

Głównym zamierzeniem projektu jest wyjaśnienie molekularnych mechanizmów warunkujących chorobotwórczość pałeczek *Escherichia coli*, które posiadają potencjał do wywołania infekcji pozajelitowych. Prezentowane badania dotyczą czynników wirulencji, które umożliwiają pałeczkom *Escherichia coli* przetrwanie w surowicy człowieka i tym samym są odpowiedzialne za wywołanie infekcji uogólnionych.

Na cały projekt składają się następujące cele badawcze:

- a. Określenie profili genetycznych badanych szczepów *E. coli* pod posiadania przez bakterie wybranych genów wirulencji związanych z wywołaniem infekcji pozajelitowych oraz ocena pokrewieństwa badanych izolatów bakteryjnych na poziomie filogenetycznym.
- b. Ocena zdolności badanych szczepów *E. coli* do wywołania infekcji za pomocą dwóch metod badawczych: *in vitro* - określenie poziomu wrażliwości badanych bakterii na bakteriofag aktywno surowicy ludzkiej oraz *in vivo* - badanie patogenności szczepów *E. coli* na modelu larw *Galleria mellonella*.
- c. Wykazanie zmian w ekspresji wybranych genów wirulencji badanych szczepów *E. coli* po ekspozycji na surowicę ludzką.
- d. Wykazanie zmian w białkach błony zewnętrznej badanych szczepów *E. coli* po ekspozycji na surowicę ludzką oraz identyfikacja potencjalnych, bakteryjnych białek błony zewnętrznej zapewniających oporność szczepów *E. coli* na bakteriofag aktywno surowicy.

*Escherichia coli* zwana potocznie pałeczką okrężnicą jest jednym z najlepiej poznanych i zbadanych mikroorganizmów, charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem genetycznym i zdolnością do zajmowania wielu różnych nisz ekologicznych. Gatunek *E. coli* obejmuje zarówno szczepy komensalne stanowiące prawidłowy mikroflorę jelitową zwierząt stałocieplnych, w tym ludzi oraz patogenne szczepy wyposażone w charakterystyczne geny zdolności warunkującej wywołanie infekcji. Od dłuższego czasu w opinii publicznej utarła się pogląd o *E. coli* jako czynniku etiologicznym infekcji biegunkowych. A w związku z epidemicznymi zachorowaniami w 2011 roku w Europie największe zagrożenie zdrowia upatruje się w enterokrwotocznych szczepach *E. coli* (EHEC), wywołujących biegunki krwotoczne, z dużym ryzykiem wystąpienia komplikacji w postaci zespołu hemolityczno-mocznicy (HUS), który prowadzi do uszkodzenia nerek. Choć jednak społeczeństwo jest nie wiadomo zagrożone zdrowotnie jakimi szczepami *E. coli* wywołującymi infekcje pozajelitowe tzw. ang. extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC, powodującymi infekcje uogólnione lub narządowe.

Pozajelitowe patogenne szczepy *E. coli* są bardzo zróżnicowaną grupą bakterii chorobotwórczych, obejmują zarówno szczepy uropatogenne *E. coli* (ang. uropathogenic *E. coli* UPEC), które są czynnikiem etiologicznym głównie infekcji układu moczowego u ludzi; *E. coli* wywołujące zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u niemowląt (ang. neonatal meningitis *E. coli*, NMEC); *E. coli* powodujące sepsis oraz *E. coli* wywołujące uogólnione infekcje u ptactwa zwane kolibakteriozami (ang. avian pathogenic *E. coli*, APEC).

Zakażenia pozajelitowe o etiologii *E. coli* są istotnym problemem zdrowia publicznego, a najczęściej notowane są zakażenia powodowane przez szczepy uropatogenne. Każdego roku na świecie odnotowuje się 130-175 mln zachorowań o etiologii UPEC, czego konsekwencją są ogromne koszty związane z opieką zdrowotną. Szacuje się, że około 60% kobiet powyżej 18 roku życia przechodzi infekcje układu moczowego najczęściej o etiologii UPEC przynajmniej raz w ciągu życia. Jednakże największym zagrożeniem zdrowotnym jest fakt, że szczepy uropatogenne *E. coli* mogą przedostać się do krwiobiegu powodując sepsis tzw. urosepsis, która stanowi około 25% wszystkich przypadków zachorowań na tę jednostkę chorobową.

Natomiast szczepy APEC wywołujące wielonarządowe infekcje u ptactwa, są przyczyną milionowych strat w przemyśle drobiarskim na w skali światowej, dziesiątki tysięcy stad hodowlanych. Kolibakteriozy to najczęściej choroby infekcyjne drobiu hodowlanego, często mające charakter zakażeń wtórnych.

Cechą wspólną dla większości pozajelitowych patogennych szczepów *E. coli* jest zdolność do przedostania się do krwi i wywołania bakteriemii, sepsy lub infekcji uogólnionych. Dokładne mechanizmy patogenetyczne tych drobnoustrojów nie są poznane, a jak wykazano w powyższym opisie ExPEC stanowi poważne zagrożenie zdrowia publicznego, powinno dążyć do zgłębienia tego zagadnienia. W niniejszym projekcie chcemy oprócz porównywania profili genów wirulencji zbadać molekularne mechanizmy patogenetyczne szczepów APEC i UPEC zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*, odpowiednio przez pasażowanie szczepów bakteryjnych w surowicy oraz badanie ich wirulencji na modelu larw *Galleria mellonella*, które stanowi znakomity model dla infekcji bakteryjnych u ludzi. Ten owadzi model badawczy jest wykorzystywany do badania wirulencji wielu mikroorganizmów patogennych, w tym były już testowane przez inne zespoły badawcze szczepy enteropatogenne jak i uropatogenne *E. coli*. Jednakże ocena patogenności szczepów chorobotwórczych dla zwierząt jak APEC na modelu larw *G. mellonella* nie była wcześniej przeprowadzana stanowiąc tym samym nowatorski element prezentowanych badań.

Pozajelitowe patogenne szczepy *E. coli* powszechnie występują w środowisku, ich rezerwuarem mogą być zwierzęta stałocieplne (koty, psy, winie, bydło, konie, drób). Poziomą wiedzę na temat prewalencji *E. coli* wśród zwierząt zmiennocieplnych np. gadów jest niewielką. Ze względu na fakt iż gady mogą być rezerwuarem patogennych dla ludzi bakterii, tj. zakażeń pałeczkami *Salmonella*, których rezerwuarem są gady (RAS, reptile-associated salmonellosis) dana grupa zwierząt może być rozpatrywana jako potencjalny rezerwuuar innych chorobotwórczych bakterii np. pozajelitowych patogennych pałeczek *E. coli*. W związku z tym planowana jest molekularna analiza pałeczek *E. coli* izolowanych od gadów, obejmująca zarówno porównawczą analizę genetyczną wraz ze szczepami APEC i UPEC oraz badanie patogenności *in vitro* i *in vivo* tych szczepów.

Prezentowany projekt badawczy obejmuje analizę mechanizmów patogenetycznych pałeczek *E. coli* o potencjale do wywołania infekcji pozajelitowych oraz rozpowszechnienia w środowisku w której epidemiologicznie cechy jak oporność na bakteriofag aktywno surowicy. Oczekiwany rezultat jest wytypowanie czynników genetycznych oraz białek błony zewnętrznej związanych z opornością *E. coli* bakteriofagowe działanie surowicy.