

STRESZCZENIE

Celem przeprowadzonych badań było dokonanie klasyfikacji oraz zdobycie wiedzy o pokrewieństwie terenowych szczepów *P. multocida* pochodzących od królików w Polsce. Praca miała również na celu usprawnienie metod identyfikacji izolatów należących do gatunku *P. multocida*.

Do badań użyto 115 terenowych szczepów zakwalifikowanych do *P. multocida*, wyizolowanych w latach 1999-2020 na terenie Polski. Pierwszą grupę stanowiły 73 szczepy wyizolowane od królików z objawami zapalenia nosa, drugą grupę - 14 szczepów od zwierząt będących bezobjawowymi nosicielami oraz trzecią grupę - 28 izolatów pochodzących od padłych królików.

Na wstępie badane szczepy poddano ocenie morfologicznej i mikroskopowej, a także określono zdolność do wytwarzania katalazy i oksydazy. Według oceny profilu biochemicznego, zgodnie z analizą wyników testu API 20E oraz ID 32E (bioMérieux), szczepy wyizolowane od królików należały do gatunku *P. multocida*. Następnie izolaty poddano klasyfikacji według kryteriów Muttersa i wsp. oraz Bisgaard i wsp. Do *P. multocida* subsp. *multocida* zakwalifikowano 17,4% izolatów, do *P. multocida* subsp. *multocida* ornityno- 80%, a jako *P. multocida* subsp. *septica* określono 2,6% szczepów.

Następnie określono przynależność serotypową badanych szczepów *P. multocida*. Otoczkę typu A stwierdzono u 87,8% izolatów, typu D u 8,7%, a typu F u 3,5%. Antygen somatyczny serotypu 12 posiadało 64,3% szczepów, a serotypu 3 35,7% izolatów. Przeprowadzone badania wykazały, że antygen somatyczny serotypu 12 występował u izolatów pochodzących zarówno od zwierząt zdrowych, jak i chorych, a szczepy serotypu 3 znacznie częściej izolowano od królików chorych. Z kolei otoczka typu A była dominująca u izolatów od królików będących bezobjawowymi nosicielami, a typu D i F występowała głównie u szczepów wyizolowanych od zwierząt chorych.

W kolejnym etapie pracy dokonano rozdziału elektroforetycznego białek błony zewnętrznej w SDS-PAGE i analizy densytometrycznej elektroforegramów terenowych izolatów *P. multocida*. W analizie densytometrycznej stwierdzono różnice w profilach elektroforetycznych białek błony zewnętrznej badanych szczepów *P. multocida*. Opierając się na różnicach w zakresie frakcji o masie molekularnej od 34 do 39 kDa wyróżniono 8 wzorców.

Następnie przy użyciu elektroforezy w zmiennym pulsowym polu elektrycznym dokonano analizy polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA. Dzięki tej technice możliwe było określenie pokrewieństwa filogenetycznego między badanymi szczepami *P. multocida* pochodzącymi od królików z terenu Polski. Prawie wszystkie krajowe szczepy wykazywały

dużą różnorodność genomowego DNA. Wśród szczepów *P. multocida* subsp. *multocida* ornityno- 46,7% izolatów charakteryzowało się silnie zaznaczonym pokrewieństwem molekularnym. Natomiast wzorce restrykcyjne pozostałych grup taksonomicznych były charakterystyczne dla pojedynczych szczepów lub grup liczących po kilka izolatów i wykazywały dużą różnorodność genomowego DNA. Z kolei wśród badanych szczepów *P. multocida* subsp. *multocida* wykazano wyraźną heterologię, a wzorce restrykcyjne grup taksonomicznych były charakterystyczne dla pojedynczych szczepów lub grup liczących po kilka izolatów. Jedynie wzorce elektroforetyczne szczepów *P. multocida* subsp. *septica*, które należały do jednej grupy klonalnej, charakteryzowały się silnie zaznaczonym pokrewieństwem na poziomie genotypowym.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono reakcję multiplex PCR, która pozwalała na równoczesną identyfikację gatunkową szczepów *P. multocida* oraz określenie typów otoczek. Ten szybki test dał możliwość rozróżnienia między blisko spokrewnionymi grupami otoczkowymi. Multiplex PCR może być zastosowany zarówno do szybkiej, czułej i specyficznej detekcji tego drobnoustroju, jak też może stanowić alternatywę dla metod serologicznych wykorzystywanych w konwencjonalnym systemie serotypowania otoczek.

Oceniono również zdolność szczepów do produkcji dermonekrotoksyny stosując w tym celu trzy metody: test Elisa, test PCR oraz test real-time PCR. Wśród 115 izolatów pochodzących od królików stwierdzono 3 szczepy toksynotwórcze *P. multocida* z otoczką typu D. Reakcja real-time PCR okazała się metodą wykazującą największą czułość, natomiast test Elisa wykazał się mniejszą o 50% czułością w porównaniu z metodami molekularnymi. Również test PCR należy ocenić jako test łatwy w wykonaniu, pozwalający na uzyskanie wyników w krótkim czasie, charakteryzujący się wysoką czułością i specyficnością.

Zastosowanie w kolejnym etapie pracy metody MALDI-TOF MS pozwoliło na zidentyfikowanie wszystkich 115 szczepów *P. multocida* wyizolowanych od królików. Wyniki badań własnych potwierdzają wysoką skuteczność metody MALDI-TOF MS do identyfikacji drobnoustrojów gatunku *P. multocida*. Metoda ta stanowi cenne narzędzie diagnostyczne w badaniach i stwarza obiecującą alternatywę dla metod zarówno fenotypowych, jak też genetycznych.

Przeprowadzone badania pozwoliły na dokonanie klasyfikacji oraz uzyskanie nowych dogłębnych danych na temat struktury populacyjnej pałeczek *P. multocida* izolowanych od królików na terenie Polski. Zaplanowane badania usprawniły również metody identyfikacji gatunkowej oraz serotypowania szczepów *P. multocida*.

SUMMARY

The aim of the study was to classify and determine the relatedness of field strains of *P. multocida* from rabbits in Poland. The work was also aimed at improving identification methods of isolates belonging to *P. multocida* species.

A total of 115 field strains classified as *P. multocida*, isolated from years 1999-2020 in Poland, were used for the study. The first group consisted of 73 strains isolated from rabbits with symptoms of rhinitis, the second group - 14 strains from animals that were asymptomatic carriers, and the third group - 28 isolates from dead rabbits.

First, the examined strains were subjected to morphological and microscopic evaluation, and also their ability to produce catalase and oxidase was determined. According to the assessment of the biochemical profile in the API 20E and the ID 32E (bioMérieux), the strains isolated from rabbits belonged to the species *P. multocida*. Next, the isolates were classified according to the criteria of Mutters *et al.* and Bisgaard *et al.* 17.4% of the isolates were classified to *P. multocida* subsp. *multocida*, 80% to *P. multocida* subsp. *multocida* ornithine-, and 2.6% of the strains were determined as *P. multocida* subsp. *septica*.

Then, serotypes of examined *P. multocida* strains were determined. The capsule of type A was found in 87.8% of isolates, type D in 8.7%, and type F in 3.5%. The somatic antigen of serotype 12 was present in 64.3% of strains, and serotype 3 in 35.7% of isolates. The conducted studies showed that the somatic antigen of serotype 12 was present in isolates from both healthy and diseased animals, while strains of serotype 3 was much more frequently isolated from diseased rabbits. In turn, the capsular type A was predominant among isolates from rabbits that were asymptomatic carriers, while the capsular type D and F were found mainly in strains isolated from sick animals.

In the next stage of the study, electrophoretic separation of outer membrane proteins in SDS-PAGE and densitometric analysis of electrophoregrams of field isolates of *P. multocida* were performed. The densitometric analysis revealed differences in the electrophoretic profiles of the outer membrane proteins of examined *P. multocida* strains. Based on differences in molecular mass fractions from 34 to 39 kDa, 8 patterns were distinguished.

Then, the analysis of polymorphism of DNA restriction fragments using pulsed-field gel electrophoresis was performed. This technique enabled determination of the phylogenetic relatedness between the examined *P. multocida* strains from rabbits from Poland. Almost all domestic strains showed high diversity of genomic DNA. Among strains of *P. multocida* subsp. *multocida* ornithine- 46.7% of isolates were characterized by strong molecular relatedness. In contrast, the restriction patterns of the other taxonomic groups were characteristic for single

strains or groups of several isolates each, and showed high diversity of genomic DNA. In turn, among the examined *P. multocida* subsp. *multocida* strains distinct heterology has been showed, and the restriction patterns of the taxonomic groups were characteristic for single strains or groups of several isolates each. Only the electrophoretic patterns of *P. multocida* subsp. *septica* strains, which belonged to a single clonal group, were characterized by strongly marked relatedness at the genotypic level.

In the next stage of the research, a multiplex PCR, allowing simultaneous species identification of *P. multocida* strains and determination of capsular types, was performed. This rapid test provided the ability to distinguish between closely related capsular groups. Multiplex PCR can be used for both rapid, sensitive and specific detection of this microorganism, and can also provide an alternative to serological methods used in conventional capsular serotyping.

The ability of the strains to produce dermonecrotxin was also evaluated using three methods: the Elisa, PCR and real-time PCR. Among 115 isolates from rabbits, 3 toxigenic *P. multocida* strains with a capsule type D were found. The real-time PCR proved to be the method showing the highest sensitivity, while the Elisa showed a 50% lower sensitivity compared to molecular methods. Also, the PCR proved to be an easy-to-perform test, allowing obtaining results in a short time, with high sensitivity and specificity.

Using the MALDI-TOF MS method in the next stage of the study, all 115 *P. multocida* strains isolated from rabbits were identified. The results of our studies confirm the high efficiency of the MALDI-TOF MS method for the identification of microorganisms of the *P. multocida* species. This method is a valuable diagnostic tool in research and creates a promising alternative to both phenotypic and genetic methods.

The conducted research allowed to classify and obtain new in-depth data on the population structure of *P. multocida* isolated from rabbits in Poland. The planned studies also improved methods of species identification and serotyping of *P. multocida* strains.