

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Ana ŠIMENC

**GENOTIPIZACIJA IZBRANIH SEVOV
BAKTERIJE *Escherichia coli*
IZOLIRANIH V BOLNIŠNICI GOLNIK**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Ana ŠIMENC

**GENOTIPIZACIJA IZBRANIH SEVOV BAKTERIJE *Escherichia coli*
IZOLIRANIH V BOLNIŠNICI GOLNIK**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**GENOTYPING OF SELECTED *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED
IN HOSPITAL GOLNIK**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

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

Študijska komisija dodiplomskega študija biologije je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Jernejo Ambrožič Avguštin in za recenzentko doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec.

Mentorica: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

Recenzentka: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Polona ZALAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Marjanca STARČIČ ERJAVEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 26. 9. 2011

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.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ana Šimenc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Dn
- DK 579.61:577.2(479.4 Bolnišnica Golnik)(043.2)=163.6
- KG *Escherichia coli*/filogenetske skupine/filogenetske podskupine/sekvenčna skupina
ST131/virulentni dejavniki/dejavniki odpornosti/PCR
- AV ŠIMENC, Ana
- SA AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (mentor)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca
(recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2011
- IN GENOTIPIZACIJA IZBRANIH SEVOV BAKTERIJE *Escherichia coli*
IZOLIRANIH V BOLNIŠNICI GOLNIK
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XIV, 98 str., 14 pregl., 2 sl., 2 pril., 130 vir.
- IJ SI
- JI sl/en
- AI Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je del normalne črevesne mikrobiote človeka in toplokrvnih živali. Z genotipizacijskimi metodami smo pri 15-ih sevih vrste *E. coli*, izoliranih v letih 2008 in 2009 iz različnih kužnin v Bolnišnici Golnik, ugotavljali prisotnost zapisov za virulentne dejavnike ter zapisov za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam. Seve smo uvrstili v filogenetske skupine in podskupine po Clemontu. S tipizacijo na osnovi multilokusnih zaporedij smo analizirali sedem gospodinjskih genov in seve na podlagi alelnih kombinacij uvrstili v sekvenčne skupine (ST). V močno virulentno ST131, ki je povezana s številnimi zunajčrevesnimi okužbami, smo uvrstili sedem sevov [46%]. Vsi izolati iz ST131 imajo beta-laktamazo z razširjenim spektrom delovanja iz skupine CTX-M ter gene *fimH*, *crl*, *iha*, *sat*, *fluA*, *usp*, *ompA*, *aer*, *kpsMTII*, *fyuA*, *iutA* in *irp*. Vsi pripadajo serološki skupini O25. Šest sevov iz ST131 pripada filogenetski podskupini B₃ [86%], eden pa filogenetski podskupini D₂. Najpogostejši tip beta-laktamaz, ki jih imajo sevi iz sekvenčne skupine ST131 je CTX-M-1. Noben sev iz naše raziskave nima genov *qnr* oziroma gena *qepA* za odpornost proti kinolonom, 9 sevov pa ima gen *aac* (6')-Ib-cr. S Fisherjevim natančnim testom smo preverili razširjenost genov znotraj posameznih skupin. V filogenetski podskupini B₃ in skupini ST131 se statistično značilno pojavljata gena *iha* in gen, značilen za serološko skupino O25, (P = 0,0069) ter geni *usp*, *sat* in *kpsMTII* (P = 0,0013). Gen *fluA*, ki kodira avtotransportski toksin, je statistično bolj značilen za sekvenčno skupino ST131 (P = 0,0013), kot za filogenetsko podskupino B₃ (P = 0,0405).

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- DN Dn
- DC 579.61:577.2(479.4 Bolnišnica Golnik)(043.2)=163.6
- CX *Escherichia coli*/phylogenetic groups/phylogenetic subgroups/ sequence type ST131/
virulence factors/antimicrobial susceptibility/PCR
- AU ŠIMENC, Ana
- AA AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (supervisor)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca
(reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2011
- TI GENOTYPING OF SELECTED STRAINS OF *Escherichia coli* ISOLATED IN
HOSPITAL GOLNIK
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XIV, 98 p., 14 tab., 2 fig., 2 ann., 130 ref.
- LA Sl
- AL sl/en
- AB The bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*) is a part of the normal intestinal microbiota of humans and warm-blooded animals. With genotyping methods we established the presence of virulence factors genes and those that pass the immunity against the antimicrobial substances in 15 strains of *E. coli* which were isolated from different cultures in the Hospital Golnik. We classified the strains in phylogenetic (sub)groups following the Clermont method. With the multilocus sequence typing we analyzed housekeeping genes. Each allelic combination is then assigned a sequence type (ST) number. Into the highly virulent ST131 which is connected with extraintestinal infections we classified seven strains [46%]. All isolates from the ST131 have the extended spectrum beta-lactamase CTX-M and the genes *fimH*, *crl*, *iha*, *sat*, *fluA*, *usp*, *ompA*, *aer*, *kpsMTII*, *fyuA*, *iutA* and *irp*. They all belonged to the serological group O25. Six strains from the ST131 belonged to the phylogenetic subgroup B₂₃ [86%], and one belonged to the phylogenetic subgroup D₂. The most common type of the beta-lactamase of the strains from ST131 was CTX-M-1. None of the strains had the plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes or the gene *qepA*. Nine strains contained the gene *aac* (6')-Ib-cr. We checked the statistical significance of the prevalence of the genes inside the individual groups using the Fisher's Exact Test. In the phylogenetic subgroup B₂₃ and ST131, there was a statistically characteristic occurrence of the genes *iha* and the gene which was connected with O25 (P = 0.0069), and genes *usp*, *sat* and *kpsMTII* (P = 0.0013). The gene *fluA*, which encodes the autotransporter toxin, was statistically more characteristic for the ST131 (P = 0.0013) than for the phylogenetic subgroup B₂₃ (P = 0.0405).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJA <i>ESCHERICHIA COLI</i>	3
2.1.1 Razvrstitev bakterije <i>E. coli</i> v skupine	3
2.1.1.1 Delitev v skupine na osnovi seroloških metod	3
2.1.1.2 Delitev v skupine na osnovi molekularnih metod	4
2.1.1.2.1 Filogenetske skupine in podskupine po Clermontu	4
2.1.1.2.2 Tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij	5
2.1.1.3 Delitev glede na patogenost in mesto povzročanja okužb	8
2.1.1.3.1 Virulentni dejavniki	8
2.1.1.3.2 Sevi IPEC	21
2.1.1.3.3 Sevi ExPEC	23
2.2 ZDRAVLJENJE OKUŽB	25
2.2.1 <i>Beta-laktamski antibiotiki</i>	25
2.2.1.1 Delovanje beta-laktamskih antibiotikov	26
2.2.1.2 Mehanizmi odpornosti proti beta-laktamskim antibiotikom	26
2.2.1.2.1 Beta-laktamaze	26
2.2.2 <i>Kinoloni</i>	30
2.2.2.1 Delovanje kinolonov	31

2.2.2.2	Mehanizmi odpornosti proti kinolonom	32
2.2.2.2.1	Odpornost proti kinolonom, ki je posledica kromosomskih mutacij ..	32
2.2.2.2.2	Plazmidno kodirana odpornost proti kinolonom	32
3	MATERIAL IN METODE	36
3.1	MATERIAL	36
3.1.1	<i>Bakterijski sevi</i>	36
3.1.1.1	Laboratorijska seva.....	36
3.1.1.2	Klinični izolati ESBL producirajočih sevov	36
3.1.2	<i>Gojišča</i>	36
3.1.2.1	Priprava trdnih gojišč LB (angl. <u>L</u> uria- <u>B</u> ertani) v petrijevkah	36
3.1.2.2	Priprava trdnih gojišč LB z dodatkom protimikrobnih učinkovin	36
3.1.2.3	Priprava trdnih gojišč BHI (angl. <u>B</u> rain <u>H</u> eart <u>I</u> nfusion).....	37
3.1.3	<i>Kemikalije</i>	37
3.1.4	<i>Encimi</i>	38
3.1.5	<i>Začetni oligonukleotidi</i>	39
3.1.6	<i>Kompleti</i>	39
3.1.7	<i>Pufri in reagenti</i>	39
3.1.7.1	Ločevanje nukleinskih kislin z elektroforezo na agaroznem gelu.....	39
3.1.8	<i>Pribor in oprema</i>	39
3.1.8.1	Pribor	39
3.1.8.2	Oprema	40
3.2	METODE	40
3.2.1	<i>Verižna reakcija s polimerazo (PCR)</i>	40
3.2.1.1	Priprava vzorčne DNA za izvedbo PCR.....	40
3.2.1.2	Začetni oligonukleotidi za PCR.....	41
3.2.1.3	Sestava reakcijskih mešanic za reakcijo PCR	43
3.2.1.4	Razmere pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)	45
3.2.2	<i>Agarozna gelska elektroforeza</i>	51
3.2.3	<i>Ugotavljanje filogenetskih skupin in podskupin različnih sevov E. coli</i>	52
3.2.4	<i>Restriksijska analiza PCR-pomnožkov</i>	52

3.2.4.1	Restriksijska analiza PCR-pomnožkov dobljenih s parom začetnih oligonukleotidov <i>qac1/qac2</i>	52
3.2.5	Čiščenje fragmentov dobljenih v reakciji PCR in določitev nukleotidnega zaporedja	53
3.2.6	Konjugacija izbranih sevov z recipientskim sevom <i>E. coli</i> J53 Az ^r	53
3.2.7	Fisherjev natančni test	54
4	REZULTATI	55
4.1	UVRSTITEV SEVOV V FILOGENETSKE SKUPINE IN PODSKUPINE	55
4.2	UVRSTITEV SEVOV V SEKVENČNE SKUPINE (ST) NA OSNOVI MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ (MLST)	56
4.3	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI GENOV	58
4.3.1	Ugotavljanje prisotnosti genov za virulentne dejavnike.....	58
4.3.2	Ugotavljanje prisotnosti za serološko skupino O25 značilnega gena.....	63
4.3.3	Ugotavljanje prisotnosti genov za odpornost proti antibiotikom.....	64
4.3.3.1	ANALIZA TRANSKONJUGANT	66
4.4	POVEZANOST GENOV VIRULENTNIH DEJAVNIKOV, ZA SEROLOŠKO SKUPINO O25 ZNAČILNEGA GENA IN GENOV DEJAVNIKOV ODPORNOSTI S FILOGENETSKO (POD)SKUPINO, SEKVENČNO SKUPINO ST131 IN SEROLOŠKO SKUPINO O25	68
4.4.1	Povezanost genov virulentnih dejavnikov s filogenetsko (pod)skupino, sekvenčno skupino ST131 in serološko skupino O25	68
4.4.2	Povezanost za serološko skupino O25 značilnega gena s filogenetsko (pod)skupino in sekvenčno skupino ST131	71
4.4.3	Povezanost genov dejavnikov odpornosti s filogenetsko (pod)skupino, sekvenčno skupino ST131 in serološko skupino O25	76
5	RAZPRAVA	75
5.1	SKLEPI.....	81
6	POVZETEK	83
7	VIRI	85
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razdelitev sevov <i>E. coli</i> v filogenetske skupine in podskupine	5
Preglednica 2: Funkcija za analizo MLST izbranih gospodinjskih genov <i>E. coli</i>	6
Preglednica 3: Laboratorijska seva <i>E. coli</i> , ki smo ju uporabili pri delu	36
Preglednica 4: Založne in končne koncentracije protimikrobnih sredstev.	37
Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri PCR, njihovo nukleotidno zaporedje in velikost nastalega PCR-pomnožka.	41
Preglednica 6: Uvrstitev sevov <i>E. coli</i> v filogenetske skupine in podskupine.....	55
Preglednica 7: Kombinacije alelov izbranih sedmih gospodinjskih genov.	57
Preglednica 8: Prisotnost genov virulentnih dejavnikov.....	60
Preglednica 9: Prisotnost za serološko skupino O25 značilnega gena.....	63
Preglednica 10: Prisotnost genov dejavnikov odpornosti proti beta-laktamskim antibiotikom z razširjenim spektrom delovanja in kinolonom	65
Preglednica 11: Analiza transkonjugant.....	66
Preglednica 12: Povezanost genov virulentnih dejavnikov s filogenetsko (pod)skupino, sekvenčno skupino ST131 in serološko skupino O25	69
Preglednica 13: Povezanost za serološko skupino O25 značilnega gena s filogenetsko (pod)skupino in sekvenčno skupino ST131.....	72
Preglednica 14: Povezanost genov dejavnikov odpornosti s filogenetsko (pod)skupino, sekvenčno skupino ST131 in serološko skupino O25	74

KAZALO SLIK

Slika 1: (A) Kromosomska lega in (B) genetska raznolikost sedmih gospodinjskih genov <i>E. coli</i> , ki se uporabljajo za analizo MLST..	7
Slika 2: Elektroforeza PCR-pomnožkov genov <i>chuA</i> (279 bp), <i>yjaA</i> (211 bp) in fragmenta TSPE4.C2 (152 bp)	55

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Sevi *E. coli*, ki tvorijo ESBL, izolirani iz različnih kužnin v Bolnišnici Golnik.

PRILOGA B: Nukleotidna zaporedja PCR-pomnožkov gospodinjskih genov, s pomočjo katerih smo določili sekvenčne skupine posameznih sevov *E. coli*.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A/E lezije.....	histopatološke spremembe črevesnega epitela (angl. " <u>att</u> aching-and- <u>eff</u> acing lesion")
AAF.....	agregativne vezavne fimbrije (angl. " <u>agg</u> regative <u>adh</u> erence <u>fim</u> briae")
APEC.....	sevi <i>E. coli</i> , patogeni za ptice (angl. " <u>av</u> ian <u>pat</u> hogenic <u>E. coli</u> ")
bp.....	bazni par
BHI	gojišče <u>B</u> rain <u>H</u> eart <u>I</u> nfusion
CNF1.....	citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (angl. " <u>cyt</u> otoxic <u>ne</u> crotizing factor 1")
DAEC.....	difuzno adherentni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. " <u>diff</u> usely <u>adh</u> erent <u>E. coli</u> ")
DNA.....	deoksiribonukleinska kislina (angl. " <u>de</u> oxyribo <u>nuc</u> leic <u>ac</u> id")
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
EAEC.....	enteroagregativni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. " <u>ent</u> ero <u>agg</u> regative <u>E. coli</u> ")
EDTA.....	etilendiamintetraocetna kislina
EHEC.....	enterohemoragični sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. " <u>ent</u> ero <u>ha</u> emorrhagic <u>E. coli</u> ")
EIEC.....	enteroinvazivni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. " <u>ent</u> ero <u>inv</u> asive <u>E. coli</u> ")
EPEC.....	enteropatogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. " <u>ent</u> ero <u>pat</u> hogenic <u>E. coli</u> ")
ESBL.....	beta-laktamaza z razširjenim spektrom delovanjem (angl. " <u>ext</u> ended spectrum <u>bet</u> a- <u>lac</u> tamase")
EtBr.....	etidijev bromid
ETEC.....	enterotoksigeni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. " <u>ent</u> ero <u>tox</u> igenic <u>E. coli</u> ")
ExPEC.....	zunajčrevesni patogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. " <u>ext</u> raintestinal <u>pat</u> hogenic <u>E. coli</u> ")
IPEC.....	črevesni patogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. " <u>int</u> estinal <u>pat</u> hogenic <u>E. coli</u> ")
kb.....	kilobaza
KMP.....	<u>k</u> rvno- <u>mo</u> žganska pregrada

LB.....	gojišče <u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
LT.....	termo-labilni toksin (angl. "heat-labile toxin")
MLEE.....	multilokusna encimska elektroforeza (angl. " <u>m</u> ulti- <u>l</u> ocus <u>e</u> nzyme <u>e</u> lectrophoresis")
MLST.....	tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (angl. " <u>m</u> ulti- <u>l</u> ocus <u>s</u> equences <u>t</u> yping")
MRHA.....	hemaglutinacija, odporna proti manози (angl. "mannose-resistant hemagglutination")
MSHA.....	hemaglutinacija, občutljiva za manozo (angl. "mannose-sensitive hemagglutination")
NaCl.....	natrijev klorid
NMEC.....	sevi <i>Escherichia coli</i> , ki povzročajo meningitis pri novorojenčkih (angl. " <u>n</u> eonatal <u>m</u> eningitis associated <u>E. coli</u> ")
obr./min.....	obrati na minuto
PBP.....	penicilin vezavni proteini (angl. " <u>p</u> enicillin <u>b</u> inding <u>p</u> roteins")
PCR.....	verižna reakcija s polimerazo (angl. " <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction")
PMQR.....	plazmidno-kodirana odpornost proti kinolonom (angl. " <u>p</u> lasmid <u>m</u> ediated <u>q</u> uinolone <u>r</u> esistance")
QRDR.....	regija, ki posreduje odpornost proti kinolonom (angl. "quinolone resistance determining region")
RNA.....	ribonukleinska kislina (angl. " <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid")
RNAza.....	encim, ki cepi molekule RNA
SPATE.....	serinski proteazni avtotransporterji iz družine enterobakterij (angl. " <u>s</u> erine <u>p</u> rotease <u>a</u> uto <u>t</u> ransporters of <u>E</u> nterobacteriaceae")
ST.....	termo-stabilni toksin (angl. "heat-stable toxin")
ST.....	sekvenčni tip oz. sekvenčna skupina (angl. " <u>s</u> equences <u>t</u> ype")
ST131.....	sekvenčna skupina 131
TBE.....	Tris-boratni elektroforezni pufer
Tcp.....	protein, ki vsebuje domeno TIR (angl. " <u>T</u> oll/ <u>i</u> nterleukin-1 <u>r</u> eceptor domain-containing protein")
TE.....	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA
UPEC.....	uropatogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (angl. " <u>u</u> ropathogenic <u>E. coli</u> ")

UV.....ultravijolična (svetloba)

VTEC.....sevi *Escherichia coli*, ki sintetizirajo verotoksine (angl. "verotoxin-producing *E. coli*")

VT.....verotoksin

1 UVOD

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je del normalne črevesne mikrobiote človeka in toplokrvnih živali, kjer igra pomembno vlogo pri razgradnji hrane in sintezi vitaminov.

V primeru, da komezalni sevi zaidejo v sterilna okolja svojega gostitelja, lahko povzročajo zunajčrevesne okužbe. Črevesne okužbe povzročajo patogeni sevi *E. coli*, pridobljeni iz okolja. Patogeni sevi imajo v svojem genomu številne zapise za virulentne dejavnike, kot so adhezini, toksini in invazini, dejavniki, ki omogočajo prehod krvno-možganske pregrade, sistemi za privzem železa ter dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu gostitelja in odpornost proti serumu. V zadnjem času so pogosto opisani tudi komezalni sevi z zapisi za virulentne dejavnike. Okužbe, ki jih povzročajo nekateri sevi, niso odvisni le od patogenosti same bakterije, temveč tudi od zdravstvenega stanja gostitelja.

Zdravljenje okužb, ki jih povzročajo sevi vrste *E. coli*, poteka s pomočjo protimikrobnih učinkovin, najpogosteje z beta-laktamskimi antibiotiki in kinoloni. Kljub uspešnemu razvoju le-teh, skupaj z njim poteka tudi evolucija odpornih bakterijskih vrst in sevov. Odpornost je posledica mutacij in/ali horizontalnega prenosa genov, na katerih so zapisi za odpornost.

Do nedavnega smo lahko v strokovni literature zasledili podatek, da so sevi, ki imajo številne zapise za virulentne dejavnike, praviloma bolj občutljivi za antibiotike in obratno, sevi, ki so odporni proti antibiotikom naj bi imeli manj virulentnih dejavnikov. V zadnjem času se vse pogosteje pojavljajo sevi, ki imajo zapise tako za virulentne dejavnike kot tudi zapise za odpornost proti antibiotikom. Tak je, na primer, zelo patogen sev iz sekvenčne skupine ST131, ki je razširjen že po celem svetu.

1.1 NAMEN DELA

V diplomskem delu smo genotipizirali 15 sevov *E. coli*, izoliranih v letih 2008 in 2009 iz različnih kužnin v Bolnišnici Golnik.

Vseh 15 sevov smo s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR) uvrstili v filogenetske skupine in podskupine po Clermontu ter ugotavljali prisotnost genov za adhezine, toksine in invazine, dejavnike, ki omogočajo prehod krvno-možganske pregrade, sisteme, ki omogočajo privzem železa in dejavnike, ki omogočajo izogibanje imunskemu sistemu gostitelja in odpornost proti serumu. Ugotavljali smo tudi prisotnost genov za odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom z razširjenim spektrom delovanja in plazmidno kodirano odpornost proti kinolonom. Pomnožili smo tudi sedem gospodinjskih genov in seve s pomočjo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST) uvrstili v sekvenčne skupine (ST). Še posebej nas je zanimala vedno bolj razširjena sekvenčna skupina ST131, povezana s hudimi zunajčrevesnimi okužbami. V diplomskem delu smo ugotavljali tudi značilne povezave med filogenetskimi skupinami, podskupinami, serološko skupino O25 in sekvenčno skupino ST131 ter prisotnostjo genskih zapisov za virulentne dejavnike in odpornost proti protimikrobnim učinkovinam.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Escherichia coli*

Bakterijo *Escherichia coli* (*E. coli*) uvrščamo v skupino enterobakterij, ki skupaj z drugimi bakterijami sestavljajo relativno homogen razred γ -proteobakterij (Garrity in sod., 2005).

Enterobakterije so nesporulirajoči bacili, ki se pojavljajo posamezno ali v parih. V premeru merijo od 1,1 do 1,5 μm , v dolžino pa od 2 do 6 μm . Po Gramu se barvajo negativno. V primeru, da so gibljivi, se premikajo s 5–10 peritrihno nameščenimi flageli. So fakultativni anaerobi z respiratornim ali fermentativnim tipom metabolizma, obstajajo pa tudi anaerobni podtipi. So oksidaza negativni. Razmerje parov G + C v DNA je med 48 in 59-odstotki (Garrity in sod., 2005; Madigan in Martinko, 2006).

Bakterija *E. coli* je del normalne črevesne mikrobiote človeka in živali, kjer igra pomembno vlogo pri sintezi vitaminov, zlasti vitamina K (Garrity in sod., 2005). Večina komenzalnih sevov *E. coli* je nepatogenih. V primeru, da bakterijski sevi zaidejo v sterilna okolja svojega gostitelja, da pride do oslabilve imunskega sistema gostitelja ali spremembe črevesne mikrobiote, lahko nepatogeni sevi povzročijo različne bolezenske znake. Bolezenski znaki so lahko tudi posledica vnosa patogenih sevov *E. coli* (Nicolas-Chanoine in sod., 2007).

2.1.1 Razvrstitev bakterije *E. coli* v skupine

Bakterijo *E. coli* lahko delimo v skupine z različnimi metodami na osnovi različnih kriterijev.

2.1.1.1 Delitev v skupine na osnovi seroloških metod

Serotipizacija je metoda, ki temelji na razlikah v strukturi antigenov, ki se nahajajo na bakterijski površini. Antigeni O so lipopolisaharidni antigeni in jih označujemo s številkami od O1 do O73. Od tega je bilo nekaj skupin izločenih, na novo pa se raziskuje nekatere nove serološke skupine in podskupine O. Antigeni K so kapsularni polisaharidni antigeni. Poznamo 60 seroloških skupin K. Flagelarnih ali H antigenov je 56, od tega so tri skupine izločili (Garrity in sod., 2005).

Serotipizacija je bila v preteklosti zelo pomembna metoda, ki pa se danes opušča. Določene antigene še vedno uporabljamo pri identifikaciji bakterij, na primer antigene O157, O26 in O25. Slednji je še posebej značilen za izolate *E. coli*, ki pripadajo sekvenčni skupini ST131.

2.1.1.2 Delitev v skupine na osnovi molekularnih metod

2.1.1.2.1 Filogenetske skupine in podskupine po Clermontu

Bakterijo *E. coli* delimo v štiri glavne filogenetske skupine: A, B1, B2 in D. Znotraj glavne filogenetske skupine A ločimo podskupini A₀ in A₁, znotraj skupine B2 podskupini B2₂ in B2₃, znotraj skupine D pa podskupini D₁ in D₂ (Clermont in sod., 2000). Vse štiri filogenetske skupine vključujejo tako patogene kot nepatogene seve, a se njihovo razmerje med skupinami razlikuje (Wirth in sod., 2006). Virulentne zunajčrevesne seve večinoma uvrščamo v filogenetsko skupino B2, v manjši meri tudi v podskupino D₂, komenzalni sevi pa so večinoma v filogenetski skupini A. Zaradi povečane stopnje homolognih rekombinacij se je genom patogenih sevov pogosteje spreminjal. Glavna evolucijska sila v filogenetskih skupinah B1, B2 in D so rekombinacije, v skupini A pa mutacije. Mutacije so pogoste tudi v filogenetski skupni D. Sevi *E. coli* lahko pridobijo nove gene za virulentne dejavnike s horizontalnim genskim prenosom (Canton in sod., 2006). Zanimivo je, da je genom sevov iz filogenetskih skupin B1, B2 in D večji od genoma sevov iz skupine A ($5,07 \pm 0,09$ Mb in $4,74 \pm 0,06$ Mb) (Bergthorsson in Ochman, 1998).

Postopek, s katerim lahko bakterije hitro uvrstimo v filogenetske skupine in podskupine, temelji na verižni reakciji s polimerazo (PCR), s katero ugotavljamo prisotnost genov *chuA* in *yjaA* ter fragmenta DNA TSPE4.C2. Gen *chuA* je v enterohemoragičnem sevu *E. coli* O157:H7 potreben za transport hema, funkcija gena *yjaA* pa je neznana. Gen *chuA* je prisoten v vseh sevih iz skupine B2 in D, sevi iz skupin A in B1 pa ga nimajo. S pomočjo tega gena, lahko skupini B2 in D ločimo od skupin B1 in A. Gen *yjaA* ločuje med skupinama B2 (pozitivni) in D (negativni). Fragment TSPE4.C2 je prisoten pri večini sevov B1 in v nobenem sevu iz skupine A (Clermont in sod., 2000).

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

Filogenetska skupina	Filogenetska podskupina	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2
A	A ₀	-	-	-
	A ₁	-	+	-
B1		-	-	+
B2	B2 ₂	+	+	-
	B2 ₃	+	+	+
D	D ₁	+	-	-
	D ₂	+	-	+

Znak + pomeni prisotnost gena, znak - pa odsotnost gena.

V primerjavi z referenčno hibridizacijsko metodo po Southernu, so z metodo po Clermontu v pravilno filogenetsko skupino uvrstili 99-odstotkov sevov. Napaka se je pojavila pri sevih iz filogenetske skupine B1, ki so jih napačno uvrstili v filogenetsko skupino A (Clermont in sod., 2000). V primerjavi z metodo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij (glej spodaj) so z metodo po Clermontu, pravilno uvrstili 85-odstotkov sevov *E. coli*, od tega so bili vsi sevi iz filogenetskih skupin B1 in B2 pravilno uvrščeni, iz podskupine A₁ je bilo pravilno uvrščenih 91-odstotkov sevov, iz skupine D pa 76-odstotkov sevov. Sevov iz podskupine A₀ s to metodo ne moremo pravilno uvrstiti v filogenetske skupine (Gordon in sod., 2008).

2.1.1.2.2 Tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij

E. coli je bila prva bakterija, pri kateri so vpeljali tehnike populacijske genetike. Razvoj se je začel z multilokusno encimsko elektroforezo (MLEE ali angl. multilocus enzyme electrophoresis), ki temelji na relativni mobilnosti encimov pri elektroforezi. Razlike v mobilnosti so neposredno povezane z mutacijami oziroma rekombinacijami v genskih zapisih za encime (www.springerprotocols.com). Pogoste rekombinacije in mutacije v bakterijskem genomu, ki so posledica imunološke selekcije v gostitelju in uporabe antibiotikov, lahko zabrišejo filogenetske signale in s tem sorodnost med posameznimi sevi (Urwin in Maiden, 2003; Wirth in sod., 2006).

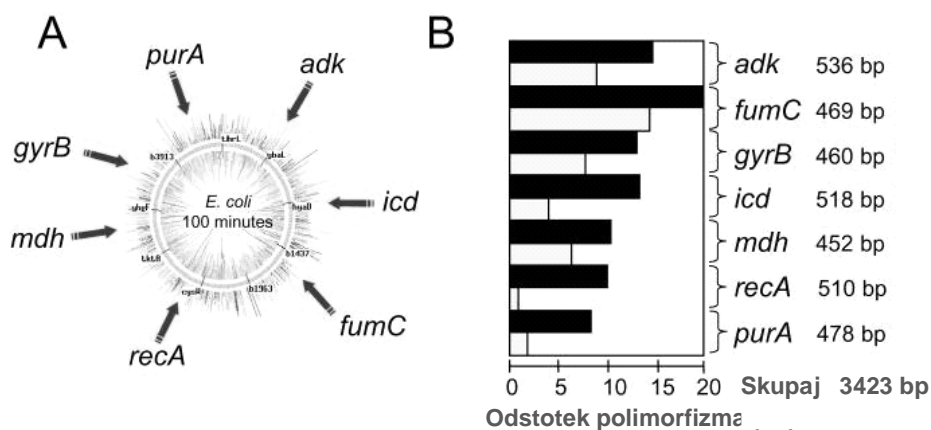
Leta 1998 se je uveljavila metoda analize sedmih gospodinjskih genov, s katero lahko ocenimo populacijsko strukturo *E. coli*, imenovana tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST ali angl. multilocus sequence typing) (Urwin in Maiden, 2003). Gospodinjski geni so geni, katerih produkti so bistveni za delovanje vsake celice ne glede na njeno funkcijo, zato so pri sorodnih sevih evolucijsko ohranjeni. Znotraj vsakega od sedmih gospodinjskih genov je polimorfni od 8 do 20-odstotkov nukleotidov (Wirth in sod., 2006).

Posameznim kombinacijam alelov vseh sedmih genov so dodelili številko sekvenčne skupine (ST ali angl. sequence type), sorodne ST-je pa uvrstili v komplekse ST. Kompleksi ST vključujejo centralni genotip ter sorodne genotipe, ki izhajajo iz centralnega z omejenim številom genetskih dogodkov. Organizacija sekvenčnih skupin v komplekse je pomembna pri epidemoloških analizah. S primerjavami alelnih profilov lahko ugotovljamo sorodnost med izolati, saj imajo sorodni izolati enak ali zelo podoben ST (Urwin in Maiden, 2003). Skupine ST in kompleksi ST se med filogenetskimi skupinami razlikujejo, kar kaže, da je bila virulenca pridobljena kasneje v evoluciji (Wirth in sod., 2008).

Preglednica 2: Funkcija za analizo MLST izbranih gospodinjskih genov *E. coli*.

Gospodinjski gen	Produkt gena	Funkcija
<i>adk</i>	adenilat kinaza	Encim, ki katalizira fosforilacijo AMP v ADP ob prisotnosti ATP.
<i>fumC</i>	fumarat hidrataza	Encim iz cikla citronske kisline, ki katalizira reverzibilno hidratacijo fumarčne kisline v L-jabolčno kislino.
<i>icd</i>	izocitrat/ izopropilmalat dehidrogenaza	Oksidoreduktaza, ki katalizira pretvorbo izocitrata in NAD ⁺ v 2-ketoglutarat, CO ₂ in NADH. Za delovanje so potrebni Mg ²⁺ in Mn ²⁺ ioni. Aktivirajo ga ADP, citrat in Ca ²⁺ , inhibirajo pa NADH, NADPH in ATP. Reakcija je ključna v ciklu citronske kisline.
<i>purA</i>	adenilosukcinat dehidrogenaza	Encim, ki katalizira nastanek AMP iz L-aspartata, IMP in GTP v biosintezi AMP.
<i>gyrB</i>	DNA giraza	Bakterijska DNA topoizomeraza II, ki katalizira od ATP-ja odvisno odpiranje DNA vijačnic, prehod vijačnice skozi odprtino in ponovno zapiranje obeh vijačnic.
<i>recA</i>	ATP/GTP vezavni motiv	Več funkcijski DNA-vezavni protein, ki igra pomembno vlogo v homologni rekombinaciji in postreplicativnih popravilnih mehanizmih.
<i>mdh</i>	malat dehidrogenaza	Encim, ki katalizira pretvorbo (S)-malata in NAD ⁺ v oksaloacetat in NADH.

Viri: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/2007/MBrowser.html>, <http://www.epibio.com>,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&term=3990893>



Slika 1: (A) Kromosomska lega in (B) genetska raznolikost sedmih gospodinjskih genov *E. coli*, ki se uporabljajo za analizo MLST. Črni stolpci v histogramu označujejo polimorfizem nukleotidov, sivi pa polimorfizem aminokislin. Poleg simbola posameznega gena je prikazana dolžina nukleotidnega zaporedja genskega fragmenta, ki se uporablja za analizo MLST (Wirth in sod., 2006).

2.1.1.2.2.1 Sekvenčna skupina 131 (ST131)

V svetu je vedno več klonalno razširjenih, močno virulentnih sevov iz sekvenčne skupine ST131 (Tartof in sod., 2005). Večina izolatov *E. coli*, ki pripada sekvenčni skupini ST131, kaže poleg enakega profila MLST tudi naslednje značilnosti: filogenetska skupina B2, serotip O25:H4, prisotnost beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja iz skupine CTX-M in odpornost proti ciprofloksacinu. Raziskave so pri izolatih ST131 potrdile prisotnost genov *fimH* (fimbrije tipa I), *sat* (avtotransportski toksin), *fyuA* (receptor za jersiniabaktin), *usp* (uropatogeni specifični proteini) in *malX* (marker za otoke patogenosti) (Nicolas-Chanoine in sod., 2007; Coelho in sod., 2010). Raziskava iz leta 2008 je pri 7-odstotkih zdravih oseb iz območja Pariza potrdila prisotnost *E. coli* ST131 brez gena *bla*_{CTX-M-15} (Leflon-Guibout in sod., 2008).

Izolati O25:H4-ST131 so povezani s hudimi zunajčrevesnimi okužbami. Pogosto jih izolirajo iz krvi in trebušne tekočine. Predstavljajo velik zdravstveni problem, saj so odporni proti številnim protimikrobnim učinkovinam (Nicolas-Chanoine in sod., 2007).

2.1.1.3 Delitev glede na patogenost in mesto povzročanja okužb

Komenzalni in patogeni sevi *E. coli* se po filogenetskem ozadju in virulentnih lastnostih močno razlikujejo (Nicolas-Chanoine in sod., 2007). Patogeni sevi *E. coli* imajo v svojem genomu številne zapise za virulentne dejavnike in so povezani z okužbami. Letno povzročijo več kot 160 milijonov primerov griže, ki se pri milijonu ljudi konča s smrtjo (Wirth in sod., 2006). Bakterije vrste *E. coli* glede na mesto povzročanja okužb delimo v črevesne (sevi IPEC ali angl. *intestinal pathogenic E. coli*) in zunajčrevesne (sevi ExPEC ali angl. *extraintestinal pathogenic E. coli*) seve (Garrity in sod., 2005).

2.1.1.3.1 Virulentni dejavniki

Virulenca je sposobnost patogena, da povzroča poškodbe tkiva ali bolezen v gostitelju. Največkrat je posledica prisotnosti genskih zapisov za različne virulentne dejavnike (Johnson, 1991; Madigan in Martinko, 2006).

Virulentne dejavnike lahko razdelimo v dve skupini, na tiste, ki se izražajo na površini bakterijske celice (npr. fimbrije) in tiste, ki jih bakterija sintetizira znotraj celice in nato izloči na mesto delovanja (npr. hemolizin alfa) (Emody in sod., 2003). Prvi in najpomembnejši korak pri okužbi gostitelja je pritrditev bakterije na površino gostiteljske celice. Vezavi lahko sledi vstop v celice ali tvorba biofilma (Antão in sod., 2009; Johnson, 1991). Vezava bakterije na površino je nujna za nadaljno kolonizacijo in nastanek okužbe. Pri vseh nadaljnjih stopnjah sodelujejo toksini in drugi virulentni dejavniki, ki bakterijam omogočajo preživetje v gostitelju in izogibanje imunskemu odzivu.

2.1.1.3.1.1 Fimbrije in adhezini

Fimbrije so nitaste zunajcelične strukture različnih velikosti, ki omogočajo specifično vezavo bakterije na površino gostiteljske celice. Na površini bakterijske celice se nahaja več kot 400 fimbrij (Antão in sod., 2009).

Na površini fimbrij je protein adhezin, ki omogoča visoko afinitetno vezavo patogena na specifične komponente celične površine (Antão in sod., 2009). Adhezini bakterije *E. coli* imajo različne morfološke značilnosti in receptorsko specifičnost. Večinoma se obnašajo kot lektini, ki prepoznavajo oligosaharidne ostanke glikoproteinov in glikolipidov (Le Bouguenec, 2005).

Vezavo patogenih bakterij na receptorje gostitelja posredujejo fimbrijski ali nefimbrijski adhezini. Fimbrijski adhezini so nameščeni na vrhu fimbrije (npr. fimbrije tipa 1), nefimbrijski pa se nahajajo neposredno na površini bakterijske celice (npr. adhezini družine Afa/dr). Večina adhezinov deluje šele po vezavi na specifični receptor v gostiteljskem tkivu. En sam patogeni sev lahko vsebuje različne adhezine z afiniteto za različne specifične receptorje, ki mu omogočajo prilagoditev na različna gostiteljska tkiva med okužbo (Le Bouguéneć, 2005).

Fimbrije posameznih sevov so sestavljene iz specifičnih proteinskih podenot in imajo različne aglutinacijske lastnosti (Antão in sod., 2009). Fimbrije tipa 1, ki posredujejo za manozo občutljivo hemaglutinacijo (MSHA ali angl. mannose-sensitive hemagglutination), najdemo na površini komenzalnih in patogenih sevov *E. coli*. Večina fimbrij, ki je na površini patogenih sevov *E. coli*, povzroča za manozo odporno hemaglutinacijo (MRHA ali angl. mannose-resistant hemagglutination) (Le Bouguéneć, 2005).

Fimbrijski adhezini

2.1.1.3.1.1.1 Fimbrije tipa 1

Fimbrije tipa 1 so neflagelarne, nitaste strukture na površini bakterijske celice, ki omogočajo pripenjanje bakterije na gostiteljske celice.

Sinteza fimbrij vključuje štiri gene, imenovane *fimA*, *fimB*, *fimC* in *fimD*. Izražanje genov fimbrij tipa 1 je fazno variabilno, kar pomeni, da so lahko fimbrije v določenem obdobju fenotipsko prisotne, v določenem obdobju pa ne. Fazno variacijo nadzorujeta dva regulatorna gena *fim*, *fimB* in *fimE*. Dodatni trije geni, *fimF*, *fimG* in *fimH* niso potrebni za tvorbo fimbrij tipa 1, pač pa so pomembni za sposobnost vezave na celice gostitelja. Adhezin fimbrij tipa 1, ki ga kodira gen *fimH*, je na vrhu fimbrije in je odgovoren za vezavo na receptor. FimH posreduje tudi za manozo občutljivo hemaglutinacijo., (Antão in sod., 2009). Fimbrije tipa 1 omogočajo tudi invazijo in posledično okužbo gostiteljskega tkiva ter rast v biofilmu (Martinez in sod., 2000; Schembri in Klemm, 2001).

2.1.1.3.1.1.2 P-fimbrije

P-fimbrije so, podobno kot fimbrije tipa 1, nitaste strukture na površini bakterijske celice (Antão in sod., 2009). Receptorje prepoznavajo z adhezinom PapG, ki je nameščen na vrhu fimbrije (Ulett in sod., 2007).

P-fimbrije so heteropolimeri, sestavljeni iz glavnega pilina PapA, manjših pilinov PapE in PapF ter adhezina PapG. PapE, PapF, PapK in PapG so locirani na vrhu fimbrije. PapF in PapG omogočata vezavo bakterije na gostiteljsko celico (Antão in sod., 2009).

Adhezini PapG se pojavljajo v treh molekularnih variantah: PapGI, PapGII, PapGIII. PapGIII je prevladujoča varianta med bakterijskimi izolati *E. coli* pri ženskah in otrocih z vnetjem sečnega mehurja, PapGII pa je povezan z okužbami ledvic in bakteremijo pri ljudeh. P-fimbrije so ključne determinante, ki so povezane z virulenco *E. coli* pri okužbah urinarnega trakta. Potrebne so za vezavo na uroepitelialne celice *in vivo* ter povezane z močnim vnetnim odgovorom, ki nastane kot posledica bakterijske kolonizacije ledvic. Vodi lahko k okvaram ledvic (Antão in sod., 2009). V živalskih modelih in v urinarnem traktu človeka sprožijo P-fimbrije prirojen imunski odgovor (Ulett in sod., 2007).

2.1.1.3.1.1.3 S-fimbrije

Gruča genov *sfa* je velika 6,5 kb in kodira najmanj sedem specifičnih genskih produktov *sfa*. Skupina genov *sfa* kodira protein, ki je zgrajen iz večje, 16 kDa velike podenote SfaA in treh manjših podenot SfaS (15 kDa), SfaG (17kDa) in SfaH (29 kDa). Izražanje *sfa* je odvisno od razmer v okolju, kot so temperatura, osmolarnost in prisotnost glukoze. Na molekularni stopnji izražanje *sfa* posredujeta dva regulatorna proteina, *sfaB* in *sfaC*. S-fimbrije prepoznavajo strukture, ki vsebujejo nevraminsko (sialično) kislino. Zaradi specifične vezave na sialil galaktozide jih imenujemo S-fimbrije. Vezavo omogoča *sfaS*, manjša podenota S-fimbrij. Morfološko so S-fimbrije podobne fimbrijam tipa 1 in P-fimbrijam (Antão in sod., 2009).

2.1.1.3.1.1.4 M-fimbrije

Gen *bmaE* kodira M aglutininsko podenoto fimbrij tipa M. M-fimbrije se vežejo na terminalno aminokislinsko zaporedje krvnega antigena iz skupine M (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Johnson, 1991). Gen *bmaE* je povezan s sevi, ki jih po Clermontu uvrščamo v filogenetsko skupino B1 (Ramos in sod., 2009).

2.1.1.3.1.1.5 Agregativne adherentne fimbrije

Agregativne adherentne fimbrije (AAF ali angl. *aggregative adherence fimbriae*) so kodirane na 55- do 65-MDa velikem virulentnem plazmidu pAA (Farfan in sod., 2008).

Glede na aminokislinsko zaporedje večje podenote ločimo tri različice AAF: AAF/I, AAF/II in AAF/III, ki so kodirane z geni *aggA*, *aafA* in *agg3A* (Boisen in sod., 2008). Različica AAF/II vključuje dve strukturni podenoti: večjo podenoto AafA in manjšo podenoto AafB. AafA prepozna proteine zunajceličnega matriksa in omogoča adhezijo, AafB pa je povezan s sproščanjem citokinov (Farfan in sod., 2008).

2.1.1.3.1.1.6 G-fimbrije

G-fimbrije uvrščamo v družino fimbrij F17. G-fimbrije kodira skupina štirih genov. Filament gradita adhezina F17A, ki je glavna strukturna podenota, odgovorna za antigenske lastnosti, in F17G. F17C je pomemben protein zunanje membrane, nujen za translokacijo podenot preko zunanje membrane (Tanskanen in sod., 2001).

Gen *gafD* kodira topno, na C-terminalnem delu okrnjeno obliko fimbrialnega lektina, imenovano Δ GafD. Δ GafD je 20-kDa velik protein prisoten v periplazmi bakterij, ki sintetizirajo G-fimbrije, ni pa vključen v fimbrialni filament. Protein GafD se specifično veže na N-acetil-D-glukozaminske ostanke glikoproteinov, npr. laminin, glikoziliran protein bazalne membrane, ki je na površini epitelnih, endotelih in mišičnih celic. Izražanje fimbrij F17 je povezano z izražanjem citotoksičnega nekrotizirajočega dejavnika (CNF1) (Saarela in sod., 1996).

G-fimbrije omogočajo vezavo na črevesne celice, na bazalno membrano (Tanskanen in sod., 2001) in zunajcelični matriks (Saarela in sod., 1996).

2.1.1.3.1.1.7 Curlijeva vlakna

Curlijeva vlakna so spiralne strukture na površini bakterijske celice. Kodirana so s skupino genov *csg* (angl. *curl* *subunit* *gene*), ki vključuje dva operona, od katerih eden kodira *csgB*, *csgA* in *csgC*, drugi pa *csgD*, *csgE*, *csgF* in *csgG* (Antão in sod., 2009; Russell in Herwald, 2005, str. 67-89). Curli sestoji iz polimerov 15 kDa velikega proteina curlina, ki ga kodira gen *csgA*. Večina naravnih izolatov *E. coli* ima gen *crl*, a samo nekateri lahko sestavijo proteinske podenote v curlijeva vlakna, saj je za to potrebno izražanje obeh operonov (Antão in sod., 2009).

Curlijeva vlakna omogočajo vezavo bakterij na tanko črevo in so udeležena pri tvorbi biofilmov (Russell in Herwald, 2005, str. 67-89). Sevi *E. coli*, ki imajo curlijeva vlakna, lahko v človeški plazmi absorbirajo plazminogen in tkivni aktivator plazminogena, kar vodi v tvorbo proteolitično aktivnega plazmina, s čimer je omogočeno razširjanje bakterij znotraj gostitelja (Antão in sod., 2009).

Nefimbrijski adhezini

2.1.1.3.1.1.8 Adhezin Iha

Iha je približno 78-kDa velik protein v zunanji membrani, ki so ga prvič opisali v enterohemoragičnem sevu *E. coli* O157:H7. Zaradi podobnosti z enterobaktinskim sideroforjem IrgA bakterije *Vibrio cholerae*, so ga poimenovali Iha (angl. *iron-regulated gene* *homologue* *adhesine*) (Leveille in sod., 2006; Johnson in sod., 2005).

Adhezin Iha ne povzroča aglutinacije. Zapis zanj je na otoku patogenosti (Johnson in sod., 2000). Glede na rezultate nekaterih raziskav naj bi bil Iha kateholatni sideroforni receptor, ki lahko v celice privzema entrobaktin in sorodne spojine (Leveille in sod., 2006).

2.1.1.3.1.1.9 Proti toploti odporen aglutinin

Aglutinin Hra (angl. *heat-resistant agglutinin*) je proti toploti odporen protein zunanje membrane. Hra v sevu ETEC O9:H10:K99 je proti manosi odporen hemaglutinacijski protein, ki pospešuje zlepljanje človeških in živalskih eritrocitov ter človeških črevesnih celic. Nekateri raziskave povezujejo gen *hra* z drugimi virulentnimi geni, v največji meri z genom *cnf* in *hly*, ki se nahajata na otokih patogenosti (Srinivasan in sod., 2003).

2.1.1.3.1.2 Toksini in invazini

2.1.1.3.1.2.1 Hemolizin alfa

Hemolizini povzročajo zunajčrevesne okužbe. Delujejo na različne celice, kot so limfociti, granulociti, eritrociti in renalne tubularne celice (Schmidt in sod., 1995). Hemolitični sevi bakterije *E. coli* najpogosteje sintetizirajo in izločajo hemolizin alfa (Johnson, 1991).

Hemolizin alfa kodira operon *hly*, ki vključuje štiri gene. HlyA je 110 kDa velik protein s hemolitično funkcijo. Aktivira ga 20 kDa velik protein HlyC, ki mu doda maščobno kislino (acilacija). Proteina HlyB in HlyD tvorita membranski kompleks, translokator, ki skupaj s proteinom TolC omogočata izločanje proteina HlyA preko zunanje membrane (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Johnson, 1991).

Število parov G+C v operonu *hly* bakterije *E. coli* je 40-odstotno in je podobno vsebnosti G+C parov pri rodovih *Proteus* in *Pasteurella spp.*, zato je možno da geni za hemolizin alfa izvirajo iz ene izmed teh dveh vrst. Možno je tudi, da geni izvirajo iz genoma sesalcev, saj so podobni genu *mdr*, ki ga najdemo v nekaterih tumorskih celicah. Produkt tega gena je neselektivna črpalka, ki aktivno črpa različne spojine iz celic in omogoča odpornost proti številnim zdravilom (Johnson, 1991).

Zapis za hemolizin alfa je pogosto povezan z zapisom za citotoksični nekrotizirajoči dejavnik (Johnson, 1991).

2.1.1.3.1.2.2 Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1

Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (CNF1 ali angl. cytotoxic necrotizing factor 1) je 115 kDa velik protein, ki ga izločajo številni uropatogeni sevi *E. coli*. CNF1 katalizira deamidacijo katalitsko aktivnega glutaminskega ostanka družine GTPaz Rho. CNF1 omogoča okužbo urinarnega trakta miši ter povzroča akutni prostatitis pri podganah (Davis in sod., 2005). S spremembami v citoskeletu gostiteljskih celic naj bi sicer nepatogenim sevom omogočal vstop v celice (Bahrani-Mougeot in sod., 2002). Genetski zapis za CNF1 se pogosto nahaja skupaj z zapisom za alfa-hemolizin (Davis in sod., 2005).

2.1.1.3.1.2.3 Za uropatogene seve specifični protein Usp

Bakteriocini so protimikrobne molekule, ki jih sintetizirajo in izločajo bakterije. Z njimi uničujejo sorodne bakterije, ki zasedajo isto ekološko nišo (Sharma in sod., 2002).

Usp je homologen piocinom, to so bakteriocini z endonukleazno aktivnostjo, ki jih izloča bakterija *Pseudomonas aeruginosa*. Zapis za Usp (uropathogenic specific protein) leži na majhnem, 4,2-kb velikem otoku patogenosti na kromosomu številnih uropatogenih sevov *E. coli* (Parret in De Mot, 2002).

2.1.1.3.1.2.4 Avtotransportni toksini Sat, Vat, Hbp in Ag43

Avtotransportni toksini so družina proteinov, ki jih izločajo po Gramu negativne bakterije. Značilnost avtotransportskega mehanizma je, da so njegovi produkti sposobni sami usmerjati svoje izločanje skozi zunanjo membrano (Restieri in sod., 2007).

Vsi avtotransporterji imajo podobno zgradbo iz treh domen: i) amino (N-) terminalnega vodilnega peptida ali signalnega zaporedja, ki omogoča transport prekursorja skozi notranjo membrano, ii) alfa ali potniške osrednje domene, ki ima funkcijo izločanja proteina in iii) karboksi (C-) terminalne ali beta domene, ki omogoča izločanje skozi zunanjo membrano. Po sintezi se avtotransportni protein prenese skozi notranjo membrano s pomočjo Sec-translokaze. Prenos sproži vodilni peptid. Pri tem se signalno zaporedje odstrani, preostali del pa se sprosti v periplazmo, kjer lahko pride do strukturnih sprememb. Beta domena se vstavi v zunanjo membrano, ker najverjetneje napravi beta-sodček s hidrofilno poro, skozi katero potniška domena prečka zunanjo membrano. Ko je enkrat na celični površini, se lahko potniška domena sprosti z zunanje membrane ali pa ostane kovalentno povezana s površino bakterijske celice (Restieri in sod., 2007).

Družina avtotransporterjev vključuje številne domnevne virulentne dejavnike, ki v *E. coli* in drugih po Gramu negativnih bakterijah delujejo kot citotoksini, enterotoksini, imunoglobulinske proteaze, mucinaze, hem-vezavni proteini ali kot adhezini (Restieri in sod., 2007).

Serinski proteazni avtotransporterji enterobakterij (SPATE ali angl. serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*) vključujejo adhezine, toksine in proteaze, z

ohranjenim serin-proteaznim motivom v potniški domeni ter podaljšanim signalnim zaporedjem. Genski zapisi za SPATE so povezani s posameznimi filogenetskimi skupinami in/ali patotipi *E. coli* (Restieri in sod., 2007).

Protein **Sat** (angl. secreted autotransporter toxin) je 107-kDa velik avtotransporterski protein, ki povzroča vakuolizacijo in posledično propad epitelnih celic ledvic in mehurja. V gostitelju sproži imunski odgovor, kot serinska proteaza pa ima tudi proteolitično aktivnost (Restieri in sod., 2007).

Pri sevih UPEC se pojavljata dva avtotransporterska proteina, Vat in Tsh, ki sta sicer značilna za seve *E. coli*, ki so patogeni za ptice (APEC). **Vat** (angl. vacuolating autotransporter toxin) povzroča vakuolizacijo embrionalnih fibroblastov kokoši in je ključen za virulenco sevov APEC. V primeru okužb urinarnega trakta povzroči lizo uroepitelnih celic in omogoči kolonizacijo globljih tkiv. **Tsh** (angl. temperature-sensitive hemagglutin) pri ptičih povzroča perikarditis in septikemijo. Sestavljata ga dve domeni, TshS in Tsh-beta. Očiščen Tsh se lahko veže na eritrocite, hemoglobin in proteine zunajceličnega matriksa, ima pa tudi proteolitično aktivnost. Vezava na zunajcelični matriks in posledična razgradnja le-tega omogoča bakterijam prodor v tkivo gostitelja. **Hbp** (angl. hemoglobine-binding protein) se od Tsh razlikuje v dveh aminokislinah, na mestih 209 in 842. Hbp razgrajuje hemoglobin in veže hem (Kostakioti in Stathopoulos, 2004).

Poleg SPATE so bili v številnih sevih *E. coli* identificirani tudi drugi avtotransporterji, vključno z antigenom 43 (Ag43). Ag43 je v zunanji membrani številnih sevov *E. coli*. V sevu *E. coli* K-12 ga kodira gen *flu* (*agn43*). Odgovoren je za agregacijo bakterij znotraj gostitelja in nastanek biofilma, s čimer bakterijam omogoča dolgotrajno preživetje v gostitelju (Ulett in sod., 2007). Glikozilacija Ag43 vpliva na sposobnost vezave bakterij na evkariontske celice (Restieri in sod., 2007).

Možna razlaga za distribucijo avtotransporterjev med različnimi filogenetskimi skupinami je njihova ohranjenost na otokih patogenosti, profagih ali konjugativnih plazmidih. Večina avtotransporterskih zaporedij (*vat*, *pic*, *sat* in drugi) je namreč kodiranih na otokih patogenosti (Restieri in sod., 2007).

2.1.1.3.1.2.5 Omptini

Protein zunanje membrane OmpT je površinska proteaza po Gramu negativnih bakterij, ki z visoko katalitično učinkovitostjo cepi peptidno vez med dvema zaporednima bazičnima aminokislinama, kot so Arg in Arg, Lys in Arg ter Lys in Lys. OmpT se zлага v 10-verižen antiparalelni transmembranski beta-sodček z zankami, ki se razprostirajo na zunanji strani membrane. Osrednji del (beta-sodček) tvori poro, ki omogoča prehajanje molekul vode skozi zunanjo membrano. Aktivno mesto se nahaja na zunajcelični strani znotraj globokih brazd (Baaden in Sansom, 2004; McCarter in sod., 2004).

OmpT razgrajuje številne pozitivno nabite protimikrobne peptide, katalizira aktivacijo človeškega plazminogena v plazmin in razgrajuje nekatere rekombinantne heterologne proteine. Najverjetneje ima pri uropatogenih sevih *E. coli* zaščitno vlogo (Baaden in Sansom, 2004).

2.1.1.3.1.3 Protein, ki vsebuje domeno TIR

Patogene bakterije ovirajo delovanje človeškega TLR (angl. toll-like receptor) z izločanjem homolognega proteina, ki vsebuje domeno TIR (Tcp ali angl. TIR domain-containing protein; TIR ali angl. toll/interleukin-1 receptor domain). TLR so pomembni senzorji mikrobnega napada, ki vodijo prirojeno imunsko obrambo proti številnim mikroorganizmom. Z inhibicijo TLR in MyD88 specifičnega signaliziranja zavirajo prirojen imunski odziv gostitelja in bakterijam omogočajo preživetje (Cirl in sod., 2008).

2.1.1.3.1.4 Virulentni dejavniki, ki omogočajo prehod krvno-možganske pregrade

Za prehod krvno-možganske pregrade in posledično razvoj meningitisa, morajo biti izpolnjeni številni pogoji, kot so ustrezna stopnja bakteremije, prisotnost kapsule K1, S-fimbrij in proteina zunanje membrane OmpA ter produktov genov *ibeA*, *ibeB*, *aslA* in *yijP* (Hoffman in sod., 2000; Germon in sod., 2005).

2.1.1.3.1.4.1 Gen *asl*

Gen *aslA* (angl. arylsulfatase-like gene) kodira polipeptid iz 475 aminokislin in z molekularno maso približno 52 kDa. AslA je sestavljen iz dveh membranskih segmentov in amino terminalnega signalnega zaporedja. Oba sulfatazna motiva, I in II, se nahajata na

N-terminalnem delu proteina in sta homologna (55 % in 70 %) sulfataznima motivoma v arilsulfatazi (AtsA) bakterije *K. pneumoniae*, ki je vključena v sulfatni metabolizem (Hoffman in sod., 2000).

AsIA ima pomembno vlogo pri prehodu krvno-možganske pregrade. Pri mutantih, ki gena *asIA* ne izražajo, je vezava na epitelne celice bistveno manjša. Za prehod krvno-možganske pregrade so poleg AsIA pomembni tudi drugi dejavniki. Raziskave namreč kažejo, da zgolj plazmid z genom *asIA*, ne omogoča invazivnosti neinvazivnim sevom (Hoffman in sod., 2000).

2.1.1.3.1.4.2 Gen *ibeA*

Gen *ibeA* kodira 50-kDa velik protein bakterije *E. coli*, ki povzroča meningitis pri novorojenčkih. Receptor za IbeA, katerega N-terminalni del je deloma homologen serumskemu albuminu, je na površini človeških in govejih možganskih mikrovaskularnih endotelijskih celic. IbeA je verjetno vpleten v receptorsko-ligandno posredovano invazijo možganskih mikrovaskularnih endotelijskih celic (Germon in sod., 2005).

Raziskave so pokazale, da imajo sevi z inaktiviranim genom *ibeA* zmanjšano sposobnost invazije možganskih mikrovaskularnih epitelialnih celic (Germon in sod., 2005).

2.1.1.3.1.4.3 Protein zunanje membrane OmpA

Protein zunanje membrane OmpA (angl. outer membrane protein A) je pomemben za ohranjanje integritete zunanje membrane bakterij. N-terminalni del proteina OmpA se zлага v beta-sodček iz osmih transmembranskih beta-trakov, ki so povezani s tremi kratkimi periplazemskimi zavoji in štirimi relativno velikimi na površini izpostavljenimi hidrofilnimi zankami (Teng in sod., 2006).

N-terminalni del proteina OmpA se veže na receptor Ecgp, ki se nahaja na površini možganskih mikrovaskularnih epitelialnih celic (Selvaraj in sod., 2007). Bakterijam omogoča prehod krvno-možganske pregrade (Shin in sod., 2005).

Protein OmpA vpliva tudi na druge adhezivne strukture bakterij, na primer fimbrije tipa 1, ki naj bi prav tako omogočale vezavo bakterij na celice endotela. Delecija gena *ompA* zmanjša izražanje operona fimbrij tipa 1 (Teng in sod., 2006).

2.1.1.3.1.5 Sistemi za privzem železa

Železo je eden izmed najpogostejših prehodnih elementov v okolju, ki je potreben za rast skoraj vseh živih celic. Bakterije potrebujejo železo za številne metabolne in signalne funkcije, vključno z elektronskim transportom, peroksidno redukcijo, sintezo aminokislin in nukleozidov, sintezo DNA, fotosintezo ter virulenco (Furrer, 2006).

Železo (Fe) tvori dve ionski obliki, Fe^{+2} (fero) in Fe^{+3} (feri) železo. V anaerobnem okolju je Fe v obliki Fe^{+2} in je topen. V bakterijo se z lahkoto prenaša s pomočjo sistema FeoAB. V aerobnem okolju se železo nahaja v obliki Fe^{+3} in tvori netopne minerale (Furrer, 2006).

V bioloških tekočinah je železo večinoma vezano na železo-vezavne proteine, kot sta hemoglobin in transferin, zato so pri okužbah bakterije soočene s pomanjkanjem in morajo najti dodatne načine za privzem le-tega (Faraldo-Gómez in Sansom, 2003).

Eden izmed sistemov, ki so ga bakterije razvile za rast in preživetje v okolju z zmanjšano koncentracijo železa, je uporaba sideroforjev. Sideroforji so majhne negativno nabite, pod 1000 kD velike molekule, ki jih izločajo bakterije in glive. Imajo visoko afiniteto za Fe^{+3} železo. V gostitelju vežejo železo iz železo-vezavnih proteinov, nato pa se transportirajo nazaj v bakterijsko ali glivno celico, kjer sprostijo železo s hidrolizo sideroforja oziroma z redukcijo Fe^{3+} v Fe^{2+} z nižjo afiniteto vezave (Faraldo-Gómez in Sansom, 2003)

Bakterije lahko privzemajo železo iz okolja tudi s hemofori ali z receptorskimi proteini, ki se nahajajo na površini bakterijske celice in specifično vežejo železo-vezavne proteine (Faraldo-Gómez in Sansom, 2003).

Posamezna bakterija ima lahko več sistemov za privzem železa, s čimer si zagotovi najboljši izplen železa iz okolja. S tem se poveča tudi njena sposobnost preživetja v gostitelju. Sistemi za privzem železa se med bakterijami prenašajo večinoma s pomočjo horizontalnega genskega prenosa (Hancock in sod., 2008).

2.1.1.3.1.5.1 Aerobaktin

Aerobaktinski sistem je plazmidno ali kromosomsko kodiran sistem za privzem železa, ki je prisoten v številnih črevesnih mikroorganizmih. Vključuje najmanj pet genov za sintezo (*iuc* ali angl. *iron uptake chelate*) in transport (*iut* ali angl. *iron uptake transport*)

sideroforja. 74-kDa velik produkt gena *iutA* je proteinski receptor zunanje membrane za feri železo (Lorenzo in sod., 1986). Izražanje genov za aerobaktin je uravnavaano z regulatorjem za privzem železa (Fur ali angl. ferric uptake regulator) in je odvisno od koncentracije železa v celici. Aerobaktin se najverjetneje sprošča v difuzni obliki (der Vartanian in sod., 1992).

2.1.1.3.1.5.2 Jersiniabaktin

Skupina genov *fyuA-irp* je deloma odgovorna za virulenco patogenih bakterij iz rodu *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* 1B).

Pri sintezi sideroforja jersiniabaktin sodelujejo ključni proteini YbtS, YbtE, YbtU, HMWP₁ in HMWP₂. HMWP₁ in HMWP₂ sta zapisana z genoma *irp1* in *irp2*. Sta del otoka patogenosti HPI (angl. High Pathogenicity Island). Receptor za jersiniabaktin FyuA je zapisan z genom *fyuA*, deluje pa tudi kot receptor za pesticin. Bakterija *Yersinia* ima na otoku patogenosti tudi lokus *hms*, ki pa ga sevi *E. coli* nimajo. Ena izmed možnih razlag je, da na otoku patogenosti pride do delecije regije *hms*, a je bolj verjetna razlaga, da se *fyuA-irp* skupina genov širi neodvisno od regije *hms*, kar dokazuje tudi vsebnost parov G+C (47 % za gen *hms* in 56-59 % za gen *fyuA-irp*). Le malo *fyuA-irp* pozitivnih sevov ima zmanjšano občutljivost za pesticin, večina pozitivnih sevov pa je proti njemu odporna. Skupina genov *fyuA-irp* se je iz *Y. pestis* v *E. coli* najverjetneje prenesla s horizontalnim genskim prenosom. Gene *fyuA*, *irp1* in *irp2* najdemo v številnih patogenih sevih *E. coli* (Schubert in sod., 1998).

2.1.1.3.1.5.3 Enterobaktin

Produkti skupine genov *iroBCDEN* sodelujejo pri glukozilaciji enterobaktina v salmohelin in sintezi receptorja za salmohelin, ki se nahaja na zunanji membrani. Salmohelin je kodiran z genom *iroN* in leži na otoku patogenosti na kromosomu ali na plazmidu (Zhu in sod., 2005). Skupino genov *iro* so prvič opisali pri bakteriji *Salmonella enterica*, pogosta pa je tudi pri zunajčrevesnih sevih *E. coli*, posebno pri tistih, ki so bili izolirani iz urinarnega trakta. Izražanje gena je uravnavaano z regulatorjem za privzem železa (Fur), podobno kot pri aerobaktinskem sistemu in je odvisno od koncentracije železa v celici. (Sorsa in sod., 2003).

2.1.1.3.1.5.4 IreA

Gen *ireA* (angl. iron-responsive element) kodira peptid z molekularno maso 75,3 kDa. 38-56-odstotna homologija s proteini, ki delujejo kot sideroforni receptorji kaže, da je tudi IreA vključen v privzem železa in najverjetneje tudi sam deluje kot sideroforni receptor. Številne raziskave kažejo, da se gen *ireA* nahaja na otoku patogenosti. Gen je bil najverjetneje pridobljen s horizontalnim prenosom, kar potrjuje 43-odstotno razmerje G + C parov (v primerjavi z 51-odstotki pri *E. coli* K-12) (Russo in sod., 2001).

2.1.1.3.1.6 Dejavniki, ki omogočajo izogibanje imunskemu sistemu gostitelja in odpornost proti serumu

Bakterije, ki se pojavijo v človeškem serumu, lizira komplementni sistem. V primeru odsotnosti specifičnih protiteles bakterije namreč aktivirajo alternativno pot aktivacije komplementa. Komplementni sistem sestavljajo molekule, ki v kaskadi sprožijo nastanek membranskega kompleksa ali MAC (angl. membrane attack complex). Ta v zunanji membrani bakterije tvori pore skozi katere lizocimi dosežejo peptidoglikansko celično steno in jo razgradijo. Bakterije se pred delovanjem komplementnega sistema zavarujejo s pomočjo posameznih ali kombiniranih učinkov, kot so blokada aktivacije komplementne kaskade (kisli polisaharidi), onemogočanje dostopa komplementnih komponent do kritičnih membranskih tarčnih mest (O polisaharidne stranske verige) ali oviranje normalnega delovanja MAC-kompleksa, tudi če ta že doseže zunanjo membrano bakterije (površinska proteina TraT in Iss).

Protein TraT je 25 kDa velik lipoprotein zunanje membrane, ki sevom omogoča odpornost proti serumu z oviranjem delovanja komplementnega sistema. Gen *traT* se prenaša z velikim plazmidom iz inkompatibilnostne skupine IncF. Pri sevih, ki nimajo kapsule, že majhno število izvodov gena *traT* poviša odpornost proti serumu, medtem ko mora biti pri sevih s kapsulo prisotno večje število izvodov gena, da pride do spremembe v odpornosti proti serumu (Johnson, 1991).

Protein Iss (angl. increased serum survival) 100-kratno poviša odpornost proti serumu in virulenco pri sevu *E. coli*, ki je občutljiv za delovanje seruma. Ne vpliva na sestavljanje komplementa, temveč inhibira aktivnost MAC kompleksa na zunanji membrani (Johnson, 1991).

Kapsularni polisaharidi so linearni polimeri ponavljajočih se ogljikohidratnih podenot, v katere si lahko vključene tudi aminokislinske ali lipidne komponente. Pri *E. coli* trenutno poznamo nekaj več kot 80 tipov kapsularnih polisaharidov, ki jih označujemo kot antigeni K (Schembri in sod., 2004). Glede na genetske in biosintetske lastnosti delimo kapsule na štiri skupine (Whitfield in Roberts, 1999).

Kapsule iz skupine 2 so tanke in termostabilne. Zgrajene so iz kislih polisaharidov z visoko koncentracijo anionov. Kodirajo jih tri skupine genov: ena skupina je odgovorna za sintezo in polimerizacijo podenot, druga za postpolimerizacijske modifikacije polisaharidov (dodajanje fosfatidne kisline) in transport preko citoplazemske membrane, tretja pa za translokacijo preko zunanje membrane, v katero so vključeni produkti genov *kpsM* (transmembranska komponenta), *kpsT* (ATPazna komponenta), *kpsS* in *kpsC* (Johnson, 1991; Whitfield in Roberts, 1999).

Kapsularni polisaharidi patogenih sevov *E. coli* so slabo imunogeni, kar je najverjetneje posledica molekularne mimikrije. To pomeni, da so kapsularni polisaharidi po strukturi podobni gostiteljskim trisialogangliozidom. Imunogenost se poveča pri nastanku konjugatov z albumini in drugimi proteini (Johnson, 1991).

Kisli kapsularni polisaharidi onemogočajo fagocitozo in komplemetno ubijanje bakterijskih celic. Stopnja fagocitoze je premosorazmerna količini polisaharidov. Kapsularni polisaharidi blokirajo opsonizacijo tako, da ovirajo nalaganje komplemeta (Johnson, 1991).

2.1.1.3.2 Sevi IPEC

V skupino sevov IPEC uvrščamo seve, ki povzročajo črevesne bolezni, kot so diareja, enterokolitis in kolitis (Garrity in sod., 2005). Na črevesni epitel se pogosto pripenjajo z G-fimbrijami (Saarela in sod., 1996).

2.1.1.3.2.1 Enteropatogeni sevi *E. coli* (EPEC)

Enteropatogeni sevi so odgovorni za večino primerov diareje, ki nastane kot posledica izločanja enterotoksinov ali vdora v celice črevesnega epitela. V skupini so sevi s specifičnimi serotipi O:H. Na črevesni epitel se pritrdijo na poseben, t. i. A/E način (angl.

attaching and effacing lesions), ki se kaže v obliki histopatoloških sprememb črevesnega epitela gostitelja in jo zaradi specifičnosti uporabljamo kot diagnostični označevalec. Sevi niso sposobni tvoriti Šigovih toksinov. Imajo velik virulentni plazmid, imenovan EAF (angl. EPEC adhesion factor), ki jim poleg že omenjene vezave omogoča tudi tvorbo fimbrij. Za EPEC seve je značilna tvorba intimina (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Escherichia>).

2.1.1.3.2.2 Enterotoksigeni sevi *E. coli* (ETEC)

Enterotoksigeni sevi so pomembni povzročitelji diareje pri ljudeh in domačih živalih. Povezani so s produkcijo enega ali več enterotoksinov, ki so termo-labilni (LT) ali termo-stabilni (ST). Genetski zapis za LT-I in ST je na plazmidih, genetski zapis za LT-II pa na kromosomu. Pogosto imajo sevi z LT-I in ST značilne serotipe O:K:H. (Garrity in sod., 2005). Izločajo enega ali več kolonizacijskih dejavnikov, ki jim omogočajo ključni korak v virulenci – pritrditev na črevesno mukozno površino, zato pa so pogostejši pri sevih, ki povzročajo diarejo in septikemijo (Saarela in sod., 1996).

2.1.1.3.2.3 Enteroinvazivni sevi *E. coli* (EIEC)

Enteroinvazivni sevi so, za razliko od večine patogenih *E. coli*, znotrajcelični patogeni. Sevi EIEC po genotipskih in fenotipskih značilnostih ter boleznih, ki jih povzročajo, močno spominjajo na bakterije iz rodu *Shigella*. Večinoma so negibljivi. Lahko vdrejo in se razmnožujejo v celicah debelega črevesa. Z virulenco so povezani številni kromosomsko in plazmidno kodirani geni. Povezani so z majhnim številom serotipov (Garrity in sod., 2005).

2.1.1.3.2.4 Enteroagregativni sevi *E. coli* (EAEC)

Za seve EAEC je značilen poseben agregativni vzorec pritrditve na celice HEp-2, v celičnih kulturah je namreč opazna izrazita avtoaglutinacija med bakterijskimi celicami in površino celic HEp-2. Značilno plastovitost lahko opišemo z modelom zloženih opek. Značilno vezavo posredujejo plazmidno kodirane fimbrije I (AAF/I). Nekateri sevi EAEC ne izražajo nobene od znanih različic AAF, zato predvidevajo, da obstajajo še neodkrite različice AAF (Garrity in sod., 2005). EAEC ne izločajo termo-labilnih ali termo-stabilnih enterotoksinov. Kar 93-odstotkov enteroagregativnih sevov *E. coli* tvori siderofor

jersiniabaktin (Schubert in sod., 1998). Enteroagregativni sevi *E. coli* so za enterotoksigenimi sevi *E. coli* najpomembnejši povzročitelji diareje v državah v razvoju in tudi v razvitih državah (Boisen in sod., 2008).

2.1.1.3.2.5 Difuzno adherentni sevi *E. coli* (DAEC)

Za DAEC je značilen difuzni vezavni vzorec na celice HEp-2 (Garrity in sod., 2005). Vezavo omogoča skupina adhezinov Afa/Dr, ki so kromosomsko ali plazmidno kodirani (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Escherichia>).

2.1.1.3.2.6 Sevi *E. coli*, ki izločajo verotoksine (VTEC)

Sevi VTEC izločajo enega ali dva od dveh antigensko ločenih, ponavadi bakteriofagno posredovanih citotoksinov VT1 in VT2 (Garrity in sod., 2005).

Znotraj skupine sevov VTEC razlikujemo enterohemoragične (EHEC) seve, ki imajo enake značilnosti kot jih ima prototipski sev *E. coli* O157:H7. Sevi EHEC povzročajo hemoragični kolitis in hemolitični uremični sindrom (Garrity in sod., 2005). Za vezavo na epitelne celice in kolonizacijo je pomemben protein zunanje membrane intimin. Sevi EHEC poleg Šigovih toksinov tvorijo tudi enterohemolizin. Za privzem hema je odgovoren gen *chuA*, ki kodira 69-kDa velik protein zunanje membrane (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Escherichia>).

2.1.1.3.3 Sevi ExPEC

Zunajčrevesni patogeni sevi *E. coli* so epidemološko in filogenetsko ločeni od komezalnih in črevesnih sevov. Njihovi genomi so zelo raznoliki. Imajo številne genske zapise za virulentne dejavnike, kot so P-fimbrije, S-fimbrije, nefimbrialni adhezini Iha, sistemi, ki omogočajo privzem železa (npr. aerobaktin), kapsula, O-antigeni, mehanizmi, ki omogočajo odpornost proti serumu (npr. TraT) in toksini (npr. alfa-hemolizin). Zunajčrevesni sevi *E. coli*, še posebno tisti, ki povzročajo okužbe urinarnega trakta, imajo zapise za Vat, Sat in Ag43. Za zunajčrevesne patogene seve *E. coli*, izolirane iz telesnih tekočin, kot so urin, trebušna tekočina in kri, je značilno tudi povečano izranje gena *ireA* (Russo in sod., 2001; Johnson, 1991). Geni za virulentne dejavnike se pogosto nahajajo na otokih potogenosti. Sevi imajo določeno število serotipov O:K:H (Garrity in sod., 2005; Lafont in sod., 1987; Johnson in sod., 2005).

Sevi ExPEC lahko povzročajo okužbe na katerem koli delu zunaj črevesa. Najpogostejše so okužbe urinarnega trakta, vnetje ledvičnega meha in ledvičnega tkiva, meningitis pri novorojenčkih ter sepsa. Okužbe povzročajo pri vseh starostnih skupinah (Garrity in sod., 2005).

2.1.1.3.3.1 Uropatogeni sevi *E. coli* (UPEC)

Uropatogeni sevi so najpomembnejši povzročitelji okužb urinarnega trakta, vključno s vnetjem sečnega mehurja (cistitis) ter vnetjem ledvičnega meha in tkiva (pielonefritis). Večina uropatogenih sevov pripada filogenetski skupini B2 (Johnson T. in sod., 2008). Vezavo in vstop v celice gostitelja jim omogočajo številni adhezini, kot so adhezini Dr, F1C-fimbrije, P-fimbrije, S-fimbrije in fimbrije tipa 1 (Garrity in sod., 2005). Fimbrije tipa 1 so povezane tudi z vezavo na vaginalne epitelne celice (Antão in sod., 2009). Privzem železa omogočajo različni sistemi, kot so aerobaktin, enterobaktin, jersiniabaktin in Chu. Sevi UPEC izločajo avtotransportske toksine Pic, Sat in Tsh, citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 ter alfa-hemolizin, ki lahko povzroča resne zaplete pri bolnikih z okužbami urinarnega trakta (Garrity in sod., 2005). Zapis zanj imajo tudi sevi, ki so povezani z drugimi zunajčrevesnimi okužbami (Johnson, 1991). Gen *cnf1* zasledimo pri 61-odstotkih izolatov *E. coli* iz urinarnega trakta in manj kot 10-odstotkih komenzalnih izolatov (Yamamoto in sod., 1995). Najbolj virulentni uropatogeni sevi *E. coli*, ki povzročajo bolezni ledvic in pielonefritis, izločajo protein Tcp (Cirl in sod., 2008).

2.1.1.3.3.2 Sevi *E. coli*, ki povzročajo meningitis pri novorojenčkih (NMEC)

Večina sevov (77 %), ki povzroča meningitis pri novorojenčkih, pripada filogenetski skupini B2 (Johnson T. in sod., 2008). 80-odstotkov sevov NMEC ima kapsularni polisaharid K1, ki omogoča vstop v možganske mikrovaskularne endotelialne celice. Vezavo jim omogočajo S-fimbrije in P-fimbrije, invazijo pa toksini AslA, Ibe, K1 kapsula in OmpA (Antão in sod., 2009). Pomemben toksin sevov NMEC je tudi CNF1 (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Escherichia>).

2.1.1.3.3.3 Sevi *E. coli*, ki so patogeni za ptice (APEC)

Sevi APEC so povezani z okužbami zunajčrevesnih tkiv perutnine. Sistemska okužba se prične z okužbo dihalnih poti, za katero so v prvi fazi odgovorne fimbrije tipa 1, v kasnejši

fazi pa P-fimbrije. 99-odstotkov sevov *E. coli*, izoliranih iz obolelih ptic, ima gen *csgA*, ki omogoča sintezo curlina, proteina ki sestavlja Curlijeva vlakna (Antão in sod., 2009). Sevi APEC imajo podoben nabor virulentnih dejavnikov kot sevi ExPEC. Najverjetneje povzročajo okužbe tudi pri drugih sesalcih (Moulin-Schouleur in sod., 2007).

2.2 ZDRAVLJENJE OKUŽB

Okužbe, ki jih povzročajo sevi vrste *E. coli*, so vedno večji problem za zdravje ljudi tudi v razvitem svetu, saj je zdravljenje okužb zaradi naraščajoče odpornosti proti antibiotikom zelo težavno ter vedno manj uspešno. K tem pripomore tudi prekomerna in nekontrolirana uporaba antibiotikov, ki je pospešila širjenje odpornih sevov.

Za zdravljenje okužb pri po Gramu negativnih bakterijah se najpogosteje uporabljajo beta-laktamske in kinolonske protimikrobne snovi. Odpornost je največkrat posledica mutacij v kromosomskih genih, ki spremenijo metabolno pot ali tarčno mesto delovanja (Madigan in Martinko, 2006), oziroma posledica vnosa tujih genskih zapisov za proteine, ki posredujejo odpornost (Amábile-Cuevas, 2007, str. 25-53).

Če je odpornost proti antibiotikom posledica mutacij na kromosomu, se geni, ki jo posredujejo, prenašajo s pomočjo klonalnega širjenja. Ta prenos imenujemo vertikalni prenos genov (Amábile-Cuevas, 2007, str. 25-53).

V primeru, da so genetske determinante, ki posredujejo odpornost proti antibiotikom nahajajo na mobilnih genetskih elementih kot so plazmidi, transpozoni in integroni, se lahko neposredno prenašajo iz ene vrste bakterij v drugo. Tak prenos imenujemo horizontalni prenos (Amábile-Cuevas, 2007, str. 25-53).

2.2.1 Beta-laktamski antibiotiki

Beta-laktamski antibiotiki so največja in najpogosteje uporabljena skupina antibiotikov. Mednje uvrščamo peniciline, cefalosporine, karbapeneme in monobaktame. Zanje je značilen štiričlenski beta-laktamski obroč, na katerega je pri penicilinih in karbapenemih vezan petčlenski, pri cefalosporinih pa šestčlenski obroč. Monobaktami sekundarnega obroča nimajo (Livermore in Williams, 1996).

2.2.1.1 Delovanje beta-laktamskih antibiotikov

Beta-laktamski antibiotiki inhibirajo bakterijske transpeptidaze, imenovane tudi penicilin vezavni proteini (PBP ali angl. penicillin binding proteins), ki sodelujejo pri sintezi bakterijske celične stene. Transpeptidaze katalizirajo transpeptidacijo, proces pri katerem pride do navzkrižne povezave stranskih skupin linearne peptidoglikanske verige. Zaradi stereokemične podobnosti s peptidoglikanom, se transpeptidaze lahko vežejo tudi na beta-laktamske antibiotike (Baquero in sod., 2008). V primeru, da se vežejo na penicilin, pri sintezi celične stene ne pride do transpeptidacije, ki je nujna za trdnost celične stene. Ker se celična stena kljub temu tvori, je celica podvržena lizi. Poleg tega kompleksi beta-laktamov s PBP stimulirajo sproščanje avtolizinov, ki razgradijo že obstoječo celično steno (Madigan in Martinko, 2006).

2.2.1.2 Mehanizmi odpornosti proti beta-laktamskim antibiotikom

Prekomerna uporaba beta-laktamskih antibiotikov je povzročila razvoj odpornosti ter posledično izgubo učinkovitosti pri zdravljenju okužb. Odpornost pri po Gramu pozitivnih bakterijah je večinoma posledica modifikacije obstoječih ali tvorbe dodatnih PBP. Odpornost pri po Gramu negativnih bakterijah je največkrat povezana z izločanjem kromosomsko ali plazmidno kodiranih beta-laktamaz in aktivnega črpanja antibiotika iz celice (Baquero in sod., 2008). Možna mehanizma odpornosti sta tudi uporaba alternativnih peptidoglikanskih transpeptidaz in nepropustnost zunanje membrane pri po Gramu negativnih bakterijah (Livermore, 1998; Murray in sod., 1999).

2.2.1.2.1 *Beta-laktamaze*

Beta-laktamaze so zelo heterogena skupina encimov, ki posredujejo odpornost proti antibiotikom. Proteini so zgrajeni iz alfa-heliksov in beta-nagubanih ravnin ter si ne glede na zaporedje aminokislin delijo enako topologijo (Perez in sod., 2007). Beta-laktamaze inaktivirajo beta-laktamske antibiotike še preden dosežejo tarčna mesta PBP. V prvi stopnji se encimi reverzibilno in nekovalentno vežejo na ogljikove vezi beta-laktamskega obroča, v drugi stopnji pa encim s svojo hidroksilno skupino napade karbonilno skupino beta-laktamskega obroča (Baquero in sod., 2008). Na koncu se aktivni encim odcepi in nastane hidroliziran in neaktiven antibiotik (Livermore, 1995).

Evolucija beta-laktamaz in nastanek novih mehanizmov odpornosti je posledica:

- mutacije v posameznem beta-laktamaznem genu (modifikacija enega nukleotida spremeni celotno aminokislino) in posledično spremenjene hidrolitične lastnosti encima,
- povečanega izražanja genov za beta-laktamaze zaradi različnih promotorjev ali združitvijo z insercijskimi zaporedji,
- uporabe kompleksnih genskih reglulatornih poti za povečanje koncentracije encima,
- integracije ustreznih genov *bla* v mobilne genetske elemente, kot so plazmidi ali transpozoni, in njihov horizontalni prenos med bakterijami (Baquero in sod., 2008).

Najbolj uspešne beta-laktamaze patogenih bakterij so se razvile z mobilizacijo kromosomskih genov *bla* iz okoljskih bakterij, razširjena uporaba antibiotikov pa je njihovo širjenje in evolucijo še pospešila (Baquero in sod., 2008).

Prvo beta-laktamazo, penicilinazo, so identificirali že leta 1940 v bakteriji *E. coli*, zanimiva pa je postala šele leta 1944, zaradi neuspešnega zdravljenja okužb z bakterijo *Staphylococcus aureus*. V tistem času je ta encim sintetiziralo manj kot 10-odstotkov sevov *S. aureus*, do leta 1950 pa se je ta delež povišal na 80-odstotkov. Danes že več kot 90-odstotkov *S. aureus* tvori penicilinaze. Povečanje deleža sevov *S. aureus*, ki tvorijo penicilinaze, je posledica pridobivanja plazmidov z geni za penicilaze *bla* in selekcije izolatov, ki tvorijo beta-laktamaze. Zanimivo je, da se plazmidi, na katerih so geni za penicilinaze *bla*, niso razširili v po Gramu negativne bakterije (Baquero in sod., 2008).

Ampicilini in prva generacija cefalosporinov so v klinično uporabo prišli leta 1960 in že leta 1963 se je pojavila prva bakterija *E. coli*, odporna proti ampicilinu. Odpornost je bila posledica tvorbe nove beta-laktamaze, imenovane TEM. Geni *bla*, ki so kodirali ta encim, so bili na tranpozicijskem elementu (Tn3), ki se lahko vključi v plazmide različnih inkompatibilnostnih skupin. Tako se je odpornost s horizontalnim prenosom genov razširila v vse vrste družine enterobakterij ter v bakterije vrst *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* in *Pseudomonas aeruginosa*. Delež *E. coli*, odpornih proti ampicilinu, je danes že več kot 60-odstoten (Bradford, 2001).

V epidemoloških študijah med letoma 1970 in 1980 so odkrili številne nove beta-laktamaze, kot so TEM-2, ki se od TEM-1 razlikuje po le eni aminokislini, PSE-1, SHV-1 in OXA-1. Plazmidno-kodirano beta-laktamazo SHV-1 so odkrili v zgodnjih 70-ih letih prejšnjega stoletja v sevu bakterije *Klebsiella*. V številnih sevih te bakterije, je gen *bla*_{SHV-1} vključen v bakterijski kromosom (Bradford, 2001).

Beta-laktamazo OXA-1 so prvič identificirali v *E. coli*. Ta integronsko kodiran encim je del transpozicijskega elementa na plazmidu, zato se lahko širi med različnimi bakterijskimi vrstami (Baquero in sod., 2008).

2.2.1.2.1.1 Beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL)

Mutacije v strukturnih genih primarnih beta-laktamaz TEM, SHV in OXA so povzročile nastanek različic s povečano hidrolitično aktivnostjo za beta-laktamske antibiotike. Poimenovali so jih beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL ali angl. extended-spectrum beta-lactamase) in vanjo vključili tudi skupino CTX-M (Baquero in sod., 2008). ESBL so prvič opisali v Nemčiji leta 1983 pri bakteriji *Klebsiella spp.* (Perez in sod., 2007). Od leta 2000 pogostost izolatov z ESBL narašča (Nicolas-Chanoine in sod., 2008).

ESBL so encimi, ki cepijo amidno vez v beta-laktamskem obroču pri penicilinih in cefalosporinih z razširjenim spektrom delovanja. Delovanje ESBL inhibirajo beta-laktamazni inhibitorji, kot so klavulanska kislina, azobaktam in sulbaktam (Paterson in Bonomo, 2005; Bush in sod., 1995). Z uporabo novih antibiotikov so se pojavile tudi težave, saj so nove mutante že odporne proti beta-laktamskim inhibitorjem, ter v nekaterih primerih tudi proti cefalosporinom z razširjenim spektrom delovanja (Baquero in sod., 2008).

V zadnjem času se pojavljajo mikroorganizmi, ki tvorijo več kot eno beta-laktamazo, kar še povečuje njihovo odpornost in otežuje zdravljenje (Baquero in sod., 2008).

2.2.1.2.1.1.1 ESBL iz skupine TEM

Prvi encim ESBL iz skupine TEM je bil TEM-3, ki so ga odkrili leta 1989. TEM-1 je bila do leta 2001 najpogostejša beta-laktamaza pri po Gramu negativnih bakterijah. Hidrolizira

peniciline in cefalosporine ozkega spektra. Pri bakteriji *E. coli* je do 90-odstotkov odpornosti proti ampicilinu posledica izločanja TEM-1. Leta 1985 so odkrili TEM-2, ki se od TEM-1 razlikuje v enem samem nukleotidu. (Bradford, 2001). Znotraj skupine TEM razlikujemo že več kot 160 alelnih različic (Woodford, 2010).

2.2.1.2.1.1.2 ESBL iz skupine SHV

SHV-2 so odkrili leta 1983 in se od SHV-1 razlikuje po eni sami aminokislini. Ravno ta razlika je omogočila aktivnost proti cefalosporinom tretje generacije. SHV ESBL so prisotni pri številnih vrstah iz družine enterobakterij in tudi pri nekaterih drugih bakterijah (Paterson in Bonomo, 2005). Znotraj skupine SHV razlikujemo okoli 110 alelnih različic (Woodford, 2010). Manjše število različic znotraj skupine SHV je verjetno posledica manjše dostopnosti genov *bla_{SHV-1}* v naravi v primerjavi z geni *bla_{TEM-1}* (Baquero in sod., 2008).

2.2.1.2.1.1.3 ESBL iz skupine OXA

Encimi iz skupine OXA imajo visoko in specifično hidrolitično aktivnosti proti oksacilinu in kloksacilinu, klavulanska kislina pa jih le šibko zavira. Odgovorni so za odpornost proti ampicilinu in cefalotinu. Skupina OXA vključuje encime na osnovi fenotipskih in ne genotipskih lastnosti, zato je homologija med nekaterimi encimi iz družine le 20-odstotna (Bradford, 2001).

2.2.1.2.1.1.4 ESBL iz skupine CTX-M

Encimi CTX-M preferenčno hidrolizirajo cefotaksim. Z beta-laktamazami iz skupin TEM in SHV so si podobni le v 40-odstotkih aminokislin. Najpogostejši so pri bakterijah *E. coli*, njihovo prisotnost pa so potrdili tudi pri nekaterih drugih vrstah iz družine enterobakterij. Med kromosomsko kodiranim encimom AmpC bakterije *Kluyvera ascorbata* in encimi CTX-M obstaja 95-odstotna podobnost, kar bi lahko pomenilo, da so se encimi CTX-M razvili iz beta-laktamaz vrste *K. ascorbata*. Vsi encimi CTX-M imajo na mestu 237 serinski ostanek, ki je najverjetneje odgovoren za povečano encimsko aktivnost pri beta-laktamazah CTX-M (Bradford, 2001).

Encime CTX-M lahko glede na aminokislinska zaporedja razdelimo v 5 podskupin:

- **CTX-M-1** z variantami CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15 in FEC-1;
- **CTX-M-2** z variantami CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-3L, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20 in TOHO-1;
- **CTX-M-8**
- **CTX-M-9** z variantami CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27 in TOHO-2 ter
- **CTX-M-25** z variantama CTX-M-25 in CTX-M-29 (Bonnet, 2004).

Genski zapisi za encime CTX-M, so najpogosteje na 7- do 160-kb velikih plazmidih. Na istih plazmidih so pogosto tudi geni za odpornost proti kinolonom (PMQR ali angl. plasmid-mediated quinolone resistance), amonoglikozidom, sulfonamidom, tetraciklinom, trimetoprimom in kloramfenikolu (Paterson in Bonomo, 2005). Večina sevov, ki ima gene *bla*_{CTX-M}, so izolirali iz pacientov z okužbami urinarnega trakta (Perez in sod., 2007).

2.2.2 Kinoloni

Kinoloni so po strukturi 1,4-dihidro-4-okso piridinske molekule s karboksi kislinskim substituentom na mestu 3. Substituent na mestu 3 in karbonilna skupina na mestu 4 sta najverjetneje odgovorna za aktivnost kinolonov, saj tvorita kompleks z DNA in DNA girazo.

Prvi kinolon, imenovan nalidiksična kislina, so sintetizirali leta 1962. Uporabljali so ga izključno za zdravljenje okužb sečil (Acar in Goldstein, 1997). Prvi fluorokinolon s širokim spektrom delovanja je bil norfloksacin. S kemijskimi spremembami v molekulah protimikrobnih učinkovin so povečali njihovo protimikrobno učinkovitost ter razširile njihov spekter delovanja (Vila, 2005). Zaradi širokega spektra protimikrobne učinkovitosti so fluorokinoloni eni izmed najbolj pogosto predpisanih antibiotikov (Yamane in sod., 2007).

2.2.2.1 Delovanje kinolonov

Kinoloni so sintetični antibiotiki, ki inhibirajo delovanje bakterijskih topoizomeraz. Topoizomeraze so encimi, ki uravnavajo superzvijanje kovalentno zaprte verige DNA (Madigan in Martinko, 2006; Murray in sod., 1999). Glede na način delovanja ločimo dve skupini topoizomeraz, topoizomeraze I, ki cepijo le eno verigo DNA in omogočijo prehod verige skozi nastalo vrzel, in topoizomeraze II, ki cepijo obe verigi in omogočijo prehod drugega dela vijačnice skozi nastalo vrzel, ki se na koncu zapre (Murray in sod., 1999). Med topoizomeraze II uvrščamo DNA girazo in topoizomerazo IV, ki imata podobno strukturo. Oba encima sta tetramera iz dveh podenot A in dveh podenot B. Podenoto A kodirajo geni *gyrA* in *parC*, podenoto B pa geni *gyrB* in *parE* (Vila, 2005). Podenota A je katalitična podenota, ki cepi in zlepi verigi DNA.

DNA-giraza katalizira negativno zvijanje DNA, ki je nujno za nastanek in delovanje replikacijskih vilic in začetek podvajanja verige DNA pri celični delitvi, topoizomeraza IV pa ločuje podvojene in prepletene kromosome pred celično delitvijo in vpliva na dodatno zvijanje molekul DNA (Murray in sod., 1999). Redki mikroorganizmi topoizomeraze IV nimajo, v tem primeru njeno vlogo prevzame DNA giraza.

Kinoloni se vežejo na podenoto A DNA-giraze, ko je ta povezana z DNA in je veriga že prekinjena. Vezava kinolona prepreči zlepljanje prekinjene verige DNA in tvorbo negativnih navojev. Če je na verigi DNA kompleks kinolon-DNA-giraza, le-ta ne more potovati skozi replikacijske vilice. Nadaljnja replikacija je tako onemogočena, kompleks se sprosti, veriga DNA pa ostane prekinjena. (Drlica, 1999).

Tarča kinolonov je pri po Gramu negativnih bakterijah DNA giraza, pri po Gramu pozitivnih pa topoizomeraza IV. Kinoloni novejših generacij (clinafloksoacin, moksifloksoacin) delujejo enako na oba encima (Hooper, 2000).

2.2.2.2 Mehanizmi odpornosti proti kinolonom

2.2.2.2.1 *Odpornost proti kinolonom, ki je posledica kromosomskih mutacij*

Odpornost proti kinolonom je posledica mutacij kromosomskih genov za encima DNA-girazo in DNA-topoizomerazo IV v bakterijski celici (Strahilevitz in sod., 2009). Do mutacij prihaja v katalitičnih podenotah GyrA ali ParC in se imenujejo QRDR (ang. quinolone resistance determining region) (Willmot in Maxwell, 1993). Glavna tarča kinolonov pri po Gramu negativnih bakterijah je DNA-giraza, zato so mutacije, ki omogočajo odpornost najpogosteje v podenoti GyrA. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah pa je glavna tarča kinolonov topoizomeraza IV, zato se mutacije pojavijo prednostno v podenoti ParC. Odpornost proti novejšim kinolonom, ki vplivajo na oba encima enako, pa se razvije težje, saj je ob pojavu ugodne mutacije v enem encimu drugi encim proti kinolonom še vedno občutljiv (Deguchi in sod., 1997; Yague in sod., 2002). Ker so spontane mutacije v kromosomu dokaj redek genetski proces, ne morejo v celoti pojasniti povečane odpornosti proti kinolonom, ki so jo opazili v zadnjem desetletju.

Odpornost je lahko tudi posledica zmanjšane vnosa ali izčrpavanja kinolonov. Kinoloni lahko difundirajo skozi membrano ali pa v celico vstopajo skozi porine. Kromosomske mutacije lahko zmanjšajo občutljivost bakterij za kinolone, saj spremenijo sestavo membran ali zmanjšajo število membranskih porinov. Pri po Gramu negativnih bakterijah največkrat pride do mutacije v genih *ompA*, *ompC* in *ompF*, ki kodirajo porine zunanje membrane. Membranske črpalke se lahko izražajo neprestano ali pa so uravnane z različnimi regulatornimi sistemi. Pri *E. coli* je pri izčrpavanju kinolonov najpomembnejša črpalka AcrAB-TolC. Mutacija v genu *acrR*, ki je represor sistema *acrAB* poveča aktivnost črpalke in s tem tudi odpornost proti kinolonom (Jacoby, 2005; Wang in sod., 2001).

2.2.2.2.2 *Plazmidno kodirana odpornost proti kinolonom*

Kot že omenjeno, so zapisi za odpornost proti kinolonom v enterobakterijah največkrat na kromosomu. Leta 1998 so prvič opisali plazmidno kodirano odpornost proti kinolonom (PMQR ali angl. plasmid-mediated quinolone resistance), ki je sama po sebi manj učinkovita od kromosomsko kodirane, a skupaj omogočata nastanek bakterijskih sevov, ki so zelo odporni proti fluorokinolonom. Do sedaj so opisani trije mehanizmi PMQR, ki omogočajo odpornost proti fluorokinolonom:

- zaščita tarčnega mesta s produkti genov *qnr*: peptidi Qnr se vežejo na DNA girazo in topoizomerazo IV ter s tem preprečijo učinkovito delovanje antibiotikov,
- kemijska modifikacija fluorokinolonov: aminoglikozidna acetiltransferaza AAC(6')-Ib-cr z acetilacijo modificira fluorokinolone (norfloksacin in ciprofloksacin),
- izločanje antibiotika s pomočjo membranske črpalke: črpalka QepA izčrpava hidrofилne fluorokinolone iz celice (Poirel in sod., 2008).

2.2.2.2.1 PMQR – odpornost z zaščito tarčnega mesta

Proteine Qnr uvrščamo v družino proteinov s ponovitvami petih aminokislin. Odpornost proti kinolonom posredujejo s svojo proteinsko strukturo in ne encimsko aktivnostjo (Robicsek in sod., 2006). V naravi naj bi protein Qnr bakterije ščitil pred naravnimi inhibitorji DNA giraze, kot je mikrocin B17. Zaradi pogoste uporabe kinolonov in posledično močnega selekcijskega pritiska so genetski zapisi verjetno prešli na mobilne geneske elemente in se razširili v okolje (Ellington, 2006). Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) za ciprofloksacin pri večini sevov *E. coli* divjega tipa je 0,008 µg/ml, pri sevih s plazmidom, na katerem je zapis za Qnr, pa 0,025 µg/ml (Strahilevitz in sod., 2009).

Ob vezavi proteina Qnr se spremeni konformacija žepa za vezavo kinolona, zato se kinoloni ne morejo približati tarčnemu mestu (Baquero in sod., 2008).

2.2.2.2.1.1 QnrA

Prvi primer plazmidno posredovane odpornosti so opisali pri urinskem izolatu bakterije *Klebsiella pneumoniae* leta 1998 v Združenih državah. Sevu bakterije *K. pneumoniae* s plazmidom pMG252 in zmanjšanim številom porinov v membrani, se je odpornost proti kinolonom zvišala za 4- do 16-krat. V sevih *E. coli*, ki so vsebovali isti plazmid in so imeli običajno število porinov, se je odpornost povišala za 8- do 64-krat. Gen, odgovoren za odpornost proti kinolonom, je bil torej na plazmidu. Sprva so ga poimenovali *qnr* in mu kasneje dodali alelni oznako A (Baquero in sod., 2008). Gen *qnrA* kodira protein QnrA iz 218 aminokislin (Martinez-Martinez in sod., 1998). V različnih bakterijah so odkrili številne variante gena *qnr*, ki se s *qnrA* ujemajo v 94- do 99-odstotkih aminokislin.

Poimenovali so jih *qnrA1*, *qnrA2*, *qnrA3*, *qnrA4*, *qnrA5* in *qnrA6* (Strahilevitz in sod., 2009; Cattoir in sod., 2007).

2.2.2.2.1.2 QnrB

Gen *qnrB* kodira protein *qnrB1* iz 226 aminokislin, ki sodi v družino s ponovitvami petih aminokislin. Odkrili so ga leta 2006 pri izolatu *K. pneumoniae* (Jacoby in sod., 2003). QnrB1 se s proteinom QnrA1 ujema v 43-odstotkih, s QnrS1 pa v 44-odstotkih aminokislin. Bakterije iz družine enterobakterij imajo številne variante gena *qnrB* (1-19), ki v primerjavi z genom *qnrB1* kažejo 85- do 99-odstotno variabilnost (Strahilevitz in sod., 2009; Cattoir in sod., 2007).

2.2.2.2.1.3 QnrC

Zapis za gen *qnrC1* so odkrili na plazmidu pHS9, izoliranem iz kliničnega seva *Proteus mirabilis* v Šanghaju. 666-bp velik gen kodira zapis za protein QnrC iz 221 aminokislin. QnrC se s proteinom QnrA1 ujema v 64-odstotkih, s QnrB1 v 41-odstotkih, s QnrS1 v 59-odstotkih in s QnrD v 43-odstotkih aminokislin (Strahilevitz in sod., 2009).

2.2.2.2.1.4 QnrD

Zmanjšana občutljivost za ciprofloksacin se prenaša tudi na majhnem, 4,3-kb velikem plazmidu, na katerem je zapis za protein QnrD, ki ga sestavlja 214 aminokislin. QnrD se s proteinom QnrA1 ujema v 48-odstotkih, s QnrB1 v 61-odstotkih in s QnrS1 v 32-odstotkih aminokislin (Strahilevitz in sod., 2009).

2.2.2.2.1.5 QnrS

Leta 2003 je na Japonskem prišlo do zastrupitve z bakterijo *Shigella flexneri* in posledično do izbruha enterokolitisa. Eden izmed osmih izoliranih sevov je imel plazmid, odgovoren za odpornost proti kinolonom. Izoliran plazmid kodira protein QnrS iz 218 aminokislin. QnrS se s proteinom QnrA1 ujema v 59-odstotkih aminokislin. Do sedaj so odkrili še tri variante gena *qnrS* (2-4), ki se od gena *qnrS1* razlikujejo v 7,8-odstotkih aminokislin (*qnrS2*) oziroma po enem kodonu (*qnrS3*) (90 % variabilnost) (Strahilevitz in sod., 2009; Cattoir in sod., 2007).

Proteina QnrA in QnrS najverjetneje izvirata iz vodnih vrst bakterij *Shewanella algae* in *Vibrio splendidus*. Proteina QnrA in QnrB sta pogosto povezana s plazmidno kodiranimi beta-laktamazami razširjenega spektra, kot sta SHV in CTX-M (Poirel in sod., 2008).

2.2.2.2.2 PMQR – odpornost s kemijsko modifikacijo kinolonov z AAC(6')-Ib-cr

Leta 2006 so v Šanghaju iz kliničnih izolatov *E. coli* izolirali plazmid, ki omogoča 4-krat višjo stopnjo odpornosti proti ciprofloksacinu, kot jo sicer omogoča QnrA. Ugotovili so, da ima sev poleg gena *qnrA* tudi novo različico gena za aminoglikozidno acetiltransferazo, *aac(6')-Ib*, ki so jo označili *aac(6')-Ib-cr*. Encim, ki ga kodira, ima dodatno sposobnost acetilacije in s tem inaktivacije fluorokinolonov (Jacoby in sod., 2009).

Odpornost, ki jo posreduje AAC(6')-Ib-cr je manjša od odpornosti, ki jo posredujejo proteini Qnr (Poirel in sod., 2008). AAC(6')-Ib-cr je pogosto povezan z beta-laktamazami razširjenega spektra kot so CTX-M-15, CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-24 in SHV-12, saj so genski zapisi velikokrat na istem plazmidu, ter z drugimi PMQR geni, kot so *qnrA1*, *qnrB2*, *qnrB4*, *qnrB6*, *qnrB10*, *qnrS1*, *qnrS2* in *qepA* (Strahilevitz in sod., 2009).

2.2.2.2.3 PMQR – izločanje antibiotika z membransko črpalko QepA

Na Japonskem so leta 2002 na plazmidu pHPA odkrili gen *qepA* (ang. quinolone efflux pump), ki omogoča odpornost proti aminoglikozidom, florokinolonom in beta-laktamom z razširjenim spektrom delovanja (Strahilevitz in sod., 2009). Protein omogoča 32- do 64-kratno povečanje odpornosti za hidrofilne kinolone kot so norfloksacin, ciprofloksacin in enrofloksacin (Poirel in sod., 2008). Gen *qepA* kodira 511 aminokislin velik protein QepA, iz družine proteinov s 14 transmembranskimi segmenti. Razširjen je v številnih po Gramu negativnih bakterijah in služi odstranjevanju nezaželenih snovi iz citoplazme in membrane.

Delež G+C parov v QepA je 72-odstoten, na kromosomu enterobakterij pa 50-odstoten. Glede na filogenetske analize, QepA najverjetneje sodi v družino transporterskih membranskih črpalk iz po Gramu pozitivne družine bakterij *Actinomycetales*. V sevih, ki imajo črpalko QepA je akumulacija norfloksacina mnogo manjša kot v sevih, ki črpalke nimajo (Yamane in sod., 2007). Glede na raziskave je QepA najverjetneje plazmidno kodirana kinolonska črpalka za izločanje fluorokinolonov iz citoplazme v zunanost celice (Strahilevitz in sod., 2009; Yamane in sod., 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Bakterijski sevi

3.1.1.1 Laboratorijska seva

Pri raziskovalnem delu smo uporabili laboratorijska seva *E. coli* iz zbirke Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Preglednica 3: Laboratorijska seva *E. coli*, ki smo ju uporabili pri delu

Sev <i>E. coli</i>	Genotip	Vir
J53	Az ^r	G. A. Jacoby
J53 <i>qnr</i> ⁺	Az ^r plasmid <i>qnrA</i>	G. A. Jacoby

3.1.1.2 Klinični izolati ESBL producirajočih sevov

Vseh petnajst kliničnih sevov *E. coli*, ki izločajo encime ESBL in smo jih uporabili pri raziskovalnem delu, je bilo izoliranih v Bolnišnici Golnik, v letu 2008 in začetku leta 2009.

3.1.2 Gojišča

3.1.2.1 Priprava trdnih gojišč LB (angl. Luria-Bertani) v petrijevkah

Trdna gojišča LB smo pripravili tako, da smo v deionizirani vodi raztopili 25 g/l gojišča LB in 15g/l agarja. Z avtoklaviranjem smo gojišča sterilizirali 15 minut pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 55 °C, smo ga razlili v sterilne plastične petrijevke.

3.1.2.2 Priprava trdnih gojišč LB z dodatkom protimikrobnih učinkovin

Osnovno gojišče LB smo pripravili tako, kot je opisano v podpoglavju 3.1.2.1. Na 55 °C ohlajenem gojišču smo dodali protimikrobna sredstva natrijev azid, ampicilin, tetraciklin in trimetoprim v koncentracijah, ki so navedene v preglednici 4. S pomočjo magnetnega mešala smo gojišče ponovno premešali in ga nato razlili v sterilne plastične petrijevke.

Preglednica 4: Založne in končne koncentracije protimikrobnih sredstev.

Protimikrobno sredstvo	Založna koncentracija (mg/ml)	Končna koncentracija v gojišču (µg/ml)
Ampicilin	100	100
Cefotaksim	10	2
Ciprofloksacin	10	0,04
Natrijev azid	150	175
Tetraciklin	10	10
Trimetoprim	10	10

3.1.2.3 Priprava trdnih gojišč BHI (angl. Brain Heart Infusion)

Trdna gojišča BHI smo pripravili tako, da smo v deionizirani vodi raztopili 27 g/l gojišča BHI in 15 g/l agarja. Z avtoklaviranjem smo sterilizirali 15 minut pri 121 °C in tlaku 1,2 atm. Ko se je gojišče ohladilo na približno 55 °C, smo ga razlili v sterilne plastične petrijevke.

3.1.3 Kemikalije

BIOCHEMICA

- ciprofloksacin

BIOLIFE ITALIANA

- gojišče BHI (Brain Hearth Infusion)

FERMENTAS

- deionizirana voda brez nukleaz
- DNA velikostni standardi: 1 kb DNA Ladder (10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250 bp), 1 kb Plus DNA Ladder (20000, 10000, 7000, **5000**, 4000, 3000, 2000, **1500**, 1000, 700, **500**, 400, 300, 200 in 75 bp), 100 bp Plus DNA Ladder (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 in 100 bp) in 50 bp DNA Ladder (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 in 50 bp),
- *Taq*-polimeraza: Dream TaqTM Green PCR Master Mix

- Zmes za PCR: PCR Master Mix (0,05 enot/ μ l Taq DNA polimeraze v reakcijskem pufu: 4 mM MgCl₂, 0,4 mM vsakega od dNTPjev: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- nanašalni elektroforezni pufer

KEMIKA

- EDTA
- glukoza
- KH₂PO₄ (natrijev dihidrogen fosfat)

LEK

- tetraciklin

ROTH

- agar (Agar-agar, Kobe I)
- agarosa (Agarose NEEO Ultra Qualitat)
- LB (Luria-Broth medium)
- SDS Ultra Pure

SIGMA

- 0,1 M kalcijev diklorid
- ampicilin
- baza Tris
- etidijev bromid (10 mg/ml)
- kalijev acetat
- natrijev azid
- natrijev hidroksid
- trimetoprim

3.1.4 Encimi

FERMENTAS

- *TaaI*
- *NdeI*

3.1.5 Začetni oligonukleotidi

Vsi začetni oligonukleotidi so bili pripravljene v laboratoriju podjetja Jena Bioscience GmbH, Jena, Nemčija.

3.1.6 Kompleti

Za čiščenje DNA iz agaroznega gela smo uporabili komplet proizvajalca Fermentas:

- GeneJET™ Gel Extraction Kit

3.1.7 Pufri in reagenti

3.1.7.1 Ločevanje nukleinskih kislin z elektroforezo na agaroznem gelu

Za pripravo agaroznih gelov in elektroforezo smo uporabili:

- **puffer 5× TBE** (0,45 mM Tris-borat, 10 mM EDTA), ki smo ga hranili pri sobni temperaturi,
- **agarozo** za pripravo gela,
- **etidijev bromid** (založna koncentracija 10 mg/ml),
- **nanašalni elektroforezni puffer** (0,25-odstotni bromfenolmodro, 0,25-odstotni ksilencianol, 40-odstotna saharoza).

3.1.8 Pribor in oprema

3.1.8.1 Pribor

Pri laboratorijskem delu smo uporabili:

- avtomatske pipete (Eppendorf),
- laboratorijske rokavice,
- laboratorijska steklovina: čaše, merilni valji, elrenmajerice, epruvete, petrijevke...,
- laboratorijske cepilne zanke,
- mikrocentrifugirke,
- PCR mikrocentrifugirke (MicroAmp, Perkin Elmer),
- plastične petrijevke.

3.1.8.2 Oprema

- ciklični termostat GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer),
- ciklični termostat UNO II (Biometra),
- namizno centrifugo Eppendorf Centrifuge 5417C,
- namizno centrifugo Eppendorf Centrifuge 5415R,
- sistem za elektroforezo (banjica Hoefer HE 33, nosilec za gel, glavnik, električni napajalnik Consort E835 oziroma E143),
- UV transiluminator UXDT-20ML-15R (Biostep),
- hibridizacijska vodna kopel (Stovall Life Science),
- vibracijski mešalnik (SBD),
- magnetno mešalo (Tehtnica Železniki),
- avtoklav (Kambič, Slovenija),
- gorilnik (Tlos Zagreb),
- digestorij (Variolab Mobilen W90),
- tehtnica Santer SD 1000T (Tehtnica, Železniki).

3.2 METODE

3.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR ali angl. *polymerase chain reaction*) smo ugotavljali prisotnost genskih zapisov za virulentne dejavnike in gena, značilnega za s serološko skupino O25. Pomnožili smo sedem gospodinjskih genov, katere smo na podlagi zaporedij uvrstili v sekvenčne skupine. Ugotavljali smo tudi prisotnost zapisov za odpornost proti beta laktamskim antibiotikom z razširjenim spektrom delovanja (ESBL) in kinolonom.

3.2.1.1 Priprava vzorčne DNA za izvedbo PCR

Cepilno zanko bakterijske kulture smo prenesli v mikrocentrifugirko z 200 µl sterilne destilirane vode. Bakterije smo resuspendirali s kratkim mešanjem na vibracijskem mešalniku. Resuspendirane celice smo nato 10 minut inkubirali v vreli vodi, nato pa jih 10 minut centrifugirali pri 14 000 vrt./min v namizni centrifugi pri sobni temperaturi. Celokupno bakterijsko DNA, prisotno v supernatantu, smo uporabili kot vzorčno DNA za verižno reakcijo s polimerazo.

3.2.1.2 Začetni oligonukleotidi za PCR

V preglednici 5 so prikazani začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za ugotavljanje prisotnosti genskih zapisov z verižno reakcijo s polimerazo.

Preglednica 5 : Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri PCR, njihovo nukleotidno zaporedje in velikost nastalega PCR-pomnožka.

Kategorija	Oznaka začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje para začetnih nukleotidov (5'-3')	Velikost PCR-pomnožka (bp)	Referenca
Filogenetske skupine in podskupine	ChuA	1 GACGAACCAACGGTCAGGAT 2 TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	Clermont in sod., 2000
	YjaA	1 TGAAGTGCAGGAGACGCTG 2 ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	
	TspE4.C2	1 GAGTAATGTCGGGGCATTCA 2 CGCGCCAACAAGTATTACG	152	
Serološka skupina O25	O25pabBspe	F TCCAGCAGGTGCTGGATCGT R GCGAAATTTTTCGCCGTACTGT	347	Clermont in sod., 2009
	trpA	F GCTACGAATCTCTGTTTGCC R GCAACGCGCCTGGCGGAAG	427	
Beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja	TEM	F ATAAAATTCTTGAAGACGAAA R GACAGTTACCAATGCTTAATC	1080	Ling Ma in sod., 2005
	SHV	F GGGTTATTCTTATTGTGCGC R TTAGCGTTGCCAGTGCTC	927	
	OXA	A CCAAAGACGTGGATG B GTTAAATTCGACCCCAAGTT	442	Siu L. K. in sod., 2000 Edelstein in sod., 2003
	panCTX-M	F TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA R CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	544	
	CTX-1	AAAAATCACTGCGCCAGTTC AGCTTATTCATCGCCACGTT	415	
	CTX-2	CGACGCTACCCCTGCTATT CCAGCGTCAGATTTTTTCAGG	552	
CTX-8	TCGCGTTAAGCGGATGATGC AACCACGATGTGGGTAGC	666	Woodford in sod., 2006	
CTX-9	CAAAGAGAGTGCAACGGATG ATTGAAAGCGTTCATCACC	205		
Plazmidno-kodirane determinante odpornosti proti kinolonom (PMQR)	CTX-25	GCACGATGACATTTCGGG AACCACGATGTGGGTAGC	327	Cattoir in sod., 2007a
	QnrA1-6	F AGAGGATTTCTCACGCCAGG R TGCCAGGCACAGATCTTGAC	580	
	QnrB1-6	F GGMATHGAAATTCGCCACTG ^a R TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA ^a	264	Cattoir in sod., 2007b
	QnrCm	F GGGTTGTACATTTATTGAATCG R CACCTACCCATTTATTTCA	307	Wang in sod., 2009
	QnrDm	F CGAGATCAATTTACGGGGAATA R AACAAGCTGAAGCGCCTG	582	Cavaco in sod., 2009
	QnrSm	F GCAAGTTCATTGAACAGGGT R TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428	Cattoir in sod., 2007a
	QepA	F GCGAGCGCTGGGCGCTTGCGCAG R CCGCCACGCTCCACGACCCGC	1521	To delo
Qac	1 F GGCATCACTGCGTTCGCTCG 2 R GACTGAGCATGACCTTGCG	514	Rok Keber, dipl.delo	

Se nadaljuje...

Adhezini	FimH	1 AACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG 2 ATTGCGTACCAGCATTAGCAATGTCC	465	Usein in sod., 2001
	PapGI	F TCGTGCTCAGGTCCGGAATTT R TGGCATCCCCAACATTATCG	461	Johnson in Stell, 2000
	PapGII	F GGGATGAGCGGGCCTTTGAT R CGGGCCCCAACGTAAGTCTCG	190	
	PapGIII	F GGCCTGCAATGGATTTACCTGG R CCACCAAATGACCATGCCAGAC	258	
	Sfa	1 CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC 2 CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	Le Bouguenec in sod., 1992
	BmaE	1 ATGGCGCTAACTTGCCATGCTG 2 AGGGGGACATATAGCCCCCTTC	504	Johnson in sod., 2000
	Aaf	1 TCGATTGCTACTTTTATT 2 ATTGACCGTGATTGGCTTCC	242	Vila in sod., 2000
	GafD	1 TGTTGGACCGTCTCAGGGCTC 2 CTCCCGAACTCGCTGTTACT	949	Johnson in sod., 2000
	Crl	1 TTTGATTGTCTGGCTGTATG 2 CTTGAGATTGAGCGTCTGTC	250	Maurer in sod., 1998
	Iha	F CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA R TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA	827	Johnson in sod., 2000
Toksini in invazini	Hra	F TACGGTATTCAGTGGCCGGTATC R TCGTCCTTGTAACCTCACACTGC	474	Ambrožič Avguštin, neobjavljeno
	HlyA	1 AACAAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT 2 ACCATATAAGCGGTCATTCCTCGTCA	1177	Yamamoto in sod., 1995
	Cnf1	1 TCGTTATAAAATCAAACAGTG 2 CTTTACAATATTGACATGCTG	445	Ewers in sod., 2004
	Usp	N6 ATGCTACTGTTCCGGGTAGTGTGT N7 CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT	1023	Nakano in sod., 2001
	Sat	1 ACTGGCGGACTCATGCTGT 2 AACCTGTAAAGAAGACTGAGC	387	Ruiz in sod., 2002
	Vat	1 GAACACAGTTCATCTGATCTCC 2 GAATATATCAAATTGGTCCCCC	419	Parham in sod., 2005
	Hbp	1 GCGGACAATAAAGGACAGG 2 GGAGTTATCTGCCTGGATGG	829	Ambrožič Avguštin, neobjavljeno
	FluA	1 GCGGTGTAAGTGTGGCCG 2 CGTTGTGGCTGCCAGAC	1637	Ambrožič Avguštin, neobjavljeno
	OmpT_{APEC}	1 CAGAGTATCTGTCCGGTGCCTCA 2 TACGGTTCCATGTTCTTCCGAC	581	Ambrožič Avguštin, neobjavljeno
	Protein z domeno TIR	TcpC	F GGCAACAATATGTATAATATCCT R GCCCAGTCTATTTCTGCTAAAGA	386
Virulentni dejavniki, ki omogočajo prehod KMP	AslA	1 CGGTGTCTGATATGTACACCG 2 CATCCCTTCCAGTAAACG	546	Hoffman in sod., 2000
Mehaznizmi za privzem železa	IbeA	F AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC R TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	170	Johnson in sod., 2000
	OmpA	1 TCAGGGCGTTCAACTGACCG 2 GCCTGCGGCTGAGTTACAAC	753	Ko in sod., 2005
	Aer	1 TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT 2 AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG	602	Yamamoto in sod., 1995
	Iut	1 GGCTGGACATCATGGAACTGG 2 CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	300	Johnson in sod., 1998

Se nadaljuje...

	FyuA	F TGATTAACCCCGCGACGGGAA R CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	880	Schubert in sod., 1998
	Irp	1 AAGGATTCGCTGTTACCGGAC 2 TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	286	
	IroN	F AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG R GACGCCGACATTAAGACGCAG	665	Johnson in sod., 2000
	IreA	1 TGGTCTTCAGCTATATGG 2 ATCTATGATTGGTGTGGT	415	Russo in sod., 2001
Faktorji za izogibanje imunskemu sistemu gostitelja in odpornost proti serumu	TraT	1 GGTGTGGTGCATGAGCACAG 2 CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	290	Johnson in Stell, 2000
	Iss	F ACGATACTCCGTAGCCAGAGAT R ATGAACAGTGCAGATGAGCTCC	791	Ambrožič Avguštin, neobjavljeno
	KpsMTH	F GCGCATTTGCTGATACTGTTG R CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	272	Johnson in Stell, 2000
MLST-gospodinjski geni	Adk	P1 ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG P2 CCGTCAACTTTCGCGTATTT	583 (536)	Wirth in sod., 2006
	FumC	P1 TCACAGGTCCGACGCGCTTC P2 GTACGCAGCGAAAAAGATTC	806 (469)	
	GyrB	P1 TCGGCGACACGGATGACGGC P2 ATCAGGCCTTCACGCGCATC	(460)	
	Icd	P1 ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGC ACA P2 GGACGCAGCAGGATCTGTT	878 (518)	
	Mdh	P1ATGAAAGTCGCAGTCTCGGCGCTGC T GGCGG P2TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGAT AT CTTTCTT	932	
	PurA	P1 CGCGCTGATGAAAGAGATGA P2 CATACGGTAAGCCACGCAGA	816 (478)	
	RecA	P1 CGCATTTCGCTTTACCCTGACC P2 TCTCGATCAGCTTCTCTTTT	655 (510)	

^aM = A ali C, H = A ali C ali T, Y = C ali T.

3.2.1.3 Sestava reakcijskih mešanic za reakcijo PCR

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *qnrA*, *qnrB* in *qnrS* (multipleks PCR) smo pripravili tako, da smo v 200 µl mikrocentrifugirke odpipetirali 2 µl bakterijskega lizata, po 1 µl začetnih oligonukleotidov QnrAm-F, QnrAm-R, QnrBm-F, QnrBm-R, QnrSm-F, QnrSm-R (10 pmol/µl), 12,5 µl PCR Master mix-a (Fermentas) in 4,5 µl destilirane vode.

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *chuA*, *yjaA* in fragmenta TspE4.C2 (multipleks PCR) smo pripravili tako, da smo v 200 µl mikrocentrifugirke odpipetirali 2 µl bakterijskega lizata, po 1 µl začetnih oligonukleotidov

ChuA1, ChuA2, YjaA1, YjaA2, TspE4.C2-1, TspE4.C2-2, 12,5 µl PCR Master mix-a (Fermentas) in 4,5 µl destilirane vode.

Reakcijske mešanice za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *aac(6')-Ib* in *aac(6')-Ib-cr* smo pripravili tako, da smo v 200 µl mikrocentrifugirke odpipetirali 3 µl bakterijskega lizata, 1 µl začetnega oligonukleotida qac 1F (10 pmol/µl), 1 µl qac 2R (10 pmol/µl), 12,5 µl PCR Master mix-a (Fermentas) in 7,5 µl destilirane vode.

Reakcijske mešanice za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *qnrC*, *qnrD*, *qepA*, *fimH*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *crl*, *iha*, *hlyA*, *cnf1*, *sat*, *vat*, *hbp*, *aer*, *iroN*, *iss*, *kpsMTII* in genov β-laktamaz skupin TEM, SHV, OXA in podskupin CTX smo pripravili tako, da smo v 200 µl mikrocentrifugirke odpipetirali 1 µl bakterijskega lizata, 1 µl izbranega začetnega oligonukleotida F oziroma 1 (10 pmol/µl), 1 µl izbranega začetnega oligonukleotida R (10 pmol/µl) oziroma 2, 12,5 µl PCR Master mix-a (Fermentas) in 9,5 µl destilirane vode.

Za pomnoževanje gospodinjskih genov *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* in *recA* smo uporabili dvakratno količino reakcijske mešanice. V 200 µl mikrocentrifugirke odpipetirali 2 µl bakterijskega lizata, 2 µl izbranega začetnega oligonukleotida F (10 pmol/µl), 2 µl izbranega začetnega oligonukleotida R (10 pmol/µl), 25 µl PCR Master mix-a (Fermentas) in 19 µl destilirane vode.

Reakcijske mešanice za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *sfa*, *bmaE*, *aaf*, *gaf*, *hra*, *usp*, *fluA*, *ompT*, *tcp*, *asl*, *ibeA*, *ompA*, *iut*, *fyuA*, *irp*, *ireA* in *traT* smo pripravili tako, da smo v 200 µl mikrocentrifugirke odpipetirali 2 µl bakterijskega lizata, 1 µl izbranega začetnega oligonukleotida F oziroma 1 (10 pmol/µl), 1 µl izbranega začetnega oligonukleotida R oziroma 2 (10 pmol/µl), 12,5 µl PCR Master mix-a (Fermentas) in 8,5 µl destilirane vode.

3.2.1.4 Razmere pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja gena *bla_{TEM}*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	50 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	80 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *bla_{SHV}* in *iha*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1 ×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 sekund	30 ×
Pomnoževanje	72 °C	90 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1 ×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *bla_{OXA}*, *bla_{panCTX}* in gena *fumC*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	1 minuta	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* in *qnrS*

Začetna denaturacija	95 °C	4 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	54 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja gena *qnrD*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	53 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *aac(6')-Ib* in *aac(6')-Ib-cr* s parom začetnih oligonukleotidov qac 1 (F)/ qac 2 (R)

Začetna denaturacija	94 °C	150 sekund	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	40 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *fimH* in *sat*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	60 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	30 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja genov *vat*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *papGI*, *tcp* in *traT*

Začetna denaturacija	95 °C	4 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *papGII*, *crl*, *kpsMTII*, *chuA*, *yjaA* in fragmenta TspE4.C2

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	30 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *papGIII*, *iut*, *irp* in gena, značilnega za serološko skupino O25

Začetna denaturacija	95 °C	4 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	50 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	40 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *sfa*, *bmaE*, *ompT* in *aslA*

Začetna denaturacija	95 °C	150 sekund	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	64 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	45 minute	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja gena *aaf*

Začetna denaturacija	95 °C	5 minut	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	50 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	30 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja gena *crl*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	30 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *hra*, *cnf*, *ibeA*, *aer*, *iron*, in *iss*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	60 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	1 minuta	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedja gena *hlyA*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	64 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	150 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnegih zaporedij genov *gaf* in *usp*

Začetna denaturacija	95 °C	5 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	50 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	90 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *hbp* in *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×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *fluA* in *fyuA*

Začetna denaturacija	95 °C	4 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	2 minuti	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *ireA*

Začetna denaturacija	95 °C	5 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	50 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov *bla*, ki kodirajo podskupine CTX-M

Začetna denaturacija	94 °C	5 minut	1×
Denaturacija	94 °C	25 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	52 °C	40 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	50 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	6 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja gena *adk*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	52 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja gena *gyrB*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	58 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja gena *icd*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	54 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	1 minuta	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja gena *mdh*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	68 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja gena *purA*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	50 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

- Razmere za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja gena *recA*

Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1×
Denaturacija	94 °C	30 sekund	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	54 °C	30 sekund	30×
Pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
Končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1×

3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

Z agarozno gelsko elektroforezo smo preverjali prisotnost in velikost nastalih PCR-pomnožkov ter fragmentov DNA po restrikciji. Preverjali smo tudi prisotnost plazmidne DNA po izolaciji. Glede na velikost PCR-pomnožka smo pripravili gele z gostoto od 0,9 do 1,5-odstotka agaroze. Gel smo pripravili tako, da smo ustrezni količini agaroze dodali pufer 1× TBE in segrevali, dokler se agarozna ni raztopila. Na 50 °C do 60 °C ohlajenemu gelu smo dodali etidijev bromid do končne koncentracije 0,5 µg/ml. Gel smo vlili v nosilce, v katere smo pred tem namestili glavnike za jamice in počakali, da se gel strdi.

Glede na velikost pričakovanega PCR-pomnožka smo v prvo jamico dali 1-kilobazno, 100-bp ali 50-bp lestvico (Fermentas), ki nam je služila kot označevalec velikosti. Skupaj z nanašalnim elektroforeznim pufrom smo v razmerju 5:1 v preostale jamice vnesli po 5 μ l PCR-pomnožkov ali PCR-pomnožkov po restrikciji. V primeru, da smo uporabili Master Mix z dodanim barvilom za spremljanje elektroforeze (Dream Taq Green Master Mix, Fermentas), nanašalnega elektroforeznega pufru nismo uporabili. Elektroforeza je potekala pri napetosti 10V/cm gela v pufru 1 \times TBE.

Za analizo razrezane plazmidne DNA smo uporabili 1-odstotni agarozni gel. Kot označevalec velikosti smo uporabili 1-kilobazno lestvico (Plus DNA Ladders, Fermentas). V jamice smo vnesli vzorec in nanašalni pufer v razmerju 5:1. Ločevali smo pri napetosti 6 V/cm gela, v pufru 1 \times TBE.

Po končani elektroforezi smo gele presvetlili z UV-svetlobo valovne dolžine 302 nm in jih dokumentirali.

3.2.3 Ugotavljanje filogenetskih skupin in podskupin različnih sevov *E. coli*

Seve smo v filogenetske skupine in podskupine uvrstili na osnovi prisotnosti treh odsekov DNA, *chuA*, *yjaA* in TSPE4.C2, kot je prikazano v preglednici 1.

3.2.4 Restriksijska analiza PCR-pomnožkov

3.2.4.1 Restriksijska analiza PCR-pomnožkov dobljenih s parom začetnih oligonukleotidov *qac1/qac2*

S parom začetnih oligonukleotidov *qac1/qac2* smo pomnožili obe različici gena *aac(6')-Ib*, izvorno obliko (divji tip) in mutirano različico (*aac(6')-Ib-cr*). Zaporedji genov se razlikujeta le v dveh baznih parih v kodonih 102 in 179. Restriksijska encima *TaaI* in *NdeI* imata na mestih, kjer sta mutaciji, spoznavni zaporedji, zato smo ju uporabili za razrez nastalih PCR-pomnožkov. Glede na velikost nastalih fragmentov smo določili prisotnost izvorne in/ali mutirane oblike gena.

Za pripravo 10 μ l restriksijske mešanice smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 3 μ l neočiščenega PCR-pomnožka, 0,5 μ l encima *TaaI* ali 1 μ l encima *NdeI*, 1 μ l ustreznega pufru za restrikcijo (Fermentas) ter 4,5 oziroma 5 μ l deionizirane vode. Restrikcija z

encimom *TaaI* je potekala pri 65 °C, restrikcija z encimom *NdeI* pa pri 37 °C. Obe restrikciji smo inkubirali približno 16 ur. Nastale restrikcije fragmente smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo na 1,5-odstotnem agaroznem gelu.

3.2.5 Čiščenje fragmentov dobljenih v reakciji PCR in določitev nukleotidnega zaporedja

Fragmente genov *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* in *recA* smo pomnožili z metodo PCR, ki smo jo izvedli po postopku, opisanem v podpoglavjih 3.2.1.3 in 3.2.1.4. Po pomnoževanju smo celotno vsebino pomnožkov (50 µl) vnesli v jamice na agaroznem gelu. Po elektroforezi smo gel presvetlili z UV svetlobo in s sterilnim skalpelom iz njega izrezali del, kjer je bil pomnoženi fragment DNA. Nastale fragmente DNA smo iz izrezanega koščka agaroznega gela očistili po navodilih proizvajalca s pomočjo kompleta Fermentas GenetJET™ Gel Extraction Kit. Očiščene fragmente smo poslali v Macrogen Inc. v Korejo, kjer so jim določili nukleotidno zaporedje.

3.2.6 Konjugacija izbranih sevov z recipientskim sevom *E. coli* J53 Az^r

S konjugacijami smo skušali plazmide iz izbranih sevov prenesti v recipientski sev bakterije *E. coli* J53Az^r. Konjugacije smo pripravili tako, da smo na trdno gojišče BHI na gosto razmazali polno cepilno zanko recipientskega seva *E. coli* J53 Az^r, odpornega proti natrijevemu azidu, preko tega pa smo na enak način razmazali izbrane donorske ESBL producirajoče seve. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Polno cepilno zanko zraslih bakterij smo naslednji dan precepili na trdna selektivna gojišča LB z natrijevim azidom (za kontraselekcijo proti donorju), v kombinaciji z ampicilinom, tetraciklinom ali trimetoprimom (za kontraselekcijo proti recipientu in selekcijo prenesenih plazmidnih lastnosti). Plošče smo inkubirali 2 dni pri 37 °C, nato pa kolonije precepili na enaka sveža gojišča. Plošče smo zopet inkubirali 2 dni pri 37 °C. Precepljanje smo ponovili še enkrat.

Za preverjanje transkonjugant smo poleg selekcije z antibiotiki uporabili tudi že opisano metodo PCR, s katero smo preverili, kateri filogenetski skupini oziroma podskupini pripadajo nastale transkonjugante. V primeru, da se domnevne transkonjugante uvrščajo v filogenetsko skupino A, smo potrdili, da gre za transkonjuganto. V to skupino se namreč uvršča tudi recipientski sev *E. coli* J53 Az^r.

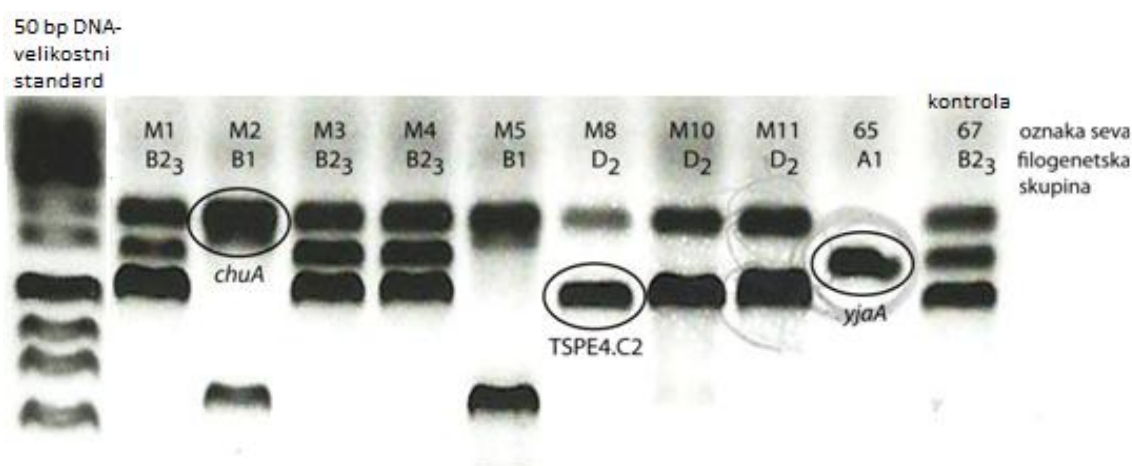
3.2.7 Fisherjev natančni test

S Fisherjevim natančnim testom (Fisher's Exact Test) lahko izračunamo statistično značilnost povezav. Test se uporablja pri majhnih vzorcih, saj za razliko od drugih statističnih metod upošteva tako prisotnost kot tudi odsotnost posameznih genov znotraj celotnega vzorca. O statistično pomembni razliki govorimo, kadar je $P < 0,05$. Za izračun vrednosti P s Fisherjevim natančnim testom smo uporabili računalniški program, ki je na spletni strani <http://www.langsrud.com/fisher.htm>.

4 REZULTATI

4.1 UVRSTITEV SEVOV V FILOGENETSKE SKUPINE IN PODSKUPINE

Seve vrste *E. coli* smo na podlagi prisotnosti ali odsotnosti genov *chuA* in *yjaA* ter fragmenta DNA TSPE4.C2 (slika 2) uvrstili v filogenetske skupine in podskupine po Clermontu (preglednica 6).



Slika 2: Elektroforeza PCR-pomnožkov genov *chuA* (279 bp), *yjaA* (211 bp) in fragmenta TSPE4.C2 (152 bp).

Preglednica 6: Uvrstitev sevov *E. coli* v filogenetske skupine in podskupine.

Oznaka seva <i>E. coli</i>	M1	M2	M3	M4	M5	M8	M10	M11	65	67	68	69	72	73	75
Filo- genetska (pod)skupina	B ₂₃	B ₁	B ₂₃	B ₂₃	B ₁	D ₂	D ₂	D ₂	A ₁	B ₂₃	A ₁	B ₂₃	B ₂₃	B ₂₃	B ₁

V filogenetsko podskupino A₁ smo uvrstili 2 seva [13 %] od 15-ih zbranih izolatov. Filogenetski skupini B₁ pripadajo trije sevi [20 %], filogenetski podskupini B₂₃ iz filogenetske skupine B₂ pa 7 sevov [47 %]. V filogenetsko skupino D smo uvrstili 3 seve [20 %], vsi pripadajo podskupini D₂.

4.2 UVRSTITEV SEVOV V SEKVENČNE SKUPINE (ST) NA OSNOVI MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ (MLST)

V raziskavi smo preverjali prisotnost sevov močno virulentne in proti antibiotikom odporne sekvenčne skupine 131, ki predstavlja vedno večji zdravstveni problem po celem svetu (preglednica 7).

Posamezni alel vsakega od sedmih gospodinjskih genov ima alelno številko. Na osnovi kombinacije alelnih številok za vseh sedem gospodinjskih genov, lahko posamezni sev uvrstimo v sekvenčno skupino. Analizo zaporedij gospodinjskih genov sevov smo opravili s pomočjo programskih orodij na spletni strani <http://mlst.ucc.ie/mlst/mlst/dbs/Ecoli/>.

Uvrstitev v ST-komplekse smo v raziskavi izpustili, saj za večino izolatov (14 [93 %]) še ni opisanih ST kompleksov. Sev M1, ki smo ga uvrstili v ST kompleks 38, ne pripada sekvenčni skupini ST131 in zato ne vpliva na rezultate naše raziskave.

Na podlagi ustrezne kombinacije alelov smo v sekvenčno skupino ST131 uvrstili 7 izolatov *E. coli* (M3, M4, M11, 67, 69, 72 in 73), od katerih jih 6 sodi v filogenetsko podskupino B₂₃ in eden v filogenetsko podskupino D₂. Izolat 73 se v enem od sedmih preiskovanih gospodinjskih genov (*icd*) razlikuje od sekvenčne skupine ST131, a smo ga, zaradi podobnosti z drugimi izolati, v nadaljnjih raziskavah in analizi rezultatov vseeno upoštevali kot ST131. Vseh 7 preostalih sevov se pri vseh sedmih kombinacijah alelov gospodinjskih genov razlikuje od sekvenčne skupine ST131.

Preglednica 7: Kombinacije alelov izbranih sedmih gospodinjskih genov.

Oznaka seva vrste <i>E. coli</i>	Filo- genetska (pod) skupina	Aleli gospodinjskih genov							Sekvenčna skupina
		<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	
M1	B2 ₃	4	26	2	25	5	5	19	ST38
M2	B1	9	6	204	131	24	8	7	ST1490
M3	B2 ₃	53	40	47	13	36	28	29	ST131
M4	B2 ₃	53	40	47	13	36	28	29	ST131
M5	B1	6	4	5	18	11	8	14	ST533
M8	D ₂	4	26	<u>61</u>	25	5	5	19	ST1605
M10	D ₂	92	4	87	96	70	58	2	ST648
M11	D ₂	53	40	47	13	36	28	29	ST131
65	A ₁	10	99	5	91	8	<u>169</u>	2	ST361
67	B2 ₃	53	40	47	13	36	28	29	ST131
68	A ₁	<u>157</u>	4	12	1	20	18	7	ST1338
69	B2 ₃	53	40	47	13	36	28	29	ST131
72	B2 ₃	53	40	47	13	36	28	29	ST131
73	B2 ₃	53	40	47	16*	36	28	29	podoben ST131
75	B1	6	4	4	<u>13</u>	24	8	14	ST58

V preglednici so podčrtane tiste kombinacije alelov, ki se razlikujejo od kombinacije, ki jo ima napisana sekvenčna skupina.

* Alelu *icd* izolata 73 smo dvakrat določili nukleotidno zaporedje, a smo obakrat dobili enak rezultat.

4.3 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI GENOV

4.3.1 Ugotavljanje prisotnosti genov za virulentne dejavnike

Pri vseh 15 sevih *E. coli* [100 %] smo z metodo verižne reakcije s polimerazo ugotavljali prisotnost zapisov za izbrane virulentne dejavnike (preglednica 8).

Izmed preučevanih genov fimbrij oz. adhezinov smo najpogosteje našli gena *crl* (15 [100 %]) in *fimH* (14 [93 %]). Gen *iha* smo našli pri devetih izolatih (9 [60 %]); pri vseh sedmih izolatih iz filogenetske podskupine B₂₃ (7 [100 %]) in dveh izolatih iz podskupine D₂ (2 [67 %]). Gen *papGIII* smo našli pri dveh sevih iz filogenetske skupine B1 (2 [67 %]). Gene za preostale adhezine smo našli le pri posameznih sevih in po neznačilnem vzorcu (*gaf* pri enem sevu, *hra* pri dveh sevih) oziroma jih ne najdemo pri nobenem od sevov.

Od genov toksinov in invazinov se najpogosteje in skupaj pojavljata *usp* in *sat*. Našli smo ju pri osmih izolatih (8 [53 %]), od tega pri vseh sedmih sevih iz filogenetske podskupine B₂₃ (7 [100 %]) in enem sevu iz filogenetske podskupine D₂ (1 [33 %]). Razen enega seva iz filogenetske podskupine B₂₃ vsi ostali pripadajo sekvenčni skupini ST131. Gen *hbp* smo našli pri petih sevih (5 [33 %]). Gen *fluA* smo potrdili pri osmih sevih [53 %], njegova prisotnost pa deloma sovпада s prisotnostjo genov *usp* in *sat* [87 %]. Našli smo ga pri vseh sevih iz sekvenčne skupine ST131 (7 [100 %]) in pri sevu iz filogenetske skupine B1.

Gen *ompT* smo zasledili pri dveh izolatih iz filogenetske skupine B1 (2 [67 %]).

Pri 11 izolatih (11 [73 %]) smo zasledili gen *ompA*, enega izmed treh genov, ki kodirajo virulentne dejavnike, ki omogoča prehod krvno-možganske pregrade. Gen *ompA* smo našli pri vseh sevih iz filogenetskih podskupin B₂₃ (7 [100 %]) in D₂ (3 [100 %]), našli pa smo ga tudi pri izolatu iz filogenetske podskupine A₁ (1 [50 %]). Preostalih dveh genov (*asl*, *ibeA*) za virulentne dejavnike, ki omogočajo prehod krvno-možganske pregrade nismo našli v nobenem od sevov.

Skupini genov *aer-iut* in *irp-fyuA* smo našli pri 12 izolatih (12 [80 %]). Skupino genov *irp-fyuA* smo našli pri sevih iz filogenetskih podskupin B₂₃ (7 [100 %]), D₂ (3 [100 %]) in dveh sevih iz filogenetske skupine B1 (2 [66 %]), pojavljanje skupine genov *aer-iut* pa je

neznačilno. Gen *iroN* je bil prisoten pri dveh izolatih iz filogenetske skupine B1 (2 [66 %]). Zasedili smo ga pri enakih sevih kot gena *papGIII* in *ompT*.

Gena *traT* in *iss* sta bila prisotna pri devetih izolatih (9 [60 %]) in se vedno pojavljata skupaj. Zapis *kpsMTII* smo zasedili pri osmih izolatih (8 [53 %]); pri vseh sevih iz filogenetske podskupine B2₃ (7 [100 %]) in enem sevu iz filogenetske podskupine D₂ (1 [33 %]). Vsi sevi, ki imajo zapis *kpsMTII*, razen enega iz filogenetske podskupine B2₃, sodijo v sekvenčno skupino ST131.

Poleg že omenjenih genov *fluA* in *kpsMTII* se pri sekvenčni skupini ST131 pojavlja tudi gen *iha* za nefimbrijski adhezin, gena *usp* in *sat* ter gen *ompA*. Pri vseh izolatih iz ST131 najdemo tudi gene *aer-iut* in *irp-fyuA*, ki kodirajo sisteme za privzem železa.

Preglednica 8: Prisotnost genov virulentnih dejavnikov

Oznaka seva vrste <i>E. coli</i>	Filo-genetska (pod) skupina	ADHEZINI										
		<i>fimH</i>	<i>papGI</i>	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfa</i>	<i>bmaE</i>	<i>aaf</i>	<i>gaf</i>	<i>crl</i>	<i>iha</i>	<i>hra</i>
M1	B ₂₃	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
M2	B1	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
M3	B ₂₃	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
M4	B ₂₃	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
M5	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M8	D ₂	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
M10	D ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M11	D ₂	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
65	A ₁	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
67	B ₂₃	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
68	A ₁	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
69	B ₂₃	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
72	B ₂₃	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
73	B ₂₃	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
75	B1	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-

+ pomeni prisotnost specifičnega PCR-pomnožka, - pomeni, da specifičnega PCR-pomnožka nismo zasledili
Sevi, označeni z odebeljenimi črkami na sivem ozadju, se uvrščajo v sekvenčno skupino ST131.

FIMBRIJSKI ADHEZINI: *fimH* – fimbrije tipa 1; *papGI*, *papGII*, *papGIII* – P-fimbrije; *sfa* – S-fimbrije; *bmaE* – M-fimbrije; *aaf* – agregativne adherentne fimbrije; *gaf* – G-fimbrije; *crl* – curljeva vlakna

NEFIMBRIJSKI ADHEZINI: *iha* – IrgA homologni adhezin; *hra* – proti toploti odporen aglutinin

Se nadaljuje ...

Oznaka seva vrste <i>E. coli</i>	Filo- genetska (pod) skupina	TOKSINI IN INVAZINI							OMPTIN	PROTEIN Z DOMENO TIR	VIRULENTNI DEJAVNIKI, KI OMOGOČAJO PREHOD KMP		
		<i>hly</i>	<i>cnf1</i>	<i>usp</i>	Avtotransportirski toksini				<i>ompT</i>	<i>tcp</i>	<i>asl</i>	<i>ibeA</i>	<i>ompA</i>
					<i>sat</i>	<i>vat</i>	<i>hbp</i>	<i>fluA</i>					
M1	B2 ₃	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
M2	B1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M3	B2 ₃	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
M4	B2 ₃	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
M5	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M8	D ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
M10	D ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
M11	D ₂	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
65	A ₁	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
67	B2 ₃	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
68	A ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	B2 ₃	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
72	B2 ₃	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
73	B2 ₃	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
75	B1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

+ pomeni prisotnost specifičnega PCR-pomnožka, - pomeni, da specifičnega PCR-pomnožka nismo zasledili
Sevi, označeni z odebelenimi črkami na sivem ozadju, se uvrščajo v sekvenčno skupino ST131.

TOKSINI IN INVAZINI: *hly* – hemolizin alfa; *cnf1* – citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1; *usp* – za uropatogene seve specifični protein
KMP – krvno-možganska pregrada

Se nadaljuje ...

Oznaka seva vrste <i>E. coli</i>	Filo- genetska (pod) skupina	SISTEMI ZA PRIVZEM ŽELEZA						FAKTORJI ZA IZOGIBANJE IMUNSKEMU SISTEMU GOSTITELJA IN ODPORNOST PROTI SERUMU		
		<i>aer</i>	<i>iut</i>	<i>fyuA</i>	<i>Irp</i>	<i>iroN</i>	<i>ireA</i>	<i>traT</i>	<i>iss</i>	<i>kpsMTII</i>
M1	B2 ₃	+	+	+	+	-	-	+	+	+
M2	B1	+	+	+	+	+	-	+	+	-
M3	B2 ₃	+	+	+	+	-	-	+	+	+
M4	B2 ₃	+	+	+	+	-	-	+	+	+
M5	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M8	D ₂	-	-	+	+	-	-	-	-	-
M10	D ₂	-	-	+	+	-	-	+	+	-
M11	D ₂	+	+	+	+	-	-	-	-	+
65	A ₁	+	+	-	-	-	-	-	-	-
67	B2 ₃	+	+	+	+	-	-	+	+	+
68	A ₁	+	+	-	-	-	-	-	-	-
69	B2 ₃	+	+	+	+	-	-	+	+	+
72	B2 ₃	+	+	+	+	-	-	+	+	+
73	B2 ₃	+	+	+	+	-	-	-	-	+
75	B1	+	+	+	+	+	-	+	+	-

+ pomeni prisotnost specifičnega PCR-pomnožka, - pomeni, da specifičnega PCR-pomnožka nismo zasledili
 Sevi, označeni z odebeljenimi črkami na sivem ozadju, se uvrščajo v sekvenčno skupino ST131.

SISTEMI ZA PRIVZEM ŽELEZA: *aer-iut* – aerobaktin; *irp-fyu* – jersiniabaktin
 FAKTORJI ZA IZOGIBANJE IMUNSKEMU SISTEMU GOSTITELJA: *kpsMTII* - kapsula

4.3.2 Ugotavljanje prisotnosti za serološko skupino O25 značilnega gena

Pri vseh 15 sevih *E. coli* smo z metodo verižne reakcije s polimerazo ugotavljali prisotnost gena, značilnega za serološko skupino O25 in na ta način preverili, kateri sevi se uvrščajo v to skupino (preglednica 9).

V serološko skupino O25 se uvrščajo vsi sevi iz filogenetske podskupine B₂₃ (7 [100 %]), izolat iz filogenetske skupine B1 (1 [33 %]) in izolat iz filogenetske podskupine D₂ (1 [33 %]).

Preglednica 9: Prisotnost za serološko skupino O25 značilnega gena

Oznaka seva vrste <i>E. coli</i>	Filogenetska (pod)skupina	Za serološko skupino O25 značilen gen
M1	B ₂₃	+
M2	B1	+
M3	B ₂₃	+
M4	B ₂₃	+
M5	B1	-
M8	D ₂	-
M10	D ₂	-
M11	D ₂	+
65	A ₁	-
67	B ₂₃	+
68	A ₁	-
69	B ₂₃	+
72	B ₂₃	+
73	B ₂₃	+
75	B1	-

+ pomeni prisotnost specifičnega PCR-pomnožka, - pomeni, da specifičnega PCR-pomnožka nismo zasledili. Sevi, označeni z odebeljenimi črkami na sivem ozadju, sodijo v sekvenčno skupino ST131.

4.3.3 Ugotavljanje prisotnosti genov za odpornost proti antibiotikom

Pri vseh 15 sevih *E. coli* smo z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) preverili prisotnost genskih zapisov za odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom in kinolonom (preglednica 10).

Vsi sevi imajo zapis za beta-laktamaze CTX. Med njimi prevladuje zapis *bla*_{CTX-1}. Zapis *bla*_{CTX-9} imajo trije sevi (3 [20 %]), *bla*_{CTX-8} pa le en sev (1 [7 %]). Izolat M1 ima dva zapisa, *bla*_{CTX-1} in *bla*_{CTX-9}. Osem sevov (8 [53 %]) ima gen *bla*_{TEM} in le en sev gen *bla*_{SHV}.

Od genov za odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom, se poleg zapisa *bla*_{CTX-1} (12 [80 %]) pogosto pojavlja tudi zapis *bla*_{OXA} (9 [60 %]). Gena sta tudi statistično povezana, saj vsi sevi z genom *bla*_{OXA} imajo tudi gen *bla*_{CTX-1}.

Noben sev iz naše raziskave nima plazmidno kodiranih genov *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* in gena *qepA* za odpornost proti kinolonom. Kar 9 sevov (9 [60 %]) pa ima gen *aac(6')-Ib-cr*.

Pristotnost gena *aac(6')-Ib-cr* v celoti sovpada s prisotnostjo gena *bla*_{OXA}. Imajo ju vsi sevi iz filogenetske podskupine A₁ (2 [100 %]) in filogenetske podskupine B₂₃ (7 [100 %]).

Večina sevov iz ST131 [86 %], ima gena *bla*_{OXA} in *bla*_{CTX-1}, ki kodirata odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom in gen *aac(6')-Ib-cr* za odpornost proti kinolonom in nekaterim aminoglikozidom.

Preglednica 10: Prisotnost genov dejavnikov odpornosti proti beta-laktamskim antibiotikom z razširjenim spektrom delovanja in kinolonom

Oznaka seva vrste <i>E. coli</i>	Filo- genetska (pod) skupina	Geni za odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom z razširjenim spektrom delovanja								Geni za odpornost proti kinolonom								
		TEM	SHV	OXA	CTX -1	CTX -2	CTX -8	CTX -9	CTX -25	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i>	<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> w.t.	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	<i>qepA</i>
M1	B2 ₃	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
M2	B1	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3	B2 ₃	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
M4	B2 ₃	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
M5	B1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M8	D ₂	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M10	D ₂	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M11	D ₂	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	A ₁	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
67	B2 ₃	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
68	A ₁	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
69	B2 ₃	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
72	B2 ₃	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
73	B2 ₃	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
75	B1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ pomeni prisotnost specifičnega PCR-pomnožka, - pomeni, da specifičnega PCR-pomnožka nismo zasledili
Sevi, označeni z odebeljenimi črkami na sivem ozadju, sodijo v sekvenčno skupino ST131.

4.3.3.1 ANALIZA TRANSKONJUGANT

Na gojišča smo nacepili recipientski laboratorijski sev J53 Az^r, odporen proti azidu, preko njega pa razmazali posamezne donorske seve. Zrasle bakterije smo dvakrat precepili na nova gojišča s kombinacijo dveh protimikrobnih učinkovin, natrijevega azida (za kontraselekcijo proti donorju) in ampicilina, tetraciklina ali trimetoprima (za selekcijo transkonjugant). Opazovali smo rast transkonjugant. V transkonjugantah smo z verižno reakcijo s polimerazo ugotavljali prisotnost plazmidov z zapisi za beta-laktamaze CTX, SHV in TEM (preglednica 11).

Preglednica 11: Analiza transkonjugant.

Oznaka seva vrste <i>E. coli</i>	Filo-genetska (pod) skupina	Rast na gojišču z dodanimi antibiotiki za selekcijo transkonjugant				Ugotavljanje prisotnosti genov za odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom pri transkonjugantah		
		AzAp	AzCtx	AzTc	AzTp	panCTX	SHV	TEM
M1	B ₂₃	-	-	-	+	-	nt	-
M2	B1	+	+	+	-	+	+	-
M3	B ₂₃	-	-	-	+	-	nt	nt
M4	B ₂₃	-	-	-	+	-	nt	nt
M5	B1	+	+	-	-	+	nt	nt
M8	D ₂	-	-	-	-	nt	nt	nt
M10	D ₂	-	-	-	-	nt	nt	nt
M11	D ₂	-	-	-	-	nt	nt	nt
65	A ₁	-	-	-	-	nt	nt	nt
67	B ₂₃	-	-	-	-	nt	nt	nt
68	A ₁	-	-	-	-	nt	nt	nt
69	B ₂₃	-	-	-	+	-	nt	nt
72	B ₂₃	+	-	-	-	-	nt	+
73	B ₂₃	-	-	-	-	nt	nt	nt
75	B1	-	-	-	-	nt	nt	nt

+ pomeni rast transkonjugante, - rasti ni; nt – nismo testirali, ker donorski sev ni imel tega genskega zapisa ali transkonjugante nismo izolirali

Az – natrijev azid; Ap – ampicilin; Ctx – cefotaksim; Tc – tetraciklin; Tp – trimetoprim

Sevi, označeni z odebeljenimi črkami na sivem ozadju, sodijo v sekvenčno skupino ST131.

V primeru, da je bilo transkonjugant več, smo prisotnost ugotavljali pri tisti, ki je označena z znakom +*.

Pri konjugacijah smo pričakovali prenos plazmida z zapisi za beta-laktamaze CTX, SHV in TEM za odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom iz donorskih sevov v recipientski sev J53 Az^r. Opazili smo rast sedmih domnevnih transkonjugant [47 %], ki smo jih uvrstili v filogenetsko skupino A, kamor sodi tudi sev J53 Az^r. Štiri izmed njih so bile iz sekvenčne skupine ST131. Z verižno reakcijo s polimerazo smo pri domnevnih transkonjugantah preverili prisotnost zapisov za odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom. Ugotavljali smo prisotnost le tistih zapisov za odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom, ki jih je imel že posamezni donorski sev.

Od sedmih domnevnih transkonjugant so imele le tri [20 %] plazmid z zapisi za odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom, dve iz filogenetske skupine B1 in ena iz filogenetske podskupine B2₃. Pri sevih iz sekvenčne skupine ST131 do konjugacij ni prišlo.

4.4 POVEZANOST GENOV VIRULENTNIH DEJAVNIKOV, ZA SEROLOŠKO SKUPINO O25 ZNAČILNEGA GENA IN GENOV DEJAVNIKOV ODPORNOSTI S FILOGENETSKO (POD)SKUPINO, SEKVENČNO SKUPINO ST131 IN SEROLOŠKO SKUPINO O25

S pomočjo Fisherjevega natančnega testa smo preverjali statistično značilnost poveze posameznih genov s filogenetskimi (pod)skupinami, sekvenčno skupino ST131 in serološko skupino O25.

4.4.1 Povezanost genov virulentnih dejavnikov s filogenetsko (pod)skupino, sekvenčno skupino ST131 in serološko skupino O25

S Fisherjevim natančnim testom smo preverjali značilno povezanost genov za virulentne dejavnike s posamezno filogenetsko (pod)skupino, sekvenčno skupino ST131 in serološko skupino O25 (preglednica 12).

Od vseh virulentnih dejavnikov je za filogenetsko podskupino A₁ statistično značilna le skupina genov *irp-fyuA* (0,0285). V filogenetski skupini B₁ se statistično značilno pojavljajo geni *papGIII* (0,0285), *iha* (0,0439), *ompT* (0,0285), *ompA* (0,0087), *aer-iut*, *irp-fyuA* in *iroN* (0,0285) ter *iss* (0,0087). Za filogenetsko podskupino B₂₃ so statistično značilni geni *iha* (0,0069), *usp* in *sat* (0,0013), *fluA* (0,0405) in *kpsMTII* (0,0013). Za filogenetsko podskupino D₂ ni statistično značilen nobeden od analiziranih genov.

V sekvenčni skupini ST131 se statistično značilno pojavljajo geni *iha* (0,0069), *usp*, *sat* in *fluA* (0,0013) ter *kpsMTII* (0,0013). V filogenetski podskupini B₂₃ in sekvenčni skupini ST131 se statistično značilno in z enakim P pojavljajo isti geni, razlika je le v genu *fluA*, ki je statistično bolj značilen za sekvenčno skupino ST131.

Za serološko skupino O25 so statistično značilni geni *iha* (0,109), *usp* in *sat* (P = 0,0013), *fluA* (P = 0,0405), *kpsMTII* (P = 0,0013) ter *aer-iut* in *irp-fyu* (P = 0,0439). Geni *usp*, *sat* in *kpsMTII* se z enakim P pojavljajo tudi v filogenetski podskupini B₂₃ in sekvenčni skupini ST131. Gen *fluA* smo z enako vrednostjo P zasledili v filogenetski podskupini B₂₃.

Preglednica 12: Povezanost genov virulentnih dejavnikov s filogenetsko (pod)skupino, sekvenčno skupino ST131 in serološko skupino O25

	Filogenetska (pod)skupina								Sekvenčna skupina			Serološka skupina		
	A ₁		B ₁		B _{2,3}		D ₂		ST131	ne-ST131		O25	ne-O25	
	število (%)	P	število (%)	P	število (%)	P	število (%)	P	število (%)	število (%)	P	število (%)	število (%)	P
Adhezini														
<i>fimH</i>	2 (100)	1	3 (100)	1	7 (100)	1	2 (66)	0,2000	7 (100)	7 (87)	1	9 (100)	5 (83)	0,3999
<i>papGI</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>papGII</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>papGIII</i>	0 (0)	1	2 (66)	0,0285	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	2 (25)	0,4666	1 (11)	1 (17)	1
<i>sfa</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>bmaE</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>aaf</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>gaf</i>	1 (50)	0,1333	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1 (12)	1	0 (0)	1 (17)	0,3999
<i>crl</i>	2 (100)	1	3 (100)	1	7 (100)	1	3 (100)	1	7 (100)	8 (100)	1	9 (100)	6 (100)	1
<i>iha</i>	0 (0)	0,1428	0 (0)	0,0439	7 (100)	0,0069	2 (66)	1	7 (100)	2 (25)	0,0069	8 (89)	1 (17)	0,0109
<i>hra</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	1 (14)	1	1 (33)	0,3714	0 (0)	2 (25)	0,4666	1 (11)	1 (17)	1
Toksini in invazini														
<i>hly</i>	0 0	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>cnfI</i>	0 0	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>usp</i>	0 (0)	0,1999	0 (0)	0,0769	7 (100)	0,0013	1 (33)	0,5692	7 (100)	1 (12)	0,0013	8 (89)	0 (0)	0,0013
Avtotransportni toksini														
<i>sat</i>	2 100	0,1999	0 (0)	0,0769	6 (86)	0,0013	1 33	0,5692	7 (100)	1 (12)	0,0013	8 (89)	0 (0)	0,0013
<i>vat</i>	0 0	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>hbp</i>	1 (50)	1	0 (0)	0,5054	4 (57)	0,2820	0 (0)	0,5054	4 (57)	1 (12)	0,1188	4 (44)	1 (17)	0,5804
<i>fluA</i>	0 (0)	0,1999	1 (33)	0,5692	6 (86)	0,0405	1 (33)	0,5692	7 (100)	1 (12)	0,0013	7 (78)	1 (17)	0,0405

Vrednosti P so statistično značilne, ko je $P < 0,05$. V tabeli so označene z odebeljeni črkami.

Ker sevov iz filogenetskih podskupin A₀, B₂ in D₁ ni, v tabelo niso vključene.

Se nadaljuje ...

	Filogenetska (pod)skupina								Sekvenčna skupina			Serološka skupina		
	A ₁		B1		B ₂ ₃		D ₂		ST131	ne-ST131	P	O25	ne-O25	P
	število (%)	P	število (%)	P	število (%)	P	število (%)	število (%)	število (%)	število (%)	P	število (%)	število (%)	P
Omp_Tini														
<i>ompT</i>	0 (0)	1	2 (66)	0,0285	0 (0)	0,4666	0 (0)	1	0 (0)	2 (25)	0,4666	1 (11)	1 (17)	1
Protein, ki vsebuje domeno TIR														
<i>tcp</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
Virulentni dejavniki, ki omogočajo prehod KMP														
<i>asl</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>ibe</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>ompA</i>	2 (50)	0,4761	0 (0)	0,0087	7 (100)	0,0769	3 (100)	0,5164	7 (100)	4 (50)	0,0769	8 (89)	3 (50)	0,2351
Sistemi za privzem železa														
<i>aer</i>	2 (100)	1	2 (66)	0,0285	7 (100)	0,1999	1 (33)	0,0813	7 (100)	5 (62)	0,1999	9 (100)	3 (50)	0,0439
<i>iut</i>	2 (100)	1	2 (66)	0,0285	7 (100)	0,1999	1 (33)	0,0813	7 (100)	5 (62)	0,1999	9 (100)	3 (50)	0,0439
<i>fyuA</i>	0 (0)	0,0285	2 (66)	0,0285	7 (100)	0,1999	3 (100)	1	7 (100)	5 (62)	0,1999	9 (100)	3 (50)	0,0439
<i>irp</i>	0 (0)	0,0285	2 (66)	0,0285	7 (100)	0,1999	3 (100)	1	7 (100)	5 (62)	0,1999	9 (100)	3 (50)	0,0439
<i>iroN</i>	0 (0)	1	2 (66)	0,0285	0 (0)	0,4666	0 (0)	1	0 (0)	2 (25)	0,4666	1 (11)	1 (17)	1
<i>ireA</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
Faktorji za izogibanje imunskemu sistemu gostitelja in odpornost proti serumu														
<i>traT</i>	0 (0)	0,1428	2 (66)	1	6 (86)	0,1188	1 (33)	0,5252	5 (71)	4 (50)	0,6083	7 (78)	2 (33)	0,1356
<i>iss</i>	0 (50)	0,4761	3 (100)	0,0087	0 (0)	0,0769	0 (0)	0,5164	5 (71)	4 (50)	0,6083	7 (78)	2 (33)	0,1356
<i>kpsMTII</i>	0 (0)	0,1999	0 (0)	0,0769	7 (100)	0,0013	1 (33)	0,5692	7 (100)	1 (12)	0,0013	8 (89)	0 (0)	0,0013

Vrednosti P so statistično značilne ko je $P < 0,05$. V tabeli so označene z odebeljenimi črkami.

Ker sevov iz filogenetskih podskupin A₀, B₂ in D₁ ni, v tabelo niso vključene.

4.4.2 Povezanost za serološko skupino O25 značilnega gena s filogenetsko (pod)skupino in sekvenčno skupino ST131

S Fisherjevim natančnim testom smo preverjali statistično značilnost povezeve za serološko skupino O25 značilnega gena s posamezno filogenetsko (pod)skupino oziroma sekvenčno skupino ST131 (preglednica 13).

Gen, značilen za serološko skupino O25, je statistično značilno povezan s filogenetsko podskupino B₂ in sekvenčno skupino ST131 ($P = 0,0069$). Za ostale skupine nismo dobili statistično značilne povezave.

Preglednica 13: Povezanost za serološko skupino O25 značilnega gena s filogenetsko (pod)skupino in sekvenčno skupino ST131

	Filogenetska (pod)skupina								Sekvenčna skupina		
	A ₁		B ₁		B _{2,3}		D ₂		ST131	ne-ST131	
	število (%)	P	število (%)	P	število (%)	P	število (%)	P	število (%)	število (%)	P
Za serološko skupino O25 značilen gen	0 (0)	0,1428	1 (33)	0,5252	7 (100)	0,0069	1 (33)	0,5252	7 (100)	2 (25)	0,0069

Vrednosti P so statistično značilne ko je $P < 0,05$. V tabeli so označene z odebeljeni črkami.
 Ker sevov iz filogenetskih podskupin A₀, B_{2,2} in D₁ ni, v tabelo niso vključene.

4.4.3 Povezanost genov dejavnikov odpornosti s filogenetsko (pod)skupino, sekvenčno skupino ST131 in serološko skupino O25

S Fisherjevim natančnim testom smo preverjali statistično značilnost povezave genov odpornosti proti beta-laktamskim antibiotikom in kinolonom in posameznih filogenetskih (pod)skupino, sekvenčno skupino ST131 in serološke skupine O25 (preglednica 14). V primeru, da je $P < 0,05$, je gen značilen za posamezno skupino.

Gen *bla*_{OXA} je statistično značilno povezan s filogenetsko skupino B1 in podskupino D₂ ($P = 0,0439$) ter filogenetsko podskupino B2₃ ($P = 0,0069$). Popolnoma enake vrednosti P se pojavljajo za povezanost gena *aac* (β')-Ib-cr s filogenetsko skupino B1, podskupino D₂ in podskupino B2₃.

Za sekvenčno skupino ST131 in serološko skupino O25 nismo našli nobene statistično značilne povezave z analiziranimi geni odpornosti proti antibiotikom.

Preglednica 14: Povezanost genov dejavnikov odpornosti s filogenetsko (pod)skupino, sekvenčno skupino ST131 in serološko skupino O25

	Filogenetska (pod)skupina								Sekvenčna skupina			Serološka skupina		
	A ₁		B ₁		B ₂		D ₂		ST131	ne-ST131		O25	ne-O25	
	število (%)	P	število (%)	P	število (%)	P	število (%)	P	število (%)	število (%)	P	število (%)	število (%)	P
Beta-laktamski antibiotiki														
<i>bla</i> _{TEM}	2 (100)	0,4667	2 (66)	1	2 (28)	0,1319	2 (66)	1	2 (29)	6 (75)	0,1319	4 (44)	4 (67)	0,6083
<i>bla</i> _{SHV}	0 (0)	1	1 (33)	0,1999	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1 (12)	1	1 (11)	0 (0)	1
<i>bla</i> _{OXA}	2 (100)	0,4857	0 (0)	0,0439	7 (100)	0,0069	0 (0)	0,0439	6 (86)	3 (37)	0,1188	7 (78)	2 (33)	0,1356
<i>bla</i> _{CTX-1}	2 (100)	1	2 (66)	0,5164	7 (100)	0,1999	1 (33)	0,0813	6 (86)	6 (75)	1	8 (89)	4 (67)	0,5252
<i>bla</i> _{CTX-2}	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>bla</i> _{CTX-8}	0 (0)	1	1 (33)	0,1999	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1 (12)	1	0 (0)	1 (17)	0,3999
<i>bla</i> _{CTX-9}	0 (0)	1	0 (0)	1	1 (14)	1	2 (66)	1	1 (14)	2 (25)	1	2 (22)	1 (17)	1
<i>bla</i> _{CTX-25}	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
Kinoloni														
<i>qnrA</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>qnrB</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>qnrC</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>qnrD</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>qnrS</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>aac (6')-Ib</i>	2 (100)	0,4857	0 (0)	0,0439	7 (100)	0,0069	0 (0)	0,0439	6 (86)	3 (37)	0,6043	7 (78)	2 (33)	0,1356
<i>aac (6')-Ib-cr w.t.</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	2 (100)	0,4857	0 (0)	0,0439	7 100	0,0069	0 (0)	0,0439	6 (86)	3 (37)	0,6043	7 (78)	2 (33)	0,1356
<i>qepA</i>	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	1

Vrednosti P so statistično značilne ko je $P < 0,05$. V tabeli so označene z odebeljeni črkami.

Ker sevov iz filogenetskih podskupin A₀, B₂ in D₁ ni, v tabelo niso vključene.

5 RAZPRAVA

Namen diplomskega dela je bil genotipizacija 15 sevov vrste *E. coli*, ki so jih izolirali v letih 2008 in 2009 iz različnih kužnin v Bolnišnici Golnik. Pri vseh sevih so še pred našo analizo fenotipsko potrdili prisotnost beta-laktamaz z razširjenim spektrom delovanja.

Delitev v skupine na osnovi seroloških metod. Serotipizacija antigenov O in H je pomembna metoda identifikacije patogenih sevov (Blanco in sod., 2009). V naši raziskavi smo ugotovili, da je serološka skupina O25 značilna za seve iz filogenetske podskupine B₂₃ (7 [100 %]). Iz serološke skupine O25 je tudi izolat iz filogenetske skupine B1 (1 [33 %]) in izolat iz filogenetske podskupine D₂ (1 [33 %]).

Uvrstitev sevov v filogenetske skupine in podskupine. Na podlagi prisotnosti ali odsotnosti genov *chuA* in *yjaA* ter fragmenta DNA TSPE4.C2 smo seve bakterije *E. coli* uvrstili v filogenetske skupine in podskupine po Clermontu. Sevi iz naše raziskave v največji meri pripadajo filogenetski podskupini B₂₃ (7 [47 %]), s po tremi sevi sta zastopani filogenetski skupini B1 in D (vsaka po 3 [20 %]), najmanj pa je sevov iz filogenetske skupine A (2 [13 %]). Glede na številne raziskave komenzalni sevi večinoma sodijo v filogenetski skupini A in B1, patogeni sevi, povezani z zunajčrevesnimi okužbami, pa v filogenetski skupini B2 in D povzročajo zunajčrevesne okužbe (Picard in sod., 1999; Johnson in Stell, 2000). Raziskava Jaureguy-a in sodelavcev iz leta 2008 je pokazala, da večina patogenih sevov povezanih z bakteremijo, sodi v filogenetsko skupino B2 (50 %), sledita skupini D (23 %) in A (20 %), v najmanjši meri pa patogeni sevi pripadajo filogenetski skupini B1 (7 %). Rezultati raziskave Ramos-a in sodelavcev iz leta 2010 kažejo, da tako uroseptični sevi kot tudi sevi, povezani s septikemijo, najpogosteje pripadajo filogenetski skupini B2 (70 %), precej manj sevov pa pripada filogenetskim skupinam D (22,9 %), A (5,7 %) oziroma B1 (1,4 %). V raziskavi Bingen-Bidois-ove in sodelavcev iz leta 2002, so ugotovili, da 68-odstotkov ExPEC sevov, ki povzročata meningitis pri novorojenčkih, sodi v filogenetsko skupino B2, 22-odstotkov v filogenetsko skupino D, 6-odstotkov v A in le 4-odstotki v B1.

Rezultati naše raziskave so za seve, ki pripadajo filogenetski podskupini B₂₃, v skladu z zgoraj omenjenimi. Pri sevih iz preostalih filogenetskih (pod)skupin se rezultati

razlikujejo, še posebej to velja za seve iz filogenetskih skupin A in B1, pri katerih je situacija ravno obratna.

Uvrstitev sevov v sekvenčne skupine. Zaradi obvladljivega števila sevov, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, smo jih s pomočjo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST) uvrstili v sekvenčne skupine (ST). Zanimala nas je predvsem močno virulentna in vedno bolj razširjena sekvenčna skupina ST131, v katero smo uvrstili sedem sevov od 15-ih iz naše raziskave. Leta 2008 so prisotnost sevov iz ST131 potrdili v Kanadi, Indiji, Kuvajtu, Franciji, Švici, na Portugalskem in v Španiji (Coque in sod., 2008), iz naše raziskave pa je razvidno, da so bili sevi iz te skupine tedaj že prisotni tudi v Sloveniji. O ST131 so poročali tudi že iz Velike Britanije, Italije, Turčije, Hrvaške, Japonske, Združenih držav in Norveške (Peirano in sod., 2010). Preostali sevi iz naše raziskave se po profilu MLST med seboj razlikujejo.

Sekvenčna skupina ST131 in ugotavljanje prisotnosti genov za virulentne dejavnike.

V raziskavi nas je zanimala tudi povezava med sekvenčno skupino ST131 in prisotnostjo genskih zapisov za virulentne dejavnike. Za seve iz ST131 je poleg enakega profila MLST, značilna tudi filogenetska skupina B2 in serotip O25:H4, prisotnost beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja iz skupine CTX-M in odpornost proti ciprofloksacinu (Leflon-Guibout in sod., 2008). V omenjeni raziskavi so ugotovili tudi, da imajo vsi izolati ST131 genske zapise *fimH* (fimbrije tipa I), *sat* (avtotransportni toksin), *fyuA* (receptor za jersiniabaktin), *usp* (uropatogeni specifični proteini) in *malX* (marker za otoke patogenosti). Isti geni, razen zadnjega, ki ga nismo analizirali, so bili prisotni tudi pri vseh sevih iz naše raziskave, ki pripadajo ST131.

V kasnejših raziskavah so ugotovili, da lahko sevi iz sekvenčne skupine ST131 pripadajo tudi filogenetski skupini D (Cagnacci in sod., 2008). To smo potrdili tudi v naši raziskavi, saj se v filogenetsko skupino D uvršča en sev iz ST131 (14 %), v filogenetsko podskupino B₂ pa šest sevov (86 %). Med sevi *E. coli*, ki tvorijo CTX-M-15, obstaja visoka stopnja homogenosti, med sevi, ki tvorijo CTX-M-14 in druge ESBL, pa visoka stopnja heterogenosti (Blanco in sod., 2009). Izmed vseh sevov iz ST131 v naši raziskavi, tistega, ki ima CTX-M-14, uvrščamo v filogenetsko skupino D. Ima drugačen virulentni profil od

preostalih sevov iz ST131 (nima genov *iss* in *traT*) in ima od vseh sevov iz ST131 najmanj zapisov za virulentne dejavnike.

Prav tako so v več kot 90-odstotkih izolatov iz sekvenčne skupine ST131 potrdili prisotnost genov *iha* (adhezin-sideroforni receptor: 91 %), *kpsMTII* (kapsula: 94 %), *iutA* (receptor za aerobaktin: 97 %) in *ompT* (proteaza T zunanje membrane: 97 %). Gene *iha*, *kpsMTII* in *iutA* smo zasledili tudi pri vseh izolatih iz naše raziskave, ki pripadajo sekvenčni skupini ST131. Gena *ompT* nismo odkrili pri nobenem izolatu, kar je najverjetneje posledica uporabljenih začetnih oligonukleotidov, ki so bili pripravljene za seve *E. coli*, patogene za ptice (sevi APEC). Gen *traT* (odpornost proti serumu), ki je bil v omenjeni raziskavi prisoten v 75-odstotkih sevov, je v naši raziskavi prisoten pri 71-odstotkih sevov iz ST131. V manj kot 12 % sta se v raziskavi Leflon-Guibout-a pojavljala *iss* (odpornost proti serumu: 8 %) in *iroN* (sideroforni receptor: 11 %), ki sta bila v naši raziskavi prisotna v 71- oziroma 0-odstotkih. Poleg zgoraj omenjenih genov so bili pri vseh sevih iz naše raziskave, ki pripadajo sekvenčni skupini ST131, prisotni geni *crl* (adhezin), *fluA* (avtotransportni toksin), *ompA* (virulentni dejavnik, ki omogoča prehod krvno-možganske pregrade) ter *aer*, *iut* in *irp* (sistemi za privzem železa).

V raziskavi smo ugotovili, da se skupaj pojavljajo zapisi *traT* in *iss*, *usp* in *sat* ter *papGIII*, *ompT* in *iroN*.

Ugotavljanje prisotnosti gena, značilnega za serološko skupino O25. Pri vseh sevih iz naše raziskave, ki pripadajo ST131, smo potrdili prisotnost gena, značilnega za serološko skupino O25 (7 [100 %]), kar je v skladu z že omenjeno raziskavo Leflon-Guibotove in sodelavcev iz leta 2008. Serološka skupina O25 je značilna tudi za seve iz filogenetske podskupine B₂₃ (7 [100 %]). V O25 se uvršča izolat iz filogenetske skupine B1 (1 [33 %]) in izolat iz filogenetske podskupine D₂ (1 [33 %]), ki pripada skupini ST131.

Ugotavljanje prisotnosti genov za odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom. V 90-ih letih prejšnjega stoletja so prevladovali beta-laktamaze tipa TEM in SHV. Od leta 2003 se v največjem številu pojavljajo sevi, ki tvorijo CTX-M, predvsem varianta CTX-M-15, ki sodi v skupino CTX-M-1 beta-laktamaz (Peirano in sod., 2010). V nekoliko manjši meri se pojavlja varianta CTX-M-14, ki sodi v skupino CTX-M-9. (Blanco in sod., 2009).

Pri vseh 15-ih sevih smo potrdili prisotnost vsaj ene beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja, nekateri sevi pa so imeli celo tri. Najpogosteje se pojavljata zapisa *bla*_{CTX-1} (12 [80 %]) in *bla*_{OXA} (9 [60 %]). Gena sta tudi statistično povezana, saj vsi sevi z genom *bla*_{OXA} imajo tudi gen *bla*_{CTX-1}. Vsi sevi imajo zapis za vsaj eno beta-laktamazo CTX-M, eden izmed sevov (1 [7 %]) pa celo dva, za CTX-M-1 in CTX-M-9. Osem sevov (8 [53 %]) ima gen *bla*_{TEM} in le en sev gen *bla*_{SHV}.

Ugotavljanje prisotnosti genov za odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom pri ST131. Najpogostejši varianti beta-laktamaz, ki se pojavljata pri sevih iz ST131, sta CTX-M-14 in CTX-M-15 (Blanco in sod., 2009), v raziskavi iz leta 2008 pa so ugotovili, da so lahko celo brez encimov CTX-M (Leflon-Guibout in sod., 2008). Študija, v katero so zajeli 332 črevesnih izolatov *E. coli* zdravih ljudi iz območja Pariza, je potrdila prisotnost *E. coli* iz ST131 brez gena *bla*_{CTX-M-15} v 7 % zdravih oseb (Leflon-Guibout in sod., 2008). Najpogostejša skupina beta-laktamaz pri sevih iz ST131 v naši raziskavi je CTX-M-1 (kamor uvrščamo varianto CTX-M-15) (6 [86 %]), en sev pa ima beta-laktamazo CTX-M-9 (kamor uvrščamo varianto CTX-M-14) (1 [14 %]).

Ugotavljanje prisotnosti genov za odpornost proti kinolonom. Noben sev iz naše raziskave nima genov *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* in *qnrS* oziroma gena *qepA* za odpornost proti kinolonom. Odsotnost plazmidno kodiranih determinant odpornosti proti kinolonom pri sevih z geni *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{TEM} ali *bla*_{SHV} so opazili tudi v drugih raziskavah (Peirano in sod., 2010). Devet sevov (9 [60 %]) iz naše raziskave ima gen *aac* (6')-*Ib*-cr. Prisotnost gena *aac* (6')-*Ib*-cr v celoti sovpada s prisotnostjo gena *bla*_{OXA}. Imajo ju vsi sevi iz filogenetske podskupine A₁ (2 [100 %]) in podskupine B₂₃ (7 [100 %]). AAC(6')-*Ib*-cr naj bi bil glede na rezultate nekaterih raziskav (Strahilevitz in sod., 2009) povezan z beta-laktamazami razširjenega spektra kot je CTX-M-15, saj se genska zapisa nahajata na istem plazmidu IncFII. To smo potrdili tudi v naši raziskavi, saj vseh devet sevov (9 [100 %]) z zapisom *aac*(6')-*Ib*-cr, ima tudi zapis *bla*_{CTX-M-15}, med tem ko trije sevi (3 [25 %]) imajo le slednjega. Raziskave so potrdile prisotnost plazmida tudi pri sevih iz sekvenčne skupine ST131 (Coque in sod., 2008).

Sevi O25:H4-ST131 predstavljajo velik zdravstveni problem, saj povzročajo zunajčrevesne okužbe in so odporni proti številnim protimikrobnim učinkovinam (Nicolas-Chanoine in

sod., 2007). Vsi sevi iz sekvenčne skupine ST131 in filogenetske podskupine B₂₃, imajo oba zapisa, *bla*_{CTX-M-15} in *aac(6')-Ib-cr*, sev iz sekvenčne skupine ST131, ki pripada filogenetski skupini D pa nima nobenega od navedenih zapisov. Raziskava Peiranove in sodelavcev iz leta 2010 kaže, da ima 91-odstotkov sevov, ki pripada sekvenčni skupini ST131 gen *bla*_{CTX-M-15}, 69-odstotkov pa jih ima gen *aac(6')-Ib-cr*. V naši raziskavi je *bla*_{CTX-M-15} oziroma *aac(6')-Ib-cr* vsebovalo 86-odstotkov sevov iz ST131.

Nastanek transkonjugant. Do nastanka transkonjugant je prišlo le pri 20-odstotkov sevov, pri enem sevu iz filogenetske skupine B1 in dveh sevih iz filogenetske podskupine B₂₃. Pri sevih iz sekvenčne skupine ST131 do konjugacij ni prišlo.

Statistična analiza povezanosti genov s filogenetskimi (pod)skupinami, sekvenčno skupino ST131 in serološko skupino O25. S pomočjo Fisherjevega natančnega testa smo preverili statistično značilno povezanost posameznih genov (vrednost P) s filogenetskimi (pod)skupinami, serološko skupino O25 in sekvenčno skupino ST131. Statistično značilno povezavo (P = 0,0013) smo zasledili med geni *usp*, *sat* in *kpsMTII* ter filogenetsko skupino B₂₃, serološko skupino O25 in sekvenčno skupino ST131. Z omenjenimi skupinami sta statistično značilno povezana tudi zapisa *iha* (P = 0,0069 za filogenetsko podskupino B₂₃ in sekvenčno skupino ST131; P = 0,0109 za serološko skupino O25) in *fluA* (P = 0,0405 za filogenetsko podskupino B₂₃ in serološko skupino O25). Zapis *fluA* je edini izmed analiziranih zapisov, ki je statistično bolj povezan s sekvenčno skupino ST131 (P = 0,0013). V raziskavi Sannesa in sodelavcev iz leta 2004 so dobili statistično značilno povezavo med geni *papGIII*, *sfaS*, *iha* (P = 0,02), *fimH*, *cnf1*, *iroN*, *fyuA*, *ireA*, *iutA*, *kpsMTII* (P < 0,001), *ibeA*, *ompT* in filogenetsko skupino B2. Genov *usp*, *sat* in *fluA* v omenjeni raziskavi niso analizirali. Statistično značilno povezavo med genom *kpsMTII* in filogenetsko skupino B2 (P < 0,0001) so dobili tudi v raziskavi Ramosa in sod. (2009). Preostalih genov, ki so se v naši raziskavi pokazali kot statistično značilno povezani s filogenetsko skupino B₂₃, v raziskavi niso analizirali. Poleg gena *kpsMTII* so se kot statistično značilni pokazali geni *cnf1*, *hlyA*, *ompT*, *papGII* in *traT*. V raziskavi Restierijeve in sod. (2006) so potrdili statistično značilno povezanost med genom *fluA* in filogenetsko skupino B2 (P < 0,0001), zanimivo pa je, da so statistično značilno povezavo dobili tudi med omenjenim genom in filogenetsko skupino A.

Tako kot v naši raziskavi so tudi Coelho in sod. (2011) ugotovili statistično značilno povezavo med geni *usp*, *sat* in *kpsMTII* ($P < 0,001$) ter sekvenčno skupino ST131. Poleg omenjenih genov so se kot statistično značilni pokazali tudi geni *papGII*, *papGIII*, *cnf1*, *traT* in *ibeA*. Genov *iha* in *fluA* v raziskavi niso testirali. Statistično značilno povezavo med geni *iha*, *sat*, *usp*, za serološko skupino O25 značilnim genom in sekvenčno skupino ST131 so zasledili tudi v raziskavi Johnsona in sod. (2010) ($P < 0,001$), zanimivo pa je, da niso potrdili statistično značilne povezave med genom *kpsMTII* in omenjeno sekvenčno skupino.

Statistično povezanost smo zasledili tudi med za serološko skupino O25 značilnim genom ter filogenetsko skupino B₂₃ in sekvenčno skupino ST131, podobno kot Martinez-Medina in sod. (2009) v svoji raziskavi ($P = 0,0348$). Vsi sevi iz serološke skupine O25 v omenjeni raziskavi so se uvrščali v sekvenčno skupino ST131.

Statistično značilno povezavo smo zasledili med skupino genov *irp-fyuA* in filogenetsko skupino A₁ ter geni *papGIII*, *iha*, *ompT*, *ompA*, *aer-iut*, *irp-fyuA*, *iroN*, *iss* in filogenetsko skupino B1. Raziskava Bingen-Bidois-ove in sodelavcev iz leta 2002 ni potrdila statistično značilne povezave med skupino genov *irp-fyuA* in filogenetsko skupino A ($P = 0,5927$). V omenjeni raziskavi so v filogenetsko skupino B1 uvrstili le en sev, pri katerem niso zasledili statistično značilnih povezav.

S serološko skupino O25 so statistično značilno povezani geni *iha*, *usp*, *sat*, *fluA*, *kpsMTII*, *aer-iut* in *irp-fyu*.

Statistično značilno povezavo smo zasledili med prisotnostjo zapisa *bla_{OXA}* za odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom in filogenetskimi (pod)skupinami B1, B₂₃ in D₂. Enake vrednosti P smo pri omenjenih skupinah zasledili tudi za gen *aac(6')-Ib-cr* za odpornost proti kinolonom. V naši raziskavi nismo zasledili statistično značilnih povezav med geni za odpornost proti antibiotikom in sekvenčno skupino ST131, so pa v raziskavi Peiranove in sod. (2010) zasledili povezavo gena *aac(6')-Ib-cr* z omenjeno sekvenčno skupino ($P = 0,0001$).

5.1 SKLEPI

- Na podlagi prisotnosti oziroma odsotnosti genov *chuA* in *yjaA* ter fragmenta DNA TSPE4.C2 smo največ izolatov bakterije *E. coli* uvrstili v filogenetsko podskupino B₂₃ (7 [47 %]), ki je tudi sicer povezana s patogenimi sevi *E. coli*. Po tri seve smo uvrstili v filogenetski skupini B1 in D. Najmanj je bilo sevov iz filogenetske skupine A (2 [13 %]).
- S pomočjo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST) smo vsem sevom določili sekvenčno skupino. Sedem sevov od 15-ih smo uvrstili v klonalno sekvenčno skupino ST131, ki je povezana s hudimi zunajčrevesnimi okužbami. Od sedmih sevov jih je šest iz filogenetske podskupine B₂₃, eden pa iz filogenetske skupine D. Omenjeni filogenetski (pod)skupini sta povezani s patogenimi sevi *E. coli* s številnimi zapisi za virulentne dejavnike.
- Vsi sevi iz naše raziskave, ki pripadajo ST131 so iz serološke skupine O25 in imajo gene *fimH* (fimbrije tipa I), *crl* in *iha* (adhezina), *usp* (uropatogeni specifični protein), *fluA* in *sat* (avtotransportrska toksina) *ompA* (virulentni dejavnik, ki omogoča prehod krvno-možganske pregrade) *aer*, *iutA*, *fyuA*, *irp* (sistemi za privzem železa) ter *kpsMTII* (kapsula). Zapisa za *traT* (odpornost proti serumu) in *iss* (odpornost proti serumu) se pri sevih pojavljata skupaj, potrdili smo ju pri 71-odstotkih sevov iz ST131. Zasledili ju nismo pri sevu, ki pripada filogenetski podskupini D₂ in izolatu 73, ki se v enem od sedmih preiskovanih gospodinjskih genov razlikuje od sekvenčne skupine ST131.
- V filogenetski podskupini B₂₃ in sekvenčni skupini ST131 se statistično enako značilno pojavljata gen *iha* in gen, značilen za serološko skupino O25 ($P = 0,0069$) ter geni *usp*, *sat* in *kpsMTII* ($P = 0,0013$). Gen *fluA*, ki kodira avtotransportrski toksin, je edini izmed vseh analiziranih genov, ki je značilen le za ST131. Vrednost P za *fluA* pri sevih iz ST131 je 0,0013, v filogenetski podskupini B₂₃ pa 0,0405.
- Pri vseh 15-ih sevih smo potrdili prisotnost genskega zapisa za vsaj eno beta-laktamazo z razširjenim spektrom delovanja in zapisa za vsaj eno beta-laktamazo CTX-M. Najpogosteje se pojavljata zapisa *bla*_{CTX-M-1} (12 [80 %]) in *bla*_{OXA} (9 [60 %]). Gena sta tudi statistično povezana, saj vsi sevi z genom *bla*_{OXA} imajo tudi gen *bla*_{CTX-1}. Najpogostejši tip beta-laktamaz, ki jih imajo sevi iz sekvenčne skupine ST131, je CTX-M-1 (6 [86 %]).

- Noben sev iz naše raziskave nima genov *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* in *qnrS* oziroma gena *qepA* za odpornost proti kinolonom. Kar 9 sevov (9 [60 %]) iz naše raziskave pa ima gen *aac(6')-Ib-cr*, katerega prisotnost v celoti sovпада s prisotnostjo gena *bla_{OXA}*. Vseh devet sevov z zapisom *aac(6')-Ib-cr*, ima tudi zapis *bla_{CTX-M-1}*. Vsi sevi iz sekvenčne skupine ST131 in filogenetske podskupine B₂₃, imajo zapisa *bla_{CTX-M-1}* in *aac(6')-Ib-cr*, sev iz sekvenčne skupine ST131 in filogenetske skupine D pa nima nobenega od navedenih zapisov.
- Do nastanka transkonjugant je prišlo pri enem sevu iz filogenetske skupine B1 in dveh sevih iz filogenetske podskupine B₂₃. Pri sevih iz sekvenčne skupine ST131 ni prišlo do prenosa plazmida.
- Iz rezultatov lahko sklepamo, da so sevi iz filogenetske podskupine B₂₃ močno patogeni. V primerjavi s sevi iz drugih filogenetskih (pod)skupin imajo več zapisov za virulentne dejavnike in odpornost proti antibiotikom. Tudi sevi iz ST131 imajo številne zapise za virulentne dejavnike in odpornost, a najbolj virulentni sevi iz naše raziskave pripadajo filogenetski podskupini B₂₃ oziroma ne pripadajo ST131, bi lahko njihov virulentni profil povezali z filogenetsko skupino B₂₃.

6 POVZETEK

Komenzalni sevi vrste *Escherichia coli* (*E. coli*) so del črevesne mikrobiote človeka in toplokrvnih živali. V primeru, da zaidejo v sterilno okolje svojega gostitelja, lahko povzročajo zunajčrevesne okužbe. Z zunajčrevesnimi okužbami so povezani tudi sevi *E. coli*, ki pripadajo sekvenčni skupini ST131. Imajo številne zapise za virulentne dejavnike in zapise za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam, zato predstavljajo vedno večji zdravstveni problem.

Seve vrste *E. coli*, izolirane iz različnih kužnin v Bolnišnici Golnik, smo uvrstili v filogenetske skupine in podskupine po Clermontu. V največji meri pripadajo filogenetski podskupini B₂₃ (47 %), sledita filogenetski skupini B1 in D (20 %), najmanj pa je sevov iz filogenetske skupine A (13 %). S pomočjo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST) smo seve uvrstili v sekvenčne skupine (ST). Kar 47-odstotkov sevov pripada ST131. Z verižno reakcijo s polimerazo smo ugotavljali prisotnost zapisov za virulentne dejavnike: adhezine (*fimH*, *papGI*, *GII* in *GII*, *sfa*, *bma*, *aaf*, *gaf*, *crl*, *iha*, *hra*), toksine in invazine (*hly*, *cnf1*, *usp*, *sat*, *vat*, *hbp*, *flu*, *ompT*, *tcp*), virulentne dejavnike, ki omogočajo prehod krvno-možganske pregrade (*asl*, *ibeA*, *ompA*), sisteme, ki omogočajo privzem železa (*aer-iut*, *fyu-irp*, *iroN*, *ireA*) in dejavnike, ki omogočajo izogibanje imunskemu sistemu gostitelja in odpornost proti serumu (*traT*, *iss*, *kpsMTII*) ter prisotnost zapisov za odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom z razširjenim spektrom delovanja (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M}) in plazmidno kodirano odpornost proti kinolonom (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*). Zanimalo nas je tudi, ali za ST131 obstaja značilen nabor virulentnih dejavnikov.

Vsi sevi, ki pripadajo ST131, imajo gene *fimH*, *sat*, *fyuA*, *usp*, *iha*, *kpsMTII* in *iutA*, *crl*, *fluA*, *ompA*, *aer*, *iut* in *irp*. Vsi sevi, ki pripadajo sekvenčni skupini ST131 in vsi sevi iz filogenetske podskupine B₂₃ se uvrščajo v serološko skupino O25. Prisotnost genov *traT* in *iss* smo potrdili pri 71-odstotkih sevov iz ST131.

Vsi sevi iz raziskave imajo vsaj eno beta-laktamazo z razširjenim spektrom delovanja. Najpogosteje in skupaj se pojavljata zapisa *bla*_{CTX-1} (87 %) in *bla*_{OXA} (60 %). Najpogostejši tip beta-laktamaz, ki jih imajo sevi iz ST131, je CTX-M-1 (86 %). Sevi *E. coli*, ki tvorijo CTX-M-15 (kamor uvrščamo CTX-M-1) so bolj homogeni kot sevi, ki tvorijo CTX-M-14

in druge ESBL. Edini izmed sevov iz ST131 v naši raziskavi, ki ima CTX-M-14, pripada filogenetski skupini D in ima drugačen nabor virulentnih dejavnikov (nima *iss* in *traT*).

Nobeden od sevov iz naše raziskave nima plazmidno kodiranih genov *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* in *qnrS* oziroma gena *qepA* za odpornost proti kinolonom, kar 60-odstotkov sevov pa ima gen *aac(6')-Ib-cr*. Pristotnost gena *aac(6')-Ib-cr* v celoti sovpađa s prisotnostjo gena *bla_{OXA}*. Vsi sevi z zapisom *aac(6')-Ib-cr*, imajo tudi zapis *bla_{CTX-M-15}*. Vsi sevi iz ST131, ki sodijo v filogenetsko podskupino B₂₃ imajo zapisa *bla_{CTX-M-15}* in *aac(6')-Ib-cr*. Sev iz ST131, ki sodi v filogenetsko skupino D, nima nobenega od navedenih zapisov.

Do nastanka transkonjugant je prišlo le pri 20-odstotkov sevov, pri enem sevu iz filogenetske skupine B1 in dveh sevih iz filogenetske podskupine B₂₃. Pri sevih iz sekvenčne skupine ST131 do prenosa plazmida ni prišlo.

S pomočjo Fisherjevega natančnega testa smo preverili statistično značilnost povezav posameznih genov s filogenetskimi (pod)skupinami, sekvenčnim tipom ST131 in serološko skupino O25. V filogenetski podskupini B₂₃ in ST131 se statistično značilno in z enako razširjenostjo pojavljajo geni *iha* in za serološko skupino O25 značilen gen ($P = 0,0069$) ter *usp*, *sat* in *kpsMTII* ($P = 0,0013$). Gen *fluA* je edini izmed vseh analiziranih genov, ki je v primerjavi s filogenetsko podskupino B₂₃ ($P = 0,0405$), statistično bolj značilen za ST131 ($P = 0,0013$). Kodira avtotransportni toksin Ag43, ki je odgovoren za agregacijo bakterij znotraj gostitelja in fazno variabilno tvorbo biofilma. Na ta način bakterijam omogoča dolgotrajno preživetje v gostitelju.

Gen *bla_{OXA}* za odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom, in gen *aac(6')-Ib-cr* za odpornost proti kinolonom, se najpogosteje pojavljata v filogenetski podskupini B₂₃ ($P = 0,0069$). Za ST131 ni značilen nobeden od genov za odpornost proti antibiotikom.

Sevi iz filogenetske podskupine B₂₃ imajo v primerjavi s sevi iz drugih filogenetskih (pod)skupin več zapisov za virulentne dejavnike in odpornost proti antibiotikom. Tudi sevi iz ST131 imajo številne zapise za virulentne dejavnike in odpornost, a najbolj virulentni sevi iz naše raziskave pripadajo filogenetski podskupini B₂₃.

7 VIRI

- Abraham J. M., Freitag C. S., Clements J. R., Eisenstein B. I. 1985. An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 82, 17: 5724-5727.
- Acar J. F., Goldstein F. W. 1997. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. Clinical Infectious Diseases, 24, 1: 67-73.
- Amábile-Cuevas, C. F., 2007. Antimicrobial resistance in Bacteria. Norfolk. Horizon Bioscience, 25-53.
- Antão E., Wieler L., Ewers C. 2009. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Gut pathogens, 1, 1: 22.
- Baaden M., Sansom M. S. P. 2004. OmpT: Molecular dynamics simulations of an outer membrane enzyme. Biophysical Journal, 87: 2942-2953.
- Bach S., de Almeida A., Carniel E. 2000. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*. FEMS Microbiological Letters, 183, 2: 289-294.
- 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.
- Baquero F., Nombela C., Cassel G. H., Gutierrez J. A. 2008. Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens. Washington D. C., ASM Press.
- Bergthorsson U., Ochman H. 1998. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. Molecular Biology and Evolution, 15, 1: 6-16.
- Bingen-Bidois M., Clermont O., Bonacorsi S., Terki M., Brahimi N., Loukil C., Barraud D., Bingen E. 2002. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. Infection and Immunity, 70, 6: 3216-3226.
- Blanco M., Alonso M. P., Nicolas-Chanoine M.-H., Dahbi G., Mora A., Blanco J. E., López C., Cortés P., Llagostera M., Leflon-Guibout V., Puentes B., Mamani R., Herrera A., Coira M. A., García-Garrote F., Pita J. M., Blanco J. 2009. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-

- lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63: 1135-1141.
- Boisen N., Struve C., Scheutz F., Krogfelt K. A., Nataro J. P. 2008. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infection and Immunity*, 76, 7: 3281-3292.
- Bonnet R. 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 1: 1-14.
- Bradford P. A. 2001. Extended spectrum β -lactamases in the 21st century: characterisation, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 4: 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 β -lactamase type. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 1: 54-61.
- Bush K., Jacoby G. A., Madeiros A. A. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1211-1233.
- Cagnacci S., Gualco L., Debbia E., Schito G. C., Marchese A. 2008. European Emergence of Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli* Clonal Groups O25:H4-ST 131 and O15:K52:H1 Causing Community-Acquired Uncomplicated Cystitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 8: 2605-2612.
- Canton R., Coque T. M. 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 466-457.
- Cattoir V., Poirel L., Rotimi V., Soussy C. J., Nordmann P. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60: 394-397.^a
- Cattoir V., Weill F.-X., Poirel L., Fabre L., Soussy C.-J., Nordmann P. 2007. Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 4: 751-754.^b
- Cavaco L. M., Hasman H., Xia S. in Aarestrup F. M. 2009. *qnrD*, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar

- Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 23, 2: 603-608.
- Cirl C., Wieser A., Yadav M., Duerr S., Schubert S., Fischer H., Stappert D., Wantia N., Rodriguez N., Wagner H., Svanborg C., Miethke T. 2008. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nature Medicine*, 14, 4: 399-406.
- 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.
- Clermont O., Dhanji H., Upton M., Gibreel T., Fox A., Boyd D., Mulvey M. R., Nordmann P., Ruppé E., Sarthou J. L., Frank T., Vimont S., Arlet G., Branger C., Woodford N., Denamur E. 2009. Rapid detection of the O25B-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 2: 274-277.
- Coelho A., Mora A., Mamani R., López C., González-López J. J., José J., Larrosa M. N., Quintero-Zarate J. N., Dahbi G., Herrera A., Blanco J. E., Blanco M., Alonso M. P., Prats G., Blanco J. 2011. Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 3: 517-526.
- Coque T. M., Novais A., Carattoli A., Poirel L., Pitout J., Peixe L., Baquero F., Cantón R., Nordmann P. 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 2: 195-200.
- Čitar M. 2010. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije.
- Davis. J. M., Rasmussen S. B., O'Brien A. D. 2005. Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. *Infection and Immunity*, 73, 9: 5301-5310.
- Deguchi T., Fukuoka A., Yasuda M. 1997. Alteration in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical

- isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 699-701.
- De Lorenzo V., Bindereif A., Paw B. H., Neilands J. B. 1986. Aerobactin Biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 165, 2: 570-578.
- Der Vartanian M., Jaffeux B., Contrepolis M., Chavarot M., Girardeau J.-P., Bertin Y., Martin C. 1992. Role of aerobactin in systemic spread of an opportunistic strain of *Escherichia coli* from the intestinal tract of gnotobiotic lambs. *Infection and Immunity*, 60, 7: 2800-2807.
- Drlica K. 1999. Mechanism of fluoroquinolone action. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 5: 504-509.
- Edelstein M., Pimkin M., Palagin I., Edelstein I. in Strachounski L. 2003. Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 12: 3724-3732.
- Ellington M. J., Woodford N. 2006. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 6: 1026-1029.
- Emödy L., Kerenyi M., Nagy G. 2003. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22: S29-S33.
- Faraldo-Gómez J. D., Sansom M. S. P. 2003. Acquisition of siderophores in gram negative bacteria. *Molecular Cell Biology*, 4: 105-116.
- Farfan M. J., Inman K. G., Nataro J. P. 2008. The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins. *Infection and Immunity*, 76, 10: 4378-4384.
- Furrer J. L. 2006. Enterobactin export in *Escherichia coli* via p43 (ents) and associated components. A Dissertation, Faculty of the Graduate School, University of Missouri-Columbia.
- Garrity G. M., Brenner D. J., Krieger N. R., Staley J. T. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Vol. 2.: The Proteobacteria (part C). New York Springer.

- Germon P., Chen Y.-H., He L., Blanco J. E., Brée A., Schouler C., Huang S.-H., Moulin-Schouleur M. 2005. *ibeA*, a virulence factor od avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 151: 1179-1186.
- Gordon D. M., Clermont O., Tolley H., Denamur E. 2008. Assigning *Escherichia coli* strains to filogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex metod. *Environmental Microbiology*, 10, 10: 2484-2496.
- Hancock V., Ferrières L., Klemm P. 2008. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology*, 154, 1: 167-175.
- Heimer S. R., Rasko D. A., Lockatell C. V., Johnson D. E., Mobley H. L. T. 2004. Autotransporter gene *pic* and *tsh* are asociated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 72, 1: 593-597.
- Hoffman J. A., Badger J. L. Zhang Y., Huang S.-H., Kim K. S. 2000. *Escherichia coli* K1 *aslA* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo. *Infection and Immunity*, 68, 9: 5062-5067.
- Hooper D. C. 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 31: 24-28.
- Istinič I. 2007. Plazmidne determinante rezistence proti fluorokinolonom in betalaktamskim antibiotikom z razširjenim spektrom delovanja pri izbranih sevih bakterije *Escherichia coli*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.
- Jacoby G. A. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 41, 2: 120-126.
- Jacoby G., Cattoir V., Hooper D., Martinez-Martinez L., Nordmann P., Pascual A., Poirel L., Wang M. 2008. *qnr* Gene Nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 7: 2297-2299.
- Jacoby G. A., Chow N., Waites K. B. 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 559-562.
- Jacoby A. G., Walsh E. K., Mills M. D., Walker J. V., Oh H., Robicsek A., Hooper C. D. 2006. *qnrB*, Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 4: 1178-1182.

- Jacoby G. A., Gacharna N., Black T. A., Miller G. H., Hooper D. C. 2009. Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 4: 1665-1666.
- Jauregui F., Landraud L., Passet V., Diancourt L., Frapy E., Guigon G., Carbonnelle E., Lortholary O., Clermont O., Denamur E., Picard B., Nassif X., Brisse S. 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, 9: 560.
- Johnson J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4, 1: 80-128.
- Johnson J. R., Brown J. J., Carlino U. B., Russo T. A. 1998. Colonization with and acquisition of uropathogenic *Escherichia coli* as revealed by polymerase chain reaction-based detection. *The Journal of Infectious Diseases*, 177, 4: 1120-1124.
- Johnson J. R., Jelacic S., Schoening L. M., Clabots C., Shaikh N., Mobley H. L. T., Tarr P. I. 2005. The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 73, 2: 965-971.
- Johnson J. R., Johnston B., Clabots C., Kuskowski M. A., Castanheira M. *Escherichia coli* Sequence Type ST131 as the Major Cause of Serious Multidrug-Resistant *E. coli* Infections in the United States. 2010. *Clinical Infectious Diseases*, 51, 3: 286-294.
- 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., 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 *iroNE. coli*, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infection and Immunity*, 68, 5: 3040-3047.
- Johnson J. R., Stell A. L. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181: 261-272.
- Keber R. 2007. Rezistenca proti kinolonom, integroni in klebicini uropatogenih ESBL sevov bakterij iz rodu *Klebsiella*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.

- Klemm P., Orskov I., Orskov F. 1982. F7 and type I-like fimbriae from three *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections: protein chemical and immunological aspects. *Infection and Immunity*, 36, 2: 462-468.
- Ko J., Kim I., Yoo S., Min B., Kim K., Park C., 2005. Conversion of methylglyoxal to acetol by *Escherichia coli* aldo-keto reductases. *The Journal of Bacteriology*, 187: 5782-5789.
- Kostakioti M. in Stathopoulos C. 2004. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity*, 72, 10: 5548-5554.
- Lafont J.-P., Dho M., D'Hauteville M. H., Bree A., Sansonetti J. P. 1987. Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 55, 1: 193-197.
- Le Bouguenec C. 2005. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295: 471-478.
- Le Bouguenec C., Archambaud M., Labigne A. 1992. Rapid and Specific Detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* Adhesin-Encoding Operons in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 5: 1189-1193.
- Leflon-Guibout V., Blanco J., Amaqdouf K., Mora A., Guize L., Nicolas-Chanoine M.-H. 2008. Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, ampng fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area od Paris, France. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 12:3900-3905.
- 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.
- Ling Ma, Feng-Yee Chang, Chang-Phone Fung, Te-Li Chen, Jung-Chung Lin, Po-Liang Lu, Li-Yueh Huang, Jen-Chang Chang, L.K. Siu. 2005. Variety of TEM-, SHV-, and CTX-M-Type β -Lactamases Present in Recent Clinical Isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* from Taiwan. *Microbial Drug Resistance*, 11, 1: 31-39.

- Livermore D. M. 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8: 557-584.
- Livermore D. M. 1998. β -lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41: 25-41.
- Livermore D. M., Williams J. D. 1996. β -lactams: Mode of action and mechanisms of bacterial resistance. V: *Antibiotics in laboratory medicine*. 4th edition. Lorain V. (ed.). Baltimore, Williams & Wilkins: 502-578.
- Madigan M. T., Martinko J. M. 2003. *Brock biology of microorganisms*. 11th edition. Upper Saddle River, Pearson Prentice Hall.
- 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.
- Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby G. A. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 14, 351: 797-799.
- Martinez-Medina M., Mora A., Blanco M., López C., Alonso M. P., Bonacorsi S., Nicolas-Chanoine M.-H., Darfeuille-Michaud A., Garcia-Gil J., Blanco J. 2009. Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 12: 3968-3979.
- Maurer J. J., Brown T. P., Steffens W. L., Thayer S. G. 1998. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin *tsh* among avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 42, 1: 106-118.
- 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.
- Moulin-Schouleur M., Répérant M., Laurent S., Brée A., Mignon-Grasteau S., Germon P., Rasschaert D., Schouler C. 2007. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 10: 3366-3376.
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M. A. 1999. *Medical Microbiology*. 4th ed. Missouri, Mosby, Inc.

- Nakano M., Yamamoto S., Terai A., Ogawa O., Makino S., Hayashi H., Nair G. B., Kurazono H. 2001. Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS Microbiology Letters*, 205: 71-76.
- Nicolas-Chanoine M.-H., Blanco J., Leflon-Guibout V., Demarty R., Alonso M. P., Caniça M. M., Park Y.-J., Lavigne J.-P., Pitout J., Johnson J. R. 2008. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61: 273-281.
- Palandačić A. 2007. Virulenčni dejavniki uropatogenih sevov bakterije *Escherichia coli* zbranih v enotah zdravstvenega doma Ljubljana. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.
- 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.
- Parret A. H. A., De Mot R. 2002. *Escherichia coli*'s uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity? *Microbiology*, 148:1604-1606.
- Paterson D. L., Bonomo R. A., 2005. Extended-Spectrum β -Lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 4: 657-686.
- Peirano G., Richardson D., Nigrin J., McGeer A., Loo V., Teye B., Alfa M., Pienaar C., Kibsey P., Pitout J. D. D. 2010. High prevalence of ST131 Isolates Producing CTX-M-15 and CTX-M-14 among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 3: 1327-1330.
- Perez F., Endimiani. A., Hujer K. M., Bonomo R. A. 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Current Opinion in Pharmacology*, 7, 5: 459-469.
- 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.
- Poirel L., Cattoir V., Nordmann P. 2008. Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? *Clinical Microbiology and Infection*, 14: 295-297.
- Ramos N. L., Saayman M. L., Chapman T. A., Tucker J. R., Smith H. V., Faoagali J., Chin J. C., Brauner A., Katouli M. 2010. Genetic relatedness and virulence gene

- profiles of *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and uroseptic patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29: 15-23.
- 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., Jacoby A. G., Hooper D. C. 2006. The worldwide emergence of plasmid mediated quinolone resistance. *Lancet Infectious Diseases*, 6, 10: 629-640.
- Ruiz J., Navia M. M., Vila J., and Gascón J. 2002. Prevalence of *sat* gene among clinical isolates of *Shigella* spp. causing traveler's diarrhea: geographical and specific differences. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4: 1565-1566.
- Russo T. A., Carlino U. B., 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.
- Russell W., Herwald H. 2005. Concepts in Bacterial Virulence. *Contrib Microbiol. Basel*, Karger, vol 12, str. 67-89.
- 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.
- Sannes M. R., Kuskowski M. A., Owens K., Gajewski A., Johnson J. R. 2004. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *The journal of Infectious Diseases*, 190: 2121-2128.
- Schembri M. A., Dalsgaard D., Klemm P. 2004. Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *Journal of Bacteriology*, 186, 5: 1249-1257.
- Schembri M. A., Klemm P. 2001. Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction. *The EMBO Journal*, 20: 3074-3081.
- 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.

- Schubert S., Rakin A., Karch H., Carniel E., Heesemann J. 1998. Prevalence of the »high-pathogenicity island« of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infection and Immunity*, 66, 2: 480-485.
- Selvaraj S. K., Periandythevar P., Prasadarao N. V. 2007. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* K1 selectively enhances the expression of intercellular adhesion molecule-1 in brain microvascular endothelial cells. *Microbes and Infection*, 9, 5: 547-557.
- 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.
- Shin S., Lu G., Cai M., Kim K. S. 2005. *Escherichia coli* outer membrane protein A adheres to human brain microvascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330, 4: 1199-1204.
- Siu L. K., Lo J. Y. C., Yuen K. Y., Chau P. Y., Ng M. H. in Ho P. L. 2000. β -Lactamases in *Shigella flexneri* Isolates from Hong Kong and Shanghai and a Novel OXA-1-Like β -Lactamase, OXA-30. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 8: 2034-2038.
- 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.
- Starčič Erjavec M., Jesenko B., Petkovšek Ž., Žgur-Bertok D. 2010. Prevalence and associations of tcpC, a gene encoding a toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein, among *Escherichia coli* urinary tract infection, skin and soft tissue infection and commensal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 3: 966-968.
- Strahilevitz J., Jacoby A. G., Hooper C. D., Robicsek A., (2009). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat.

- Tanskanen J., Saarela S., Tankka S., Kalkkinen N., Rhen M., Korhonen T. K., Westerlund-Wikström B. 2001. The *gaf* fimbrial gene cluster of *Escherichia coli* expresses a full-size and a truncated soluble adhesin protein. *Journal of Bacteriology*, 183, 2: 512-519.
- Tartof S. Y., Solberg O. D., Manges A. R., Riley L. W. 2005. Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 12: 5860-5864.
- Teng C.-H., Xie Y., Shin S., Di Cello F., Paul-Satyaseela M., Cai M., Kim K. S. 2006. Effect 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.
- Ulett G. C., Valle J., Beloin C., Sherlock O., Ghigo J.-M., Schembri M. A. 2007. Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infection and Immunity*, 75, 7: 3233-3244.
- Urwin R., Maiden M. C. J. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology*, 11, 10: 479-487.
- Usein C. R., Damian M., Tatu-Chitoiu D., Capusa C., Fagaras R., Tudorache D., Nica M., Le Bouguéne C. 2001. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 5, 3: 303-310.
- Van der Woude M. W., Henderson I. R. 2008. Regulation and function of Ag43 (flu). *Annual Review of Microbiology*, 62: 153-169.
- Vila J., Ruiz J., Navia M. M. 1999. Molecular bases of quinolone resistance acquisition in gram-negative bacteria. *Recent Research Developments in Antimicrobials and Chemotherapy*, 3: 323-344.
- Vila J., Vargas M., Henderson I. R., Gascoín J., Nataro J. P. 2000. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in traveler's diarrhea. *Journal of Infectious Diseases*. 182: 1780-1783.
- Willmott C.J.R., Maxwell A. 1993. A single point mutation in the DNA gyrase. A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37: 126-127.

- Wang H., Dzik-Fox J.L., Chen M., Levy S.B. 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 1515-1521.
- Wang M., Guo Q., Xu X., Wang X. 2009. New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, *qnrC*, Found in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 5: 1892-1897.
- Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa P., Wieler L. H., Karch H., Reeves P. R., Maiden M. C., Ochman H., Achtman M., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60, 5: 1136-1151.
- Whitfield C., Roberts I.S. 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 31, 5: 1307-1319.
- Woodford N. 2010. Rapid characterization of beta-lactamases by multiplex PCR. *Methods in Molecular Biology*, 642, 4: 181-192.
- Woodford N., Fagan E. J., Ellington M. J. 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 154-155.
- Yague G., Morris J. E., Pan X. S., Gould K. A., Fisher L. M. 2002. Cleavable complex formation by wild-type and quinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* type II topoisomerases mediated by gemifloxacin and other fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 413-419.
- Yamamoto S., Terai A., Youri K., Kurazono H., Takeda Y., Yoshida O. 1995. Detection of virulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 12: 85-90.
- Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Kimura K., Shibata N., Kato H., Shibayama K., Konda T., Arakawa Y. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 9: 3354-3360.
- Zhu M., Valdebenito M., Winkelmann G. in Hantke K. 2005. Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiology*, 151: 2363-2372.

SPLETNI VIRI

http://www.bfro-uni-lj.si/gost/smd/mikroslo/vsebina/h/hbc_her.htm

<http://www.epibio.com>

<http://www.langsrud.com/fisher.htm>

<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Escherichia>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&term=3990893>

<http://www.nlm.nih.gov/mesh/2007/MBrowser.html>

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin za usmerjanje pri delu ter za veliko mero potrpežljivosti in prilagodljivosti.

Zahvaljujem se tudi recenzentki prof. dr. Marjanci Starčič Erjavec, ki mi je natančno pregledala diplomsko delo.

Hvala vsem zaposlenim na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, ki so mi pomagali pri laboratorijskem delu, še posebej dr. Zdravku Podlesku in Gregorju Bajcu.

Najlepša hvala Idi Istinič, ki me je vpeljala v laboratorijsko delo in Sari Trontelj, ki mi je tekom nastajanja diplome velikokrat priskočila na pomoč. Hvala tudi vsem drugim, ki so mi kakor koli pomagali pri nastajanju diplomskega dela, pa sem jih nehote pozabila omeniti.

Iskreno se zahvaljujem svojim staršem, ki so mi tekom študija nudili finančno in moralno podporo ter fantu Davidu. Hvala tudi vsem sošolcem in prijateljem, ki so mi polepšali študentske dni.

PRILOGE

PRILOGA A: Sevi *E. coli*, ki tvorijo ESBL, izolirani iz različnih kužnin v Bolnišnici Golnik.

OZNAKA	LETO OSAMITVE	CTX
M1	2008	10
M2	2008	0
M3	2008	0
M4	2008	0
M5	2008	15
M8	2008	16
M10	2008	0
M11	2008	0
65	2008	0
67	2008	15
68	2008	10
69	2008	0
72	2008	8
73	2009	12
75	2009	8

Poleg oznak, ki smo jih uporabili v diplomskem delu, sta navedena tudi leto osamitve in skupina CTX.

PRILOGA B: Nukleotidna zaporedja PCR-pomnožkov gospodinjskih genov, s pomočjo katerih smo določili sekvenčne skupine posameznih sevov *E. coli* S črko N so označeni nukleotidi, katerih se ni dalo določiti.

- **adk (adenilat kinaza)**

M1 adk

NNNNTNNTCAGTTCATCATGGAGAAATATGGTATTCCGCAAATCTCCACTGGCGATATGCTGC
GTGCTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAGACATTATGGATGCTGGCA
AACTGGTTACCGACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACTGCC
GTAATGGTTTCTGTTGGACGGCTTCCCGCGTACCATTCCGCAGGCAGACGCGATGAAAGAAGC
GGGCATCAATGTTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATCGTTGACCGTATT
GTCGGTCGCCGCGTTCACGCGCCGCTGGTCTGTTTATCACGTTAAATTCAACCCGCCGAAAG
TAGAAGGCAAAGACGACGTTACCGGTGAAGAAGTACTACCCGTAAGACGATCAGGAAGAA
ACCGTACGTAACGTTGTTGAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACTCCA
AGAAGCGGAAGCGGGTAACACCAAATACGCGAGTGTGACGGGATTGTCGCCCGCTGCCGA
ATGGCGCTCGCTTCTCTCTCACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACCTTTTGCCGCTGCGCGCTT
GGTTAGCGCCAGCGCATGAACCAGTGAGGTGGGCATTCTCTCCGACGAAATGCGAAAATGCAC
CACCGAGCATTGACTTTGTGCGCCCCCAGATTTCATCTGCTGGGACATCACTCGCCCCATCGAT
CTCTCCCCTCCGCACCGAAAAAATTCCTCGAAACTCACTCACAGTTGGGCTTTATTTAGTGTAG
CGTCC

M2 adk

NANGNNNNNTTCATCATGGAGAAATATGGTATTCCGCAAATCTCCACTGGCGATATGCTGCGTG
CTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAGACATTATGGATGCTGGCAAAC
TGGTCACCGACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACTGCCATA
ATGGTTTCTGTTGGACGGCTTCCCGCGTACCATTCCGCAGGCAGACGCGATGAAAGAAGCGGG
CATCAATGTTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATCGTTGACCGTATCGTC
GGTCGCCGCGTTCACGCTCCGCTGGTCTGTTTATCACGTTAAATTCAATCCGCCGAAAGTAG
AAGGCAAAGACGACGTTACCGGTGAAGAAGTACTACCCGTAAGATGATCAGGAAGAGACCG
TACGTAACGTTCTGGTTGAATACCATCAGATGACAGCACCGCTGATCGGCTACTACTCCAAAGA
AGCGGAAGCGGGTAATACCAAATACGCGAAGTTGACGGGCGACGGCTGCCAAATGGAGCTCGC

TTTCTCTTCAGACAACAAAACCTATTTCTTAATTATCTTTGGCCGCTGCTTGGTTGGCTAGCGCCC
ACGAACGAATGAGGGGAGGTGTTTCTCTCCATCGAAAAGCGGACCTGCTCCACGGAGCG
CTGACTTTGCGCGCCCACTCCGTATCGGCCTGGACCTCCATCGCGCCATCGACTGTCGCGCGGA
AAAAAACAAAGATNNNAGCGTGTAGACTGCACGATGTACCTGTATGCTAGTGAGCGACCAAT
TACCGGCTGAAAGGTTTCGCCAAAATAAGCCCGGCGACTCATCTCTGGAACATAGCGATACG
CATTGAGACTTAATGTTAGATTCACTAACTT

M3 adk

NNNNNNNTNGCTAGTTCATCATGGAGAATATGGTATTCCGCAAATCTCCACTGGCGATATGCT
GCGTGCTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAGACATTATGGATGCTGG
CAAACCTGGTCACCGACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACTG
CCGCAACGGTTTCTGTTGGACGGCTTCCCCTGACCATCCGACAGGCAGACGCAATGAAAGAA
GCGGGCATCAATGTTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATTGTTGACCGTA
TCGTAGGCCCGCCGCTTACGCGCCGCTGGTTCGTGTTTATCACGTTAAATTCAATCCGCCGAA
AGTAGAAGGCAAAGACGACGTTACCGGTGAAGAGCTGACTACCCGTAAGACGATCAGGAAG
AGACCGTACGTAAACGTCTGGTTGAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACTC
CAAAGAAGCGGAAGCGGGTAAACACCAAATACGCGAAAGTTGACGGGAAGCCTGTGCCCTGCGC
TCACTTTCATTCCACAAACCTAAAGCTCCTTACCTTTGGCCTGCCGCTTGGGTTTGGCCAACG
CCACCATTTCATAGGGGGGCTTTTCCCCCTCCCACCGAAAAAGGGTTCCCGAGCCTCGAAA
GTTGTGTGTTGCAACCTATATGGGGTGGCATCTGCGCGCTCACCAACTCCTTCGCATCTTTGAA
AAAAAAACCACANACCACCGTCTATCTGAAAGAATTTGCTATGCTAGTTCGGAATTGCAAAGC
ATCTCACCTACATTCAGTGCTTGTTCAGACTCCCTAGGCGTCGTCTGTAACCTTGCTGCACACAT
CGCTATTCACTTACTTTTCGCCCGCCTTTTCATCACGCCCTCTGCAGCATGGNC

M4 adk

NNNNCTCATGGAGAAATATGGTATTCCGCAAATCTCCACTGGCGATATGCTGCGTGCTGCGGTC
AAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAGACATTATGGATGCTGGCAAACCTGGTCACC
GACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACTGCCGCAACGGTTTCC
TGTTGGACGGCTTCCCCTGACCATCCGACAGGCAGACGCAATGAAAGAAGCGGGCATCAATG
TTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATTGTTGACCGTATCGTAGGCCCGCG
CGTTCACGCGCCGCTGTTGCTGTTTATCACGTTAAATTCAATCCGCCGAAAGTAGAAGGCAA
GACGACGTTACCGGTGAAGAGCTGACTACCCGTAAGACGATCAGGAAGAGACCGTACGTAAA
CGTCTGGTTGAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACTCAAAGAAGCGGAAG
CGGGTAAACCAAATACGCGAGTTTTGACGGCACGCCCGCGTTCGAAAGGGGCCCTGCTTTTCT
CTCCAAACAAAAGAGCCAAAATCTTCTTAACTTTGGCCGTGCGCCGCTTGGTTGGCCCCAGCC
CTTGAACCAAGGAGGGGGGCATTTCTCCTCCAAAACGCGAAATGGCCCCACCAGCGGTGAGA
GTTGTGCGCCCCACACCTTATATCCGCCGACACCCAATCGCCCTTATACTCGNNTGNGCCGA
AAAAAAACAACGCTTCGACNATTAGACCTTCCGACTGTTCTCCTCTGNTTTCAGCGGTCAA
ATTCTGCTTGATGGATTCCCTCATAACTAAGCACTCCCCGACTCCACTCCCTGAGCGTGATGG
ATACGCAGTGAGTCTTTTTTTTTACTTCNN

M5 adk

NNNNNNNGNTNGCTAGTTCATCATGGAGAAATATGGTATTCCGCAAATCTCCACNGGGCGATA
TGCTGCGTGCTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAGACATTATGGATGC
TGGCAAACCTGGTCACCGACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGA
CTGCCGTAATGGTTTCTGTTGGACGGCTTCCCCTGACCATCCGACAGGCAGACGCGATGAAA
GAAGCGGGCATCAATGTTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATTGTTGATC
GTATCGTAGGCCCGCCGCTTTCATGCGCCGCTGGTTCGTGTTTATCACGTTAAATTCAATCCGCCG
AAAGTAGAAGGCAAAGACGACGTTACCGGTGAAGAACTGACTACCCGTAAGACGATCAGGA
AGAAACCGTGCGTAAACGTCTGGTTGAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTAC
TCCAAAGAAGCGGAAGCGGGTAAACACCAAATACGCNNTTGANNCTNAAAGTATAACCGCTGC
CGGATGCCTCGCGCTTTCTCCTTATTACAACAAACCCTAAGCTTCTCACTTCTGCGGTGTCGC
GCCTTGGTGAGCGCCACGGCACGAATCCATGAGGGGGCCTTTTCTCCCACGAACCGTGCAACT
GCTCCAGCGAGCTCGGAGTTTGTGCGTGCACAGCTTATATGCTGGGATATCCTCGCTCTCATCG
TACTTCGCATGCTGGAAAAATGACCCACATTAACAACCTTCTTCATCATCGCATATCACTTTGCT
ACTTCCGAACTCCTGACCTCTCAAACCTCTCATTGCATTTTTGCAGCCTCTCCATCNTCGTACTG
GAGGGTTGTTGACACAGCCGATCATCTCGACTGTTTCGGCGCCCTTTTCATC

M8 adk

NNNNNTNGCTCAGTTCATCATGGAGAATATGGTATTCCGCAAATCTCCACTAGGGCGATATGCT
GCGTGCTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAAAGACATTATGGATGCTG
GCAAACCTGGTTACCGACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACT
GCCGTAATGGTTTCTGTTGGACGGCTTCCCGCGTACCATTCCGCAGGCAGACGCGATGAAAGA
AGCGGGCATCAATGTTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATCGTTGACCGT
ATTGTCGGTCCCGCGTTCACGCGCCGTCTGGTCGTGTTTATCACGTTAAATTCAACCCGCCGAA
AGTAGAAGGCAAAGACGACGTTACCGGTGAAGAACTGACTACCCGTAAGACGATCAGGAAG
AAACCGTACGTAAACGTCTGGTTGAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACTC
CAAAGAAGCGGAAGCGGGTAACACCAAATACGCGAGTTTTGACGGGTCCCGCCTGCCGAATG
GCGCTCGCTTCTCTTCAGACAACAAGCCTAAATCTTCTTTACTTTTGGCGCTGCGCGTTGGT
TTGCGCCAGCGCATGAATCAGAGAGGTGGGCGTTTTCTCCCTCAAATGCGAAAGTGCTCCCGC
GAGCGCTGAGTTTGTGCGCCCCACGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCCCCATCGATNCTTT
GGACTGGGGAGAAAAAAAAGA

M10 adk

NNNGNNCANTTCATCATGGAGAATATGGTATTCCGCAAATCTCCACTGGCGATATGCTGCGTG
CTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAAAGACATTATGGATGCTGGCAAAC
TGGTACCGACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACTGCCGTA
ATGGTTTCTGTTGGACGGCTTCCCGCGTACCATTCCGCAGGCAGACGCGATGAAAGAAGCGGG
CATCAATGTTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATTGTTGATCGTATCGTCG
GCCGCCGCTTCATGCGCCGTCTGGTCGTGTTTATCACGTTAAATTCAATCCGCCTAAAGTAGA
AGGCAAAGACGACGTTACCGGTGAAGAACTGACTACCCGTAAGACGATCAGGAAGAAACCGT
GCGTAAACGTCTGGTTGAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACTCCAAAGAA
GCGGAAGCAGGTAACACCAAATACGCAAGGGTTTTGAACGGATTAGCCGCCTGCCGAATGGCG
CTCGCTTCTCTTCATACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACATGCCGCTGCGCGCTGGGTA
GCGCCAGCGTATGAATAACAGAGGAGGGCACTTTTTCTCGTCAAACGCGGAAACGGTCCCGCG
AGCGTCGAAGTTGTGGTGTCCACAGCTTATATGGGGGGGATCTCTCGCGCTCACAACTCCTTC
GCGAGNGTAAAAAAGAAACCTCATAACAAAATAAATCAATCAACAATCCACATGGCTACTT
CCGCGCTCGAGAGGTCTTCCACGTA

M11 adk

NNNNNNNNNTNGCTAGTTCATCATGGAGAATATGGTATTCCGCAAATCTCCACTGGCGATATGC
TGCGTGCTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAAAGACATTATGGATGCTG
GCAAACCTGGTACCGACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACT
GCCGCAACGGTTTCTGTTGGACGGCTTCCCGCGTACCATTCCGCAGGCAGACGCAATGAAAGA
AGCGGGCATCAATGTTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATTGTTGACCGT
ATCGTAGGCCGCCGCGTTCACGCGCCGTCTGGTCGTGTTTATCACGTTAAATTCAATCCGCCGA
AAGTAGAAGGCAAAGACGACGTTACCGGTGAAGAGCTGACTACCCGTAAGACGATCAGGAA
GAGACCGTACGTAAACGTCTGGTTGAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACT
CCAAAGAAGCGGAAGCGGGTAACACCAAATACGCGAGAACCCTCGCCGTTCTTTTTTTTTGTC
CGCCGCTGAAGGGCCAGTGCCTTGCTTCTCAGAACAAGGGGTCTAACTTCTTTGTTTACTGGG
GGCGGTGCGCTGGTTGGTTGACTCCACCTCATCCCACCGATGTGCGGAGGTTTGCCGCCGCC
ATGGAGAAGTGCCCCCTCCAGCGGTGTGTGTGTGCCCTGCACGCCATATAGCCTCGGAAACCN
ACCCGCTACATATCTTGAGACTGACCCCCAAAAAAAAGAACGTTTCGGGGTAGGGGGGC
TTCCGACTGTTAC

65 adk

NNNNTNGCTCAGTTCATCATGGAGAATATGGTATTCCGCAAATCTCCACTGGCGATATGCTGC
GTGCTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAAAGACATTATGGATGCTGGCA
AACTGGTACCGACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACTGCC
GTAATGGTTTCTGTTGGACGGCTTCCCGCGTACCATTCCGCAGGCAGACGCGATGAAAGAAGC
GGGCATCAATGTTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATCGTTGACCGTATC
GTCGGTCCCGCGTTCATGCGCCGTCTGGTCGTGTTTATCACGTTAAATTCAATCCGCCGAAAGT
AGAAGGCAAAGACGACGTTACCGGTGAAGAACTGACTACCCGTAAGATGATCAGGAAGAGA
CCGTACGTAAACGTCTGGTTGAATACCATCAGATGACAGCACCGCTGATCGGCTACTACTCAA
AGAAGCAGAAGCGGGTAATACCAAATACGCAAGGTGGACCGGGGTACTTCTTCCCGCCGCTG

CCCGAATGGCACTCCCTTTCTCTTTTCGAAAACAAGCCTAAATCTTCATTAAATTTTGCCGCTGCG
TGCTCGGGTAGCGCCCACGTGTGAATCAATGAGGAGGGCATTCTCCGTCGGAACGCGTAAAT
GCTCCAACGAGCGCTGAGTTTGTGCGCCCCGAGCTTATATGCGATGACATCACTCGCGCACAC
CAACTACTACGCATGAGTGGAAAAAGTT

67 adk

GNGNGNAGNTNGCTCGTTTCTCATGGGAGAATATGGTATTCCGCAAATCTCCACTGGCGATATG
CTGCGTGCTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAGACATTATGGATGCTG
GCAAACCTGGTCACCGACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACT
GCCGCAACGGTTTCTGTTGGACGGCTTCCCGCGTACCATTCCGCAGGCAGACGCAATGAAAGA
AGCGGGCATCAATGTTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATTGTTGACCGT
ATCGTAGGCCGCCGCGTTACGCGCCGCTCTGGTCTGTGTTATCACGTTAAATTCAATCCGCCGA
AAGTAGAAGGCAAAGACGACGTTACCGGTGAAGAGCTGACTACCCGTAAAGACGATCAGGAA
GAGACCGTACGTAAACGTCTGGTTGAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACT
CCAAAGAAGCGGAAGCGGGTAACACCAAATACGCGAGCCCACGTTAATTTCCCTTAGGCCTG
GTTGATACATTTCTTATTCTGTAGGGA
CCATTGTCCGTTGTGTCTTCTTGCGCAGGCCCTTN

68 adk

NGCANNNGCTAGTTCATCATGGAGAAATATGGTATTCCGCAAATCTCCACNGGGCGATATGCT
GCGTGCTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAGACATTATGGATGCTGG
CAAACCTGGTCACCGACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACTG
CCGTAATGGTTTCTGTTGGACGGCTTCCCGCGTACCATTCCGCAGGCAGACGCGATGAAAGAA
GCGGGCATCAATGTTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATTGTTGATCGTA
TCGTAGGCCGCCGCGTTACGCGCCGCTCTGGTCTGTGTTATCACGTTAAATTCAATCCGCCGAAA
GTAGAAGGCAAAGACGACGTTACCGGTGAAGAACTGACTACCCGTAAAGACGATCAGGAAGA
AACCGTGCGTAAACGTCTGGTTGAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACTCC
AAAGAAGCGGAAGCGGGTAACACCAAATACGCGAGGAGCCCTGAAAAATTTCTTTGTGAAGGC
CGCTGTCTAAATTTTGCCCTTACCCGTAAAAATGGAAAATTGAGACTGTGAGCGCTGGAGTAC
GAGCATAGGTGGCCACGAATTCNCGTTGTATCCCGCGAAAACGTTAAGAAAACTACAGAACC
TCCAATGCGAAGGTACGCCCCACTACCCGTCCTGGAAGTACGCGCCCCACACGTTGTTTA
CAAACAGGTATCAAGTACCCGGGAACTCCAAACAGTAAGACAATAAATATCTTACCTCCTTTG
CATAATACAGAAAGCAGTCAAACCTAAACCAACTACACTATTGCCCCGGGGTTATTCCTCCCG
GTAACCCGCAACCCCGGAGAACTGGCCGGGGGTTTCGTTCTAATCCGTAGGAACCACT

69 adk

NNGNNGNNGNTNGCTCAGTTCATCATGGAGAAATATGGTATTCCGCAAATCTCCACTGGCGATATG
CTGCGTGCTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAGACATTATGGATGCTG
GCAAACCTGGTCACCGACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACT
GCCGCAACGGTTTCTGTTGGACGGCTTCCCGCGTACCATTCCGCAGGCAGACGCAATGAAAGA
AGCGGGCATCAATGTTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATTGTTGACCGT
ATCGTAGGCCGCCGCGTTACGCGCCGCTCTGGTCTGTGTTATCACGTTAAATTCAATCCGCCGA
AAGTAGAAGGCAAAGACGACGTTACCGGTGAAGAGCTGACTACCCGTAAAGACGATCAGGAA
GAGACCGTACGTAAACGTCTGGTTGAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACT
CCAAAGAAGCGGAAGCGGGTAACACCAAATACGCGAAAATTTGACGGNAA

72 adk

NNNNTNGNTCTCATGGAGAAATATGGTATTCCGCAAATCTCCACTGGCGATATGCTGCGTGCTGC
GGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAGACATTATGGATGCTCGGCAAACCTCG
GTCACCGACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATCGCTCAGGAAGACTGCCGCAAC
GGTTTCTGTTGGACGGCTTCCCGCGTACCATTCCGCAGGCAGACGCAATGAAAGAAGCGGGCA
TCAATGTTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATTGTTGACCGTATCGTAGG
CCGCCGCGTTACGCGCCGCTCTGGTCTGTGTTATCACGTTAAATTCAATCCGCCGAAAGTAGAA
GGCAAAGACGACGTTACCGGTGAAGAGCTGACTACCCGTAAAGACGATCAGGAAGAGACCGTA
CGTAAACGTCTGGTTGAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACTCCAAAGAAG
CGGAAGCGGGTAACACCAAATACGAAGGTGGTTGACGGACATGCTCAAAGGGAATTGGCTATT
TTAATTTCTCTTAACGGTTACTGTTCTAGTGCCCGAGACCGCTTTGAGGAGCTCGGGTGCTG

GGCTTTCGCTGGTAAGTATTTTCAGCGATCGCAAAATGACAGTTGTGAGATCTCTGCGCGCGCCC
CCACATCACTGCTGTGGACTTAGCTTGAACATTTTGTTCCTCCGCCTCGTCCAGGTTCACTCCA
GAACTCCAGAAGGTTAGTCTATATTTTACCCTTTTTTCTCTAATAGCGATGGAGTACAGTTTC
CAGGACTCCCGTAGCCGCGTGCCGTTCCCCCCCCGTAACGCCCTCCCCCCCCGTCGCCCCCTC
CCTTTCCTTCAACTCGTTCCTCTACATAACCCCCCGCATTCCTCGCCCCGCC

73 adk

GGNNNTNGCTCGTTTCTCATGGGAGAATATGGTATTTCCGCAAATCCTCCACTGGGCGATATGC
TGCGTGCTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAAGACATTATGGATGCTG
GCAAACCGGTCACCGACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACT
GCCGCAACGGTTTCTGTTGGACGGCTTCCCGCGTACCATTCCGCAGGCAGACGCAATGAAAGA
AGCGGGCATCAATGTTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATTGTTGACCGT
ATCGTAGGCCGCCGCGTTCACGCGCCGCTCTGGTCGTGTTTATCACGTTAAATTCATCCGCCGA
AAGTAGAAGGCAAAGACGACGTTACCGGTGAAGAGCTGACTACCCGTAAGACGATCAGGAA
GAGACCGTACGTAAACGTCTGGTTGAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACT
CCAAAGAAGCGGAAGCGGGTAACACCAAATACGGAGCGTGTGCGGTGCGATGAGGAATGGTTC
TAGCATACTCTGATACTGGAGCCCCAATCTTCATTATTGTTTCATCTTCAAATCATGGTGAGTGT
CCTCGATGCTACAGGAGTGGTGATTTTCTCCTTCCATTTCGCTGAATACACCTTCTAGGCTGAATT
TGATAACCCCCCGCTAAACAGGGGTTTCTTCTGGCCCCATCCCTCGTC

75 adk

NNNNNNNCTAGTTCATCATGGAGAATATGGTATTTCCGCAAATCCTCCACTGGGCGATATGCTGC
GTGCTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGGTAAACAAGCAAAAGACATTATGGATGCTGGCA
AACTGGTCACCGACGAACTGGTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACTGCC
GTAATGGTTTCTGTTGGACGGCTTCCCGCGTACCATTCCGCAGGCAGACGCGATGAAAGAAGC
GGGCATCAATGTTGATTACGTTCTGGAATTCGACGTACCGGACGAACTGATTGTTGATCGTATC
GTAGGCCGCCGCGTTCATGCGCCGCTCTGGTCGTGTTTATCACGTTAAATTCATCCGCCGAAAG
TAGAAGGCAAAGACGACGTTACCGGTGAAGAAGTACTACCCGTAAGACGATCAGGAAGAA
ACCGTGCGTAAACGTCTGGTTGAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACTCCA
AGAAGCGGAAGCGGGTAACACCAAATACGCGAGTTGTGACGGCCCCGCTGCAAAATGGAATT
CGTTTTCTCATCTAACATCTTAACTAAGTCTCTGTAACTTTTGCCGCTGCCCGCTTGATAACCGC
CCGGGCAGCTGAGCACTGCGCTGGGATGCATCTCCGACGAAACGCGAAAATGCACCAGCGAGC
AACGACTGTTGCGCCCCCCCACAGCTCATCGCCGGGACTTAAACTGGACCGATCAATCTCTCC
CCTCACCAGGAAACAAAAAACTCGAGAACTTCTAAAAAAGATAACTATTAATTTGTTACCCCT
TTAGCTTTAAACCGAAGTCCCAGTCTTTTATCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTGCC

- ***fumC* (fumarat hidrataza)**

M1 *fumC*

NNANNNNNGCGNACAACGGTGCGCAGGTAATGACTGCCAGTTCATCTGCCACGCGACGCGCA
TACTCCGGATGGGTATTTAGTCCAGTACCCACAGCTGTACCGCCATAGCCAGTTCGGCTACGT
GAGGCAGGCTGTATTCAATATGTTTGAGATTATGCTCGAGCATCGTACCCAGCCGGAATCTC
CTGCCCCAGTGTTAGCGGCGTGGCGTCCTGCAAGTGGGTTTCGACCGATTTTTACGATATCGGCA
AATGCACGGGATTTTTCACTCAGCGTCTGTGTCAGGGTTTTAAGCTGCGGAATGAGTTGCTTGC
GCAGCGCCAGCAGCGCCGCAACGTGCATCGCCGTTGGAAAAGACATCGTTAGAACTTTGGCTTTT
GTTACGTCGTCGTTAGGGTGAACTTTACGCTCCATCCCACGCACGCGCCGAGTAATTCAGT
GCCCGTTAGCCAGCACTTCGTTTCATGTTTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGAT
AGCCAATGGGAATTCGTCGTCATGCTGTCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCTGCCGAATGGCG
CTCGCTTTCTTTTCAGACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACTTTTGCCGCTGCGCGCTTGGTTAG
CGCCAGCGCATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTTTCTCCGTCGAAAATGCGGAAATGCTCCAGCGAG
CGTTGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCCCCCATCGAATCTTTCNC
C

M2 *fumC*

ANNNNGNNNNACAACGGTGACAGGTAATGACTGCCAGTTCATCTGCTACGCGACGCGCATA
TCCGGATGGGTATTTAGTCCAGTACCCACCGCTGTACCGCCAAGAGCCAGTTCGGCTACGTGAG
GCAGGCTGTATTCGATATGTTTGAGATTATGCTCGAGCATCGTACCCAGCCGGAATCTCCTG

CCCTAGTGTTAGCGGCGTGGCGTCCTGCAAGTGGGTTTCGACCGATTTTGACGATATCGGCAAAT
GCACGCGATTTTTACTCAGCGTCTGTGTCAGGGTTTTAAGCTGCGGAATGAGTTGCTTGCGCA
GCGCCAGCAGCGCCGCAACGTGCATCGCCGTCGGAAAGACATCGTTGGAACCTTTGGCTTTTTGT
CACGTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCCATCCCGCGCACGCCGCGAGTAATTCAGTGGCC
CGGTTAGCCAGCACTTCGTTTCATGTTTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGATAGC
CAGCGGGAATTCGTCGTCATGCTGTCCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCTGCCGAATGGCGCTC
GTTTTCTCTCAGACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACCTTTTGCCGCTGCGCGCTTGGTTAGCGC
CAGCGCATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTTCTCCGTCGAAATGCGGAAATGCTCCAGCGAGCGT
TGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCCCCATCGANCTNTTCNGGG
GGAAAAAANNCCGGGACTCCGGGGCGNTATGTCCCTTATATCGGTTACCCCTTTTGTCAACA
TCCCAATTCGCGCCCTGTCCCTATCCCTCTCACACGCATCAAACCTTCCCCACCCCTCCGCCCA
GGTCCCCAAACAAAGCCAGACTTTCCTTCGAGGCGCTCTTATCTATCTTTC

M3 *fumC*

NNNNNGNCGNACACGGTGCACAGGTAATGACTGCCAGTTCATCTGCTACGCGACGCGCATATT
CCGGATGGGTATTTAGTCCAGTACCCACCGCTGTACCGCCCAGAGCCAGTTCGCTACGTGAGG
CAGGCTGTATTCGATACGTTTGGAGATTATGCTCCAGCATCGCTACCCAGCCGGAATCTCCCGC
CCCAGCGTTAACGGCGTGGCGTCCTGCAAGTGGGTACGACCGATTTTGACGATATCAGCAAATG
CGCGGGATTTTTACTCAGCGTCTGGGTGAGGGTTTTAAGTTGTGGAATGAGTTGCTTGCGCAG
CGCCAGTAGTGCCGCAACGTGCATCGCCGTCGGAAAGACATCGTTGGAACCTTTGGCTTTTGTTC
ACGTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCCATCCCGCGCACGCCACCGAGTAATTCAGTGGCCC
GGTTAGCCAGCACTTCGTTTCATATTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGATAGCC
AGCGGGAATTCGTCGTCATGCTGTCCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCTGCCGAATGGCGCTCG
CTTCTCTCAGACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACCTTTTGCCGCTGCGCGCTTGGTTAGCGCC
AGCGCATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTTCTCCGTCGAAATGCGGAAATGCTCCAGCGAGCGCT
GAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCTCCCATCGACCNTTTTGGGGA
AAAAAAAAAANCCAAGTAGACTTCAGAATGTTCTCCATGTTTTAGCAGACAAAATTCCTGCT
GATGGATTCTCTAAATGAGCACTGACGATCCCACTCTGGAGAGAGGCGTACCCTACTNNNC
TCTTGTGTAGTCAAAAAAAAAATCGGAGNTTCTTTCGTGGGGGGAGAAAGAAG

M4 *fumC*

NNNNNNNTNCTNGANCNNANTTNCNTTGCNTTCNGGTAATGACTGCCAGTTCATCTGCTACGCGA
CGCGCATATTCGGATGGGTATTTAGTCCAGTACCCACCGCTGTACCGCCCAGAGCCAGTTCGG
CTACGTGAGGCAGGCTGTATTCGATATGTTTGGAGATTATGCTCCAGCATCGCTACCCAGCCGGA
AATCTCCTGCCCCAGCGTTAACGGCGTGGCGTCCTGCAAGTGGGTACGACCGATTTTGACGATA
TCAGCAAATGCGCGGGATTTTTACTCAGCGTCTGGGTCAGGGTTTTAAGTTGTGGAATGAGTT
GCTTGCGCAGCGCCAGTAGTGCCGCAACGTGCATCGCCGTCGGAAAGACATCGTTGGAACCTTTG
GCTTTTGTTCACGTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCCATCCCGCGCACGCCACCGAGTAATT
CACTGGCCCCGTTAGCCAGCACTTCGTTTCATATTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGC
CAGATAGCCAGCGGGAATTCGTCGTCATGCTGTCCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCTGCCGAA
TGGCGCTCGCTTCTCTCAGACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACCTTTTGCCGCTGCGCGCTTG
GTTAGCGCCAGCGCATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTTCTCCGTCGAAATGCGGAAATGCTCCA
CGGAGCGTGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCTCCCATCGAATC
TTTNCCTGGGGAAAAANATCCAAGGGGGTGCCTTATTGCTTCACTTTGGCTTGTTCGATATTCG
GGCCTCTCCATACTTTTCATGGCTTTTTTCTGCAAGCTCGACATCATTGGTATTAATAATTTGTTT
CACAAATCCTCCATTTGACTCAACTTTTGGCCGCCTTTTCAACACGGC

M5 *fumC*

NNNNNGNNAACCGTGCACAGGTAATGACTGCNAGTTCATCTGCTACGCGACGCGCATACTC
CGGATGGGTATTTAGTCCAGTACCCACCGCTGTACCGCCAAGAGCCAGTTCGCTACGTGAGGC
AGGCTGTATTCGATACGTTTGGAGATTATGCTCGAGCATCGCTACCCAGCCGGAATCTCCTGCC
CTAGTGTTAGCGGCGTGGCGTCCTGCAAGTGGGTTTCGACCGATTTTGACGATATCGGCAAATGC
ACGCGATTTTTACTCAGTGTCTGTGTCAGGGTTTTAAGCTGCGGAATGAGTTGCTTGCGCAGCG
CCAGCAGCGCCGCAACGTGCATCGCCGTCGGAAAGACATCGTTGGAACCTTTGGCTTTTGTTCAC
GTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCCATCCCGCGCACGCCGCGAGTAATTCAGTGGCCCCG
TTAGCCAGCACTTCGTTTCATGTTTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGATAGCCAG
CGGGAATTCGTCGTCATGCTGTCCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCTGCCGAATGGCGCTCGCTT

TCTCTTCAGACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACTTTTGCCGCTGCGCGCTTGGTTAGCGCCAGC
GCATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTTTCTCCGTGCGAAATGCGGAAATGCTCCAGCGAGCGTTGAG
TTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCCCCCATCGACTTTTTTTGGGAAAAA
AAAANGGCCNCNNTAGACACTTTCTCCCTGGTTTTCTCCGGGAAAACAGGCCCAATTATTGTGCG
GGGCTTTCGCCAAAACACAGGCAGCGCACGAGGCAAACCTAAAGGTAATCATAACCCTTGTGCGC
CAAAAAAAAAGCCCCCCCCCTTGGCAGCGGTGTGAAATAATTTTCGTGTAG

M8 *fumC*

ANTNNNNGGCGNACAACGGTGCAGGTAATGACTGCCAGTTCATCTGCCACGCGACGCGCAT
ACTCCGGTATGGGTATTTAGTCCAGTACCCACAGCTGTACCGCCCATAGCCAGTTCGCTACGT
GAGGCAGGCTGTATCAATATGTTTGAGATTATGCTCGAGCATCGCTACCCAGCCGGAATCTC
CTGCCCCAGTGTTAGCGGCGTGGCGTCTGCAAGTGGGTTTCGACCGATTTTTACGATATCGGCA
AATGCACGGGATTTTTCACTCAGCGTCTGTGTCAGGGTTTTAAGCTGCGGAATGAGTTGCTTGC
GCAGCGCCAGCAGCGCCGCAACGTGCATCGCCGTTGGAAAGACATCGTTAGAATTTGGCTTTT
GTTACGTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGCTCCATCCCACGCACGCCCGCCGAGTAATCACTG
GCCCCGTTAGCCAGCACTTCGTTTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGAT
AGCCAATGGGAATTCGTCGTCATGCTGTCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCTGCCGAATGGCG
CTCGCTTCTCTTCAGACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACCTTTGCCGCTGCGCGCTTGGTTAG
CGCCAGCGCATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTTTCTCCGTGCGAAATGCGGAAATGCTCCAGCGAG
CGTTGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCCCCCATCGAANTTCNN

M10 *fumC*

NNNGNNGNAGGTAATGACTGCCAGTTCATCTGCTACGCGACGCGCATACTCCGGATGGGTATTT
AGTCCAGTACCCACCGCTGTACCGCCAAGAGCCAGTTCGCTACGTGAGGCAGGCTGTATTCGA
TATGTTTGAGATTATGCTCGAGCATCGCTACCCAGCCGGAATCTCCTGCCCTAGTGTTAGCGG
CGTGGCGTCTGCAAGTGGGTTTCGACCGATTTTGACGATATCGGCAAATGCACGCGATTTTTCA
CTCAGTGTCTGTGTCAGGGTTTTAAGCTGCGGAATGAGTTGCTTGCAGCGCCAGCAGCGCCG
CAACGTGCATCGCCGTCGGAAGACATCGTTGGAACCTTTGGCTTTTGTTCACGTCGTCGTTAGG
GTGAACCTTACGTTCCATCCCAGCGCACGCCCGCTGTAATCACTGGCCCCGTTAGCCAGCACTT
CGTTCATGTTTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGATAGCCAGCGGGAATTCGTC
GTCATGCTGTCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCTGCCGAATGGCGCTCGCTTCTCTTCAGACA
ACAAGCCTAAATCTTCATTAACCTTTGCCGCTGCGCGCTTGGTTAGCGCCAGCGCATGAATCAG
TGAGGTGGGCATTTTCTCCGTGCGAAATGCGGAAATGCTCCAGCGAGCGTTGAGTTTGTGCGCCC
CACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCCCCCATCGACTNTTTTTTGGGGAAAAAAAAAAAAATTC
ATCGCNGATTTTCCGATTTTCGTGAGATGAAACACCGTCCAATTCCTGCTGAGGGTTCCTCACA
ACTACGCGTGCGGACACATATCAAGAAAGTATTGGATTCCGGTGTGAGCGAAAAAACACGAGC
CCCCACTTCGGTGCTNCGAAAAATTTAGTGCATGACACTAACCACAAATCCC

M11 *fumC*

NNNTNNNNNCGGGTACAACGGTGCACAGGTAATGACTGCCAGTTCATCTGCTACGCGACGCG
CATATTCGGATGGGTATTTAGTCCAGTACCCACCGCTGTACCGCCAGAGCCAGTTCGCTAC
GTGAGGCAGGCTGTATTCGATATGTTTGAGATTATGCTCCAGCATCGTACCCAGCCGGAATC
TCCTGCCCCAGCGTTAACGGCGTGGCGTCTGCAAGTGGGTACGACCGATTTTGACGATATCAG
CAAATGCGCGGGATTTTTCACTCAGCGTCTGGGTGAGGTTTTAAGTTGTGGAATGAGTTGCTT
GCGCAGCGCCAGTAGTGCCGCAACGTGCATCGCCGTCGGAAGACATCGTTGGAACCTTTGGCTT
TTGTTACGTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCCATCCCAGCGCACGCCACCGAGTAATCACT
GGCCCCGTTAGCCAGCACTTCGTTTCATATTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGA
TAGCCAGCGGGAATTCGTCGTCATGCTGTCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCTGCCGAATGGC
GCTCGCTTCTCTTCAGACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACCTTTTGCCGCTGCGCGCTTGGTTA
GCGCCAGCGCATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTTCTCCGTGCGAAATGCGGAAATGCTCCAGCGA
GCGCTGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCTCCATCGAATCTTTGN
GTGGGGCAAAAAAAACTCATTTTCTACGTCTTTCTTTTCGCTTTCCTTTGTCTATTTCCAATTC
ATAGCTTCTTCCNTGCTTTCAAGGCTTTTTTGGAACTCTAAAA

65 *fumC*

NNNNNGGGGNNNACAACGGTGCACAGGTAATGACTGCCAGTTCATCTGCTACGCGACGCGCA
TACTCCGGATGGGTATTTAGTCCAGTACCCACCGCTGTACCGCCAAGAGCCAGTTCGCTACGT

GAGGCAGGCTGTATTTCGATATGTTTGAGATTATGCTCGAGCATCGCTACCCAGCCGGAAATCTC
CTGCCCCAGCGTTAACGGCGTGGCATCCTGCAAGTGAGTACGACCAATTTTGACGATATCGGCA
AAAGCACGGGATTTCTCATTAGTGTCTGTGTCAGGGTTTTAAGCTGAGGAATGAGTTGCTTGC
GCAGCGCCAGCAGCGCCGCAACGTGCATAGCCGTCGGAAAGACATCGTTGGAACCTTTGGCTTTT
GTTACGTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCCATCCCGCGCACACCCGCCGAGTAATTCAGT
GCCCCGTTAGCCAGCACTTCGTTTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGAT
AGCCAGCGGGAATTCGTCGTCATGCTGTCCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCCTGACGAATGGCG
CTCGCTTTCTTTAGACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACCTTTGCGCGTGCACGCTTGGTTAG
CGCCAGCGCATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTTCTCCGTCGAAATGCGGAAATGCTCCAGCGAG
CGTTGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCCCCATCGAATCTTNCN

67 *fumC*

ANNNNNNGGNACAACGGTGCACAGGTAATGACTGGCCAGTTCATCTGCTACGCGACGCGCATA
TTCCGGAATGGGTATTTAGTCCAGTACCCACCGCTGTACCGCCCAGAGCCAGTTCGGCTACGTG
AGGCAGGCTGTATTTCGATATGTTTGAGATTATGCTCCAGCATCGCTACCCAGCCGGAAATCTCC
TGCCCCAGCGTTAACGGCGTGCCGTCCTGCAAGTGGGTACGACCGATTTTGACGATATCAGCAA
ATGCGCGGGATTTTTCACTCAGCGTCTGGGTGAGGGTTTTAAGTTGTGGAATGAGTTGCTTGC
AGCGCCAGTAGTGCCGCAACGTGCATCGCCGTCGGAAAGACATCGTTGGAACCTTTGGCTTTTGT
TCACGTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCCATCCCGCGCACGCCACCGAGTAATTCAGTGGC
CCGTTAGCCAGCACTTCGTTTCATATTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGATAG
CCAGCGGGAATTCGTCGTCATGCTGTCCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCCTGCCGAATGGCGCT
CGCTTTCTTTAGACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACCTTTGCGCGTGCACGCTTGGTTAGCG
CCAGCGCATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTTCTCCGTCGAAATGCGGAAATGCTCCAGCGAGCG
CTGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCTCCCATCGATCTNTTNCGGG
GGAAAAAAAAANNCAAATTTACATCGTATTACTTCAACTTTTCCATTAAGAAACCTCCGAGCTA
GGAAACCTCCTCCACCTACTTCCCGGCTTTGTTGGGGCCCTTATAACGTTGATCTGGGGGTTTGT
TCGAACATCCGTATAACCTCTCTGTTTTGCGGCCATTTGATCTTGCCCA

68 *fumC*

NNNNNGNNGNANANGGTGCACAGGTAATGACTGCCAGTTCATCTGCTACGCGACGCGCATA
CTCCGGATGGGTATTTAGTCCAGTACCCACCGCTGTACCGCCAAGAGCCAGTTCGGCTACGTGA
GGCAGGCTGTATTTCGATATGTTTGAGATTATGCTCGAGCATCGCTACCCAGCCGGAAATCTCCT
GCCCTAGTGTTAGCGGCGTGGCGTCTGCAAGTGGGTTCGACCGATTTTGACGATATCGGCAAA
TGCACGCGATTTTTCACTCAGTGTCTGTGTCAGGGTTTTAAGCTGCGGAATGAGTTGCTTGC
GCGCCAGCAGCGCCGCAACGTGCATCGCCGTCGGAAAGACATCGTTGGAACCTTTGGCTTTTGT
CACGTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCCATCCCGCGCACGCCGCCGAGTAATTCAGTGGCC
CGGTTAGCCAGCACTTCGTTTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGATAGC
CAGCGGGAATTCGTCGTCATGCTGTCCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCCTGCCGAATGGCGCTC
GCTTTCTTTAGACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACCTTTGCGCGTGCACGCTTGGTTAGCGC
CAGCGCATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTTCTCCGTCGAAATGCGGAAATGCTCCAGCGAGCGT
TGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCCCCATCGATCTTTTTNNGG
GAAAAAAAAACNNGGGGAGAAGTCGAGGGGCGTCCCCCTATAAAAAAAAAAACGGGTCTCCCTGT
TCTAATCGGCCAAATCCTGCTGAAGGGAAGACGTGAAAATTAACATTTGAAAAAAAAAATC
TGAGGGGAGGGGTACACTTATTAGTTTTTTGGTTAGATATCAAAAATTCGG

69 *fumC*

NNNNNGNNGNNGGTACAACGGTGCACAGGTAATGACTGCCAGTTCATCTGCTACGCGACGCGC
ATATTCCGGATGGGTATTTAGTCCAGTACCCACCGCTGTACCGCCCAGAGCCAGTTCGGCTACG
TGAGGCAGGCTGTATTTCGATATGTTTGAGATTATGCTCCAGCATCGCTACCCAGCCGGAAATCT
CCTGCCCCAGCGTTAACGGCGTGCCGTCCTGCAAGTGGGTACGACCGATTTTGACGATATCAGC
AAATGCGCGGGATTTTTCACTCAGCGTCTGGGTGAGGGTTTTAAGTTGTGGAATGAGTTGCTT
CGCAGCGCCAGTAGTGCCGCAACGTGCATCGCCGTCGGAAAGACATCGTTGGAACCTTTGGCTTT
TGTTACGTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCCATCCCGCGCACGCCACCGAGTAATTCAGT
GCCCCGTTAGCCAGCACTTCGTTTCATATTTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGAT
AGCCAGCGGGAATTCGTCGTCATGCTGTCCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCCTGCCGAATGGCG
CTCGCTTTCTTTAGACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACCTTTGCGCGTGCACGCTTGGTTAG
CGCCAGCGCATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTTCTCCGTCGAAATGCGGAAATGCTCCAGCGAG

CGCTGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCTCCCATCGAATCTTTNTN
GCTGCTGCGCTAACAAAAAGGCTTGAAAGCGCACTTGTTTGCCCTTTGCTGTAAATTTGTTTGTCT
TCGATTTTTCCGGCTGCCCTCAGGCCCTTCCATTGGCCTTCCCGGCAGGCGCGCAATCGCGGG
AGTGAGACCTTGTCCCAACAAAAACGTCCCTCTACTCGAACGGCTCCCT

72 *fumC*

NNNNNTNNTNNGTACAAACGGTGCACAGGTAATGACTGCCAGTTCATCTGCTACGCGACGC
GCATATTCCGGATGGGTATTTAGTCCAGTACCCACCGCTGTACCGCCCAGAGCCAGTTCCGCTA
CGTGAGGCAGGCTGTATTTCGATATGTTTGGAGATTATGCTCCAGCATCGCTACCCAGCCGAAAT
CTCCTGCCCCAGCGTTAACGGCGTGGCGTCTGCAAGTGGGTACGACCGATTTTGACGATATCA
GCAAATGCGCGGGATTTTTCACTCAGCGTCTGGGTGAGGGTTTTAAGTTGTGGAATGAGTTGCT
TGCGCAGCGCCAGTAGTGCCGCAACGTGCATCGCCGTCCGAAAGACATCGTTGGAACCTTTGGCT
TTTGTTACGTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCCATCCCGCGCACGCCACCGAGTAATTCAC
TGGCCCCGTTAGCCAGCACTTCGTTTCATATTTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGCCAG
ATAGCCAGCGGAATTCGTCGTCATGCTGTCCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCTGCCGAATGG
CGCTCGCTTTCTTTCAGACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACCTTTGCGCTGCGCGCTTGTT
AGCGCCAGCGCATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTTCTCCGTGCAAATGCGGAAATGCTCCAGCG
AGCGCTGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCTCCCATCGAATCTTTC
GCGCTGTTGCGTAACAANNNGCGACCCCTAGACATCAGAAAGGGTCTCCTTGATCTCATCGTGC
AATTCCTGCTGAAGGAGACATGAAATAATCATTGAGAAACAAACATGCGGAGTAGGGGTACCC
TCTTTGCCNTTTTTACTTCTTTCATGGCENN

73 *fumC*

ANNNNNNNGNCGGTACNACGGTGCACAGGTAATGACTGCCAGTTCATCTGCTACGCGACGCG
CATATTCCGGATGGGTATTTAGTCCAGTACCCACCGCTGTACCGCCCAGAGCCAGTTCCGCTAC
GTGAGGCAGGCTGTATTTCGATATGTTTGGAGATTATGCTCCAGCATCGCTACCCAGCCGAAATC
TCCTGCCCCAGCGTTAACGGCGTGGCGTCTGCAAGTGGGTACGACCGATTTTGACGATATCAG
CAAATGCGCGGGATTTTTCACTCAGCGTCTGGGTGAGGGTTTTAAGTTGTGGAATGAGTTGCTT
GCGCAGCGCCAGTAGTGCCGCAACGTGCATCGCCGTCCGAAAGACATCGTTGGAACCTTTGGCTT
TTGTTACGTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCCATCCCGCGCACGCCACCGAGTAATTCACT
GGCCCCGTTAGCCAGCACTTCGTTTCATATTTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGA
TAGCCAGCGGGAATTCGTCGTCATGCTGTCCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCTGCCGAATGGC
GCTCGCTTTCTTTCAGAAAAAAGCCTAAAATCTTCATTAACCTTTTGCCCCGTGCGCGCTTT
GGGTTAGCGCCCAGCCGCATGAATCAGTGAGGGTGGGCATTTTTNNTCCGTCGAAAATGCGG
AAAATGCTTCCAGCCGAGGGGCTGAAGTTTGGTGCCGCCCAACAGCTTAATCTGCCGGGACAA
TCAAATCCCCCTCCATCGGAATCTTTTTCGCCTGGCCGTACACAAAACTGCGCTGTACAGTCTT
GGGTTTCTTTTACCGACACCCTGCAGGACCTGACATTGACCCCTACAAAAGACTGGGTGTCGA
TGACTGCAACCTTTCGATCAATTCGTTCTCTCGAGCGAACGCACCATATCA

75 *fumC*

GNNNGCNNGGGGGNTACAACGGTGCACAGGTAATGACTGCCAGTTCATCTGCTACGCGACGC
GCATACTCCGGATGGGTATTTAGTCCAGTACCCACCGCTGTACCGCCAAGAGCCAGTTCCGCTA
CGTGAGGCAGGCTGTATTTCGATATGTTTGGAGATTATGCTCGAGCATCGCTACCCAGCCGAAAT
CTCCTGCCCTAGTGTTAGCGGCGTGGCGTCTGCAAGTGGGTTTCGACCGATTTTGACGATATCG
GCAAATGCACGCGATTTTTCACTCAGTGTCTGTGTCAGGGTTTTAAGCTGCGGAATGAGTTGCTT
GCGCAGCGCCAGCAGCGCCGCAACGTGCATCGCCGTCCGAAAGACATCGTTGGAACCTTTGGCTT
TTGTTACGTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCCATCCCGCGCACGCCGCCGAGTAATTCACT
GGCCCCGTTAGCCAGCACTTCGTTTCATGTTTCATGTTACTTTGCGTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGA
TAGCCAGCGGGAATTCGTCGTCATGCTGTCCTGCCAGTACTTCATCCGCCGCTGCCGAATGGC
GCTCGCTTTCTTTCAGACAACAAGCCTAAATCTTCATTAACCTTTTGCCGCTGCGCGCTTGTTA
GCGCCAGCGCATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTTCTCCGTGCAAATGCGGAAATGCTCCAGCGA
GCGTTGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGCCCCATCGAATCTNTCC
GCGGGTAGTACAAAANCTTCCGGGGGGAAGAGAGGGGCGACTACCTACAATAACGAAAAGGGC
CTCCCTTGATCTANCCGGCCAATCCCCTCGAAGGAGACATGCGATTATCACCCCTAGAATCAA
ACTTGCGCGGGGGGTTCCCTTCTTTCTTTN

- *icd* (izocitrat/izopropilmalat dehidrogenaza)

M1 *icd*

NNNNNCTNTANNTCNTANTNNTATGCAACGGCAACTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCC
TTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCT
GCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAATTTACACCGGTGAA
AAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGATGTCTGGCTGCCTGCTGAAACCCTTGATCTGATTCGTG
AATATCGCGTTGCCATTAAAGGCCCTCTGACCACTCCGTTGGTGGCGGTATTCTGTTCTCTGAAC
GTTGCCCTGCGCCAGGAACTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCA
CCCCAAGCCCGTTAAACATCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGA
CATTTATGCGGGTATCGAATGGAAAGCTGACTCTGCCGACGCCGAGAAAGTGATTAATTCCTG
CGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGT
GTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACGATC
GTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGTTTAAAG
ACTGGGGCTACCAGCTGGCGCGTGAAGAGTTTGGCGGTGAACTGATCGACGGCGGCCCGTGGA
TGAAAGTTAAAAACCCGAATACCGCAAAGAGATCGTCATTAAGACGTGATTGCTGACGCAT
TCCTGCAACAGATCGGG

M2 *icd*

NNCGTGTGTANNTCTTACNNNNATGCAAACGGCAACTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCC
TTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCT
GCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAATTTACACCGGTGAA
AAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGATGTCTGGCTGCCTGCTGAAACCCTTGATCTGATTCGTG
AATATCGCGTTGCCATTAAAGGCCCGCTGACCACTCCGTTGGTGGCGGTATTCTGCTCTCTGAA
CGTTGCCCTGCGCCAGGAACTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGC
ACTCCAAGCCCGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAG
ACATTTATGCGGGTATCGAATGGAAAGCTGACTCTGCCGACGCCGGGAAAGTGATTAATTCCT
GCGTGAAGAGATGGGTGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCC
GTGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAATGAT
CGTACTCTGTGACTCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGTTTAAAG
ACTGGGGCTACCAGCTGGCGCGTGAAGAGTTTGGCGGTGAACTGATCGACGGCGGCCCGTGCC
TGAAAGTTAAAAACCCGAACACCGCAAAGAGATCGTCATTAAGACGTGATTGCTGATGCAT
TCCTGCAACAGATCTGGCCTNCGTCTCAA

M3 *icd*

NNNNNNNTNTNANTCAGTACANNNNNATGCAAACGGCAACTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTA
TCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGA
CGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAATTTACACCGG
TGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGTCTGGTTGCCTGCTGAAACCCTTGATCTGATT
CGTGAATATCGCGTTGCCATTAAAGGCCCGCTGACCACTCCGTTGGTGGCGGTATTCTGCTCTCT
GAACGTTGCCCTGCGCCAGGAACTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAG
GGCACTCCAAGCCCGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGG
AAGACATTTATGCGGGTATCGAATGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGATTAAT
TCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGAACATTGCGGTATCGGTATTA
GCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAAC
GATCGTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGTTA
AAGACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACTGATCGACGGCGGCCCGT
GGCTGAAAGTTAAAAACCCGAATACCGCAAAGAGATCGTCATTAAGACGTGATTGCTGATG
CATTCCTGCAACAGATCGNCCGNCNGNCCCCATAAA

M4 *icd*

NNNCGGTATNTACANTNNTTGCAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTT
ACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTG
CAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAATTTACACCGGTGAA
AATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGTCTGGTTGCCTGCTGAAACCCTTGATCTGATTCGTGA
ATATCGCGTTGCCATTAAAGGCCCGCTGACCACTCCGTTGGTGGCGGTATTCTGCTCTCTGAAC
GTTGCCCTGCGCCAGGAACTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCA

CTCCAAGCCCGGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGA
CATTTATGCGGGTATCGAATGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGATTAAATTCCTG
CGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGT
GTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACGATC
GTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGTTTAAAG
ACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACTGATCGACGGCGGCCCGTGGC
TGAAAGTTAAAAACCCGAATACCGCAAAGAGATCGTCATTAAGACGTGATTGCTGATGCAT
TCCTGCAACAGATCGGGTTGCGCCACAN

M5 *icd*

NNNNTCAGTACANNNNNNTGCAAACGGCAACTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACA
TTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCAGT
CGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAAATTTACACCCGGTAAAAATC
CACACAGTTTTATGGTCAGGATGTCTGGCTGCCTGCTGAAACCCCTGATCTGATTTCGTGAATATC
GCGTTGCCATTAAGGTCCGCTGACCACTCCTGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTGAACGTTGCC
CTGCGCCAGGAACTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAAGGCACTCCAA
GCCCCGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTA
TGCGGGTATCGAATGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCCGAGAAAGTGATTAAATTCCTGCGTGA
AGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGAACATTGCGGTATCGGTATCAAGCCGTGTTCT
GAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTCCGTGCCGCGATTGAATACGCAATTGCCAACGACCCGTGAC
TCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGTTTAAAGACTGG
GGCTACCAGCTGGCGCGTGAAGAGTTTGGCGGTGAACTGATCGACGGCGGCCCGTGGCTGAAA
GTTAAAAACCCGAACACCGCAAAGAGATCGTCATTAAGACGTGATTGCTGATGCATTCCCTGC
AACAGATCGGNNTCNCTCCACACAAA

M8 *icd*

NNCGNNNNNANNTCAGTACANTNNNATGCAACGGCAACTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTAT
CCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGAC
GCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAAATTTACACCCGT
GAAAAATCCACACAGTTTTATGGTCAGGATGTCTGGCTGCCTGCTGAAACCCCTGATCTGATTC
GTGAATATCGCGTTGCCATTAAGGCCCTCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGTTCTCTG
AACGTTGCCCTGCGCCAGGAACTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGG
GCACCCCAAGCCCGTTAAACATCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGA
AGACATTTATCGGGTATCGAATGGAAAGCTGACTCTGCCGACGCCGAGAAAGTGATTAAATTC
CTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGTTCCCG
GAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTTCGTGCAG
CGATCGAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCAT
GAAGTTCACCGAAGGCGCGTTTAAAGACTGGGGCTACCAGCTGGCGCGTGAAGAGTTTGGCGG
TGAAGTATCGACGGCGGCCCGTGGATGAAAGTTAAAAACCCGAATACCGCAAAGAGATCGT
CATTAAAGACGTGATTGCTGACGCATTCTGCACAGACGNCGGGGGCCCCAAAAANAACCTCC
GGTGTAGGGGAAATCTCTGTGCCGTTTCGGTTTTAACTTTCCCGGGCCCGTCATAGTCCCC
AACTCTTCAGCGCCTCTG

M10 *icd*

NNNNNCCAGTAGATCTNNCTGCAAACGGCAACTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTAC
ATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCA
GTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAAATTTACACCCGGTAAAAA
TCCACACAGTTTTATGGTCAGGATGTCTGGCTACCTGCTGAAACCCCTGATCTGATTTCGTGAATA
TCGCGTTGCCATCAAAGGCCCGTGAACCACTCCGGTTGGTGGTGGTATTCGCTCTCTCAACGTTG
CTCTGCGCCAGGAACTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCC
AAGCCCGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATT
TATGCGGGTATCGAATGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGATTAAATTCCTGCGTG
AAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGAACATTGCGGCATCGGTATTAAGCCGTGTTT
TGAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACGATCGTGA
CTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGTTTAAAGACTGG
GGCTACCAGCTGGCGCGTGAAGAGTTTGGCGGTGAACTGATCGACGGCGGCCCGTGGCTGAAA

GTAAAAACCCGAACACCGGCAAAGAGATCGTCATTAAGACGTGATTGCTGATGCATTCCCTGC
AACGTNCN

M11 icd

NNCNTNTNTANNTCNTACTTTCGTATGTAAACGGCAACTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCC
CTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCCAGCCATGCTGAAAGTGGTTCGACGC
TGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGGCAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAAATTTACACCGGTGA
AAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGTCTGGTTGCCTGCTGAAACCCTTGATCTGATTTCGT
GAATATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTTCGCTCTCTGA
ACGTTGCCCTGCGCCAGGAACTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGG
CACTCCAAGCCCAGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAA
GACATTTATGCGGGTATCGAATGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGATTAATTC
TGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCC
GTGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACGAT
CGTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGTTTAAAG
ACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACTGATCGACGGCGGCCCGTGGC
TGAAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAGAGATCGTCATTAAGACGTGATTGCTGATGCAT
TCCTGCAACAGATTNNN

65 icd

NNNNTCTTTAGTCNTTANNNNATGCAACGGCAACTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTT
ACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCCAGCCATGCTGAAAGTGGTTCGACGCTG
CAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGGCAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAAATTTACACCGGTGAAA
AATCCACACAGGTTTATGGTCAGGATGTCTGGCTGCCTGCTGAAACCCTTGATCTGATTTCGTGA
ATATCGCGTTGCCATTAAGGTCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTTCGCTCTCTGAAC
GTTGCCCTGCGCCAGGAACTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCA
CTCCAAGCCCAGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGA
CATTTATGCGGGTATCGAATGGAAAGCTGACTCTGCCGACGCCGAGAAAGTGATTAATTCCTG
CGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATCAAGCCG
TGTTCTGAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTCCGTGCCGCGATTGAATACGCAATTGCCAACGACC
GTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGTAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGTTTAAAGA
CTGGGGCTACCAGCTGGCGCGTGAAGAGTTTGGCGGTGAACTGATCGACGGTGGCCCCGTGGCT
GAAAGTTAAAAACCCGAACACTGGCAAAGAGATCGTCATTAAGACGTGATCGCTGATGCATT
CCTGCAACAGATNNNCN

67 icd

NNNNNANAGGTAACANNCNNTGCAAACGGCAACTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTT
ACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCCAGCCATGCTGAAAGTGGTTCGACGCTG
CAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGGCAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAAATTTACACCGGTGAAA
AATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGTCTGGTTGCCTGCTGAAACCCTTGATCTGATTTCGTGA
ATATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTTCGCTCTCTGAAC
GTTGCCCTGCGCCAGGAACTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCA
CTCCAAGCCCAGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGA
CATTTATGCGGGTATCGAATGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGATTAATTCCTG
CGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGT
GTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACGATC
GTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGTTTAAAG
ACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACTGATCGACGGCGGCCCGTGGC
TGAAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAGAGATCGTCATTAAGACGTGATTGCTGATGCAT
TCCTGCAACAGANNNG

68 icd

NNNNTNTNANNTCANTAGANNTNNATGCAAACGGCAACTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTA
TCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCCAGCCATGCTGAAAGTGGTTCG
CGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGGCAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAAATTTACACCGG
TGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGATGTCTGGCTGCCTGCTGAAACCCTTGATCTGATT
CGTGAATATCGCGTTGCCATTAAGGTCCGCTGACCACTCCTGTTGGTGGCGGTATTTCGCTCTCT

GAACGTTGCCCTGCGCCAGGAACTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAG
GGCACTCCAAGCCCAGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGG
AAGACATTTATGCGGGTATCGAATGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCCGAGAAAGTGATTAAT
TCCTGCGTGAAGAGATGGGGGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGAACATTGTGGTATCGGTATTA
GCCGTGTTGCGAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAAC
GATCGTGACTCTGTGACTCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGAGCGTTA
AAGACTGGGGCTACCAGCTGGCGCGTGAAGAGTTTGGCGGTGAACTGATCGACGGCGGCCGT
GGCTGAAAGTTAAAAACCCGAACACCGGCAAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATG
CATTCTGCAACAGATANN

69 icd

NNCANNNTNAGNTCATTACACCNATGCAACGGCAACTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCC
TTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCT
GCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAATTTACACCGGTGAA
AAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGGTTGCCTGCTGAAACCCTTGATCTGATTCGTG
AATATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGTTGGTGGCGGTATTGCTCTCTGAA
CGTTGCCCTGCGCCAGGAACTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGC
ACTCCAAGCCCAGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAG
ACATTTATGCGGGTATCGAATGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGATTAATTCCT
GCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCC
GTGTTGCGAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACGAT
CGTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGTTAAAG
ACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACTGATCGACGGCGGCCGTGGC
TGAAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCAT
TCCTGCAACAGATCGCG

72 icd

NNGCNTNTNNGTNTTANTNNNNATGCAANGGCAACTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCC
TTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCT
GCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAATTTACACCGGTGAA
AAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGGTTGCCTGCTGAAACCCTTGATCTGATTCGTG
AATATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGTTGGTGGCGGTATTGCTCTCTGAA
CGTTGCCCTGCGCCAGGAACTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGC
ACTCCAAGCCCAGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAG
ACATTTATGCGGGTATCGAATGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGATTAATTCCT
GCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCC
GTGTTGCGAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACGAT
CGTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGTTAAAG
ACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACTGATCGACGGCGGCCGTGGC
TGAAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCAT
TCCTGCAACAGATCGNN

73 icd

NNCGTNNNTAGNNNNNNNTGCAAACGGCAACTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTA
CATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGC
AGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAATTTACACCGGTGAAAA
ATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGGCTGCCTGCTGAAACTCTTGATCTGATTCGTGAAT
ATCGCGTTGCCATTAAGGTCCGCTGACCACTCCTGTTGGTGGCGGTATTGCTCTCTGAACGTT
GCCCTGCGCCAGGAACTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAAGGCACTC
CAAGCCCAGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACAT
TTATGCGGGTATCGAATGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCCGAGAAAGTGATTAATTCCTGCGT
GAAGAGATGGGGGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGAACATTGTGGTATCGGTATTAAGCCGTGTT
CGGAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACGATCGTG
ATTCTGTGACTCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGTTAAAGATTG
GGGCTACCAGCTGGCGCGTGAAGAGTTTGGCGGTGAACTGATCGACGGCGGCCGTGGCTGAA
AGTTAAAAACCCGAACACCGGCAAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCCTG
CAACAGACNCCN

75 *icd*

NNNNNTNTANNTCANTANNNNNATGCAAACGGCAACTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATC
CCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTTCGACG
CTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCCTGGATGGAAATTTACACCGGTG
AAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGTCTGGTTGCCTGCTGAAACCCTTGATCTGATTCTG
TGAATATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTCTGCTCTCTG
AACGTTGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGG
GCACTCCAAGCCCGGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGA
AGACATTTATGCGGGTATCGAATGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGATTAATTA
CCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGAACATTGCGGTATCGGTATTAAG
CCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGTCTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACG
ATCGTGAATCTGTGACCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGTTTAA
AGACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAAATTTGGCGGTGAACTGATCGACGGCGGCCCGTG
GCTGAAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAGAGATCGTCATTAAGACGTGATTGCTGATGC
ATTCCTGCAACAGACGN

- ***purA* (adenilosukcinat dehidrogenaza)**

M1 *purA*

NNNGNNAANNNTGGCATCCCGTTCGTGAGCGTCTGCTGCTGTCTGAAGCATGTCCGCTGATCC
TTGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGGCA
CCACCGGTCGTGGTATCGGGCCTGCTTATGAAGATAAAGTGGCACGTCGCGGTCTGCGTGTGG
CGACCTTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAACCTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAACCTC
CAGTTGGTTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTTCTGGATGATACGATGG
CTGTTGCCGACATCCTGACTTCTATGGTGGTTGACGTTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTCAG
CGTGGCGATTTTCGTATGTTTCAAGGTGCTCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTACTT
ATCCGTACGTAACATCTTCCAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGCC
GCGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTGGGTGCAGGTCCGT
TCCCGACTGAACTGTTGATGAACTGGCGAGTTCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGCGC
AACTACGGGTCGTCGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTCGCGTTCGTCGTGCGGTACAG
CTGAACTCCCTGTCTGGCTTCTGCCTGACCAAGCTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTGA
AACTCTGCNTTTTATCNCACNNGANGNAGGGACGCGTTGGTCAACGGTGTTTTCCAGCGCCTG
CCGATACACACCACAACACACCCCGTATTTGCCCAAATTCCTTACCCGTGCTTGCAGAGAA
ATTCGCCGTTTCTCAAACAGTTCAGTCGGAAACGGACCTGCACCCACACGA

M2 *purA*

NNNNNNNACNGTGGCATCCCGTTCGTGAGCGTCTGCTGCTGTCTGAAGCATGTCCGCTGATCCT
TGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGGCAC
CACCGGTCGTGGTATCGGGCCTGCTTATGAAGATAAAGTAGCACGTCGCGGTCTGCGTGTGGC
GACCTTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAACCTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAACCTCC
AGTTGGTTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTTCTGGATGATACGATGGC
TGTTGCCGACATCCTGACTTCTATGGTGGTTGACGTTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTCAGC
GTGGCGATTTTCGTATGTTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTACTTA
TCCGTACGTAACCTTCTTCCAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGCCG
CGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTAGGTGCAGGTCCGTT
CCCGACCGAAGTGTGATGAACTGGCGAGTTCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGCGCA
ACTACGGGGCGTCGTCGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTCGCGTTCGTCGTGCGGTACAGC
TGAACCTCCCTGTCTGGCTTCTGCCTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTAA
ACTCTGCTCTNTN

M3 *purA*

NNGNNGNANGNGGGCATCCCGTTCGTGAGCGTCTGCTGCTGTCCGAAGCATGTCCGCTGATCCT
TGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGGCAC
CACCGGTCGTGGTATCGGGCCTGCTTATGAAGATAAAGTAGCACGTCGCGGTCTGCGTGTGGC
GACCTTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAACCTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAACCTCC
AGTTGGTTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTTCTGGATGATACGATGGC
TGTTGCCGACATCCTGACTTCTATGGTGTGGTACGTTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTCAGC

GTGGCGATTCGTCATGTTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTACATA
TCCGTACGTAACCTTCTTCCAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGCCCCG
CGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTGGGGGCAGGTCCGTT
CCCACCGAACTGTTTGTGAACTGGCGAGTTCCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGCGCA
ACTACGGGTCGTCGTCGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTTCGTCGTGCGGTACAGT
TGAACCTCCCTGTCTGGCTTCTGCCTGACTAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTTAA
ACTCTGNNTTTT

M4 *purA*

NNGNNAACGNGGCATCCCGTTCGTGAGCGTCTGCTGCTGTCCGAAGCATGTCCGCTGATCCT
TGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGGCAC
CACCGGTCGTGGTATCGGGCCTGCTTATGAAGATAAAGTAGCACGTCGCGGTCTGCGTGTGGC
GACTTTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAACTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAACCTCC
AGTTGGTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTTCTGGATGATACGATGGC
TGTTGCCGACATCCTGACTTCTATGGTTGTTGACGTTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTCAGC
GTGGCGATTCGTCATGTTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTACATA
TCCGTACGTAACCTTCTTCCAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGCCCCG
CGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTGGGGGCAGGTCCGTT
CCCACCGAACTGTTTGTGAACTGGCGAGTTCCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGCGCA
ACTACGGGTCGTCGTCGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTTCGTCGTGCGGTACAGT
TGAACCTCCCTGTCTGGCTTCTGCCTGACTAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTTAA
ACTCTGNNTTTT

M5 *purA*

NNNTGGNNAACGNGGCATCCCGTTCGTGAGCGTCTGCTGCTGTCTGAAGCATGTCCGCTGATCC
TTGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGGCA
CCACCGGTCGTGGTATCGGGCCTGCTTATGAAGATAAAGTAGCACGTCGCGGTCTGCGTGTGG
CGACTTTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAACTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAACCTC
CAGTTGGTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTTCTGGATGATACGATGG
CTGTTGCCGACATCCTGACTTCTATGGTGGTTGACGTTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTCAG
CGTGGCGATTCGTCATGTTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTACTT
ATCCGTACGTAACCTTCTTCCAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGCCC
GCGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTAGGTGCAGGTCCGT
TCCCGACCGAACTGTTTGTGAACTGGCGAGTTCCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGCGC
AACTACGGGGCGTCGTCGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTTCGTCGTGCGGTACAG
CTGAACTCCCTGTCTGGCTTCTGCCTGACTAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTTA
AACTCTGCGTGNTTACCCCGTAGGGAGNCGGAACGGGCAACGGTTTTCCAAGCCAGCCGGGT
ACAACGACCACGCCCCGTAATTGCGCCCCGAATTCGTTACCCCTGCTTGCAGAGGAACTCGTCAG
TTTCATCAAACAGTTCGGTCGGAAACGGACCTGCACTACACGAGTGAGTAGCTT

M8 *purA*

NNNNANANNNGGCATCCCGTTCGTGAGCGTCTGCTGCTGTCTGAAGCATGTCCGCTGATCCTTG
ATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGGCACCA
CCGGTCGTGGTATCGGGCCTGCTTATGAAGATAAAGTGGCACGTCGCGGTCTGCGTGTGGCGA
CCTTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAACTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAACCTCCAG
TTGGTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTTCTGGATGATACGATGGCTG
TTGCCGACATCCTGACTTCTATGGTGGTTGACGTTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTCAGCGT
GGCGATTCGTCATGTTTGAAGGTGCTCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTACTTATC
CGTACGTAACATCTTCCAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGCCCCGCG
TTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTGGGTGCAGGTCCGTTCC
CGACTGAACTGTTTGTGAACTGGCGAGTTCCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGCGCAAC
TACGGGTCGTCGTCGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTTCGTCGTGCGGTACAGCTG
AACTCCCTGTCTGGCTTCTGCCTGACCAAGCTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTGAAAC
TCTGCTGNTTACCCCCATAGGGANCCGAACGGCAACGGTTTTCCAACCCGCCCCGGTACNACAAC
ACAACCCCGAATTTCCCAAATTCGTTACCCGGCTTGCAAAGAACCCTCCATTTTCTCAAAC
ATTTATTTCGGGAACGGACCTGCCCCATCAATGGGAGTAAGCTTTAAGGTAC

M10 *purA*

NNNGNNNANNNNGGCATCCCCNTTCGTGAGCGTCTGCTGCTGTCTGAAGCATGTCCGCTGATCC
TTGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGGCA
CCACCGGTCGTGGTATCGGGCCTGCTTATGAAGATAAAGTGGCACGTCGCGGTCTGCGTGTTGG
CGACCTTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAACTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAACCTC
CAGTTGGTTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTTCTGGATGATACGATGG
CTGTTGCCGACATCCTGACTTCTATGGTTGTTGACGTTTCTGATCTGCTCGACCAGGCGCGTCAG
CGTGGCGATTTTCGTCATGTTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTACTT
ATCCGTACGTAACCTTCTCCAACACCCTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGCC
ACGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTGGGTGCAGGTCCGT
TCCCGACTGAACTGTTTGGATGAAACTGGCGAGTTCCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGCGC
AACTACGGGTCGTGCTGCTGCTGACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTCTGCTGCGGTACAG
CTGAACTCCCTGTCTGGCTTCTGCCTGACCAAGCTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTGA
AACTCTGCGTGGTTATAACCGCGNAATNAANNCGTACGGGCAACGGGGGTCCAAGCCAGGCCG
GGTACAACGACCGACGAACCCCGTAGTTGCGCCGACTCGTTACCCTGCTTGCAGGAGGAACTCG
CCAGTTTCATCAAACAGTCAGTCGGGATCGGACCTGCACCCACACGAGTGNNTA

M11 *purA*

NNNTNGNGAANNNGGCATCCCGTTCGTGAGCGTCTGCTGCTGTCCGAAGCATGTCCGCTGATC
CTTGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGGC
ACCACCGTTCGTGGTATCGGGCCTGCTTATGAAGATAAAGTAGCACGTCGCGGTCTGCGTGTTG
CGACCTTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAACTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAACCT
TCCAGTTGGTTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTTCTGGATGATACGAT
GGCTGTTGCCGACATCCTGACTTCTATGGTTGTTGACGTTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTC
AGCGTGGCGATTTTCGTCATGTTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTAC
ATATCCGTACGTAACCTTCTCCAACACCCTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGC
CCGCGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTGGGGCAGGTCC
GTTCCCGACCGAACTGTTTGGATGAAACTGGCGAGTTCCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGC
GCAACTACGGGTCGTGCTGCTGCTGACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTCTGCTGCGGTAC
AGTTGAACTCCCTGTCTGGCTTCTGCCTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGT
TAAACTCTGCGTGNTT

65 *purA*

NNTGNNACGTGANACCCGTTCCCTGAGCGTCTGCTGCTGTCTGACTGTGTCCGCTGATCCTTGATA
ATCTCGTTGCGCTGGATAACGTGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCCATCGAAGCCACCG
GCCGTGGTATCCGGCTGCTTATGAAGATAATGAAGATCGTCGCGGTCTGCGTGTTGTGGACCT
TTTCGACCTTTAAACCTTCGATGAATTACTGAAAGAAGTGATGGAATATCTCAACTTCCACTTGG
TTAACTACTACAAATCTGAAGCGGTTGATTACCATAAAGTTCTGGATGATACGATGGATGTTGC
CGACGTCCTGACTTCTATGGCGTCTGACGTTTCTGACCTGCTCGACCTGGTCCGTCAGCGTGGTG
ATTTTCGTCATGTTTGAAGGGGCTCAAGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGCACTTATCCGTA
CTTTACTTCTTCCAACCTCCTCTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGGTCCGGCCTGGCCCCGCTGTATG
TTGATTATGTTCTGGGTATCCTCAAAGTTTACTCAACTCACGCAGGTGCAGGTCCGTTCCCGACC
GACCTGATTGATGAGACTGATGAGTTCTCTAGTACCTCGGTAACCAAGTCAACGCATCTACCG
CGCTCCTCGTCGTAACCGCTGGCTGGACTCCGTTGCCGTTCTGTCGCGCGGACATGTGAACTCC
CTGACTGGCTTCTGCCTGACTAAACTGAATGTTCTGGATGGTCTGAATGAGGTGAAACTCTGCA
ACTTNNNTTNNCCCCCTANTTNNNTNNTCCGGNGTTCAAGCCGTTCCCGGCCAGCCAGTAACC
CCCACAATTCCCCCTAATTGCGTTACACCTGCTTTGCCCGAGATAGTCGCGAATTCCCCAGTTTT
TCGTCGGTACGGCACCTGCCCCCTACCTCAACTTACACAAGTTGAGT

67 *purA*

NNNGNAAACNNNGGCATCCCGTTCGTGAGCGTCTGCTGCTGTCCGAAGCATGTCCGCTGATC
CTTGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGGC
ACCACCGTTCGTGGTATCGGGCCTGCTTATGAAGATAAAGTAGCACGTCGCGGTCTGCGTGTTG
GCGACCTTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAACTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAACCT
TCCAGTTGGTTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTTCTGGATGATACGAT
GGCTGTTGCCGACATCCTGACTTCTATGGTTGTTGACGTTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTC
AGCGTGGCGATTTTCGTCATGTTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTAC

ATATCCGTACGTAACCTTCTTCCAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGC
CCGCGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTGGGGGCAGGTCC
GTTCCCGACCGAACTGTTTGATGAAACTGGCGAGTTCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGC
GCAACTACGGGTCGTCGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTGTCGTCGCGGTAC
AGTTGAACTCCCTGTCTGGCTTCTGCCTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGT
TAAACTCTNTTTN

68 *purA*

NNNNNGGNNACGNNGGCATCCCGTTCGTGAGCGTCTGCTGCTGTCTGAAGCATGTCCGCTGATC
CTTGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGGC
ACCACCGGTCGTGGTATCGGGCCTGCTTATGAAGATAAAGTAGCACGTCGCGGTCTGCGTGTG
GCGACCTTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAACTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAAC
TCCAGTTGGTTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTTCTGGATGATACGAT
GGCTGTTGCCGACATCCTGACTTCTATGGTGGTTGACGTTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTC
AGCGTGGCGATTTTCGTCATGTTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTAC
TTATCCGTACGTAACCTTCTTCCAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGC
CCGCGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCAACTCGTGTAGGTGCAGGTCC
TTTCCCGACCGAACTGTTTGATGAAACTGGCGAGTTCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGC
GCAACTACGGGCGTCGTCGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTGTCGTCGCGGTAC
AGCTGAACTCCCTGTCTGGCTTCTGCCTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGT
TAAACTCTGCNCNTTTCCCGGANNAGGACCCANGGGAAACCGGTTGTTACACCAACCGGTT
TAAAACAAAACGCCCAAGGTTGCTCGATACTCTGAACCCGAGTTGCCAGGAACTCTCCAGTTT
CTTCAAACGTTTCGGGGNNAAGGATCTGGC

69 *purA*

NNNNANNNNANGGNGGCATCCCNTTCGTGAGCGTCTGCTGCTGTCCGAAGCATGTCCGCTGATC
CTTGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGGC
ACCACCGGTCGTGGTATCGGGCCTGCTTATGAAGATAAAGTAGCACGTCGCGGTCTGCGTGTG
GCGACCTTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAACTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAAC
TCCAGTTGGTTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTTCTGGATGATACGAT
GGCTGTTGCCGACATCCTGACTTCTATGGTTGTTGACGTTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTC
AGCGTGGCGATTTTCGTCATGTTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTAC
ATATCCGTACGTAACCTTCTTCCAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGC
CCGCGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTGGGGGCAGGTCC
GTTCCCGACCGAACTGTTTGATGAAACTGGCGAGTTCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGC
GCAACTACGGGTCGTCGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTGTCGTCGCGGTAC
AGTTGAACTCCCTGTCTGGCTTCTGCCTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGT
TAAACTCTGNTCTATANNAACNGNAGTNAANCCGAAATCTCGCGGTACTTTCCGGGACTCTTG
AACACATTGCACCAGAAGCGCGCTCGAATGCTGCTAGAAAGATATCATCAGGGAAGCGCTTGG
GGA

72 *purA*

NNCCNNNTCGTGAGCGTCTGCTGCTGTCCGAAGCATGTCCGCTGATCCTTGATTATCACGTTGC
GCTGGATAACGCGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGGCACCACCGGTCGTGGTAT
CGGGCCTGCTTATGAAGATAAAGTAGCACGTCGCGGTCTGCGTGTGGCGACCTTTTCGACAAA
GAAACCTTCGCTGAAAACTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAACCTCCAGTTGGTTAACTACT
ACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTTCTGGATGATACGATGGCTGTTGCCGACATCCT
GACTTCTATGGTTGTTGACGTTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTCAGCGTGGCGATTTTCGTC
TGTTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTACATATCCGTACGTAACCTC
TTCCAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGCCCGGTTATGTTGATTAC
GTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTGGGGGCAGGTCCGTTCCCGACCGAACTGTT
TGATGAAACTGGCGAGTTCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGCGCAACTACGGGTCGTCGT
CGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTGTCGTCGCGGTACAGTTGAACTCCCTGTCTG
GCTTCTGCCTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTTAAACTCTGTTTTTT

73 purA

NNNNNNACGGNGNGCATCCCCGTTCTGTGAGCGTCTGCTGCTGTCCGAAGCATGTCCGCTGATCC
TTGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGGCA
CCACCGGTCGTGGTATCGGGCCTGCTTATGAAGATAAAGTAGCACGTCGCGGTCTGCGTGTGG
CGACCTTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAACTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAACCTC
CAGTTGGTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTTCTGGATGATACGATGG
CTGTTGCCGACATCCTGACTTCTATGGTTGTTGACGTTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTCAG
CGTGGCGATTTTCGTATGTTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTACAT
ATCCGTACGTAACCTTCTTCCAACACCCTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGCC
GCGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTGGGGCAGGTCCGT
TCCCGACCGAACTGTTGATGAAACTGGCGAGTTCCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGCGC
AACTACGGGTCGTCGTCGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTCTGTCGTGCGGTACAG
TTGAACTCCCTGTCTGGCTTCTGCCTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTTA
AACTCTGCGTGGNTTANCCGGTATGA

75 purA

NGNNGAACGGTGGGCATCCCGTTCGTGAGCGTCTGCTGCTGTCTGAAGCATGTCCGCTGATCCT
TGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGAGAAAGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGGCAC
CACCGGTCGTGGTATCGGGCCTGCTTATGAAGATAAAGTAGCACGTCGCGGTCTGCGTGTGGC
GACCTTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAACTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAACCTCC
AGTTGGTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTTCTGGATGATACGATGGC
TGTTGCCGACATCCTGACTTCTATGGTGGTTGACGTTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTCAGC
GTGGCGATTTTCGTATGTTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTACTTA
TCCGTACGTAACCTTCTTCCAACACCCTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGCCCG
CGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTAGGTGCAGGTCCGTT
CCCGACCGAACTGTTTGTGATGAAACTGGCGAGTTCCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTCGGCGCA
ACTACGGGGCGTCGTCGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTCTGTCGTGCGGTACAGC
TGAACTCCCTGTCTGGCTTCTGCCTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTTAA
ACTCTGCTGN

- **gyrB (DNA giraza)**

M1 gyrB

GNNNNNNNNCNTGGTATTTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTG
TAAAGAAATTATCGTCACCATTACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGC
ATCCGACCGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGC
ACGCAGGCGGTAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTGGTGT
TTCGGTAGTAAACGCCCTGTGCAAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTCAC
CGTCAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAA
ACCGGCACCATGGTGCCTTCTGGCCTAGCCTCGAAACCTTACCAATGTGACCGAGTTTCAAT
ATGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTGCTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTTCGTCTG
CGCGACAAGCGTGACGGCAAAGAAGACCCTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAAGCGTTTCGTT
GAATATCTGAACAAGAACAACCGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACCGAAAAAG
ATGGTATCGGCCTTGAAGTGGCGTTGCAGTGGAAACGATGGCTTCCAGGAAAACATCTACTGCTT
TACCAACAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTCACCTGGCAGGCTTCCGTGCGGCGATGACC
CGTACCCTGAACGCCATACATGGACAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACC
GGTGACGATGGCGNNGGGGGGGCGTAAGAAATAAAAAAAGANNTGGTCCCTTTTTTTGGGCCG
CCTCTTTAAAAATAAAAAAATACCTAAAGAGAAATTTTTCNAAAATTTTAAAAATTTGC

M2 gyrB

CNNGNCCNNGNNATTTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAA
AGAAATTATCGTCACCATTACGCCGATAACTCTGTCTCCGTACAGGATGATGGGCGCGGCATT
CCGACCGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCAC
GCAGGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTGGTGT
CGTTGTAAACGCCCTGTGCAAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTCACCG
TCAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCTCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAA
CGGCACCATGGTGCCTTCTGGCCCAGCCTCGAAACCTTACCAATGTGACCGAGTTTCAATAT

GAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTTCGTCTGCG
CGACAAGCGTGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTTGA
ATATCTGAACAAGAACAACCGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACCGAAAAAGAC
GGTATTGGCGTCAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAACATCTACTGCTTTAC
CAACAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTCACCTGGCAGGCTTCCGTGCGGCGATGACCCGT
ACCCTGAACGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTTAGCGCCACCGGT
GACGATGCTNNAGGGCCGGGAATATATAAAAAAAAAAAAAAGGTGGCTTATCCTCCACTAAAGGA
AATGAATTAAGTCAACGGCGTATTCTACCCGATAGGAGGTTACCGTGTA AAAACTTA

M3 *gyrB*

NNNNNCAATGGTATTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAA
AGAAATTATCGTCAACATTCACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGCATT
CCGACCGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCAC
GCAGGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGT
CGGTAGTAAACGCCCTGTGCAAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTCACC
GTCAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCCCGCTGGCGGTTACCGGCGGAGACTGAAAAA
CCGGCACCATGGTGCCTTTCTGGCCAAGCCTTGAACCTTACCAATGTGACCGAGTTCGAATA
TGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTTCGTCTGC
GCGATAAGCGCGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTTG
AATATCTGAACAAGAACAACCGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTTCCACCGAAAAAGA
CGGTATTGGCGTCAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAAACATCTACTGCTT
ACCAACAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTCACCTGGCAGGTTTCCGTGCGGCGATGACCC
GTACTCTGAACGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACCG
GTGACGATGCGNGGGCGGGCGNAATAAAAAATAAAAAAAAAAACCTTTGCGGAACTTTTTGGG
CAATTTAAAGAGTCTAGGTCTCTGCGTACGCCATCTTTTGGAGAGTGTTAAATGCAAT

M4 *gyrB*

GNNNNAACGTCNNGGTATTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACT
GTAAAGAAATTATCGTCAACATTCACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGG
CATTCCGACCGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTG
CACGCAGGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTG
TTTCGGTAGTAAACGCCCTGTGCAAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTC
CCGTACAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCCCGCTGGCGGTTACCGGCGGAGACTGAAAA
AACCGGCACCATGGTGCCTTTCTGGCCAAGCCTTGAACCTTACCAATGTGACCGAGTTCGAA
TATGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTTCGTCT
GCGCGATAAGCGCGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGT
TGAATATCTGAACAAGAACAACCGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTTTCCACCGAAAAA
GACGGTATTGGCGTCAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAAACATCTACTGCT
TTACCAACAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTCACCTGGCAGGTTTCCGTGCGGCGATGAC
CCGTACTCTGAACGCCTACATGGACGAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAACTCAGCGCCAC
CGGGGACGATGCGCGTGCGGNNGTGAAAAAAAAAAAAAAAAANTGTTGAAATGGTGANNITCAA
CGGGTCTTCTCTGATCGAGATATACCGTGAAGAGNTCTGATTTCAAGTCTGATTAGC

M5 *gyrB*

NNNNNNCTCANNGNATTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACT
GTAAAGAAATTATCGTCAACATTCACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGG
CATTCCGACCGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTG
CACGCAGGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTG
TTTCGGTAGTAAACGCCCTGTGCAAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTC
CCGTACAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCTCCGCTGGCGGTTACCGGCGGAGACTGAAAA
AACCGGCACCATGGTGCCTTTCTGGCCCAGCCTCGAAACCTTACCAATGTGACCGAGTTCGAA
TATGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTTCGTCT
GCGCGACAAGCGCGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGT
TGAATATCTGAACAAGAACAACCGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACTGAAAAA
GACGGTATTGGCGTCAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAAACATCTACTGCT
TTACCAACAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTCACCTGGCAGGCTTCCGTGCGGCGATGAC
CCGTACCTGAACGCCTACATGGACGAAGAAGGCTACGGCAAAGCAAGCCAACCTAAGCGCCG

CGGGTGCATGCGGTGCAGNNNCTATATAACAAAAAAATNGAGTTTTGAGCCCCTGGTCC
TGACCCGCGCTTCCTTCTGAGGACCTGTTTCATGAGATGGACGTCATGTAAGGTTTTN

M8 *gyrB*

CTNGGAGCGNNNATAGTCTGGTGTGAGATTGGCCCGCGTCCCTCGAGAGGTATGGGGGGTA
TCCACTGTGTGCTCGCCCTTCGCGCGCCGGGGGGCCTCCCAGGAGGTAGGTTGGGAAAAGCGGC
TCCTGGAGGTTGATAACTTCACCGATGGAGCAGCGGCGGCTACTTTTCTGCAATTTTTGAGCAG
CCGGGGGCAGAAATCAGAATGAGTCCCCTCTGATCCAGGGGTGCGATGGTTAGGTGTTGCAG
AGGATAACACCCAAACAATTAGGCTCAACATACGTATTGCCGAACATTTATAAATTGACGTGG
AATCTCAAGAAAAGAGCACACAACCCCGACTTTTGATACGGCCACAATATAAAAACCTGGT
CGTGTTCGGATCTAGCCTAGATTTCGGGACTTTGAGCAACGGGACCGAATGCGCGGAGCACATT
CCGGCAAACGGACTGGCGGTAGTCTGTGTTTTTCCATCCCAGTCTCTTCTTCTGAGCAACAAAC
GTCACATCGAAAAGGAGACTTTTATAGGTAGCGGGCACTTATCTTCGTGGTGTGTATAATCATA
AGCACACGCCGAACCCCCCATATTTTTCTGCTAAAACCAAGAGCTATTCCCACGGTTAACTC
GTTAAAAGGAAATCGGCCGATAAGAAAAAATATTATTTTTTACAAAACACTGTTCACTTTTTTC
ACAGAGGCACCCCGAGGCTTCCACGTGAAGGGGGAACGCACACCACCGCGCCCTCTGGGG
AAAAAAAAGNTCTTTATCTCGGTAAGGATGACTGGCCCTGGCGGTGGGACGGGTATTACACGC
GGAACAAGCGGTATCGGACGACGGAAGCTCTTCGTGACTGTTCTTCGAGCAAAGCGGAAAAT
NTTGCGAAAACCTTCTTAAACAGCGCACGGAGGTCCGCACAG

M10 *gyrB*

NNNNNNNGCANTGGTATTTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTG
TAAAGAAATTATCGTCACCATTACCGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGT
ATCCGACCGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGC
ACGCAGGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGT
TTCGGTAGTAAACGCCCTGTGCAAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTCAC
CGTCAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCTCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAA
ACCGGCACCATGGTGCCTTTCTGGCCAGCCTCGAAACCTTACCAATGTGACCGAGTTCGAAT
ATGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTCTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTTCGTCTG
CGCGATAAGCGCGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTT
GAATATCTGAACAAGAACAACCGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACTGAAAAAG
ACGGTATTGGCGTGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAACATCTACTGCTG
TACCAACAACATTCCGACGCGTACCGGCGGTACTCACCTGGCAGGCTTCCGTGCGGGCGATGAC
CCTTACTATGAGCGCTACGTGGACGAAGAACGATAGCGTTATCAACCAACCTCAACTCCACCG
GGGGGGGAGACGGTGCCTCNCGGTAGAAGAAAAAANNTAGCGTTATNGATGCACTGTG
AGCGNGTCTACCTCCGTCATACTGCATATACGGNNNACATCATCATGGNNAGTTANN

M11 *gyrB*

AANNNAACGCCTTCTTTTTGNGGNGGTGATAACGCTATCGCCNAAGCGCTCGCGGGTCTGTGA
AGAATTTATTGGCATTTCACACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGCAT
TCCGACCGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCAC
GCAGGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGT
CGGTAGTAAACGCCCTGTGCAAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTCACC
GTCAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCCCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAA
CCGGCACCATGGTGCCTTTCTGGCCAAGCCTTGAACCTTACCAATGTGACCGAGTTCGAATA
TGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTCTTCTCAACTCCGGGGTTTCCATTCTTCTGC
GCGATAAACCGGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTTG
AATATCTGAACAAGAACAACCGCCATCCACCCGAATATCTTTTACTTTTTCCACCCAAAAAGA
CAGTGTGGGGCCTAAATGCGGTTTCAAAGCGAAGATGTCTTCCAGGAAAACATCTACTGTTTT
TTTTAACAACATTCCGCAGCGTGTGCGCGGTAGTCTTACGGTAGGTGTCTTACAAAACAATGAT
TACCACCCCGTACCCCTCCCCGGGCAACACACAAGNACTGTGTGTCTGGCCGGGATGATGGGGC
ATGTTTTGGGGGAGGATTCAATGTGTTTCGGGGAGTATCTCACGCGCAACTGAGCTTGACCTTCT
CCATGCAGTGGTATATTTGACAATACTCCTATAAGGGACGGACGCTCTGTCCGCGTT

63 *gyrB*

GNNNNNTCGNGCATGCAGCATGCCTACTAGCGCGTACTGTTTGCCTGCGGTGAGAGAACTGTCT
GAGTTACGCTCTTCCCCGGTGTTTTTACCAGCAGCAGTCGATCTGAGAAGAAACGAGCCTGCT

GACCGTCGCCTTCAACGTTCAAGGCGATCAACAACGTCCTGTTTCGCCCTGGAGTGGACGAACCAG
AGATAGACCAAAACGTGCAGCTGCCTGGGCCATAGACAGGGTTGCAGACCCGCCACCGGCTTT
CGCTTCAACCACCTCAGTACCCGCGTTCTGGATACGTTTGGTCAGATCAGCCACTTCTGCTCGG
TAAACTAACGCCAGGAACCTGTGACAGCAGCGGCAGAATGATAACACCAGAGTGACCACCAA
TAACCGGCACTTCAACTTCGCCTGGCTGTTTGCCTTTCAGTTCCGCAACACAGGTGTTGGAACGA
ATGAAATCCAGCGTGAACACGCCGAACAGTTTGTGTTTGTGCATAAACGCCGGCTTTTTTCAGCA
CTTCAGTCGCCATCGCAACTGTAGTGTTACGGGGTTAGTGATAATACCAATGCACGCTTTCAG
GTAGGTTTTTCGCAACTTGATGTACGAGGCTGTTACGATACCGGCGATGACGTTAAACAGGTTG
CAACGATCCATATGCGGTTGACGCGCTACCCCTGTGGAGATAAGAACGACATCTGCACCGTACC
AGCGCCGAAGTCGCATCTTCACTGAAAAACCTTTGATTTTACAGCAGTAGGTATATGCCTCA
CATCGACAGCGACGCTGGGAGAACTGGAGCGATATCATACAGATATAGTTCTGCACTTGACG
CATTTGGGTTTTTAACAGTGGAGCAAGCGCCTGTCATCAGCAGAGTGCCAGCG

65 *gyrB*

NNNNANNAANNNGNNATTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGT
AAAGAAATTATCGTCACCATTACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGCA
TTCCGACCGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCA
CGCAGGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGT
TCGGTAGTAAACGCCCTGTGCAAAAACCTGGAGCTGGTTATCCAGCGGAGGGTAAATTCACC
GTCAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCTCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAAA
CCGGCACCATGGTGCCTTTCTGGCCAGCCTCGAAACCTTACCAATGTGACCGAGTTTCAATA
TGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTGCTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTCTGCTGC
GCGACAAGCGCGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTTG
AATATCTGAACAAGAACAACGCGGATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACTGAAAAAGA
CGGTATTGGCGTCGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAACATCTACTGCTTT
ACCAACAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTAACCTGGCAGGCTTCCGTGCGGCGATGACCC
GTACCCTGAACGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACCG
GTGACGATGCTAAAGGGGNGGNGGNATNANNANATAAAAAAACTTTGTGCGGCAAATTATAA
GAGCCAGGGGCCCTGCACCACGCTACCTTTGGGCCCATGTTAACATGCAAAGGAAA

67 *gyrB*

NNNNGACTCNNGNATTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTA
AAGAAATTATCGTCACCATTACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGCAT
TCCGACCGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCAC
GCAGGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGT
CGGTAGTAAACGCCCTGTGCAAAAACCTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAATTCACC
GTCAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCCCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAAA
CCGGCACCATGGTGCCTTTCTGGCCAAGCCTTGAACCTTACCAATGTGACCGAGTTTCAATA
TGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTGCTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTCTGCTGC
GCGATAAGCGCGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTTG
AATATCTGAACAAGAACAACGCGGATCCACCCGAATATCTTCTACTTTTCCACCGAAAAAGA
CGGTATTGGCGTCGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAACATCTACTGCTTT
ACCAACAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTAACCTGGCAGGTTTCCGTGCGGCGATGACCC
GTACTCTGAACGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACCG
GTGACGATGGNAAGGGGCGGGCGANCTGATANAAAAAAACTTATTCTAGGTGATAGG
GTAACCGGGTAAGAACATATTATTTAAAATTTGACTAGACTTCTGTGACGCTGGGATT

68 *gyrB*

NNCANNANGCNNNNATTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTA
AAGAAATTATCGTCACCATTACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGCAT
TCCGACCGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCAC
GCAGGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGT
CGGTAGTAAACGCCCTGTGCAAAAACCTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAATTCACC
GTCAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCCCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAAA
CCGGCACCATGGTGCCTTTCTGGCCTAGCCTCGAACTTTCACCAATGTGACCGAGTTTCAATA
TGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTGCTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTCTGCTGC
GCGACAAGCGCGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTTG

AATATCTGAACAAGAACAACAAAACGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACTGAAAAAGA
CGGTATTGGCGTCGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAACATCTACTGCTTT
ACCAACAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTIONTGGCAGGCTTCCGTGCGGCGATGACCC
GTACCCTGAACGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTTAGCGCCACCG
GTGACGATGCGNNGGGCGGNGTGATATAGAATAAAAAANAGTCCCCGACTAACCTATCTTTGGGA
CCATTTTTATAAATAAATGTATCTTTAATAATTTTTTTCACACATTTACAAACTTTTCC

69 *gyrB*

NNNNNNNNNGGNATTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAA
AGAAATTATCGTCACCATTACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGCATT
CCGACCGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCAC
GCAGGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGT
CGGTAGTAAACGCCCTGTGCAAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTCACC
GTCAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCCCGCTGGCGGTTACCGGCGGAGACTGAAAAAA
CCGGCACCATGGTGCCTTTCTGGCCAAGCCTTGAACCTTACCAATGTGACCGAGTTCGAATA
TGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTGCTTCCACTCCGGCGTTTCCATTTCGTCTGC
GCGATAAGCGCGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTTG
AATATCTGAACAAGAACAACAAAACGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTTTCCACCGAAAAAGA
CGGTATTGGCGTCGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAACATCTACTGCTTT
ACCAACAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTIONTGGCAGGTTCCGTGCGGCGATGACCC
GTACTCTGAACGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACCG
GTGACGATGCGNNGGGCGGGGAAAAATAAAAAAAAAGTAGTTTGTCAAGTCCGGTGGATGCCG
CCATCGTTAAGATGATTACCTCCACGCCACGTGCGTAGAGGAGTCATTGAGTACCATCC

72 *gyrB*

NNGNACGNCNNGNATTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGT
AAAGAAATTATCGTCACCATTACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGCA
TTCCGACCGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCA
CGCAGGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGT
TCGGTAGTAAACGCCCTGTGCAAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTCACC
GTCAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCCCGCTGGCGGTTACCGGCGGAGACTGAAAAAA
CCGGCACCATGGTGCCTTTCTGGCCAAGCCTTGAACCTTACCAATGTGACCGAGTTCGAATA
TGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTGCTTCCACTCCGGCGTTTCCATTTCGTCTGC
GCGATAAGCGCGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTTG
AATATCTGAACAAGAACAACAAAACGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTTTCCACCGAAAAAGA
CGGTATTGGCGTCGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAACATCTACTGCTTT
ACCAACAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTIONTGGCAGGTTTCCGTGCGGCGATGACCC
GTACTCTGAACGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACCG
GTGACGATGCGNNGGGGCGGGANAAAAAAAANAAATGACTTTTTTCGAAGTTTTGGCTC
CGTTCAAATATCTAGCTTCCACTCTTCTAATTCTGGCGGAGAGAATAAAAAAATCCAA

73 *gyrB*

NCNGANNNGNATGNATTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTG
TAAAGAAATTATCGTCACCATTACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGC
ATTCCGACCGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGC
ACGCAGGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGT
TTCGGTAGTAAACGCCCTGTGCAAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTCACC
CGTCAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCCCGCTGGCGGTTACCGGCGGAGACTGAAAAAA
ACGGGCACCATGGTGCCTTTCTGGCCAAGCCTTGAACCTTACCAATGTGACCGAGTTCGAAT
ATGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTGCTTCCACTCCGGCGTTTCCATTTCGTCTG
CGCGATAAGCGCGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTT
GAATATCTGAACAAGAACAACAAAACGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTTTCCACCGAAAAAG
ACGGTATTGGCGTCGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAACATCTACTGCTT
TACCAACAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTIONTGGCAGGTTCCGTGCGGCGATGACC
CGTACTCTGAACGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACC
GGTGACGTGCGNNGGGGGGGGNANTATATATAAAAAAACTNNGTNGTNTTTNTTCGGTCCG
TGCAGCCCTGCTTTCTATCGATAAGATTCATCTCCACTAGGAGTGTGTAGTTCGTTT

75 *gyrB*

NNNNNNNATTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAAAGAAA
TTATCGTCAACCATTACGCCGATAACTCTGTCTGTACAGGATGACGGGCGCGGCATTCCGAC
CGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGTATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCACGCAGG
CGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGTTCGGTA
GTAAACGCCCTGTGCAAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTACCGTCAG
ATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAAACGGC
ACCATGGTGCCTTTCTGGCCCAGCCTCGAAACCTTACCAATGTGACCGAGTTCGAATATGAAA
TTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTGCTTCTCAACTCCGGCGTTTCCATTCTGCTGCGCGAC
AAGCGCGACGGCAAAGAAGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTTGAATAT
CTGAACAAGAACAAAACGCCGATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACTGAAAAAGACGGTA
TTGGCGTCGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGGAAAAACATCTACTGCTTTACCAA
CAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTIONTGGCAGGCTTCCGTGCGGCGATGACCCGTACC
CTGAACGCCCTACATGGACAAAAGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTTAGCGCCACCGGTGCGT
GNNGGGGCGGGGCGAATATATATAAAAAAAGCGNGTTGCNGCANAGTGAGCTTCGCAACTG
GAGCCTGGTTCGTAGCATGATAGATCCTACCAGTGAACACTAGCGTCAGGATGAGAAGAA

- *recA* (ATP/GTP vezavni motiv)

M1 *recA*

NNNNNNNNGNAGCTGTACACGCACCTGCTTTCTCGATCAGCTTCTCTTTACGCCCAGATCAAC
CAGTTCGCCATAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGGAATTCAGCCTGTTTAAACGGC
GCAGCGATTTTGTCTTACCACCTTTCACACGGGTTTCGCTACCCACCACGTTTTTCGCCCTCTTT
ACCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGCGTAGAATTTACGCGCGTTACCACCG
GTAGTGGTTCCGGGTTACCGAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAGATCA
GCAGCGTGTGGACTGCTTACAGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGCTCATCATACTGCG
CGCAAGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTTCCGCTTTCGCTTTCGGCGTCAGTGCCGCC
ACGGAGTCAACGACGATAACGTCTACTGCACCAGAACGCGCCAGGGCGTCACAGATTTCCAGT
GCCTGCTCGCCAGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTGATATCGACGCCAGTTTACGTG
CATAGATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTTTCTTTTACGCTAAA
AAAAAGTTCGATATCACCTCTATTGTAGTCTTTGTCCCCGATACCCTTCGGCACCGTGATCCGG
TGAGGGGTGCTGTCTGGAGGGTGAATGACTAAACTGGAAGTTTGGCAAAGCGAGCCCATGTTT
AATCTGCTGTTACCCGACCACCGCNAAGAAAGTTCTT

M2 *recA*

NNNANNNTTGTAGCTGTACCACGCGCCTGCTTTCTCGATCAGCTTCTCTTTACGCCCAGGTCAA
CCAGTTCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGAAATTCAGCCTGTTTAAACGG
TGCAGCGATTTTGTCTTACCACCTTTCACGCGGGTTCGCTACCCACCACGTTTTTCGCCCTCTTT
CACCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGCGTAGAATTTACGCGCGTTACCACC
GGTAGTGGTTTCCGGGTTACCGAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAGATC
AGCAGCGTGTGGACTGCTTACAGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGCTCATCATACTG
CCGCAAGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTTCCGCTTTCGCTTTCGGCGTCAGTGCCGCC
ACGGAGTCAACGACGATAACGTCTACTGCGCCAGAACGCGCCAGGGCGTCACAGATTTCCAGT
GCCTGCTCGCCGGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTATCGATATCGACGCCAGTTTACGTG
CGTAGATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTTTCCCTTTCACGCTCAA
ANGTCCACGGCGCGGAAACCGACTCACCGGGCGGCTGGGCAGCTGCTGCCTGTCGTATGCAG
AACAGCTGACCTCCTTGTGTGGCTTACAGCATGACAAACTGGAGGTCCTGGACGGCCAAAAAGA
GGATAAACTCTGGGNTATN

M3 *recA*

GNNANNNTTGTGCTGTACCACGCGCCTGCTTTCTCGATAAGCTTCTCTTTACGCCCAGGTCAA
CCAGCTCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGGAATTCAGCCTGTTTAAACGG
CGCAGCGATTTTGTCTTACCACCTTTCACGCGGGTTCGCTACCCACCACGTTTTTCGCCCTCTTT
CACCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGCGTAGAATTTACGCGCGTTACCACC
GGTAGTGGTTTCCGGGTTACCGAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAGATC
AGCAGCGTGTGGACTGCTTACAGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGCTCATCATACTG
CCGCAAGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTTACCTTCGATTTCCGCTTTCGGCGTCAGTGCCGCC

ACGGAGTCAACGACGATAACGTCTACTGCACCAGAACGTGCCAGGGCGTCACAGATTTCCAGT
GCCTGCTCGCCAGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTCGATATCGACGCCAGTTTACGTG
CGTAGATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTTANCNTCCCACGCTAAA
GNTCTCGTCGTCGTCGAGCTGTAGCGTTGTCGCTGCCGACCGTCGCCGTGCGCAGTGGGAGAC
TTGCAGAGTGCTGCCTGGTTACCGGGTGGGTAGGATGGACGGCTGAATGACTGAAAGCTGCTGT
CTCTGCGGTGATGG

M4 *recA*

NNNNGTNTGNAGCTGTACCACGCGCCTGCTTTCTCGATAAGCTTCTCTTTACGCCCAGGTCA
ACCAGCTCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGGAATTCAGCCTGTTTAAACG
GCGCAGCGATTTTGTCTTCACCACTTTCACGCGGGTTTCGCTACCCACCACGTTTTCGCCCTCTT
TCACCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGCGTAGAATTTACGCGCGTTACCAC
CGGTAGTGGTTTCCGGGTACCAGAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAGAT
CAGCAGCGTGTGGACTGCTTCAGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGTTCATCATACTG
GCCGCAAGGCCATGTGAGAGTCGCCGATTTACCTTCGATTTCCGCTTTCGGCGTCAGTGCCG
CCACGGAGTCAACGACGATAACGTCTACTGCACCAGAACGTGCCAGGGCGTCACAGATTTCCA
GTGCCTGCTCGCCAGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTCGATATCGACGCCAGTTTACG
TGCGTAGATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTTCTTTTACGCTA
AAAAGGTACGGGGCGTGAAAACCGGATGGCCGGCCTCCGTTGCCGGTGCGGACCGCCGTACAG
GTGAACCTGCTGACCGGGTTGGGCTTGAGCAAGATGGAAGTGCAGGATGTCTGGATAGGCAA
AACCTGAAGGTTGCCGGGTTAATGAGAT

M5 *recA*

ANNNNTNNTTGTAGCTGTACCACGCGCCTGCTTTCTCGATCAGCTTCTCTTTTACGCCCAGGTCA
ACCAGTTCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGAAATTCAGCCTGTTTAAACG
GTGCAGCGATTTTGTCTTCACCACTTTCACGCGGGTTTCGCTACCCACCACGTTTTCGCCCTCTT
TCACCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGCGTAGAATTTACGCGCGTTACCAC
CGGTAGTGGTTTCCGGGTACCAGAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAGAT
CAGCAGCGTGTGGACTGCTTCAGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGTTCATCATACTG
GCCGCAAGGCCATGTGAGAGTCGCCGATTTCCGCTTTCGCTTTCGGCGTCAGTGCCG
CCACGGAGTCAACGACGATAACGTCTACTGCACCAGAACGCGCCAGGGCGTCACAGATTTCCA
GTGCCTGCTCGCCGGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTATCAATATCGACGCCAGTTTACG
TGCGTAGATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTTACCTTTCACGCTA
AAACGCGTCTCCCCATCGTACCACCTGGTCGCTTGCCGCCTCCCGATCCTCGTGCGGTACAAC
GAAGACCCTGCCGGGGCGGCTGCCGGATGACCATGGAGGTCCTGATGGACGGGATGAAGGACT
GCTCTGCTGCTGATCACCCGGGTGNAG

M8 *recA*

NNANGNTGNNGCTGTACACGCACCTGCTTTCTCGATCAGCTTCTCTTTACGCCCAGATCAACC
AGTTCGCCATAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGGAATTCAGCCTGTTTAAACGGCG
CAGCGATTTTGTCTTCACCACTTTCACACGGGTTTCGCTACCCACCACGTTTTCGCCCTCTTTCA
CCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGCGTAGAATTTACGCGCGTTACCACCGG
TAGTGGTTTCCGGGTACCAGAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAGATCAG
CAGCGTGTGGACTGCTTCAGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGTTCATCATACTGCTGCC
GCAAGGCCATGTGAGAGTCGCCGATTTCCGCTTTCGCTTTCGGCGTCAGTGCCGCCA
CGGAGTCAACGACGATAACGTCTACTGCACCAGAACGCGCCAGGGCGTCACAGATTTCCAGTG
CCTGCTCGCCAGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTCGATATCGACGCCAGTTTACGTGC
ATAGATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTTCTTTCCACGCTAAAN
GCGGGACCAAAGACGACGTAACGGCTGGCCGGACAGCGTGGCCGCTCGTGCCTGCGCGTACAG
GTGAACCTGCTGACCGGCTTGTGCGGGACCAACTGGACGATCCGGAAGGTCCGGAGAGGTGAA
AACTGGAGAACTCCCTGGTNNG

M10 *recA*

GNNAATNNTTTTGTAGCTGTACNCGCGCCTGCTTTCTCGATCAGCTTCTCTTTACGCCCAGGTC
AACCAGCTCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGGAATTCAGCCTGTTTAAAC
GGCGCAGCGATTTTGTCTTCACCACTTTCACGCGGGTTTCGCTACCCACCACGTTTTCGCCCTC
TTTACCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGCGTAGAATTTACGCGCGTTACC

ACCGGTAGTGGTTTTCCGGGTTACCGAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAG
ATCAGCAGCGTGTGGACTGCTTCAGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGCTCATCATA
GTGCCGCAAGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTTCCGCTTCGATTTCCGCTTTCGGCGTCAGTGCC
GCCACGGAGTCAACGACGATAACGTCTACTGCGCCAGAACGCGCCAGGGCGTCACAGATTTCC
AGTGCCTGCTCGCCGGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTCGATATCGACGCCAGTTTAC
GTGCGTAGATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTTCCNTTCACGCTNA
AAACCGGATCGTCGTCCTCGTACCGGCTGGCTGGATTCCGATTGCCCGTTTCGTCGTGCGGTACA
GTTGAACCTCCCTGTCTGGGTTCTGCCTGACTAAACTGGACATTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTT
AAACTCTCTGCTGC

M11 *recA*

NNNNNNNNTNAGCTGTACCACGCGCCTGCTTTCTCGATAAGCTTCTCTTTCACGCCCAGGTCA
ACCAGCTCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGGAATTCAGCCTGTTAAACG
GCGCAGCGATTTTGTCTTCACCACTTTCACGCGGGTTTCGCTACCCACCACGTTTTTCGCCCTCTT
TCACCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGCGTAGAATTTACAGCGCGTTACCAC
CGGTAGTGGTTTTCCGGGTTACCGAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAGAT
CAGCAGCGTGTGGACTGCTTCAGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGCTCATCATACTG
GCCGCAAGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTTACCTTCGATTTCCGCTTTCGGCGTCAGTGCCG
CCACGGAGTCAACGACGATAACGTCTACTGCACCAGAACGTGCCAGGGCGTCACAGATTTCCA
GTGCTGACTCGCCAGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTCGATATCGACGCCCAGTTTACG
TGCCTAGATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTTACCTTTTACAGCT
ANAAAGNCGTAGTCNCGAAACGGACGGACGGCCTGCGTGGCCGCTCGTACTGCGCGACAAG
TGAACAGCTGACTGGCTTGTGTGTGTTTACTGGACGTCTGGATGGTCTGAAGAGCTGAAAAA
CTGAAGNTCTTCCGGTGTAACTGCTAGTAAGAGTTTT

65 *recA*

NNANNNGCTGTACCACGCGCCTGCTTTCTCGATCAGCTTCTCTTTTACGCCCAGGTCAACCAGT
TCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGGAATTCAGCCTGTTAAACGGCGCAG
CGATTTTGTCTTCACCACTTTCACGCGGGTTTCGCTACCCACCACGTTTTTCGCCCTCTTTACCC
CGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGCGTAGAATTTACAGCGCGTTACCACCGGTAG
TGGTTTTCCGGGTTACCGAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAGATCAGCAG
CGTGTGGACTGCTTCAGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGCTCATCATACTGCCGCA
AGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTTCCGCTTCGATTTCCGCTTTCGGCGTCAGTGCCGCCACGG
AGTCAACGACGATAACGTCTACTGCGCCAGAACGCGCCAGGGCGTCACAGATTTCCAGTGCCTG
CTCGCCGGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTCGATATCGACGCCCAGTTTACGTGCGTAG
ATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTNCAACNNAAGGNNNAGGCCGGC
CGGGTCGTCGTCACGATCCGGCTGGTTGGTTGCCGCTGCCGAGCTACCTGCGGTATAGTTGA
ACTCCCTGTCTGGTTTTCTGCCTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGACTGAAAGAGGTTAAACT
CTCTGCAGA

67 *recA*

NNNNTNTNNGCTGTACCACGCGCCTGCTTTCTCGATAAGCTTCTCTTTCACGCCCAGGTCAACC
AGCTCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGGAATTCAGCCTGTTAAACGGCG
CAGCGATTTTGTCTTCACCACTTTCACGCGGGTTTCGCTACCCACCACGTTTTTCGCCCTCTTTCA
CCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGCGTAGAATTTACAGCGCGTTACCACCGG
TAGTGGTTTTCCGGGTTACCGAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAGATCAG
CAGCGTGTGGACTGCTTCAGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGCTCATCATACTGTCG
GCAAGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTTACCTTCGATTTCCGCTTTCGGCGTCAGTGCCGCCA
CGGAGTCAACGACGATAACGTCTACTGCACCAGAACGTGCCAGGGCGTCACAGATTTCCAGTG
CCTGCTCGCCAGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTCGATATCGACGCCCAGTTTACGTGC
GTAGATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTCAACAGGATCAGTCAANT
TGTTTTTAAAAAGGAAAGGTTCTTACGTTTGTCTACGTCTGCGCCCCAGTGAACCTCCCAACGG
GTGGAGCATGATAGTCTGGACGTCTAGATGGCCTGAGAAGGTAAGTCTGTGTATCTCCCAAGCC
AGCACAAGCAGCAGTCGAAATTA AAAAGGTGATCACTGACGCATTCGACCCAATCGTCAAACA
T

68 recA

NNNNTNNAGCTGTNCACGCGCCTGCTTTCTCGATCAGCTTCTCTTTTACGCCCAGGTCAACCAGT
TCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGAAATTCAGCCTGTTTAAACGGTGCAG
CGATTTTGTCTTACCACCTTTCACGCGGGTTCGCTACCCACCACGTTTTTCGCCCTCTTTCACCG
CGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGGCGTAGAATTTACGCGCGTTACCACCGGTAG
TGGTTTCCGGGTACC GAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAGATCAGCAG
CGTGTGGACTGCTTACGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGCTCATCATACTGCGCA
AGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTTTCGCCTTCGATTTCCGCTTTCGGCGTCAGTGCCGCCACGG
AGTCAACGACGATAACGTCTACTGCGCCAGAACGCGCCAGGGCGTCACAGATTTCCAGTGCCTG
CTCGCCGGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTATCGATATCGACGCCAGTTTACGTGCGTAG
ATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGNTNAACTNGGGTNNANNNTGAG
ACCATGAACAATTGTTGGATTTTTGAAGTAGACCAACGAAGAGTCATTAACGGACGGGTGCTAC
CGGGTGGCTGCGTGAC

69 recA

NNTTTNNGCTGTACACGCGCCTGCTTTCTCGATAAGCTTCTCTTTCACGCCCAGGTCAACCAGC
TCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGGAATTCAGCCTGTTTAAACGGCGCAG
CGATTTTGTCTTACCACCTTTCACGCGGGTTCGCTACCCACCACGTTTTTCGCCCTCTTTCACCG
CGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGGCGTAGAATTTACGCGCGTTACCACCGGTAG
TGGTTTCCGGGTACC GAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAGATCAGCAG
CGTGTGGACTGCTTACGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGCTCATCATACTGCGCA
AGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTTACCTTCGATTTCCGCTTTCGGCGTCAGTGCCGCCACGG
AGTCAACGACGATAACGTCTACTGCACCAGAACGTGCCAGGGCGTCACAGATTTCCAGTGCCTG
CTCGCCAGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTCGATATCGACGCCAGTTTACGTGCGTAG
ATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTTCCCCGAAGGTTAGGCCANGCG
GAAGCACTGGGGAAAAAGGGCAGAATCCTTGAGGTTTGGCCGAGAGAAGCGGAGGTAGAGAG
GGGGTCCACGACTGGCTCGTGCCTGAATTAGCTGGGAAGTACAGAGAGACCGGGCCGCGCTG
TCTCTGTGACAACTCGAGCATAGGGCAGGGAGATGGCCATTCTAGACGGGTGTGCGTAGGCTT
ATTCTGTGACACGCTTCGGGCCACAAAAAA

72 recA

NNNNNTNNAGCTGTACCACGCGCCTGCTTTCTCGATAAGCTTCTCTTTCACGCCCAGGTCAACC
AGCTCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGGAATTCAGCCTGTTTAAACGGCG
CAGCGATTTGTTCTTACCACCTTTCACGCGGGTTCGCTACCCACCACGTTTTTCGCCCTCTTTCAC
CCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGGCGTAGAATTTACGCGCGTTACCACCGG
TAGTGGTTTCCGGGTACC GAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAGATCAG
CAGCGTGTGGACTGCTTACGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGCTCATCATACTGCGC
GCAAGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTTACCTTCGATTTCCGCTTTCGGCGTCAGTGCCGCCA
CGGAGTCAACGACGATAACGTCTACTGCACCAGAACGTGCCAGGGCGTCACAGATTTCCAGTG
CCTGCTCGCCAGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTCGATATCGACGCCAGTTTACGTGC
GTAGATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTTCTGGGGTTNGCCANAA
NGTGAGACCAGGTAATGGGGCACCCGCGCCGCCCTCCGTCGACGTGTTTATTAACGGGGGGT
GCTACCGGGAGCTGGAGATTTGTTGGCGGTTAGATCAACCGCGGCCCGTCGTGGATGTTAGTTG
ACCCCCCTACCGGCAAGAGATAGTTGTCATGAGGAATTGCTTGTGATTCTGCCTGTACGAT
CTGGGTACTACAAAAAN

73 recA

NNNNATGNGCTGTACCACGCGCCTGCTTTCTCGATAAGCTTCTCTTTCACGCCCAGGTCAACCA
GCTCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGGAATTCAGCCTGTTTAAACGGCGC
AGCGATTTTGTCTTACCACCTTTCACGCGGGTTCGCTACCCACCACGTTTTTCGCCCTCTTTCAC
CGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGGCGTAGAATTTACGCGCGTTACCACCGGT
AGTGGTTTCCGGGTACC GAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAGATCAGC
AGCGTGTGGACTGCTTACGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGCTCATCATACTGCGC
CAAGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTTACCTTCGATTTCCGCTTTCGGCGTCAGTGCCGCCAC
GGAGTCAACGACGATAACGTCTACTGCACCAGAACGTGCCAGGGCGTCACAGATTTCCAGTGC
CTGCTCGCCAGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTCGATATCGACGCCAGTTTACGTGCG
TAGATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTNAAAAGGGACTCGNGGN

NCTTTTGGAAGCCCGATGATGCGAAAGGGCAGAATTGTTAACGTTTGCCGATAGTGCTGAGGCA
TAGTTGAACTCCCTGTCTGGCTTGTGACAGACTAGCTGGAAATTCTGGATGGGCTGAACCAGGG
CTTACTCTGTGATAAACCCCAATCGGGGGAAGAGGACCTCCTTCAAGAAACGTGATGGTGGAG
GCGTCCTGCAACAAACGCG

75 recA

NANNNNNNAGCTGNACNACGCGCCTGCTTTCTCGATCAGCTTCTCTTTTACGCCCAGGTCAACC
AGTTCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGAAATTCAGCCTGTTTAAACGGTG
CAGCGATTTTGTCTTACCACCTTTCACGCGGGTTTCGCTACCCACCACGTTTTCGCCCTCTTCA
CCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGCGTAGAATTCAGCGCGTTACCACCGG
TAGTGGTTTTCCGGGTTACCGAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAGATCAG
CAGCGTGTGGACTGCTCAGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCGCCTGGCTCATCATACGTGCC
GCAAGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTCGCCTTCGATTTCCGCTTTCGGCGTCAGTGCCGCCA
CGGAGTCAACGACGATAACGTCTACTGCGCCAGAACGCGCCAGGGCGTCACAGATTTCCAGTG
CCTGCTCGCCGGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTATCAATATCGACGCCCAGTTTACGTGC
GTAGATTGGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCACAGGNTTAAACGGNNAGTCAGAN
NGTTTCCGGTGGCCCTCAGTCGCCAATGTGAGTATCTTGGAAAGCCTCCCCGAAGGGCCGNTAA
CAACGGAGGGTGCCTGNTGGGGGGTGAAGAATAGGCTGGGGAACCTGATCACCGAGGCCCGGG
TGGAAGTTCGAAACCCGNTTACGGGCAAGAGAACGGTGTAAAAAACGGGTTGGCGATGGATC
CTGGACCAATC

- ***mdh* (malat dehidrogenaza)**

M1 *mdh*

NNNTNNGCAGGCGCTTGCACTACTGTTANAACCCAACTGCCTTCAGGTTTCAGAACTCTCTCTG
TATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCTGTCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGTGAA
AATCAAAGTTTTTCTGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGCGCAGATGTCGTTCTTATC
TCTGCAGGTGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCCGACCTGTTAACGTTAACGCCGGCA
TCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCGAAAACCTGCCCCGAAAGCGTGCATTGGTATTATCAC
TAACCCGGTTAACACCACAGTTGCGATTGCTGCTGAAGTGCTGAAAAAAGCCGGTGTATGAC
AAAAACAACTGTTCCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTGTTCCAACACCTTTGTTGCGGAAC
TGAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTATTGGCGGTCCTCTGGTGTACCAT
TCTGCCGCTGCTGTACAGGTTCCCTGGCGTTAGCTTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTGACC
AAACGTATCCAGAACGCGGGTACTGAGGTGGTTGAAGCGAAAGCCGGTGGCGGGTCTGCAACC
CTGTCTATGGGCCAGGCAGCTGCACGTTTTGGCCTGTCTCTGGTTTCGCGCACTGCAAGGTGAAC
AAGGCGTTGTGCAATGTGCCTACGTTGAAGGTGACGGTCAGTACGCACGTTTCTTCTCAACC
GCTGCTGCTGGGTAACCGCGTGGAAAGAGCGTAAATCTATCGGCACTCTGAGCGCATATGG
AAAGAACGCGCTGGAAGGTATGCTGGATCCCCTGAAAAAATATATCGCTCTGGCCCAAGGAGT
GCGCTCTATTTTCTNAAAACC

M2 *mdh*

TNNNTNNNNCCAGGCGCTTGCACTACTGTTAAAAACCCAACTGCCTTCAGGTTTCAGAACTCTCT
CTGTATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCCGTCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGT
GAAAATCAAAGTTTTTCTGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGCGCAGATGTCGTTCTT
ATCTCTGCAGGTGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCCGACCTGTTAACGTTAACGCCG
GCATCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCGAAAACCTGCCCCGAAAGCGTGCATTGGTATTAT
CACTAACCCGGTTAACACCCTGTTGCAATTGCTGCTGAAGTGCTGAAAAAAGCCGGTGTATTAT
GACAAAAACAACTGTTCCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTGTTCCAACACCTTTGTTGCGG
AACTGAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTATTGGCGGTCCTCTGGTGTTA
CCATTCTGCCGCTGCTGTACAGGTTCCCTGGCGTTAGTTTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTG
ACCAAACGTATCCAGAACGCGGGTACTGAGGTGGTTGAAGCGAACGCCGGAGGCGGGCCTGCA
ACCCTGCCATGCCAGGCAGCTGCACGATTTGCTCTGTCTCTGGTTTCGTGCCCTGCATGCTGAA
CAAGGCGTTGTCTAATGTGCCTACTTTGAAGGCGACGGTCAGTACGCCCGTACTTCTCTCTCCG
CTGCTGTCTGNCAACAAGACGGAATGGAAAAGCGTAATTCTATCGGTACCCTGAAACCCTTTAGA
ACATAACGTTTTTGAAGGTATGCGGGAAGCCCTGAAAAAAAATATCGCTATGGCCCAAGATT
GCATTTTATTATATAAAAAANT

M3 mdh

TNNNNGNNCAGGGCGCTTGCACTACTGTTAAAACCCAAGTGCCTTCAGGTTTCAGAACTCTCTCT
GTATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCTGTTCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGTGA
AAATCAAAGGTTTTTCAGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGTGCAGATGTCGTTCTTAT
CTCTGCAGGCGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCGACCTGTTTAAACGTTAACGCCGGT
ATCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCGAAAACCTGCCCGAAAGCGTGCATTGGTATTATCA
CTAACCCGGTTAACACTACAGTTGCGATTGCTGCTGAAGTGCTGAAAAAAGCCGGTGTATATGA
CAAAAACAAACTGTTTCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTTCGTTCCAACACCTTTGTTGCGGAA
CTGAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTATTGGTGGTCACTCTGGTGTACCA
TTCTGCCGCTGCTGTACAGGTTCTGGCGTTAGTTTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTGACC
AAACGTATCCAGAACGCGGGTACTGAGGTGGTTGAAGCCAAAGCCGGTGGCGGCTCTGCAACC
CTGTCTATGGGCCAGGCACCTGCACGTTTTGGTCTGTCTCTGGTTCGCGCACTGCACTGCGAACA
AGGCGTGGTCAATGTGCCTACGTTGAAGGCGACGGTACGTACGCTCGTTTCTTCTCAACC
GCTGCTGCTGGGGTAAAAACGGCGTGGAAGAGCTAAATCTATCGGTACTCTGAGCTCATTGAG
CATTACGCTTTGGAAGGTATGAGGGAATGCTCTGAAAAAATAAATGAATCTTGCGCAGGAGT
TCAGATAATATAATAAAAAAGG

M4 mdh

TTNNTTNNNNCAGGCGCTTGCACTACTGTTAAAACCCAAGTGCCTTCAGGTTTCAGAACTCTCTCT
GTATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCTGTTCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGTGA
AAATCAAAGGTTTTTCAGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGTGCAGATGTCGTTCTTAT
CTCTGCAGGCGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCGACCTGTTTAAACGTTAACGCCGGT
ATCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCGAAAACCTGCCCGAAAGCGTGCATTGGTATTATCA
CTAACCCGGTTAACACTACAGTTGCGATTGCTGCTGAAGTGCTGAAAAAAGCCGGTGTATATGA
CAAAAACAAACTGTTTCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTTCGTTCCAACACCTTTGTTGCGGAA
CTGAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTATTGGTGGTCACTCTGGTGTACCA
TTCTGCCGCTGCTGTACAGGTTCTGGCGTTAGTTTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTGACC
AAACGTATCCAGAACGCGGGTACTGAGGTGGTTGAAGCGAAAGCCGGTGGCGGGTCTGCAACC
CTGTCTATGGGCCAGGCAGCTGCACGTTTTGGTCTGTCTCTGGTTCGCGCACTGCAGGGCGAAC
AAGGCGTTGTCAATGTGCCTACGTTGAAGGCGACGGTACGTACGCTCGTTTCTTCTCAAAC
CGCTGCTGCTGGGTAAAAACGGCGTGGAAGAGCGTAAATCTATCGGTACTCTGAGCGCAATAG
AACATAGCGCGCTGGAAGGTATGCTGGATAACCCGAAAAAATAATCGCTCTGGGGCAGGAGT
ATCATTTAATATATAAAAAA

M5 mdh

NNNNNNNTGNNCAGGCGCTTGCACTACTGTTAANACCCAAGTGCCTTCAGGTTTCAGAACTCTCT
CTGTATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCTGTTCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGT
GAAAATCAAAGGTTTTTCTGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGCGCAGATGTCGTTCTT
ATCTCTGCAGGTGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCGACCTGTTTAAACGTTAACGCCG
GCATCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTTCGAAAACCTGCCCGAAAGCGTGCATTGGTATTAT
CACTAACCCGGTTAACACCACAGTTGCGATTGCTGCTGAAGTGCTGAAAAAAGCCGGTGTATAT
GACAAAAACAAACTGTTTCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTTCGTTCCAACACCTTTGTTGCGG
AACTGAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTATTGGCAGGAAAGTGGCTGATCTG
CCATTCTGCCGCTGCTGTACAGGTTCTGGCGTTATTTTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTG
ACCAAACGTATCCAGAACGCAGGTACTGTATTGGTTGAAGCGAACGTGGTTGGCGGGACTGCA
ACCCTGTCTATGGGCCAGGCTGCTGTTCTTTTTGTTCTGTCTCTGGCACGCTCACTGCAAGACGA
ACAAGGCGTTGTCCAATGTGCCTATGTTGAAGGCGACGGTACAGACGCACGTCTTATTCGCTCAA
CCCGCTGCTGCTGGGTACAAATCGGGTGTAACCACAACTCTCTCGGTACCCTGAACCCCATTC
GAACAGATCGCCATTGTAAGGTATGCTGGAATACGCTGAATAAAGATTTTGTCT

M8 mdh

NNNNNANNNNNCAGGCGCTTGCACTACTGTTANNNCCCAAGTGCCTTCAGGTTTCAGAACTCTC
TCTGTATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCTGTTCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTG
TGAAAATCAAAGGTTTTTCTGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGCGCAGATGTCGTTCT
TATCTCTGCAGGTGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCGACCTGTTTAAACGTTAACGCC
GGCATCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCGAAAACCTGCCCGAAAGCGTGCATTGGTATT
ATCTAACCCGGTTAACACCACAGTTGCGATTGCTGCTGAAGTGCTGAAAAAAGCCGGTGTAT

ATGACAAAAACAAACTGTTCCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTTCGTTCCAACACCTTTGTTGC
GGAAGTCAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTTATTGGCGGTCACTCTGGTGT
TACCATTCTGCCGCTGCTGTCACAGGTTCTGGCGTTAGCTTTACCGAGCAGGAAGTGGTTGATC
TGACCAAACGTATCCAGAAGTCCGGTACTGAGGTGGTTGAAGCGAAGGCCGGTGGCGCGTCTG
CTACCCTGTCTATGGCCAGGTTCTGCTCGTTTCGGCCTGTCTCTGGTCCCGCACTGCAAGGTGA
ATAGGCGTTGTCGAATGTGCCTACTTTTAAATGTGACGTTTAGGAAGCCCCTTCTTCTCTCCC
GCTGATGCCCGGTAAGAGCAGCTTGAAAAGACT

M10 mdh

NNNTTNGNNCNGGCGCTTGCACTACTGTTAAAACCCAAGTGCCTTCAGGTTTCAGAACTCTCTCT
GTATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCTGTTCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGTGA
AAATCAAAGGTTTTTCTGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGCGCAGATGTCGTTCTTAT
CTCTGCAGGTGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCGGACCTGTTTAAACGTTAACGCCGGC
ATCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCGAAAAACCTGCCGAAAGCGTGCAATTGGTATTATCA
CTAACCCGGTTAACACCACAGTGGCGATTGCTGCTGAAGTGCTGAAAAAAGCCGGTGTATTATGA
CAAAAACAACTGTTCCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTTCGTTCCAACACCTTTGTTGCGGAA
CTGAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTTATTGGCGGTCACTCTGGTGTACCA
TTCTGCCGCTGCTGTCACAGGTTCTGGCGTTAGTTTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTGACC
AAACGTATCCAGAACGCGGGTACTGAGGTGGTTGAAGCGAAAGCCGGTGGCGGGTCTGCAACC
CTGTCTATGGGTACAGCAGCTGCACGTTTTGGCCTGTCTCTGGTTCGCGCACTGCAAGGTGAAC
AAGGCGTTGTCGAATGTGCCTACGTTGAAGGTGACGGTCAGTACGACGTTTCTTCTCAACC
GCTGCTGTTGGTAAAAACGGCGTGGAAAGAGCGTAAATCTATCGGCACTCTGAGCGCATTGGA
AAAGAACGCGCTGGAAGGTATGCTGGATACGCTGAAGAAAGATATCGCTCTGGGGCAGGAGTT
CNTTTAAANAAAA

M11 mdh

TANNTTNGGCCAGGGGCGCTTGCACTACTGTTAANANCCCAACTGCCTTCAGGTTTCAGAACTCT
CTCTGTATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCTGTTCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCT
GTGAAAATCAAAGGTTTTTTCAGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGTGCAGATGTCGTTCC
TTATCTCTGCAGGCGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCGGACCTGTTTAAACGTTAACGC
CGGTATCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCGAAAAACCTGCCGAAAGCGTGCAATTGGTATT
ATCACTAACCCGGTTAACACTACAGTTGCGATTGCTGCTGAAGTGCTGAAAAAAGCCGGTGT
ATGACAAAAACAAACTGTTCCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTTCGTTCCAACACCTTTGTTGC
GGAAGTCAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTTATTGTGGTCACTCTGGTGT
ACCATTCTGCCGCTGCTGTCACAGGTTCTGGCGTTAGTTTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCT
GACCAAACGTATCCAGAACGCGGGTACTGAGGTGGTTGAAGCGAAAGCCGGTGGCGGGTCTGC
CCCCCTGTCTATGGGCCAGGCACTGCACGTTTTGGTCTGTCTCTGGTTCGCGCACTGCAGGCGA
ACAAGGCGTTGTCGAATGTGCCTACGTGAACGTGACGGTCACTACGCTCGTTTCTTCTCAACC
CGCTGCTGCTGGGTAACCGGGGCGGAAGAGC

65 mdh

NNNTNNGGNCCAGGGGCGCTTGCACTACTGTTAAAACCCAAGTGCCTTCAGGTTTCAGAACTCTC
TCTGTATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCTGTTCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTG
TGAAAATCAAAGGTTTTTCTGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGCGCAGATGTCGTTCT
TATCTCTGCAGGCGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCGGACCTGTTTAAACGTTAACGCC
GGCATCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCGAAAAACCTGCCGAAAGCGTGCAATTGGTATT
ATCACTAACCCGGTTAACACCACAGTTGCAATTGCTGCTGAAGTGCTGAAAAAAGCCGGTGT
ATGACAAAAACAAACTGTTCCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTTCGTTCCAACACCTTTGTTGC
GGAAGTCAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTTATTGGCGGTCACTCTGGTGT
TACCATTCTGCCGCTGCTGTCACAGGTTCTGGCGTTAGTTTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATC
TGACCAAACGCATCCAGAACGCGGGTACTGAAGTGGTTGAAGCGAAGGCCGGTGGCGGGCCTG
CTACCCTGTCTATGGGCCAGGCACTGCACGTTTTGGTCTGTCTCTGGTTCGTCAGTGCAGGCG
ACAAGGCGTTGTCGAATGTGCCTACGTTGAAGGCGACAGTACGCCCCGTTTTCTTCTCTC
AACCGCTTGTGCTGGGTAATGAACGGCGTGGAAAGAGCGTAAATCTATCGGTTCCCTGAACGCA
TTTTCAACAGAACGCGCTGTAAGGTATGCTGGATACGCTGAATAAAAGATACCGCTCCGGGCAC
GAATCCGTTTATTATATAAAGAAGN

67 mdh

TNANNTNGCCAGGCGCTTGCACTACTGTTAAAACCCAACTGCCTTCAGGTTTCAGAACTCTCTC
TGTATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCTGTGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGTG
AAAATCAAAGGTTTTTTCAGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGTGCAGATGTCGTTCTTA
TCTCTGCAGGCGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCCGACCTGTTAACGTTAACGCCGG
TATCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCGAAAACCTGCCCGAAAGCGTGCATTGGTATTATC
ACTAACCCGGTTAACACTACAGTTGCGATTGCTGCTGAAGTGCTGAAAAAAGCCGGTGTATTATG
ACAAAAACAACTGTTTCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTTCGTTCCAACACCTTTGTTGCGGA
ACTGAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTATTGGTGGTCACTCTGGTGTACC
ATTCTGCCGCTGCTGTACAGGTTCCCTGGCGTTAGTTTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTGA
CCAAACGTATCCAGAACGCGGGTACTGAGGTGGTTGAAGCGAAAGCCGGTGGCGGGTCTGCAA
CCCTGTCTATGGGCCAGGCAGCTGCACGTTTTGGTCTGTCTCTGGTTTCGCGCACTGCAGGGCGA
ACAAGGCGTTGTGCAATGTGCCTACGATGAACGCGACGGTCAGTACGCTCGTTTCTCTCAAC
CGCTGCTGCTGGGTAAGAACGGCNTGGAAGAGCGTCANCTATCGCTACTCTGAACTCATANGA
ACNNAGCGCTGGACGGNTGGTGAATCCCTGANNNGACTACAGNTGGCGCAAGGAGTTTCAAT
ATATNNNAAANANN

68 mdh

NNNTNNNGCCAGGCGCTTGCACTACTGTTANAACCCAACTGCCTTCAGGTTTCAGAACTCTCTC
TGTATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCCGTCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGTG
AAAATCAAAGGTTTTTCTGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGCGCAGATGTCGTTCTTA
TCTCTGCAGGTGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCCGACCTGTTAACGTTAACGCCGG
CATCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCGAAAACCTGCCCGAAAGCGTGCATTGGTATTATC
ACTAACCCGGTTAACACCACAGTTGCGATTGCTGCTGAAGTGCTGAAAAAAGCCGGTGTATTATG
ACAAAAACAACTGTTTCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTTCGTTCCAACACTTTTGTGCGGA
ACTGAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTATTGGCGGTCACTCTGGTGTACC
ATTCTGCCGCTGCTGTACAGGTTCCCTGGCGTTAGTTTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTGA
CCAAACGTATCCAGAACGCGGGTACTGAGGTGGTTGAAGCGAAAGCCGGTGGCGGGTCTGCAA
CCCTGTCTATGGGCCAGGCAGCTGCACGTTTTGGTCTGTCTCTGGTTTCGTCACACTGCACGGCGAA
CAAGGCGTTGTGCAAAATGTGCCTACGTTGAAGCCGACGGTCAGTACGCCCCGTTTCTTCTCTCA
ACCGCTGCTGCTGGGTAACGCGGTGTAAGACCGTAATCTATCGGTACCCTGAGCGCTTTTG
AACAGAAGCGG

69 mdh

TNNNNNGCAGGCGCTTGCACTACTGTTAAAACCCAACTGCCTTCAGGTTTCAGAACTCTCTCT
GTATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCTGTGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGTGA
AAATCAAAGGTTTTTTCAGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGTGCAGATGTCGTTCTTAT
CTCTGCAGGCGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCCGACCTGTTAACGTTAACGCCGGT
ATCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCGAAAACCTGCCCGAAAGCGTGCATTGGTATTATCA
CTAACCCGGTTAACACTACAGTTGCGATTGCTGCTGAAGTGCTGAAAAAAGCCGGTGTATTATGA
CAAAAACAACTGTTTCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTTCGTTCCAACACCTTTGTTGCGGAA
CTGAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTATTGGTGGTCACTCTGGTGTACC
AAACGTATCCAGAACGCGGGTACTGAGGTGGTTGAAGCGAAAGCCGGTGGCGGGTCTGCAACC
CTGTCTATGGGCCAGGCAGCTGCACGTTTTGGTCTGTCTCTGGTTTCGCGCACTGCAGGGCGAAC
AAGGCGTTGTCTAATGTGCCTACGATGAAGGCGACGGTCAGTACGCTCGTTTCTTCTCTACCT
CTGCTGCTGGGTAAGACGGCGTGAAGAGCGTAAATCTATCGTTACTCTGAGCGCATATGACC
AGAGCGCTTTGGAAGGTATGCTGGATACGCTGGACCAATATATCGCTCTGGGCCAAGGATGTCC
ATTTATAAAATAAAAAATTG

72 mdh

TTNNNGGCGNGGCGCTTGCACTACTGTTAAAACCCAACTGCCTTCAGGTTTCAGAACTCTCTCTG
TATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCTGTGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGTGAA
AATCAAAGGTTTTTTCAGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGTGCAGATGTCGTTCTTATC
TCTGCAGGCGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCCGACCTGTTAACGTTAACGCCGGTA
TCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCGAAAACCTGCCCGAAAGCGTGCATTGGTATTATCAC
TAACCCGGTTAACACTACAGTTGCGATTGCTGCTGAAGTGCTGAAAAAAGCCGGTGTATTATGAC

AAAAACAAACTGTTTCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTTCGTTCCAACACCTTTGTTGCGGAAC
TGAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTTATTGGTGGTCACTCTGGTGTACCAT
TCTGCCGCTGCTGTACAGGTTTCTGGCGTTAGTTTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTGACC
AAACGTATCCAGAACGCGGGTACTGAGGTGGTTGAAGCGAAAGCCGGTGGCGGGTCTGCAACC
CTGTCTATGGGCCAGGCAGCTGCACGTTTTGGTCTGTCTCTGGTTCGCGCACTGCAGGGCGAAC
AAGGCGTTGTCGAATGTGCCTACGTTGAAGGCGACGGTCAGTACGCTCGTTTTCTCTCAACC
GCTGCTGCTGGGTAAAAACGGCGTGGAAGAGCGTAAATCTATCGGTA CTCTGAGCGCATTTGAA
CAGAACGCGCTGGAAGGTATGCTGGATACGCTGAAGAAAGATATCGCTCTGGGGCAGAGAGTT
TTTTTAAAAAAA

73 mdh

NTNNNNGGCAGGCGCTTGCACTACTGTTAAAACCCA ACTGCCTTCAGGTT CAGA ACTCTCTCTG
TATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCTGTCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGTGAA
AATCAAAGTTTTTTCAGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGTGCAGATGTCGTTCTTATC
TCTGCAGGCGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCCGACCTGTTAACGTTAACGCCGGTA
TCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCGAAAACCTGCCCGAAAGCGTGCATTGGTATTATCAC
TAACCCGGTTAACACTACAGTTGCGATTGCTGCTGAAAGTGTGAAAAAGCCGGTGTATGAC
AAAAACAAACTGTTTCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTTCGTTCCAACACCTTTGTTGCGGAAC
TGAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTTATTGGTGGTCACTCTGGTGTACCAT
TCTGCCGCTGTGTACAGGTTTCTGGCGTTAGTTTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTGACC
AAACGTATCCAGAACGCGGGTACTGAGGTGGTTGAAGCGAAAGCCGGTGGCGGGTCTGCAACC
CTGTCTATGGGCCAGGCAGCTGCACGTTTTGGTCTGTCTCTGGTTCGCGCACTGCAGGGCGAAC
AAGGCGTTGTCGAATGTGCCTACGTTGAAGGCGACGGTCAGTACGCTCGTTTTCTCTCAACC
GCTGCTGCTGGGTAAAAACGGCGTGGAAGAGCGTAAATCTATCGGTA CTCTGAGCGCATTTGAA
CAGAACGCGCTGGAAGGTATGCTGGATACGCTGAAGAAAGATATCGCTCTGGGCAGAGTTTTTT
TTTTAAAAAAA

75 mdh

NTNNGNNCAGGCGCTTGCACTACTGTTAAAACCCA ACTGCCTTCAGGTT CAGA ACTCTCTCTGT
ATGATATCGCTCCAGTGACTCCCGGTGTGGCCGTCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGTGAA
AATCAAAGTTTTTCTGGTGAAGATGCGACTCCGGCGCTGGAAGGCGCAGATGTCGTTCTTATC
TCTGCAGGTGTAGCGCGTAAACCGGGTATGGATCGTTCCGACCTGTTAACGTTAACGCCGGCA
TCGTGAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCGAAAACCTGCCCGAAAGCGTGCATTGGTATTATCAC
TAACCCGGTTAACACCACTGTTGCAATTGCTGCTGAAAGTGTGAAAAAGCCGGTGTATGAC
AAAAACAAACTGTTTCGGCGTTACCACGCTGGATATCATTTCGTTCCAACACCTTTGTTGCGGAAC
TGAAAGGCAAACAGCCAGGCGAAGTTGAAGTGCCGGTTATTGGCGGTCACTCTGGTGTACCAT
TCTGCCGCTGCTGTACAGGTTTCTGGCGTTAGTTTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTGACC
AAACGTATCCAGAACGCGGGTACTGAGGTGGTTGAAGCGAAAGCCGGTGGCGGGTCTGCAACC
CTGTCTATGGGCCAGGCAGCTGCACGTTTTGGTCTGTCTCTGGTTCGTGCACTGCAGGGCGAAC
AAGGCGTTGTCGAATGTGCCTACGTTGAAGGCGACGGTCAGTACGCCGTTTTCTCTCAACC
GCTGCTGCTGGGTAAAAACGGCGTGGAAGAGCGTAAATCTATCGGTA ACCCTGAGCGCATTTGA
ACAGAACGCGCTGGAAGGTATGCTGGATACGCTGAAGAAAGATATCGCTCTGGGCAGNNTTTT
TTTTAAAAAAA