



Molekulska karakterizacija APEC sojeva *E. coli* izdvojenih na farmama peradi Republike Hrvatske

Molecular characterization of APEC strains isolated from poultry farms in Croatia

Lozica, L.^{1*}, Ž. Gottstein¹, D. Horvatek Tomić¹

Sažetak

Kolibaciloza uzrokovana ptičjim patogenim sojevima bakterije *Escherichia coli* (APEC) stvara velike gospodarske gubitke u intenzivnoj peradarskoj proizvodnji. Često nastaje kao sekundarna infekcija zbog imunosupresije uzrokovane drugim bolestima. Osim toga, neadekvatni zoohigijenski uvjeti i drugi stresni čimbenici kao što je nesivost mogu utjecati na pojavu bolesti. S obzirom na velike štete koje uzrokuje te postojanje zoonotskog potencijala, utvrđivanje proširenosti APEC sojeva i njihova tipizacija, može pomoći u provođenju nužnih profilaktičkih mjera kao što je cijepljenje. U ovom su istraživanju izdvojeni sojevi *E. coli* iz lešina dostavljenih na patomorfološku pretragu s farmi peradi koje imaju probleme s kolibacilozom. Iz bakterijskih je kultura izdvojena ukupna DNK i određena pripadnost filogenetskim skupinama (A, B1, B2, D) dokazivanjem gena *chuA*, *yjaA* i ulomka DNK TspE4.C2 primjenom PCR reakcije. Utvrđeno je i postojanje pojedinih gena virulencije koji mogu biti pokazatelj patogenosti sojeva. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da postoji velika raznovrsnost filogenetskih skupina *E. coli* što otežava provođenje imunoprofilakse, te su utvrđene razlike u prevalenciji određenih gena virulencija između pojedinih sojeva.

Abstract

Aavian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) can cause serious losses in poultry production. It often begins as a secondary infection caused by immunosuppression. Moreover, inadequate zoohygienic conditions and stress, such as the laying period, may cause problems. Due to the great losses and possible zoonotic potential of APEC, molecular characterization and determination of phylogenetic diversity is very important, for it can help in conducting prophylactic measures. During this epizootiological survey, poultry carcasses were brought from farms for pathomorphological examination due to the suspicion of colibacillosis. Afterwards *E. coli* strains were isolated and molecular characterization was undertaken. Some of the most frequent virulence genes which may be indicators of strain pathogenicity were determined. The results showed contamination with different *E. coli* phylogroups according to phylogenetic group markers (*chuA*, *yjaA*, TspE4.C2), with a predominant finding of B2 phylogroup. In addition, some differences in the frequency of certain virulence genes between isolated strains were determined, which could affect the efficiency of immunoprophylactic measures.

Ključne riječi: *E. coli*, APEC, phylogenetic diversity, PCR

Key words: *E. coli*, APEC, filogenetska raznolikost, lančana reakcija polimerazom

UVOD

Kolibaciloza je svaka lokalizirana ili sustavna zarazna bolest uzrokovana gram-negativnom bakterijom *Escherichia coli* koja naseljava sluznične površine (Biđin, 2008.). Patogeni sojevi *E. coli* dijele se na crijevne i izvancrijevne. Sojevi bakterije *E. coli* koji uzrokuju izvancrijevne infekcije (engl. *extraintestinal pathogenic E. coli*, ExPEC) obično su dio fiziološke crijevne mikroflore zdravih životinja. Patogeni sojevi posjeduju čimbenike virulencije pomoću kojih naseljavaju površinu sluznica i uzrokuju bolest. ExPEC sojevi dijele se u četiri patovara – ptičji patogeni sojevi *E. coli* (engl. *avian pathogenic E. coli*, APEC), septikemijski sojevi *E. coli* (engl. *septicaemia associated E. coli*, SePEC), uropatogeni sojevi *E. coli* (engl. *uropathogenic E. coli*, UPEC) i sojevi *E. coli* uzročnici meningitisa novorođenčadi (engl. *newborn meningitic E. coli*, NMEC) (Moulin-Schouleur i sur., 2007.; Antão, 2010.; Mellata, 2013.). Ptičji patogeni sojevi *E. coli* uzrokuju različite lokalizirane i sistemske infekcije kao što su upala zračnih vrećica, koliseptikemija, koligranulomatoza, perikarditis, peritonitis, sinovitis, salpingitis, upala žumanjčane vrećice i sindrom otečene glave. Bolest najčešće započinje infekcijom dišnog sustava u peradi stare 3 do 12 tjedana, nakon čega slijedi sistemska infekcija karakterizirana fibrinoznim lezijama i septikemijom koje dovode do uginuća (Moulin-Schouleur i sur., 2007.; Schouleur i sur., 2012.), ali do zaraze može doći i ascendentno, putem reproduktivnog trakta (Landman i sur., 2014.). Zaražavanju dišnog sustava često prethodi infekcija mikoplazmama ili nekim virusom, čime on postaje osjetljiviji (Cordoni i sur., 2016.). Razlog početka infekcije upalom zračnih vrećica jest povećana osjetljivost zbog smanjene količine makrofaga u tom području (Antão, 2010.; Mellata, 2013.), odnosno smanjene sposobnosti fagocitoze makrofaga i neutrofila (Matthijs i sur., 2009.). Isto tako, oštećenje tkiva dišnog sustava virusima karakterizirano je gubitkom cilija i trepetljivih stanica, čime se smanjuje cilijarna aktivnost i čišćenje mukocilijarnog sekreta, te oštećenjem epitela koje omogućuje lakše prijanjanje bakterija (Matthijs i sur., 2009.). Osim toga, neprikladni zoohigijenski uvjeti, stresni čimbenici i soj pilića utječu na osjetljivost zračnih vrećica prema bakteriji.

Kolibaciloza često nastaje i kao sekundarna infekcija zbog imunosupresije uzrokovane drugim bolestima kao što su zarazna bolest burze, zarazna anemija pilića ili Marekova bolest. U tom slučaju mogu je uzrokovati i komenzalni sojevi *E. coli* što objašnjava sve češću pojavu A-sojeva (Dissanayake i sur., 2014.).

Serotipizacija i određivanje seroloških skupina dosad je već provjerena metoda tipizacije APEC sojeva. Oni najčešće pripadaju serovarovima O1, O2, O18 i O78 (Moulin-Schouleur i sur., 2007.; Johnson i sur., 2008.; Ewers i sur., 2009.). Sojeve *E. coli* može se podijeliti u četiri filogenetske skupine: A, B1, B2 i D, određivanjem prisutnosti gena *yjaA* i *chuA*, te ulomka DNK TspE4. C2 lančanom reakcijom polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) (Clermont i sur., 2000.), te u sedam podskupina: A₀, A1, B1, B2₁, B2₂, B2₃, D1 i D2 (Carlos i sur., 2010.), pri čemu se B2₃ nalazi samo u ljudi. Većina patogenih izvancrijevnih sojeva pripada skupini B2, manji dio skupini D, a komenzalni sojevi skupini A i B1 (Picard i sur., 1999.; Clermont i sur., 2000.; Escobar-Páramo i sur., 2006.; Carlos i sur., 2010.; Maturana i sur., 2011.). Imajući na umu da svi izvancrijevni patovarovi imaju isto filogenetsko podrijetlo, može se pretpostaviti da postoji zoonotski potencijal ptičjih patogenih sojeva *E. coli* (Moulin-Schouleur, 2007.; Johnson i sur., 2009.; Antão, 2010.). B2 i D filogenetske skupine posjeduju širok spektar čimbenika virulencije od kojih je velik dio epidemiološki vezan uz pojavu slučajeva izvancrijevnih infekcija (Manges i sur., 2007.). Patogeni serovarovi *E. coli* često se mogu izolirati iz crijeva klinički zdravih jedinki, što dokazuje da je često oportunistički patogen. Miješanjem crijevnih i izvancrijevnih sojeva dolazi do međusobne izmjene genetskog materijala i prilagodbe komenzalnih sojeva koji onda postaju sposobni za infekciju. Molekularna epidemiološka istraživanja diljem svijeta utvrdila su nekoliko potencijalnih rezervoara ExPEC-a, kao što su probavni trakt čovjeka, životinje koje se koriste kao izvor hrane, životinjski proizvodi, okoliš kontaminiran otpadnim vodama i kućni ljubimci (Manges i Johnson, 2012.). Najvažniji izvor zaraze zračnih vrećica jesu feces i kontaminirana prašina (Porter, 1998.).

Ptičji patogeni sojevi *E. coli* uzrokuju kolibacilozu u nesilica, roditeljskih jata i tovnih pilića,

što dovodi do visokog morbiditeta i mortaliteta, a time i velikih ekonomskih gubitaka u peradarskoj industriji. U roditeljskim jatima teških linija *E. coli* najčešće uzrokuje salpingitis te posljedično peritonitis i septikemiju (Gregersen i sur., 2010.). S obzirom na velike gospodarske štete, utvrđivanje proširenosti APEC sojeva i njihova tipizacija mogu pomoći u provođenju nužnih profilaktičkih mjera kao što je cijepljenje. Zbog raznovrsnosti sojeva trenutačno dostupna komercijalna cjepiva nisu adekvatna, te se sve više podliježe proizvodnji inaktiviranih autogenih cjepiva (Landman, 2014.).

MATERIJAL I METODE

Uzorci

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

Izolacija i identifikacija *E. coli*

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

Izdvajanje i pročišćavanje DNK

Čiste kulture *E. coli* presađene su na ploče hranjivog agara (Nutrient Agar, Difco, Francuska) i korištene za izdvajanja DNK pomoću Chelex 100 (BioRad, Francuska) prema uputi proizvođača. Izdvojena DNK čuvana je na -20 °C do izvođenja pretrage. Neposredno prije pre-

trage u uzorcima je određena koncentracija DNK pomoću BioDrop uređaja (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), a potom je za PCR reakciju koncentracija u uzorcima prilagođena na 20 µg/mL.

Lančana reakcija polimerazom

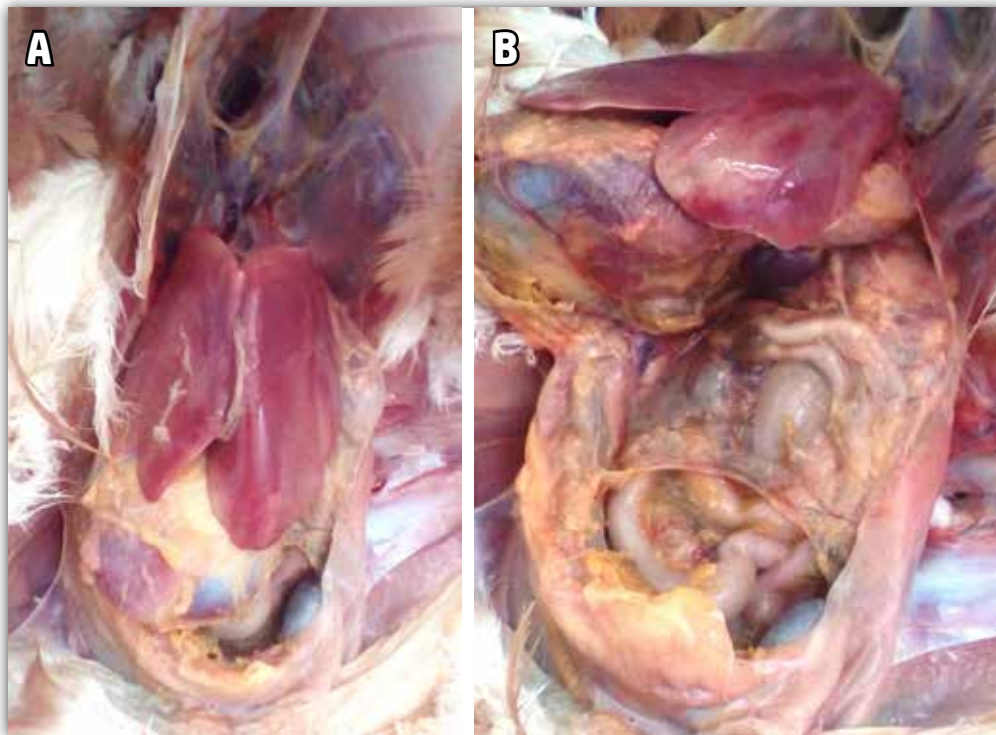
Izvedene su tri multiplex PCR reakcije prema protokolu Clermont i sur. (2000.) za svaki uzorak za sveukupno 22 gena virulencije. U prvoj reakciji korišteno je osam početnica (R1, R2, R3, R4, K12, *chuA*, *yjaA*, TspE), u drugoj pet (*iroN*, *ompT*, *hlyF*, *Iss*, *iutA*), a u trećoj devet (*astA*, *irp2*,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

Gel-elektroforeza

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

REZULTATI I RASPRAVA

Klinički je na farmama u oboljelih jedinki primijećeno otežano kretanje, otečenost glave, povremeni problemi s disanjem i proljevom. Patoanatomskom pretragom lešina uočene su kronična purulentna pneumonija uz kazeoznu upalu zračnih vrećica, perikarditis, peritonitis, perihepatitis, hepatomegalija, splenomegalija, tendosinovitis, salpingitis i enteritis. Neke od uočenih patoloških promjena prikazane su na slici 1. Obrisci su uzeti s organa koji su bili patološki promijenjeni ili predstavljaju predilekcijska mjesta za infekciju *E. coli*, kao što su jetra, slezena, pluća, crijeva i jajnik. Uočene makroskopske promjene u većine lešina upućivale su na koliseptikemiju, što je i potvrđeno izdvajanjem *E. coli* u čistoj kulturi iz pretraživanih organa, te potvrđeno i MALDI-TOF metodom pretrage i API testom.



Slika 1. Promjene uočene patomorfološkom pretragom. A. Fibrinozni perihepatitis. B. Fibrinozni poliserozitis, egg peritonitis.

Na temelju rezultata PCR-a, sojevi su svrstani u filogenetske skupine i podskupine. Od ukupno 48 pretraženih sojeva *E. coli*, većina ih pripada B2 filogenetskoj skupini (52,08 %), a dokazana je i prisutnost drugih skupina - B1 (22,92 %), D (16,67 %) i A (8,33 %). Određena je i učestalost filogenetskih podskupina pri čemu je najzastupljenija bila B2₃ podskupina (47,92 %). Na grafikonu 1 prikazana je usporedba zastupljenosti filogenetskih skupina, a na grafikonu 2 zastupljenost filogenetske podskupine B2₃ na farmama 1, 2 i 3. Na farmi 1 bili su primijećeni teži klinički simptomi te su prilikom patomorfološke pretrage uočene izraženije patološke promjene.

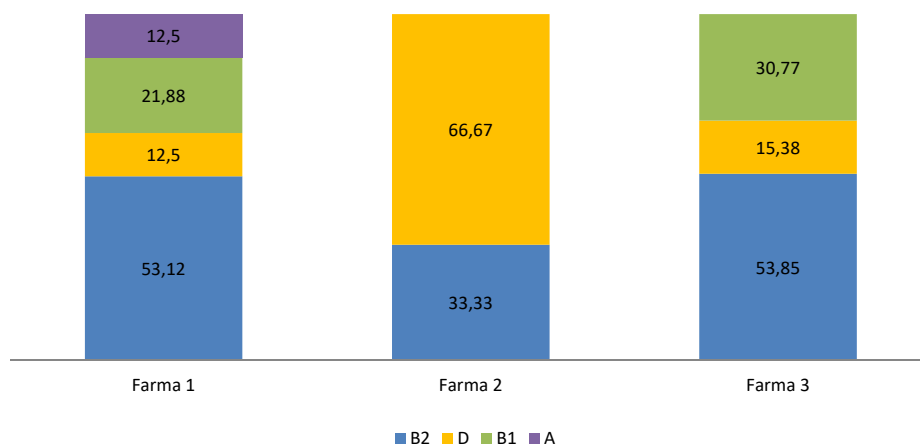
U tablici 1 prikazana je učestalost filogenetskih skupina i podskupine B2₃ po organima iz kojih su uzeti obrisci, pri čemu se može vidjeti da je najzastupljenija skupina B2 najčešće izolirana iz jetre, slezene, folikula i pluća.

U tablici 2 prikazana je učestalost nekih od gena virulencije koji se smatraju važnima za patogenost APEC u pojedinih filogenetskih skupina. Može se uočiti vrlo visoka učestalost različitih gena virulencije kod filogenetske skupine B1 i B2, a relativno mala u skupine A.

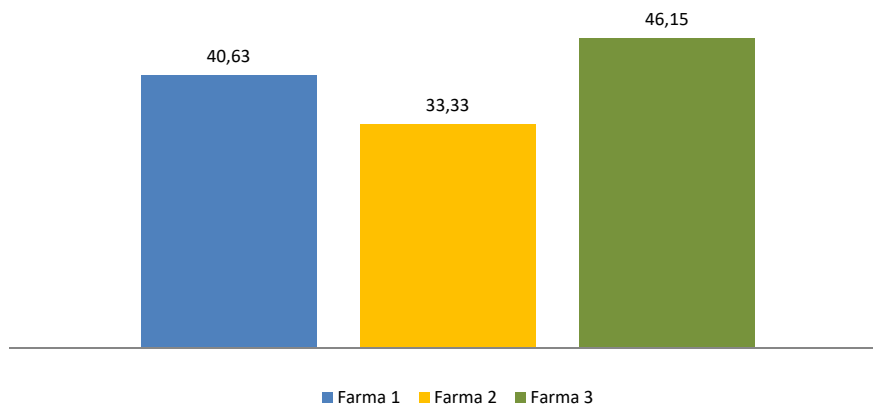
Ptičji patogeni sojevi *E. coli* uzrokuju različite lokalizirane i sistemske infekcije, a bolest najčešće započinje infekcijom dišnog sustava koja se razvije u sistemska infekciju i dovodi do uginuća. Kod nesilica je pak samo nesenje izrazit stres, a hormonski status (visoke razine estrogena) pridonose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

Unatoč izrazitoj raznovrsnosti APEC izolata, istraživanja su pokazala sličnosti između NMEC, SePEC, UPEC i APEC sojeva u pripadnosti serogrupama, filogenetskim grupama i posjedovanju faktora virulencije, što upućuje na mogućnost postojanja zoonotskog potencijala APEC sojeva (Ewers i sur., 2007.; Mellata i sur., 2013.; Guabiraba i sur., 2015.). Rezultati iz tablice 1

Grafikon 1. Usporedni prikaz učestalosti filogenetskih skupina na farmama 1, 2 i 3 (%).



Grafikon 2. Prikaz zastupljenosti filogenetske podskupine B2₃ na farmama 1, 2 i 3 (%).



Tablica 1. Prikaz učestalosti filogenetskih skupina i B2₃ podskupine po organima iz kojih su uzeti obrisci.

Organ	Filogenetska skupina				Fil. podskupina
	B2	B1	D	A	B2 ₃
Jetra	6	3	1	1	5
Crijevo	-	2	2	-	-
Jajnik	8	3	2	1	7
Slezena	4	1	-	1	4
Pluća	5	-	1	-	5
Tibiotarzalni zglob	1	1	-	-	1
Zračne vrećice	1	1	-	1	1
Gušterača	-	-	1	-	-
Gornji dišni putevi	-	-	1	-	-

pokazuju da je najzastupljenija filogenetska skupina (B2) najčešće izolirana iz jetre, folikula, slezene i pluća, gdje su obično i najizraženije patomorfološke promjene. U ovom smo istraživanju, zbog velike zastupljenosti filogenetske skupine B2, provjerili i kojim podskupinama pripadaju APEC sojevi koje smo izdvojili. Metoda utvrđivanja podskupina zasniva se na dokazu svih triju gena koji se koriste i za određivanje filogenetskih skupina (*chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*). Na temelju dokaza tih gena utvrdili smo da je prevalencija skupine B2₃ čak 47,92 % od ukupno pretraženih sojeva, odnosno da 23 od 25 izolata iz skupine B pripada spomenutoj podskupini. U dosadašnjim istraživanjima nijedan APEC soj nije svrstan u skupinu B2₃ za koju se smatra da joj pripadaju samo humani sojevi. Takav rezultat ima veliku važnost jer upućuje na veliku genetsku srodnost izoliranih sojeva različitih životinjskih vrsta i ljudi, a uz to je dodatan pokazatelj zoonotskog potencijala ptičjih patogenih sojeva. Postojanje takvih sličnosti očekivano je

s obzirom na njihovu važnost u omogućivanju preživljavanja bakterija u ekstraintestinalnim uvjetima. Unatoč tome, potvrđuje da postoji mogućnost prijenosa ExPEC sojeva na ljude kao rezultat neadekvatnog postupanja sa životinjama, odnosno manipulacijom lešinama i mesom koje služi za prehranu ljudi.

Prevalencija gena virulencije koje smo određivali, a koji se smatraju važnima za patogenost APEC sojeva, djelomično se slaže s rezultatima sličnih istraživanja drugih autora. U tablici 2 prikazana je njihova učestalost u zajedničkom uzorku i pojedinim filogenetskim skupinama. Može se uočiti veća učestalost različitih gena virulencije kod filogenetskih skupina B1 i B2, a relativno mala u skupine A za koju se smatra da joj pripadaju samo komezalni sojevi *E. coli*. Rezultati su pokazali veću zastupljenost *papC*, *chuA*, *iutA* i *sitA* gena u teških linija i nesilica s obje farme, za razliku od *irp2*, *astA* i *hlyF* gena koji su zastupljeniji samo kod nesilica s farme 2. Ewers i sur. (2009.) istraživali su jesu li sojevi iz-

Tablica 2. Prikaz učestalosti pojedinih gena virulencije (%).

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

dvojeni iz fecesa klinički zdrave peradi rezervoar izvancrijevnih infekcija i zaključili da zdrava perad može služiti kao genska zaliha (eng. *gene pool*) za ExPEC sojeve. Jedan od mogućih načina širenja zaraze jest i u klaonici putem trupova kontaminiranih fecesom i sadržajem crijeva (Johnson i sur., 2009.). Isto tako, domestikacija životinja imala je neposredan utjecaj na mikrofloru životinja putem pasminske selekcije, prilagodbe hranidbe i zoohigijenskih uvjeta u uzgoju te izloženosti različitim antibioticima. Učestala upotreba antimikrobnih preparata u intenzivnom uzgoju u peradarskoj industriji dovela je do toga da konzumacijom mesa dolazi do razvoja sve veće antimikrobne rezistencije jer perad ima ulogu rezervoara ExPEC-a (Manges i sur., 2007.; Manges i Johnson, 2012.).

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

ZAKLJUČAK

Rezultati upućuju na veliku raznolikost filogenetskih skupina *E. coli* u istim jatima peradi što otežava mogućnost imunoprofilakse. Na prvim dvjema farmama uključenima u epizootiološko istraživanje korišteno je živo i inaktivirano komercijalno cjepivo dostupno na tržištu, ali bez pozitivnog ishoda. Zbog toga se kao trenutačno najbolje rješenje preporučuju inaktivirana autogena cjepiva pripremljena od "stajskih sojeva" *E. coli*. Adekvatnim cijepljenjem peradi mogla bi se smanjiti pojavnost bolesti primarno u peradi, a time i pritisak na ljudsku populaciju kod koje su sve češće infekcije urinarnog trakta uzrokovane ExPEC sojevima genetski vrlo srodnim ptičjim patogenim sojevima *E. coli*. Preventivnim cijepljenjem smanjuje se potreba za antimikrobnom terapijom zaraženih jata. Na taj

bi način smanjena upotreba antibiotika imala pozitivan utjecaj i na zdravlje ljudi te smanjila stvaranje antimikrobne rezistencije koja je sve veći problem. Iz tog je razloga bitno kontinuirano provoditi epizootiološka istraživanja kako bi se pratila i kontrolirala pojavnost i širenje potencijalno opasnih sojeva za samu perad ali i ljudsku populaciju.

LITERATURA

- ANONYMOUS (2014): Colibacillosis in layers: an overview. Hy-Line Technical Update, 1-8.
- ANTÃO, E. M. (2010): Identification of Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) genes important for the colonization of the chicken lung and characterization of the novel ExPEC adhesin I. Dissertation. Humboldt- Universität zu Berlin, Berlin, Njemačka.
- BIĐIN Z. (2008): Bolesti peradi; Veterinarski fakultet; Zagreb.
- CARLOS, C., M. M. PIRES, N. C. STOPPE, E. M. HACHICH, M. I. Z. SATO, T. A. T. GOMES, L. A. AMARAL, L. M. M. OTTOBONI (2010): *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. BMC Microbiol. 10, 161-171.
- CLERMONT, O., S. BONACORSI, E. BINGEN (2000): Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4555-4558.
- CORDONI, G., M. J. WOODWARD, H. WU, M. AL-ANAZI, T. WALLS, R. M. LA RAGIONE (2016): Comparative genomics of European avian pathogenic *E. coli* (APEC). BMC Genomics 17, 960-981.
- DISSANAYAKE, D. R. A., S. OCTAVIA, R. LAN (2014): Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka. Vet. Microbiol. 168, 403-412.
- ESCOBAR-PÁRAMO, P., A. LE MENAC'H, T. LE GALL, C. AMORIN, S. GOU-RIOU, B. PICARD, D. SKURNIK, E. DENAMUR (2006): Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. Environ. Microbiol. 8, 1975-1984.

- EWERS, C., G. LI, H. WILKING, S. KIEßLING, K. ALT, E. M. ANTÃO, C. LATUR-NUS, I. DIEHL, S. GLODDE, T. HOMEIER, U. BÖHNKE, H. STEINRÜCK, H. C. PHILIPP, L. H. WIELER (2007): Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 163–176.
- EWERS, C., E. M. ANTÃO, I. DIEHL, H. C. PHILIPP, L. H. WIELER (2009): Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 184–192.
- GREGERSEN, R. H., H. CHRISTENSEN, C. EWERS, M. BISGAARD (2010): Impact of *Escherichia coli* vaccine on parent stock mortality, first week mortality of broilers and population diversity of *E. coli* in vaccinated flocks. *Avian Pathol.* 39, 287–295.
- GUABIRABA, R. i C. SCHOULER (2015): Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1-8.
- JOHNSON, T. J., Y. WANNEMUEHLER, C. DOETKOTT, S. J. JOHNSON, S. C. RO-SENBERGER, L. K. NOLAN (2008): Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3987–3996.
- JOHNSON T. J., C. M. LOGUE, Y. WANNEMUEHLER, S. KARIYAWASAM, C. DOETKOTT, C. DEBROY, D. G. WHITE, L. K. NOLAN (2009): Examination of the source and extended virulence genotypes of *Escherichia coli* contaminating retail poultry meat. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 657-667.
- LANDMAN, W. J. M., G. J. BUTER, R. DIJKMAN, J. H. H. VAN ECK (2014): Molecular typing of avian pathogenic *Escherichia coli* colonies originating from outbreaks of *E. coli* peritonitis syndrome in chicken flocks. *AvianPathol.* 43, 345–356.
- MANGES A.R. i J. R. JOHNSON (2012): Foodborne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin. Infect. Dis.* 55, 712–719.
- MANGES A. R., S. P. SMITH, B. J. LAU, C. J. NUVAL, J. N. S. EISENBERG, P. S. DIETRICH, L. W. RILEY (2007): Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: A case-control study. *Foodborne. Pathog. Dis.* 4, 419-431.
- MATTHIJS, M., M. P. ARIAANS, R. M. DWARS, J. H. H. VAN ECK, A. BOUMA, A. STEGEMAN, L. VERVELDE (2009): Course of infection and immune responses in the respiratory tract of IBV infected broilers after superinfection with *E. coli*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127, 77–84.
- MATURANA, V. G., F. DE PACE, C. CARLOS, M. M. PIRES (2011): Subpathotypes of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) exist as defined by their syndromes and virulence traits. *Open. Microbiol. J.* 5, 55-64.
- MELLATA, M. (2013): Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 916-932.
- MOULIN- SCHOULEUR, M., M. RÉPÉRANT, S. LAURENT, A. BRÉE, S. MIG-NON- GRATEAU, P. GERMON, D. RASSCHAERT, C. SCHOULER (2007): Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 3366-3376.
- PICARD, B., J. S. GARCIA, S. GOURIOU, P. DURIEZ, N. BRAHIMI, E. BINGEN, J. ELION, E. DENAMUR (1999): The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* 67, 546–553.
- PORTER, R. A. JR. (1998): Bacterial enteritides of poultry. *Poult. Sci.* 77, 1159–1165.
- SCHOULER, C., B. SCHAEFFER, A. BRÉE, A. MORA, G. DAHBI, F. BIET, E. OSWALD, J. MAINIL, J. BLANCO, M. MOULIN-SCHOULEUR (2012): Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1673-1678.