

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Anja PALANDAČIĆ

**VIRULENTNI DEJAVNIKI UROPATOGENIH SEVOV BAKTERIJE  
*Escherichia coli*, ZBRANIH V ENOTAH ZDRAVSTVENEGA DOMA  
LJUBLJANA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**VIRULENCE FACTORS OF UROPATHOGENIC *Escherichia coli*  
STRAINS COLLECTED FROM GENERAL PRACTICES IN  
LJUBLJANA**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za molekularno genetiko na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija biologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Miklavža Grabnarja, za somentorico asist. dr. Jernejo Ambrožič Avguštin in za recenzentko doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec.

Mentor: prof. dr. Miklavž Grabnar

Somentorica: asist. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

Recenzentka: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Miklavž Grabnar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: asist. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Datum zagovora: 5. 6. 2007

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Anja Palandačič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Dn
- DK UDK579.24:616.61:614.2(043.2)=863
- KG *Escherichia coli*/ virulentni dejavniki/ Zdravstveni dom Ljubljana/ odpornost proti fluorokinolonom/ filogenetske skupine
- AV PALANDAČIČ, Anja
- SA GRABNAR, Miklavž (mentor)/ AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (somentorica)/ STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2007
- IN VIRULENTNI DEJAVNIKI UROPATOGENIH SEVOV BAKTERIJE *Escherichia coli*, ZBRANIH V ENOTAH ZDRAVSTVENEGA DOMA LJUBLJANA
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 91 str., 20 pregl., 13 sl., 85 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Zbirko 102 uropatogenih sevov bakterije vrste *Escherichia coli*, izoliranih iz pacientov Zdravstvenega doma Ljubljana (izolacija in identifikacija: Inštitut za varovanje zdravja v Ljubljani) smo glede na odpornost proti fluorokinolonom (norfloksacin, ciprofloksacin) razdelili na dve skupini. Seve obeh skupin smo z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) uvrstili v filogenetske skupine A, B1, B2 ter D. Z enako metodo smo pri sevih preverili prisotnost delov genov za 23 izbranih virulentnih dejavnikov. Primerjali smo, kakšne so razlike med skupinama: med uvrščenostjo v filogenetske skupine ter med številom virulentnih dejavnikov. V skupini sevov, ki je za fluorokinolone občutljiva, je več sevov iz filogenetske skupine B2 in manj sevov iz filogenetske skupine A kot v skupini sevov, ki je proti fluorokinolonom odporna. Sevov uvrščenih v filogenetski skupini D in B1 je približno enako v obeh skupinah. Ravno tako smo opazili, da imajo za fluorokinolone občutljivi sevi več virulentnih dejavnikov. Razlika je bolj vidna pri določenih virulentnih dejavnikih (*kpsMIII*, *usp*, *iroN*, *hlyA*). Pri delu s sevi smo določali tudi hemolizo na ploščah KA-IVZ. Tisti sevi, ki so bili hemolitični na ploščah (šest proti fluorokinolonom odpornih sevov), niso imeli nobenega od treh testiranih zapisov za hemolizine (*hlyA*, EHEC-*hlyA*, *hbp*). Združili smo rezultate sevov obeh skupin. Največ sevov smo uvrstili v filogenetsko skupino B2 (43 %), sledile so filogenetske skupine D (33 %), A (17 %) in B1 (8 %). Ugotovili smo, da imajo sevi iz skupine B2 največ virulentnih dejavnikov, sledili so sevi iz skupine D, nato pa sevi A in B1. Sevi 1056/1, 1056/2 in 1056/3 so bili izolirani iz urina iste pacientke in so izstopali po specifičnemu fenotipu. Razlikovali so se v morfologiji in odpornosti proti antibiotikom, ne pa tudi po prisotnosti delov genov za izbrane virulentne dejavnike in po plazmidih.

## KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- ND Dn
- DC UDK579.24:616.61:614.2(043.2)=863
- CX *Escherichia coli*/ virulence factors/ General practices in Ljubljana/ fluoroquinolone resistance/ phylogenetic groups
- AU PALANDAČIĆ, Anja
- AA GRABNAR, Miklavž (supervisor)/ AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (co-advisor)/ STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2007
- TI VIRULENCE FACTORS OF UROPATHOGENIC *Escherichia coli* STRAINS COLLECTED FROM GENERAL PRACTICES IN LJUBLJANA
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 91 p., 20 tab., 13 fig., 85 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In present work, 102 uropathogenic *Escherichia coli* strains, isolated from patients treated in general practices in Ljubljana, were divided in two groups accordingly to resistance to fluoroquinolones (ciprofloxacin, norfloxacin). Both groups were screened by PCR amplification for 23 chosen virulence factors. The strains were also classified in phylogenetic groups A, B1, B2 and D by the same method. We compared the two groups in relation to number of virulence factors and phylogenetic group classification. Among fluoroquinolone-susceptible strains there were more strains classified in the phylogenetic group B2 and less in the phylogenetic group A than among fluoroquinolone-resistant strains. The number of strains from phylogenetic groups B1 and D is almost the same in both, fluoroquinolone-susceptible and fluoroquinolone-resistant group. Fluoroquinolone-susceptible strains have more virulence factors. The difference is more obvious in particular virulence factors (*kpsMTII*, *usp*, *iroN*, *hlyA*). In our work we also tested the strains for three virulence factors linked with hemolysis,  $\alpha$ -hemolysin, enterohemolysin and Hbp. The results were not consistent with hemolysis noticed on blood agar plates (KA-IVZ). In the whole collection, most of the strains were classified in the phylogenetic group B2 (43%), followed by groups D (33 % of the strains), A (17 %) and B1 (8 %). Virulence factors were most often associated with phylogenetic group B2 and to the lesser extend to phylogenetic group D, followed by phylogenetic groups A and B1. Strains 1056/1, 1056/2 and 1056/3 were isolated from urine of the same patient. They differentiated in morphology and resistance to antibiotics, however there was no difference in the presence of chosen virulence factors or plasmids in the genetic material of the strains.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) .....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE .....	V
KAZALO PREGLEDNIC .....	VIII
KAZALO SLIK .....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	X
1 UVOD.....	1
1. 1 NAMEN DELA.....	2
2 PREGLED OBJAV .....	3
2.1 BAKTERIJA <i>E. coli</i> .....	3
2.1.1 Filogenetske skupine .....	4
2.2 OKUŽBE SEČIL .....	5
2.3 ZDRAVLJENJE OKUŽB SEČIL.....	7
2.3.1 $\beta$ -laktami .....	7
2.3.2 Kinoloni .....	8
2.3.3 Sulfametoksazol-trimetoprim .....	8
2.3.4 Alternativni načini zdravljenja .....	9
2.4 ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM.....	9
2.4.1 Odpornost proti $\beta$ -laktamom .....	10
2.4.2 Odpornost proti kinolonom .....	10
2.4.3 Odpornost proti sulfametoksazol-trimetoprimu .....	11
2.5 VIRULENTNI DEJAVNIKI .....	12
2.5.1 Adhezini.....	13
2.5.2 Toksini in invazini .....	19
2.5.3 Mehanizmi za privzem železa .....	26
2.5.4 Dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu in serumska odpornost .....	29
2.6 OTOKI PATOGENOSTI.....	30

3 MATERIAL IN METODE.....	32
3.1 MATERIAL .....	32
3.1.1 Bakterijski sevi .....	32
3.1.2 Gojišča .....	32
3.1.3 Kemikalije .....	34
3.1.4 Pufri in reagenti .....	36
3.1.5 Oprema .....	36
3.2 METODE .....	37
3.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....	37
3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza .....	42
3.2.3 Ugotavljanje filogenetskih skupin in podskupin sevov <i>E. coli</i> občutljivih in odpornih proti fluorokinolonom .....	43
3.2.4 Ugotavljanje odpornosti proti antibiotikom .....	43
3.2.5 Izolacija plazmidne DNK s kompletom »QIAGEN Plasmid Midi Kit« .....	43
3.2.6 Konjugacija plazmidov iz sevov 1056/1, 1056/2 in 1056/3 .....	44
3.2.7 Fisherjev test.....	44
4 REZULTATI .....	45
4.1 ZBIRKA SEVOV .....	45
4.2 VIRULENTNI DEJAVNIKI IN UVRŠČENOST V FILOGENETSKE SKUPINE PROTI FLUOROKINOLONOM ODPORNIH SEVOV <i>E. coli</i> .....	45
4.2.1 Adhezini.....	45
4.2.2 Toksini in invazini .....	46
4.2.3 Mehanizmi za privzem železa .....	47
4.2.4 Dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu .....	47
4.2.5 Otok patogenosti št. IV .....	48
4.2.6 Filogenetske skupine .....	48
4.2.7 Hemoliza na ploščah KA-IVZ.....	49
4.3 VIRULENTNI DEJAVNIKI IN UVRŠČENOST V FILOGENETSKE SKUPINE ZA FLUOROKINOLONE OBČUTLJIVIH SEVOV <i>E. coli</i> .....	54
4.3.1 Adhezini.....	54
4.3.2 Toksini in invazini .....	54

4.3.3	Mehanizmi za privzem železa .....	55
4.3.4	Dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu .....	56
4.3.5	Otok patogenosti št. IV .....	56
4.3.6	Filogenetske skupine .....	56
4.3.7	Hemoliza na ploščah KA-IVZ.....	57
4.4	PRIMERJAVA PROTI FLUOROKINOLONOM ODPORNIHNIH IN ZA FLUOROKINOLONE OBCUTLJIVIH SEVOV <i>E. coli</i> .....	62
4.4.1	Virulentni dejavniki .....	62
4.4.2	Filogenetske skupine .....	63
4.4.3	Pogostost pojavljanja virulentnih dejavnikov pri sevih iz določene filogenetske skupine.....	63
4.5	VIRULENTNI DEJAVNIKI IN UVRSTITEV V FILOGENETSKE SKUPINE CELOTNE ZBIRKE SEVOV .....	65
4.5.1	Filogenetske skupine .....	65
4.5.2	Pogostost pojavljanja virulentnih dejavnikov pri sevih iz določene filogenetske skupine.....	65
4.6	DOLOČANJE PRISOTNOSTI DELOV GENOV ZA VIRULENTNE DEJAVNIKE Z METODO MULTIPLEKS PCR.....	67
4.7	LASTNOSTI UROPATOGENIH SEVOV <i>E. coli</i> 1056/1, 1056/2 IN 1056/3, IZOLIRANIMI IZ URINA ISTE PACIENTKE.....	69
4.7.1	Prisotnost plazmidov v sevih 1056/1, 1056/2 in 1056/3 .....	71
4.7.2	Konjugacija plazmidov iz sevov 1056/1, 1056/2 in 1056/3 .....	72
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	73
5.1	SKLEPI .....	80
6	POVZETEK.....	82
7	VIRI .....	84
7.1	CITIRANI VIRI.....	84
7.2	NECITIRANI VIRI.....	91

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1.</b> Razdelitev v filogenetske skupine in podskupine .....	5
<b>Preglednica 2.</b> Založne in končne koncentracije antibiotikov .....	33
<b>Preglednica 3.</b> Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri PCR .....	37
<b>Preglednica 4.</b> Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje nukleotidnih zaporedji delov genov virulentnih dejavnikov in PAI IV .....	39
<b>Preglednica 5.</b> Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje nukleotidnih zaporedji delov genov <i>chuA</i> , <i>yja</i> in TSPE.C2 .....	39
<b>Preglednica 6.</b> Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje nukleotidnih zaporedji delov genov z metodo multipleks PCR.....	40
<b>Preglednica 7.</b> Proti fluorokinolonom odporni sevi <i>E. coli</i> : adhezini, izogib.imun.sist., PAI IV....	50
<b>Preglednica 8.</b> Proti fluorokinolonom odporni sevi <i>E. coli</i> : toksini, invazini, bkt., železo .....	52
<b>Preglednica 9.</b> Za fluorokinolone občutljivi sevi <i>E. coli</i> : adhezini, izogib.imun.sist., PAI IV .....	58
<b>Preglednica 10.</b> Za fluorokinolone občutljivi sevi <i>E. coli</i> .....	60
<b>Preglednica 11.</b> Pojavljanje delov genov, ki kodirajo virulentne dejavnike pri sevih <i>E. coli</i> , ki so odporni proti oziroma občutljivi za fluorokinolone .....	62
<b>Preglednica 12.</b> Število proti fluorokinolonom odpornih in za fluorokinolone občutljivih sevov v posamezni filogenetski skupini in podskupini .....	63
<b>Preglednica 13.</b> Število virulentnih dejavnikov proti fluorokinolonom odpornih sevov iz posamezne filogenetske podskupine .....	64
<b>Preglednica 14.</b> Število virulentnih dejavnikov za fluorokinolone občutljivih sevov iz posamezne filogenetske podskupine .....	64
<b>Preglednica 15.</b> Število sevov v posamezni filogenetski skupini .....	65
<b>Preglednica 16.</b> Povprečno število virulentnih dejavnikov na sev iz filogenetske skupine.....	66
<b>Preglednica 17.</b> Soodvisnost pojavljanja delov genov za virulentne dejavnike, pripadnosti določeni filogenetski skupini in odpornosti proti oziroma občutljivosti za fluorokinolone .....	67
<b>Preglednica 18.</b> Morfologija in konsistenca kolonij, ki jih tvorijo sevi 1056/1, 1056/2 in 1056/3 na različnih vrstah trdnih gojišč.....	69
<b>Preglednica 19.</b> Morfologija seva 1056/2 na gojišču LB pri različnih temperaturah.....	70
<b>Preglednica 20.</b> Odpornost sevov 1056/1, 1056/2 in 1056/3 prot protimikrobnim snovem .....	71



## KAZALO SLIK

<b>Slika 1.</b> Shematski prikaz interakcije <i>E. coli</i> z gostiteljskim tkivom .....	13
<b>Slika 2.</b> Elektroforeza PCR-pomnožkov dela gena <i>iha</i> .....	46
<b>Slika 3.</b> Elektroforeza PCR-pomnožkov dela gena <i>sat</i> .....	46
<b>Slika 4.</b> Elektroforeza PCR-pomnožkov dela gena <i>iroN</i> .....	47
<b>Slika 5.</b> Elektroforeza PCR-pomnožkov fragmentov za določanje filogenetskih skupin .....	48
<b>Slika 6.</b> Elektroforeza PCR-pomnožkov dela gena <i>hbp</i> .....	55
<b>Slika 7.</b> Elektroforeza PCR-pomnožkov dela gena <i>hlyA</i> .....	55
<b>Slika 8.</b> Elektroforeza PCR-pomnožkov dela gena <i>aer</i> .....	55
<b>Slika 9.</b> Elektroforeza PCR-pomnožkov fragmentov za določanje filogenetskih skupin .....	56
<b>Slika 10.</b> Elektroforeza multipleks PCR-pomnožkov delov genov <i>ibeA</i> , <i>kpsMT II</i> in <i>fimH</i> .....	68
<b>Slika 11.</b> Elektroforeza multipleks PCR-pomnožkov delov genov <i>fimH</i> - preverjanje rezultatov multipleksov .....	68
<b>Slika 12.</b> Elektronski posnetek kolonije seva 1056/2.....	70
<b>Slika 13.</b> Elektroforeza produktov po izolaciji plazmidne DNK.....	72

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APEC --- za ptiče patogeni sevi *Escherichia coli* («avian pathogenic *Escherichia coli*«)

ATP ----- adenzin trifosfat

BHI ----- gojišče »brain heart infusion«

bp ----- bazni par

Cip ----- ciprofloksacin

cm ----- centimeter

DAEC --- difuzno adherentni sevi *Escherichia coli*

DAF ---- dejavnik, ki pospešuje razkroj («decay accelerating factor«)

DNK --- deoksiribonukleinska kislina

*E. coli* -- *Escherichia coli*

EDTA -- etilendiamintetraacetna kislina

EAEC --- enteroagregativni sevi *Escherichia coli*

EHEC.--- enterohemoragični sevi *Escherichia coli*

EIEC --- enteroinvazivni sevi *Escherichia coli*

EPEC --- enteropatogeni sevi *Escherichia coli*

ESBL ---  $\beta$ -laktameze z razširjenim spektrom delovanja («extended-spectrum  $\beta$ -lactamases«)

ExPEC -- izvenčrevesni patogeni sevi *Escherichia coli* («extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*«)

g ----- gram

GPI ----- glikozilfosfatidilinozitol

IVZ ----- Inštitut za varovanje zdravja

KA ----- gojišče Luria-Bertani z dodano govejo krvjo

KA-IVZ - trdna krvna gojišča iz Inštituta za varovanje zdravja

kb ----- kilobaza

LB ----- gojišče Luria-Bertani

l ----- liter

MAC --- kompleks, ki napade membrano («membrane attack complex«)

mg ----- miligram

min ----- minuta

ml ----- mililiter

mm ---- milimeter

mM ---- milimol

MRHA - hemaglutinacija odporna proti manozi (»manonse-resistant hemagglutination«)

MSHA -- hemaglutinacija občutljiva za manozo (»manonse-resistant hemagglutination«)

Nor ----- norfloksacin

obr. ----- obrati

PCR ---- verižna reakcija s polimerazo

SPATE - serin-proteazni avtotransporterji enterobakterij (»serine protease autotransporters  
of *Enterobacteriaceae*«)

SXT ----- sulfametoksazol-trimetoprim

TBE ---- Tris-borat EDTA

TE ----- Tris-EDTA

UPEC --- uropatogeni sevi *Escherichia coli* (»uropathogenic *Escherichia coli*«)

UTI ----- infekcije sečil (»urinary tract infections«)

VB ----- gojišče Vogel-Bonner

V ----- volt

µg ----- mikrogram

µl ----- mikroliter

## 1 UVOD

Bakterije, ki jih uvrščamo v vrsto *Escherichia coli* (*E. coli*), so zelo raznolike. Komenzalni sevi so del črevesne flore zdravih ljudi in toplokrvnih živali. Nekateri sevi pa so patogeni in povzročajo črevesne ali izvenčrevesne bolezni. Med slednje spadajo infekcije sečil, bakteriemije, septikemije in meningitis ter intraabdominalne infekcije, pljučnice, osteomielitis in infekcije mehkega tkiva (ran).

Infekcije sečil uvrščamo med najpogostejše izvenbolnišnične bakterijske infekcije, predstavljajo pa tudi velik odstotek bolnišničnih infekcij. Najpogostejši povzročitelj izvenbolnišničnih infekcij sečil je bakterija vrste *E. coli*, ki je po nekaterih podatkih vzrok za infekcije sečil v kar 90 % primerov. Infekcije sečil zdravimo najpogosteje s protimikrobnimi snovmi sulfametoksazol-trimetoprim, kinoloni in  $\beta$ -laktami. Zaradi njihove pogoste uporabe pa je vse več bakterij vrste *E. coli* odpornih na te protimikrobne snovi.

Sposobnost sevov vrste *E. coli*, da povzročijo bolezen, je odvisna od prisotnosti genetskih zapisov za različne virulentne dejavnike: adhezine, toksine in invazine, dejavnike za zaščito pred gostiteljevim imunskim sistemom in sisteme za privzem železa.

## 1. 1 NAMEN DELA

V diplomskem delu smo ugotavljali pogostost pojavljanja izbranih virulentnih dejavnikov pri dveh skupinah uropatogenih sevov vrste *E. coli*, ki so jih izolirali in določili na Inštitutu za varovanje zdravja (IVZ) v Ljubljani. V prvi skupini je bilo 48 proti fluorokinolonom odpornih sevov, v drugi pa 54 za fluorokinolone občutljivih sevov. Sevi so bili izolirani iz pacientov z nekomplikiranimi infekcijami sečil, ki niso bili hospitalizirani in so se zdravili v enotah Zdravstvenega doma Ljubljana.

Ugotavljali smo prisotnost naslednjih genetskih zapisov virulentnih dejavnikov: *fimH* (fimbrije tipa 1), *papGII* (fimbrije P), *sfa* (fimbrije S), *gafD* (fimbrije G) in *bmaE* (fimbrije M), *iha* in *hra* (nefimbrialna adhezina), *kpsMTII* (kapsula tipa 2) in *iss* (protein, ki pripomore k srumski odpornosti), *hlyA* (hemolizin  $\alpha$ ), EHEC-*hlyA* (enterohemolizin), *vat*, *sat*, *picU*, *hbp* (avtotransporterski proteini), *ompT* (proteaza T), *ompA*, *ibeA*, *asl* (invazini), *usp* (bakteriocin), *aer* (aerobaktin) in *iroN* (sideroforni receptor). Preverjali smo tudi prisotnost otoka patogenosti št. IV (PAI IV). Vse seve, tako proti fluorokinolonom odporne, kot tudi za fluorokinolone občutljive, smo uvrstili v filogenetske skupine in podskupine ter jih testirali za hemolizo na ploščah KA-IVZ.

Skupini občutljivih in odpornih sevov smo primerjali in ugotavljali, kolikšna je pogostost pojavljanja določenega virulentnega dejavnika v vsaki od skupin. Zanimalo nas je tudi število proti fluorokinolonom odpornih in za fluorokinolone občutljivih sevov v posamezni filogenetski skupini oziroma podskupini. Prav tako smo podatke za vse seve združili in ugotavljali, kakšna je razporeditev celotne zbirke sevov po filogenetskih skupinah, ne glede na odpornost proti fluorokinolonom. Zanimalo nas je tudi, kako je prisotnost virulentnih dejavnikov povezana s pripadnostjo določeni filogenetski skupini, bodisi če opazujemo obe skupini ločeno ali pa podatke združimo.

Pri pregledu zbirke sevov smo opazili tri proti fluorokinolonom odporne seve (1056/1, 1056/2, 1056/3) izolirane iz urina iste pacientke, ki so močno izstopali po specifičnih fenotipskih lastnostih. Zato smo seve izpostavili in natančneje preučili.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BAKTERIJA *E. coli*

Bakterijo vrste *E. coli* je leta 1884 odkril nemški mikrobiolog Teodor Escherich. Danes je med najbolj raziskanimi prokariotskimi organizmi. *E. coli* uvrščamo v rod *Escherichia* in družino *Enterobacteriaceae* ter med  $\gamma$ -proteobakterije (Bergerjev priročnik).

*E. coli* je po Gramu negativna bakterija paličaste oblike. Dolžina celice je med 2,0 in 2,6 mikrometra, širina pa med 1,1 in 1,5 mikrometra. Celice imajo pogosto izven celične strukture, kot so peritrihni flageli za gibanje in fimbrije za pritrdjanje. *E. coli* je kemoorganotrof in fakultativni anaerob, ki energijo (odvisno od prisotnosti kisika) pridobiva z respiratornim ali fermentativnim metabolizmom. Uporablja lahko veliko različnih spojin kot vir ogljika, zato njeno gojenje praviloma ni zahtevno. Optimalno raste pri temperaturi 37°C (Holt in sod., 1994; Madigan in sod., 2000).

Genetski material *E. coli* je raznolik. Ima krožen kromosom in pogosto tudi plazmide. Kromosom ima 4,6 milijona baznih parov pri sevu K12 (Blattner in sod., 1997) in 5,5 milijona baznih parov pri enterohemoragičnemu sevu O157:H7 (Hayashi in sod., 2001). Tudi število genov se razlikuje. K12 jih ima 4288 (Blattner in sod., 1997), medtem ko so jih pri sevih O157:H7 določili 5361 (Hayashi in sod., 2001). Razlika v količini genetskega materiala je posledica horizontalnega prenosa genov s plazmidi in drugimi prenosljivimi genetskimi elementi. Vsebnost G:C parov je med 49 in 52 odstotki (Madigan in sod., 2000).

Bakterije vrste *E. coli* so normalni prebivalci prebavnega trakta ljudi in večine toplokrvnih živali, najdemo pa jih tudi v zemlji in vodi. Kot komenzali so pomembne zaradi sinteze vitaminov (na primer vitamina K). Hkrati sodelujejo pri ustvarjanju anoksičnih razmer v debelem črevesu, kjer pomagajo porabiti kisik, ki ovira naselitev anaerobov. Sevi *E. coli*, ki imajo specifične genetske determinante povezane s patogenezo, so lahko patogeni za ljudi in živali. Takšni sevi sintetizirajo tako imenovane virulentne dejavnike, ki omogočijo kolonizacijo novih ekoloških niš v gostitelju, invazijo globljih tkiv ter preživetje v sovražnem okolju gostitelja. Zapisi za virulentne dejavnike se prenašajo vertikalno, iz

materinske na hčerinsko celico, ali horizontalno, med linijami, na plazmidih ali na drugih prenosljivih genetskih elementih kot so otoki patogenosti (Madigan in sod., 2000; Sorsa in sod., 2003; Zhang in sod., 2002).

Infekcije, ki jih najpogosteje povzročijo sevi *E. coli*, so črevesne bolezni, okužbe sečil («urinary tract infections» = UTI) in sepsa ter meningitis. Občasno jih izolirajo tudi iz pacientov z intraabdominalnimi infekcijami, pljučnicami, osteomielitisom in infekcijami mehkega tkiva (ran). Glede na genetsko raznolikost virulentnih dejavnikov nekateri avtorji seve *E. coli* uvrščajo v patotipe. Vsak patotip povzroči bolezen s pomočjo druge kombinacije virulentnih dejavnikov, kar pogosto pri gostitelju izzove različne simptome. Tako na primer patogene črevesne *E. coli* naprej delimo v šest različnih patotipov: enteropatogene (EPEC), enterohemoragične (EHEC), enterotoksične (ETEC), enteroagregativne (EAEC), enteroinvazivne (EIEC) in difuzno adherentne (DAEC). Njihovo razlikovanje je izboljšalo razumevanje patogeneze te bakterije. Sevi, ki povzročajo bolezni izven prebavnega trakta, so t.i. ekstraintestinalni patogeni sevi *E. coli* ali ExPEC. V to skupino uvrščamo tudi seve vrste *E. coli*, ki povzročajo okužbe sečil (UPEC) in seve, ki povzročajo meningitis (MNEC). Sevi *E. coli*, ki povzročajo bolezni pri pticah in imajo prav tako specifičen nabor virulentnih dejavnikov, označimo kot APEC («avian pathogenic *E. coli*») (Bekal in sod., 2003; Marrs in sod., 2005; Russo in sod., 2001).

### 2.1.1 Filogenetske skupine

Na podlagi prisotnosti določenih genov oziroma fragmentov DNK so ugotovili, da lahko seve vrste *E. coli* razdelimo v t.i. filogenetske skupine. Delitev je narejena na osnovi treh specifičnih genov, ki so jih našli v DNA knjižnici *E. coli* in jih lahko uporabimo za filogenetske markerje. To so *chuA*, ki je gen za transport hema v enterohemoragičnemu sevu O157:H7, ter gen *yjaA* in fragment TSPE4.C2 z neznano funkcijo (Clermont in sod., 2000; Zhang in sod., 2002). Skupine A, B2 ter D lahko še dodatno razdelimo na podskupine A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, B2<sub>2</sub>, B2<sub>3</sub>, D<sub>1</sub> in D<sub>2</sub> (Branger in sod., 2005).

**Preglednica 1.** Razdelitev v filogenetske skupine in podskupine (povzeto po Branger in sod., 2005)

<b>filogenetska skupina</b>	<b>filogenetska podskupina</b>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>tspE4.C2</i>
<b>A</b>	A <sub>0</sub>	-	-	-
	A <sub>1</sub>	-	+	-
<b>B1</b>		-	-	+
<b>B2</b>	B2 <sub>2</sub>	+	+	-
	B2 <sub>3</sub>	+	+	+
<b>D</b>	D <sub>1</sub>	+	-	-
	D <sub>2</sub>	+	-	+

Virulentne ExPEC seve bakterije *E. coli* avtorji večinoma uvrščajo v skupini B2 in D, medtem ko so glede na dosedanje raziskave komenzalni sevi najpogosteje iz skupin A in B1 (Zhang in sod, 2002).

Sevi iz skupin B2 in D imajo pogosto zapise za virulentne dejavnike, ki jih sevi iz skupin A in B1 nimajo. Poleg tega je bila opažena tudi povezava med virulenco in odpornostjo proti antibiotikom. Sevi iz skupin A in B1 z malo virulentnimi dejavniki pogosteje nosijo zapise za odpornost proti različnim protimikrobnim spojinam (Branger in sod., 2005).

## 2.2 OKUŽBE SEČIL

Bakterijske okužbe sečil sodijo med najpogostejše infekcijske bolezni. Po ocenah Bahrani-Mougeot in sodelavcev (2002) so infekcije sečil vsako leto ugotovljene pri šest do sedem milijonih ambulantnih pacientov. Leta 1991 so bile v Združenih državah Amerike okužbe sečil vzrok za kar 9.6 milijonov obiskov pri osebnih zdravnikih ter navedene v 1.5 milijonih bolnišničnih odpustnic. Tako visoke frekvence postavijo okužbe sečil na prvo mesto med urološkimi in ledvičnimi boleznimi in po stroških zdravljenja presežejo celo bolezni kroničnih odpovedi ledvic, vključno s stroški za dializo in presaditev (Bahrani-Mougeot in sod., 2002).



Bolj dovzetne za okužbo sečil so predšolske deklice, spolno aktivne ter starejše ženske in starejši moški. Da je bolezen pogostejša pri ženskah, je verjetno posledica anatomskih razlik med spoloma. Predvidevajo, da vsaj polovica vseh žensk v svojem življenju zbolijo za takšno ali drugačno okužbo sečil (Bahrani-Mougeot in sod., 2002).

Okužbe sečil so lahko akutne ali kronične ter zapletene in nezapletene. Kronične infekcije so posledica sposobnosti bakterij, da se »skrijejo« v tkivu in se izognejo tako obrambnemu sistemu gostitelja kot tudi delovanju antibiotikov. Bolezen se ponovno pojavi v približno četrtini primerov, pri ostalih treh četrtinah gre za akutno obliko, ki se ne ponovi. Do zapletenih okužb najpogosteje pride pri bolnišničnih pacientih, ki imajo že prej obstoječe funkcijske ali anatomske zapreke v sečilih ali pa imajo vstavljen urinski kateter. Nezapletene okužbe so asimptomatska in simptomatska bakteriurija, pri kateri so bakterije v urinu, vnetje mehurja ali cistitis, vnetje sečnice ali uretritis, vnetje prostate ali prostatitis in vnetje ledvic ali pielonefritis. Pojavljajo se pri imunsko neoslabljenih bolnikih, ki imajo normalna sečila (Anderson in sod., 2004; Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Stamm in Norrby, 2001).

Najpogostejša infekcija sečil je vnetje mehurja ali cistitis, ki se kaže z značilnimi simptomi, med katerimi sta najbolj opazna pogosto in boleče uriniranje. Diagnozo potrdimo, ko je v primerno odvzetem urinu prisotnih tisoč ali več bakterij na mililiter seča. Najresnejša infekcija sečil je akutni pielonefritis ali vnetje ledvic. Do nje pride navadno takrat, ko patogeni organizmi iz mehurja prodrejo v eno ali obe ledvici in se tam naselijo. Bolezen spremljajo znaki kot so bolečine v spodnjem delu trebuha, vročina, slabost in prisotnost bakterij v krvi, ki se pojavi pri 12% bolnikov. Pri vnetju ledvic so še posebno nevarne komplikacije pri bolnikih z ledvičnimi kamni ali kakšno drugo blokado v ledvicah (Bahrani-Mougeot in sod., 2002).

V 95% je okužba posledica kolonizacije po ascendentni ali transuretralni poti, kar pomeni da se infekcija začne s kolonizacijo sečnice in se nadaljuje navzgor do mehurja, v nekaterih primerih pa še naprej po sečevodih do ledvic. Druga pot okužbe sečil je descendentna ali hematogena, pri kateri bakterije vstopijo v sečila iz krvnega obtoka (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Stamm in Norrby, 2001).

O povzročiteljih okužb sečil obstajajo med raziskovalci različna mnenja. Nekateri menijo, da okužbe sečil najpogosteje povzročajo komenzali iz črevesne flore, ki se po ascendentni poti prenesejo v sečila, drugi pa da gre za popolnoma druge, patogene seve.

Najpogostejša povzročiteljica okužb sečil je *E. coli*, ki povzroči 90 % izvenbolnišničnih okužb sečil. Drugi povzročitelji so še bakterije iz vrst *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, enterokoki ter *Pseudomonas aeruginosa* (Anderson in sod., 2004; Bahrani-Mougeot in sod, 2002).

### 2.3 ZDRAVLJENJE OKUŽB SEČIL

Bakterijske okužbe sečil se najpogosteje zdravi s protimikrobnimi spojinami. To so lahko antibiotiki v ožjem pomenu besede (produkti gliv in bakterij) ali umetni substrati (umetno sintetizirane spojine). Baktericidni antibiotiki poškodujejo bakterijsko celico, tako da propade, medtem ko bakterioSTATIČNI antibiotiki le zavrejo njeno rast. Po načinu delovanja ločimo štiri vrste antibiotikov. Prvi preprečujejo sintezo celične stene bakterije, drugi delujejo na sintezo znotraj-celičnih beljakovin, tretji vplivajo na sintezo jedrnih kislin, zadnja skupina pa ovira dejavnosti povezane s citoplazemsko membrano (Gubina in Ihan, 2002).

Antibiotiki oziroma protimikrobne spojine, ki se uporabljajo za zdravljenje infekcij sečil so  $\beta$ -laktami, kinoloni in kombinacija sulfametoksazol-trimetoprim.

#### 2.3.1 $\beta$ -laktami

$\beta$ -laktamski obroč je zgrajen iz treh ogljikovih atomov in enega dušika ter je del strukture  $\beta$ -laktamskih antibiotikov, kamor uvrščamo peniciline, cefalosporine, karbapeneme in monobaktame (<http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-lactam>). Delujejo tako, da preprečijo sintezo bakterijske celične stene. Celična stena bakterij nastaja z zamreževanjem polimerov N-acetilglukozamina in N-acetilmuraminske kisline v peptidoglikansko verigo, pri čemer sodelujejo encimi transpeptidaze in karboksipeptidaze. Na te encime se vežejo penicilin ali njegovi analogi in preprečijo njihovo delovanje. Sinteza celične stene se zaustavi. Posledica je kopičenje osnovnih sestavin za izgradnjo v celici, kar sproži bakterijski avtolitični sistem in celica se razkroji (Gubina in Ihan, 2002).

### 2.3.2 Kinoloni

Kinoloni so sintetične protimikrobne spojine, ki se uporabljajo v klinični in veterinarski medicini. Imajo širok spekter delovanja, saj zavirajo bakterijske topoizomeraze, encime, ki uravnavajo zvitje molekul DNK (Murray in sod., 1999; Snyder in Champness, 2003).

Topoizomeraze se delijo na dve skupini, tip I in tip II. Tip I cepi eno verigo dvojne vijačnice in drugo verigo povleče skozi nastalo odprtino. Topoizomeraze tipa II naenkrat cepijo obe verigi dupleksa DNA in skozi nastalo odprtino povlečejo drugi dupleks ter nato odprtino zaprejo. Za razliko od tipa I, ki naenkrat doda ali odvzame le en navoj, tip II spremeni dva navoja (Murray in sod., 1999; Snyder in Champness, 2003).

DNK-giraza je najpomembnejša topoizomeraza pri bakteriji vrste *E. coli*. Spada med topoizomeraze tipa II. Je tetramerna molekula iz dveh neenakih podenot A in B, ki ju kodirata gena *gyrA* in *gyrB*. Pomembna je za začetek podvajanja DNK (Murray in sod., 1999; Snyder in Champness, 2003).

Kinoloni v *E. coli* delujejo tako, da se vežejo na kompleks med DNK-girazo in DNK, natančneje na podenoto A, in preprečijo zlepljanje že razcepljenih verig DNK. Druga tarča kinolonov je topoizomeraza IV, ki jo kodirata kromosomska gena *parC* in *parE*. Deluje tako, da loči prepletene verige kromosomske DNK pred delitvijo celice. Tako kot DNK-giraza je pomembna tudi pri dodatnem zvijanju DNK, le da je manj učinkovita (Murray in sod., 1999; Snyder in Champness, 2003).

Primarna tarča starejših kinolonskih protimikrobnih spojin je DNK-giraza. Sem spadata ciprofloksacin in ofloksacin, ki se še vedno najpogosteje uporabljata. Novejši antibiotiki iz skupine kinolonov delujejo enako močno proti DNK-girazi in topoizomerazi IV, taka sta gatifloksacin in moksifloksacin (Hooper, 2000).

### 2.3.3 Sulfametoksazol-trimetoprim

Sulfametoksazol in trimetoprim posredno zavirata sintezo nukleinskih kislin. Sulfametoksazol je sulfonamid in kompetitivni inhibitor encima dihidropteorat sintetaze, ki sintetizira dihidropteroično kislino. Trimetoprim je diaminopirimidin in analog

tetrahidrofolne kisline. Zavira delovanje bakterijske dihidrofolat reduktaze in prepreči sintezo tetrahidrofolne kisline. Obe kislini sta prekurzorja za sintezo pirimidinov in purinov. Z zaviranjem metabolizma folne kisline spojini v kombinaciji delujeta bakteriostatično na širok spekter bakterij (Murray in sod., 1999; Silva, 1996).

### **2.3.4 Alternativni načini zdravljenja**

Čeprav so antibiotiki ponavadi učinkovito zdravilo za bakterijske okužbe sečil, niso vedno enako uspešni. Poleg tega imajo nekatere neprijetne stranske učinke. Ker so neselektivni uničevalci bakterij, v človeškem telesu odstranjujejo tako povzročitelja bolezni kot tudi druge koristne bakterije. Posledica so prebavne težave, slabost in glivne infekcije. Včasih antibiotiki povzročijo tudi alergične reakcije. Vse večji problem postajajo tudi bakterijski sevi odporni proti antibiotikom, ki se z rastočo uporabo antibiotikov vse bolj razširjajo (Wright in Lenard, 2001).

Med alternativne metode zdravljenja okužb sečil spadajo uporaba D-manoze ter izvlečki brusnic in borovnic. D-manoza je enostavni sladkor, podoben D-glukozi. Absorbira se v zgornjem delu prebavil, preide skozi jetra in se nepredelana prenese v krvni obtok. Od tam se preko ledvic v visoki količini izloči v urin. Bakterije vrste *E. coli* se s fimbrijami tipa 1, natančneje z adhezinom FimH v konici fimbrije, z večjo afiniteto vežejo na D-manozo kot na sladkorne ostanke na površini gostiteljskih celic in se z urinom odplaknejo iz telesa. FimH je zelo pogost tip adhezina tako pri uropatogenih kot tudi pri komenzalnih sevih bakterije *E. coli*. To je verjetno razlog, da se z D-manozo pozdravi do 90% nezapletenih infekcij sečil v enem do dveh dneh, zelo učinkovita pa naj bi bila tudi pri preprečevanju kroničnih infekcij. Podobne učinke imajo tudi izvlečki brusnic in borovnic, le da ji v njih D-manoza prisotna v manjši koncentraciji in so zato manj učinkoviti (Wright in Lenard, 2001).

### **2.4 ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM**

Bakterije so proti antibiotikom naravno odporne, ali pa postanejo odporne z mutacijami oziroma pridobijo genetske zapise za odpornost. Odpornost se raznaša z vertikalnim (iz materinske na hčerinsko celico) ali horizontalnim (med sevi, vrstami, rodovi) prenosom genov. Prenos posredujejo mobilni genetski elementi plazmidi, integroni, bakteriofagi in

transpozoni. Poznamo več različnih mehanizmov odpornosti proti antibiotikom. To so: (a) sinteza encima, ki s kemično modifikacijo ali hidrolizo zavre delovanje antibiotika, (b) sprememba prepustnosti membrane za antibiotik ali njegovo črpanje iz celice, (c) sinteza alternativne tarče, na katero deluje antibiotik, ne da bi se pri tem ustavila sinteza osnovne tarče, (d) sprememba tarčnega mesta, na katero deluje antibiotik (Hawkey, 1998; Madigan in sod., 2000; Silva, 1996).

#### **2.4.1 Odpornost proti $\beta$ -laktamom**

Odpornost proti  $\beta$ -laktamom je lahko posledica pridobitve spremenjenih ali novih penicilin vezočih proteinov, ki so na  $\beta$ -laktame neobčutljivi. To se pogosteje zgodi pri po Gramu pozitivnih bakterijah, primer je meticilin-odporen *Staphylococcus aureus*. Odpornost povzročijo tudi spremembe prepustnosti zunanje membrane ter aktivno izčrpavanje antibiotika. Pri po Gramu negativnih bakterijah odpornost najpogosteje omogoči sinteza  $\beta$ -laktamaz (npr. penicilinaze, cefalosporinaze), ki jih celice izločajo v periplazemski prostor. To so peptidaze, ki hidrolizirajo  $\beta$ -laktamski antibiotik. Genetski zapis je bodisi na kromosomu ali na plazmidu (Georgopapadakou, 1993; Murray in sod., 1999). V zadnjem času zbuja veliko pozornosti bakterijski sevi z ESBL («extended-spectrum  $\beta$ -lactamases»). To so sevi, ki imajo  $\beta$ -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja, kar pomeni, da se encimi spremenijo (po zgradbi in delovanju) zaradi točkovnih mutacij v genih, ki jih kodirajo (Bradford, 2001). Afiniteta encimov za substrat se poveča in zato lahko razgradijo tudi umetno sintetizirane cefalosporine in monobaktame s širokim spektrom delovanja (Jacoby in Carreras, 1990; Jacoby in Medeiros, 1991).

#### **2.4.2 Odpornost proti kinolonom**

Po Gramu negativne bakterije so proti kinolonom največkrat odporne zaradi točkovnih mutacij v genih, ki kodirajo DNK-girazo ali topoizomerozo IV. Primarna tarča kinolonov v *E. coli* je DNK-giraza, zato je odpornost pri tej vrsti bakterij največkrat povezana z mutacijami v *gyrA* podenoti, v QRDR območju (quinolone resistance-determining region) (Murray in sod, 1999; Rdriguez-Martinez, 2005; Ruiz, 2003). Odpornost je lahko posledica povečane nepropustnosti bakterijske celice za kinolone, ki v celico pridejo skozi fosfolipidni dvosloj ali skozi porine. Difuzija skozi dvosloj je odvisna od hidrofobnosti kinolona in jo je težko aktivno uravnati. Odpornost proti nekaterim kinolonom,  $\beta$ -

laktamom, tetraciklinom in kloramfenikolu je zato večkrat posledica zmanjšanja izražanja glavnih porinov, predvsem OmpF ter tudi OmpA in OmpC (Ruiz, 2003). Poleg tega so za povečano odpornost pogosto pomembne tudi transmembranske črpalke s širokim spektrom substratne specifičnosti, ki črpajo antibiotike iz periplazemske špranje, še preden vstopijo v citoplazmo. Primer take črpalke pri *E. coli* je črpalka AcrB, ki poleg različnih antibiotikov (kinoloni,  $\beta$ -laktami, tetraciklini, nalidiksična kislina, kloramfenikol) črpa iz celice tudi detergente, razkužila, žolčne soli, kemoterapevtske snovi in kationska barvila (Yu in sod., 2003).

Odpornost proti kinolonom lahko posreduje tudi zapis na plazmidu PMQR (plasmid mediated quinolone resistance). Plazmid pMG252, ki so ga leta 1998 izolirali iz bakterije *Klebsiella pneumoniae*, ima zapise za odpornost proti kinolonom, kloramfenikolu, kanamicinu, gentamicinu, streptomycinu, trimetoprimu in še številnim drugim protimikrobnim spojinam (Martinez-Martinez in sod., 1998). Nosilec odpornosti proti kinolonom je produkt gena *qnr* QnrA. Ta se veže na DNK-girazo in spremeni konformacijo vezavnega mesta za kinolone, oziroma na nek drug način zmanjša nastanek kompleksa med kinolonom, DNK-girazo in DNK ali ga destabilizira. QnrA se veže tudi na topoizomerozo IV (Tran in sod., 2005a in b). Poleg gena *qnrA* so odkrili še dva dodatna *qnr* gena, *qnrS* in *qnrB*, ter druge različice vseh treh genov, ki ravno tako blokirajo delovanje kinolonov (Robicsek, 2006).

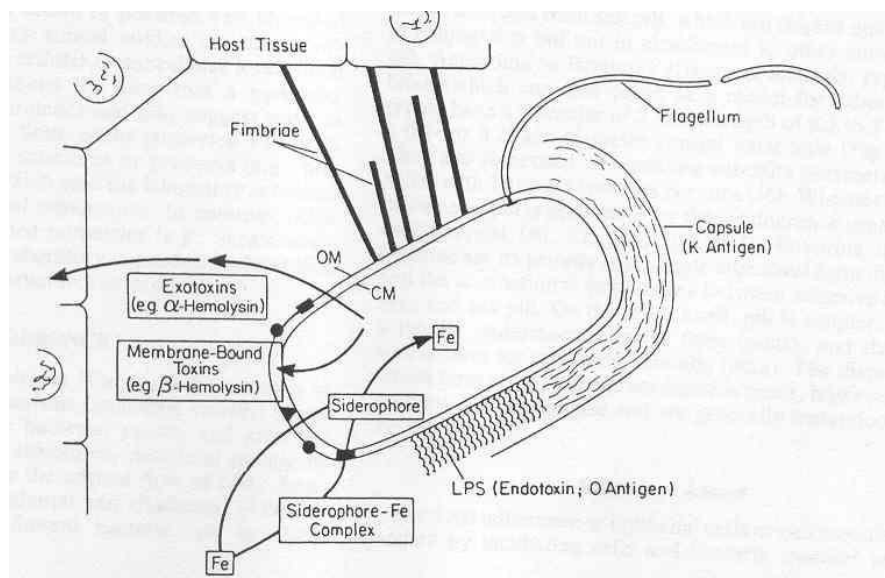
#### **2.4.3 Odpornost proti sulfametoksazol-trimetoprimu**

Vzrok za odpornost proti sulfametoksazol-trimetoprimu je spremenjena prepustnost celice za kombinacijo teh dveh snovi, ali pa do odpornosti privede sprememba metabolne poti. V tem primeru je odpornost posledica sinteze odporne dihidropteroat sintetaze in odporne dihidrofolat reduktaze. Bakterija s spremembo v metabolizmu folne kisline ohrani normalno sintezo nukleinskih kislin in se izogne vplivu antibiotika (Murray in sod., 1999; Silva, 1996).

## 2.5 VIRULENTNI DEJAVNIKI

»Virulenca« se nanaša na stopnjo patogenosti mikroba oziroma na njegovo sposobnost povzročanja bolezni. Beseda virulenca izvira iz latinske besede *virulentus* in pomeni »poln strupa« (<http://en.wikipedia.org/wiki/Virulence>). Pri bakteriji vrste *E. coli* je virulenca rezultat skupnega vpliva produktov enega ali več genov za virulentne dejavnike, ki razlikujejo potencialnega patogena od komezalnih črevesnih sevov (Johnson, 1991). Pri vstopu v sečila se uropatogene bakterije soočijo s pasivno in aktivno telesno obrambo, ki vključuje telesne pregrade, curek urina, protibakterijske molekule in imunske celice (Mulvey, 2002). ExPEC sevi s produkcijo različni virulentnih dejavnikov premagajo ali spremenijo obrambni sistem gostitelja ter kolonizirajo in poškodujejo gostiteljeve celice in tkiva (Johnson is sod., 2005).

Virulentne dejavnike razdelimo v skupine glede na to, v kateri stopnji patogeneze jih bakterija potrebuje. Za prvi stik z gostiteljem so pomembni **adhezini**, ki omogočijo pritrnitev na mestih povzročanja bolezni. Najprej je pritrnitev reverzibilna, nato sledi ireverzibilna pritrnitev, ki ji včasih sledi vstop v celice ali tvorba biofilmov. V naslednji stopnji še vedno sodelujejo adhezini, pridružijo pa se jim še **toksini in invazini**, ki s poškodbo gostiteljskega tkiva olajšajo prodiranje bakterije in raznašanje patogena po telesu. K preživetju patogena v sovražnem okolju pripomoreta še dve skupini dejavnikov, to so **mehanizmi za privzem železa**, ki ga v gostiteljevih tkivih in tekočinah primanjkuje, ter **faktorji za izogibanje obrambnemu sistemu** gostitelja (Bahrani-Mougeot in sod., 2002).



**Slika 1.** Shematski prikaz interakcije *E. coli* z gostiteljskim tkivom (Johnson, 1991)  
( »Host Tissue«- gostiteljsko tkivo, »Fimbriae«- fimbrije, »Flagellum«- flagel, »Capsule«- kapsula, »K Antigen«- antigen K, »OM«- zunanja membrana, »CM«- celična membrana, »Exotoxins«- eksotoksini, »eg.  $\alpha$ -Hemolysin«- na primer  $\alpha$ -hemolizin, »Membrane-Bound Toxins«- membransko vezani toksini, »eg.  $\beta$ -Hemolysin«- na primer  $\beta$ -hemolizin, »Siderophore«- siderofor, »Siderophore-Fe Complex«- kompleks med sideroforjem in Fe, »LPS«-lipopolisaharidi, »Endotoxin«- endotoksin, »O Antigen«- antigen O)

### 2.5.1 Adhezini

Adhezini omogočijo bakterijam vezavo na celice gostitelja in preprečijo, da bi jih različni mehanizmi odstranili iz telesa, zato jih uvrščamo med pomembnejše komponente bakterijske patogenosti (Mulvey, 2002). Sposobnost vezave na epitelne celice je ključen dejavnik za kolonizacijo gostiteljskih tkiv in za vzpostavitev infekcijskega procesa. Tako je tudi v primeru infekcije sečil in črevesa, ko adhezini bakterijam omogočajo poselitev sterilnih mukoznih tkiv sečil in okolju izpostavljenih tkiv prebavnega trakta. Poleg tega adhezini in njihovi receptorji igrajo pomembno vlogo tudi v nadaljnjih stopnjah infekcije ter omogočijo oblikovanje znotrajceličnih bakterijskih rezervoarjev za kasnejše infekcijske cikle (Le Bouguéneq, 2005).

Bakterijski adhezini so površinske strukture in kot take prispevajo h kolonizaciji tkiva, vendar so hkrati tudi antigeni, ki v gostitelju sprožijo imunski odgovor. Prisotnost določenih adhezinov je uravnotežena s tveganjem ob njihovem izražanju, zato je njihova ekspresija mnogokrat fazno variabilna, kar pomeni da v danem trenutku le del bakterij v



populaciji izraža določen adhezin. Regulacija ekspresije adhezinov je zapletena in odvisna od številnih dejavnikov okolja (Holden in Gally, 2004).

Najpogostejši adhezini uropatogenih sevov *E. coli* so fimbrije. Osnovna razdelitev fimbrij temelji na njihovi zmožnosti hemaglutinacije eritrocitov v prisotnosti sladkorja manoze. Manoza-občutljivi (*manose-sensitive hemagglutination* ali *MSHA* fimbrije) so tisti tipi fimbrij, ki ob prisotnosti manoze izgubijo zmožnost zlepljanja eritrocitov, manoza-odporni (*manose-resistant hemagglutination* ali *MRHA* fimbrije) pa tisti, ki to lastnost ohranijo. V prvo skupino spadajo fimbrije tipa 1, medtem ko so manoza-odporne fimbrije P, S, F1C in družina Dr-adhezinov. Adhezine pa lahko razdelimo tudi na fimbrialne in nefimbrialne (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Le Bouguéneq, 2005).

Fimbrije se sestavljajo na površini bakterijskih celic iz monomerov ali enostavnih oligomerov s pomočjo proteinov zunanje membrane in šaperonov (Mulvey, 2002). Najpogostejša pot sestavljanja je šaperonsko-vratarska pot (»chaperoneusher pathway«), pogosta pa je tudi pot sestavljanja fimbrije št. 4 (»type IV pilus assembly pathway«) (Le Bouguéneq, 2005).

UPEC sevi izražajo fimbrije tipa 1, P-, F1C-, S-, M-, G-fimbrije in adhezine iz družine Dr. Posamezne skupine adhezinov se vežejo na različne receptorje in se verjetno pritrdijo v različnih delih urinarnega trakta. En sev ima enega ali več različnih tipov adhezinov (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Mulvey, 2002).

#### 2.5.1.1 Fimbrije tipa 1

Fimbrije tipa 1 so najpogostejši adhezini pri UPEC sevih. Kodirani so v osmih genih *fim* in zgrajeni iz dveh delov. Prvi del je 7 nm debela helikalna palčka ali fibrila sestavljena iz podenot FimA, drugi del pa je 3 nm debela konica iz proteina FimH ter dveh adapterskih proteinov FimF in FimG. Ključen protein za pritrdjanje je FimH. Ima C-terminalni del, ki je zadolžen za zasidranje v konico fibrila, in N-terminalni del, kjer se nahaja žep za vezavo ogljikohidratnih receptorjev. Žep (adhezivna domena) je 11 trakast  $\beta$ -sodček, povezan z osrednjo domeno preko gibljivega podaljška, ki omogoča optimalno prilagajanje mesta vezave gostiteljevim receptorjem. FimH se praviloma veže na glikoproteine, ki vsebujejo

monosaharid manozo. Genetski zapisi za fimbrije tipa 1 so zelo variabilni, obstaja cela vrsta alelov, katerih produkti se lahko razlikujejo le za eno aminokislino. Vsakršna sprememba v genetskem zapisu vpliva na lastnosti vezave FimH, ne glede na to ali gre za spremembo v manozna-vezočem mestu ali kje drugje v zapisu za fimbrijo. Vse fimbrije tipa 1 lahko vežejo trimanozne strukture, razlikujejo pa se v sposobnosti vezave drugih ogljikohidratnih in ne ogljikohidratnih receptorjev, kot so manozni ostanki, kolagen I in IV, laminin ter fibronektin (Mulvey, 2002).

Poleg uropatogenih sevov so fimbrije tipa 1 pogosti tudi pri komenzalnih in enteropatogenih sevih *E. coli*. Vendar pa je 80% komenzalnih sevov sposobnih vezati le trimanozo, medtem ko imajo uropatogeni sevi v 70% »nadgrajene« fimbrije, ki se vežejo tudi na nekatere druge molekule, kar jim olajša kolonizacijo (Mulvey, 2002).

Primarni receptor za vezavo fimbrij tipa 1 je uroplakin 1a. To je glikoprotein, ki skupaj s še nekaterimi drugimi uroplakini (UP 1b, UP II, UP III) tvori 0.3 – 0.5  $\mu\text{m}$  velike glikoproteinske plake. Plaki pokrivajo skoraj celoten lumen mehurja in delujejo kot nepropustna ovira, ki stabilizira in krepi uroepitel mehurja. Z vezavo na uroplakin 1a patogene bakterije poselijo notranjo površino mehurja (Mulvey, 2002).

FimH pripomore tudi pri kolonizaciji v orofarniksu. Vendar je zaradi prisotnosti manoznih ostankov, na katere se FimH veže z večjo afiniteto kot na celice gostitelja, kolonizacija manj uspešna. Do podobnega pojava lahko pride tudi v mehurju, če so v urinu raztopljene molekule (manozna), na katere se bakterija veže z večjo afiniteto kot na celice (Mulvey, 2002).

FimH sodeluje tudi pri vezavi med bakterijami, pri njihovi agregaciji in tvorbi biofilmov. Prednost bakterij v biofilmu je, da so dodatno zaščitene pred imunskim sistemom in antibiotiki. Biofilmi, ki se tvorijo s pomočjo fimbrij tipa 1, olajšajo poselitev katetrov in drugih medicinskih pripomočkov, kar se izkaže kot velik problem pri hospitaliziranih bolnikih (Mulvey, 2002).

Fimbrije tipa 1 niso vključene le v adhezijo, temveč imajo vlogo tudi pri invaziji tkiv. Včasih je veljalo, da so uropatogene bakterije izvencelični patogeni. Novejše raziskave potrjujejo, da sevi, ki izražajo fimbrije tipa 1, pogosto vstopijo v gostiteljske celice in se tam, bolj zaščiteni pred obrambnim sistemom in delovanjem antibiotikov, tudi razmnožujejo. Pritrditev bakterij preko fimbrij tipa 1 sproži spremembe na površini in v citoskeletu gostiteljske celice, ki posledično ovije pritrjeno bakterijo in ji omogoči vstop v celico (Martinez in sod., 2000).

Fimbrije tipa 1 so po raziskavah Tenga in sodelavcev (2006) vključene tudi v prehod krvno-možganske pregrade. V fazno variabilni populaciji bakterij, so tiste s trenutno izraženimi fimbrijami tipa 1 pogosteje prehajale umeten model krvno-možganske pregrade kot tiste, ki fimbrij niso izražale.

#### 2.5.1.2 P- fimbrije

P-fimbrije sta leta 1976 opisala Svanborg-Eden in Hansson, ki sta odkrila, da se *E. coli* izolirane iz pacientov z vnetjem ledvic v večji meri vežejo na uroepitelne celice kot fekalni sevi. To sposobnost sta povezala s prisotnostjo fimbrij. Ugotovila sta, da bakterije s P-fimbrijami zlepljajo človeške eritrocite, neodvisno od prisotnosti manoze (Bahrani-Mougeot in sod., 2002).

P-fimbrije so po strukturi podobni fimbrijam tipa 1. Zgrajene so iz kratke fleksibilne konice, ki je vpeta v distalni del debelejšje paličaste strukture. Palčka, ki jo v membrano zasidra PapH, je debela 6.8 nm in je sestavljena iz podenot PapA, razvrščenih v desnosučni helikalni cilindar. Konica fibrila je debela okoli 2 nm in je zgrajena iz adhezina PapG v povezavi s še tremi podenotami PapE, PapF in PapK (Mulvey, 2002). Skupaj P-fimbrije kodira enajst genov *pap* (»pilus asociated with pielonefritis«) (Le Bouguéneq, 2005).

PapG ima več različic. Prva odkrita je bila PapG I, ki pa je redka v sevih patogenih za ljudi. Najpogosteje se pojavlja PapG II, pri nekaterih sevih, ki povzročijo vnetje mehurja, pa so odkrili PapG III (Bahrani-Mougeot in sod., 2002).

Glikolipidni receptor za PapG I je globotriazilceramid. Zgrajen je iz digalaktozidnega jedra povezanega preko  $\beta$ -glukozonega ostanka s ceramidno skupino, ki glikolipid veže v membrano. Če digalaktozidnemu delu dodamo en N-acetil-galaktozamin nastane globozid, ki veže PapG II. Formanov antigen z dodatnima dvema N-acetil-galaktozaminoma pa veže PapG III (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Mulvey, 2002).

Glikolipidne receptorje, na katere se vežejo fimbrije P, najdemo na površini ledvičnih celic in eritrocitov, zato so te fimbrije še posebno pogoste pri vnetju ledvic. Adhezini PapG naj bi tudi olajšali bivanje uropatogenim sevom *E. coli* med črevesno floro (Mulvey, 2002).

#### 2.5.1.3 S-, F1C- in M-fimbrije

S-fimbrije imajo podobno strukturo kot fimbrije tipa 1 in P. Zgrajene so iz večje podenote SfaA in treh manjših podenot SfaG, SfaH in SfaS. Za vezavo na gostiteljske celice sta pomembni predvsem podenoti SfaA in SfaS, čeprav lastnosti vezave S-fimbrij uravnavata tudi drugi dve enoti. SfaS tvori konico fimbrije. Veže se na sialično kislino v receptorjih, izraženih na površini ledvičnih celic in endotelnih celic žil. Velika podenota SfaA omogoča vezavo na glikolipide in plazminogen endotelnih celic (Mulvey, 2002).

S-fimbrije bakterijam olajšajo širjenje po telesu in med gostiteljskimi tkivi. Pogosto jih najdemo pri sevih *E. coli*, ki povzročajo sepsa, vnetje ledvic in meningitis pri novorojenčkih. Sialično-kislinski ostanki so tudi na uroplakinu III, enemu od štirih integralnih proteinov, ki so obilno izraženi na notranji površini mehurja, zato so S-fimbrije pomembne tudi za razvoj vnetja mehurja. S-fimbrije ne povzročajo zlepljanja eritrocitov. Sevi, ki imajo zapise za te adhezine, pa poleg njih pogosto nosijo še zapise za P-fimbrije in hemolizin (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Mulvey, 2002).

Obstajajo še drugi adhezini, ki so genetsko homologni S-fimbrijam, a se razlikujejo v specifičnosti receptorjev, na katere se vežejo. Sem uvrščamo F1C-fimbrije, ki vežejo N-acetil-galaktozamin ( $\beta$ -GalNac-1) in 4 $\beta$ -galaktozo, ki sta del glikolipidov izraženih na epitelnih celicah distalnih tubulov in zbiralnih vodov ledvic. Enake receptorje najdemo tudi na epitelu mehurja in na ledvičnih endotelnih celicah. F1C-fimbrije ima približno 14% UPEC izolatov (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Mulvey, 2002).

UPEC sevi redko izražajo tudi fimbrialni adhezini M. Njegovo prisotnost v genomu UPEC seva preverjamo s prisotnostjo gena *bmaE*. M-fimbrije se vežejo na terminalno aminokislinsko zaporedje krvnega antigena iz skupine M, ki je na glikoforinu A («M blood group antigen, glycophorin A») (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Johnson, 1991).

#### 2.5.1.4 G-fimbrije

UPEC sevi izražajo G-fimbrije, vendar so pogostejše pri sevih, ki povzročajo črevesne bolezni in septikemijo. G-fimbrije so kodirani v skupku genov *gaf*, ki ga sestavljajo štirje geni. Podenota za vezavo je manjši protein GafD, ki se veže na N-acetil-D-glukozamin (Saarela in sod., 1996).

Fimbrialni adhezini se pogosto vežejo na komponente izvenceličnega matriksa. G-fimbrije se vežejo na protein ekstracelularnega matriksa laminin, ki je tudi sestavina bazalne lamine in je del epitelnih, endotelnih ter mišičnih tkiv. Na laminin se vežejo tudi fimbrije tipa 1 in S-fimbrije (Saarela in sod., 1996).

#### 2.5.1.5 Družina Dr-adhezinov

Nekatere raziskave potrjujejo, da družina Dr-adhezinov olajša vzpenjanje bakterij po sečnici in sečevodih v zgornje dele sečil. Povezujejo jo tudi s kronično infekcijo sečil, ki jo omogoči zadrževanje bakterij v medceličnini. Epidemiološke študije so pokazale, da je pri polovici otrok z UTI in pri več kot 30% nosečih žensk z vnetjem ledvic vzrok za infekcijo sev *E. coli* z izraženim Dr-adhezinom. Še več, če UPEC sev izraža Dr-adhezini, se še enkrat poveča verjetnost, da se bo infekcija sečil ponovila. Sev z izraženim Dr-adhezinom se v primerjavi s sevom brez njega, v tkivu zadržuje bistveno dlje (Mulvey, 2002).

V družino Dr-adhezinov uvrščamo tako fimbrialne (Dr-adhezini) kot tudi nefimbrialne adhezine (Afa-I, Afa-II, Afa-III in Afa-IV, Nfa-I in Dr-II). Vežejo se na krvni antigen Dr, ki je del membranskega proteina zadolženega za preprečevanje lize celice z apoptozo (t.i. «decay accelerating factor» ali DAF). V membrano celice je zasidran z glikozilfosfatidilinozitolom (GPI-sidro). Izražen je na eritrocitih ter nekaterih drugih tkivih, vključno z uroepitelom. Ekspresija DAF se še posebno poveča v urinarnem traktu nosečnic, ki so zato bolj dovzetne za infekcijo s sevi UPEC, ki imajo Dr-adhezini. Dr-

adhezini se vežejo tudi na karcinoembrionski antigen (CD66e), protein, ki je z GPI sidrom pritrjen v membrano in ima neznano funkcijo. Poleg tega Dr-adhezin, ne pa drugi člani te družine, prepozna kolagen IV. Z vezavo na vse te molekule, Dr-adhezini povečajo adhezijo bakterij na komponente medceličnine in s tem olajšajo njihovo dolgotrajno preživetje predvsem v zgornjem delu sečil (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Mulvey, 2002).

#### 2.5.1.6 Nefimbrialni adhezini Iha in Hra

Iha je adhezivni protein, ki je bil prvič opisan pri enterohemoragični *E. coli* O157:H7. Zaradi visoke homologije z enterobaktinskim sideroforjem IrgA bakterije *Vibrio cholerae*, je poimenovan Iha («IrgA homologue adhesin»). Kljub podobnosti so ga na začetku obravnavali le kot možni adhezivni dejavnik, ki se je pogosteje pojavljal pri uropatogenih sevih kot pri komezalnih, šele kasneje je bil prepoznan kot kateholatni sideroforni receptor, ki lahko v celice privzema enterobaktin in sorodne spojine (Leveille in sod., 2000).

Hra («heat-resistant agglutinin») je proti vročini odporen protein zunanje membrane in nefimbrialni adhezin. Zleplja človeške ter živalske eritrocite in črevesne celice neodvisno od prisotnosti manoze (Srinivasan in sod., 2002).

### 2.5.2 Toksini in invazini

Toksini in invazini olajšajo bakterijam kolonizacijo gostiteljskih tkiv. Po zaključeni adheziji pričnejo patogeni sproščati različne molekule, ki poškodujejo gostiteljske celice ali izvencelični matriks med njimi. Na ta način prodirajo v globlje celične plasti, kjer so bolj zaščiteni pred dejavniki imunskega sistema in delovanjem antibiotikov. Poleg tega se iz razpadlih gostiteljskih celic sproščajo snovi, ki jih bakterije lahko uporabijo za rast. Toksini in invazini so raznolike snovi, na primer hemolizini, nekrotični faktorji, proteaze in drugi.

#### 2.5.2.1 $\alpha$ -hemolizin

Hemolitični sevi vrste *E. coli* največkrat sintetizirajo in izločajo  $\alpha$ -hemolizin. Opisani so bili tudi drugi sekrecijski hemolitični proteini ter  $\beta$ -hemolizin, ki se veže na celice, vendar so slabše raziskani (Johnson, 1991).

Sintezo in sekrecijo  $\alpha$ -hemolizina omogočajo protein zunanje membrane TolC in produkti štirih genov, kodiranih v *hly* operonu. Prvi je protein HlyA, 110-kDa velik protein, ki ima hemolitično funkcijo. Drugi je 20-kDa velik protein HlyC, ki z acilacijo aktivira HlyA. Ostala dva produkta, proteina HlyB in HlyD, tvorita membranski kompleks in skupaj s proteinom TolC omogočita sekrecijo HlyA skozi zunanjo membrano. Po sekreciji  $\alpha$ -hemolizin za svoje delovanje in privzem pravilne terciarne konformacije potrebuje tudi dvovalentne kalcijeve katione (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Johnson, 1991).

Ko se  $\alpha$ -hemolizin izloči iz bakterijske celice in aktivira, se veže na gostiteljske celice. Vstavi se v zunanji sloj membrane, kjer povzroči nastanek kationsko-selektivnih kanalov z visoko prevodnostjo in premerom 2 nm, ki povečajo prepustnost membrane za  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , manitol in saharozo. Posledica je nastanek eritrocitnih duhkov, preluknjanih in izpraznjenih rdečih krvnih celic.  $\alpha$ -hemolizin razgrajuje eritrocite vseh sesalcev in celo rib (Johnson, 1991).

$\alpha$ -hemolizin je toksičen tudi za druge celice: levkocite, fibroblaste in uroepitelne celice. Prispeva k vnetju, poškodbi tkiva ter oslabitvi gostiteljevega imunskega sistema. V imunskih celicah povzroči morfološke spremembe in degranulacijo ter poslabša kemotakso in fagocitozo, pri visokih koncentracija pa celice razgradi. Bolj občutljivi so monociti in granulociti, medtem ko so limfociti relativno odporni.  $\alpha$ -hemolizin stimulira sprostitvev superoksidnega aniona in vodikovega peroksida iz tubularnih ledvičnih celic ter sprostitvev histamina iz bazofilcev in celic mast (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Johnson, 1991).

Zaradi nenavadne uporabe kodonov in vsebnosti G:C parov, ki je bolj podobna vsebnosti G:C parov pri rodovih *Pasteurella* in *Proteus*, je možno da geni za  $\alpha$ -hemolizin izvirajo iz teh sorodnih rodov. Mogoče pa je tudi, da geni izvirajo iz genoma sesalcev, saj so podobni genu *mdr*, ki ga najdemo v nekaterih tumorskih celicah. Njegov produkt je glikoprotein (neselektivna črpalka), ki aktivno črpa različne spojine iz celic in vzpostavlja odpornost na številna zdravila (Johnson, 1991).

$\alpha$ -hemolizin ponavadi izdelujejo močno virulentni sevi. Posledica delovanja  $\alpha$ -hemolizina je sprostitvev železa iz eritrocitov, oviranje funkcije fagocitov in direktna toksičnosti za

gostiteljeva tkiva. Zapis za  $\alpha$ -hemolizin je mnogokrat povezan z zapisom za citotoksični nekrotični faktor (Johnson, 1991).

#### 2.5.2.2 Enterohemolizin

Enterohemolizin (oznaka gena EHEC-*hlyA*) je virulentni dejavnik povezan s sevi vrste *E. coli*, ki povzročajo hemoragični kolitis in hemolitični uremični sindrom. Zapis zanj se nahaja na velikem virulentnem plazmidu. Spada med citolizine, ki tvorijo pore v membrani celic, v družino RTX-proteinov («repeats in toxin proteins»). Enterohemolizin je po primarni strukturi podoben  $\alpha$ -hemolizinu (Schmidt in sod., 1995).

#### 2.5.2.3 Citotoksični nekrotični faktor 1 ali CNF1

Citotoksični nekrotični faktor je virulentni dejavnik, ki je pogosto povezan z infekcijami sečil. Njegov genetski zapis se velikokrat nahaja skupaj z genetskim zapisom za  $\alpha$ -hemolizin (Bahrani-Mougeot in sod., 2002).

CNF1 je 110-kDa velik protein, ki ga kodira en sam gen. Čeprav še ni trdnih dokazov, naj bi CNF1 sprožil spremembe v citoskeletu gostiteljskih celic ter tako omogočil sicer nepatogenim bakterijam vstop v celice. V črevesu naj bi induciral smrt mikrovilov, povečal permeabilnost celičnih plasti ter zmanjšal sposobnost fagocitoze imunskih celic. Posledica delovanja CNF1 v mehurju pa je luščenje uroepitelnih celic (Bahrani-Mougeot in sod., 2002).

#### 2.5.2.4 Bakteriocin Usp

Bakteriocini so proteini, ki jih sintetizirajo in izločajo bakterije. Z njimi uničijo druge bakterije, ki zasedajo isto ekološko nišo (Sharma in sod., 2002).

Usp («uropathogenic specific protein») je protein, velik 346 aminokislin, ki povečuje virulentnost uropatogenih sevov *E. coli*, ki ga izločajo. Zapis zanj leži na kromosomu, v okviru majhnega otoka patogenosti (Kurazono in sod., 2003). Protein Usp verjetno deluje kot bakteriocin proti kompetitivnim sevom vrste *E. coli*, ki zasedajo isto ekološko nišo. S tem se poveča infektivnost seva v sečilih (Parret in De Mot, 2002).



#### 2.5.2.5 Avtotransporterski toksini

Po Gramu negativne bakterije so razvile vsaj pet mehanizmov za transport produktov iz celice v zunanje okolje. Eden izmed njih je avtotransporterski ali V-sekrecijski sistem, ki je bil prvič opisan za transport proteaze IgA1 pri bakteriji *Neisseria gonorrhoeae*. Značilnost tega transportnega mehanizma je, da so njegovi substrati sposobni sami usmerjati svoje izločanje preko zunanje membrane (Guyer in sod., 2000; Kostakioti in Stathopoulos, 2004).

Značilni avtotransporter je sestavljen iz treh podenot: N-terminalnega vodilnega peptida ali signalne sekvence, osrednje potniške (»passenger domain«) ali  $\alpha$ -domene, ki je nosilka funkcije proteina, in C-terminalne ali  $\beta$ -domene, ki omogoči prehod preko zunanje membrane. Avtotransporterski protein se po sintezi najprej prenese skozi notranjo membrano s pomočjo Sec-translokaze. Prenos sproži vodilni peptid. Pri tem se signalno zaporedje odreže, ostali del pa se sprosti v periplazmo, kjer lahko pride do strukturnih modifikacij. Nato se  $\beta$ -domena proteina vstavi v zunanjo membrano in tam verjetno naredi  $\beta$ -sodček s centralno hidrofилno poro, skozi katero potniška domena prečka zunanjo membrano. Ko je enkrat na celični površini, lahko funkcionalna domena ostane kovalentno vezana na membrano, ali pa se s proteolizo odcepi in sprosti v okolje (Guyer in sod., 2000; Restieri in sod., 2007).

Proteini, ki se izločajo z avtotransporterskim sekrecijskim sistemom, so največkrat virulentni dejavniki. Po  $\beta$ -domeni, katere sekvenca je zelo ohranjena, so si zelo podobni. Njihove potniške domene pa so raznolike in delujejo kot adhezini, proteaze, hemaglutinini, citotoksini, enterotoksini, mucinaze, imunoglobulinske proteaze in mediatorji celične gibljivosti. Lahko imajo tudi druge funkcije, ki so odvisne od ekološke niše, katero patogen zaseda. Med dobro preučeni primeri avtotransporterske poddružine so serin-proteazni avtotransporterji enterobakterij ali SPATE (»serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*«). Najdemo jih pri rodovih *Escherichia*, *Shigella*, *Neisseria*, *Haemophilus* in drugih. Skupen jim je zelo ohranjen serin-proteazni motiv GDSGS v potniški domeni. Poleg tega imajo vsi tudi nenavadno podaljšano signalno sekvenco, aktivno mesto, ki spominja na aktivno mesto kemotripsinskih proteaz, ne cepijo IgA1 kot IgA1 proteaze, potniška in  $\beta$ -domena pa ostaneta povezani. Kljub visoki podobnosti

njihovih funkcionalnih domen, ki nakazujejo na skupni izvor, se SPATE razlikujejo v proteolitičnih značilnostih. Vsak posamezen protein poddružine ima drugačne cepilne lastnosti in je omejen na ozek spekter substratov (Parham in sod., 2005; Restieri in sod., 2007).

Med najbolj raziskanimi avtotransporterji pri uropatogenimih sevih *E. coli* so Sat, Vat, PicU in Tsh ter Hbp. Protein **Sat** (»secreted autotransporter toxin«) je 107 kDa velik avtotransporterski protein, ki ga pogosto povezujejo z zelo virulentnimi sevi. Poleg osrednje domene je neprocesiran prekurzor sestavljen še iz 49 aminokislin dolge vodilne sekvence in avtotransporterske domene velike 30 kDa. Protein Sat najprej povzroči vakuolizacijo epitelnih celic ledvic in mehurja ter nekaterih drugih celičnih tipov, nato pa njihovo smrt. V gostitelju sproži močen imunski odgovor, kot serinska proteaza pa ima tudi proteolitično aktivnost. Zapis za Sat pogosteje nosijo ExPEC sevi, še posebno povzročitelji infekcij sečil (Heimer in sod., 2004; Guyer in sod., 2000). Protein **PicU** je homologen avtotransporterskemu proteinu Pic (»protein involved in intestinal colonization«), ki ga imajo nekateri sevi iz rodu *Schigella* in enteroagregativni sevi *E. coli*. Je toksičen za celice sečil in ima mucinolitično aktivnost, ki olajša prodor PicU skozi zaščitno mukozno plast ter poveča kolonizacijo sečil. (Parham in sod., 2004; Parham in sod., 2005). Nedavno sta bila pri ptičjih izolatih opisana dva virulentna dejavnika, ki se pojavljata tudi pri UPEC sevih. Prvi je protein **Vat** (»vacuolating autotransportertoxin«), ki povzroči vakuolizacijo embrionalnih fibroblastov kokoši in je bistven za virulenco APEC sevov. Pri infekcijah sečil povzroči lizo uroepitelnih celic in doprinese h kolonizaciji globljih tkiv (Parham in sod., 2005). Drugi je protein **Tsh** (»temperature-sensitive hemagglutin«), ki pri ptičih povzroči perikarditis in septikemijo. Sestavljata ga dve domeni, TshS (106 kDa) in Tshβ (133 kDa) in ima motiv značilen za SPATE poddružino. Očiščen TshS se lahko veže na rdeče krvne celice, hemoglobin, fibronektin in kolagen IV, ima pa tudi mucinolitično in proteolitično aktivnost. Tsh ima torej dvojno vlogo, prva je aderenza, druga pa proteoliza. Pomemben je pri vezavi na izvencelični matriks in njegovi razgradnji, kar omogoča bakterijam nadaljnji prodor v gostiteljsko tkivo, poveča se njihova disperzija in zaščitenost pred imunskim sistemom (Kostakioti in Stathopoulos, 2004). **Hbp** (»hemoglobine-binding protein«) se od Tsh razlikuje le v dveh aminokislinah, na mestih

209 in 842 v proteinu. Hbp razgrajuje hemoglobin in veže hem (Kostakioti in Stathopoulos, 2004, Otto in sod., 1998).

#### 2.5.2.6 Omptini

Omptin T ali OmpT (outer membrane endopeptidase T) je peptidaza zunanje membrane, ki cepi peptidno vez med bazičnimi aminokislinami (Arg-Arg, Arg-Lys in Lys-Lys). Je monomerni protein. Sestavljena je iz osrednjega dela, ki tvori poro skozi zunanjo membrano ( $\beta$ -sodček) in zank, ki segajo daleč iz membrane (Baaden in Sansom, 2004; McCarter in sod., 2004).

OmpT uvrščamo v družino bakterijskih proteinov zunanje membrane, med integralne peptidaze zunanje membrane. Zaradi šibke inaktivacije s serin proteaznimi inhibitorji pa ga lahko uvrstimo tudi v družino serin proteaz. Po nukleotidnem zaporedju ni podoben nobeni od znanih družin proteaz (Baaden in Sansom, 2004; McCarter in sod., 2004). Poleg OmpT poznamo še omptin OmpP (Potempa in Pike, 2005).

Že pred več kot dvajsetimi leti je Leytus s sodelavci (1981) ugotovil, da OmpT katalizira aktivacijo iz plazminogena v plazmin. Poleg tega razgrajuje številne pozitivno nabite protimikrobne peptide, zato predvidevajo da ima pri UPEC sevih vrste *E. coli* zaščitno vlogo. OmpT cepi protimikrobni peptid protamin, ki ga izločajo epitelne celice mehurja (McCarter in sod., 2004; Potempa in Pike, 2005).

#### 2.5.2.7 Virulentni dejavniki, ki *E. coli* omogočijo prehod preko krvno-možganske pregrade

Bakterijski meningitis kljub napredkom v protimikrobni terapiji in podporni negi ostaja nevarna bolezen, ki se mnogokrat konča s smrtjo ali trajnimi posledicami. Veliko k temu pripomore nepopolno razumevanje patogeneze in patofiziologije tega obolenja. Večinoma je meningitis posledica prehoda patogena iz krvi v možganske ovojnice ali možgane. Veliko število bakterij (visoka stopnja bakterijemije) v krvi poveča možnost razvoja meningitisa, ni pa samo po sebi dovolj. Za invazijo tkiv osrednjega živčevja je potreben prehod preko krvno-možganske pregrade in uspešna pritrnitev ter poselitev možganskih mikrovaskularnih endoteljskih celic (Hoffman in sod., 2000; Huang in sod., 1999).

Pogosti povzročitelji bakterijskega meningitisa so *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, streptokoki skupine B in pneumokoki ter še nekatere manj pogoste po Gramu negativne in pozitivne bakterije. Najpogostejši povzročitelj meningitisa pri novorojenčkih je *E. coli* (Huang in sod., 1999; Slack, 1998).

Kako patogenom uspe prečkati krvno-možgansko pregrado, še ni v celoti znano. Zagotovo pa pri tem sodeluje več determinant. *E. coli* naj bi se najprej vezala na glikoproteine in glikolipide možganskih mikrovaskularnih endotelijskih celic s pomočjo S-fimbrij, kar pa zadostuje le za pritrditev, na pa tudi za nadaljnjo kolonizacijo. S samo invazijo možganskega tkiva so do sedaj povezali zunanji membranski protein OmpA (outer membrane protein A), kapsulo K1, *aslA* (arylsulfataze-like gene) ter produkte genov *ibeA* (invasin of brain endothelium), *ibeB* ter *yijP* (imenovan tudi *f577*) (Hoffman in sod., 2000; Huang in sod., 1999).

OmpA se veže na receptor Ecgp, ki je le na možganskih mikrovaskularnih endotelijskih celicah, ne pa tudi na drugih endotelih tkivih izven možganov (Selvaraj in sod., 2007). Ena izmed možnih razlag delovanja proteina OmpA je tudi njegov vpliv na izražanje fimbrij tipa 1. UPEC sevi z mutiranim genom *ompA* redkeje izražajo fimbrije tipa 1, ki imajo po novejših raziskavah ravno tako vlogo pri prehodu krvno-možganske pregrade (Teng in sod., 2006).

Invazija bakterije vrste *E. coli* je selektivna, bolj so ogroženi določeni deli krvno-možganske pregrade. Dejavniki za prehod krvno-možganske pregrade (OmpA, kapsula K1) povečajo izražanje celičnih adhezivnih molekul (intracellular adhesion molecule-1 ali ICAM-1 oziroma CD54) na gostiteljskih celicah, ki privabljajo levkocite na mesto napada. Migracija levkocitov preko krvno-možganske pregrade je mogoče tisto, kar povzroči škodo v določenih delih možganov in poveča prepustnost krvno-možganske pregrade (Selvaraj in sod., 2007).

### 2.5.3 Mehanizmi za privzem železa

Železo je bistven element za vse organizme. V naravi ga je veliko, vendar pri fizioloških pogojih (kisik in nevtralen pH) hitro oksidira iz bolj topne oblike  $\text{Fe}^{2+}$  v  $\text{Fe}^{3+}$  in tvori netopne hidrokside. Zato je koncentracija dostopnega železa nizka in njegov privzem predstavlja izziv za vsak organizem (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Feraldo-Gómez in S.P. Sansom, 2003).

V človeškem telesu je železo vgrajeno v železo-vezočih proteinih, kjer deluje kot kofaktor. V bioloških tekočinah ga je več kot 20  $\mu\text{M}$ , vendar je večinoma vezan in zato nedostopen mikroorganizmom. Del obrambnega mehanizma gostitelja ob infekcijah je še dodatno zmanjševanje prostega železa s povečano črevesno absorpcijo in sintezo železovih proteinov ter prenosom železa iz plazme v znotrajcelične prostore (intracelular). Pri po Gramu negativnih bakterijah privzem železa dodatno ovira zunanja membrana. Bakterije so bile prisiljene razviti mehanizme, s katerimi pridobijo železo za svojo rast in razvoj (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Feraldo-Gómez in S.P. Sansom, 2003; Johnson, 1991;).

Bakterije si pri privzemu železa pomagajo z receptorskimi proteini, ki so razmeščeni na površini njihovih celic in specifično vežejo številne železo-vezoče spojine. Veliko patogenov uporabi kot vir železa kar enake železo-vezoče proteine kot gostitelj, na primer transferin. Drugi si pomagajo s hemofori, tretji pa proizvajajo in izločajo **sideroforje**. Sideroforji so nizko-molekularne spojine, ki jih sintetizirajo bakterije in glive. Sproščajo jih v okolje, kjer ujamejo železo. Ko so v gostitelju, sideroforji vežejo železo iz proteinov kot so hemoglobin in transferin. Nato se transportirajo v celico glive ali bakterije, kjer se železo sprostijo s hidrolizo sideroforja ali z redukcijo  $\text{Fe}^{3+}$  v manj trdno vezan  $\text{Fe}^{2+}$ . Sideroforji vežejo  $\text{Fe}^{3+}$  s tremi kelatnimi skupinami, ki so oksigenirane in skupaj z železovim ionom tvorijo kompleks z veliko termodinamsko stabilnostjo. Na osnovi kemijske narave kelatnih skupin razdelimo sideroforje v hidrosamatne (hydroxamic acid) in kateholatne, ki vsebujejo kateholatni obroč (Feraldo-Gómez in S.P. Sansom, 2003).

Sideroforji se pri po Gramu pozitivnih bakterijah najprej vežejo na receptorje usidrane v plazmalemo. Ti jih prenesejo do ABC–transporterjev ( $\gg$ ATP-binding-cassette

transporters«), ki jih s pomočjo energije ob hidrolizi ATP prenesejo preko membrane. Celoten proces je pri po Gramu negativnih bakterijah nekoliko bolj zapleten. Na notranji membrani so dogodki enaki tistim na plazmalemi po Gramu pozitivnih bakterij, vendar je pred tem potreben transport preko zunanje membrane. Sideroforji se na zunanji strani zunanje membrane najprej povežejo z visoko afinitetnimi receptorji in se s pomočjo energije, ki jo dovaja sistem Ton, prenesejo v periplazemski prostor. Sistem Ton je sestavljen iz integralnega membranskega proteina ExbB ter dveh v membrano usidranih periplazemskih proteinov ExbD in TonB. V proteinu TonB pride pod vplivom protanske gibalne sile do konformacijskih sprememb, posledica je mehanska povezava z zunanjimi membranskimi receptorji, kar sproži transport železove spojine preko membrane (Feraldo-Gómez in S.P. Sansom, 2003).

Posamezen bakterijski sev ima lahko več mehanizmov za privzem železa, s katerimi si zagotovi kar najboljši izplen železa iz okolja. S tem se poveča njegova sposobnost preživetja v gostitelju, zagotovi pa si tudi selekcijsko prednost pred sorodnimi sevi. Sistemi za privzem železa se med bakterijami razširjajo z vertikalnim in horizontalnim genskim prenosom (Braun, 2005).

V naravi obstajajo antibiotiki, ki so sestavljeni iz antiobotsko aktivne komponente in siderofornega nosilca. Najbolj preučeni primer je albomicin, sestavljen iz trihidroksamata (veže  $\text{Fe}^{3+}$ ), peptidne povezave ter triribozil pirimidinske komponente, ki inhibira tRNA<sup>ser</sup> sintetazo. Ta antibiotik je zelo učinkovit proti po Gramu negativnim in pozitivnim bakterijam. Konjuganti s kelatno skupino za vezavo železa so ena od možnih rešitev zdravljenja okužb bakterij, ki so odporne proti drugim antibiotikom (Braun, 2005).

#### 2.5.3.1 Aerobaktin in enterobaktin

Hidroksamatni siderofor aerobaktin je eden izmed najbolj učinkovitih sistemov za privzem železa med enterobakterijami. Je majhna molekula, ki nastane s kondenzacijo dveh lizinskih molekul in citrata. Po sekreciji iz celic *E. coli*, aerobaktin iztrga  $\text{Fe}^{3+}$  iz gostiteljevih železo-vezočih proteinov in se preko 74 kDa velikega zunaj membranskega receptorja (IutA) prenese nazaj v celice. Sevi z aerobaktinom boljše rastejo v okoljih z nizko koncentracijo železa, kot sta serum in urin (Johnson, 1991).

Aerobaktinski sistem je kodiran v pet-genskem operonu, z geni imenovanimi *iuc* («iron uptake») in *iut* («iron uptake:transport»). Zapis zanj je kodiran na kromosomu ali na plazmidu. Ekspresija aerobaktina je uravnana s koncentracijo železa v celici, preko sistema Fur («ferric uptake regulator») (Johnson, 1991).

Kateholatni siderofor enterobaktin je drugi veliki specializirani siderofor *E. coli* in ima večjo vezavno konstanto za železo kot aerobaktin. Vendar se pri nevtralnem pH enterobaktin deprotonira in vezavna konstanta se zniža pod aerobaktinovo. V vodnih raztopinah enterobaktin hitreje iztrga železo transferinu kot aerobaktin, medtem ko je v serumu situacija ravno obratna. Enterobaktin se veže na serumske proteine (albumin) in se s tem verjetno inaktivira. Sicer ne aerobaktin ne enterobaktin nista dovolj velika, da bi povzročila nastanek protiteles, vendar enterobaktin deluje kot hapten. Enterobaktin je manj topen in manj stabilen od aerobaktina, za sprostitvev železa se mora hidrolizirati. Aerobaktin se reciklira brez hidrolize, železo pa prinese do mesta v celici, kjer je potrebno. Enterobaktin sprosti železo prosto v citoplazmo. Produkcija aerobaktina se sproži pri manjšem pomanjkanju železa kot produkcija enterobaktina (Johnson, 1991).

#### 2.5.3.2 *IroBCDEN* skupek genov

Skupek genov *iroBCDEN* je vpleten v privzem sideroforjev kateholatnega tipa v bakterijske celice. Gen *iroN* kodira receptor, ki omogoči prehod sideroforja preko zunanje membrane (sideroforni receptor). Prvič je bil odkrit pri vrsti *Salmonella enterica*, vendar je pogost tudi pri vrsti *E. coli* in drugih enterobakterijah. Kodiran je lahko tako na plazmidu kot na kromosomu, njegovo izražanje pa je podobno kot pri aerobaktinskemu sistemu regulirano s sistemom Fur in je odvisno od koncentracije železa v celici. Geni *iro* prispevajo k večji virulentnosti bakterije, saj ji olajšajo bivanje v z železom revnih telesnih tekočinah (Sorsa in sod., 2003).

#### 2.5.3.3 Gen *ireA*

Leta 2001 so Russo in sodelavci opisali nov gen pri sevu *E. coli*, katerega izražanje v človeški krvi in urinu je bilo povečano v primerjavi z izražanjem v tekočem LB gojišču. To je bil gen *ireA* (iron-responsive element), katerega produkt je 75,3 kDa velik protein. Opazili so, da je poleg povečanega izražanje v telesnih tekočinah, njegova ekspresija

odvisna tudi od dostopnosti železa. Gen *ireA* je sideroforni receptor, ki veže kateholatne sideroforne molekule in omogoči njihov prenos v bakterijsko celico.

#### **2.5.4 Dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu in serumska odpornost**

Obramba pred patogenimi mikrobi je lahko pasivna ali aktivna. Pasivna obramba so debele, tesno povezane celične plasti, izpostavljene površine pokrite z mukozo, hiter tok telesnih tekočin in njihova negostoljubna sestava. Aktivna obramba pa je imunski sistem, ki obsega celice in proteine za odstranjevanje tujkov. Človeški imunski sistem je zelo kompleksen in ščiti telo pred patogeni na različne načine. Bakterije v človeškem serumu lizira komplementni sistem. Komplementni sistem je nabor molekul, ki v kaskadi sprožijo nastanek membranskega kompleksa ali MAC (membrane attack complex). Ta napade membrano bakterije ter v njej tvori pore, skozi katere v celico vstopijo različne snovi, na primer lizocim, in jo razgradijo. Komplement sprožijo različni dražljaji, med drugim komponente celične stene bakterij. Drugi pogosti način odstranjevanja bakterij je fagocitoza, pri kateri posebne celice (fagociti) bakterije, ki so označene s protitelesi, obdajo in prebavijo z endocitozo (Johnson, 1991).

Bakterije vrste *E. coli* se imunskemu sistemu izogibajo na več načinov in pri vseh sodelujejo različni izvencelični polisaharidi (lipopolisaharidna plast), kapsule ter posebni proteini. S komplementom posredovano ubijanje ovirajo z blokado komplementne kaskade ob pomoči kislih polisaharidov, ali s preprečevanjem dostopa komponentam komplementa do ključnih mest na membrani s pomočjo O polisaharidov (Johnson, 1991).

Produkta genov *traT* (protein povezan s serumsko odpornost) in *iss* (increased serum survival) sta lipoproteina zunanje membrane, ki onemogočata normalno delovanja kompleksa MAC, kljub temu da mu uspe doseči zunanjo membrano. Bakterija z izraženima *traT* in *iss* ima boljše možnosti za preživetje v človeškem serumu (Johnson, 1991).

Fagocitozo bakterijskih celic ovirajo različne vrste kapsul, pri čemer je količina kapsularnih polisaharidov premosorazmerna z učinkovitostjo fagocitov (Johnson, 1991).



#### 2.5.4.1 Kapsula

Pri bakteriji vrste *E. coli* je trenutno znanih okoli 80 tipov kapsul. Sestavljene so iz ogljikohidratnih polimerov, včasih pa vsebujejo še aminokislinske ali lipidne komponente. Delimo jih na tri skupine. Kapsule skupine 1 imajo visoko molekulsko težo, nizko gostoto nabojev in jih imajo navadno komenzalni sevi *E. coli*. Kapsule skupin 2 in 3 pa imajo nizko molekulsko težo ter visoko gostoto nabojev in so povezane s patogenimi izvenčrevesnimi sevi *E. coli* (Johnson, 1991; Johnson in O'Bryan, 2004).

Kapsule iz skupine 2 so večinoma tanke, zaplataste in termostabilne. Sestavljene so iz kislih polisaharidov z visoko koncentracijo anionov. Zapis zanje je na kromosomu bakterije in ga sestavljajo trije skupki genov (*kpsMT*). Prvi skupek so geni za sintezo in polimerizacijo podenot, drugi regulira postpolimerizacijsko modifikacijo in transport preko notranje membrane. Tretji skupek uravnava prenos preko zunanje membrane (Johnson, 1991).

Kapsularni polisaharidi iz patogenih *E. coli* so slabi imunogeni. Podobni so gostiteljskim trisialogangliozidom (pojav molekularne mimikrije). Imunogenost se nekoliko poveča ob tvorbi konjugatov s proteini. Kapsule imajo protifagocitozno in protikomplementno aktivnost. Oteževanje fagocitoze je verjetno posledica negativnega naboja in hidrofилnosti polisaharidov. Stopnja fagocitoze je premosorazmerna količini polisaharidov. Poleg tega kapsularni polisaharidi blokirajo opsonizacijo tako, da se vmešajo v nalaganje komplementa. S komplementnim sistemom posredovana liza bakterijskih celic se zmanjša. Fagocitoza in komplementno ubijanje se povečata, če je več protiteles ali če porušimo mrežo polisaharidov kapsuli s segrevanjem (Johnson, 1991).

Kapsule so pomembne tudi pri tvorbi biofilmov in adheziji. Če so predebele prekrijejo povezovalne strukture in onemogočajo njihovo vezavo (Schembri in sod., 2003).

#### 2.6 OTOKI PATOGENOSTI

Otoki patogenosti so mobilni genetski elementi, ki so imeli ključno vlogo v evoluciji patogenih bakterij iz skupine *Enterobacteriaceae*. Navadno se nahajajo na bakterijskem kromosomu. V uropatogenem sevu *E. coli* so jih prvi opisali Hacker in sodelavci (1983).

Po definiciji so to regije DNK, daljše od 10 kb, ki nosijo zapis za virulentne dejavnike in so povezane s patogenimi organizmi. Pri fekalnih izolatih *E. coli* so otoki patogenosti manj pogosti (Hochhut in sod., 2005).

Za otoke patogenosti je značilno, da so pogosto povezani s tRNA geni. Vsebnost G:C parov je drugačna kot pri ostali kromosomski DNK. Drugačna je tudi raba kodonov. Mnogokrat so v njihov zapis vključene ponovitve ali pa drugi mobilni elementi kot so transpozoni, bakteriofagi in insercijske sekvence (IS). Nekateri otoki patogenosti so tudi zelo nestabilni in lahko spontano izginejo iz kromosoma. Zaradi vseh teh lastnosti se predvideva, da so se PAI razvili iz mobilnih genetskih elementov s horizontalnim prenosom genov. Otoke patogenosti so bakterije pridobile v evolucijskem procesu speciacije patogenov iz njihovih nepatogenih prednikov. Ta proces se je lahko zgodil milijone let nazaj, razloži pa tudi pojavljanje novih patogenih sevov v kratkem časovnem obdobju (Dobrindt in sod., 2002).

Pri sevih UPEC so bili opisani številni otoki patogenosti. Čeprav včasih nosijo zapise za iste virulentne dejavnike, se med seboj razlikujejo po velikosti, genetski vsebini in organizaciji, kromosomskem insercijskem mestu ter stabilnosti (Dobrindt in sod., 2002).

PAI IV je povezan s tRNA kodirajočim genom *asnT*. Velik je približno 30,2 kb in ima G:C vsebnost 57%. Ne vsebuje ponavljajočih sekvenc ali ostankov IS elementov, nosi pa zapis za sideroforski sistem jersinijabaktin. PAI IV je pogosto prisoten tudi pri komenzalnih sevih, zato nekateri avtorji menijo, da ni povezan le z virulenco, temveč omogoči bakterijam boljše preživetje v danem okolju (ti. »fitnes faktor«). Patogene bakterije, ki imajo PAI IV, dalj časa vztrajajo v gostiteljskem tkivu in lahko povzročajo kronične infekcije (Dobrindt in sod., 2002).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Bakterijski sevi

###### 3.1.1.1 Laboratorijski sevi

Pri konjugaciji smo uporabili sev J53 z genotipom Az<sup>f</sup>, vir G. A. Jacoby.

###### 3.1.1.2 Izolati uropatogenih sevov *E. coli* iz enot Zdravstvenega doma Ljubljana

Uropatogene seve bakterije *E. coli*, ki smo jih uporabljali pri delu, so osamili in identificirali v Inštitutu za varovanje zdravja (IVZ) v Ljubljani. Določili so jim tudi odpornost na protimikrobne substance ciprofloksacin, norfloksacin in sulfametoksazol-trimetoprim. Uporabili so difuzijsko metodo z diski.

##### 3.1.2 Gojišča

###### 3.1.2.1 Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)

Tekoča gojišča Luria-Bertani smo pripravili tako, da smo v deionizirani vodi raztopili 25 g osnove LB za en l gojišča, ki smo ga nato razdelili v epruvete po 10 ml in sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C.

###### 3.1.2.2 Priprava trdnih gojišč LB

Trdna gojišča LB smo pripravili tako, da smo v deionizirani vodi raztopili 25 g osnove LB in 15 g agarja za en l gojišča. Mešanico smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C, jo ohladili na 55 °C in jo nalili v plastične petrijevke.

###### 3.1.2.3 Priprava gojišč LB z antibiotiki

LB gojišča z antibiotiki smo pripravili tako, da smo gojišču LB, ohlajenemu na 55 °C pred razlitjem v plastične petrijevke, dodali ustrezno koncentracijo antibiotika, oziroma kombinacijo večih antibiotikov (preglednica 2).

**Preglednica 2.** Založne in končne koncentracije antibiotikov (v trdnih in tekočih gojiščih LB)

antibiotik	založna koncentracija (mg/ml)	koncentracija v gojišču ( $\mu$ g/ml)
ampicilin	100	100
kloramfenikol	50	50
natrijev azid	150	150
tetraciklin	10	10
trimetoprim	10	10

3.1.2.4 Priprava trdnih gojišč BHI

Trdna gojišča BHI (»brain heart infusion«) smo pripravili tako, da smo v deionizirani vodi raztopili 37 g osnove BHI in 15 g agarja za en l gojišča ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo do 55 °C, smo ga nalili v plastične petrijevke.

3.1.2.5 Priprava trdnih LB gojišč z dodano govejo krvjo (KA)

Trdna gojišča LB z dodano krvjo smo pripravili tako, da smo v deionizirani vodi raztopili 25 g osnove LB in 15 g agarja za en l gojišča. Mešanico smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C, jo ohladili na približno 50 °C ter dodali sterilno govejo kri (50 mililitrov krvi na liter gojišča). Gojišča smo razlili v plastične petrijevke.

3.1.2.6 Gojišča za preizkus hemolize na ploščah (KA-IVZ)

Krvna gojišča, ki smo jih uporabili za preizkus hemolize na ploščah, so pripravili na Inštitutu za varovanje zdravja v Ljubljani.

3.1.2.7 Priprava minimalnih trdnih gojišč

Minimalna trdna gojišča smo pripravili tako, da smo posebej zmešali 20 ml gojišča VB (Vogel-Bonner, založna koncentracija 50g/l) in 480 ml deionizirane vode ter 15 g agarja in 500 ml deionizirane vode. Mešanici smo ločeno avtoklavirali 15 min pri 121 °C, ju nato združili ter dodali 5 ml 40-odstotne sterilne glukoze ter 2 ml 20-odstotne raztopine MgSO<sub>4</sub>. Gojišča smo razlili v plastične petrijevke.

### 3.1.2.8 Priprava minimalnih trdnih gojišč z dodano govejo krvjo

Minimalna trdna gojišča smo pripravili tako, da smo posebej zmešali 20 ml gojišča VB (Vogel-Bonner, založna koncentracija 50g/l) in 480 ml deionizirane vode ter 15 g agarja in 500 ml deionizirane vode. Mešanici smo ločeno avtoklavirali 15 min pri 121 °C, ju nato zmešali ter dodali 5 ml 40-odstotne sterilne glukoze in 2 ml 20-odstotne raztopine MgSO<sub>4</sub>. Ko so se gojišča ohladila na približno 40 °C smo dodali še sterilno govejo kri (50 ml krvi na liter gojišča). Gojišča smo razlili v plastične petrijevke.

### 3.1.3 Kemikalije

#### BIOLIFE ITALIANA

- agar (agar technical)
- BHI (»brain heart infusion«)

#### FERMENTAS

- PCR Master Mix (0.05 enot/μl Taq DNK polimeraze v reakcijskem pufru: mM MgCl<sub>2</sub>, po 0.4 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- standardna 1-kb DNK-lestvica
- standardna 50-bp DNK-lestvica
- destilirana voda brez nukleaz
- nanašalni pufer za elektroforezo

#### KEMIKA

- EDTA

#### MERCK

- 70-odstotni etanol
- izopropanol
- 20-odstotna raztopina MgSO<sub>4</sub>
- 40-odstotna sterilna glukoza

#### QIAGEN

- komplet za izolacijo plazmidne DNK QIAGEN Plasmid Midi Kit

#### ROTH

- baza Tris

#### SEAKEM

- agarozna

#### SIGMA

- LB (Luria Broth medium)
- etidijev bromid (10 mg/ml)
- VB (Vogel-Bonner medium)
- TE pufer z RNazo
- ampicilin
- kloramfenikol
- natrijev azid
- tetraciklin
- trimetoprim

#### INŠTITUT ZA VAROVANJE ZDRAVJA

- sterilna goveja kri
- pripravljene krvne plošče

### 3.1.4 Pufri in reagenti

#### 3.1.4.1 Agarozna gelska elektroforeza

Za agarozno gelsko elektroforezo smo uporabili naslednje raztopine:

- elektroforezni agarozni gel,
- 5×TBE (0,45 mM Tris-borat; 10 mM EDTA), avtoklaviran in shranjen na sobni temperaturi,
- nanašalno elektroforezno barvilo (0,25-odstotni bromfenol modro, 0,25-odstotni ksilen cianol, 40-odstotna saharoza).

#### 3.1.4.2 Izolacija plazmidne DNK

- Za izolacijo plazmidne DNK smo uporabili komplet QIAGEN Plasmid Midi Kit, ki vključuje pufre P1, P2, P3, QBT, QC, QF.
- 70-odstotni etanol
- izopropanol
- pufer TE z RNazo ( 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 50 µg/ml RNaza

### 3.1.5 Oprema

Pri našem delu smo uporabili naslednjo opremo:

- ciklični termostat GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer)
- ciklični termostat
- avtomatske pipete (Eppendorf)
- centrifugo (Sorval)
- elektroforezo 2301 Mascrodrive 1 (LKB Bromma)
- inkubator Sutjeska
- namizno centrifugo (Eppendorf Centrifuge 5417C)
- namizno centrifugo (Beckman)
- rotacijski stresalnik (Biofuge 13, Heraeus)
- stresalnik (Infors HT)
- stresalno vodno kopel (Pharmacia)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

#### 3.2.1.1 Priprava celičnega lizata iz prekonočne kulture za izvedbo PCR

Lizat smo pripravili tako, da smo 1 ml prekonočne kulture odpipetirali v mikrocentrifugirko in centrifugirali 2 min pri 13.000 obr./min v namizni centrifugirki pri sobni temperaturi. Nato smo odstranili supernatant, pelet pa resuspendirali v 100 µl sterilne destilirane vode. Resuspendirane celice smo segrevali 10 min na temperaturi 100 °C in jih ponovno centrifugirali pri 14.000 obr./min v namizni centrifugi pri sobni temperaturi. Supernatant s celokupno celično DNK smo uporabili za namnožitev specifičnega dela DNK s PCR.

#### 3.2.1.2 Začetni oligonukleotidi za PCR

Za pomnoževanje genov s PCR smo uporabili začetne oligonukleotide (Jena Bioscience), ki so navedeni v preglednici 3.

**Preglednica 3.** Začetni oligonukleotidi (Jena Bioscience) uporabljeni pri PCR (njihovo nukleotidno zaporedje in velikost PCR pomnožka)

Oznaka začetnega nukleotida	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Velikost pomnožka (v bp)
AsIA1	CGGTGTCTGATATGTACACCG	546
AsIA2	CATCCCTTCCAGTAAACG	
Aer1	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602
Aer2	AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG	
BmaE1	ATGGCGCTAACTTGCCATGCTG	504
BmaE2	AGGGGGACATATAGCCCCCTC	
FimH1	AACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG	465
FimH2	ATTGCGTACCAGCATTAGCAATGTCC	
GafD1	TGTTGGACCGTCTCAGGGCTC	949
GafD2	CTCCCGGAACCTCGCTGTTACT	
Hra1	TACGGTATTCAGTGGCGGTATC	474
Hra2	TCGTCCITGTAACCTCACACTGC	
HlyA1	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177
HlyA2	ACCATATAAGCGGTCATCCCCGTCA	
EHEC-HlyA1	GGTGCAGAAAAAGTTGTAG	1551
EHEC-HlyA2	TCTCGCCTGATAGTGTTTGGTA	
Hbp1	GCCTGTCATCCTATCAGAA	920
Hbp2	CGCAGGGCATAGTCCAGCG	



Oznaka začetnega nukleotida	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Velikost pomnožka (v bp)
Iha1	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	827
Iha2	TCCTTAAGCTCCC GCGGCTGA	
Iss1	ACGATACTCCGTAGCCAGAGAT	791
Iss2	ATGAACAGTGCAGATGAGCTCC	
IroN1	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	665
IroN2	GACGCCGACATTAAGACGCAG	
IbeA1	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	170
IbeA2	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	
KpsMTH1	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	272
KpsMTH2	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	
OmpA1	TCAGGGCGTTCAACTGACC	753
OmpA2	GCCTGCGGCTGAGTTACAAC	
OmpT1	CAGAGTATCTGTCCGGTGCCTCA	581
OmpT2	TACGGTTCCATGTTCTTCGAC	
PapG II 1	GGGATGAGCGGGCCTTTGAT	190
PapG II 2	CGGGCCCCAAGTAACTCG	
PicU 1	TCAGGCCGGTAAGAACAGCAAAT	346 (371)
PicU 2	ACGGTAAGAGTGTGGATGGCGGAGTC	
Sat1	ACTGGCGGACTCATGCTGT	387
Sat2	AACCCTGTAAGAAGACTGAGC	
Sfa1	CTCCGGAGA ACTGGGTGCATCTTAC	410
Sfa2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	
UspN6 1	ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT	1023
UspN7 2	CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT	
Vat1	GAACACAGTTCATCTGATCTCC	418
Vat2	GAATATATCAAATTGGTCCCCC	
ChuA1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279
ChuA2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
Yja1	TGAAGTGT CAGGAGACGCTG	211
Yja2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
TspE4.C2-1	GAGTAATGTCCGGGCATTC A	152
TspE4.C2-2	CGCGCCAACAAGTATTACG	
PAI IV-1	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	286
PAI IV-2	TCGTCCGGCAGCGTTTCTTCT	

### 3.2.1.3 Reakcijska mešanica za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Za PCR reakcijo, s katero smo preverjali prisotnost delov genov *aslA*, *aer*, *bmaE*, *fimH*, *gafD*, *hra*, *hlyA*, EHEC-*hlyA*, *hbp*, *iha*, *iss*, *ironN*, *ibeA*, *kpsMT II*, *ompA*, *ompT*, *papG II*, *picU*, *sat*, *sfa*, *usp*, *vat* in PAI IV, smo pripravili 25 µl reakcijske mešanice. Sestava je podana v preglednici 4.

**Preglednica 4.** Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje nukleotidnih zaporedji delov genov virulentnih dejavnikov in PAI IV

začetni oligonukleotid 1	1 µl
začetni oligonukeotid 2	1 µl
PCR Master Mix	12,5 µl
destilirana voda	8 µl
celični lizat	2,5 µl

Za PCR reakcijo, s katero smo preverjali prisotnost delov genov *chuA*, *yja* in fragmenta TSPE.C2, smo pripravili 25 µl reakcijske mešanice. Sestava je podana v preglednici 5.

**Preglednica 5.** Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje nukleotidnih zaporedji delov genov *chuA*, *yja* in TSPE.C2

začetni oligonukleotid 1	po 1 µl vsakega
začetni oligonukeotid 2	po 1 µl vsakega
PCR Master Mix	12,5 µl
destilirana voda	6 µl
celični lizat	0,5 µl

Za metodo multipleks PCR, s katero smo preverjali prisotnost delov genov *ibeA*, *kpsMT II* in *fimH*, smo pripravili 25 µl reakcijske mešanice. Sestava je podana v preglednici 6.

**Preglednica 6.** Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje nukleotidnih zaporedji delov genov z metodo multipleks PCR

začetni oligonukleotid 1	po 1 µl vsakega
začetni oligonukleotid 2	po 1 µl vsakega
PCR Master Mix	12,5 µl
destilirana voda	4 µl
celični lizat	2,5 µl

3.2.1.4 Pogoji pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedji genov *fimH*, *hra*, *ibeA*, *kpsMT II*, *papG II*, *picU*, *sat*, *sfa*, *vat* in PAI IV.

začetna denaturacija	95° C	150 sekund	1×
denaturacija	94° C	30 sekund	
prileganje začetnih oligonukleotidov	64° C	30 sekund	30×
pomnoževanje	72° C	30 sekund	
končno pomnoževanje	72° C	7 minut	1×

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedji genov *aslA*, *aer*, *bmaE*, *iroN*, *ompT*.

začetna denaturacija	95° C	150 sekund	1×
denaturacija	94° C	30 sekund	
prileganje začetnih oligonukleotidov	64° C	30 sekund	30×
pomnoževanje	72° C	45 sekund	
končno pomnoževanje	72° C	7 minut	1×

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedji genov *gafD*, *hbp*, *iha*, *iss*, *ompA*.

začetna denaturacija	95° C	150 sekund	1×
denaturacija	94° C	30 sekund	
prileganje začetnih oligonukleotidov	64° C	30 sekund	30×
pomnoževanje	72° C	60 sekund	
končno pomnoževanje	72° C	7 minut	1×

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedji genov *hlyA*, *usp*.

začetna denaturacija	95° C	150 sekund	1×
denaturacija	94° C	30 sekund	
prileganje začetnih oligonukleotidov	64° C	30 sekund	30×
pomnoževanje	72° C	90 sekund	
končno pomnoževanje	72° C	7 minut	1×

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedji gena *hlyent*.

začetna denaturacija	95° C	150 sekund	1×
denaturacija	94° C	30 sekund	
prileganje začetnih oligonukleotidov	64° C	30 sekund	30×
pomnoževanje	72° C	120 sekund	
končno pomnoževanje	72° C	7 minut	1×

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedji genov *chuA*, *yja* in TSPE.C2.

začetna denaturacija	94° C	4 minute	1×
denaturacija	94° C	30 sekund	
prileganje začetnih oligonukleotidov	59° C	30 sekund	30×
pomnoževanje	72° C	30 sekund	
končno pomnoževanje	72° C	5 minut	1×

- Program pomnoževanja nukleotidnih zaporedji genov *ibeA*, *kpsMT II* in *fimH* z multipleksom.

Z multipleksom smo pomnožili dele genov *ibeA*, *kpsMT II* in *fimH*. Uporabili smo enake pogoje pomnoževanja kot za posamezne reakcije teh delov genov.

- Pozitivne kontrole

Prisotnost delov genov za vse izbrane virulentne dejavnike so preverjali pri drugi raziskavi, ki je ravno tako potekala v našem laboratoriju. V tej raziskavi so bile uporabljene enake reakcijske mešanice ter programi pomnoževanja nukleotidov za reakcijo PCR. Potrdili so, da so izbrane mešanice in programi ustrezni in da omogočajo pomnoževanje željenih delov genov (neobjavljeni podatki).

### 3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

Velikost pomnožkov PCR smo preverili v 1-, 1,5- in 2- odstotnem agaroznem gelu, odvisno od velikosti dobljenih fragmentov DNK.

1-odstotni agarozni gel smo pripravili tako, da smo 0,3 g agaroze s segrevanjem raztopili v 30 ml pufra 1×TBE, ohladili in dodali 1,5 µl 10 mg/ml etidijevega bromida. 1,5-odstotni agarozni gel smo pripravili tako, da smo 0,45 g agaroze s segrevanjem raztopili v 30 ml pufra 1×TBE, ohladili in dodali 1,5 µl 10 mg/ml etidijevega bromida. 2-odstotni agarozni gel smo pripravili tako, da smo 0,6 g agaroze s segrevanjem raztopili v 30 ml pufra 1×TBE, ohladili in dodali 1,5 µl 10 mg/ml etidijevega bromida. V jamice smo nanесли vzorec iz 5 delov raztopljenе DNK (5 µl) in 1 del nanašalnega barvila za elektroforezo (Fermentas). Elektroforeza je potekala v pufru 1×TBE, pri napetosti 10 V/cm gela.

Produkte izolacije plazmidne DNK smo preverili na 0,8-odstotnem agaroznem gelu, ki smo ga pripravili tako, da smo 0,24 g agaroze raztopili v 30 ml pufra 1×TBE, ohladili in dodali 1,5 µl 10 mg/ml etidijevega bromida. V jamice smo nanесли vzorec iz 5 delov raztopljenе DNK (10 oziroma 15 µl) in 1 del nanašalnega pufra za elektroforezo (Fermentas). Elektroforeza je potekala v pufru 1×TBE, pri napetosti 0,5 V/cm gela.

Za označevanje velikosti na gelu smo uporabili 1-kb DNK-lestvico (Fermentas) z velikostjo fragmentov 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250 bp in 50-bp DNK-lestvico (Fermentas) z velikostjo fragmentov 1000, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 250, **200**, 150, **100**, 50 bp.

### **3.2.3 Ugotavljanje filogenetskih skupin in podskupin sevov *E. coli* občutljivih in odpornih proti fluorokinolonom**

Seve smo razdelili na osnovi prisotnosti dveh genov *chuA* in *yjaA* ter DNK fragmenta TSPE4.C2 (glej preglednico 1. na strani 5, povzeto po Branger in sod., 2005).

### **3.2.4 Ugotavljanje odpornosti proti antibiotikom**

Podatke o odpornosti oziroma občutljivosti sevov za protimikrobne snovi ciprofloksacin, norfloksacin in sulfametoksazol-trimetoprim smo dobili iz Inštituta za varovanje zdravja Ljubljana. Uporabili so difuzijsko metodo z diski. Za seve 1056/1, 1056/2 in 1056/3 smo postopek ponovili tudi v našem laboratoriju in potrdili rezultate iz IVZ. Uporabili smo diske proizvajalca OXID.

### **3.2.5 Izolacija plazmidne DNK s kompletom »QIAGEN Plasmid Midi Kit«**

Delali smo po postopku za izolacijo plazmidov, ki so v celici v velikem številu. Precepili smo eno bakterijsko kolonijo iz plošče LB v tekoče gojišče LB in jo inkubirali osem ur na rotacijskem stresalniku. Startersko kulturo smo ponovno precepili v 25 ml tekočega gojišča LB in ponovno inkubirali preko noči na rotacijskem stresalniku. Naslednji dan smo zraslo bakterijsko kulturo odcentrifugirali (centrifuga Sorval, 6000 obr./min, 15 min, 4° C) in celice resuspendirali v 4 ml pufra P1. Nato smo dodali pufer P2, premešali z obračanjem (4 do 6-krat) in pustili inkubirati 5 min pri sobni temperaturi. V naslednjem koraku smo dodali pufer P3, ponovno premešali z obračanjem (4 do 6-krat) in inkubirali na ledu 15 do 20 min. Nato smo centrifugirali (centrifuga Sorval, 20 000 obr./min, 30 min, 4° C). Odpipetirali smo supernatant in ga ponovno centrifugirali (centrifuga Sorval, 20 000 obr./min, 15 min, 4° C). Medtem smo si pripravili kolono (QIAGEN-tip). Najprej smo ga prelili s 4 ml pufra QBT in počakali, da odteče. Nato smo skozi pripravljeno kolono spustili naš supernatant in počakali da odteče. QIAGEN kolono smo nato dvakrat sprali s po 10 ml pufra QC. V naslednjem koraku smo vezano DNK sprostili iz kolone s 5 ml pufra

QF. DNK smo nato oborili s 3,5 ml izopropanola sobne temperature in mešanico centrifugirali (centrifuga Sorval, 15 000 obr./min, 30 min, 4° C). Dobljeno usedlino smo sprali z 2 ml 70-odstotnega etanola sobne temperature, ponovno centrifugirali (centrifuga Sorval, 15 000 obr./min, 10 min, 4 °C) in odpipetirali ves etanol. Usedlino smo posušili na zraku in ga raztopili v 200 µl pufra TE z RNazo.

### **3.2.6 Konjugacija plazmidov iz sevov 1056/1, 1056/2 in 1056/3**

Konjugacijske zmesi smo pripravili tako, da smo na trdno gojišče BHI razmazali recipientski sev *E. coli* J53 Az<sup>r</sup>, ki je odporen proti natrijevemu azidu. Prek tega smo razmazali donorske seve 1056/1, 1056/2 in 1056/3. Plošče smo inkubirali pri 37 °C oziroma pri 41 °C preko noči. Naslednji dan smo polno zanko bakterij precepili na trdna selektivna gojišča LB z natrijevim azidom in ampicilinom, natrijevim azidom in kloramfenikolom, natrijevim azidom in tetraciklinom ter natrijevim azidom in trimetoprimom. Konjugacijo smo ponovili tudi pri višji temperaturi (40 °C).

### **3.2.7 Fisherjev test**

S pomočjo Fisherjevega testa smo izračunali, katere izmed razlik v pogostosti pojavljanja delov genov za izbrane virulentne dejavnike med obema skupinama sevov *E. coli* (proti fluorokinolonom odporna skupina in za fluorokinolone občutljiva skupina sevov), so statistično značilne. Uporabili smo Fisherjev test iz internetne strani <http://www.matforsk.no/ola.fisher.htm>.

## 4 REZULTATI

### 4.1 ZBIRKA SEVOV

Zbrali smo 102 uropatogena seva *E. coli*. Seve so izolirali in identificirali na Inštitutu za varovanje zdravja v Ljubljani. Sevi so bili izolirani iz urina pacientov iz enot Zdravstvenega doma Ljubljana z nekomplirano infekcijo sečil. Seve smo razdelili v dve skupini glede na odpornost proti fluorokinolonom (ciprofloksacin, norfloksacin), na skupino sevov, ki so proti fluorokinolonom odporni in skupino sevov, ki so za fluorokinolone občutljivi. Odpornost oziroma občutljivost je bila določena na Inštitutu za varovanje zdravja z difuzijsko metodo z diski. Nadalje smo pri vsaki od skupin sevov preverjali prisotnost delov genov izbranih triindvajsetih virulentnih dejavnikov in uvrstitev sevov v filogenetske skupine. Preverili smo tudi hemolitičnost sevov na ploščah KA-IVZ.

Preučevali smo 48 proti fluorokinolonom odpornih sevov in 54 za fluorokinolone občutljivih sevov.

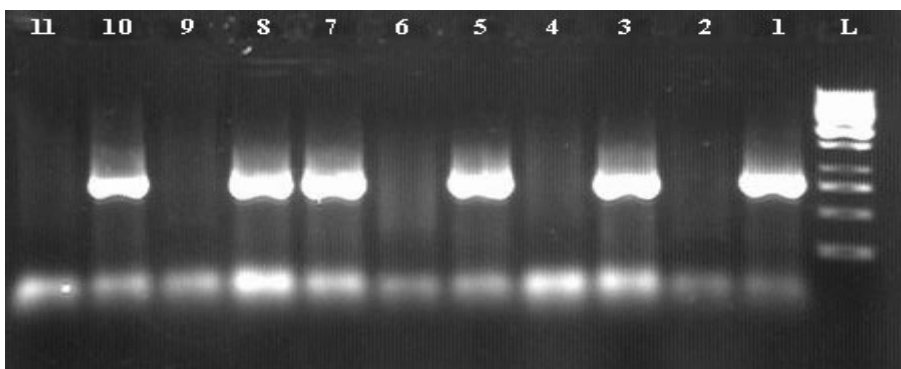
### 4.2 VIRULENTNI DEJAVNIKI IN UVRŠČENOST V FILOGENETSKE SKUPINE PROTI FLUOROKINOLONOM ODPORNIH SEVOV *E. coli*

#### 4.2.1 Adhezini

Preverjali smo prisotnost delov genov *fimH* (fimbrije tipa 1), *papGII* (fimbrije P), *iha*, *hra* (nefimbrialna adhezina), *sfa* (fimbrije S), *gafD* (fimbrije G) in *bmaE* (fimbrije M).

Uporabili smo metodo PCR in velikost PCR-pomnožkov preverili na 1 % agaroznem gelu (glej Material in metode). Na sliki 2 je prikazan primer preverjanja prisotnosti dela gena *iha* (velikost PCR-pomnožka je 872 bp).



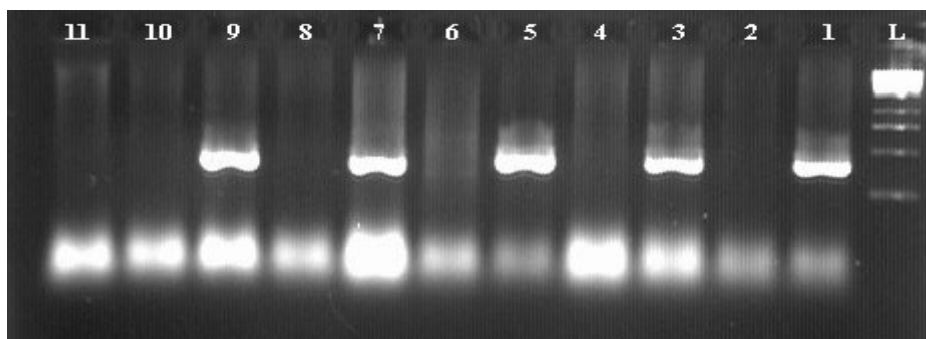


**Slika 2.** Elektroforeza PCR-pomnožkov dela gena *iha* (sevi z delovno oznako od 11 do 1; L- 1-kb DNK-lestvica)

Dele genov *fimH* smo pomnožili pri 48 (100 %), *papGII* pri 17 (35,4 %), *iha* pri 18 (37,5 %), *hra* pri 7 (14,6 %) in *sfa* pri 10 (20,8 %) proti fluorokinolonom odpornih sevih. Delov genov *gafD* in *bmaE* nismo pomnožili pri nobeden od proti fluorokinolonom odpornih sevov.

#### 4.2.2 Toksini in invazini

Preverjali smo prisotnost delov genov *hlyA* ( $\alpha$ -hemolizin), EHEC-*hlyA* (enterohemolizin), *hbp*, *sat*, *vat*, *picU* (avtotransporterski proteini), *ompT* (omptin T), *ompA* (zunanji membranski protein A) ter *ibeA* in *asl* (proteina povezana s preходом krvno-možganske pregrade). Uporabili smo metodo PCR in velikost PCR-pomnožkov preverili na 1 % agaroznem gelu (glej Material in metode). Na sliki 3 je prikazan primer preverjanja prisotnosti dela gena *sat* (velikost PCR-pomnožka je 387 bp).

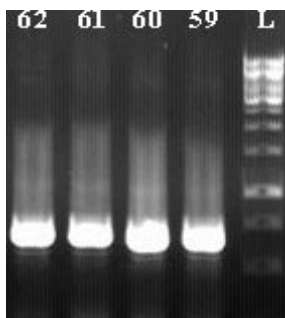


**Slika 3.** Elektroforeza PCR-pomnožkov dela gena *sat* (sevi z delovno oznako od 11 do 1; L- 1-kb DNK-lestvica)

Dele genov *sat* smo pomnožili pri 11 (22,9 %), *ompT* pri 11 (22,9 %), *ompA* pri 42 (87,5 %), *ibeA* pri 11 (22,9 %) in *usp* pri 6 (12,5 %) proti fluorokinolonom odpornih sevih. Dele gena *hbp* smo pomnožili pri 4 (8,3 %), *vat* pri 2 (4,2 %) in *picU* pri 5 sevih (10,4 %). Delov genov *hlyA*, EHEC-*hlyA* in *asl* nismo pomnožili pri nobenem proti fluorokinolonu odpornem sevu.

#### 4.2.3 Mehanizmi za privzem železa

Preverjali smo prisotnost delov genov *aer* (aerobaktin) in *iroN* (kateholatni sideroforni receptor). Uporabili smo metodo PCR in velikost PCR-pomnožkov preverili na 1 % agaroznem gelu (glej Material in metode). Na sliki 4 je prikazan primer preverjanja prisotnosti dela gena *iroN* (velikost PCR-pomnožka je 665 bp).



**Slika 4.** Elektroforeza PCR-pomnožkov dela gena *iroN* (sevi z delovno oznako od 62 do 59; L- 1-kb DNK-lestevica)

Del gena *aer* smo pomnožili pri 30 (62,5 %) in del gena *iroN* pri 18 (37,5 %) proti fluorokinolonom odpornih sevih.

#### 4.2.4 Dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu

Preverjali smo prisotnost delov genov *kpsMTII* in *iss*, ki bakterijam omogočijo izogibanje imunskemu sistemu in serumsko odpornost. Uporabili smo metodo PCR in velikost PCR-pomnožkov preverili na 1 % agaroznem gelu.

Del gena *kpsMTII* smo pomnožili pri 20 (41,7 %) in del gena *iss* pri 8 (14,6 %) proti fluorokinolonom odpornih sevih.

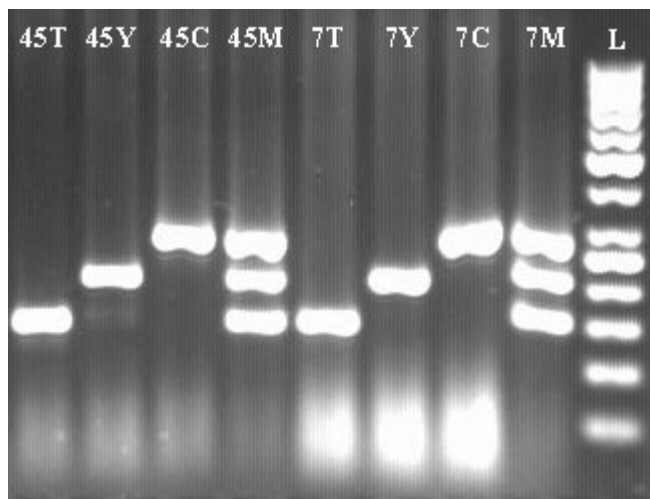
#### 4.2.5 Otok patogenosti št. IV

Preverjali smo prisotnost otoka patogenosti številka IV (PAI IV). Uporabili smo metodo PCR in velikost PCR-pomnožkov preverili na 1 % agaroznem gelu.

PAI IV je imelo 31 (64,6 %) proti fluorokinolonom odpornih sevov.

#### 4.2.6 Filogenetske skupine

Proti fluorokinolonom odporne seve smo uvrstili v filogenetske skupine in podskupine. Uporabili smo metodo PCR in velikost PCR-pomnožkov preverili na 2 % agaroznem gelu (glej Material in metode). Na sliki 5 je prikazan primer preverjanja prisotnosti delov genov *chuA*, *yja* in TSPE4.C2 (velikost PCR-pomnožkov je *chuA*- 279 bp, *yja*- 211 bp in TSPE4.C2- 152 bp).



**Slika 5.** Elektroforeza PCR-pomnožkov fragmentov za določanje filogenetskih skupin. (7, 45- delovni oznaki sevov; M-multipleks, C- posamezen PCR za fragment *chuA*, Y- posamezen PCR za fragment *yjaA*, T- posamezen PCR za fragment TSPE4.C2; L- lestvica 50 bp)

Največ sevov (33,3 %) smo uvrstili v filogenetsko skupino D, od tega 14 sevov (29,2 %) v podskupino D<sub>1</sub> in 2 (4,1 %) v podskupino D<sub>2</sub>. 14 (29,2 %) sevov smo uvrstili v filogenetsko skupino B2, 13 (27,1 %) v podskupino B2<sub>3</sub> in enega v podskupino B2<sub>2</sub>. V filogenetsko skupino A smo uvrstili 13 (27,1 %) sevov, od katerih je bil eden iz podskupine A<sub>0</sub>, ostali pa iz podskupine A<sub>1</sub>. V skupino B1 smo uvrstili 5 (10,4 %) sevov.

#### **4.2.7 Hemoliza na ploščah KA-IVZ**

Hemolizo na ploščah smo zabeležili pri proti fluorokinolonom odpornih sevih z delovno oznako 11, 15, 20, 21, 22 in 23.

Vsi rezultati o virulentnih dejavnikih, uvrstitvi v filogenetske skupine in hemolizi na ploščah proti fluorokinolonom odpornih sevov so zbrani v preglednicah 7 in 8.

**Preglednica 7.** Proti fluorokinolonom odporni sevi *E. coli* : delovna oznaka, oznaka seva, vir, odpornost proti antibiotikom, filogenetska podskupina, prisotnost virulentnih dejavnikov

Delovna oznaka	sev	Vir	cip/nor/sxt	FpS	ADHEZINI						IZOGIB IM. SIS.		PAI IV	
					<i>fimH</i>	<i>papG II</i>	<i>iha</i>	<i>hra</i>	<i>sfa</i>	<i>gafD</i>	<i>bmaE</i>	<i>kpsMT II</i>		<i>iss</i>
1	2865	ZD	RRR	B2 <sub>3</sub>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
2	2853-1	ZD	RRS	D <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
4	2646-1	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	3864-1	ZD	ROS	D <sub>1</sub>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
7	2395	ZD	RRR	B2 <sub>3</sub>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
8	2479	ZD	ROS	D <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
10	2685	ZD	RRR	B2 <sub>2</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
11	2427	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
12	3677	ZD	IIR	B2 <sub>3</sub>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
13	3589	ZD	RRS	A <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
14	2731-1	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
15	3632	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
16	2656-1	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
17	2717	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
18	3840	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
19	2851-1	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
20	2427-2	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
21	3866-4	ZD	RRS	A <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
22	3866-1	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
23	140	ZD	RRS	B2 <sub>3</sub>	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
25	164-1	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
38	243	ZD	RRS	D <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
43	252	ZO	RRR	A <sub>1</sub>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
45	269	ZD	RRS	B2 <sub>3</sub>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
53	294	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	322	ZD	RRR	B2 <sub>3</sub>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
55	325	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	322-1	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
61	354-1	ZD	IIR	B1	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
62	354-2	ZD	IIR	B1	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
65	420-1	OD	RRR	B2 <sub>3</sub>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
76	601	ZD	RRR	B2 <sub>3</sub>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+

Delovna oznaka	sev	Vir	cip/nor/sxt	FpS	<i>fimH</i>	<i>papG II</i>	<i>iha</i>	<i>hra</i>	<i>sfa</i>	<i>gafD</i>	<i>bmaE</i>	<i>kpsMT II</i>	<i>iss</i>	PAI IV
83	575-3	ZD	RRS	B2 <sub>3</sub>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
90	497	ZD	RRR	D <sub>2</sub>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
97	605	ZD	RRR	B2 <sub>3</sub>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
105	469	ZD	RRS	B2 <sub>3</sub>	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
115	531-1	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
117	715-1	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
118	679-1	ZD	RRR	A <sub>0</sub>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
119	706-2	ZD	RRR	B2 <sub>3</sub>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
120	728-1	ZO	RRR	D <sub>1</sub>	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
121	765	ZD	RRS	D <sub>2</sub>	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
123	832	ZD	RRS	B2 <sub>3</sub>	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
124	833	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
125	878	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	1056/1	ZO	RRS	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1056/2	ZO	RRS	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1056/3	ZO	RRS	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Odstotek sevov (%)					100	35,4	37,5	14,6	20,8	0	0	41,7	14,6	64,6

IZOGIB IM. SIS.- virulentni dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu in za serumsko odpornost,

ZD- ENOTA ZDRAVSTVENEGA DOMA, ZO- ZASEBNA ORDINACIJA,

cip- ciprofloksacin, nor- norfloksacin, sxt- sulfametoksazol-trimetoprim,

R- odporen, S-občutljiv, I- intermediaren, O- ni bil testiran,

FpS- filogenetska podskupina,

*fimH*- fimbrije tipa 1, *papG II*- fimbrije P, *iha*, *hra*- nefimbriialna adhezina, *sfa*- fimbrije S, *gafD*- fimbrije G, *bmaE*- fimbrije M, *kpsMT II*- kapsula tipa 2, *iss*- serumsko odpornost, PAI IV- otok patogenosti št. 4 (sev 536),

+ virulentni dejavnik je prisoten, - ni prisoten,

odstotek sevov – odstotek sevov, ki ima določen virulentni dejavnik.

**Preglednica 8.** Proti fluorokinolonom odporni sevi *E. coli* : delovna oznaka, oznaka seva, vir, odpornost proti antibiotikom, filogenetska podskupina, hemoliza na plošči, prisotnost virulentnih dejavnikov

Delovna oznaka	sev	Vir	cip/nor/sxt	FpS	Hemoliza na plošči	TOKSINI							INVAZINI			BKT	ŽELEZO		VD
						<i>hlyA</i>	EHEC- <i>hlyA</i>	<i>hbp</i>	<i>sat</i>	<i>vat</i>	<i>picU</i>	<i>ompT</i>	<i>ompA</i>	<i>ibeA</i>	<i>asl</i>	<i>usp</i>	<i>aer</i>	<i>iroN</i>	
1	2865	ZD	RRR	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	8
2	2853-1	ZD	RRS	D <sub>1</sub>	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	6
4	2646-1	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	4
5	3864-1	ZD	ROS	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	8
7	2395	ZD	RRR	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	6
8	2479	ZD	ROS	D <sub>1</sub>	?	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	5
10	2685	ZD	RRR	B2 <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	8
11	2427	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	4
12	3677	ZD	IIR	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	8
13	3589	ZD	RRS	A <sub>1</sub>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	6
14	2731-1	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	8
15	3632	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	6
16	2656-1	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	4
17	2717	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	?	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	4
18	3840	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	5
19	2851-1	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	5
20	2427-2	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	4
21	3866-4	ZD	RRS	A <sub>1</sub>	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
22	3866-1	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	++	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	4
23	140	ZD	RRS	B2 <sub>3</sub>	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	10
25	164-1	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	7
38	243	ZD	RRS	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	4
43	252	ZO	RRR	A <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
45	269	ZD	RRS	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	6
53	294	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	5
54	322	ZD	RRR	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	7
55	325	ZD	RRR	A <sub>1</sub>	?	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	4
56	322-1	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	12
61	354-1	ZD	IIR	B1	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	9
62	354-2	ZD	IIR	B1	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	9
65	420-1	OD	RRR	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	9

Delovna oznaka	sev	Vir	cip/nor/sxt	FpS	Hemoliza na plošči	<i>hlyA</i>	EHEC- <i>hlyA</i>	<i>hbp</i>	<i>sat</i>	<i>vat</i>	<i>picU</i>	<i>ompT</i>	<i>ompA</i>	<i>ibeA</i>	<i>asl</i>	<i>usp</i>	<i>aer</i>	<i>iroN</i>	VD
76	601	ZD	RRR	B <sub>23</sub>	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	9
83	575-3	ZD	RRS	B <sub>23</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	6
90	497	ZD	RRR	D <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	5
97	605	ZD	RRR	B <sub>23</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	8
105	469	ZD	RRS	B <sub>23</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	8
115	531-1	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	6
117	715-1	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	7
118	679-1	ZD	RRR	A <sub>0</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	5
119	706-2	ZD	RRR	B <sub>23</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	8
120	728-1	ZO	RRR	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	9
121	765	ZD	RRS	D <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	9
123	832	ZD	RRS	B <sub>23</sub>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	10
124	833	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	8
125	878	ZD	RRR	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	5
	1056/1	ZO	RRS	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2
	1056/2	ZO	RRS	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2
	1056/3	ZO	RRS	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2
Odstotek sevov (%)					12,5	0	0	8,3	22,9	4,2	10,4	22,9	87,5	22,9	0	12,5	62,5	37,5	

BKT.- bakteriocin, ŽELEZO- sistemi za privzem železa,

ZD- ENOTA ZDRAVSTVENEGA DOMA, ZO- ZASEBNA ORDINACIJA,

cip- ciprofloksacin, nor- norfloksacin, sxt- sulfametoksazol-trimetoprim,

R- odporen, S-občutljiv, I- intermediaren, O- ni bil testiran,

FpS- filogenetska podskupina,

*hlyA*- hemolizin *a*, *hlyent*- enterohemolizin, *hbp*- protein, ki razgradi hemoglobin, *sat*, *vat*, *picU*- avtotransporterski toksini, *ompT*- omptin T, *ompA*, *ibeA*, *asl*- invazini, *usp*- bakteriocin, *aer*, *iroN*- sistema za privzem železa, VD- število virulentnih dejavnikov (od vseh 23ih), ki jih ima sev,

+ virulentni dejavnik (hemoliza) je prisoten, - ni prisoten, ?- nedoločljivo,

odstotek sevov – odstotek sevov, ki ima določen virulentni dejavnik.



### 4.3 VIRULENTNI DEJAVNIKI IN UVRŠČENOST V FILOGENETSKE SKUPINE ZA FLUOROKINOLONE OBČUTLJIVIH SEVOV *E. coli*

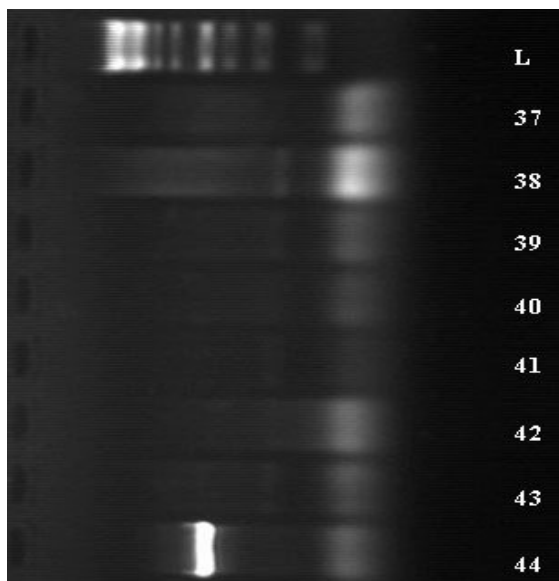
#### 4.3.1 Adhezini

Preverjali smo prisotnost delov genov *fimH* (fimbrije tipa 1), *papGII* (fimbrije P), *iha*, *hra* (nefimbrialna adhezina), *sfa* (fimbrije S), *gafD* (fimbrije G) in *bmaE* (fimbrije M). Uporabili smo metodo PCR in velikost PCR-pomnožkov preverili na 1 % agaroznem gelu (glej Material in metode).

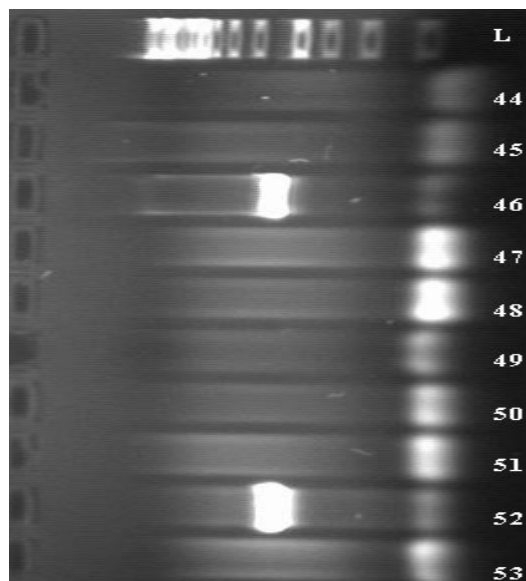
Dele genov *fimH* smo pomnožili pri 52 (96 %), *papGII* pri 25 (46 %), *iha* pri 21 (39 %), *hra* pri 16 (29,6 %), *sfa* pri 20 (37 %) in *bmaE* pri 2 (3,7%) za fluorokinolone odpornih sevih. Pomnožka dela gena *gafD* nismo dobili pri nobenem za fluorokinolone občutljivem sevu.

#### 4.3.2 Toksini in invazini

Preverjali smo prisotnost delov genov za toksine in invazine *hlyA* ( $\alpha$ -hemolizin), EHEC-*hlyA* (enterohemolizin), *hbp*, *sat*, *vat*, *picU* (avtotransporterski proteini), *ompT* (omptin T), *ompA* (zunanji membranski protein A) ter *ibeA* in *asl* (proteina povezana s preходом krvno-možganske pregrade). Uporabili smo metodo PCR in velikost PCR-pomnožkov preverili na 1 % agaroznem gelu (glej Material in metode). Na slikah 6 in 7 je prikazan primer preverjanja prisotnosti delov genov *hlyA* (velikost PCR-pomnožka je 1177 bp) in *hbp* (velikost PCR-pomnožka je 920 bp).



**Slika 6.** Elektroforeza PCR-pomnožkov dela gena *hbp* (L- 1-kb DNK-lestvica; sevi z delovno oznako 37 do 44)

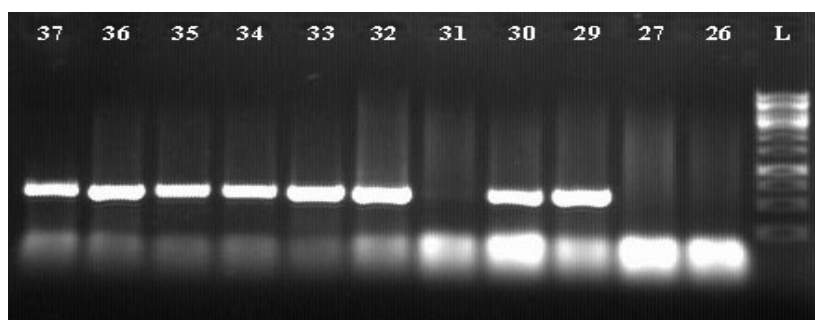


**Slika 7.** Elektroforeza PCR-pomnožkov dela gena *hlyA* (L- 1-kb DNK-lestvica; sevi z delovno oznako 44 do 53)

Dele genov *hlyA* smo pomnožili pri 10 (18,5 %), *sat* pri 14 (26 %), *vat* pri 6 (11 %), *picU* pri 14 (26 %), *ompT* pri 11 (20 %), *ompA* pri 49 (91 %), *ibeA* pri 8 (15 %) *usp* pri 16 (29,6 %) in *hbp* pri 2 (3,7 %) za fluorokinolone občutljivih sevih. Pomnožkov delov genov EHEC-*hlyA* in *asl* nismo dobili pri nobenem za fluorokinolone občutljivem sevu.

#### 4.3.3 Mehanizmi za privzem železa

Preverjali smo prisotnost delov genov *aer* (aerobaktin) in *iroN* (kateholatni sideroforni receptor). Uporabili smo metodo PCR in velikost PCR-pomnožkov preverili na 1 % agaroznem gelu (glej Material in metode). Na sliki 8 je prikazan primer preverjanja prisotnosti dela gena *aer* (velikost PCR-pomnožka je 602 bp).



**Slika 8.** Elektroforeza PCR-pomnožkov dela gena *aer* (sevi z delovno oznako 37 do 29 in 27 ter 26; L- 1-kb DNK-lestvica)

Del gena *aer* smo pomnožili pri 32 (57 %) in del gena *iroN* pri 36 (66,6 %) za fluorokinolone občutljivih sevih.

#### 4.3.4 Dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu

Preverjali smo prisotnost delov genov *kpsMTII* in *iss*, ki bakterijam omogočijo izogibanje imunskemu sistemu in serumsko odpornost. Uporabili smo metodo PCR in velikost PCR-pomnožkov preverili na 1 % agaroznem gelu.

Del gena *kpsMTII* smo pomnožili pri 39 (72 %) in del gena *iss* pri 13 (24 %) za fluorokinolone občutljivih sevih.

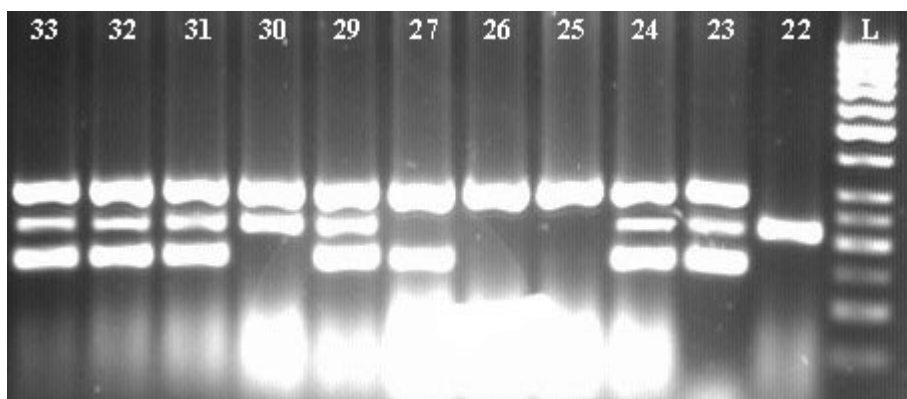
#### 4.3.5 Otok patogenosti št. IV

Preverjali smo prisotnost otoka patogenosti številka IV (PAI IV). Uporabili smo metodo PCR in velikost pomnožkov PCR preverili na 1 % agaroznem gelu.

PAI IV je imelo 44 (81,5 %) za fluorokinolone občutljivih sevov.

#### 4.3.6 Filogenetske skupine

Za fluorokinolone občutljive seve smo uvrstili v filogenetske skupine in podskupine. Uporabili smo metodo PCR in velikost PCR-pomnožkov preverili na 2 % agaroznem gelu (glej Material in metode). Na sliki 9 je prikazan primer preverjanja prisotnosti delov genov *chuA*, *yja* in TSPE4.C2 (velikosti PCR pomnožkov so *chuA*-279 bp, *yja*-211 bp in TSPE4.C2- 152 bp).



**Slika 9.** Elektroforeza PCR-pomnožkov fragmentov za določanje filogenetskih skupin (sevi z delovno oznako 33 do 29 in 27do 22; L- lestvica 50 bp)

Največ sevov (55,5 %) smo uvrstili v filogenetsko skupino B2, od tega 27 (50 %) v podskupino B2<sub>3</sub> in 3 (5,5 %) v podskupino B2<sub>2</sub>. 17 (31 %) sevov smo uvrstili v filogenetsko skupino D, 9 (16,7 %) v podskupino D<sub>1</sub> in 8 (14,8 %) v podskupino D<sub>2</sub>. V filogenetsko skupino A smo uvrstili 4 seve (7,4 %), vse v podskupino A<sub>1</sub>. V skupino B1 smo uvrstili 3 seve (5,5 %).

#### **4.3.7 Hemoliza na ploščah KA-IVZ**

Hemolize na ploščah nismo zabeležili pri nobenem od za fluorokinolone občutljivih sevov.

Vsi podatki o virulentnih dejavnikih in uvrstitvi v filogenetske skupine za fluorokinolone občutljivih sevov so zbrani v preglednicah 9 in 10.

**Preglednica 9.** Za fluorokinolone občutljivi sevi *E. coli* : delovna oznaka, oznaka seva, vir, odpornost proti antibiotikom, filogenetska podskupina, prisotnost virulentnih dejavnikov

Delovna oznaka	sev	Vir	Cip/nor/sxt	FpS	ADHEZINI							IZOGIB IM.SIS		PAI
					<i>fimH</i>	<i>papG II</i>	<i>iha</i>	<i>hra</i>	<i>sfa</i>	<i>gafD</i>	<i>bmaE</i>	<i>kpsMT</i>	<i>iss</i>	PAI IV
24	150	ZO	SSS	B2 <sub>3</sub>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
26	167	ZD	SSR	D <sub>1</sub>	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
27	172-1	ZD	SSS	D <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	142	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
30	171	ZD	SSR	B2 <sub>3</sub>	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
31	202	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
32	205	ZO	SSR	B2 <sub>3</sub>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
33	211	ZD	SSS	B2 <sub>2</sub>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
34	216	ZD	SSR	D <sub>1</sub>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
35	219	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
36	222	ZD	SSS	A <sub>1</sub>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
37	267	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
39	312-1	ZD	SSS	D <sub>1</sub>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
40	312-2	ZD	SSS	D <sub>1</sub>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
41	240-2	ZD	SSR	B1	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
42	245	ZD	SOS	D <sub>1</sub>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
44	237	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
46	302	ZD	SSS	D <sub>2</sub>	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
47	272	ZD	SSS	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	275	ZD	SSS	D <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
49	277	ZD	SSR	B2 <sub>3</sub>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
50	299	ZD	SSS	D <sub>2</sub>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
51	296	ZD	SSS	B2 <sub>2</sub>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
52	295	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
57	333-1	ZD	SSS	D <sub>2</sub>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
58	344-1	ZO	SSS	B2 <sub>3</sub>	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
59	340-1	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
60	358-1	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
63	384-1	ZD	SIR	B2 <sub>3</sub>	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
64	385-1	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
66	383-1	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
69	426-1	OD	SSS	B2 <sub>3</sub>	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
70	433-1	ZD	SSR	B2 <sub>3</sub>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+

Delovna oznaka	sev	Vir	Cip/nor/sxt	FpS	<i>fimH</i>	<i>papG II</i>	<i>iha</i>	<i>hra</i>	<i>sfa</i>	<i>gafD</i>	<i>bmaE</i>	<i>kpsMT</i>	<i>iss</i>	PAI IV
71	240-1	ZD	SSR	A <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
72	686	ZD	SSR	A <sub>1</sub>	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
73	520	ZD	SSS	B <sub>23</sub>	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
74	576	ZO	SSS	D <sub>1</sub>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
75	536	ZD	SSS	B <sub>23</sub>	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
77	450-2	ZD	SSR	B <sub>23</sub>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
78	514	ZD	SSS	D <sub>2</sub>	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
79	521	ZD	SSR	B <sub>23</sub>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
80	555	ZD	SSR	D <sub>1</sub>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
81	608	ZD	SSR	D <sub>2</sub>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
82	661	ZD	SSR	B <sub>23</sub>	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
84	523-1	ZD	SOR	B <sub>23</sub>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
85	622	ZD	SSS	B <sub>22</sub>	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
86	675	ZO	SSS	B <sub>23</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
87	457	ŠD	SSR	D <sub>2</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
88	500	ZD	SSR	D <sub>1</sub>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
89	603	OD	SSS	A <sub>1</sub>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
91	560	ZD	SSS	B1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
93	453-1	ZD	SSR	D <sub>2</sub>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
94	691	ZD	SSS	B <sub>23</sub>	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
122	799	ZD	SSS	B <sub>23</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Odstotek sevov (%)					96	46	39	29,6	37	0	3,7	72	24	81,5

IZOGIB IM. SIS.- virulentni dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu in za serumsko odpornost,

ZD- ENOTA ZDRAVSTVENEGA DOMA, ZO- ZASEBNA ORDINACIJA,

cip- ciprofloksacin, nor- norfloksacin, sxt- sulfametoksazol-trimetoprim,

R- odporen, S- občutljiv, I- intermediaren, O- ni bil testiran,

FpS- filogenetska podskupina,

*fimH*- fimbrije tipa 1, *papG II*- fimbrije P, *iha*, *hra*- nefimbrialna adhezina, *sfa*- fimbrije S, *gafD*- fimbrije G, *bmaE*- fimbrije M, *kpsMT II*- kapsula tipa 2, *iss*- serumska odpornost, PAI IV- otok patogenosti št. 4 (sev 536),

+ - virulentni dejavnik je prisoten, - ni prisoten,

odstotek sevov – odstotek sevov, ki ima določen virulentni dejavnik.

**Preglednica 10.** Za fluorokinolone občutljivi sevi *E. coli* : delovna oznaka, oznaka seva, vir, odpornost proti antibiotikom, filogenetska podskupina, hemoliza na plošči, prisotnost virulentnih dejavnikov

Delovna oznaka	sev	Vir	Cip/nor/sxt	FpS	Hemoliza na plošči	TOKSINI							INVAZINI			BKT	ŽELEZO		VD
						<i>hlyA</i>	EHEC- <i>hlyAt</i>	<i>hbp</i>	<i>sat</i>	<i>vat</i>	<i>picU</i>	<i>ompT</i>	<i>ompA</i>	<i>ibeA</i>	<i>asl</i>	<i>usp</i>	<i>aer</i>	<i>iroN</i>	
24	150	ZO	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	8
26	167	ZD	SSR	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	6
27	172-1	ZD	SSS	D <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
29	142	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	14
30	171	ZD	SSR	B2 <sub>3</sub>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	12
31	202	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	8
32	205	ZO	SSR	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	13
33	211	ZD	SSS	B2 <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	8
34	216	ZD	SSR	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	8
35	219	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	13
36	222	ZD	SSS	A <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	7
37	267	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	7
39	312-1	ZD	SSS	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	8
40	312-2	ZD	SSS	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	8
41	240-2	ZD	SSR	B1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	7
42	245	ZD	SOS	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	8
44	237	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	10
46	302	ZD	SSS	D <sub>2</sub>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	8
47	272	ZD	SSS	B1	?	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
48	275	ZD	SSS	D <sub>1</sub>	?	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	4
49	277	ZD	SSR	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	6
50	299	ZD	SSS	D <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	4
51	296	ZD	SSS	B2 <sub>2</sub>	?	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	5
52	295	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	11
57	333-1	ZD	SSS	D <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	7
58	344-1	ZO	SSS	B2 <sub>3</sub>	?	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	10
59	340-1	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	10
60	358-1	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	9
63	384-1	ZD	SIR	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	8
64	385-1	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	10
66	383-1	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	7
69	426-1	OD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	13
70	433-1	ZD	SSR	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	8

Delovna oznaka	sev	Vir	Cip/nor/sxt	FpS	Hemoliza na plošči	<i>hlyA</i>	EHEC- <i>hlyA</i>	<i>hbp</i>	<i>sat</i>	<i>vat</i>	<i>picU</i>	<i>ompT</i>	<i>ompA</i>	<i>ibeA</i>	<i>asl</i>	<i>usp</i>	<i>aer</i>	<i>iroN</i>	VD
71	240-1	ZD	SSR	A <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	8
72	686	ZD	SSR	A <sub>1</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	12
73	520	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	10
74	576	ZO	SSS	D <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	6
75	536	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	7
77	450-2	ZD	SSR	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
78	514	ZD	SSS	D <sub>2</sub>	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	11
79	521	ZD	SSR	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	8
80	555	ZD	SSR	D <sub>1</sub>	?	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	7
81	608	ZD	SSR	D <sub>2</sub>	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	9
82	661	ZD	SSR	B2 <sub>3</sub>	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	11
84	523-1	ZD	SOR	B2 <sub>3</sub>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	8
85	622	ZD	SSS	B2 <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	7
86	675	ZO	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
87	457	ŠD	SSR	D <sub>2</sub>	?	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	5
88	500	ZD	SSR	D <sub>1</sub>	?	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	8
89	603	OD	SSS	A <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	7
91	560	ZD	SSS	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	5
93	453-1	ZD	SSR	D <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	6
94	691	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	14
122	799	ZD	SSS	B2 <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2
Odstotek sevov (%)					0	18,5	0	4	26	11	26	20	91	15	0	29,6	57	66,6	

BKT- bakteriocin, ŽELEZO- sistemi za privzem železa,

ZD- ENOTA ZDRAVSTVENEGA DOMA, ZO- ZASEBNA ORDINACIJA,

cip- ciprofloksacin, nor- norfloksacin, sxt- sulfametoksazol-trimetoprim,

R- odporen, S- občutljiv, I- intermediaren, O- ni bil testiran,

FpS- filogenetska podskupina,

*hlyA*- hemolizin  $\alpha$ , *hlyent*- enterohemolizin, *hbp*- protein, ki razgradi hemoglobin, *sat*, *vat*, *picU*- avtotransporterski toksini, *ompT*- omptin T, *ompA*, *ibeA*, *asl*- invazini, *usp*- bakteriocin, *aer*, *iroN*- sistema za privzem železa, VD- število virulentnih dejavnikov (od vseh 23ih), ki jih ima sev,

+ virulentni dejavnik (hemoliza) je prisoten, - ni prisoten, ?- nedoločljivo.



#### 4.4 PRIMERJAVA PROTI FLUOROKINOLONOM ODPORNIHNIH IN ZA FLUOROKINOLONE OBČUTLJIVIH SEVOV *E. coli*

##### 4.4.1 Virulentni dejavniki

Primerjali smo pogostost delov genov, ki kodirajo virulentne dejavnike, pri proti fluorokinolonom odpornih in za fluorokinolone občutljivih sevih vrste *E. coli*. Največje razlike so v pogostosti pojavljana delov genov za *kpsMTII*, *hlyA*, *iroN* in *usp*, ki so pogostejši pri za fluorokinolone občutljivih sevih; da je razlika statistično značilna pa smo potrdili tudi s Fisherejevim testom. Ostali podatki so prikazani v preglednici 11.

**Preglednica 11.** Pojavljanje delov genov, ki kodirajo virulentne dejavnikov pri sevih *E. coli*, ki so odporni proti oziroma občutljivi za fluorokinolone

Zapis za virulentni dejavnik	Proti fluorokinolonom odporni sevi <i>E. coli</i> (število sevov (%))	Za fluorokinolone občutljivi sevi <i>E. coli</i> (%) (število sevov (%))	p-vrednost
<i>fimH</i>	48 (100)	52 (96)	0,497
<i>papG II</i>	17 (35,4)	25 (46)	0,316
<i>iha</i>	18 (37,5)	21 (39)	1
<i>hra</i>	7 (14,6)	16 (29,6)	0,096
<i>sfa</i>	10 (20,8)	20 (37)	0,085
<i>gafD</i>	0 (0)	0 (0)	1
<i>bmaE</i>	0 (0)	2 (3,7)	0,497
<i>kpsMT II</i>	20 (41,7)	39 (72)	<b>0,002</b>
<i>iss</i>	8 (16,7)	13 (24)	0,463
PAI IV	31 (64,6)	44 (81,5)	0,072
<i>hbp</i>	4 (8,3)	2 (3,7)	0,416
<i>hlyA</i>	0 (0)	10 (18,5)	<b>0,001</b>
EHEC- <i>hlyA</i>	0 (0)	0 (0)	1
<i>sat</i>	11 (22,9)	14 (26)	0,819
<i>vat</i>	2 (4,2)	6 (11)	0,276
<i>picU</i>	5 (10,4)	14 (26)	0,072
<i>ompT</i>	11 (22,9)	11 (20)	0,812
<i>ompA</i>	42 (87,5)	49 (91)	0,752
<i>ibeA</i>	11 (22,9)	8 (15)	0,320
<i>asl</i>	0 (0)	0 (0)	1
<i>usp</i>	6 (12,5)	16 (29,6)	<b>0,053</b>
<i>iroN</i>	18 (37,5)	36 (66,6)	<b>0,005</b>
<i>aer</i>	30 (62,5)	32 (57)	0,840

#### 4.4.2 Filogenetske skupine

Vse seve *E. coli*, ki smo jih preučevali, smo uvrstili v filogenetske skupine in podskupine. Podatki o številu (odstotku) sevov proti fluorokinolonom odpornih in za fluorokinolone občutljivih sevov v posamezni podskupini in skupini so navedeni v preglednici 12.

**Preglednica 12.** Število (odstotek) proti fluorokinolonom odpornih in za fluorokinolone občutljivih sevov v posamezni filogenetski skupini in podskupini

FS	FpS	Fluorokinolon <sup>odp</sup>		Fluorokinolon <sup>obc</sup>	
<b>A</b>	A <sub>0</sub>	<b>13</b> (27,1 %)	1 (2,1 %)	<b>4</b> (7,4 %)	0 (0 %)
	A <sub>1</sub>		12 (25 %)		4 (7,4 %)
<b>B1</b>	B1	<b>5</b> (10,4 %)	5 (10,4 %)	<b>3</b> (5,6 %)	3 (5,5 %)
<b>B2</b>	B2 <sub>2</sub>	<b>14</b> (29,2 %)	1 (2,1 %)	<b>30</b> (55,5 %)	3 (5,5 %)
	B2 <sub>3</sub>		13 (27,1 %)		27 (50,0 %)
<b>D</b>	D <sub>1</sub>	<b>16</b> (33,3 %)	14 (29,2 %)	<b>17</b> (31,0 %)	9 (16,7 %)
	D <sub>2</sub>		2 (4,2 %)		8 (14,8 %)

FS- filogenetska skupina, FpS- filogenetska podskupina,  
 Fluorokinolon<sup>odp</sup>- število proti fluorokinolonom občutljivih sevov, Fluorokinolon<sup>obc</sup>- število za fluorokinolone občutljivih sevov

Proti fluorokinolonom odporni sevi so pogosteje uvrščeni v filogenetsko skupino A kot za fluorokinolone občutljivi sevi. Nasprotno je med za fluorokinolone občutljivimi sevi mnogo več sevov iz filogenetske skupine B2.

#### 4.4.3 Pogostost pojavljanja virulentnih dejavnikov pri sevih iz določene filogenetske skupine

Proti fluorokinolonom odporne in za fluorokinolone občutljive seve smo razvrstili v preglednici 13 in 14. V preglednicah so podatki, koliko sevov iz posamezne filogenetske skupine in podskupine ima določeno število virulentnih dejavnikov. Na primer: dva seva iz skupine A imata po sedem virulentnih dejavnikov. Na koncu smo izračunali, kolikšno je povprečno število virulentnih dejavnikov na sev v vsaki od filogenetskih skupin.

**Preglednica 13.** Število virulentnih dejavnikov proti fluorokinolonom odpornih sevov iz posamezne filogenetske podskupine

FpS	Število virulentnih dejavnikov														Št.VD/sev
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A <sub>0</sub>					1										4,46
A <sub>1</sub>			2	5	3	2									
<b>A</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<b>B1</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	4,80
B <sub>2</sub>								1							7,93
B <sub>2</sub> <sub>3</sub>						3	1	5	2	2					
<b>B2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
D <sub>1</sub>				3	2	2	2	3	1			1			6,69
D <sub>2</sub>					1				1						
<b>D</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

FpS- filogenetska podskupina

**Krepko**- filogenetska skupina

Št.VD/sev- povprečno število virulentnih dejavnikov na sev iz določene filogenetske skupine

**Preglednica 14.** Število virulentnih dejavnikov za fluorokinolone občutljivih sevov iz posamezne filogenetske podskupine

FpS	Število virulentnih dejavnikov														Št.VD/sev
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A <sub>0</sub>															8,75
A <sub>1</sub>							1	2				1			
<b>A</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<b>B1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	4,67
B <sub>2</sub>								2							8,90
B <sub>2</sub> <sub>3</sub>		1	2			0	4	5	2	4	1	2	3	2	
<b>B2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	
D <sub>1</sub>				1		2	1	5		0					6,70
D <sub>2</sub>	1			1	1	1	1	1	1		1				
<b>D</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

FpS- filogenetska podskupina

**Krepko**- filogenetska skupina

Št.VD/sev- povprečno število virulentnih dejavnikov na sev iz določene filogenetske skupine

Tako med proti fluorokinolonom odpornimi sevi kot tudi med za fluorokinolone občutljivimi sevi imajo sevi uvrščeni v filogenetsko skupino B2 največ virulentnih

dejavnikov. Pri za fluorokinolone odpornih sevih sledijo sevi uvrščeni v skupino D, medtem ko pri za fluorokinolone občutljivih sevih sledijo sevi uvrščeni v skupino A. Med proti fluorokinolonom odpornimi sevi imajo sevi uvrščeni v filogenetsko skupino A najmanj virulentnih dejavnikov. V skupini za fluorokinolone občutljivih sevov imajo najmanj virulentnih dejavnikov sevi uvrščeni v filogenetsko skupino B1.

#### 4.5 VIRULENTNI DEJAVNIKI IN UVRSTITEV V FILOGENETSKE SKUPINE CELOTNE ZBIRKE SEVOV

##### 4.5.1 Filogenetske skupine

Združili smo podatke o uvrstitvi v filogenetske skupine za vse seve iz naše zbirke. Največ sevov (43 %) smo uvrstili v filogenetsko skupino B2, sledijo sevi iz filogenetske skupine D ter A in B1. Podatki so navedeni v preglednici 15.

**Preglednica 15.** Število (odstotek) sevov v posamezni filogenetski skupini

Filogenetska skupina	Število (odstotek) sevov
<b>A</b>	17 (17)
<b>B1</b>	8 (8)
<b>B2</b>	44 (43)
<b>D</b>	33 (32)

##### 4.5.2 Pogostost pojavljanja virulentnih dejavnikov pri sevih iz določene filogenetske skupine

Združili smo podatke o pogostosti pojavljanja virulentnih dejavnikov pri sevih iz določene filogenetske skupine, neodvisno od odpornosti proti fluorokinolonom. Največ virulentnih dejavnikov imajo sevi uvrščeni v skupino B2 (povprečno število virulentnih dejavnikov na sev je 8,6), sledijo sevi iz skupine D ter A in B1 (preglednica 16).

**Preglednica 16.** Povprečno število virulentnih dejavnikov na sev iz posamezne filogenetske skupine

FS	Št.VD/sev
A	5,5
B1	4,7
B2	8,6
D	6,7

FS- filogenetska skupina

Št.VD/sev- povprečno število virulentnih dejavnikov na sev iz določene filogenetske skupine

Zaradi večje preglednosti in informativnosti smo vse podatke o proti fluorokinolonom odpornih ter za fluorokinolone občutljivih sevih združili v preglednici 17, v kateri smo prikazali soodvisnost pojavljanja delov genov za virulentne dejavnike, pripadnost določeni filogenetski skupini in odpornosti oziroma občutljivosti za fluorokinolone.

**Preglednica 17.** Soodvisnost pojavljanja delov genov za virulentne dejavnike, pripadnosti določeni filogenetski skupini in odpornosti proti oziroma občutljivosti za fluorokinolone (ciprofloksacin, norfloksacin)

VD	A		B1		B2		D	
	cip <sup>r</sup> (%)	cip <sup>s</sup> (%)	cip <sup>r</sup> (%)	cip <sup>s</sup> (%)	cip <sup>r</sup> (%)	cip <sup>s</sup> (%)	cip <sup>r</sup> (%)	cip <sup>s</sup> (%)
<i>fimH</i>	13 (100)	4 (100)	5 (100)	3 (100)	14 (100)	29 (97)	16 (100)	16 (94)
<i>papG II</i>	0 (0)	3 (75)	0 (0)	1 (33)	5 (36)	12 (40)	12 (75)	9 (53)
<i>iha</i>	4 (31)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	8 (57)	12 (40)	6 (37,5)	8 (47)
<i>hra</i>	4 (31)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	13 (43)	2 (12,5)	3 (18)
<i>sfa</i>	1 (7,5)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	6 (43)	14 (47)	3 (19)	4 (23,5)
<i>gafD</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>bmaE</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6)
<i>kpsMT</i>	0 (0)	2 (50)	2 (40)	0 (0)	8 (57)	24 (80)	9 (56)	13 (76)
<i>iss</i>	2 (15)	4 (100)	0 (0)	1 (33)	1 (7)	6 (20)	5 (31)	1 (6)
PAI IV	5 (38)	4 (100)	2 (40)	2 (67)	14 (100)	27 (90)	10 (62,5)	11 (65)
<i>hbp</i>	1 (7,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (7)	0 (0)	0 (0)
<i>hlyA</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (23)	0 (0)	3 (18)
EHEC- <i>hlyA</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6)	0 (0)
<i>sat</i>	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	7 (50)	8 (27)	3 (19)	5 (29)
<i>vat</i>	1 (7,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	6 (20)	0 (0)	0 (0)
<i>picU</i>	1 (7,5)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	4 (28)	9 (30)	0 (0)	3 (18)
<i>ompT</i>	4 (31)	2 (50)	2 (40)	1 (33)	1 (7)	6 (20)	4 (25)	2 (12)
<i>ompA</i>	11 (85)	3 (75)	2 (40)	1 (33)	14 (100)	28 (93)	15 (94)	17 (100)
<i>ibeA</i>	1 (7,5)	0 (0)	5 (100)	0 (0)	2 (14)	7 (23)	3 (19)	1 (6)
<i>asl</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>usp</i>	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	6 (43)	13 (43)	0 (0)	2 (12)
<i>iroN</i>	4 (31)	3 (75)	2 (40)	2 (67)	7 (50)	25 (83)	5 (31)	7 (41)
<i>aer</i>	8 (61)	4 (100)	2 (40)	2 (67)	12 (86)	17 (57)	8 (50)	9 (53)
Od skupno	13 (100)	4 (100)	5 (100)	3 (100)	14 (100)	30 (100)	16 (100)	17 (100)

VD- virulentni dejavnik

cip<sup>r</sup>- število proti fluorokinolonom (ciprofloksacin, norfloksacin) odpornih sevov s posameznim virulentnim dejavnikom iz določene filogenetske skupine

cip<sup>s</sup>- število za fluorokinolone (ciprofloksacin, norfloksacin) občutljivih sevov s posameznim virulentnim dejavnikom iz določene filogenetske skupine

(%)- v oklepaju je naveden odstotek sevov s posameznim virulentnim dejavnikom

Od skupno- število vseh sevov iz posamezne filogenetske skupine

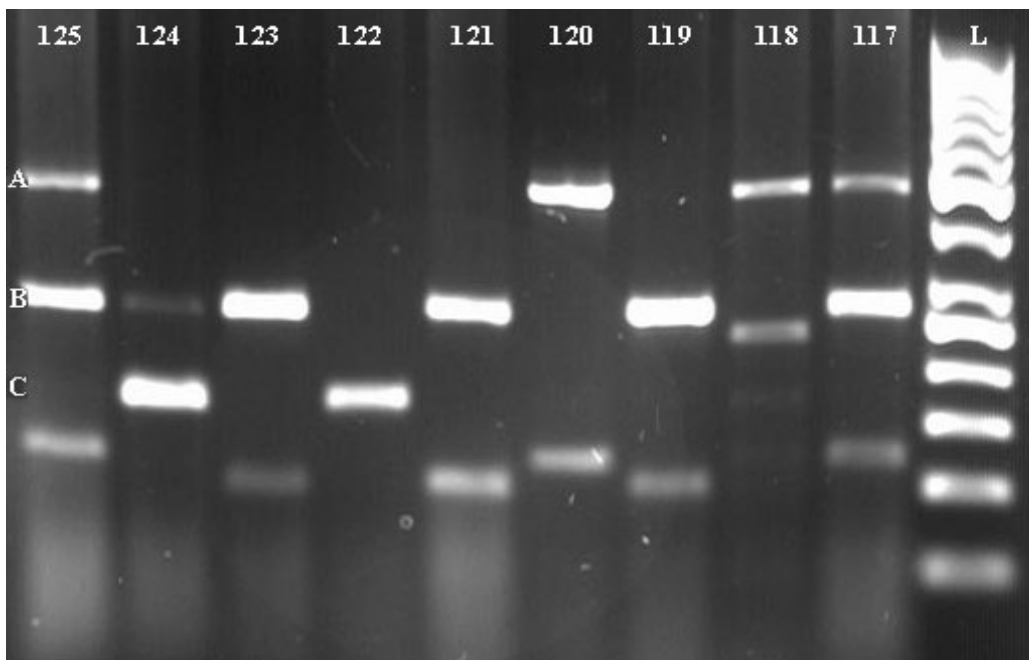
poševno- deli genov virulentnih dejavnikov

#### 4.6 DOLOČANJE PRISOTNOSTI DELOV GENOV ZA VIRULENTNE DEJAVNIKE Z METODO MULTIPLEKS PCR

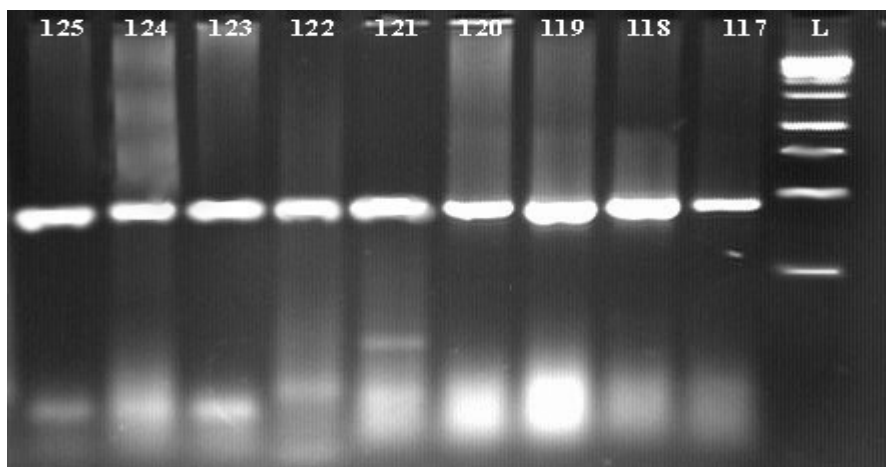
Z metodo multipleks PCR smo določali dele genov *ibeA*, *kpsMT II* in *fimH*, ki jih zaradi primerne velikosti in lastnosti začetnih oligonukleotidov lahko pomnožujemo z istim programom. Pomnožke smo zaznali na 2-odstotnem agaroznem gelu. Rezultate smo preverili s posameznimi PCR reakcijami. Ugotovili smo, da je metoda multipleks PCR

nenatančna in je dala lažno negativne rezultate, zato smo nadaljevali s posameznimi PCR reakcijami.

Pri sevih z delovno oznako 119, 121, 122, 123 in 124 po multipleksih sodeč nismo odkrili pomnožkov dela gena *fimH*. Ko smo rezultate preverili s posameznim PCR, se je izkazalo, da vsi ti sevi imajo del gena za *fimH* (sliki 10 in 11).



**Slika 10.** Elektroforeza multipleks PCR-pomnožkov delov genov *ibeA*, *kpsMT II* in *fimH* (sevi z delovno oznako 125 do 117; L-50 bp lestvica; A- *fimH* (465 bp), B- *kpsMT II* (272 bp), C- *ibeA* (170 bp)).



**Slika 11.** Elektroforeza multipleks PCR-pomnožkov delov genov *fimH* - preverjanje rezultatov metode multipleks PCR (sevi 125-117; L- 1-kb DNK-lestevica).

#### 4.7 LASTNOSTI UROPATOGENIH SEVOV *E. coli* 1056/1, 1056/2 in 1056/3, IZOLIRANIMI IZ URINA ISTE PACIENTKE

Pri pregledu vseh sevov vključenih v diplomsko delo in ostalih preučenih sevov *E. coli* izoliranih na IVZ med leti 2005 in 2007 so posebno izstopali trije proti fluorokinolonom odporni sevi (1056/1, 1056/2 in 1056/3), izolirani iz urina iste pacientke. Nanje smo postali pozorni, ker so bili izredno lepljivi in ugreznjeni v podlago. Ugreznanje je bilo tako izrazito, da jih je bilo iz določenih gojišč (na primer iz minimalnega gojišča) s cepilno zanko praktično nemogoče zajeti. Domnevali smo, da gre verjetno za enega izmed adhezinov, kapsularnih polisaharidov ali eksopolisaharidov. Zato smo seve izpostavili in preučili nekatere fenotipske lastnosti. Tako smo ugotovili, da je adhezija oziroma ugreznanje sevov odvisno od vrste gojišča ter temperature gojenja. Sevi, še posebno sev 1056/2, se ugrezajo v podlago na minimalnem gojišču, nekoliko manj na gojišču LB. Manj ugreznanja in lepljivosti sevi izkazujejo na bogatih gojiščih (KA). Lepljivost seva 1056/2 se izgubi pri temperaturi 41 °C. Natančnejši podatki o morfologiji sevov so vpisani v preglednicah 18 in 19.

**Preglednica 18.** Morfologija in konsistenca kolonij, ki jih tvorijo sevi 1056/1, 1056/2 in 1056/3 na različnih vrstah trdnih gojišč

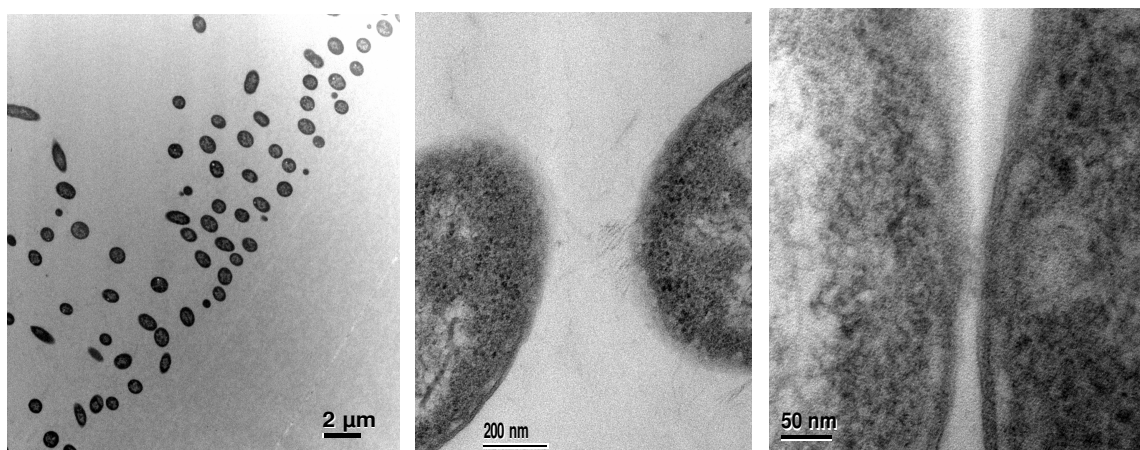
GOJIŠČE	MORFOLOGIJA SEVOV		
	1056/1	1056/2	1056/3
LB	Kolonije so sluzaste, vendar se ne lepijo in niso ugreznjene v podlago.	Kolonije so sluzaste, lepljive in ugreznjene v podlago. Iz gojišča se da kolonije enostavno odstraniti, vendar del ostane vraščen v podlago. pri precepljanju s plastično cepilno zanko, se zajete kolonije močno vlečejo.	Kolonije so sluzaste, vendar se ne lepijo in niso ugreznjene v podlago.
KA	Kolonije so velike, skoraj tekoče, niso lepljive in niso ugreznjene v podlago. Rast je bujna.	Kolonije so sluzaste in lepljive, a niso ugreznjene v podlago. Iz gojišča se jih da odstraniti enostavno.	Kolonije so sluzaste, vendar se ne lepijo in niso ugreznjene v podlago.
Minimalno z glukozo	Ni rasti.	Kolonije so majhne, močno se držijo podlage, katero so globoko ugreznjene. Iz gojišča se jih ne da odstraniti.	Ni rasti.
Minimalno krvno gojišče	Kolonije niso ugreznjene, ne lepljive. Rast je rahla.	Kolonije so sluzaste, močno ugreznjene in lepljive. Iz gojišča se jih da odstraniti le delno.	Kolonije niso ugreznjene, ne lepljive. Rast je rahla.



**Preglednica 19.** Morfologija seva 1056/2 na gojišču LB pri različnih temperaturah

TEMPERATURA (° C)	RAST	LEPLJIVOST	UGREZANJE
37	DA	DA	DA
38	DA	DA (malo manjša)	DA (malo manjše)
39	DA	DA (manjša)	DA (spodnji del)
40	DA	MANJŠA	MINIMALNO
41	DA	NE	NE

Iz elektronskih posnetkov prečnega preseka kolonije seva 1056/2 (slika 12) je razvidno, da bakterije izločajo izvencelični matriks, saj so bakterije v koloniji med sabo lepo ločene. Za kakšne vrste izvencelični matriks gre, nam ni uspelo ugotoviti.



**Slika 12.** Elektronski posnetki kolonije seva 1056/2 (Transmisijski elektronski mikroskop, vir: dr. Rok Kostanjšek)

Sevi 1056/1, 1056/2 in 1056/3 se razlikujejo v odpornosti proti ciprofloksacinu. Najbolj odporen je sev 1056/3, ki nima cone inhibicije rasti. Sledi sev 1056/2 z devet milimetrsko cono inhibicije rasti ter sev 1056/1 z enajst milimetrsko cono inhibicije rasti. V odpornosti proti norfloksacinu se sevi ne razlikujejo. Vsi trije sevi pa so tudi občutljivi na kombinacijo sulfametoksazol-trimetoprim (Preglednica 20).

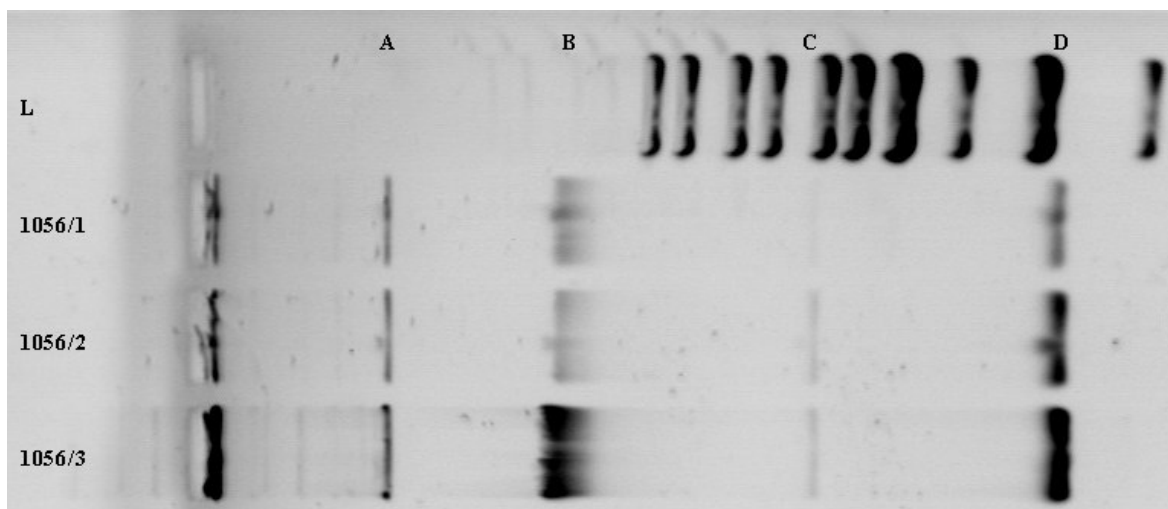
**Preglednica 20.** Odpornost sevov 1056/1, 1056/2 in 1056/3 prot protimikrobnim snovem (difuzijska metoda z diski, izvedena na Inštitutu za varovanje zdravja v Ljubljani, ponovljena v našem laboratoriju)

sev	ANTIBIOTIKI		
	ciprofloksacin	norfloksacin	sulfametoksazol-trimetoprim
1056/1	ODPOREN cona inhibicije rasti 11 mm	ODPOREN rast bakterij do diska	OBČUTLJIV
1056/2	ODPOREN cona inhibicije rasti 9 mm	ODPOREN rast bakterij do diska	OBČUTLJIV
1056/3	ODPOREN rast bakterij do diska	ODPOREN rast bakterij do diska	OBČUTLJIV

Zanimalo nas je, ali se sevi 1056/1, 1056/2 in 1056/3 razlikujejo po prisotnosti izbranih virulentnih dejavnikov. Med sevi ni bilo razlik, vsi so imeli prisoten dela genov *fimH* ter *ibeA* (glej preglednici 7 in 8).

#### 4.7.1 Prisotnost plazmidov v sevih 1056/1, 1056/2 in 1056/3

Po izolaciji plazmidne DNK in elektroforezi na 0,8-odstotnem agaroznem gelu pri napetosti 0,5 V/cm gela, smo odkrili v vseh sevih enake plazmide. CCC oblika manjšega plazmida je velikost približno 3,5 kb. Večji plazmid pa potuje daleč za zadnjim fragmentom 1-kb DNK-lestvice. Natančneje bi velikosti lahko določili s plazmidnimi CCC standardi, ki pa jih nismo uspeli izolirati.



**Slika 13.** Elektroforeza produktov po izolaciji plazmidne DNK (L-1-kb DNK-lestvica; sevi 1056/1, 1056/2, 1056/3; A- večji plazmid (CCC oblika), B- ostanki kromosomske DNK, C- manjši plazmid (OC/LC oblika), D- manjši plazmid (CCC oblika))

#### **4.7.2 Konjugacija plazmidov iz sevov 1056/1, 1056/2 in 1056/3**

Po konjugaciji in selekciji na gojiščih LB z natrijevim azidom in ampicilinom, natrijevim azidom in kloramfenikolom, natrijevim azidom in tetraciklinom ter natrijevim azidom in trimetoprimom nismo uspeli izolirati nobenih transkonjugant. Transkonjugant nismo izolirali, ko smo gojišča inkubirali na temperaturi 37 °C in prav tako ne ko smo jih inkubirali na temperaturi 40 °C. Plošče smo pri višji temperaturi inkubirali zato, ker so bile kolonije seva 1056/2 pri tej temperaturi (40 °C) minimalno lepljive in smo zato predvideli, da bi konjugacija lažje potekla.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Bakterije vrste *E. coli* so najpogostejši povzročitelj izvenbolnišničnih infekcij sečil. Za zdravljenje okužb sečil se najpogosteje uporabljajo protimikrobne spojine sulfametoksazol-trimetoprim, kinoloni in  $\beta$ -laktami. Zaradi njihove splošne uporabe je znotraj vrste *E. coli* vse več sevov, ki so odporni na eno ali več protimikrobnih snovi. Zapis za odpornost proti antibiotikom je pogosto na plazmidih ali drugih mobilnih genetskih elementih, kar olajša prenos med bakterijami (Branger in sod., 2005). Odpornost na več različnih protimikrobnih snovi je lahko posledica zmanjšane prepustnosti membrane za protimikrobne snovi, ki je posledica manjšega izražanja nekaterih glavnih porinov (Ruiz, 2003). Prav tako je lahko odpornost posledica delovanja neselektivnih črpalk, ki poleg različnih antibiotikov iz bakterijske celice črpajo tudi detergente, razkužila, žolčne soli, kemoterapevtske snovi in kationska barvila (Yu in sod., 2003).

V Sloveniji zdravniki zdravstvenih domov in zasebnih ordinacij za zdravljenje okužb sečil najpogosteje predpišejo sulfametoksazol-trimetoprim (57 %), sledi norfloksacin (37 %) in različni  $\beta$ -laktami (3,9 %) (Car in sod., 2003).

Odpornost proti sulfametoksazol-trimetoprimu je posledica sinteze spremenjenega tarčnega encima, na katerega protimikrobni snov več ne deluje (Murray in sod, 1999). Skrb vzbujajoča je tudi porast odpornosti proti kinolonom. Odpornost proti kinolonom je največkrat posledica kromosomske mutacije, ki vodi v spremembo tarčnega encima (Paterson, 2006). Zapis za odpornost proti kinolonom je lahko tudi na plazmidu (Martinez-Martinez in sod., 1998). Odpornost proti  $\beta$ -laktamom je posledica sinteze spremenjenih penicilin-vezočih proteinov ali sinteza  $\beta$ -laktamaz, ki hidrolizirajo  $\beta$ -laktamski antibiotik. V zadnjem času so vse pogostejši sevi, ki imajo  $\beta$ -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (Bradford, 2001). Ti encimi imajo večjo afiniteto do  $\beta$ -laktamskih antibiotikov, zato lahko razgradijo tudi  $\beta$ -laktame s širokim spektrom delovanja, ki so jih umetno pridobili (Jacoby in Carreras, 1990).

Kolonizacijo novih ekoloških niš v gostitelju, invazijo globljih tkiv ter preživetje v sovražnem okolju gostitelja uropatogenim sevom *E. coli* omogočijo virulentni dejavniki. Z njihovo pomočjo uropatogeni premagajo ali spremenijo obrambni sistem gostitelja ter sprožijo vnetne procese (Johnson, 1991; Sorsa in sod., 2003). Seve vrste *E. coli* lahko na podlagi treh fragmentov DNK (*chuA*, *yjaA* in TSPE4.C2) uvrstimo v t.i. filogenetske skupine. Štiri osnovne skupine A, B1, B2 in D lahko razdelimo še na podskupine A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, D<sub>1</sub> in D<sub>2</sub> (Branger in sod., 2005; Clermont in sod, 2000).

Branger in sodelavci (2005) so pri različnih družinah ESBL sevov preverjali pogostost pojavljanja nekaterih virulentnih dejavnikov. Seve so uvrstili v filogenetske skupine ter jim določili odpornost proti fluorokinolonom. Ugotovili so, da so sevi, ki so za fluorokinolone občutljivi večinoma iz filogenetske skupine B2 ter da imajo številne virulentne dejavnike. Nasprotno so bili proti fluorokinolonom odporni sevi večinoma iz filogenetske skupine D in so imeli manj virulentnih dejavnikov. Raziskave o povezavi med odpornostjo proti kinolonom ter filogenetskimi skupinami in številom virulentnih dejavnikov niso pogoste, še posebno redke pa so tovrstne raziskave na sevih izoliranih iz ambulantnih pacientov. Zato smo se pri našem delu najprej osredotočili na razlike med proti fluorokinolonom odpornimi in za fluorokinolone občutljivimi sevi iz naše zbirke, jih uvrstili v filogenetske skupine in ugotovili pogostost pojavljanja delov genov izbranih virulentnih dejavnikov pri teh dveh skupinah.

Proti fluorokinolonom odporni sevi imajo najpogosteje zapis *fimH* (100 %). Tudi zapisi za druge adhezine so precej pogosto zastopani, vendar pri manj kot polovici sevov. Od toksinov in invazinov je najpogostejši *ompA*, ki ga ima kar 42 od 48 sevov. Kar 30 (62,5 %) sevov ima zapis *aer*, medtem ko ima *iroN* 18 (37,5 %) sevov. Od dejavnikov za izogibanje imunskemu sistemu ima 20 (41,7 %) sevov zapis *kpsMTII* in 8 (16,7 %) zapis *iss*. PAI IV ima 31 (64,6 %) proti fluorokinolonom odpornih sevov, hemolizo na ploščah KA-IVZ pa smo opazili pri 6 sevih (12,5 %). Največ proti fluorokinolonom odpornih sevov smo uvrstili v filogenetsko skupino D (33,3 %), sledile so skupine B2, A in B1.

Za fluorokinolone občutljivi sevi imajo prav tako med adhezini najpogosteje prisoten *fimH* (96 %) med toksini in invazini pa *ompA* (91 %). Zapisa *aer* (57 %) in *iroN* (66,6 %) ima

skoraj enako število sevov. Zapis *kpsMTII* ima 39 (72 %) sevov, zapis *iss* pa 13 (24 %) sevov. PAI IV ima 44 (81,5 %) sevov, hemolize na ploščah KA-IVZ pa nismo opazili pri nobenem od za fluorokinolone občutljivem sevu. Največ za fluorokinolone občutljivih sevov smo uvrstili v filogenetsko skupino B2 (55,5 %), sledijo skupine D, A in B1.

Ko smo primerjali pogostost zapisov za izbrane virulentne dejavnike pri proti fluorokinolonom odpornih sevih in za fluorokinolone občutljivih sevih, smo ugotovili, da imajo za fluorokinolone občutljivi sevi le nekaj procentov več zapisov za izbrane virulentne dejavnike (odporni- 27 %, občutljivi- 34,6 %). Velasco in sodelavci (2001) so v obširni raziskavi na več kot 11 000 pacientih opazili, da imajo invazivne infekcije (vnetje ledvic, vnetje prostate...) nižjo stopnjo odpornosti proti fluorokinolonom. Pri naši zbirki sevov razlika med deleži vseh virulentnih dejavnikov ni bila velika, bolj opazne so bile razlike pri posameznih virulentnih dejavnikih, kar so opazili tudi pri drugih raziskavah. Največjo razliko med sevi iz naše zbirke smo opazili pri *kpsMTII*, *usp*, *hlyA* in *iron*, ki so vsi pogosteje prisotni pri za fluorokinolone občutljivih sevih (razlika je statistično značilna). Horjacada in sodelavci (2005) so ugotovili, da imajo občutljivi sevi večkrat zapis za  $\alpha$ -hemolizin in citotoksični nekrotični faktor 1, medtem ko imajo odporni sevi pogosteje gene *cvaC*, *bmaE*, *gafD*, *iss* in *ireA*, najbolj pa izstopa večja pogostost receptorja za aerobaktin (IutA) pri občutljivih sevih. O pogostejšem pojavljanju  $\alpha$ -hemolizina in citotoksičnega nekrotičnega faktorja pri za fluorokinolone občutljivih sevih so poročali tudi Vila in sodelavci (2002). Zapisa za  $\alpha$ -hemolizin ni imel nobeden od proti fluorokinolonom odpornih sevov iz naše zbirke, zapis pa je imelo 10 (18,5 %) občutljivih sevov, kar se sklada z zgoraj navedenimi podatki.

Od virulentnih dejavnikov navedenih v literaturi smo preverjali še pogostost *bmaE* (M-fimbrije), *gafD* (G-fimbrije), *pap* (P-fimbrije), *sfa* (S-fimbrije), *iss* (serumska odpornost), *sat* (avtotransporterski protein), *fimH* (fimbrije tipa 1) in *aer* (aerobaktin). Prisotnost zapisa za *gafD* nismo potrdili pri nobenemu sevu. V nasprotju s podatki Vila in sod., (2002) smo potrdili zapis *fimH* pri skoraj vseh sevih obeh skupin. Zapis *sfa* je pogostejši pri sevih, ki so za fluorokinolone občutljivi. Prav tako sta pogostejša zapisa *papGII* in *iss*, vendar razlika ni statistično značilna. Kljub temu se naši rezultati ne skladajo z raziskavo Horjacade in sodelavcev, v kateri so imeli proti fluorokinolonom odporni sevi več zapisa

*iss* kot za fluorokinolone občutljivi sevi. Od te raziskave se razlikuje tudi pogostost zapisa *bmaE*, ki ga v skupini odporni proti fluorokinolonom ni bilo, imela pa sta ga dva občutljiva seva. Zapis *sat* je bil približno enako zastopan v obeh skupinah. Prav tako sta imeli skupini približno enako pogosto *ompT* ter *ompA*, medtem ko zapisov *asl* in EHEC-*hlyA* (enterohemolizin) ni imel nobeden od sevov. Prisotnost zapisov *vat* in *iha* je nekoliko večja pri za fluorokinolone občutljivih sevih, vendar razlika ni statistično značilna. Zapisa *ibeA* in *hbp* sta nekoliko pogostejša pri proti fluorokinolonom odpornih sevih. Zapisa *hra* in *picU* ter PAI IV so pogostejši pri za fluorokinolone občutljivih sevih, vendar tudi pri teh razlika ni statistično značilna.

Zanimala nas je tudi povezava med filogenetskimi skupinami in odpornostjo proti fluorokinolonom. Ugotovili smo, da je med za fluorokinolone občutljivimi sevi več sevov iz skupine B2 (55,5 %) kot med odpornimi sevi (29,2 %). Skupini se skoraj ne razlikujeta po številu sevov iz skupine D (33,3 % - odporni sevi in 31 % - občutljivi). Prav tako je skoraj enako število sevov B1 (10,4 % - odporni sevi, 5,6 % - občutljivi). Med za fluorokinolone občutljivimi sevi je manj pripadnikov skupin A (7,4 %), kot med odpornimi sevi (27,1 %). Naši rezultati se skladajo z raziskavo Branger in sodelavci (2005), v kateri so ugotovili, da je večina proti fluorokinolonom odpornih sevov iz filogenetske skupine D ter večina za fluorokinolone občutljivih sevov iz filogenetske skupine B2. Več kot polovico za fluorokinolone občutljivih sevov iz naše zbirke smo uvrstili v filogenetsko skupino B2.

V literaturi so pogoste raziskave, v katerih avtorji uvrščajo seve *E. coli*, ki povzročijo različne okužbe, v filogenetske skupine ter ugotavljajo povezavo med virulentnostjo sevov in filogenetskimi skupinami. Zato smo tudi pri našem delu podatke o vseh sevih združili ter ugotavljali uvrščenost v filogenetske skupine in virulentnost sevov neodvisno od odpornosti proti fluorokinolonom. Med 102 UPEC sevi iz naše zbirke jih je bilo 33 (32 %) iz skupine D, 17 (17 %) iz skupine A ter 8 (8 %) iz skupine B1. V skupino B2 smo uvrstili 44 (43 %) sevov. Sevi iz skupin B2 in D predstavljajo 76 % sevov iz naše zbirke.

Virulentni sevi ExPEC večinoma spadajo v skupino B2 ter v manjšem obsegu v skupino D. Bingen in sodelavci (1998), Johnson in sodelavci (2000) ter Zhang in sodelavci (2002) so

ugotovili, da 68 %, 65 % oziroma 69 % sevov ExPEC, ki so jih preučevali, pripada skupini B2. Bingen in sodelavci (1998) so preučevali seve, ki so povzročili meningitis pri novorojenčkih, Johnson in sodelavci (2000) so raziskovali seve izolirane iz pacientov z bakteriemijo, Zhang in sodelavci (2002) pa so se ukvarjali z izolati iz pacientk z infekcijami sečil.

Picard in sodelavci (1999) so ugotovili, da je med komenzalnimi sevi le majhno število sevov (9%) iz skupine B2. Seve, ki so jih preučevali, so večinoma uvrstili v skupini A in B1. Njihove izsledke so potrdili tudi Duriez in sodelavci, ki so v obširni raziskavi leta 2001 preučili 168 komenzalnih sevov izoliranih iz zdravih ljudi iz različnih geografskih področji (56 sevov iz Francije, 57 sevov iz Hrvaške, 55 sevov iz Malija). Nasprotno so Zhang in sodelavci (2002) skoraj polovico (48 %) komenzalnih sevov, izoliranih iz zdravih žensk, uvrstili v skupino B2. Zhangova raziskava je zajemala tako rektalne izolate kot tudi seve UPEC (podatki navedeni zgoraj) in je potekala na ženskah starih med 18 in 39 let iz istega geografskega področja (Michigan, ZDA).

Navedeni podatki se nanašajo na klinične seve ExPEC, ki so povzročili bakteriemijo, sepso in meningitis, ali na komezalne seve, za katere mnogi avtorji menijo, da so naravni rezervoar za infekcije sečil. Po sposobnosti povzročanja bolezni bi lahko seve iz naše zbirke uvrstili med ti dve skupini. Sevi, ki smo jih preučevali, niso bili klinični sevi, saj so bili izolirani iz pacientov z uroinfekti, ki so se zdravili v Zdravstvenem domu Ljubljana in zasebnih ordinacijah in niso bili hospitalizirani. V skupino B2 smo uvrstili 43 % sevov, kar je občutno manj od zgoraj navedenih rezultatov za klinične seve ExPEC (Bingen in sod., 1998; Johnson in sod., 2000), vendar več od rezultatov za komenzalne seve (Duriez in sod., 2001; Picard in sod., 1999). Tudi podskupino sevov ExPEC – seve UPEC avtorji večinoma uvrščajo v skupino B2 in v nekoliko manjšem obsegu v skupino D (Goulet in Picard, 1986; Johnson in Stell, 2000, Zhang in sod., 2002). Naši rezultati so v tem pogledu primerljivi s tistimi iz literature, saj kljub manjšemu deležu sevov iz skupine B2, sevi iz skupin B2 in D predstavljajo 76 % sevov iz naše zbirke.

Zhang in sodelavci (2002) so ugotovili, da imajo sevi iz skupine B2 več virulentnih dejavnikov, s čimer je potrdil Duriezovo raziskavo komenzalnih sevov iz leta 2001. Tudi v



naši zbirki sevov so imeli sevi uvrščeni v skupino B2 največ virulentnih dejavnikov in sicer v povprečju 8,6 različnih dejavnikov na posamezen sev. Kljub temu so bili med njimi tudi primeri, ki so imeli le po dva ali tri različne virulentne dejavnike. Naslednja skupina po številu virulentnih dejavnikov na sev je bila skupina D (6,7 dejavnikov na sev), sledili sta A (5,5) in B1 (4,75). Vsi sevi so imeli vsaj enega od testiranih virulentnih dejavnikov, največ (14) pa sta jih imela dva seva iz skupine B2<sub>3</sub>.

Seve smo iz Inštituta za varovanje zdravja smo dobili na krvnih ploščah, pri čemer smo opazili, da jih je nekaj hemolitičnih. Ponovno smo jih precepili na plošče KA-IVZ ter zabeležili seve, ki so bili dejansko hemolitični. Primerjali smo rezultate hemolize na ploščah in prisotnost zapisov za nekatere znane hemolizine:  $\alpha$ -hemolizin, enterohemolizin ter avtotransporterski protein Hbp, ki razgrajuje hemoglobin. Hemolizo na ploščah smo opazili pri sevih z delovno oznako 11, 15, 20, 21, 22 ter 23, ki so vsi proti fluorokinolonom odporni, nobeden izmed njih pa ni imel nobenega od zgoraj navedenih hemolizinov. Zapis *hlyA* ( $\alpha$ -hemolizin) je imelo deset za fluorokinolone občutljivih sevov z delovnimi oznakami 29, 30, 35, 46, 52, 78, 81, 82, 84 in 94. Trije sevi (46, 78 in 81) so bili uvrščeni v filogenetsko skupino D, ostalih sedem pa v skupino B2. Zapisa EHEC-*hlyA* (enterohemolizin) ni imel nobeden od sevov. Zapis *hbp* so imeli štirje proti fluorokinolonom odporni sevi (2, 13, 61 in 62) iz različnih filogenetskih skupin in dva za fluorokinolone občutljiva seva (32 in 44), oba iz skupine B2.

Pri pregledu vseh sevov vključenih v diplomsko delo in ostalih preučenih sevov *E coli* izoliranih na IVZ med leti 2005 in 2007 so posebno izstopali trije proti fluorokinolonom odporni sevi izolirani iz urina iste pacientke. Nanje smo postali pozorni, ker so bili izredno lepljivi in ugreznjeni v podlago. Sevi z oznakami 1056/1, 1056/2 in 1056/3 so se razlikovali (a) po odpornosti proti antibiotikom in (b) po morfologiji. Zaradi teh posebnosti smo preverili, ali se sevi morda razlikujejo tudi po prisotnosti zapisov za katerega od izbranih virulentnih dejavnikov. Izolirali smo plazmidno DNK, poskusili pa smo tudi s konjugacijo plazmidov teh sevov.

(a) Sevi 1056/1, 1056/2 in 1056/3 so se razlikovali v odpornosti proti ciprofloksacinu, na katerega je bil najbolj odporen sev 1056/3 (rast bakterij do diska). Sledil je sev 1056/2 s cono inhibicije rasti 9 mm ter sev 1056/1 z 11 mm cono inhibicije rasti.

(b) Po morfologiji je najbolj izstopal sev 1056/2, ki je imel izrazito lepljive kolonije, ki so bile sluzaste in ugreznjene v podlago. Še posebno zanimiva je bila njegova rast na minimalnem gojišču, kjer je bilo kolonije praktično nemogoče odstraniti iz podlage. Z višanjem temperature gojenja, se je sev vse manj lepil, spreminjala pa se je tudi njegova ugreznjenost v podlago. Pri 41 °C se je sev prenehal tako lepiti kot ugrezati. Seva 1056/1 in 1056/3 sta imela ravno tako sluzaste kolonije, ki pa niso bile lepljive in ugreznjene v podlago. Kolonije seva 1056/1 so bile večje kot pri drugih dveh.

Sevi 1056/1, 1056/2 in 1056/3 imajo le dva od virulentnih dejavnikov, ki smo jih preverjali (*fimH* in *ibeA*). Uvrstili smo jih v filogenetsko skupino B1. Prav tako se ne razlikujejo po velikosti plazmidov in njihovem številu. Vsi trije sevi imajo en večji in en manjši plazmid. Pri konjugaciji sevov 1056/1, 1056/2 in 1056/3 z recipientskim sevom *E. coli* J53 Az<sup>r</sup> in selekciji na gojiščih LB z natrijevim azidom in ampicilinom, natrijevim azidom in kloramfenikolom, natrijevim azidom in tetraciklinom ter natrijevim azidom in trimetoprimom ter inkubaciji gojišč na temperaturi 37 °C nismo uspeli izolirati nobenih transkonjugant. Zaradi močne lepljivosti kolonij seva 1056/2 smo konjugacijo ponovili pri temperaturi 40 °C, vendar tudi v tem primeru nismo uspeli izolirati nobenih transkonjugant.

## 5. 1 SKLEPI

- Za fluorokinolone občutljivi sevi imajo predvsem več zapisov *hlyA*, *kpsMTII*, *iroN* ter *usp* (razlika je statistično značilna). Večkrat se pri njih pojavljajo tudi zapisi *hra*, *sfa*, *picU* in PAI IV ter *papGII*, *iss* in *vat*, vendar razlika ni statistično značilna. Približno enko pogosto so se pojavljali zapisi *fimH*, *iha*, *sat*, *ompT*, *ompA* in *aer*. Nekoliko pogosteje so imeli proti fluorokinolonom odporni sevi zapise za *ibeA* in *hbp*, vendar razlika ni statistično značilna. Zapisa *gafD*, EHEC-*hlyA* in *asl* ni imel nobeden od sevov iz naše zbirke. Zapisa *bmaE* sta imela dva za fluorokinolone občutljiva seva.
- Med za fluorokinolone občutljivimi sevi je manj pripadnikov skupin A (4), kot med odpornimi sevi (13). Skoraj enako je število sevov B1 (5- odporni sevi, 3- občutljivi). Med za fluorokinolone občutljivimi sevi je več sevov iz skupine B2 (30) kot med odpornimi sevi (14). Skupini se skoraj ne razlikujeta po številu sevov iz skupine D (16- odporni sevi in 17- občutljivi).
- Za fluorokinolone občutljivi sevi imajo več virulentnih dejavnikov (več sevov iz skupine B2) kot proti fluorokinolonom odporni sevi. Razlika je bolj vidna pri posameznih virulentnih dejavnikih.
- Hemolizo na ploščah KA-IVZ smo zabeležili pri proti fluorokinolonom odpornih sevih z delovno oznako 11, 15, 20, 21, 22 ter 23. Nobeden od njih ni imel nobenega od testiranih zapisov za hemolizine (*hlyA*, EHEC-*hlyA* in *hbp*). Zapis *hbp* so imeli proti fluorokinolonom odporni sevi 2, 13, 61 in 62 in za fluorokinolone občutljiva seva 32 in 44. Zapis *hlyA* je imelo deset za fluorokinolone občutljivih sevov z delovnimi oznakami 29, 30, 35, 46, 52,78, 81, 82, 84 in 94.
- Od vseh 102 preučenih sevov smo jih 17 (17 %) uvrstili v skupino A, 8 (8 %) v skupino B1, 44 (43 %) v skupino B2 in 33 (32 %) v skupino D. Sevi iz skupin B2 in D skupno predstavljajo 76 % sevov iz naše zbirke.
- Sevi uvrščeni v skupino B2 imajo največ virulentnih dejavnikov. Med njimi so tudi primeri, ki imajo le po dva ali tri različne virulentne dejavnike. Naslednja skupina po številu virulentnih dejavnikov na sev je bila skupina D, sledili sta A

in z najmanj dejavniki B1. Vsi sevi so imeli vsaj enega od testiranih virulentnih dejavnikov, največ (14) pa sta jih imela dva seva iz skupine B2<sub>3</sub>.

- Proti fluorokinolonom odporni sevi 1056/1, 1056/2 in 1056/3 so bili izolirani iz urina iste pacientke. Razlikovali so se po odpornosti proti antibiotikom in po morfologiji. Niso se razlikovali po prisotnosti zapisov za virulentne dejavnike in po plazmidih. Pri konjugaciji sevov na izbranih selekcijskih gojiščih in inkubaciji na 37 ter 40 °C nismo uspeli izolirati nobenih transkonjugant.

## 6 POVZETEK

Bakterije vrste *E. coli* so del naravne črevesne flore ljudi in živali. Nekateri sevi pa so patogeni in povzročajo črevesne bolezni, sepse, meningitis ter infekcije sečil. *E. coli* je najpogostejši povzročitelj infekcij sečil, saj povzroči kar 90 % tovrstnih izvenbolnišničnih infekcij. Sposobnost, da sevi vrste *E. coli* povzročijo bolezen, je odvisna od prisotnosti genetskih zapisov za različne virulentne dejavnike, ki bakterijam omogočijo kolonizacijo novih ekoloških niš v gostitelju, invazijo globljih celičnih plasti ter preživetje v sovražnem okolju gostitelja. Virulentne dejavnike delimo na adhezine, toksine in invazine, dejavnike za zaščito pred gostiteljevim imunskim sistemom in sisteme za privzem železa.

Okužbe sečil najpogosteje zdravimo s protimikrobnimi substancami, obstajajo pa tudi alternativni načini zdravljenja. Protimikrobne substance, ki se najpogosteje uporabljajo, so  $\beta$ -laktami, kinoloni in kombinacija sulfametoksazol-trimetoprim. Zaradi njihove rastoče uporabe, je med bakterijskimi sevi tudi vse več takih, ki so na te protimikrobne snovi odporni.

V tej diplomski nalogi smo preučevali zbirko 102 uropatogenih sevov, ki so bili izolirani in indentificirani na Inštitutu za varovanje zdravja v Ljubljani. Sevi so bili izolirani iz urina pacientov z infekcijo sečil, ki so se zdravili v enotah Zdravstvenega doma Ljubljana in nekaterih zasebnih ordinacijah. Seve smo razdelili na dve skupini glede na odpornost proti fluorokinolonom (ciprofloksacin, norfloksacin). Z metodo verižne reakcije s polimerazo smo seve obeh skupin sevov uvrstili v filogenetske skupine, preverili pa smo tudi pogostost pojavljanja delov genov za trindvajset izbranih virulentnih dejavnikov (*fimH*, *papG II*, *iha*, *hra*, *sfa*, *gafD*, *bmaE*, *kpsMT*, *iss*, PAI IV, *hbp*, *hlyA*, EHEC-*hlyA*, *sat*, *vat*, *picU*, *ompT*, *ompA*, *ibeA*, *asl*, *usp*, *iron* in *aer*). Ugotavljali smo povezavo med filogenetsko skupino, odpornostjo proti (oziroma občutljivostjo za) fluorokinolone ter številom virulentnih dejavnikov.

Med za fluorokinolone občutljivimi sevi je manj sevov iz skupine A, kot med odpornimi sevi. Skoraj enako je število sevov B1 ter sevov iz skupine D. Med za fluorokinolone občutljivimi sevi je več sevov iz skupine B2 kot med odpornimi sevi, posledično imajo za

fluorokinolone občutljivi sevi tudi več virulentnih dejavnikov. Razlika je bolj vidna pri nekaterih virulentnih dejavnikih. Za fluorokinolone občutljivi sevi imajo predvsem več zapisov *hlyA*, *kpsMTII*, *iroN* ter *usp* ter tudi za *hra*, *sfa*, *picU* in PAI IV, vendar pri slednjih razlika ni statistično značilna. Nekoliko več imajo zapisev *papGII*, *iss* in *vat*. Približno enako pogosto se v obeh skupinah pojavljajo zapisi *fimH*, *iha*, *sat*, *ompT*, *ompA* in *aer* (razlika ni statistično značilna). Nekoliko pogosteje so imeli proti fluorokinolonom odporni sevi zapise *ibeA* in *hbp* (razlika ni statistično značilna). Zapisov *gafD*, EHEC-*hlyA* in *asl* ni imel nobeden od sevov iz naše zbirke. Del zapisa za *bmaE* sta imela dva za fluorokinolone občutljiva seva.

Pri sevih z delovno oznako 11, 15, 20, 21, 22 ter 23 smo na ploščah KA-IVZ opazili hemolizo. Hemoliza na ploščah se ni skladala s prisotnostjo delov zapisov za hemolitične dejavnike, ki so jih imeli sevi 2, 13, 32, 44, 61 in 62 (*hbp*) in sevi 29, 30, 35, 46, 52, 78, 81, 82, 84 in 94 (*hlyA*).

Med vsemi 102 preučeniimi sevi smo jih 17 (17 %) uvrstili v skupino A, 8 (8 %) v skupino B1, 44 (43 %) v skupino B2 in 33 (32 %) v skupino D. Sevi uvrščeni v skupino B2 imajo največ virulentnih dejavnikov. Naslednja skupina po številu virulentnih dejavnikov je bila skupina D, sledili sta skupini A in B1.

Pri delu smo med proti fluorokinolonom odpornimi sevi opazili tri zanimive seve 1056/1, 1056/2 in 1056/3 izolirane iz urina iste pacientke. Sevi so se razlikovali po morfologiji in odpornosti proti antibiotikom. Preverili smo, ali se morda razlikujejo po prisotnosti zapisov za izbrane virulentne dejavnike in po plazmidih, vendar razlike nismo odkrili.

## 7 VIRI

### 7.1 CITIRANI VIRI

- Anderson G. G., Dodson K. W., Hooton T. H., Hultgren S. J. 2004. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 12, 9:424-430
- Baaden M., Sansom M. S. P. 2004. OmpT: Molecular dynamics simulations of an outer membrane enzyme. *Biophysical Journal* 87: 2942-2953
- Bahrani-Mougeot F., Gunther IV N. W., Donnenberg S. M., Mobley H. L. T. 2002. Uropathogenic *Escherichia coli*. *Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. Chapter 8. 239-259
- Bekal S., Brousseau R., Masson L., Prefontaine G., Fairbrother J., Harel J. 2003. Rapid Identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 5: 2113-2125
- Bingen E., Picard B., Brahimi N., Mathy S., Desjardins P., Elion J., Denamur E. 1998. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from predominant pool of highly virulent B2 group strains. *The Journal of Infectious Diseases*, 177: 642-650
- Blattner F. R., Plunkett G. III, Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., Collado-Vides N., Glasner J. D., Rode C. K., Mayhew G. F., Gregor J., Dawis N. W., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B., Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277:1453-1462
- Bradford P. A. 2001. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:933-951
- Branger C., Zamfir O., Geoffroy S., Laurans G., Arlet G., Thien H. V., Gouriou S., Picard B., Denamur E. 2005. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum  $\beta$  lactamase type. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 1: 54-61
- Braun V. 2005. Bacterial iron transport related to virulence. *Concepts in Bacterial Virulence. Contributions to Microbiology*, 12: 210-233
- Car J., Švab I., Kersnik J., Vegnuti M. 2003. Management of lower urinary tract infection in women by Slovene GPs. *Family Practice*, 20, 4: 452-456

- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 10: 4555-4558
- Dobrindt U., Blum-Oehler G., Nagy G., Schneider G., Johann A., Gottschalk G., Hacker J. 2002. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I<sub>536</sub> to PAI IV<sub>536</sub>) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infection and Immunity*, 70, 11: 6365-6372
- Duriez P., Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E., Chaventre A., Elion J., Picard B., Denamur E. 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*, 147: 1671-1676
- Faraldo-Gomez J. D., Sanson M. S. P. 2003. Acquisition of siderophores in gram negative bacteria. *Molecular Cell Biology*, 4: 105-116
- Georgopapadakou N. H. 1993. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to  $\beta$ -lactams. *Antimicrobial Agents*, 22, 2:29-33
- Goulet P., Picard B. 1986. Highly pathogenic strains of *Escherichia coli* revealed by the electrophoretic patterns of carboxylesterase B. *Journal of Genetical Microbiology*, 132: 1853-1858
- Gubina M., Ihan A. 2002. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana, Medicinski razgledi
- Guyer D. M., Henderson I. R., Nataro P. J., Mobley H. L. T. 2000. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 38, 1: 53-66
- Hacker J., Knapp S., Goebel W. 1983. Spontaneous deletions and flanking regions of the chromosomally inherited hemolysin determinant of *Escherichia coli* O6 strain. *Journal of Bacteriology*, 153,3: 1145-1152
- Hawkey P. M. 1998. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ*, 317:657-660
- Hayashi T., Makino K., Ohnishi M., Kurokawa S., Ishii K., Yokoyama K., Han C. G., Ohtsubo E., Nakayama K., Murata T., Tanaka M., Tobe T., Iida T., Takami H., Honda T., Sasakawa C., Ogasawara N., Yasunaga T., Kuhara S., Shiba T., Hattori M., Shinagawa H. 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*



- O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Research*, 8, 1: 11-22
- Heimer S. R., Rasko D. A., Lockett C. V., Johnson D. E., Mobley H. L. T. 2004. Autotransporter gene *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 72, 1: 593-597
- Hochhut B., Dobrindt U., Hacker J. 2005. Pathogenicity islands and their role in bacterial virulence and survival. *Concepts in Bacterial Virulence. Contributions to Microbiology*, 12: 234-254
- Hoffman J. A., Badger J. L., Zhang Y., Huang S., Sik Kim K. 2000. *Escherichia coli* K1 *asfA* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo. *Infection and Immunity*, 68, 9: 5062-5067
- Holden N. J., Gally D. L. 2004. Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 585-593
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. Williams & Wilkins. Baltimore
- Hooper D. C. 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 31: 24-28
- Horjacada J. P., Soto S., Gajewski A., Smithson A., Jimenez de Anta M. T., Mensa J., Vila J., Johnson J. R. 2005. Quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains from phylogenetic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 6: 2962-2964
- Huang S., Chen Y., Fu Q., Stins M., Wang Y., Wass C., Sik Kim K. 1999. Identification and characterization of an *Escherichia coli* invasion gene locus, *ibeB*, required for penetration of brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 67, 5: 2103-2109
- Jacoby G. A., Carreras I. 1990. Activities of  $\beta$ -lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 2: 559-562
- Jacoby G. A., Medeiros A. A. 1991. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 9: 1697-1704
- Johnson J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical*

- Microbiology Reviews, 4, 1: 80-128
- Johnson J. R., Jelacic S., Schoening L. M., Clabots C., Shaikh N., Mobley H. L. T., Tarr P. I. 2005. The IrgA homologue adhesion Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infection and immunity*, 73, 2: 965-971
- Johnson J. R., O'Bryan T. T. 2004. detection of the *Escherichia coli* group 2 polysaccharide capsule synthesis gene *kpsM* by a rapid and specific PCR-based assay. *Journal of clinical microbiology*, 42, 4: 1773-1776
- Johnson J. R., Stell A., L. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation of phylogeny and host compromise. *The journal of infectious diseases*, 181, 1: 261-272
- Kostakioti M., Stathopoulos C. 2004. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and immunity*, 72, 10: 5548-5554
- Kurazono H., Nakano M., Yamamoto S., Ogawa O., Yuri K., Nakata K., Kimura M., Makino S., Nair B. 2003. Distribution of the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from companion animals and correlation with serotypes and size-variatoins of the pathogenicity island. *Microbiological Immunology*, 47, 10: 797-802
- Le Bouguenec C. 2005. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Medical Microbiology*, 295: 471-478
- Leveille S., Caza M., Johnson J. R., Clabots C., Sabri M., Dozois C. M. 2006. Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group a strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and function as a catecholate siderophore receptor. *Infection and immunity*, 74, 6: 3427-3436
- Leytus S. P., Bowles L. K., Konisky J., Mangel W. F. 1981. Activation of plasminogen to plasmin by protease associated with the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 78,3: 1485-1489
- Madigan M. T., Marinko J. M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganisms. 9<sup>th</sup> ed. Upper Saddle River, Prentice- Hall International
- Marrs C. F., Zhang L., Foxman B. 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* pathotypes? *FEMS Microbiology letters* xxx (2005) 183-190

- Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby G. A. 1998. Quinolone resistance from transferable plasmid. *Lancet*, 351, 9105: 797-799
- Martinez J. J., Mulvey M. A., Schilling J. D., Pinker J. S., Hultgren S. J. 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO Journal* 19, 12: 2803-2812
- McCarter J. D., Stephens D., Shoemaker K., Rosenberg S., Kirsch J.F., Georgiou G. 2004. Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *Journal of bacteriology* 186, 17: 5919-5925
- Mulvey M. A. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular microbiology*, 4, 5: 257-271
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M. A. 1999. *Medical Microbiology*, 4<sup>th</sup> ed. Missouri, Mosby, Inc.
- Otto B. R., Van Dooren S. J. M.; Nuijens J. H.; Luirink J., Oudega B. 1998. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of experimental medicine*, 188: 1091-1103
- Paret A. H., De Mot R. 2002. *Escherichia coli*'s uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity? *Microbiology*, 148, 6: 1604-1606
- Parham N. J., Pollard S. J., Desvaux M., Scott-Tucker A., Liu C., Fivian A., Henderson I. R. 2005. Distribution of the serine protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae* among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, 43, 8: 4076-4082
- Parham N. J., Srinivasan U., Desvaux M., Foxman B., Marrs C. F., Henderson I. R. 2004. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology letters* 230: 73-83
- Picard B., Garcia J. S., Gouriou S., Duriez P., Brahimi N., Bingen E., Elion J., Denamur E. 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity*, 67, 2: 546-553
- Potempa J., Pike R. N. 2005. Bacterial peptidases. *Concepts in Bacterial Virulence. Contributions to Microbiology*, 12: 132-188
- Restieri c., Garriss G., Locas M., Dozois C. M. 2007. Autotransporters-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5: 1553-1562

- Robicsek A., Strahilevitz J., Sahm D. F., Jacoby G. A., Hooper D. C. 2006. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *American Society for Microbiology*, 50, 8: 2872-2874
- Rodriguez-Martinez J. M. 2005. Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones. *Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clinica*, 23, 1: 25-31
- Ruiz J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alteration, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 1109-1117
- Russo T. A., Carlino U., Johnson J. R. 2001. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 69, 10: 6209-6216
- Saarela S., Westerlund-Wikström B., Rhen M., Korhonen T. K. 1996. The GafD protein of the G (F17) fimbrial complex confers adhesiveness of *Escherichia coli* to laminin. *Infection and Immunity*, 64, 7: 2857-2860
- Schembri M. A., Dalsgaard D., Klemm P. 2004. Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *Journal of bacteriology*, 186, 5: 1249-1257
- Schmidt H., Beutin L., Karch H. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infection and immunity*, 63, 3: 1055-1061
- Selvaraj S. K., Periandythevar P., Prasadarao N. V. 2007. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* K1 selectively enhances the expression of intracellular adhesion molecule-1 in brain microvascular endothelial cells. *Microbes and infection*, xx: 1-11
- Sharma S., Waterfield N., Bowen D., Rocheleau T., Holland L., James R., Ffrench-Constant R. 2002. The luminicins: novel bacteriocins from *Photobacterium luminescens* with similarity to the uropathogenic-specific protein (Usp) from uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiological letters*, 214, 2: 241-249
- Silva J., 1996. Mechanisms of antibiotic resistance. *Current Therapeutic Research*, 57 (Suppl. A): 30-35
- Slack R. C. B. 1998. Infective syndromes. *Medical microbiology* (Greenwood D., Slack R., Peutherer J.). Fifteenth edition. Chapter 63. 604-609
- Sorsa L. J., Dufke S., Heesemann J., Schubert S. 2003. Characterization of an *iroBCDEN* gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: Evidence for

horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. *Infection and immunity*, 71, 6: 3285-3293

Srinivasan U., Foxman B., Marrs C. F. 2003. Identification of a gene encoding heat-resistant agglutinin in *Escherichia coli* as a putative virulence factor in urinary tract infection. *Journal of clinical microbiology*, 41, 1: 285-289

Stamm W.E., Norrby S. R. 2001. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *The Journal of Infectious Diseases*, 183: 1-4

Tran J. H., Jacoby G. A., Hooper D. C. 2005a. Interaction of plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49,1: 118-125

Tran J. H., Jacoby G. A., Hooper D. C. 2005b. Interaction of plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49,7: 3050-3052

Teng C., Xie Y., Shin S., Di Cello F., Paul-Satyaseela M., Cai M., Sik Kim K. 2006. Effects of *ompA* deletion on expression of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* K1 strain RS218 and on the association of *E. coli* with human brain microvascular endothelial cells. *Infection and immunity*, 74, 10: 5609-5616

Wright J.V., Lenard L. 2001. D-Mannose and bladder infection.

Zhang L., Foxman B., Marrs C. 2002. Both Urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *Journal of clinical microbiology*, 40, 11: 3951-3955

Yu E. W., Aires A. R., Nkaido H. 2003. AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *Journal of Bacteriology*, 185, 19: 5657-5664

[Http://en.wikipedia.org/wiki/Virulence](http://en.wikipedia.org/wiki/Virulence)

[Http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-lactam](http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-lactam)

[Http://www.matforsk.no/ola.fisher.htm](http://www.matforsk.no/ola.fisher.htm)

## 7.2 NECITIRANI VIRI

- Car J., Marinko T. 2003. Zdravljenje nezapletene okužbe sečnega mehurja pri ženskah v družinski medicini. *Zdravstveni vestnik*, 72: 79-83
- Eaves D. J., Randall L., Gray D. T., Buckley A., Woodward M. J., White A. P., Piddock L. J. V. 2004. Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48, 10: 4012-4015
- Johnson J. R., Gajewski A., Lesse A. J., Russo T. A. 2003. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive nonurinary infections. *Journal of clinical microbiology*, 41, 12: 5798-5802
- Johnson J. R., Russo T. A., Tarr P. I., Carlino U., Bilge S. S., Vary J. C., Stell A., L. 2000. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN<sub>E. coli</sub>*, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infection and immunity*, 68, 5: 3040-3047
- Russo T. A., McFadden C. D., Carlino-MacDonald U. B., Beanan J. M., Barnard T. J., Johnson J. R. 2002. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 70, 12: 7156-7160
- Stathopoulos C. 1998. Structural features, physiological roles, and biotechnological applications of the membrane proteases of the OmpT bacterial edopeptidase family: a micro-review. *Membrane Cell Biology*, 12, 1: 1-8
- Snyder L., Champness W. 2003. Molecular genetics of bacteria. American Society for Microbiology, Washington
- Wang Y., Huang S., Wass C. A., Stins M. F., Sik Kim K. 1999. The gene locus *yijP* contributes to *Escherichia coli* K1 invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infection and immunity*, 67, 9: 4751-4756

## **ZAHVALA**

Na začetku naj se iskreno zahvalim mentorici asist. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin, ker me je navdušila za molekularno genetiko in me uvedla v osnove laboratorijskega dela. Hvala za vodstvo in usmerjanje tako pri laboratorijskem delu, kot tudi za pomoč pri pisanju diplomskega dela ter za vso podporo in razumevanje, tudi kadar stvari niso tekle po načrtih.

Zahvaljujem se tudi mentorju prof. Grabnarju za strokovno usmerjanje in podporo pri delu.

Zahvaljujem se recenzentki doc.dr. Marjanci Starčič Erjavec za konstruktivne pripombe ter prof. dr. Darji Žgur Bertok za pomoč v zaključni fazi diplomskega dela.

Najlepša hvala tehničnima sodelavkama Fani Oven in Barbari Kastelic-Bokal za pomoč v laboratoriju, predvsem pa za dobro voljo in prijaznost. Hvala tudi vsem drugim sodelavcem v laboratoriju, ki so mi pomagali pri delu, še posebno dr. Zdravku Podleseku ter Lejli Pašić in Mateju Butali.

Iz srca hvala staršem in bratu, ki so mi vedno stali ob strani in me vzpodbujali. Hvala tudi babicama ter drugim članom družine in vsem prijateljem, ki so bili ob meni.