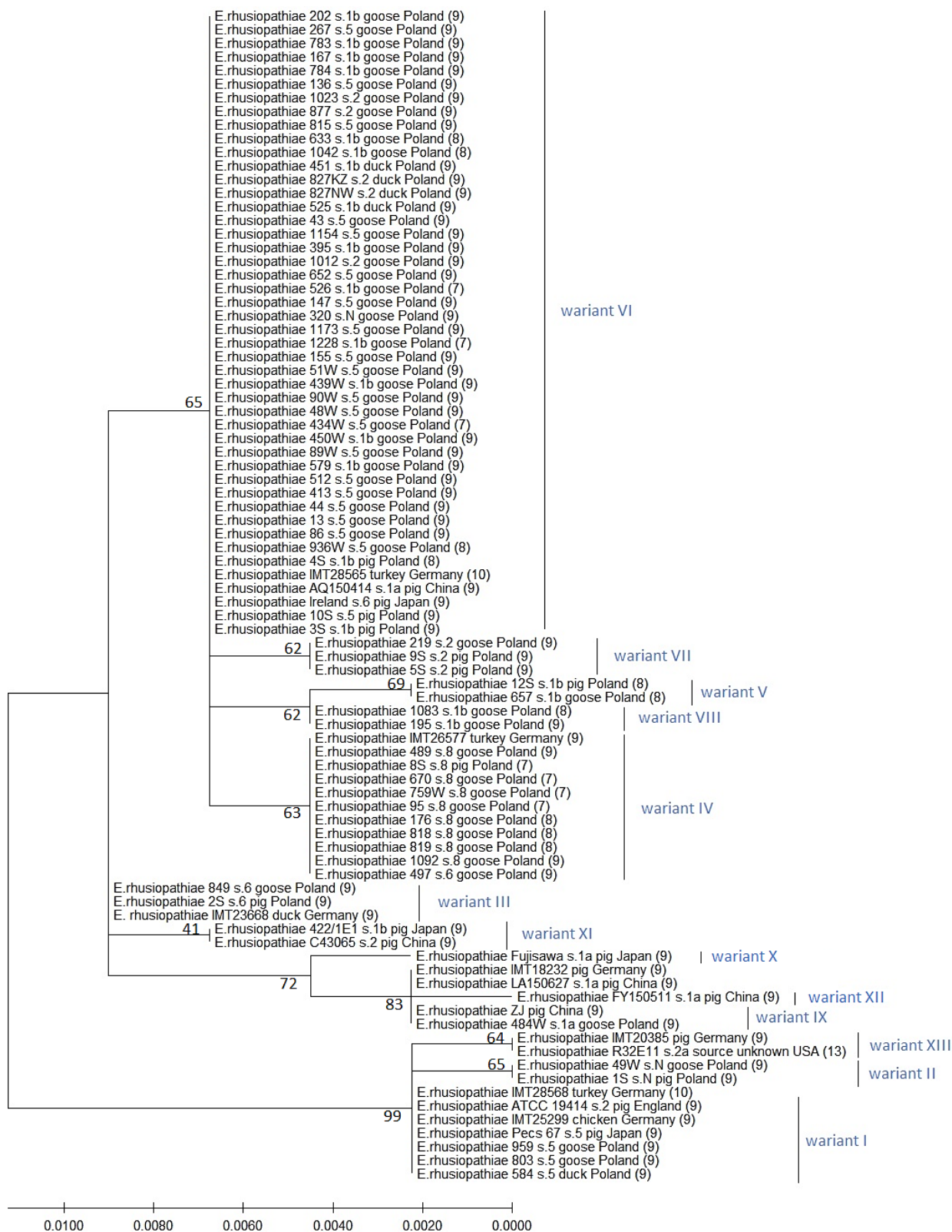
Podobnie jak w przypadku referencyjnego szczepu Fujisawa żaden z izolatów terenowych nie wykazywał 100% homologii do szczepu szczepionkowego R32E11 w zakresie 447-aa N-końcowej sekwencji białka SpaA. W domenie immunoprotekcyjnej SpaA poszczególnych izolatów wykryto od 1 do (I wariant SpaA) do 9 miejsc zmiennych (V wariant SpaA) (Tab. 4.15B); u ogromnej większości izolatów *E. rhusiopathiae* (łącznie 54/59, 91,5%) różnica dotyczyła aż siedmiu (41/59; 67,8%, wariant VI i VII), ośmiu (12/59, 20,3%, wariant IV, VIII i IX) lub dziewięciu aa (1/59; 1,7%, V wariant SpaA). Pozostałe izolaty (n=5) różniły się od szczepu R32E11 jednym aa (3/59, wariant I), dwoma aa (1/59, wariant II) lub sześcioma aa (1/59, wariant III) w zakresie domeny hiperzmiennej. Największy stopień homologii z sekwencją SpaA szczepu R32E11 wykazywały 3 szczepy serotypu 5 posiadające I wariant SpaA (nr 959, 584 i 803). U wszystkich izolatów *E. rhusiopathiae* występowała zmienność w poz. 109 (His→Asn), a u zdecydowanej większości (54/59; 91,5%) także w poz. 55, 70, 178, 195 i 303. Zmienność w regionie SpaA bogatym w prolinę odnotowano tylko u 2 szczepów terenowych (Tab. 4.15B).

Analiza porównawcza domniemanych sekwencji SpaA 86 szczepów *E. rhusiopathiae* obejmujących 59 *spaA*-dodatnich izolatów terenowych badanych w tej pracy oraz 27 szczepów referencyjnych i terenowych pochodzących od różnych gatunków zwierząt (Tab. 4.16) wykazała, że szczepy te reprezentowały trzynaście wariantów SpaA

(na podstawie zróżnicowania w obrębie regionu hiperzmiennego i bogatego w prolinę), co odpowiada 13-nastu klastrom zobrazowanym na dendrogramie (Ryc. 4.17). Numery klastrow są równoznaczne z wariantem białka SpaA. Szczepy terenowe od gęsi i kaczek reprezentowały 9 wariantów SpaA (klastry I-IX). Klastry X-XIII zawierały wyłącznie inne szczepy niż badane w tej pracy i wszystkie pochodziły spoza Polski. Klastry nr II, V, VII, VIII zawierały wyłącznie szczepy pochodzące z Polski, wyizolowane zarówno od drobiu wodnego (n=5) jak i od świń (n=4).

Odnotowano częściową korelację pomiędzy serotypem szczepu a wariantem SpaA. Nie zaobserwowano natomiast zależności pomiędzy pochodzeniem szczepu (gęś, kaczka, indyk, kura, świnia) a sekwencją białka SpaA - szczepy pochodzące od różnych gospodarzy grupowały się razem.

Największa liczba szczepów została zgrupowana w klastrze VI (n=46/87; 52,3%), który zawierał aż 40/59 szczepów terenowych od gęsi i kaczek oraz 5 szczepów pochodzące od świń i 1 szczep od indyka z różnych krajów, w tym z Polski. Szczepy reprezentujące VI wariant białka SpaA przynależały do serotypu 5 (21/46 szczepów tworzących klaster), 1b (16/46), 2 (5/46), 1a (1/46), 6 (1/46), N (1/46); serotyp jednego szczepu (IMT28565 od indyka) nie jest znany. W drugiej kolejności co do liczby zgrupowanych szczepów (n=11/87) uplasował się kład IV obejmujący wszystkie uwzględnione w analizie szczepy serotypu 8 (n=9) oraz 1 szczep serotypu 6 (szczepy te pochodziły od gęsi, kaczek i świni z Polski), a także 1 szczep o nieznanym serotypie od indyka z Niemiec. Kład V tworzyły 2 szczepy serotypu 1b, oba z Polski – jeden od gęsi (657), drugi od świni (12S). Kład VII zawierał 3 szczepy serotypu 2, w tym 1 szczep od gęsi (219) i 2 szczepy od świń (5S, 9S) z Polski. Szczep 484W o unikatowym serotypie 1a posiadał identyczny wariant białka SpaA (IX) jak 3 szczepy od świń z Chin i Niemiec; jeden z tych szczepów także przynależał do serotypu 1a, a serotypy pozostałych dwóch nie są znane. Kład nr I obejmował 7 szczepów, w tym 3 izolaty terenowe i szczep Pecs reprezentujące serotyp 5, szczep referencyjny ATCC 19414 serotyp 2, oraz 2 szczepy o nieznanym serotypie od drobiu (kura, indyk) z Niemiec. Kład III obejmował 3 szczepy, z czego 2 (1 szczep od gęsi i 1 szczep od świni z Polski) reprezentowały serotyp 6; serotyp trzeciego szczepu – od kaczki z Niemiec, jest nieznan. Wysoce wirulentny szczep Fujisawa serotyp 1a tworzył jedno-szczepową oddzielną grupę (XI) w obrębie większego kładu obejmującego m.in. 2 szczepy serotypu 1a (484W, LA1506271) (Ryc. 4.17).



**Rycina 4.17.** Dendrogram obrazujący podobieństwo między szczepami w zakresie sekwencji białka SpaA; analizie podlegał odcinek pierwszych 447 aa na końcu N' SpaA obejmujący domenę sygnałową, immunoprotekcyjną i bogatą w prolinę. Wartości obok poszczególnych gałęzi oznaczają procent drzew posiadających taką samą topologię jak drzewo oryginalne, poddawane analizie *bootstrap* do wszystkich wygenerowanych drzew. Skala określa odległość genetyczną. Liczby w nawiasach wskazują liczbę powtarzających się tandemów w regionie C-końcowym SpaA (te dane zaczerpnięto z innej analizy opartej na dopasowaniu względem siebie całych sekwencji SpaA); „s.” - serotyp

Białka SpaA analizowanych izolatów (n=87) zawierały od 7 do 13 tandemowych powtórzeń. Szczepy, których SpaA miało 7 lub 8 tandemów występowały wyłącznie w klastrze IV (7/11 szczepów tworzących klastery), V (2/2), VI (7/46 szczepów) i VIII (1/2) i co ciekawe wszystkie te szczepy pochodziły z Polski (od drobiu wodnego i świń) i występowały u izolatów serotypu 1b (7/21 szczepów) i 8 (7/9); tylko 2 szczepy (434W i 936W od gęsi) reprezentujące inne serotypy (a dokładnie serotyp 5) również zawierały skróconą wersję SpaA (7 lub 8 tandemów) (Ryc. 4.17). Lista szczepów, które zostały uwzględnione w analizie porównawczej sekwencji białka SpaA wraz z informacjami o wariancie SpaA i liczbie tandemowych powtórzeń występujących w łańcuchu aminokwasowym oraz numerami dostępu GenBank'u przedstawiono w Tabeli 4.16.

**Tabela 4.16.** Lista szczepów, które zostały uwzględnione w analizie porównawczej sekwencji białka SpaA wraz z informacjami o wariancie SpaA i liczbie tandemowych powtórzeń występujących w łańcuchu aminokwasowym

L.p.	Szczep	Gatunek	Serotyp	Wariant SpaA	Liczba powtórzeń na końcu C'	Kraj izolacji	Rok izolacji	Nr dostępu GenBank	Źródło
1	484W	gęś	1a	IX	9	Polska	2019	MZ448121	ta praca
2	219	gęś	2	VI	9	Polska	2020	MZ448138	ta praca
3	827NW	kaczka	2	VI	9	Polska	2020	MZ448145	ta praca
4	827KZ	kaczka	2	VI	9	Polska	2020	MZ448163	ta praca
5	1012	gęś	2	VI	9	Polska	2020	MZ448152	ta praca
6	877	gęś	2	VI	9	Polska	2020	MZ448164	ta praca
7	1023	gęś	2	VI	9	Polska	2021	OP822697	ta praca
8	13	gęś	5	VI	9	Polska	2020	MZ448117	ta praca
9	44	gęś	5	VI	9	Polska	2020	MZ448118	ta praca
10	89W	gęś	5	VI	9	Polska	2019	MZ448119	ta praca
11	413	gęś	5	VI	9	Polska	2020	MZ448120	ta praca
12	155	gęś	5	VI	9	Polska	2019	MZ448127	ta praca
13	1173	gęś	5	VI	9	Polska	2020	MZ448132	ta praca
14	512	gęś	5	VI	9	Polska	2020	MZ448123	ta praca
15	434W	gęś	5	VI	7	Polska	2019	MZ448136	ta praca
16	936W	gęś	5	VI	8	Polska	2019	MZ448137	ta praca
17	86	gęś	5	VI	9	Polska	2019	MZ448140	ta praca
18	48W	gęś	5	VI	9	Polska	2019	MZ448141	ta praca
19	90W	gęś	5	VI	9	Polska	2019	MZ448142	ta praca
20	147	gęś	5	VI	9	Polska	2020	MZ448146	ta praca
21	51W	gęś	5	VI	9	Polska	2019	MZ448149	ta praca
22	652	gęś	5	VI	9	Polska	2020	MZ448150	ta praca
23	136	gęś	5	VI	9	Polska	2020	MZ448153	ta praca
24	815	gęś	5	VI	9	Polska	2020	MZ448155	ta praca
25	1154	gęś	5	VI	9	Polska	2020	MZ448156	ta praca
26	43	gęś	5	VI	9	Polska	2020	MZ448157	ta praca
27	267	gęś	5	VI	9	Polska	2021	OP822692	ta praca
28	959	gęś	5	I	9	Polska	2021	OM248657	ta praca
29	584	kaczka	5	I	9	Polska	2021	OP822695	ta praca

30	803	gęś	5	I	9	Polska	2021	OP822696	ta praca
31	657	gęś	1b	V	8	Polska	2020	MZ448151	ta praca
32	450W	gęś	1b	VI	9	Polska	2019	MZ448128	ta praca
33	525	kaczka	1b	VI	9	Polska	2020	MZ448130	ta praca
34	579	gęś	1b	VI	9	Polska	2020	MZ448124	ta praca
35	784	gęś	1b	VI	9	Polska	2020	MZ448133	ta praca
36	395	gęś	1b	VI	9	Polska	2020	MZ448134	ta praca
37	439W	gęś	1b	VI	9	Polska	2019	MZ448143	ta praca
38	451	kaczka	1b	VI	9	Polska	2021	OP822693	ta praca
39	167	gęś	1b	VI	9	Polska	2020	MZ448154	ta praca
40	202	gęś	1b	VI	9	Polska	2019	MZ448159	ta praca
41	783	gęś	1b	VI	9	Polska	2020	MZ448160	ta praca
42	1042	gęś	1b	VI	8	Polska	2020	MZ448165	ta praca
43	633	gęś	1b	VI	8	Polska	2021	OM248656	ta praca
44	526	gęś	1b	VI	7	Polska	2020	MZ448147	ta praca
45	1228	gęś	1b	VI	7	Polska	2020	MZ448129	ta praca
46	320	gęś	N	VI	9	Polska	2020	MZ448139	ta praca
47	49W	gęś	N	II	9	Polska	2019	MZ448148	ta praca
48	1083	gęś	1b	VIII	8	Polska	2021	OM248658	ta praca
49	195	gęś	1b	VIII	9	Polska	2019	MZ448131	ta praca
50	95	gęś	8	IV	7	Polska	2020	MZ448144	ta praca
51	670	gęś	8	IV	7	Polska	2020	MZ448125	ta praca
52	759W	gęś	8	IV	7	Polska	2019	MZ448126	ta praca
53	818	gęś	8	IV	8	Polska	2019	MZ448161	ta praca
54	819	gęś	8	IV	8	Polska	2019	MZ448162	ta praca
55	176	gęś	8	IV	8	Polska	2020	MZ448158	ta praca
56	489	gęś	8	IV	9	Polska	2020	MZ448122	ta praca
57	1092	gęś	8	IV	9	Polska	2021	OM248659	ta praca
58	497	gęś	6	IV	9	Polska	2021	OP822694	ta praca
59	849	gęś	6	III	9	Polska	2020	MZ448135	ta praca
60	2S	świnia	6	III	9	Polska	2018	OP822680	Dec i wsp. 2023
61	IMT23668	kaczka	ND	III	9	Niemcy	2010	KR606249.1	Janßen i wsp. 2015
62	1S	świnia	N	II	9	Polska	2017	OP822679	Dec i wsp. 2023
63	5S	świnia	2	VII	9	Polska	2019	OP822683	Dec i wsp. 2023
64	9S	świnia	2	VII	9	Polska	2019	OP822687	Dec i wsp. 2023
65	8S	świnia	8	IV	7	Polska	2019	OP822686	Dec i wsp. 2023
66	IMT26577	Indyk	ND	IV	9	Niemcy	2011	KR606264.1	Janßen i wsp. 2015
67	12S	świnia	1b	V	8	Polska	2018	OP822690	Dec i wsp. 2023
68	3S	świnia	1b	VI	9	Polska	2018	OP822681	Dec i wsp. 2023
69	4S	świnia	1b	VI	8	Polska	2019	OP822682	Dec i wsp. 2023
70	10S	świnia	5	VI	9	Polska	2018	OP822688	Dec i wsp. 2023
71	Ireland	świnia	6	VI	9	Japonia	ND	LC425606.1	Shimoji i wsp. 2019
72	AQ 150414	świnia	1a	VI	9	Chiny	ND	KU214208.1	Wei i Li 2016, nieopublikowane
73	IMT28565	Indyk	ND	VI	10	Niemcy	2011	KR606272.1	Janßen i wsp. 2015
74	R32E11	nieznany	2	XIII	13	USA	<1970	MZ448116	Dec i wsp. 2023
75	IMT20385	Świnia	ND	XIII	9	Niemcy	2000	KR606212.1	Janßen i wsp. 2015
76	422/1E1	świnia	1b	XII	9	Japonia	ND	AB259653.1	To i Nagai 2007
77	C43065	świnia	2	XII	9	Chiny	ND	EF688017.1	Nazierbieke i wsp. 2008
78	Fujisawa	świnia	1a	XI	9	Japonia	<1972	AP012027.1	Ogawa i wsp. 2011
79	ZJ	świnia	ND	IX	9	Chiny	ND	CP041995.1	Gu i wsp. 2020
80	LA150627	Świnia	1a	IX	9	Chiny	ND	KU214211.1	Wei i Li 2016 nieopublikowane
81	IMT18232	Świnia	ND	IX	9	Niemcy	2009	KR606199.1	Janßen i wsp. 2015

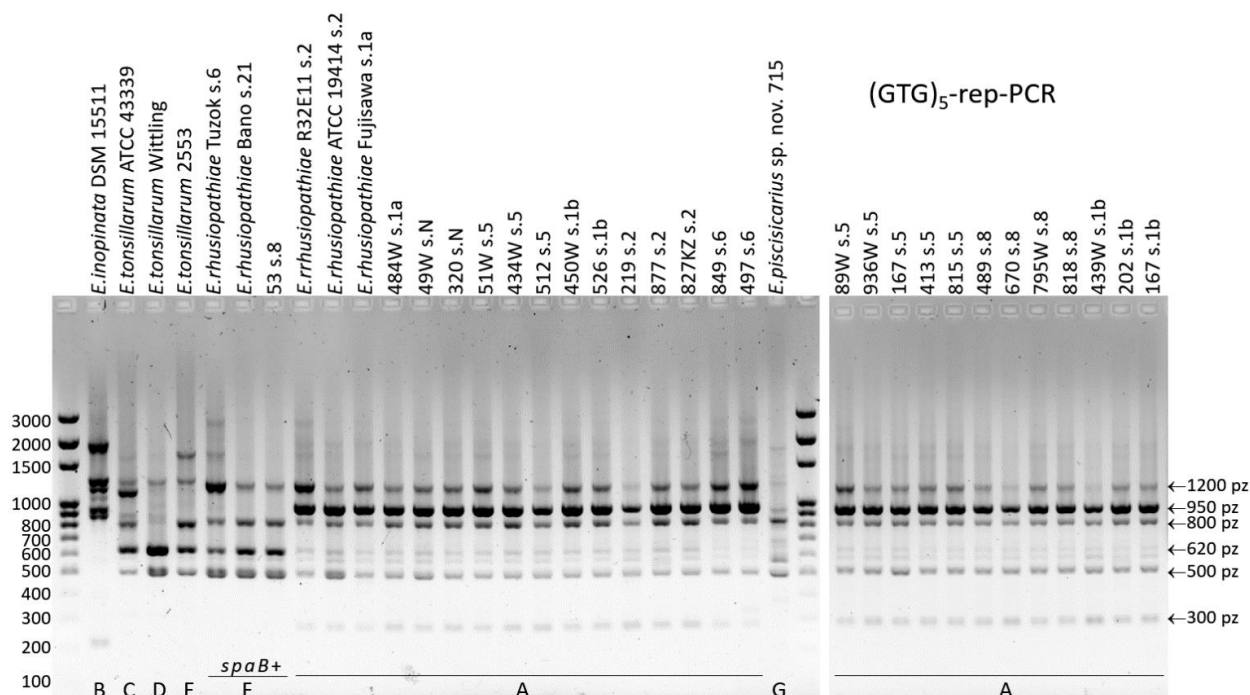
82	ATCC 19414	świnia	2	I	9	UK?	1950	LR134439.1	WTSI*, UK, 2018, nieopublikowane
83	Pecs 67	świnia	5	I	9	Japonia	<1992	AB259655.1	To i Nagai 2007
84	IMT25299	kura	ND	I	9	Niemcy	2011	KR606260.1	Janßen i wsp. 2015
85	IMT28568	indyk	ND	I	9	Niemcy	2012	KR606274.1	Janßen i wsp. 2015
86	FY 150511	Świnia	1a	X	9	Chiny	ND	KU214210.1	Wei i wsp. 2016 nieopublikowane

\*WTSI - Wellcome Trust Sanger Institute

## 4.9. Zróżnicowanie genetyczne szczepów *E. rhusiopathiae*

### 4.9.1. Rep-PCR

Analiza profili elektroforetycznych szczepów *Erysipelothrix* spp. uzyskanych za pomocą metody genotypowania rep-PCR wykazała, że zastosowanie startera (GTG)<sub>5</sub> umożliwia dyskryminację szczepów *E. rhusiopathiae* *spaA*-pozytywnych i *spaB*-pozytywnych, jednak nie pozwala na różnicowanie w obrębie izolatów *spaA*-pozytywnych. Terenowy izolat *spaB*-pozytywny (nr 53 serotyp 8) miał identyczny profil jak dwa referencyjne szczepy *spaB*-pozytywne (Tuzok serotyp 6 i Bano serotyp 21) (profil F – Ryc. 4.18). Wszystkie izolaty terenowe *spaA*-pozytywne, bez względu na serotyp czy wariant SpaA, miały takie same profile elektroforetyczne (GTG)<sub>5</sub> oznaczone na Rycinie 4.18 jako profil A; zawierał on charakterystyczny wyraźny prążek o wielkości 950 pz, a także prążki o wielkości 800, 500 i 1200 pz oraz słabo widoczny prążek o wielkości 300 pz (Ryc. 4.18). Trzy referencyjne *spaA*-pozytywne szczepy *E. rhusiopathiae* (Fujisawa, ATCC 19414 i R32E11) miały taki sam profil elektroforetyczny jak izolaty terenowe. Metoda rep-PCR z wykorzystaniem startera (GTG)<sub>5</sub> wydaje się być także obiecującą metodą do szybkiej wstępnej identyfikacji gatunkowej izolatów *E. rhusiopathiae*. Szczepy referencyjne reprezentujące gatunki *E. inopinata*, *E. tonsillarum* i *E. piscisarius* odznaczały się odmiennymi profilami elektroforetycznymi (Ryc. 4.18).



**Rycina 4.18.** Profile elektroforetyczne produktów PCR (agaroza 1,5%) uzyskanych dla wybranych izolatów terenowych *E. rhusiopathiae* oraz szczepów referencyjnych różnych gatunków *Erysipelothrix* za pomocą metody (GTG)<sub>5</sub>-rep-PCR

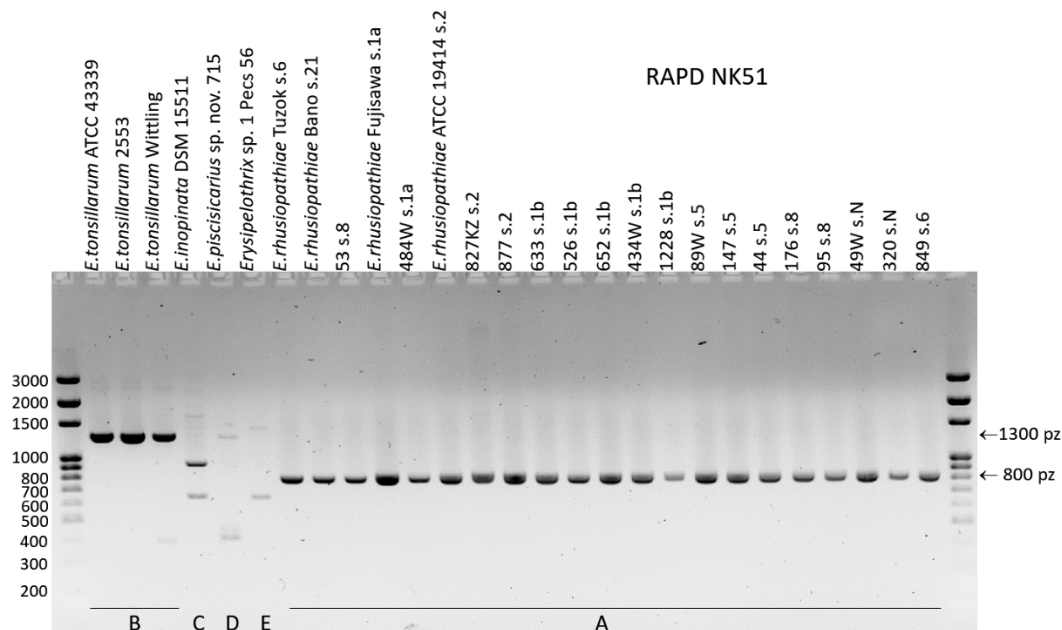
#### 4.9.2. RAPD

W metodzie RAPD z zastosowaniem starterów NK51, NK6, 1254 i M13 oraz protokołów PCR uznanych (na podstawie wyników wstępnych badań) za optymalne wykazano zróżnicowanie genetyczne w obrębie izolatów *E. rhusiopathiae*, a także pomiędzy szczepami wzorcowymi reprezentującymi różne gatunki *Erysipelothrix*. Najlepsze rezultaty dyskryminacji wewnątrzgatunkowej uzyskano przy użyciu startera M13 i 1254. W obu metodach odnotowano częściową korelację pomiędzy profilem RAPD a serotypem/profilem lekooporności, profilem wirulencji, rodzajem genu *spa* (*spaA*/*spaB*) i wariantem *SpaA*; nie zaobserwowano związku pomiędzy profilem RAPD a pochodzeniem szczepu (gęś/kaczka).

**Starter NK51** zapewniał dyskryminację międzygatunkową w obrębie rodzaju *Erysipelothrix*; profile elektroforetyczne wszystkich szczepów *E. rhusiopathiae* zawierały tylko 1 prążek o wielkości 800 pz (profil A), natomiast profile szczepów *E. tonsillarum* zawierały amplikon o wielkości 1300 pz (profil B); w profilach pojedynczych szczepów reprezentujących pozostałe trzy gatunki *Erysipelothrix* występowały słabo widoczne prążki o innych wielkościach (Ryc. 4.19). RAPD z użyciem startera NK51 jest zatem



prostą i szybką metodą, która może być wykorzystywana do identyfikacji gatunkowej *E. rhusiopathiae*, szczególnie do odróżnienia *E. tonsillarum* od *E. rhusiopathiae*.



**Rycina 4.19.** Profile elektroforetyczne produktów PCR (agarozą 1,5%) uzyskanych dla wybranych izolatów terenowych *E. rhusiopathiae* oraz szczepów referencyjnych różnych gatunków *Erysipelothrix* za pomocą metody RAPD-PCR z użyciem startera NK51

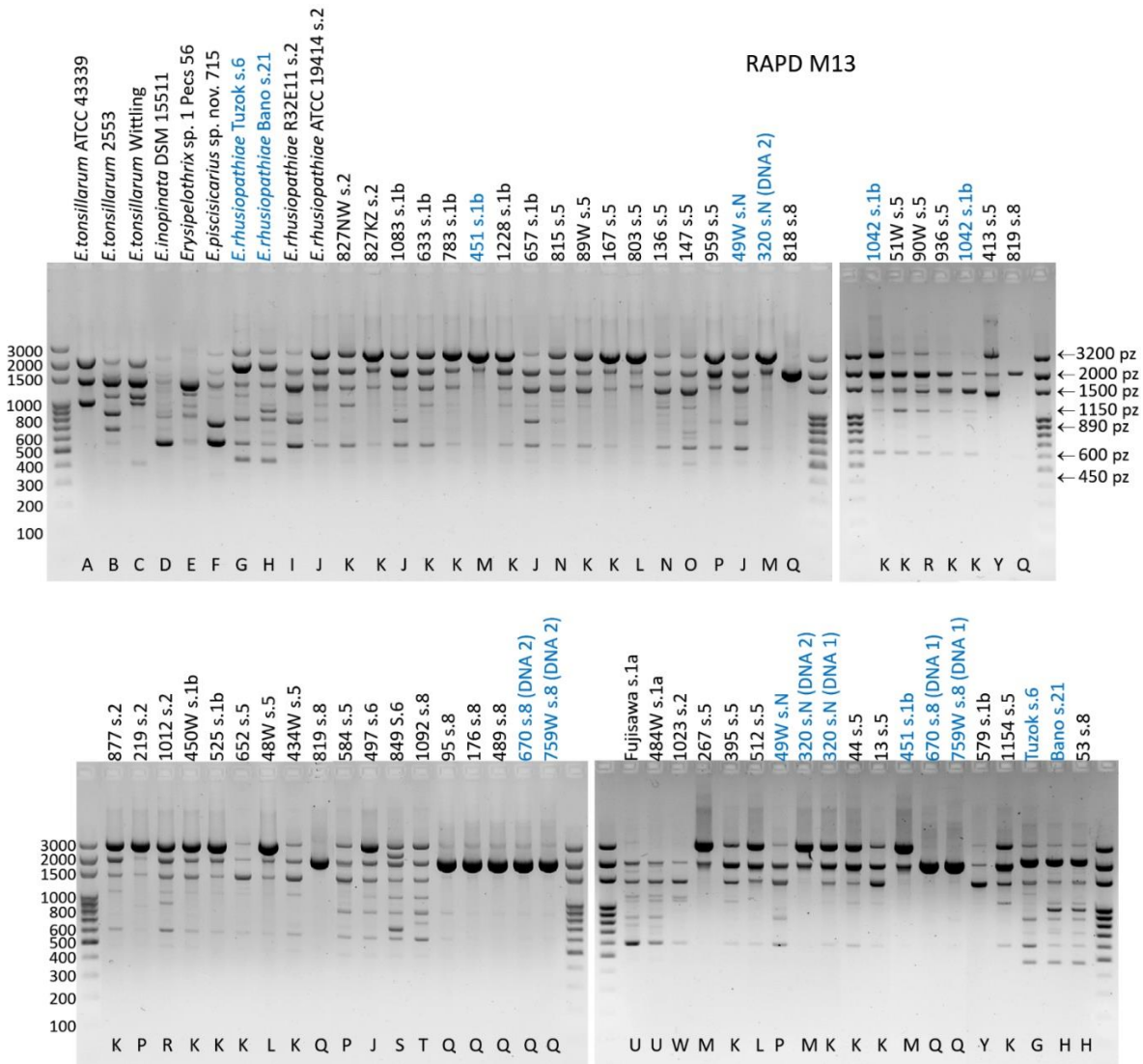
**Starter M13.** W profilach RAPD-PCR uzyskanych z tym starterem u większości szczepów *E. rhusiopathiae* występowały 3 wyraźne prążki o wielkości ok. 3000, 2000 i 1500 pz (Ryc. 4.21) oraz 2-3 słabiej widoczne prążki (1150, 890, 600 pz). Na podstawie liczby i wielkości produktów PCR u 52 losowo wybranych do tego badania terenowych izolatów *E. rhusiopathiae* wyróżniono 15 profili RAPD, tj. H, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, W, Y (Ryc. 4.21). Należy jednak zaznaczyć, że pomiędzy profilami J, P i N oraz pomiędzy K i L różnice były niewielkie – dotyczyły pojedynczych i słabo widocznych na żelu prążków. Unikatowy profil zawierający jeden prążek o wielkości ok. 2000 pz uzyskano dla siedmiu z ośmiu szczepów serotypu 8 *spaA*-dodatnich (profil Q, Ryc. 4.21); wszystkie te szczepy odznaczały się wielolekoopornością.

W metodzie RAPD z udziałem startera M13 unikatowy profil uzyskano m.in. także dla:

- szczepu 484W - jedyny reprezentant serotypu 1a, profil identyczny z profilem wzorcowego szczepu *E. rhusiopathiae* Fujisawa serotyp 1a (profil Q),
- szczepu 849 serotyp 6 (profil S) - to szczep mający unikatowy (III) wariant białka SpaA,

- szczepu 1023 serotyp 2 (profil W) – w profilu brak prążka o wielkości ok. 3000 pz, który występował u ogromnej większości izolatów (to jedyny wielolekooporny szczep wśród szczepów serotypu 2, nie ustalono jaki gen determinuje oporność na makrolidy),
- szczepu 1012 serotyp 2 (profil R) – jedyny szczep oporny na tylozynę, ale wrażliwy na erytromycynę,
- szczepu 1092 serotyp 8 – jedyny szczep serotypu 8 nie wykazujący wielolekooporności,
- szczepów 136 i 147 – jedyne użyte w badaniu szczepy serotypu 5 zawierające gen oporności *ant(6)-Ia*,
- szczepu 53 (jedyny szczep *spaB*-dodatni) – profil identycznych z profilem szczepu wzorcowego Bano *spaB*-dodatniego (profil H).

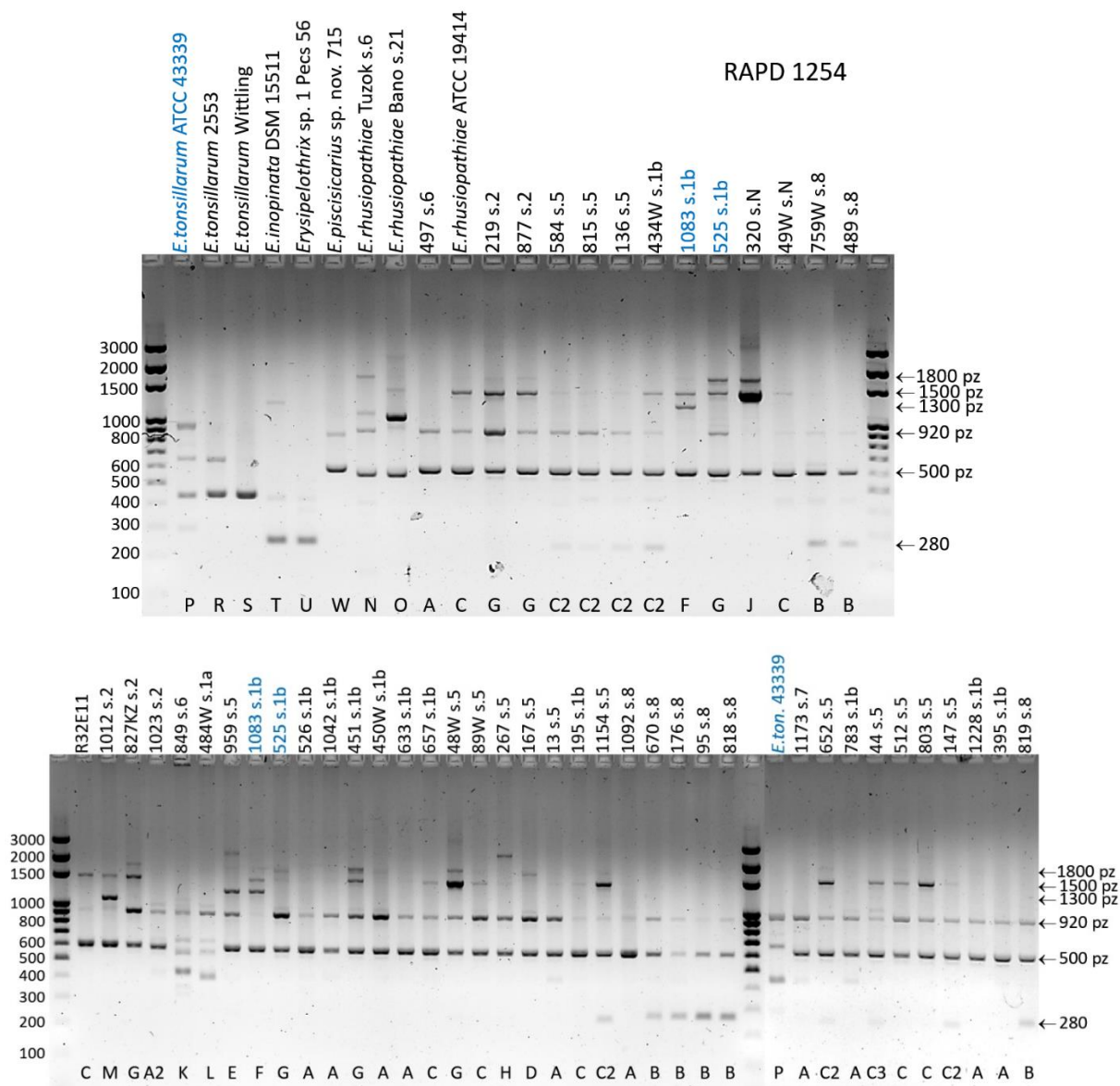
**Powtarzalność RAPD M13.** W przypadku szczepów serotypu 8 odnotowano powtarzalność wyników RAPD-M13 (w profilu zawsze występował 1 prążek o wielkości ok. 2000 pz, bez względu czy analizę wykonywano na świeżo wyizolowanym DNA czy na DNA kilkakrotnie odmrażanym i przechowywanym przez okres ponad pół roku). Natomiast w przypadku szczepów innych serotypów powtarzalność metody była niższa; w kolejnych powtórzeniach zmienna była intensywność prążków na żelu – np. w profilu szczepu 1042 serotyp 1b prążek o wielkości ok. 3000 pz raz był wyraźnie widoczny, innym razem bardzo słabo widoczny (Ryc. 4.21); podobnie było w przypadku szczepu 49W serotyp N czy 1042 serotyp 1b (Ryc. 4.21). Co więcej, w profilu szczepu 320 przy powtórnej analizie z użyciem świeżo-wyizolowanego DNA genomowego występowała mniejsza liczba prążków niż w badaniu z użyciem dłuższej (~7 miesięcy) przechowywanego DNA genomowego (stężenie DNA i jego czystość były podobne w obu próbkach, tj. 17 ng/μl i A260/280-1,66; 19 ng/μl i A260/280-1,67). Istotnym czynnikiem wpływającym na wynik metody RAPD-M13 wydaje się być zatem czas przechowywania DNA genomowego, podczas którego może dochodzić do częściowej degradacji materiału genetycznego.



**Rycina 4.21.** Profile elektroforetyczne produktów PCR (agarozą 1,5%) uzyskanych dla wybranych izolatów terenowych *E. rhusiopathiae* oraz szczepów referencyjnych różnych gatunków *Erysipelothrix* za pomocą metody RAPD z użyciem startera M13; kolorem niebieskim zaznaczono szczepy, dla których analiza została wykonana 2- lub 3-krotnie; DNA 1 – DNA przechowywane w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  ponad 6 miesięcy, rozmrażane i zamrażane ok. 10x; DNA 2 – DNA świeże (przechowywane w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  nie dłużej niż 1 miesiąc)

**Starter 1254** zapewniał dyskryminację międzygatunkową oraz różnicowanie w obrębie gatunku *E. rhusiopathiae*. Dla szczepów *E. tonsillarum* charakterystyczny był prążek o wielkości 440 pz, a dla szczepów *E. rhusiopathiae* – prążek o wielkości 500 pz. W profilach ogromnej większości izolatów terenowych (*spaA*-pozytywnych) jak również wzorcowych szczepów *E. rhusiopathiae* ATCC 19414 i R32E11 występował także słabiej widoczny prążek na wysokości 920 pz, a u ponad połowy (53%) izolatów produkt PCR o wielkości 1500 pz. Amplikony o innych wielkościach (głównie 2200, 1800, 1300, 280, 270 pz) występowały tylko u niektórych szczepów. Analizując wyniki typowania 47

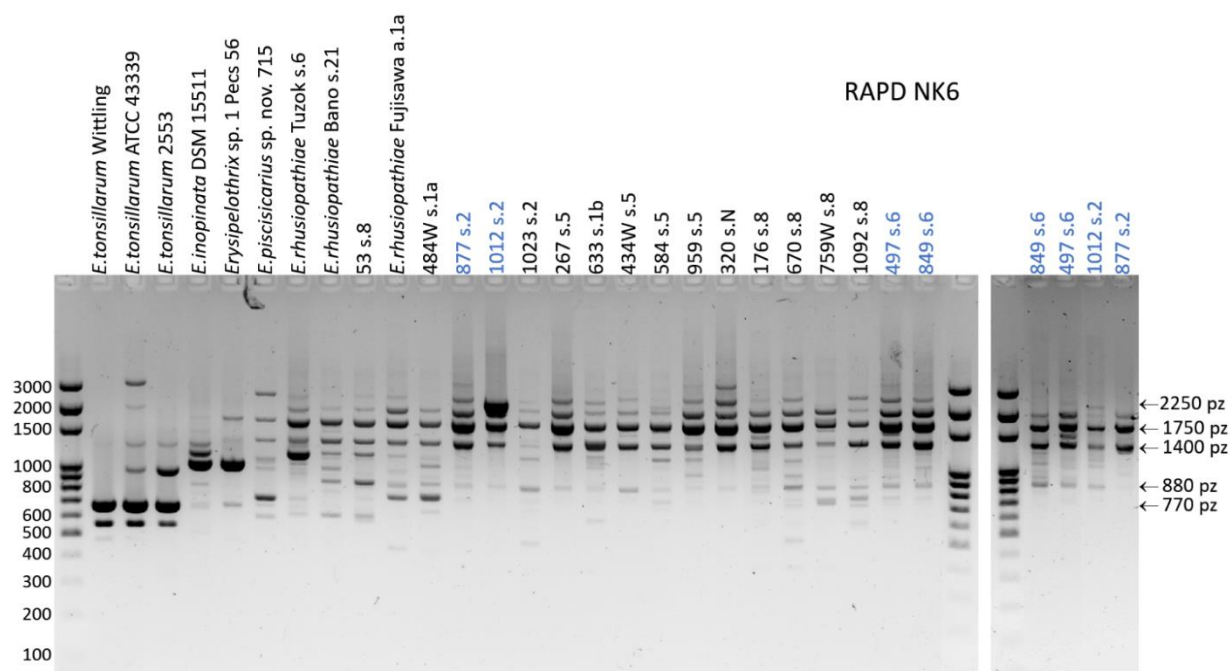
losowo wybranych izolatów terenowych *E. rhusiopathiae* otrzymano 15 profili (genotypów) RAPD, tj. A, A2, B, C, C2, C3, E, E, F, G, H, J, K, L, M. Należy podkreślić, że profil B był znamieny dla wielolekoopornych szczepów serotypu 8 (wszystkie zawierały prążek o wielkości 280 pz). Unikatowy profil uzyskano także dla szczepu 484W (jedyny reprezentant serotypu 1a i IX wariantu białka SpaA), 849 (jedyny reprezentant III wariantu SpaA, serotyp 6), 959 (jedyny szczep, u którego nie wykryto genu wirulencji *intl*, serotyp 5), 1012 (serotyp 2) oraz 1083 (serotyp 1b) (Ryc. 4.22).



**Rycina 4.22.** Profile elektroforetyczne produktów PCR (agaroza 1,7%) uzyskanych dla wybranych izolatów terenowych *E. rhusiopathiae* oraz szczepów referencyjnych różnych gatunków *Erysipelothrix* za pomocą metody RAPD z użyciem startera 1254; kolorem niebieskim zaznaczono szczepy, dla których analiza została wykonana 2-krotnie

**Powtarzalność RAPD 1254.** Bazują na wynikach uzyskanych dla trzech szczepów (*E. tonsillarum* ATCC 43339; *E. rhusiopathiae* 1083 i 525), dla których analizę wykonano dwukrotnie można stwierdzić, że metoda RAPD z użyciem startera 1254 pozwala na uzyskiwanie powtarzalnych wyników; profile dwóch szczepów były identyczne w powtórzeniu, natomiast w profilu szczepu 525 odnotowano zmianę w intensywności dwóch prążków (w powtórzeniu dwa górne prążki, tj. 1500 i 1800 pz, były bardzo słabo widoczne) (Ryc. 4.22).

**Starter NK6,** podobnie jak starter 1290 i NK51 zapewniał dyskryminację pomiędzy różnymi gatunkami *Erysipelothrix*, natomiast potencjał różnicujący tej metody w odniesieniu szczepów gatunku *E. rhusiopathiae*, pomimo optymalizacji, był niski. W profilach trzech analizowanych szczepów *E. tonsillarum* występowały dwa wyraźne prążki o wielkości 550 i 670 pz, natomiast dla wszystkich szczepów *E. rhusiopathiae* charakterystyczne były trzy prążki o wielkości 1400, 1750 i 2000 pz. W profilach niektórych izolatów terenowych występowały także mniej wyraźne prążki, najczęściej o wielkości ok. 3200 pz, 2500 pz, 1200 pz i 880 pz (Ryc. 4.23).



**Rycina 4.23.** Profile elektroforetyczne produktów PCR (agarozą 1,5%) uzyskanych dla wybranych izolatów terenowych *E. rhusiopathiae* oraz szczepów referencyjnych za pomocą metody RAPD z użyciem startera NK6; kolorem niebieskim zaznaczono szczepy, dla których analiza została wykonana w dwóch powtórzeniach

**Powtarzalność RAPD NK6.** Analiza profili elektroforetycznych uzyskanych dla wybranych izolatów w dwóch powtórzeniach wykazała, że stopień powtarzalności metody RAPD ze starterem NK6 jest niski. Pomiędzy powtórzeniami odnotowano różnice zarówno nie tylko w intensywności ale i w liczbie prążków, np. w profilu szczepu 877 przedstawionym na Rycinie 4.23 widoczne są 3 prążki główne (1400, 1750 i 2250 pz) i 4 prążki słabo lub bardzo słabo widoczne (2250, 3200, 1000 i 880 pz), natomiast w profilu tego samego szczepu uzyskany przy powtórzeniu (z użyciem tej samej próbki DNA genomowego) liczba prążków jest mniejsza (brak prążków 3200 pz, 1250 pz i 880 pz). Podobne różnice pomiędzy powtórzeniami odnotowano w stosunku do innych szczepów (Ryc. 4.23, szczepy oznaczone kolorem niebieskim). Ze względu na niską powtarzalność metodę oceniono za mało wiarygodną jeśli chodzi o różnicowanie izolatów w obrębie gatunku *E. rhusiopathiae*.





## 5. DYSKUSJA

### *Występowanie różycy drobiu wodnego*

Różycy drobiu wodnego w Polsce rokrocznie jest przyczyną znacznych strat ekonomicznych wynikających z upadków i leczenia ptaków, a w przypadku stad reprodukcyjnych także ze spadku nieśności. Przy łagodnym przebiegu choroby śmiertelność wynosi kilka procent, przy ostrym – nawet kilkudziesięciu procent stada w przeciągu kilku dni (Janowska i wsp. 1978, Bobrek i Gawęł 2015, obserwacje własne).

Przeprowadzone badania wykazały, że różycy dotyka głównie ptaki dorosłe, zarówno ze stad reprodukcyjnych jak i w hodowlach na tucz. U gęsi rzeźnych najwięcej przypadków odnotowano w przedziale wiekowym 11-13 tygodni. Jest to zbieżne z doniesieniami Bobrek i Gawęł (2015) i Bobrek i wsp. (2016), którzy opisali przypadki różycy u gęsi w wieku 8-11 tyg. Janowska i wsp. (1978) natomiast potwierdzili różycę w stadzie 6-7 miesięcznych gęsi. Różycy u piskląt, zarówno gęsi jak i kaczek została zakomunikowana jedynie w dwóch pracach z lat 70 i 80 XX w. (Bailie i wsp. 1970, Dhillon 1980). Z doniesień z innych krajów wynika, że także w przypadku kur różycy występuje najczęściej u ptaków starszych, zazwyczaj u niosek w wieku 15 miesięcy i starszych (Kurian i wsp. 2012, Watrang i wsp. 2021). Nie wiadomo co było przyczyną obserwowanej zwiększonej zachorowalności na różycę w grupie gęsi 11-13 tyg., ale możliwe, że dużą rolę odgrywał tu spadek odporności będący wynikiem stresu towarzyszącego ptakom w okresie przepierzania i dojrzewania (Żbikowski i wsp. 2011). Wydaje się, że stwierdzony w tej pracy brak zakażeń na tle *E. rhusiopathiae* u piskląt może być związany z tym, że zarówno gęsi jak i kaczki przez pierwsze 3-5 tyg. życia są przetrzymywane w odchowalniach, czyli pomieszczeniach zamkniętych. Młode ptaki nie mają wówczas kontaktu z innymi ptakami i środowiskiem zewnętrznym, które prawdopodobnie jest źródłem patogenu. Bakterie *E. rhusiopathiae* dostające się do gleby i wód gruntowych wraz z wydalinami i wydzielinami zakażonych zwierząt (świń, gryzoni, ptaków lub ryb) ulegają rozprzestrzenieniu w środowisku i mogą kontaminować obszar wybiegów drobiu wodnego (Wood 1973). W świńskich odchodach włoskowce są w stanie przetrwać, w zależności od warunków atmosferycznych przez 1-5 miesięcy (Conklin i wsp. 1979). W glebie *E. rhusiopathiae* zachowuje żywotność do 35 dni, a w przypadku wystawienia na bezpośrednie działanie promieni słonecznych - 12 dni. Przeżywalności bakterii sprzyja niska temperatura (Wood 1973). Nie wiadomo jakie były wrota zakażenia u badanych gęsi i kaczek, ale możliwe, że włoskowce dostały się do ich organizmu przez



uszkodzenia skóry powstałe np. na skutek zaburzeń behawioralnych. Tego typu zjawiska z reguły występują u ptaków najwcześniej po 7 tyg. życia, a ich przyczyną mogą być błędy żywieniowe i niewłaściwe warunki bytowe (Eriksson i wsp. 2014).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że nie tylko wiek, ale i okres roku kalendarzowego mogą usposabiać do wystąpienia różycy u drobiu wodnego. U gęsi rzeźnych aż 72,7% przypadków tej choroby potwierdzono w sierpniu i we wrześniu (n=48/66). Charakter przeprowadzonych badań nie pozwala na określenie przyczyny zwiększonej liczby zachorowań w tych miesiącach, ale wydaje się, że pewną rolę mogły odgrywać czynniki pogodowe takie jak deszcz, mokra błotnista gleba i spadek temperatury. W przypadku stad reprodukcyjnych do zwiększonej zachorowalności w okresie jesiennym mógł się przyczyniać także stres związany z podskubem. Literatura podaje, iż czynnikami usposabiającymi do rozwoju różycy u ptaków są okresowe spadki odporności, związane m.in. ze złymi warunkami pogodowymi (niska temperatura, silny wiatr, opady, przymrozki), równoczesną infekcją bakteryjną, wirusową, pasożytniczą, bądź okresem podskubu (Jordan i Bisgaard 2011, Żbikowski i wsp. 2011). Występowanie różycy u gęsi w okresie jesiennym – we wrześniu (2008 r.) i w październiku (2007 r.) potwierdzili także Bobrek i wsp. (2016). Duży wpływ na zwiększoną częstotliwość diagnozowania różycy u gęsi w drugiej połowie roku kalendarzowego miał zapewne fakt prowadzonej w tym okresie większej liczby hodowli gęsi. Wstawienia piskląt zaczynają się z reguły w marcu i trwają do lipca, a nawet w sierpniu (pierwsze patki opuszczają odchowalnię dopiero w kwietniu), natomiast w styczniu i lutym nie prowadzi się hodowli gęsi na tucz. Obserwacje własne wskazują, że gęsi są bardziej podatne na zakażenie bakteriami *E. rhusiopathiae* niż kaczki; w przeciągu trzech lat w Laboratorium Weterynaryjnym Vet-Lab Brudzew potwierdzono różycę na 93 fermach gęsi i tylko na sześciu fermach kaczek. Brak przypadków różycy u kaczek ze stad rzeźnych może być związany z krótkim cyklem produkcyjnym tych ptaków – osobniki w wieku zaledwie 7 tyg. są kierowane na ubój, a przez ok. połowę swojego życia pozostają w pomieszczeniach zamkniętych. Wydaje się zatem, że drób przebywający mający ograniczony kontakt z innymi ptakami i środowiskiem zewnętrznym jest mniej narażony na zakażenie.

### ***Zmiany anatomopatologiczne w przebiegu różycy u drobiu wodnego***

Różycy drobiu ma postać posocznicy ze zmianami naczyniowymi i narządowymi. (Bobrek i wsp. 2016). Uzyskane w tej pracy wyniki dotyczące zmian anatomopatologicznych u gęsi i kaczek z różycą są zbieżne z obserwacjami innych

autorów (Bobrek i wsp. 2016, Bobrek i wsp. 2013, Janowska i wsp. 1978), którzy opisali u gęsi zakażonych *E. rhusiopathiae* przekrwienie i powiększenie wątroby, śledziony, nerek, wybroczyny na sercu, trzustce, tłuszczu trzewnym oraz przekrwienia w mięśniach piersiowych i nóg oraz płuc (Bobrek i wsp. 2016). W zgodzie z naszymi obserwacjami pozostają także wyniki Dhillon i wsp. (1980), którzy u kaczek z różycą odnotowali powiększenie i obrzęk wątroby z przekrwieniami podtorebkowymi oraz powiększenie i przekrwienie śledziony. Obrzęk stawów skokowych jaki zaobserwowano w tych badaniach aż u 77% kaczek, podobnie jak surowiczy wysięk w torebkach stawów skokowych (33%), nie zostały wcześniej opisane u drobiu wodnego z różycą (Bobrek i wsp. 2016, Janowska i wsp. 1978).

Mechanizm powstawania przekrwień i innych zmian anatomopatologicznych podczas różycy jest słabo poznany. Wydaje się, że ważną rolę odgrywa tutaj neuraminidaza, której aktywność enzymatyczna prowadzi do zaburzenia funkcjonowania komórek. U szczurów eksperymentalnie zakażonych włoskowcem różycy, wykazano, że neuraminidaza wytwarzana przez bakterie przyczynia się do rozwoju zapalenia tętnic i małopłytkowości (Nakato 1987). Na skutek działania tego enzymu może dochodzić do wykrzepiania wewnątrznaczyniowego obserwowanego podczas zakażenia o posocznicowym przebiegu. Dodatkowo, włoskowiec różycy ma zdolność do przeżywania wewnątrz komórek układu odpornościowego, w tym w granulocytach wielojądrowych (Shimoji i wsp. 1996). To, w połączeniu z wewnątrznaczyniowym wykrzepianiem, uruchamia kaskadę prowadzącą do nadmiernego i niekontrolowanego uwalniania mediatorów zapalnych i rozwoju sepsy (Timoney 1970).

### ***Serotypy szczepów E. rhusiopathiae od drobiu wodnego***

Przedstawione w dysertacji wyniki serotypowania izolatów *E. rhusiopathiae* pochodzących od drobiu wodnego są unikatowe na skalę światową. Wysoka prevalencja szczepów serotypu 5 (38,3%) i 1b (28,3%) jest zgodna z wynikami Hess i wsp. (2023), którzy opisali dominację szczepów tych serotypów u drobiu (kury i indyki) w Austrii. Odmienne wyniki uzyskano w Niemczech, gdzie wśród szczepów *E. rhusiopathiae* (n = 32) od ptaków i ssaków dominował serotyp 1a (62,5%), podczas gdy szczepy serotypu 2 (28,1%) i serotypu N (9,4%) izolowano rzadziej (Janßen i wsp. 2015). Szczepy *E. rhusiopathiae* wyizolowane z klinicznych przypadków różycy u świń w Polsce (n = 14) reprezentowały najczęściej serotyp 1b (42,8%), rzadziej serotyp 2 (21,4%), 5 (14,3%), 6 (7,1%), 8 (7,1%) i N (7,1%) (Dec i wsp. 2023). W innych krajach zakażenia świń są

wywoływane najczęściej przez szczepy serotypu 1a, 1b i 2, a bardzo rzadko przez szczepy serotypu 5 czy N (2-3% wśród puli badanych szczepów) (McNeila i wsp. 2017, Imada i wsp. 2004).

Serotypowanie może być pomocne w badaniach epidemiologicznych do oceny rozprzestrzeniania się szczepów w środowisku, zwłaszcza lokalnie między gospodarstwami. Kilka zespołów badawczych wykazało, że immunizacja świń i/lub myszy inaktywowanymi (bakterydami) lub atenuowanymi szczepami serotypu 2 nadaje odporność przeciwko szczepom serotypu 1 i 2 oraz w różnym stopniu przeciwko szczepom innych serotypów, w tym opisanych u drobiu wodnego serotypów 5, 6, 8 i N (Wood i wsp. 1981, Sawada i Takahashi 1987, Takahashi i wsp. 1984). Wyniki tych badań sugerują, że stosowane na niektórych fermach gęsi w Polsce szczepionki przeciwko różycy u świń, oparte na szczepach serotypu 2 (np. Eryseng®), mogą nie zapewniać pełnej ochrony przeciwko szczepom *E. rhusiopathiae* innych serotypów (m.in. przeciwko szczepom serotypu 5, które dominują u drobiu wodnego). Z drugiej strony należy podkreślić, że w opisanych w literaturze badaniach na zwierzętach (myszy, świnię) do immunizacji stosowano tylko jeden szczep serotypu 2, a na uzyskany stopień ochrony przed zakażeniem innymi serotypami *E. rhusiopathiae* wpływ mogły mieć także inne antygeny (m.in. Spa) niż te determinujące serotyp (Forde i wsp. 2020). Odpowiedź na pytanie czy serotyp jest istotną cechą determinującą ochronę krzyżową u ptaków wymaga zatem przeprowadzenia dokładnych badań.

### ***Antybiotykowrażliwość i genotypowe profile lekooporności szczepów E. rhusiopathiae***

Odnotowana w tych badaniach powszechna wrażliwość szczepów *E. rhusiopathiae* na **antybiotyki β-laktamowe** jest w pełni zgodna z doniesieniami kilku innych autorów. Niskie wartości MIC ampicyliny ( $\leq 0,025 - 0,25 \mu\text{g/ml}$ ), odnotowano dla 100% izolatów pozyskanych od świń w Chinach (Ding i wsp. 2015), Japonii (Chuma i wsp. 2010, Yamamoto i wsp. 2001), a także w Polsce (Dec i wsp. 2023). Podobnie, wszystkie szczepy włoskowca różycy (n=60) wyizolowane z różnych źródeł w Australii (MIC=0,03  $\mu\text{g/ml}$  dla 100% szczepów) oraz od świń z objawami różycy w Japonii (MIC  $\leq 0,025 - 0,2 \mu\text{g/ml}$ ) zostały zakwalifikowane jako wrażliwe na penicylinę (Fidalgo i wsp. 2002, Yamamoto i wsp. 2001). Co prawda w tym drugim przypadku dla 5,1% (11/214) szczepów wartość MIC (0,2  $\mu\text{g/ml}$ ) była nieco wyższa od aktualnie ustanowionego punktu odcięcia (0,12  $\mu\text{g/ml}$ ), jednak mogło to być wynikiem zastosowania przez autorów tej pracy (Yamamoto i wsp. 2001) metody rozcieńczeń w agarze, a nie rekomendowanej przez CLSI (2017)

metody rozcieńczeń w bulionie. Niniejsza praca doktorska jest jednym z pierwszych doniesieniem o lekowrażliwości szczepów włoskowca różycy na amoksylinę i amoksylinę z kwasem klawulanowym, a uzyskane wyniki ( $MIC \leq 0,06 \mu\text{g/ml}$  dla 100% izolatów,  $n=60$ ) są wysoce optymistyczne, ponieważ antybiotyki  $\beta$ -laktamowe są lekami z wyboru w leczeniu różycy u drobiu (Żbikowski i wsp. 2011, EL-Ghany 2023). Wrażliwość na amoksylinę, amoksylinę z kwasem klawulanowym i penicylinę została wcześniej odnotowana także u pojedynczych szczepów *E. rhusiopathiae* wyizolowanych od gęsi w Polsce (Bobrek i wsp. 2016, Rzewuska i wsp. 2010). Odmienne wyniki od uzyskanych w tych badaniach przedstawili naukowcy z Austrii, którzy potwierdzili występowanie u drobiu (kury nioski  $n=16$ , indyki  $n=12$ , gęsi  $n=1$ ) szczepów włoskowca różycy opornych na ampicylinę (20% szczepów,  $MIC \geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ ) i penicylinę (40%,  $MIC \geq 0,25 \mu\text{g/ml}$ ) (Hess i wsp. 2023). Należy jednak zaznaczyć, że autorzy ci nie podjęli próby wyjaśnienia mechanizmów tej oporności, a do oznaczania lekowrażliwości stosowali gotowe do użycia mikroplątki MICRONAUT-S Lifestock/Equines GP (MERLIN Diagnostika GmbH, Niemcy), które w przypadku szczepów włoskowca różycy mogą dawać wyniki fałszywie dodatnie. Konkluzja ta oparta jest na wstępnych badaniach własnych, podczas których porównywano wyniki lekowrażliwości izolatów *E. rhusiopathiae* uzyskane w metodzie z wykorzystaniem mikroplątek firmy MERLIN Diagnostika GmbH (Niemcy) oraz w standardowej metodzie mikrorozcieńczeń w bulionie. W przypadku metody z użyciem gotowych mikroplątek (opłaszczonych antybiotykami) u kilku szczepów odnotowano oporność na penicylinę, a także na erytromycynę i linkomycynę, podczas gdy w standardowej metodzie (ze znacznie większym zakresem rozcieńczeń antybiotyków niż zakres na gotowych mikroplątkach) szczepy te były jednoznacznie kwalifikowane jako lekowrażliwe (wyniki nieopublikowane).

U drobiu w Polsce stosowany jest także inny antybiotyk, na który wg przyjętych w tej pracy kryteriów wrażliwe były wszystkie badane szczepy włoskowca różycy, tj. **florfenikol** ( $MIC$  w zakresie od 2 do 8  $\mu\text{g/ml}$ ). Podobnym stopniem wrażliwości na chloramfenikole odznaczały się szczepy *E. rhusiopathiae* wyizolowane od świń w Polsce (zakres  $MIC$  florfenikolu 2-4  $\mu\text{g/ml}$ ) (Dec i wsp. 2023) oraz szczepy od ludzi i różnych zwierząt (innych niż drób) zebrane w Australii (zakres  $MIC$  chloramfenikolu 8-16  $\mu\text{g/ml}$ ) (Fidalgo i wsp. 2002).

Odnotowane w tych badaniach sporadyczne występowanie u drobiu wodnego szczepów włoskowca różycy opornych na **makrolidy** (5%) jest w dużej mierze zgodne

z badaniami Dec i wsp. (2023) oraz Ding i wsp. (2015), którzy wykazali powszechną wrażliwość izolatów *E. rhusiopathiae* pozyskanych od świń na erytromycynę. Podobne wyniki uzyskano także w przypadku szczepów od trzody chlewnej w Japonii (2,7% szczepów opornych na erytromycynę) (Chuma i wsp. 2010). Radykalnie odmienne dane pochodzą z Austrii, gdzie aż 76,7% szczepów wyizolowanych z przypadków różycy u drobiu (kury, indyki) zostało zakwalifikowanych jako oporne na erytromycynę (Hess i wsp. (2023). Autorzy nie wyjaśnili molekularnego mechanizmu oporności, a jej wysoki wskaźnik mógł być po części spowodowany użyciem do oznaczania lekowrażliwości gotowych mikroplitek firmy MERLIN Diagnostika GmbH (Niemcy), które jak opisano wyżej, w przypadku erytromycyny dają niekiedy wyniki fałszywie dodatnie. Z drugiej strony zespół z Chin wykazał, że aż 53% (64/120) izolatów *E. rhusiopathiae* (pozyskanych w latach 2012-2013) od świń odznaczało się opornością na erytromycynę. Większość z nich zawierała geny *ermT* i *ermA-like* (Wu i wsp. 2021). Obecności tych determinant antygenowych nie potwierdzono u żadnego z trzech opisanych w tej pracy szczepów opornych na makrolidy, ale jeden z nich (nr 267 serotyp 5) zawierał gen *ermB*. Jest to pierwsze doniesienie nt. występowanie tego genu oporności u bakterii z gatunku *E. rhusiopathiae*. Gen *ermB* jest rozpowszechniony u bakterii Gram-dodatnich wchodzących w skład naturalnej mikroflory jelitowej u drobiu (*Lactobacillaceae*, *Enterococcus* sp.) (Dec i wsp. 2018, Cauwerts i wsp. 2007). Prawdopodobne jest zatem, że *ermB*-dodatni szczep włoskowca różycy nabył ten gen na drodze transferu horyzontalnego. Wyjaśnienie mechanizmu oporności na makrolidy u dwóch pozostałych szczepów od gęsi (nr. 1023 i 1012 serotypu 2) wymaga przeprowadzenia dokładniejszych badań. W najbliższym czasie nasz zespół planuje wykonanie analiz sekwencji DNA całych genomów tych szczepów z nadzieją na detekcję determinant genetycznych warunkujących oporność na erytromycynę i tylozynę.

Zgodnie z przyjętymi kryteriami, mniej niż 17% izolatów odznaczało się opornością na **lincomycynę** (16,7%), **klindamycynę** (16,7%) i **tiamulinę** (15%), a 9/10 szczepów opornych reprezentowało profil LIN+KLIN+TIAM. Co ciekawe aż 7 z 10 szczepów opornych na te antybiotyki przynależało do serotypu 8. We wcześniejszej naszej pracy profil oporności LIN+KLIN+TIAM potwierdzono u 1 z 14 (7,1%) szczepów *E. rhusiopathiae* od świń i również był to szczep reprezentujący serotyp 8 (Dec i wsp. 2023). Dane literaturowe dotyczące wrażliwości bakterii *E. rhusiopathiae* na linkozamidy są bardzo zróżnicowane. Wśród izolatów od świń (n=214) zebranych w Japonii w latach 1988-1998, szczepy oporne na linkomycynę i klindamycynę stanowiły zaledwie ~1%.

W innych badaniach z Japonii MIC linkomycyny  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$  uzyskano dla 12,1% szczepów (Chuma i wsp. 2010). Rzadkie występowanie oporności na linkozamidy odnotowano także wśród szczepów włoskowca różycy od drobiu (6,7%) (Hess i wsp. 2023). Radykalnie odmienne wyniki przedstawili badacze z Chin, wg których odsetek szczepów *E. rhusiopathiae* opornych na tą grupę antybiotyków wahał się od 64% do 72% (Ding i wsp. 2015, Wu i wsp. 2021). Oporność na tiamulinę zostało wcześniej potwierdzona u niewielkiego odsetka izolatów *E. rhusiopathiae* od świń w Polsce (7,1%, MIC > 128  $\mu\text{g/ml}$ ) (Dec i wsp. 2023) i Chinach (15,2%, MIC = 32  $\mu\text{g/ml}$ ) (Zhang i wsp. 2015). W rozbieżności do wyników uzyskanych w tej dysertacji pozostają natomiast doniesienia z Japonii i Brazylii, potwierdzające powszechną wrażliwość szczepów włoskowca różycy (izolowanych od świń) na tiamulinę (MIC  $\leq 6,25$   $\mu\text{g/ml}$  u 100% izolatów) (Coutinho i wsp. 2011, Yamamoto i wsp. 2001). Występujący u izolatów od drobiu wodnego gen oporności *lsaE* (kodujący transporter ABC, ang. *ATP-binding cassette*), który determinuje oporność na pleuromutyliny wykryto wcześniej także u izolatów *E. rhusiopathiae* od świń w Chinach (n=71). Większość z *lsaE*-dodatnich szczepów oznaczała się opornością klindamycynę (68/71), natomiast nie określono wrażliwości tych izolatów na tiamulinę (Wu i wsp. 2021). Odnotowana w tej dysertacji koegzystencja genów *lnuB* i *lsaE* (u 9 z 10 szczepów opornych na linkozamidy i tiamulinę) została wcześniej opisana u fenotypowo opornych szczepów *E. rhusiopathiae* pochodzących od świń w Polsce (Dec i wsp. 2023) i Chinach (Gu i wsp. 2020, Zhang i wsp. 2015), a także u innych bakterii Gram-dodatnich (Li i wsp. 2014, Wendlandt i wsp. 2013, Nicholson i Bayles 2022, Zhou i wsp. 2019). Wykazano, że determinanty *lnuB* i *lsaE* mogą wchodzić w skład zespołu genów oporności, zawierającego także geny *ant(6)-Ia (aadE)* i *spw*, umieszczonego na mobilnych elementach genomu (Li i wsp. 2014, Zhang i wsp. 2015, Si i wsp. 2015); w przypadku wielolekoopornego szczepu *E. rhusiopathiae* ZJ był to klaster *aadE-apt-spw-lsa(E)-lnu(B)-aadE-sat4-aphA3* (Gu i wsp. 2020) ulokowany na koniugacyjnym elemencie genetycznym. Wielce prawdopodobnym jest zatem, że występujące u szczepów *E. rhusiopathiae* od drobiu wodnego determinanty *lnuB* i *lsaE*, a także *ant(6)-Ia*, tworzą klastry genów oporności, a ich ewentualne lokalizacja na mobilnych elementach genomu zwiększa ryzyko transferu horyzontalnego.

Odnotowany w tych badaniach bardzo wysoki odsetek szczepów *E. rhusiopathiae* opornych na **tetracyklinę** (85%) jest zgodny z wynikami naszych wcześniejszych badań na szczepach włoskowca róży od świń (71,4% izolatów opornych na tetracyklinę) (Dec i wsp. 2023). Nieco mniejszą częstotliwość oporności na tą grupę antybiotyków (38-60%)

opisano dla szczepów *E. rhusiopathiae* izolowanych od trzody chlewnej w Chinach i Japonii (Wu i wsp. 2021, Ding i wsp. 2015, Yamamoto i wsp. 2001, Chuma i wsp. 2010). Występowanie genu *tetM* u fenotypowo opornych szczepów włoskowca różycy potwierdzono także w przypadku izolatów od świń (Dec i wsp. 2023, Wu i wsp. 2021). Zaznaczyć należy jednak, że w przeciwieństwie wyników uzyskanych w tej pracy (wszystkie szczepy fenotypowo odporne zawierały gen *tetM*), zespół Wu i wsp. (2021) z Chin wykazał obecność genu *tetM* tylko u 57,4% izolatów opornych na tetracyklinę. Odnotowana w tych badaniach, podobnie jak w naszej ostatniej publikacji (Dec i wsp. 2023), koegzystencja genów *tetM* i *int-Tn* (gen integrazy transpozonu) wskazuje na potencjalny udział transpozonu z rodziny Tn916/Tn1545 w rozprzestrzenianiu się genu *tetM* u bakterii *E. rhusiopathiae*.

Wysoka częstość występowania u bakterii *E. rhusiopathiae* od drobiu wodnego szczepów opornych na **enrofloksacyne** (80%) jest zgodna z wynikami Ding i wsp (2015) oraz Wu i wsp. (2021), którzy potwierdzili oporność na fluorchinolony (norfloksacyne i lewofloksacyne, enrofloksacyne lub ciprofloksacyne) u ~70%-91,7% szczepów *E. rhusiopathiae* od świń w Chinach. Nieco niższy wskaźnik oporności na enrofloksacyne odnotowano wśród izolatów od świń w Polsce (57.1%) (Dec i wsp. 2023) oraz od drobiu w Austrii (60%) (Hess i wsp. 2023). Zaobserwowana w tych badaniach korelacja pomiędzy wrażliwością szczepów włoskowca różycy na tetracyklinę i enrofloksacyne (wszystkie szczepy odporne na enrofloksacyne odznaczały się także opornością na tetracyklinę) została spostrzeżona także u izolatów od trzody chlewnej (Dec i wsp. 2023). Ze względu na odmienne podłoże molekularne oporności *E. rhusiopathiae* na te tetracykliny (genu *tetM*) i fluorochinolony (mutacja w genie *gyrA*) występowanie takiej zależności jest trudne do wyjaśnienia. Opisany w tej pracy mechanizm oporności na fluorochinolony (mutacją w genie *gyrA* kodującym podjednostkę A gyrazy DNA) pozostaje w zgodzie z wynikami naszych wcześniejszych analiz dotyczących szczepów *E. rhusiopathiae* od świń (Dec i wsp. 2023). Co ciekawe w obu naszych badaniach mutacja ACA→ATA w pozycji 86 (Thr86→Ile) występowała u opornych szczepów serotypu 2 i 8, natomiast u szczepów serotypu 5 była to zmiana Thr86→Lys (ACA→AAA). Mutacja Thr86→Ile została wykryta także u opornych na ciprofloksacyne szczepów włoskowca różycy w Chinach (Wu i wsp. 2021). Należy jednak zaznaczyć, że oporność na fluorochinolony u tych bakterii może być także wynikiem mutacji w pozycji 90 podjednostki A gyrazy oraz w pozycji 82 podjednostki ParC topizomerazy DNA typu IV (Wu i wsp. 2021).

Odnotowane w tych badaniach wysokie wartości MIC **gentamycyny, neomycyny** oraz **trimetoprimu z sulfametoksazolem** (256-  $\geq$ 512  $\mu$ g/ml) uzyskane dla wszystkich izolatów *E. rhusiopathiae* wskazują na występowanie u tych bakterii oporności naturalnej. Brak wrażliwości bakterii *E. rhusiopathiae* na neomycynę i kanamycynę został pierwotnie opisany przez Wood'a (1965), który na bazie swoich obserwacji opracował medium z dodatkiem tych antybiotyków do izolacji szczepów włoskowca różycy (w tamtym czasie *Erysipelothrix insidiosus*) (Wood 1965). Naturalna oporność bakterii *E. rhusiopathiae* na aminoglikozydy (neomycyna, kanamycyna, amikacyna, gentamycyna) oraz inhibitory kwasu foliowego (sulfadiazyna, trimetoprim) została potwierdzona także przez kilku innych autorów (Ding i wsp. 2015, Takahashi i wsp. 1987a, Dec i wsp. 2023, Coutinho i wsp. 2011, Rzewuska i wsp. 2010). Warto jednak zauważyć, że w przypadku badań Ding i wsp. (2015) zakres wartości MIC gentamycyny dla izolatów od świń był znacznie szerszy (1->128  $\mu$ g/ml, przy czym dla 98% izolatów mieścił się w zakresie 32->128  $\mu$ g/ml) niż opisany w tej pracy (256->512  $\mu$ g/ml).

Dość szeroki zakres wartości MIC (16->512  $\mu$ g/ml) u badanych izolatów *E. rhusiopathiae* uzyskano w odniesieniu do **streptomycyny** i **spektynomycyny**. Najwyższe wartości MIC odnotowano u czterech szczepów zawierających gen *ant(6)-Ia* kodujący nukleotydylotransferę aminoglikozydową. Obecność determinanty *ant(6)-Ia* została wcześniej potwierdzona u kilku wielolekoopornych szczepów *E. rhusiopathiae* od świń (przy MIC streptomycyny 512  $\mu$ g/ml) (Zhang i wsp. 2015, Gu i wsp. 2020). Gen *aadK* (kodujący 6-adenylotransferazę aminoglikozydową – enzym modyfikujący strukturę streptomycyny), który wykryto u wszystkich izolatów *E. rhusiopathiae* nie wydaje się mieć związku z opornością na streptomycynę. Nazwa genu *aadK* występującego w genomie szczepu *E. rhusiopathiae* Fujisawa (GenBank Acc. No. AP012027.1, locus\_tag="ERH\_1545), na matrycy którego zaprojektowano startery do PCR, prawdopodobnie została wprowadzona omyłko, a funkcjonalnie gen ten nie ma nic wspólnego z lekoopornością na aminoglikozydy. Ta teoria poparta jest także wynikami naszych wcześniejszymi analiz, wskazujących na brak homologii tego genu (GenBank Acc. No. AP012027.1, locus\_tag="ERH\_1545) z sekwencją genu *aadK* występującego u opornego na streptomycynę szczepu *Bacillus subtilis* 168 (GenBank Acc. No. NG\_047379.1) (Dec i wsp. 2023).



### **Geny wirulencji szczepów *E. rhusiopathiae***

Spośród wielu potencjalnych czynników wirulencji bakterii *E. rhusiopathiae*, w patogenezie różycy dotychczas potwierdzono rolę tylko niektórych z nich. Aktualnie dostępna literatura nie zawiera żadnych danych nt. czynników zjadliwości bądź genotypowych profili wirulencji szczepów *E. rhusiopathiae* wywołujących zakażenia u drobiu wodnego.

Odnotowane w tej pracy powszechne występowanie u badanych izolatów włoskowca różycy (u 98-100% izolatów) genów wirulencji *spaA*, *nanH.1*, *nanH.2*, *cpsA*, ERH\_1356, *rspA*, *rspB*, *algI*, *sub*, *hlyA*, *fbpA*, *intlI* i *hlyIII* jest zgodna z kilkoma innymi doniesieniami (Ding i wsp. 2015, Janßen i wsp. 2015, Dec i wsp. 2023, Yang i wsp. 2020). Jedynie w przypadku genów ERH\_1356 i *intl* zaobserwowano wcześniej nieco niższą prewalencję, tj. na poziomie 77,1% i 85% odpowiednio (Ding i wsp. 2015, Janßen i wsp. 2015). Negatywny wynik amplifikacji pierwszego z wymienionych genów (uzyskany dla 22,9% izolatów) mógł być jednak skutkiem zastosowania przez autorów pracy (Ding i wsp. 2015) starterów komplementarnych do sekwencji znajdujących się poza *locus tag* ERH-1356 (wniosek ten oparty jest na wynikach analizy własnej przeprowadzonej przy użyciu narzędzia BLAST i sekwencji genomowej wzorcowego szczepu *E. rhusiopathiae* Fujisawa, GenBank AP012027.1). Yang i wsp. (2020) w badaniach opartych na analizie sekwencji całych genomów ośmiu zjadliwych szczepów *E. rhusiopathiae* (Fujisawa, NCTC8163/ACTC 19414, WH13013, ZJ, ML101, GXBY-1, SY1027 i KC-Sb-R1) dowiedli, że geny kodujące enzymy odpowiedzialne za syntezę otoczki bakteryjnej *cpsA*, *cpsB* i *cpsC*, neuraminidazy *nanH*, hialuronidazy *hlyA*, *hlyB* i *hlyC* oraz białek powierzchniowych *spaA*, *rspA* i *rspB* są genami rdzeniowymi (Yang i wsp. 2020).

Badania przeprowadzone w ramach tej pracy doktorskiej wykazały, że szczepy *E. rhusiopathiae* izolowane z przypadków różycy u drobiu wodnego nie różnią się od siebie (bądź różnią się w minimalnym stopniu) pod względem genotypowych profili wirulencji (Dec i wsp. 2023, Janßen i wsp. 2015). Możliwe jest jednak, że takie różnice występują na poziomie transkryptomu. Ekspresja poszczególnych genów wirulencji może być odmienna u poszczególnych szczepów, u różnych gospodarzy, w różnych tkankach/narządach czy warunkach środowiskowych. Müller i Krasemann (1976) odnotowali dodatnią korelację między zjadliwością szczepów *E. rhusiopathiae* a poziomem wytwarzanej neuraminidazy. Li i wsp. (2016), opierając się na analizie porównawczej ekspresji genów u wysoce zjadliwego szczepu HX130709 i jego

awirulentnego odpowiednika HX130709a, wykazali, że kluczowymi czynnikami wirulencji *E. rhusiopathiae* są SpaA i neuraminidaza. We wcześniejszych badaniach dowiedziono, że zjadliwość bakterii *E. rhusiopathiae* jest w dużej mierze determinowana obecnością polisacharydowego antygeny otoczkowego, za syntezę którego odpowiada wykryty u wszystkich badanych izolatów gen *cpsA* (Shimoji i wsp. 2002). Zhu i wsp. (2018) z kolei wykazali, że białko podobne do internaliny kodowane przez gen *intI* (ERH\_1472), który został wykryty u 98% izolatów od drobiu wodnego, umożliwia specyficzną adhezję bakterii *E. rhusiopathiae* do powierzchni komórek śródbłonna świni. Warto przy tym zauważyć, że internalina wytwarzana przez *Listerię monocytogenes* przyczynia się do inwazji tych bakterii do komórek nabłonkowych (Bierne i wsp. 2007). Inna adhezyna – białko wiążące fibronektynę (FbpA), której gen wykryto u badanych izolatów *E. rhusiopathiae*, występuje u różnych bakterii Gram-dodatnich (m.in. *L. monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*) determinując ich wirulencję; dotychczas nie potwierdzono jednak zaangażowania genu *fbpA* w rozwój infekcji na tle *E. rhusiopathiae*. Podobnie jest w przypadku genu *hlyIII* kodującego białko z grupy hemolizyn oraz genu *algI* kodującego O-acetylotransferazę alginianową (prawdopodobny udział w tworzeniu biofilmu). Doniesienia literaturowe dotyczące roli białek RspA i RspB (których geny potwierdzono u wszystkich badanych izolatów) w patogenezie zakażeń *E. rhusiopathiae* są niejednoznaczne. Wstępnie wskazano, że te powierzchniowe białka biorą udział w tworzeniu biofilmu, a immunizacja myszy rekombinowanym białkiem RspA (ale nie RspB) zapewnia ochronę przed zakażeniem włoskowcem różycy (Shimoji i wsp. 2003). Z kolei wyniki ostatnich badań przeprowadzonych przez Li i wsp. (2016) wskazują na brak związku między ekspresją genu *rspA* i *rspB* a wirulencją u *E. rhusiopathiae*.

Podsumowując można stwierdzić, że detekcja genów wirulencji u badanych izolatów *E. rhusiopathiae* nie pozwoliła na ich zróżnicowanie w zakresie potencjału chorobotwórczego. Wydaje się, że więcej informacji na temat udziału poszczególnych genów w patogenezie różycy u drobiu wodnego mogłyby dostarczyć badania oparte na analizie ich ekspresji lub wykorzystaniu szczepów modyfikowanych genetycznie, tzw. *knockout*, w eksperymentach *in vitro* i na modelach zwierzęcych.

### **Rodzaje antygeny Spa i warianty SpaA u szczepów *E. rhusiopathiae* od drobiu wodnego**

Odnotowane w tych badaniach powszechne występowanie genu *spaA* u izolatów *E. rhusiopathiae* od gęsi i kaczek jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami

dotyczącymi zarówno szczepów od świń jak i od drobiu (Janßen i wsp. 2016, McNeil i wsp. 2017, Dec i wsp. 2023). Uzyskane wyniki w ogromnej mierze pokrywają się z danymi literaturowymi, wg których antygen SpaA jest charakterystyczny dla szczepów serotypu 1a, 1b, 2, 5, 8 i N, a antygen SpaB – dla serotypów 4, 6, 11, 19 i 21 (To i Nagai 2007). Tego typu korelacji nie odnotowano jedynie dla trzech z 60 badanych izolatów, tj. dla szczepu *spaB*-dodatniego (nr 53), który reprezentował serotyp 8 (a nie 6) oraz dla dwóch szczepów serotypu 6 (nr 849 i 1092) które zawierały gen *spaA* (a nie *spaB*). Występowanie genu *spaA* u szczepu serotypu 6 wykazaliśmy także w poprzednich badaniach (Dec i wsp. 2023). Określanie rodzaju antygeny Spa u izolatów terenowych jest istotne z epidemiologicznego punktu widzenia i niezbędne podczas opracowywania szczepionki przeciwko różycy. Wykazano bowiem, że immunizacja zwierząt określonym typem Spa zapewnia ochronę przed rozwojem choroby po ekspozycji na szczepy zawierające homologiczne Spa, podczas gdy ochrona przed zakażeniem szczepami zawierającymi inny typ Spa jest ograniczona (Ingebritson i wsp. 2010, To i wsp. 2010). Analizowany w tych badaniach szczep szczepionkowy R32E11 zawiera antygen SpaA, co w kontekście wyżej opisanych doniesień nakazuje przypuszczać, że szczepienie u drobiu wodnego szczepionką Eryseng® zapewnia ochronę przed zakażeniem szczepami terenowymi. W rzeczywistości doniesienia płynące z terenu wskazują na ograniczoną skuteczność tego preparatu u drobiu wodnego. Jedną z przyczyn tego stanu rzeczy mogą być wykazane w tych badaniach (opisane niżej) duże różnice w strukturze antygeny SpaA pomiędzy szczepem szczepionkowym a szczepami terenowymi. Przy rozpatrywaniu zagadnienia immunizacji pod uwagę należy także brać inne antygeny *E. rhusiopathiae*, dawkę i drogę podania szczepionki oraz wiek ptaków.

Analiza struktury antygenowego białka SpaA występującego u szczepów *E. rhusiopathiae* była dotychczas podejmowana przez kilku autorów, jednak głównie w odniesieniu do szczepów wywołujących różycę u trzody chlewnej, kurcząt i indyków (Uchiyama i wsp. 2014, Janßen i wsp. 2015). Ta praca jest pierwszym doniesieniem na temat rodzajów białka Spa i wariantów SpaA występujących u izolatów od drobiu wodnego. W kontekście struktury białka SpaA najważniejszą rolę odgrywa N-końcowa domena immunoprotekcyjna, z którą wiążą się przeciwciała generowane w organizmie gospodarza w następstwie zakażenia naturalnego lub szczepienia przeciwko różycy (Imada i wsp. 1999). Określanie struktury antygeny SpaA jest zatem zasadne w z punktu widzenia analiz epidemiologicznych i immunologicznych oraz przy opracowywaniu szczepionek.

### Warianty białka SpaA

U izolatów od drobiu wodnego (83%, 40/59), podobnie jak w puli szczepów wyizolowanych z klinicznych przypadków różycy u trzody chlewnej w Polsce (50%, 7/14), najczęściej identyfikowano VI wariant białka SpaA (Dec i wsp. 2023). Wydaje się zatem, że szczepy z tym wariantem SpaA są najbardziej rozpowszechnione na terenie naszego kraju. Inne warianty SpaA wykryte u badanych szczepów, tj. II, III, IV, V i VII, także zostały przez nas opisane u izolatów *E. rhusiopathiae* od świń (Dec i wsp. 2023). Co ciekawe na podstawie analizy wyników obu naszych badań można wywnioskować, że istnieje zależność pomiędzy wariantem SpaA a serotypem. Wariant II SpaA występował tylko u szczepów serotypu N, wariant III – u szczepów serotypu 6, wariant IV – głównie u szczepów serotypu 8, wariant V – tylko u szczepów serotypu 1b, a wariant VII – tylko u szczepów serotypu 2.

Natomiast dominujący VI wariant białka SpaA nie jest serotypowo-specyficzny, jego nosicielami była większość szczepów serotypu 5, 1b i 2 (Dec i wsp. 2023). Wariant I SpaA (Met203, Ile257) – unikatowy dla izolatu 484W serotypu 1a (1,7%), wykryto także u 18 izolatów od świń z Japonii, spośród których 17 przynależało do serotypu 1a. W eksperymentach na modelach zwierzęcych (myszy, świnię) wykazano, że szczepy z tym wariantem SpaA są wysoce wirulentne – wywołują śmierć u niezaszczepionych osobników (Uchiyama i wsp. 2014). Informacje na temat przebiegu różycy w stadzie gęsi, od których wyizolowano szczep 484W nie są znane; nie wiadomo również czy szczepy wywołujące różycę o ostrym przebiegu u świń są równie chorobotwórcze dla drobiu wodnego. Janßen i wsp. (2015) u szczepów *E. rhusiopathiae* (n=165, w tym 120 od ptaków) wyróżnili 5 wariantów (grup) SpaA, ale nie odnotowali zależności pomiędzy strukturą tego antygeny a serotypem. Aż 52,7% (87/165) izolatów badanych przez tych autorów reprezentowało I grupę SpaA (Ile55, Asn70, Asp178, Asn195, Ile257, Glu303), której odpowiada opisany w tej dysertacji wariant I SpaA wykryty u zaledwie 3 izolatów terenowych (5,1%) oraz u szczepu referencyjnego ATCC 19414. VI wariant SpaA (Ser101, Ile257) występujący u większość szczepów od drobiu wodnego (67,8%) w pracy Janßen i wsp. (2015) opisano jedynie dla 21,8% (36/165) izolatów (jako II grupa SpaA). Natomiast III wariant SpaA (Ile257) odnotowany w tych badaniach tylko u jednego szczepu (1,7%) od gęsi, tj. 849 serotyp 6, Janßen i wsp. (2015) przypisali 22,4% (37/165, III grupa SpaA) szczepów *E. rhusiopathiae* pochodzących od drobiu (kury, indyki) i świń, głównie z Niemiec. Należy zaznaczyć, że analiza porównawcza sekwencji SpaA wykazała, że u izolatów badanych przez Janßen i wsp. (2015) występował jeszcze jeden wariant

SpaA, nie wyodrębniony przez tych autorów, odpowiadający opisanemu w dysertacji wariantowi IV charakterystycznemu dla szczepów serotypu 8. Janßen i wsp. (2015) błędnie przypisali szczep IMT26577 do II grupy SpaA (Ser101, Ile257) podczas gdy w rzeczywistości w sekwencji *spaA* tego szczepu (GenBank KR606264.1) występuje dodatkowa mutacja niesynonimiczna skutkująca zmianą aa (w porównaniu do sekwencji SpaA szczepu Fujisawa) w poz. 54 (Ala54, Ser101, Ile257). Uchiyama i wsp. (2014) u izolatów włoskowca różycy pozyskanych od świń w Japonii wyróżnili trzy warianty SpaA mające podstawienia aa w pozycji 195, 203 i 257 (grupa I: Met203, Ile257; grupa II: Ile257; grupa III: Ala195, Ile257); wariant Met203, Ile257 opisany przez tych autorów dla 53% (18/34) szczepów został wykryty tylko u 1 izolatu (1,7%) od gęsi (IX wariant SpaA) (Janßen i wsp. 2015).

Zmienność aminokwasową w pozycjach 55, 70, 101, 109, 139, 178, 195, 203 i 303 regionu hiperzmiennego SpaA oraz w poz. 426 i 435 regionu bogatego w prolinę odnotowali także Forde i wsp. (2020) u izolatów włoskowca różycy pozyskanych od świń w Wielkiej Brytanii. Autorzy ci nie wykryli jednak u żadnego szczepu mutacji w pozycji 257, która występowała u wszystkich izolatów badanych w tej pracy doktorskiej; stąd żaden z wariantów SpaA opisanych przez Forde i wsp. (2020) nie był identyczny z wariantami opisanymi w tej dysertacji.

Opisana w tej dysertacji pełna homologia w zakresie sekwencji regionu sygnałowego pomiędzy badanymi izolatami *E. rhusiopathiae* jest zgodna z wynikami innych autorów (Dec i wsp. 2023, Janßen i wsp. 2015, To i wsp. 2007). Forde i wsp. (2020) jedynie u kilku z 47 analizowanych szczepów włoskowca różycy odnotowali zmienność w pozycjach 3, 9, 10, 15, 23 w obrębie domeny sygnałowej SpaA. Uzyskane przez nas sekwencje SpaA pozbawione były niestety pierwszych 12 aa (ze względu na konieczność odcięcia nieczytelnych końców chromatogramów), stąd nie wiadomo czy występowały tam mutacje w pozycjach opisanych przez Forde i wsp. (2020).

Na podstawie danych literaturowych i wyników badań własnych można zatem stwierdzić, że częstotliwość występowania szczepów *E. rhusiopathiae* z określonym wariantem SpaA jest odmienna w różnych regionach geograficznych świata, a warianty SpaA II, V i VII zostały dotychczas opisane tylko u szczepów *E. rhusiopathiae* izolowanych od drobiu wodnego i świń w Polsce (Dec i wsp. 2023).

Wyniki analizy domniemanej struktury C-końcowego regionu białka SpaA są zgodne z wcześniejszymi danymi literaturowymi, z których wynika, że SpaA szczepów *E. rhusiopathiae* pochodzących od świń i drobiu najczęściej zawiera 9 powtórzeń

tandemowych, rzadziej 7, 8, 10, 11 lub 13 (Janßen i wsp. 2015, Dec i wsp. 2023). U badanych izolatów od drobiu wodnego (n=59) nie odnotowano pełnej zależności pomiędzy liczbą tandemów w białku SpaA, a serotypem jednakże białka SpaA zawierające 7 i 8 tandemów najczęściej występowały u szczepów serotypu 1b i 8, a sporadycznie u szczepów serotypu 5. Podobną zależność odnotowano w naszej poprzedniej pracy dotyczącej charakterystyki szczepów *E. rhusiopathiae* od świń (Dec i wsp. 2023). Ostatnio wykazano, że liczba tandemowych powtórzeń w cząsteczce SpaA wpływa na właściwości adhezyjne *E. rhusiopathiae*. Szczep SE38 chorobotwórczy dla świń na skutek wprowadzonych modyfikacji prowadzących do wytwarzania białka SpaA skróconego o dwa tandemy odznaczał się niższym potencjałem chorobotwórczym u myszy i słabszymi zdolnościami przylegania do świńskich komórek śródbłonna naczyń (Wu i wsp. 2022). Można się zatem spodziewać, że szczepy od drobiu wodnego mające 7 lub 8 tandemów w regionie C-końcowym SpaA będą mniej zjadliwe niż szczepy wytwarzające SpaA z 9 powtórzeniami. Dane na temat przebiegu zakażenia w stadach, z których szczepy wyizolowano nie są jednak znane.

#### *Antyge SpaA a szczep szczepionkowy R32E11*

Żaden z 9 wariantów SpaA opisanych u badanych terenowych izolatów włoskowca różycy nie był identyczny ze strukturą SpaA szczepu R32E11, na bazie którego produkowana jest szczepionka Eryseng®. Preparat ten, choć przeznaczony do stosowania u świń, bywa także używany do ochrony stad drobiu w Polsce. Z informacji płynących z terenu (niepotwierdzonych naukowo) wynika jednak, że szczepienie gęsi tym preparatem nie zawsze przynosiło oczekiwany efekt. Ponad 90% badanych przez nas izolatów różniło się od szczepu szczepionkowego aż 7, 8 lub 9 aminokwasami w obrębie domeny immunoprotekcyjnej (odcinek pomiędzy 30 a 314 aa w sekwencji białka SpaA, epitop). Warto także zauważyć, że liczba tandemowych powtórzeń w C-końcowym odcinku łańcucha SpaA u szczepu szczepionkowego R32E11 jest dużo wyższa (13 tandemów) w porównaniu do izolatów terenowych od drobiu wodnego (7-9 tandemów). Możliwe jest zatem, że obserwowana przez niektórych terenowych lekarzy weterynarii ograniczona skuteczność wakcynacji gęsi preparatem Eryseng® wynika z dużych różnic antygenowych pomiędzy szczepem szczepionkowym a szczepami typu dzikiego. Pełne wyjaśnienie tego zagadnienia prowadzące do potwierdzenia lub odrzucenia przedstawionych przypuszczeń mogłyby wyjaśnić eksperymenty na modelach zwierzęcych. Uchiyama i wsp. (2014) w tego typu badaniach wykazali, że immunizacja zwierząt szczepem szczepionkowego

Koganei 65-0.15 serotyp 1a zawierającym II wariant SpaA (Ile257) chroni przez ciężkim przebiegiem choroby w następstwie zakażenia wysoce wirulentnymi szczepami posiadającymi I wariant SpaA (Met203, Ile257). Jednakże w tym przypadku różnica w obrębie domeny immunoprotekcyjnej pomiędzy szczepem szczepionkowym a terenowym dotyczyła tylko 1 aminokwasu.

### ***Rep-PCR i RAPD w typowaniu szczepów *Erysipelothrix* spp.***

Badanie zróżnicowania genetycznego szczepów i ich pokrewieństwa jest bardzo ważne z punktu widzenia badań epidemiologicznych oraz oceny potencjału chorobotwórczego drobnoustrojów. Jednymi z najczęściej stosowanych metod typowania bakterii są rep-PCR i RAPD. Wykonanie analizy przy użyciu każdej z nich nie wymaga znajomości sekwencji DNA, a amplifikację przeprowadza się z udziałem 1 startera.

W metodzie **rep-PCR** używa się starterów komplementarnych do stosunkowo krótkich i ewolucyjnie konserwatywnych sekwencji powtórzonych, występujących w genomie bakteryjnym w wielu kopiach. Liczba, rodzaj, jak i rozmieszczenie tych sekwencji w genomach jest charakterystyczne dla poszczególnych grup bakterii. Przykładem takich repetytywnych sekwencji są regiony REP (ang. *Repetitive Extragenic Palindromic Elements*), ERIC (ang. *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), BOX oraz stosowany w tych badaniach (GTG)<sub>5</sub> (Versalovic i wsp. 199, Masco i wsp. 2003). Amplifikacji podlegają odcinki DNA położone pomiędzy kolejnymi powtórzeniami; mają one różną długość, przez co, w następstwie rozdzielnia mieszaniny amplikonów w żelu, tworzą one wzór prążków charakterystyczny dla określonego gatunku i/lub szczepu bakterii. Profile elektroforetyczne rep-PCR jak również RAPD są uznawane za molekularny odcisk palca danego szczepu. Od czasu opracowania metody rep-PCR w 1991 r. przez Versalovic i wsp. (1991) była ona z powodzeniem stosowana do różnicowania wielu rodzajów i gatunków mikroorganizmów, zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Jednakże jej użycie do typowania bakterii z rodzaju *Erysipelothrix* nie zostało dotychczas opisane. Przeprowadzone badania wskazały, że zastosowanie startera (GTG)<sub>5</sub> umożliwia klarowną dyskryminację szczepów *E. rhusiopathiae* *spaA*-pozytywnych i *spaB*-pozytywnych, jednak nie pozwala na różnicowanie w obrębie izolatów *spaA*-pozytywnych, które zostały wyizolowane z >98% przypadków różycy. (GTG)<sub>5</sub>-rep-PCR wydaje się być także obiecującą metodą do szybkiej wstępnej identyfikacji gatunkowej izolatów *E. rhusiopathiae*. Inni autorzy również zaobserwowali większą przydatność tej metody do identyfikacji bakterii Gram-dodatnich niż do

różnicowania szczepów w obrębie gatunku. Svec i wsp. 2005 z powodzeniem zastosowali (GTG)<sub>5</sub>-rep-PCR do identyfikacji bakterii z rodzaju *Enterococcus*, a Braem i wsp. (2011) - do identyfikacji koagulazo-negatywnych gronkowców izolowanych od bydła. Starter (GTG)<sub>5</sub>-PCR okazał się także efektywny w różnicowaniu pałeczek kwasu mlekowego na poziomie gatunku i podgatunku (Gevers i wsp. 2001).

W metodzie **RAPD** polegającej na losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA, stosuje się krótkie, zazwyczaj 10- nukleotydowe startery o przypadkowej sekwencji nukleotydowej. Podobnie jak w przypadku rep-PCR starter przyłącza się do genomowego DNA w wielu miejscach, w wyniku czego podczas amplifikacji powstają produkty o różnej długości, które na żelu tworzą specyficzny wzór prążków (Power 1996). Do różnicowania szczepów *E. rhusiopathiae* zastosowano kilka starterów (M13, NK6, NK51, 1254), a najlepsze efekty uzyskano przy użyciu startera M13 komplementarnego do sekwencji mikrosatelitarnej (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3') faga M13. Wśród 52 izolatów terenowych wyróżniono 15 profili elektroforetycznych, w tym jedno-prążkowy unikatowy dla siedmiu z ośmiu szczepów serotypu 8 *spaA*-dodatnich. Wszystkie te szczepy odznaczały się wielolekoopornością. Wydaje się zatem, że charakterystyczny profil szczepów serotypu 8 może być wynikiem występowania w ich genomie zarówno sekwencji serotypowo-specyficznych jak i dodatkowego materiału genetycznego (być może plazmidowego) kodującego geny oporności (*lnuB*, *lsaE*, *tetM*). Unikatowe profile RAPD uzyskano także dla kilku pojedynczych szczepów, z których większość wyróżniała się na tle innych szczepów także ze względu na serotyp (484W serotyp 1a), sekwencję genu *spaA* (np. 849 serotyp 6) lub fenotypowy i genotypowy profil lekooporności (np. 1023 serotyp 2, 136 serotyp 5, 147 serotyp 5). Z drugiej strony należy zaznaczyć, że w wielu przypadkach szczepy mające takie same profile RAPD przynależały do odmiennych serotypów. Wyniki różnicowania badanych szczepów przy udziale startera NK51 są w pełni zgodne z wcześniejszymi rezultatami Okatani i wsp. (2000). Metoda NK51-RAPD nie pozwala na ujawnienie różnic genetycznych pomiędzy izolatami *E. rhusiopathiae*, jednak z uwagi na uzyskiwanie pojedynczych amplikonów o wielkości specyficznej dla gatunku i wysoką powtarzalność, z powodzeniem może być wykorzystywana do identyfikacji gatunkowej *E. rhusiopathiae*, a także *E. tonsillarum*. Jej przewagą na tle innych metod identyfikacji bakterii (np. sekwencjonowanie 16S rDNA lub genów metabolizmu podstawowego, spektrometria mas typu MALDI-TOF) jest prostota wykonania przy użyciu podstawowej aparatury będącej na wyposażeniu każdego laboratorium biologii molekularnej. Uzyskane w tej pracy wyniki RAPD z użyciem startera



NK6 nie pokrywają się z wynikami Okatani i wsp. (2000), którzy odnotowali istotny potencjał różnicujący tego startera w odniesieniu do izolatów *E. rhusiopathiae*. Amplifikacja w warunkach rekomendowanych przez Okatani i wsp. (2000) (niższa temp. przyłączenia starterów, tj. 34°C w porównaniu do zastosowanej 36-37,5°C) skutkowała brakiem produktów PCR dla większości izolatów badanych w tej pracy. Możliwe, że przyczyną tych rozbieżności było zastosowanie innych odczynników do PCR (innych producentów), w szczególności innej polimerazy. Jak wynika z przeprowadzonych w tej pracy badań wstępnych rodzaj użytej polimerazy znacząco wpływa na wynik RAPD.

Metoda RAPD, podobnie jak rep-PCR, jest łatwa w wykonaniu, tania i pozwala na uzyskiwanie wyników typowania dużej liczby szczepów w krótkim czasie (w porównaniu np. do PFGE, ang. *pulsed-field gel electrophoresis*). Jednakże jej podstawową wadą jest niska powtarzalność. Jest ona z reguły znacznie niższa niż w przypadku rep-PCR gdzie stosuje się dłuższe startery i wyższe temperatury ich przyłączenia (Dekowska 2011). Ten pogląd jest zgodny z wynikami badań własnych, podczas których zaobserwowano wysoką powtarzalność wzorów profili (GTG)<sub>5</sub>-rep-PCR, natomiast w przypadku metody RAPD, a szczególnie z użyciem startera NK6, odnotowano niski stopień powtarzalności wyników. Zjawisko to jest powszechnie opisywane w odniesieniu do profilowania genetycznego RAPD (Meunieri i Grimont 1993). Aby uzyskać odpowiednią ilość produktów PCR, w metodzie tej stosuje się niskie temperatury przyłączenia startera, co sprawia, że do wielu miejsc w obrębie genomu starter przyłącza się niespecyficznym. W takich warunkach nawet niewielkie różnice temperatury lub składu mieszaniny reakcyjnej mogą wpłynąć na końcowy wynik reakcji. Meunieri i Grimont (1993) wykazali, że profil RAPD jest zależny nawet od zastosowanego modelu termocyklera (różna stabilność temperatury, różna szybkość chłodzenia i nagrzewania). Przeprowadzone badania wykazały, że czynnikiem który miał największy wpływ na uzyskany wynik był okres przechowywania DNA genomowego oraz jego stężenia DNA. Do podobnych wniosków doszli Dobrzycka i Broda (2009), którzy wykazali, że jakość próbki DNA, a konkretnie jego czystość DNA, która jest zależna od metody izolacji, ma istotny wpływ na uzyskany wzór prążków; zaobserwowali, że liczba prążków w profilach RAPD wzrasta wraz ze spadkiem stężenia DNA. Jest to zbieżne z naszymi obserwacjami, gdyż w profilach RAPD uzyskiwanych przy użyciu starszych próbek DNA (w których materiał genetyczny zapewne uległ już częściowej degradacji) zwykle pojawiały się dodatkowe prążki, zazwyczaj o małej wielkości (poniżej 500 pz).

Opracowane protokoły RAPD (z udziałem starterów M13, NK6, 1254) mogą być wykorzystywane do oceny zróżnicowania genetycznego izolatów *E. rhusiopathiae*. Jednakże należy podkreślić, że nawet w przypadku protokołu M13-RAPD odznaczającego się największą siłą dyskryminacji szczepy przynależne do różnych serotypów (1b, 2, 5 i N) bądź różniące się sekwencją genu *spaA* (warianty SpaA) miały takie same profile RAPD. Stąd, w dochodzeniu epidemiologicznym dotyczącym różnicy u drobiu wodnego nie należy opierać się jedynie na wynikach metody RAPD. Wskazane jest także oznaczenie serotypu oraz analiza sekwencji genu *spaA* (określenie wariantu SpaA).



## 6. WNIOSKI

1. Nierównomierny rozkład przypadków różycy u gęsi w poszczególnych grupach wiekowych oraz okresach roku kalendarzowego sugeruje, że czynnikami predysponującymi do rozwoju infekcji jest zarówno wiek ptaków jak i czynniki klimatyczne (temperatura, wilgotność). Weryfikacja tej hipotezy wymaga przeprowadzenia obserwacji w dłuższym niż 3-letni okresie czasu (tak by liczebności poszczególnych grup były dostateczne) i przeprowadzenia analiz statystycznych uwzględniających wartości czynników atmosferycznych oraz wpływ ewentualnego występowania w pewnych okresach roku większej liczby stad gęsi, które automatycznie przekłada się na większą liczbę zachorowań.
2. Trzy zastosowane w tych badaniach metody identyfikacji szczepów *E. rhusiopathiae*, tj. spektrometria mas typu MALDI-TOF, testy real-time PCR oraz identyfikacja przy użyciu kart biochemicznych VITEK®2 GP, ze względu na krótki czas analizy (od kilkudziesięciu minut do 8 godzin) i stosunkowo łatwe wykonanie, są konkurencyjne dla metod identyfikacji opartych na analizie sekwencji DNA lub standardowym PCR. Każda z opisanych metod może być stosowana w diagnostyce różycy u drobiu, lecz pod względem czasu analizy i wiarygodności wyników najkorzystniej wypada spektrometria mas MALDI-TOF i real-time PCR.
3. Przedstawione w dysertacji opisy zmian sekcyjnych oraz wyniki dotyczące lekowrażliwości szczepów *E. rhusiopathiae* mogą okazać się pomocne lekarzom weterynarii w szybszym rozpoznaniu choroby i podjęciu decyzji o wdrożeniu właściwej antybiotykoterapii jeszcze przed uzyskaniem wyników analiz mikrobiologicznych. Natychmiastowe podjęcie leczenia jest szczególnie istotne w przypadku ostrego przebiegu choroby w stadzie, z uwagi na ryzyko ogromnych strat ekonomicznych.
4. Ze względu na wrażliwość wszystkich badanych szczepów na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe (penicylina, ampicylina, amoksyclina, amoksycylina z kwasem klawulanowym, ceftiofur) i fenikole (florfenikol), substancje przeciwdrobnoustrojowe z tych grup powinny być stosowane w leczeniu różycy u drobiu wodnego. W terapii pierwszego rzutu nie należy natomiast brać pod uwagę tetracyklin, fluorochinolonów, antybiotyków aminoglikozydowych i inhibitorów kwasu foliowego. Uzyskane dane z zakresu lekowrażliwości mogą być także

przydatne w leczeniu ludzi zakażonych odzwierzęcymi szczepami włoskowca różycy.

5. Wysoki odsetek szczepów *E. rhusiopathiae* opornych na enrofloksacynę oraz tetracyklinę wskazuje na konieczność ograniczenia stosowania antybiotyków z tych grup w hodowli drobiu wodnego w Polsce.
6. Dane nt. lekowrażliwości szczepów włoskowca różycy i występowania u nich genów oporności mogą być wykorzystane przez komitety ds. lekowrażliwości drobnoustrojów (np. EUCAST, CLSI) do opracowania poszerzonych rekomendacji (o amoksyclinę, amoksyclinę z kwasem klawulanowym, florfenikol, linkomycynę, tylozynę, tiamulinę, streptomycynę, spektynomycynę) dotyczących kategoryzacji szczepów *E. rhusiopathiae* na wrażliwe i odporne na poszczególne antybiotyki/chemioterapeutyki.
7. Określenie genotypowych profili wirulencji nie pozwala na zróżnicowanie szczepów *E. rhusiopathiae* izolowanych od drobiu wodnego pod względem ich potencjału chorobotwórczego. Ocena udziału poszczególnych genów wirulencji w patogenezie różycy wymaga przeprowadzenia pogłębionych badań opartych na analizie ekspresji genów lub wykorzystaniu szczepów *E. rhusiopathiae* typu *knockout* (z inaktywowanymi poszczególnymi genami wirulencji) w eksperymentach *in vitro* oraz na modelach zwierzęcych.
8. Zebrana w tych badaniach pula szczepów *E. rhusiopathiae* od drobiu wodnego wraz z wynikami dotyczącymi ich charakterystyki antygenowej (serotyp, rodzaj białka Spa i wariant antygeny SpaA) jest bazą do dalszych badań nad opracowaniem szczepionki przeciwko różycy dla gęsi i kaczek. Za koniecznością opracowania preparatu szczepionkowego na bazie rodzimych szczepów przemawiają także ujawnione w tych badaniach istotne różnice w strukturze antygeny SpaA pomiędzy szczepem szczepionkowym R32E11 a izolatami terenowymi.
9. Opracowane wybrane protokoły metody rep-PCR i RAPD mogą znaleźć zastosowanie w identyfikacji szczepów *E. rhusiopathiae* oraz w dochodzeniu epidemiologicznym.

## 7. PISMIENICTWO

1. Ali MQ, Kohler TP, Schulig L, Burchhardt G, Hammerschmidt S. Pneumococcal Extracellular Serine Proteases: Molecular Analysis and Impact on Colonization and Disease. *Front Cell Infect Microbiol* 2021, 11:763152.
2. Baida GE, Kuzmin NP. Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochim Biophys Acta* 1996, 1284(2):122-124.
3. Bailie WE, Bury RJ, Bicknell EJ, Knudtson WU. Case report. Erysipelothrix infection in goslings. *Avian Dis* 1970, 14(3):555-556.
4. Balducci E, Papi F, Capialdi DE, Del Bino L. Polysaccharides' Structures and Functions in Biofilm Architecture of Antimicrobial-Resistant (AMR) Pathogens. *Int J Mol Sci* 2023, 24(4):4030.
5. Beaudette FR, Hudson CB. An Outbreak of Acute Swine Erysipelas in Turkeys. *J Amer Vet Med Ass* 1936, 41:475-488.
6. Bender JS, Shen HG, Irwin CK, Schwartz KJ, Opriessnig T. Characterization of Erysipelothrix species isolates from clinically affected pigs, environmental samples, and vaccine strains from six recent swine erysipelas outbreaks in the United States. *Clin Vaccine Immunol* 2010, 17(10):1605-1611.
7. Bisgaard M, Nørrung V, Tornøe N. Erysipelas in poultry. Prevalence of serotypes and epidemiological investigations. *Avian Pathol* 1980, 9(3):355-362.
8. Bratberg AM. Selective adherence of Erysipelothrix rhusiopathiae to heart valves of swine investigated in an in vitro test. *Acta Vet Scand* 1981, 22(1):39-45.
9. Bierne H, Sabet C, Personnic N, Cossart P. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect* 2007, 9(10):1156-1166.
10. Biesiada-Drzazga B, Brodzik U, Wenczek E. Użytkowanie kaczek rzeźnych w Polsce, *Przegląd Hodowlany* 2018, 3:14-15.
11. Bisgaard M, Nørrung V, Tornøe N. Erysipelas in poultry. Prevalence of serotypes and epidemiological investigations. *Avian Pathol* 1980, 9(3):355-362.
12. Biuletyn Informacyjny Krajowej Rady Drobiarstwa, Izby Gospodarczej, Nr 1-2/2023
13. Bobrek K, Gawel A. Erysipelas Outbreaks in Flocks of Geese in Poland-Biochemical and Genetic Analyses of the Isolates. *Avian Dis* 2015, 59(3):436-439.
14. Bobrek K., Gawel A., Mazurkiewicz, M. Infections with Erysipelothrix rhusiopathiae in poultry flocks. *World's Poultry Science Journal* 2013, 69(4), 803-812.

15. Bobrek K, Nowak M, Borkowska J, Bobusia K, Gawęł A. An Outbreak of Erysipelas in Commercial Geese. *Pak Vet J* 2016, 36(3):251-257.
16. Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo MS, Yurek DA, Farley KA, Stockman BJ, Leclercq R. A new resistance gene, linB, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43(4):925-929.
17. Braem G, De Vlieghe S, Supré K, Haesebrouck F, Leroy F, De Vuyst L. (GTG)<sub>5</sub>-PCR fingerprinting for the classification and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine milk and teat apices: a comparison of type strains and field isolates. *Vet Microbiol* 2011, 147(1-2):67-74.
18. Breed F. *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Pasteurella avicida* in chickens. *Veterinary Medicine* 1943, 38:430-431.
19. Bricke R, J, Saif Y.M. Diseases of Poultry. Erysipelas, in: Calnek, B.W. (Ed.) *Diseases of poultry* 1997, 302-312 (Iowa State University Press).
20. Bricker JM, Saif YM. Use of a live oral vaccine to immunize turkeys against erysipelas. *Avian Dis* 1988, 32(4):668-73.
21. Brooke CJ, Riley TV. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *J Med Microbiol* 1999, 48(9):789-799.
22. CA-SFM/EUCAST - Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommendations 2021, 2021. <https://www.sfm-microbiologie.org/categorie-produit/livres/>
23. Cauwerts K, Decostere A, De Graef EM, Haesebrouck F, Pasmans F. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the erm(B) gene. *Avian Pathol* 2007, 36(5):395-399.
24. Cavallini M, Gazzola R, Metalla M, Vaianti L. The role of hyaluronidase in the treatment of complications from hyaluronic acid dermal fillers. *Aesthet Surg J* 2013, 33(8):1167-1174.
25. Chen YC, Chang MC, Chuang YC, Jeang CL. Characterization and virulence of hemolysin III from *Vibrio vulnificus*. *Curr Microbiol* 2004, 49(3):175-179.
26. Chuma T, Kawamoto T, Shahada F, Fujimoto H, Okamoto K. Antimicrobial susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs in Southern Japan with a modified agar dilution method. *J Vet Med Sci* 2010, 72(5):643-645.
27. CLSI Supplement Vet06. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated from Animals*. 1st ed. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2017.

28. CLSI Supplement M100. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018.
29. Conklin RH, Steele JH. Erysipelothrix infections. In: Steele JH (ed) CRC handbook. Series in zoonoses, vol 1 (section A). Boca Raton, FL, CRC Press. 1979:327-337.
30. Corstvet R. E., Howard C.: Evaluation of certain antibiotics in relation to the carrier state of Erysipelothrix rhusiopathiae (insidiosa) in turkeys. *J Am Vet Med Assoc J* 1974, 165: 744.
31. Coutinho TA, Imada Y, Barcellos DE, Oliveira SJ, Moreno AM. Phenotypic and molecular characterization of recent and archived Erysipelothrix spp. isolated from Brazilian swine. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011, 69(2):123-129.
32. Crespo R, Bland M, Opriessnig T. Use of Commercial Swine Live Attenuated Vaccine to Control an Erysipelothrix rhusiopathiae Outbreak in Commercial Cage-Free Layer Chickens. *Avian Dis.* 2019, 63(3):520-524.
33. Davin-Regli A, Abed Y, Charrel RN, Bollet C, de Micco P. Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. *Res Microbiol* 1995, 146(7):561-568.
34. Derakhshanfa R, A, Ghanbarpour, R, Yazdani, S. A pathologic study on experimental Erysipelothrix rhusiopathiae cellulitis in broiler chickens. *Veterinarski Arhiv* 2004, 74: 217-224.
35. dane Zakładu Doświadczalnego w Kołudzie Wielkiej, [www.koluda.pl](http://www.koluda.pl)
36. Dec M, Łagowski D, Nowak T, Pietras-Ożga D, Herman K. Serotypes, Antibiotic Susceptibility, Genotypic Virulence Profiles and SpaA Variants of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Strains Isolated from Pigs in Poland. *Pathogens* 2023, 12(3):409.
37. Dec M, Nowaczek A, Stępień-Pyśniak D, Wawrzykowski J, Urban-Chmiel R. Identification and antibiotic susceptibility of lactobacilli isolated from turkeys. *BMC Microbiol* 2018, 18(1):168.
38. Dec M, Stępień-Pyśniak D, Puchalski A, Hauschild T, Pietras-Ożga D, Ignaciuk S, Urban-Chmiel R. Biodiversity of Ligilactobacillus salivarius Strains from Poultry and Domestic Pigeons. *Animals (Basel)* 2021, 11(4):972.
39. Dekowska A. Zastosowanie metod biologii molekularnej w diagnostyce bakterii z rodzaju Alicyclobacillus. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego* 2011, 66(2):34-43.
40. Dhillon AS, Winterfield RW, Thacker HL, Richardson JA. Erysipelas in domestic white Pekin ducks. *Avian Dis* 1980, 24(3):784-787.



41. Ding Y, Zhu D, Zhang J, Yang L, Wang X, Chen H, Tan C. Virulence determinants, antimicrobial susceptibility, and molecular profiles of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from China. *Emerg Microbes Infect* 2015, 4(11):e69.
42. Dobrzycka A, Broda Z. Wpływ metody izolacji DNA na wynik analizy podobieństwa genetycznego wykonanej techniką RAPD. *Biotechnologia* 2009, 3(86):182-191.
43. Egervärn M, Roos S, Lindmark H. Identification and characterization of antibiotic resistance genes in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Microbiol* 2009, 107(5):1658-1668.
44. Eisenberg T, Mühldorfer K, Erhard M, Fawzy A, Kehm S, Ewers C, Semmler T, Blom J, Lipski A, Rau J, Kämpfer P, Glaeser SP. *Erysipelothrix anatis* sp. nov., *Erysipelothrix aquatica* sp. nov. and *Erysipelothrix urinaevulpis* sp. nov., three novel species of the genus, and emended description of *Erysipelothrix*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2022, 72(7).
45. El-Ghany WAA. A review article on avian Erysipelas infection: An occupational disease of one health importance. *Veterinary Integrative Sciences*, 2023, 21(2):481-494.
46. Eriksson H, Brännström S, Skarin H, Chirico J. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from laying hens and poultry red mites (*Dermanyssus gallinae*) from an outbreak of erysipelas. *Avian Pathol* 2010, 39(6):505-509.
47. Eriksson H, Bagge E, Båverud V, Fellström C, Jansson DS. *Erysipelothrix rhusiopathiae* contamination in the poultry house environment during erysipelas outbreaks in organic laying hen flocks. *Avian Pathol* 2014, 43(3):231-237.
48. Farmakopea Polska, Wydanie V Tom I, 1990. Warszawa: Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich.
49. Fidalgo SG, Longbottom CJ, Rjley TV. Susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to antimicrobial agents and home disinfectants. *Pathology* 2002, 34(5):462-465.
50. Fidalgo, SG, Riley TV. Detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in clinical and environmental samples. *Methods Mol. Biol* 2014, 268:199205.
51. Forde TL, Kollanandi Ratheesh N, Harvey WT, Thomson JR, Williamson S, Biek R, Opriessnig T. Genomic and Immunogenic Protein Diversity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Isolated From Pigs in Great Britain: Implications for Vaccine Protection. *Front Microbiol* 2020, 11:418.
52. Gevers D, Huys G, Swings J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett* 2001, 205(1):31-36.

53. Gosink KK, Mann ER, Guglielmo C, Tuomanen EI, Masure HR. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2000, 68(10):5690-5695.
54. Graham R, Levine ND, Hester HR. *Erysipelothrix rhusiopathiae* associated with a fatal disease in ducks. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1939, 95:211-216.
55. Gu J, Li YX, Xu CW, Xie XJ, Li P, Ma GX, Lei CW, Liu JX, Zhang AY. Genome sequence of multidrug-resistant *Erysipelothrix rhusiopathiae* ZJ carrying several acquired antimicrobial resistance genes. *J Glob Antimicrob Resist* 2020;21:13-15.
56. Harada T, Ogawa Y, Eguchi M, Shi F, Sato M, Uchida K, Nakayama H, Shimoji Y. Phosphorylcholine and SpaA, a choline-binding protein, are involved in the adherence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to porcine endothelial cells, but this adherence is not mediated by the PAF receptor. *Vet Microbiol* 2014, 172(1-2):216-222.
57. Hess C, Bilic I, Jandreski-Cvetkovic, D, Hess M. Antimicrobial Dilution Susceptibility Testing of *Erysipelothrix rhusiopathiae* According to CLSI Document VET06 Reveals High Resistance against Penicillin G, Erythromycin and Enrofloxacin. *Poultry* 2023, 2(1):54-62.
58. Hoepers PG, dos Reis TFM, Mendonça, EP, Rossi DA, Koerich PK, França TVJ, Zuffo PJ, Edson CV jr, Fonseca BB. First outbreak reported caused by *Erysipelothrix* species strain 2 in turkeys from poultry-producing farms in Brazil. *Ann Microbiol* 2019, 69:1211–1215.
59. Hu YF, Zhao D, Yu XL, Hu YL, Li RC, Ge M, Xu TQ, Liu XB, Liao HY. Identification of Bacterial Surface Antigens by Screening Peptide Phage Libraries Using Whole Bacteria Cell-Purified Antisera. *Front Microbiol* 2017, 26;8:82.
60. Hynes WL, Walton SL. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2000, 183(2):201-207.
61. Imada Y, Goji N, Ishikawa H, Kishima M, Sekizaki T. Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. *Infect Immun* 1999, 67(9):4376-4382.
62. Imada Y, Takase A, Kikuma R, Iwamaru Y, Akachi S, Hayakawa Y. Serotyping of 800 strains of *Erysipelothrix* isolated from pigs affected with erysipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping. *J Clin Microbiol* 2004, 42(5):2121-2126.
63. Ingebritson AL, Roth JA, Hauer PJ. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: association of Spa-type with serotype and role in protective immunity. *Vaccine* 2010, 28(13):2490-6.
64. Janowska I, Krasnodębska-Depta A, Bieszka R. Przypadek różycy u gęsi. *Medycyna Weterynaryjna* 1978, 8:471-472.

65. Janßen T, Voss M, Kühl M, Semmler T, Philipp HC, Ewers C. A combinational approach of multilocus sequence typing and other molecular typing methods in unravelling the epidemiology of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains from poultry and mammals. *Vet Res* 2015, 46(1):84.
66. Jaworowski M, Maciejczuk H. Przypadek różycy indyków. *Med Weter* 1971, 27:674.
67. Jordan FTW, Bisgaard M. "Erysipelothrix rhusiopathiae – różycza", str. 257-261 w: "Choroby drobiu", red. A. Wieliczko rozdział wyd. I polskie, 2011.
68. Karambelkar P, Rojulpote C, Borja AJ, Youngs C, Bhattaru A. An Unusual Case of Tricuspid Valve Infective Endocarditis Caused by *Erysipelothrix Rhusiopathiae*. *Cureus* 2020, 12(5):e7942.
69. Kiuchi A, Hara M, Pham HS, Takikawa K, Tabuchi K. Phylogenetic analysis of the *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Erysipelothrix tonsillarum* based upon 16S rRNA. *DNA Seq* 2000, 11(3-4):257-60.
70. Klonecki A. – wywiad z Polskim Radiu z 2021 r. <https://www.polskieradio24.pl/42/273/Artykul/2853233,Gesina-polskim-hitem-eksportowym-W-tym-roku-warunki-nie-sprzyjaja-hodowli>
71. Kobayashi N, Alam M, Nishimoto Y, Urasawa S, Uehara N, Watanabe N. Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. *Epidemiol Infect* 2001, 126(2):197-204.
72. Knap JP. Różycza ludzi w województwie lubelskim w latach 2005–2008 na tle jej sytuacji epidemiologicznej w Polsce. Próba analizy. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu* 2013, 19(2):153-157.
73. Książkiewicz J. The role and importance of native varieties of geese included in the genetic resources conservation program. *Wiadomości Zootechniczne* 2006, XLIV(4):34-38.
74. Kuliś M., Przypaśniak J, Dach-Oleszek RWI, Tylkowska-Siek A. Statistics Poland, Agriculture Department, Farm animals in 2021, <https://stat.gov.pl/>
75. Kurian A, Neumann EJ, Hall WF, Marks D. Serological survey of exposure to *Erysipelothrix rhusiopathiae* in poultry in New Zealand. *N Z Vet J* 2012, 60(2):106-9.
76. Lachmann PG, Deicher H. Solubilization and characterization of surface antigenic components of *Erysipelothrix rhusiopathiae* T28. *Infect Immun* 1986, 52(3):818-22.
77. Lee SE, Ryu PY, Kim SY, Kim YR, Koh JT, Kim OJ, Chung SS, Choy HE, Rhee JH. Production of *Vibrio vulnificus* hemolysin in vivo and its pathogenic significance. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 324(1):86-91.

78. Li Y, Zou Y, Xia Y, Bai J, Wang X, Jiang P. Proteomic and Transcriptomic Analyses of Swine Pathogen *Erysipelothrix rhusiopathiae* Reveal Virulence Repertoire. *PLoS One* 2016, 11(8):e0159462.
79. Li XS, Dong WC, Wang XM, Hu GZ, Wang YB, Cai BY, Wu CM, Wang Y, Du XD. Presence and genetic environment of pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance gene *lsa(E)* in enterococci of human and swine origin. *J Antimicrob Chemother* 2014, 69(5):1424-1426.
80. Łagowski D, Gnat S, Nowakiewicz A, Osińska M. Assessment of the subtilisin gene profile in *Trichophyton verrucosum* isolated from human and animal dermatophytoses in two-stage multiplex PCR. *J Appl Microbiol* 2021, 131(1):300-306.
81. Malanowska T. Przypadek różycy u kury. *Med Weter* 1961, 17:554.
82. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Piessens J, Goossens H. Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49(11):4798-4800.
83. Mann S. Cell wall composition of *Listeria monocytogenes* and *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Zentralbl Bakteriolog Orig* 1969, 209(4):510-522.
84. Masco L, Huys G, Gevers D, Verbrugghen L, Swings J. Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting. *Syst Appl Microbiol* 2003, 26(4):557-563.
85. Masco L, Van Hoorde K, De Brandt E, Swings J, Huys G. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* strains from humans, animals and probiotic products. *J Antimicrob Chemother* 2006, 58(1):85-94.
86. Meier SM, Kottwitz J, Keller DI, Albin S. *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection by geese to human transmission. *BMJ Case Rep* 2021, 14(5):e240073.
87. Meunier JR, Grimont PA. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res Microbiol* 1993, 144(5):373-379.
88. McNeil M, Gerber PF, Thomson J, Williamson S, Opriessnig T. Serotypes and Spa types of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from British pigs (1987 to 2015). *Vet J* 2017, 225:13-15.
89. Muller HE, Krasemann C. Immunität gegen *Erysipelothrix rhusiopathiae*-Infektion durch aktive Immunisierung mit homologer Neuraminidase. *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol* 1976, 151(3):237-241.
90. Nakato H, Shinomiya K, Mikawa H. Adhesion of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to cultured rat aortic endothelial cells. Role of bacterial neuraminidase in the induction of arteritis. *Pathol Res Pract* 1987, 182(2):255-260.

91. Nazierbieke W, Liu Z, Li K, Chen Y, Borrathybay E. [Cloning and expression of N-terminal protective domain of spaA gene from *Erysipelothrix rhusiopathiae* C43311]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2008, 48(2):207-212.
92. Nicholson TL, Bayles DO. Comparative virulence and antimicrobial resistance distribution of *Streptococcus suis* isolates obtained from the United States. *Front Microbiol* 2022, 10;13:1043529.
93. Norrung V. Studies on *Erysipelothrix insidiosa* S. *rhusiopathiae*. 1. Morphology, cultural features, biochemical reactions and virulence. *Acta Vet Scand* 1970, 11(4):577-585.
94. Ogawa Y, Ooka T, Shi F, Ogura Y, Nakayama K, Hayashi T, Shimoji Y. The genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of firmicutes and the organism's intracellular adaptations. *J Bacteriol* 2011, 193(12):2959-2971.
95. Ogawa Y, Shiraiwa K, Ogura Y, Ooka T, Nishikawa S, Eguchi M, Hayashi T, Shimoji Y. Clonal Lineages of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Responsible for Acute Swine Erysipelas in Japan Identified by Using Genome-Wide Single-Nucleotide Polymorphism Analysis. *Appl Environ Microbiol* 2017, 83(11):e00130-17.
96. Ogawa Y, Shiraiwa K, Nishikawa S, Eguchi M, Shimoji Y. Identification of the Chromosomal Region Essential for Serovar-Specific Antigen and Virulence of Serovar 1 and 2 Strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Infect Immun* 2018, 86(9):e00324-18.
97. Oh BK, Kim HA, Lee SJ, Lee SH, Lee JY, Kim BJ, Kim BS, Kang JH, Kim JW, Choi HI, Sung KC. An Unusual Case of Aortic and Mitral Valve Involved *Erysipelothrix rhusiopathiae*-Induced Endocarditis: Rare Zoonosis with Devastating Outcome. *J Cardiovasc Imaging* 2021, 29(4):387-389.
98. Okatani AT, Hayashidani H, Takahashi T, Taniguchi T, Ogawa M, Kaneko K. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Erysipelothrix* spp. *J Clin Microbiol* 2000, 38(12):4332-4336.
99. Opriessnig T, Forde T, Shimoji Y. *Erysipelothrix* Spp.: Past, Present, and Future Directions in Vaccine Research. *Front Vet Sci* 2020, 7:174.
100. Pal N, Bender JS, Opriessnig T. Rapid detection and differentiation of *Erysipelothrix* spp. by a novel multiplex real-time PCR assay. *J Appl Microbiol* 2010, 108(3):1083-1093.
101. Pattison, M., McMullin, P., Bradbury, J., Alexander, D., 2008. Erysipelas. In: *Poultry Diseases*, (6th edition). Saunders Elsevier, Philadelphia, s. 304-307.
102. Power EG. RAPD typing in microbiology-a technical review. *J Hosp Infect* 1996, 34(4):247-265.

103. Polner T, Gajdács Gy, Kemenes F, Kucsera, Gy. Heavy losses among geese due to swine erysipelas. *Magyar Allatorvosok Lapja* 1972, 27:341-344.
104. Rzewuska M, Żbikowski A, Sałamaszyńska-Guz A, Karpińska E, Szeleszczuk P, Binek M. Właściwości fenotypowe szczepów włoskowca różycy wyizolowanych od gęsi. W: Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem embriopatologii i okresu okołolęgowego. F.P.H. „Elma”, Wrocław 2010, s. 173-178
105. Saif YM, Bricker JM. Erysipelas. W: Fadlly A. M., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L.K.: *Diseases of Poultry*, Blackwell Publishing, 2008, s. 909-922
106. Sawada T, Takahashi T. Cross protection of mice and swine given live-organism vaccine against challenge exposure with strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* representing ten serovars. *Am J Vet Res* 1987, 48(1):81-84.
107. Sawicka-Durkalec A, Tomczyk G, Gerilovych I, Kurska O. Molecular Detection and Phylogenetic Analysis of *Riemerella anatipestifer* in Poultry and Wild Geese in Poland. *Pathogens* 2023, 12(2):256.
108. Shen HG, Bender JS, Opriessnig T. Identification of surface protective antigen (spa) types in *Erysipelothrix* reference strains and diagnostic samples by spa multiplex real-time and conventional PCR assays. *J Appl Microbiol* 2010, 109(4):1227-1233.
109. Shi F, Harada T, Ogawa Y, Ono H, Ohnishi-Kameyama M, Miyamoto T, Eguchi M, Shimoji Y. Capsular polysaccharide of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, and its modification with phosphorylcholine. *Infect Immun* 2012, 80(11):3993-4003.
110. Shi F, Ogawa Y, Sano A, Harada T, Hirota J, Eguchi M, Oishi E, Shimoji Y. Characterization and identification of a novel candidate vaccine protein through systematic analysis of extracellular proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Infect Immun* 2013, 81(12):4333-4340.
111. Shimoji Y, Yokomizo Y, Sekizaki T, Mori Y, Kubo M. Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. *Infect Immun* 1994, 62(7):2806-2810.
112. Shimoji Y, Yokomizo Y, Mori Y. Intracellular survival and replication of *Erysipelothrix rhusiopathiae* within murine macrophages: failure of induction of the oxidative burst of macrophages. *Infect Immun* 1996, 64(5):1789-1793.
113. Shimoji Y. Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. *Microbes Infect* 2000, 2(8):965-972.

114. Shimoji Y, Asato H, Sekizaki T, Mori Y, Yokomizo Y. Hyaluronidase is not essential for the lethality of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in mice. *J Vet Med Sci* 2002, 64(2):173-176.
115. Shimoji Y, Ogawa Y, Osaki M, Kabeya H, Maruyama S, Mikami T, Sekizaki T. Adhesive surface proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* bind to polystyrene, fibronectin, and type I and IV collagens. *J Bacteriol* 2003, 185(9):2739-2748.
116. Shimoji Y, Shiraiwa K, Tominaga H, Nishikawa S, Eguchi M, Hikono H, Ogawa Y. Development of a Multiplex PCR-Based Assay for Rapid Serotyping of *Erysipelothrix* Species. *J Clin Microbiol* 2020, 58(6):e00315-20.
117. Shimoji Y, Bito M, Shiraiwa K, Ogawa Y, Nishikawa S, Eguchi M. Disassociation of Spa type and serovar of an *Erysipelothrix rhusiopathiae* serovar 6 strain isolated from a diseased pig. *J Vet Diagn Invest* 2019, 31(3):488-491.
118. Shiraiwa K, Ogawa Y, Nishikawa S, Eguchi M, Shimoji Y. Identification of serovar 1a, 1b, 2, and 5 strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* by a conventional gel-based PCR. *Vet Microbiol* 2018, 225:101-104.
119. Schmucker S, Hofmann T, Sommerfeld V, Huber K, Rodehutschord M, Stefanski V. Immune parameters in two different laying hen strains during five production periods. *Poult Sci* 2021, 100(11):101408.
120. Si H, Zhang WJ, Chu S, Wang XM, Dai L, Hua X, Dong Z, Schwarz S, Liu S. Novel plasmid-borne multidrug resistance gene cluster including *lsa(E)* from a linezolid-resistant *Enterococcus faecium* isolate of swine origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2015, 59(11):7113-7116.
121. Stackebrandt E, Reboli AC, Farrar WE. The Genus *Erysipelothrix*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. & Stackebrandt, E. (eds), *The Prokaryotes*. Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria, Third edition. 2006, New York: Springer Science + Business Media, LLC, s. 492-510.
122. Stackebrandt E. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Online © 2015 Bergey's Manual Trust. This article is © 2009 Bergey's Manual Trust. Published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust. Svec P, Vancanneyt M, Seman M, Snauwaert C, Lefebvre K, Sedláček I, Swings J. Evaluation of (GTG)<sub>5</sub>-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol Lett* 2005, 247(1):59-63.
123. Stephenson EH, Berman DT. Isolation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* from tonsils of apparently normal swine by two methods. *Am J Vet Res* 1978, 39(1):187-188.

124. Svec P, Vancanneyt M, Seman M, Snauwaert C, Lefebvre K, Sedláček I, Swings J. Evaluation of (GTG)5-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol Lett* 2005, 247(1):59-63.
125. Swan R, Lindsey M. Treatment and control by vaccination of erysipelas in farmed emus (*Dromaius novohollandiae*). *Austr Vet J* 1998, 76:325-327.
126. Taguchi Y, Shiraiwa K, Ogawa Y, Oi T, Nakamura S, Okumura J, Shimoji Y. An invasive infection with an unusual spaB-possessing *Erysipelothrix rhusiopathiae* in a human. *J Med Microbiol* 2020, 69(10):1249-1252.
127. Takahashi T, Takagi M, Sawada T, Seto K. Cross protection in mice and swine immunized with live erysipelas vaccine to challenge exposure with strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* of various serotypes. *Am J Vet Res* 1984, 45(10):2115-2118.
128. Takahashi T, Hirayama N, Sawada T, Tamura Y, Muramatsu M. Correlation between adherence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains of serovar 1a to tissue culture cells originated from porcine kidney and their pathogenicity in mice and swine. *Vet Microbiol* 1987, 13(1):57-64.
129. Takahashi T, Sunama P, Satra J, Cholsindhu N, Kongthon S, Jitnupong W, Yamamoto K, Kijima M, Furuuchi S. Serotyping and pathogenicity of *Erysipelothrix* strains isolated from tonsils of slaughter pigs in Thailand. *J Vet Med Sci* 1999, 61(9):1007-1101.
130. To H, Nagai S. Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Clin Vaccine Immunol* 2007, 14(7):813-20.
131. To H, Someno S, Nagai S, Koyama T, Nagano T. Immunization with truncated recombinant protein SpaC of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain 715 serovar 18 confers protective immunity against challenge with various serovars. *Clin Vaccine Immunol* 2010, 17(12):1991-1997.
132. Torriani S, Zapparoli G, Dellaglio F. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65(10):4351-4356.
133. Uchiyama M, Yamamoto K, Ochiai M, Yamamoto T, Hirano F, Imamura S, Nagai H, Ohishi K, Horiuchi N, Kijima M. Prevalence of Met-203 type spaA variant in *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates and the efficacy of swine erysipelas vaccines in Japan. *Biologicals* 2014, 42(2):109-113.
134. Utnik-Banaś K, Źmija J. The Geese Market in Poland. *Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu* 2018, XX(3).



135. Vakulenko SB, Donabedian SM, Voskresenskiy AM, Zervos MJ, Lerner SA, Chow JW. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47(4):1423-1426.
136. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991, 19(24):6823-6831.
137. Wang Q, Chang BJ, Riley TV. Erysipelothrix rhusiopathiae. *Vet Microbiol* 2010, 140(3-4):405-417.
138. Wang Y, Li J, Zhang A, Zhu W, Zhang Q, Xu Z, Yan S, Sun X, Chen H, Jin M. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals potential virulence factors of Erysipelothrix rhusiopathiae. *J Proteomics* 2017, 160:28-37.
139. Wendlandt S, Li B, Ma Z, Schwarz S. Complete sequence of the multi-resistance plasmid pV7037 from a porcine methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Vet Microbiol* 2013,166(3-4):650-654.
140. Wood RL. A selective liquid medium utilizing antibiotics for isolation of Erysipelothrix insidiosa. *Am J Vet Res* 1965, 26(115):1303-1308.
141. Wood R. Survival of Erysipelothrix rhusiopathiae in soil under various environmental conditions. *Cornell Vet* 1973, 63:390-410
142. Wood RL, Harrington R Jr. Serotypes of Erysipelothrix rhusiopathiae isolated from swine and from soil and manure of swine pens in the United States. *Am J Vet Res* 1978, 39(11):1833-1840.
143. Wood RL, Booth GD, Cutlip RC. Susceptibility of vaccinated swine and mice to generalized infection with specific serotypes of Erysipelothrix rhusiopathiae. *Am J Vet Res* 1981, 42(4):608-614.
144. Wood RL. Erysipelas. 1992, In: Diseases of Swine, 7 ed. (Leman, A., Straw, B., Mengeling, W., D'Allaire, S. and Taylor, D. eds.), Iowa State University Press, Ames, s. 475-486.
145. Wu C, Lv C, Zhao Y, Zhu W, Liu L, Wang T, Kang C, Yang Y, Sun X, Zhang Q, Jin M. Characterization of Erysipelothrix rhusiopathiae Isolates from Diseased Pigs in 15 Chinese Provinces from 2012 to 2018. *Microorganisms* 2021, 9(12):2615.
146. Wu C, Zhang Z, Kang C, Zhang Q, Zhu W, Zhang Y, Zhang H, Xiao J, Jin M. The C-Terminal Repeat Units of SpaA Mediate Adhesion of Erysipelothrix rhusiopathiae to Host Cells and Regulate Its Virulence. *Biology (Basel)* 2022, 11(7):1010.

147. Yamamoto K, Kijima M, Yoshimura H, Takahashi T. Antimicrobial susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs with swine erysipelas in Japan, 1988-1998. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2001, 48(2):115-126.
148. Yang L, Zhu Y, Peng Z, Ding Y, Jie K, Wang Z, Peng Y, Tang X, Wang X, Chen H, Tan C. Comparative Genome Analysis of a Pathogenic *Erysipelothrix rhusiopathiae* Isolate WH13013 from Pig Reveals Potential Genes Involve in Bacterial Adaptions and Pathogenesis. *Vet Sci* 2020, 7(2):74.
149. Zautner AE, Tersteegen A, Schiffner CJ, Đilas M, Marquardt P, Riediger M, Delker AM, Mäde D, Kaasch AJ. Human *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection via bath water - case report and genome announcement. *Front Cell Infect Microbiol* 2022, 12:981477.
150. Zhang A, Xu C, Wang H, Lei C, Liu B, Guan Z, Yang C, Yang Y, Peng L. Presence and new genetic environment of pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance gene *lsa(E)* in *Erysipelothrix rhusiopathiae* of swine origin. *Vet Microbiol* 2015, 177(1-2):162-7.
151. Zhu W, Cai C, Wang Y, Li J, Wu C, Kang C, Sun X, Jin M. Characterization of roles of SpaA in *Erysipelothrix rhusiopathiae* adhesion to porcine endothelial cells. *Microb Pathog* 2017a, 113:176-180.
152. Zhu W, Zhang Q, Li J, Wei Y, Cai C, Liu L, Xu Z, Jin M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase acts as an adhesin in *Erysipelothrix rhusiopathiae* adhesion to porcine endothelial cells and as a receptor in recruitment of host fibronectin and plasminogen. *Vet Res* 2017b, 48(1):16.
153. Zhu W, Cai C, Huang J, Liu L, Xu Z, Sun X, Jin M. Characterization of pathogenic roles of two *Erysipelothrix rhusiopathiae* surface proteins. *Microb Pathog* 2018, 114:166-168.
154. Zhu W, Cai C, Li J, Zhang Q, Huang J, Jin M. Characterization of protective antigen CbpB as an adhesin and a plasminogen-binding protein of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Res Vet Sci* 2019, 124:352-356.
155. Zhou K, Zhu D, Tao Y, Xie L, Han L, Zhang Y, Sun J. New genetic context of *lnu(B)* composed of two multi-resistance gene clusters in clinical *Streptococcus agalactiae* ST-19 strains. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019, 8:117.
156. Żbikowski A, Karpińska E, Rzewuska M, Szeleszczuk P. Różycza u drobiu. *Życie Weterynaryjne* 2011, 86(5):357-360.



### Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data .....27.06.2023r.....

Podpis promotora .....*Martha Dev*.....

### Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami,
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego,
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data .....27.06.2023r.....

Podpis autora .....*Tomasz Worak*.....