

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Sara TRONTELJ

**FENOTIPSKE IN GENOTIPSKE
LASTNOSTI SEVOV VRSTE *Escherichia coli*
IZOLIRANIH IZ VZORCEV ŽIVIL**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Sara TRONTELJ

**FENOTIPSKE IN GENOTIPSKE LASTNOSTI SEVOV VRSTE
Escherichia coli IZOLIRANIH IZ VZORCEV ŽIVIL**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF
Escherichia coli STRAINS ISOLATED FROM FOOD SAMPLES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

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 prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Mentorica: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

Recenzentka: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Sara Trontelj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Dn
- DK UDK 579.842.11(043.2)=163.6
- KG *Escherichia coli*/*Buttiauxella*/filogenetske skupine/filogenetske podskupine/
virulentni dejavniki/občutljivost za protimikrobne snovi/PCR
- AV TRONTELJ, Sara
- SA AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (mentor)/ŽGUR BERTOK, Darja (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2010
- IN FENOTIPSE IN GENOTIPSE LASTNOSTI SEVOV VRSTE *Escherichia coli*
IZOLIRANIH IZ VZORCEV ŽIVIL
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XIV, 99 str., 19 pregl., 3 sl., 2 pril., 64 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je del naravne mikrobiote prebavnega trakta, v določenih primerih pa lahko povzroča različne črevesne in zunajčrevesne okužbe. V telo jo lahko vnesemo tudi s hrano, zato so živila pomemben izvor sevov *E. coli*. Analizirali smo zbirko 124 sevov *E. coli*, ki so jih iz vzorcev živil v letih 2007 in 2008 izolirali in identificirali na Inštitutu za varovanje zdravja v Ljubljani. S pomočjo metode PCR smo seve uvrstili v filogenetske skupine in podskupine po Clermontu, ugotovili prisotnost zapisov za nekatere virulentne dejavnike ter prisotnost plazmidno-kodiranih determinant odpornosti proti kinolonom iz skupine genov *qnr*. Najprej smo ugotovili, da je bilo 27 % sevov napačno identificiranih kot *E. coli*. Od preostalih analiziranih sevov smo 53 % uvrstili v filogenetsko skupino A, 33 % sevov v skupino B₁, 2 % sevov v skupino B₂ in 11 % sevov v skupino D. Pri vseh sevih vrste *E. coli* smo zasledili gen *crl*, pri 88 % gen *fimH*, pri 12 % gen *vtx2*, pri 11 % gen *hra*, pri 10 % gena *hlyen* in *ompT*, pri 7 % gena *iha* in *vtx1*, pri 4 % gen *eae*, pri 1 % gene *sfa*, *hlyA* in *vat*, gena *sat* in *cnf* pa pri nobenem sevu. Pri nobenem sevu nismo uspeli dokazati plazmidno-kodiranih determinant odpornosti *qnr*.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- DN Dn
- DC UDC 579.842.11(043.2)=163.6
- CX *Escherichia coli*/Buttiauxella/phylogenetic groups/phylogenetic subgroups/
virulence factors/antimicrobial susceptibility/PCR
- AU TRONTELJ, Sara
- AA AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (supervisor)/ŽGUR BERTOK, Darja (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2010
- TI PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF *Escherichia coli*
STRAINS ISOLATED FROM FOOD SAMPLES
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XIV, 99 p., 19 tab., 3 fig., 2 ann., 64 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*) is a part of natural microbiota of the digestive tract but in some cases it can cause various intestinal and extraintestinal infections. It can enter the body through food, therefore foods represent an important source of *E. coli* strains. We analysed 124 strains of *E. coli*, which had been isolated and identified from food samples in 2007 and 2008 at the National Institute of Public Health in Ljubljana. Using PCR, strains were classified into phylogenetic groups and subgroups following the Clermont method. Since we discovered that 27 % of the strains had been missidentified as *E. coli* in the following analyses only the remaining 90 strains were included. 53 % of the remaining strains were classified into phylogenetic group A, 33 % of the strains into B₁, 2 % into group B₂ and 11 % into group D. Further, the strains were analysed for the presence of some virulence factor genes and the presence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes. The gene *crl* was detected in all strains, *fimH* was detected in 88 %, *vtx2* in 12 %, *hra* in 11 %, *hlyE* and *ompT* in 10 %, *iha* and *vtx1* in 7 %, *eae* in 4 %, and *sfa*, *hlyA* and *vat* genes in 1 % of the tested strains. The genes *sat* and *cnf* were not detected among the analysed strains. We were unable to prove the presence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* in the tested strains.

KAZALO VSEBINE

<u>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)</u>	<u>III</u>
<u>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)</u>	<u>IV</u>
<u>KAZALO VSEBINE</u>	<u>V</u>
<u>KAZALO PREGLEDNIC</u>	<u>VIII</u>
<u>KAZALO SLIK</u>	<u>X</u>
<u>KAZALO PRILOG</u>	<u>XI</u>
<u>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</u>	<u>XII</u>
<u>1 UVOD</u>	<u>1</u>
1.1 NAMEN DELA	2
<u>2 PREGLED OBJAV</u>	<u>3</u>
2.1 ŽIVILA	3
2.2 BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i>	3
2.2.1 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA <i>E. coli</i>	6
2.3 <i>E. coli</i> LAHKO DELIMO V SKUPINE NA PODLAGI RAZLIČNIH KRITERIJEV	8
2.3.1 DELITEV GLEDE NA PRISOTNOST POVRŠINSKIH IN FLAGELARNIH ANTIGENOV	8
2.3.2 DELITEV V T. I. "SEKVENČNE TIPE" NA PODLAGI RAZLIČNIH ZAPOREDIJ GOSPODINJSKIH GENOV	8
2.3.2.1 Filogenetske skupine po Clermontu	8
2.3.3 DELITEV GLEDE NA PATOGENOST IN MESTO POVZROČANJA OKUŽB	10
2.3.3.1 Sevi IPEC	10
2.3.3.1.1 Enteropatogeni sevi <i>E. coli</i> (EPEC)	10
2.3.3.1.2 Enterotoksigeni sevi <i>E. coli</i> (ETEC)	11
2.3.3.1.3 Enteroinvazivni sevi <i>E. coli</i> (EIEC)	12
2.3.3.1.4 Enteroagregativni sevi <i>E. coli</i> (EAEC)	13
2.3.3.1.5 Difuzno adherentni sevi <i>E. coli</i> (DAEC)	13
2.3.3.1.6 Sevi <i>E. coli</i> , ki sintetizirajo verotoksine (VTEC)	13
2.3.3.2 Sevi ExPEC	15
2.3.3.2.1 Uropatogeni sevi <i>E. coli</i> (UPEC)	15
2.3.3.2.2 Sevi <i>E. coli</i> , ki povzročajo neonatalni meningitis (NMEC)	16
2.3.3.2.3 Sevi <i>E. coli</i> , patogeni za ptice (APEC)	16
2.3.4 SEVI <i>E. coli</i> PRI DRUGIH ŽIVALIH	17

2.4 VIRULENTNI DEJAVNIKI	17
2.4.1 ADHEZINI	17
2.4.1.1 Fimbrije tipa 1	18
2.4.1.2 S-fimbrije	19
2.4.1.3 Intimin	20
2.4.1.4 Curljeva vlakna	20
2.4.1.5 Nefimbrijski adhezini Iha in Hra	21
2.4.2 TOKSINI IN INVAZINI	22
2.4.2.1 Enterohemolizin	22
2.4.2.2 Hemolizin alfa	22
2.4.2.3 Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 ali CNF1	23
2.4.2.4 Avtotransportski toksini	23
2.4.2.5 Omptini	24
2.4.2.6 Verotoksini	24
2.5 ZDRAVLJENJE OKUŽB Z <i>E. COLI</i>	25
2.5.1 ODPORNOST PROTI PROTIMIKROBNIM SNOVEM	25
2.6 <i>E. coli</i> V ŽIVILIH	25
2.7 BAKTERIJE, KI SO ŽE BILE IZOLIRANE IZ ŽIVIL IN SO FENOTIPSKO ZELO PODOBNE <i>E. coli</i>	26
2.7.1 <i>Leclercia</i>	26
2.7.2 <i>Buttiauxella</i>	28
3 MATERIAL IN METODE	32
3.1 MATERIAL	32
3.1.1 BAKTERIJSKI SEVI	32
3.1.2 GOJIŠČA	40
3.1.2.1 Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)	40
3.1.2.2 Priprava trdnih gojišč LB	40
3.1.3 KEMIKALJE	41
3.1.4 PUFRI IN REAGENTI	42
3.1.4.1 Ločevanje nukleinskih kislin z elektroforezo na agaroznem gelu	42
3.1.5 KOMPLETI IN TESTI	43
3.1.5.1 Komplet za izolacijo genomske DNA	43
3.1.5.2 Komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela	43
3.1.5.3 Dodatne raztopine, ki jih ni v kompletu za izolacijo genomske DNA	43
3.1.6 PRIBOR IN OPREMA	44
3.2 METODE	45
3.2.1 FENOTIPSKE METODE	45
3.2.1.1 Izolacija in identifikacija sevov na Oddelku za sanitarno mikrobiologijo na IVZ	45
3.2.1.1 Identifikacija sevov na Oddelku za medicinsko mikrobiologijo na IVZ	45
3.2.1.2 Ugotavljanje odpornosti proti protimikrobnim snovem –antibiogram	45
3.2.2 GENOTIPSKE METODE	45
3.2.2.1 Priprava vzorčne DNA za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)	45
3.2.2.1.1 Priprava bakterijskih lizatov	45
3.2.2.1.2 Izolacija genomske DNA	46
3.2.2.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	47
3.2.2.2.1 Začetni oligonukleotidi za reakcijo PCR	47
3.2.2.2.2 Sestava reakcijskih mešanic za PCR	49
3.2.2.2.3 Pogoji pomnoževanja s PCR	50
3.2.2.3 Agarozna gelska elektroforeza	52

3.2.2.4	Ugotavljanje filogenetskih skupin in podskupin sevov <i>E. coli</i>	53
3.2.2.4	Pomnoževanje dela gena za 16S rRNA	53
3.2.2.5	Čiščenje fragmenta dobljenega v reakciji PCR in ugotavljanje nukleotidnega zaporedja dela gena za 16S rRNA	53
3.2.2.6	Genotipska identifikacija na podlagi nukleotidnega zaporedja dela gena za 16S rRNA (analiza 16S rRNA)	53
3.2.2.7	Ugotavljanje prisotnosti virulentnih dejavnikov	54
3.2.2.8	Ugotavljanje prisotnosti plazmidno-kodiranih determinant odpornosti proti kinolonom	54
4	REZULTATI	55
4.1	FILOGENETSKE SKUPINE	55
4.2	PREVERJANJE IDENTIFIKACIJE SEVOV, KI SO BILI UVRŠČENI V FILOGENETSKO PODSKUPINO A₀ PO CLERMONTU	58
4.3	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI GENOV, KI KODIRAJO VIRULENTNE DEJAVNIKE	72
4.4	PORAZDELITEV VIRULENTNIH DEJAVNIKOV GLEDE NA FILOGENETSKE (POD)SKUPINE	76
4.5	PORAZDELITEV VIRULENTNIH DEJAVNIKOV GLEDE NA VRSTO VZORCA	80
4.6	UGOTAVLJANJE ODPORNOSTI PROTI PROTIMIKROBNIM SNOVEM	82
4.6.1	GENOTIPSKO TESTIRANJE ODPORNOSTI	82
4.6.1.1	Plazmidno kodirane determinante odpornosti proti kinolonom (PMQR)	82
4.7	ANALIZA PODATKOV O OBČUTLJIVOSTI SEVOV <i>E. coli</i>	82
5	RAZPRAVA	87
6	SKLEPI	91
7	POVZETEK	92
8	VIRI	94

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Razlikovanje petih vrst rodu <i>Escherichia</i>7
Preglednica 2:	Razvrstitev sevov <i>E. coli</i> v filogenetske skupine in podskupine 9
Preglednica 3:	Biokemijske značilnosti vrste <i>L. adecarboxylata</i> 27
Preglednica 4:	Značilnosti vrst iz rodu <i>Buttiauxella</i>29
Preglednica 5:	Zbirka sevov IVZ – OSM..... 33
Preglednica 6:	Uporabljeni začetni oligonukleotidi.....48
Preglednica 7:	Uvrstitev sevov iz IVZ – OSM v filogenetske skupine in podskupine..... 56
Preglednica 8:	Število (odstotek) sevov <i>E. coli</i> iz zbirk 2007 in 2008, ki smo jih uvrstili v posamezne filogenetske skupine..... 58
Preglednica 9:	Sevi, ki po dodatni fenotipski identifikaciji niso bili opredeljeni kot <i>E. coli</i>59
Preglednica 10:	Genotipska identifikacija sevov iz zbirke IVZ – OSM uvrščenih v filogenetsko podskupino A ₀61
Preglednica 11:	Število (odstotek) sevov <i>E. coli</i> iz zbirk 2007 in 2008, ki so se dejansko uvrstili v posamezne filogenetske skupine.....72
Preglednica 12:	Prisotnost virulentnih dejavnikov sevov vrste <i>E. coli</i> iz zbirke IVZ – OSM.....73

Preglednica 13:	Odstotek sevov vrste <i>E. coli</i> iz zbirke IVZ – OSM s prisotnim virulentnim dejavnikom.....	76
Preglednica 14:	Odstotek sevov iz posamezne filogenetske (pod)skupine, s prisotnimi virulentnimi dejavniki.....	77
Preglednica 15:	Porazdelitev virulentnih dejavnikov po filogenetskih (pod)skupinah.....	78
Preglednica 16:	Porazdelitev virulentnih dejavnikov glede na vrsto vzorca.....	81
Preglednica 17:	Povzetek ugotovitev testiranja odpornosti za seve <i>E. coli</i> , primerjava let 2007 in 2008.....	83
Preglednica 18:	Primerjava odpornosti proti protimikrobnim snovem med posameznimi filogenetskimi (pod)skupinami sevov vrste <i>E. coli</i>	85
Preglednica 19:	Občutljivost za nekatere testirane protimikrobne snovi glede na posamezne filogenetske skupine sevov <i>E. coli</i>	86

KAZALO SLIK

Slika 1:	Prikaz dela bakterijskega drevesa življenja.....	5
Slika 2:	Primer elektroforeze pomnožkov PCR treh filogenetskih označevalcev.....	55
Slika 3:	Primer elektroforeze pomnožkov PCR dela gena za 16S rRNA.....	60

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Nukleotidna zaporedja pomnožkov PCR dobljenih z začetnima oligonukleotidoma Fd1 in 1392.

PRILOGA B: Nukleotidna zaporedja pomnožkov PCR dobljenih z začetnima oligonukleotidoma vtx2F in vtx2R.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- A/E lezije..... histopatološke spremembe črevesnega epitela (ang. "attaching-and-effacing lesion")
- AAF..... agregativne vezavne fimbrije (ang. "aggregative adherence fimbriae")
- ABU..... asimptomatska bakteriurija (ang. "asymptomatic bacteriuria")
- APEC..... sevi *E. coli*, patogeni za ptice (ang. "avian pathogenic E. coli")
- BLAST.....ang. "Basic Local Alignment Search Tool"
- bp..... bazni par
- CLSI.....Clinical and Laboratory Standards Institute
- CNF1..... citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (ang. "cytotoxic necrotizing factor 1")
- DAEC.....difuzno adherentni sevi *Escherichia coli* (ang. "diffusely adherent E. coli")
- DNA.....deoksiribonukleinska kislina (ang. "deoxyribonucleic acid")
- E. coli*..... bakterija *Escherichia coli*
- EAEC..... enteroagregativni sevi *Escherichia coli* (ang. "enteroaggregative E. coli")
- EDTA.....etilendiamintetraoetna kislina
- EHEC..... enterohemoragični sevi *Escherichia coli* (ang. "enterohaemorrhagic E. coli")
- EIEC..... enteroinvazivni sevi *Escherichia coli* (ang. "enteroinvasive E. coli")
- EPEC..... enteropatogeni sevi *Escherichia coli* (ang. "enteropathogenic E. coli")
- ESBL.....beta-laktamaza z razširjenim spektrom delovanjem (ang. "extended spectrum beta-lactamase")
- EtBr..... etidijev bromid
- ETEC..... enterotoksigeni sevi *Escherichia coli* (ang. "enterotoxigenic E. coli")
- ExPEC..... zunajčrevesni patogeni sevi *Escherichia coli* (ang. "extraintestinal pathogenic E. coli")
- IMVC.....skupina štirih biokemijskih testov za identifikacijo bakterij: indol, metil rdeče, Voges-Proskauer, citrat

IPEC.....	črevesni patogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. "intestinal pathogenic <i>E. coli</i> ")
ISO.....	Organizacija za mednarodne standarde (ang. "International organization for standardization")
IVZ	Inštitut za varovanje zdravja
kb.....	kilobaza
LB.....	gojišče Luria-Bertani
LEE.....	ang. "locus of enterocyte effacement"
LT.....	termo-labilni toksini (ang. "heat-labile toxin")
MLST.....	ang. "multi-locus sequence typing"
MR.....	manoza-odporen
MS.....	manoza-občutljiv
NaCl.....	natrijev klorid
NMEC.....	sevi <i>Escherichia coli</i> , ki povzročajo neonatalni meningitis (ang. "neonatal meningitis associated <i>E. coli</i> ")
obr./min.....	obrati na minuto
OMM.....	Oddelek za medicinsko mikrobiologijo
ONPG.....	o-nitrofenol- β -galaktozid
OSM.....	Oddelek za sanitarno mikrobiologijo
PCR.....	verižna reakcija s polimerazo (ang. "polymerase chain reaction")
PMQR.....	plazmidno-kodirana odpornost proti kinolonom (ang. "plasmid-mediated quinolone resistance")
RDP.....	ribosomska podatkovna baza (ang. "Ribosomal Database Project")
RNA.....	ribonukleinska kislina (ang. "ribonucleic acid")
RNAza.....	encim, ki cepi molekule RNA
rRNA.....	ribosomska ribonukleinska kislina
SePEC.....	sevi <i>Escherichia coli</i> , ki povzročajo sepsa (ang. "septicaemia associated <i>E. coli</i> ")
ST.....	termo-stabilni toksini (ang. "heat-stable toxin")
TBE.....	Tris-boratni elektroforezni pufer
TE.....	Tris-EDTA
UPEC.....	uropatogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. "uropathogenic <i>E. coli</i> ")

UV.....ultravijolična (svetloba)

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

1 UVOD

Vsak človek ima naravno mikrobioto, ki naseljuje njegove sluznice in kožo. Poselitev z mikrobi in oblikovanje mikrobiote se začeta ob rojstvu, ko je novorojenec izpostavljen okolju, poseljenem z mikroorganizmi. Mikrobioto sestavljajo mikroorganizmi, ki so s človekom v komenzalnem sožitju. Neugodni zunanji in notranji dejavniki, kot so okužbe, zdravila, predvsem antibiotiki, kemoterapije, obsevanja in tudi stres, lahko vplivajo na sestavo mikrobiote. Največ bakterij prebiva v črevesju, večina teh je neškodljivih ter sodeluje pri razgradnji hrane in s tem pridobivanju hranil.

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je del mikrobiote prebavil in velja za nepatogeno bakterijo. A sevi *E. coli*, ki imajo enega ali več virulentnih dejavnikov, lahko povzročijo različne črevesne in zunajčrevesne okužbe. Takšne seve označimo kot potencialno patogene seve *E. coli*.

Živila so najpogostejši vir vnosa *E. coli*, tako nepatogenih kakor tudi patogenih, ki lahko povzročijo številne črevesne, pa tudi zunajčrevesne okužbe. O lastnostih bakterijskih sevov, prisotnih v živilih, pa je zelo malo podatkov.

Ker so nas zanimale fenotipske in genotipske lastnosti sevov *E. coli*, ki so v živilih, smo analizirali seve, izolirane neposredno iz vzorcev živil, ki so nam jih odstopili na Oddelku za sanitarno mikrobiologijo z Inštituta za varovanje zdravja v Ljubljani (IVZ – OSM). Ugotavljali oziroma analizirali smo njihove biokemijske lastnosti, razvrstitev v t. i. filogenetske skupine, vsebnost virulentnih dejavnikov in njihovo odpornost proti različnim protimikrobnim snovem.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil analizirati 124 sevov izoliranih iz vzorcev živil, ki so jih v letih 2007 in 2008 izolirali in identificirali kot *E. coli* na IVZ – OSM. Želeli smo ovrednotiti virulentni potencial izolatov iz živil, zato smo jih uvrstili v filogenetske skupine in ugotavljali prisotnost različnih virulentnih dejavnikov. Poleg tega smo želeli analizirati tudi odpornost teh sevov proti pogosto uporabljenim protimikrobnim snovem ter ugotoviti prisotnost plazmidno-kodirane determinante odpornosti proti kinolonom.

Predvidevali smo, da se sevi *E. coli* iz živil razvrščajo v filogenetske skupine v drugačnih odstotkih kot izolati zunajčrevesnih in črevesnih okužb in so manj odporni proti protimikrobnim snovem v primerjavi z izolati iz kliničnih vzorcev. Pričakovali smo tudi, da ti sevi nimajo veliko genov, povezanih z virulenco.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ŽIVILA

Živilo je osnovna dobrina in potreba človeka, lahko pa predstavlja tudi tveganje in nevarnost za naše zdravje. Živilo je varno, če ne vsebuje bioloških dejavnikov tveganja (paraziti, patogene bakterije, virusi), kemičnih dejavnikov tveganja (ostanki pesticidov, težkih kovin, zdravil, detergentov, nedovoljenih aditivov in drugih strupenih snovi) ter fizikalnih dejavnikov tveganja (kot so mehanični, npr. kamenčki, kosti, les, zemlja, steklo, plastika). Pri določanju, ali je neko živilo škodljivo za zdravje, se upoštevajo verjetni takojšnji kratkoročni ali dolgoročni učinki živila na zdravje ljudi, verjetni kumulativni toksični učinki ter posebna zdravstvena preobčutljivost skupin potrošnikov (<http://www.gov.si/mz-splet.nsf>, <http://www.mkgp.gov.si/index.php>).

Tudi v Sloveniji imamo inštitucije, ki se ukvarjajo s preverjanjem ustrezne kakovosti živil. Ena izmed teh je Oddelek za sanitarno mikrobiologijo (OSM) na Inštitutu za varovanje zdravja v Ljubljani (IVZ), kjer med drugim ugotavljajo prisotnost mikrobnih pokazateljev higienskega stanja vzorcev v proizvodnji in prometu z živili ter prisotnost patogenih dejavnikov mikrobnega izvora, ki lahko škodljivo vplivajo na zdravje ljudi. Eden izmed pomembnih patogenov je tudi *E. coli*, predvsem sevi, ki sintetizirajo verotoksine (VTEC).

2.2 BAKTERIJA *Escherichia coli*

Bakterijo *E. coli* je leta 1885 odkril nemški zdravnik Teodor Escherich in sodi danes med najbolj preučevane prokariotske organizme (Madigan in sod., 2003). Na osnovi analize zaporedja genov za 16S rRNA (v nadaljevanju: analiza 16S rRNA) se uvršča rod *Escherichia* v skupino *Gammaproteobacteria*, v družino enterobakterij – *Enterobacteriaceae*. Na sliki 1 je prikazan izsek iz bakterijskega drevesa življenja, kamor na osnovi 16S zaporedja uvrščamo *E. coli*. Poleg *E. coli*, v rod *Escherichia* uvrščamo še vrste *Escherichia hermannii* (*E. hermannii*), *Escherichia fergusonii*, *Escherichia vulneris* in *Escherichia blattae*. (Garrity in sod., 2005; 607–624).

Bakterije vrste *E. coli* so ravni valjasti po Gramu negativni bacili z zaobljenimi konci, velikosti $1,1\text{--}1,5 \times 2,0\text{--}6,0 \mu\text{m}$, ki se pojavljajo sami ali v paru. Lahko so gibljive ali negibljive. Gibljive imajo 5–10 flagel, ki so razporejeni peritriho, večina jih ima tudi fimbrije. So fakultativno anaerobni. Večina sevov fermentira laktozo, ob fermentaciji D-glukoze sintetizira močne kisline in ponavadi tudi plin, ne sintetizira pa acetil-metilkarbinola (acetoina). Večina sevov ima aktivno lizin-dekarboksilazo, izjema so metabolno neaktivni sevi *E. coli*, večina enteroinvazivnih sevov *E. coli* (EIEC) in *E. hermannii*. Kolonije imajo navadno gladek rob, so konveksne, sivkaste, vlažne in se bleščijo. *E. hermannii* je rumeno pigmentirana. Sevi vrste *E. coli* rastejo pri temperaturi 15–45 °C, najboljše pa med 21 °C in 37 °C. So nevtrofilne in rastejo pri pH med 5,0 in 9,0 (Garrity in sod., 2005; 607–624).



Slika 1: Prikaz dela bakterijskega drevesa življenja (Yarza in sod., 2008).

2.2.1 Izolacija in identifikacija *E. coli*

Za gojenje in izolacijo sevov vrste *E. coli* lahko uporabimo veliko enostavnih gojišč z dodanim agarjem kot trdilcem gojišča (Garrity in sod., 2005; 622). Za identifikacijo se večinoma uporabljajo biokemijske metode, kot so skupina testov IMVC (indol, metil rdeče, Voges-Proskauer, citrat), komercialni komplet Api 20E in avtomatizirani sistemi za identifikacijo. Sevi vrste *E. coli* imajo značilen rezultat testov IMVC ++-- (indol +, metil rdeče +, Voges-Proskauerjev test -, citrat -). V preglednici 1 so navedene glavne biokemijske značilnosti vrst rodu *Escherichia*, ki jih uporabljamo pri identifikaciji in razlikovanju *E. coli* od ostalih vrst v rodu.

Za identifikacijo se redkeje uporabljajo molekularne metode, kot je identifikacija na podlagi analize 16S rRNA, ki je sicer bolj zanesljiva, ni pa primerna v vseh okoliščinah, saj s to analizo ne moremo ločiti sevov vrste *E. coli* od sevov iz rodu *Shigella*. DNA vrste *E. coli* in štirih vrst rodu *Shigella* ima namreč tako visoko stopnjo sorodnosti (65–87 %), da bi jih morali uvrščati v isto vrsto, kar pa je zaenkrat predvsem v medicinski mikrobiologiji nesprejemljivo. Med samimi vrstami znotraj rodu *Escherichia* pa je odstotek sorodnosti DNA ugotovljen s hibridizacijo DNA med 29 % in 94 % (Garrity in sod., 2005; 607–624).

Preglednica 1: Razlikovanje petih vrst rodu *Escherichia*^a (Garrity in sod., 2005; 595, 609).

TEST	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> (metabolno neaktivni sevi)	<i>E. blattae</i>	<i>E. fergusonii</i>	<i>E. hermannii</i>	<i>E. vulneris</i>
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-
vodikov sulfid	-	-	-	-	-	-
ureaza	-	-	-	-	-	-
arginin-dihidrolaza	[-]	-	-	-	-	d
lizin-dekarboksilaza	+	d	+	+	-	[+]
ornitin-dekarboksilaza	d	[-]	+	+	+	-
hidroliza želatine	-	-	-	-	-	-
oksidaza	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	d	-	[+]	+	+
indol	+	[+]	-	+	+	-
citrat	-	-	d	[-]	-	-
giblјivost	+	-	-	+	+	+
KCN	-	-	-	-	+	[-]
malonat	-	-	+	d	-	[+]
D-glukoza	+	-	+	+	+	+
<i>Fermentacija sladkorjev:</i>						
D-adonitol	-	-	-	+	-	-
D-arabitol	-	-	-	+	-	-
celobioza	-	-	-	+	+	+
dulcitol	d	d	-	d	[-]	-
laktoza	+	[-]	-	-	d	[-]
D-manitol	+	+	-	+	+	+
melibioza	[+]	d	-	-	-	+
D-sorbitol	+	d	-	-	-	-
L-arabinoza	+	[+]	+	+	+	+
L-ramnoza	[+]	d	+	+	+	+
myo-inozitol	-	-	-	-	-	-
salicin	d	-	-	d	d	d
acetata	+	d	-	+	[+]	d
rumena pigmentacija	-	-	-	-	+	d

^aZnaki: -, 0–10 % pozitivnih; [-], 11–25 % pozitivnih; d, 26–75 % pozitivnih; [+], 76–89 % pozitivnih; +, 90–100 % pozitivnih. Vključeni so pozitivni testi po dveh dneh inkubacije pri 36 °C, z izjemo hidrolize želatine (22 °C).

2.3 *E. coli* LAHKO DELIMO V SKUPINE NA PODLAGI RAZLIČNIH KRITERIJEV

2.3.1 Delitev glede na prisotnost površinskih in flagelarnih antigenov

Serotipizacija je zgodovinsko ena od najbolj uporabljenih metod. Metoda temelji na različnosti strukture antigenov na bakterijski površini. Antigeni so lahko lipopolisaharidi (antigeni O), kapsularni polisaharidi (antigeni K) ali flagelarni proteini (antigeni H). Serološke skupine O označujemo od O1 do O173, čeprav so bile nekatere skupine naknadno izločene (O31, O47, O67, O72, O93, O94 in O122). Seroloških skupin K je 60, seroloških skupin H pa 56 (skupine H13, H22 in H50 so izločili) (Garrity in sod., 2005; 612).

2.3.2 Delitev v t. i. "sekvenčne tipe" na podlagi različnih zaporedij gospodinjskih genov

Čedalje pogosteje se uporablja razdelitev na osnovi primerjave nukleotidnega zaporedja sedmih t. i. gospodinjskih genov (ang. "house-keeping genes") z metodo MLST (ang. "multi-locus sequencing typing"). Glede na razlike v alelih in kombinacije alelov posameznih genov se uvrščamo v t. i. sekvenčne tipe (ang. "sequence type"). Ker je metoda za nekatere laboratorije oziroma večje število sevov preobsežna, se pogosto uporablja razvrščanje sevov vrste *E. coli* v t. i. filogenetske skupine po Clermontu.

2.3.2.1 Filogenetske skupine po Clermontu

Metodo je predlagal Clermont s sodelavci na podlagi testiranja 230 sevov, ki so predhodno že bili razvrščeni v filogenetske skupine z uporabo drugih metod. Hitra tehnika za ugotavljanje filogenetske skupine sevov *E. coli* temelji na metodi ugotavljanja prisotnosti in odsotnosti genov *chuA* in *yjaA* ter fragmenta DNA TspE4.C2 s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Analize s to metodo so pokazale, da je vrsta *E. coli* sestavljena iz štirih glavnih filogenetskih skupin A (s podskupinama A₀ in A₁), B1, B2 (s podskupinama B₂ in B₂₃) in D (s podskupinama D₁ in D₂) (Clermont in sod., 2000).

Preglednica 2. Razdelitev sevov *E. coli* v filogenetske skupine in podskupine glede na prisotnost genov *chuA* in *yjaA* ter fragmenta DNA TspE4.C2 (povzeto po Branger in sod., 2005)^a

Filogenetska skupina	Filogenetska podskupina	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2
A	A ₀	-	-	-
	A ₁	-	+	-
B₁	B ₁	-	-	+
B₂	B ₂ ₂	+	+	-
	B ₂ ₃	+	+	+
D	D ₁	+	-	-
	D ₂	+	-	+

^a Znak + pomeni prisotnost, znak – pa odsotnost pomnoženega zaporedja.

Z uporabo Clermontove metode se 85–91 % sevov *E. coli* pravilno uvrsti v filogenetske skupine (ugotovljeno s primerjavo metode MLST). S to metodo lahko 100-odstotno uvrstimo seve iz filogenetskih skupini B₁ in B₂, 91 % iz podskupine A₁ in 76 % iz skupine D, sevov iz podskupine A₀ pa s to metodo ne moremo pravilno uvrstiti v filogenetske skupine (Gordon in sod., 2008).

Sevi *E. coli* iz različnih filogenetskih skupin zasedajo različne ekološke niše in se razlikujejo po značilnostih ter imajo različen virulentni potencial. Tako seve iz skupin B₂ in D redkeje izoliramo iz okolja, rib, žab in plazilcev kot iz skupin A in B₁. Pri sesalcih iz črevesja pogosteje izoliramo seve skupine B₂, kot seve drugih skupin. Izolati zunajčrevesnih delov telesa pogosteje pripadajo skupinam B₂ in D kot pa A in B₁ (Gordon in sod., 2008).

Sevi z genotipom *chuA* -, *yjaA* - in TspE4.C2 -, pri katerih torej ni opaziti pomnožkov PCR, so relativno redki in ne pripadajo vsi podskupini A₀, zato jih moramo šteti kot nedoločljive in bi jih morali izločiti iz kakršnih koli statističnih analiz. Iz avstralske zbirke

izolatov (n = 888) iz vretenčarjev, zemlje, vode in sedimentov samo 9 % izolatov spada v to skupino. Med izolati (n = 75) izoliranimi iz živali jih v to skupino spada le 8 %, iz zbirk humanih izolatov pa 4 % (n = 150) oz. 5 % (n = 619), kar je odvisno od posameznega gostitelja in geografske pokrajine (Gordon in sod., 2008).

2.3.3 Delitev glede na patogenost in mesto povzročanja okužb

E. coli je komenzalni mikroorganizem v črevesni mikrobioti ljudi in toplokrvnih živali. Večina sevov je nepatogenih in ne povzroča škode gostitelju. Ob spremenjenem zdravstvenem stanju gostitelja in/ali spremembi ostale mikrobiote v ekološki niši ter vnosa sevov, ki imajo določene gene za virulentne dejavnike, postanejo sevi *E. coli* lahko patogeni mikrobi, ki povzročajo črevesne (IPEC) in zunajčrevesne okužbe (ExPEC). Seve IPEC in ExPEC na podlagi prisotnosti različnih virulentnih dejavnikov ter povzročitvi podobnih bolezenskih znakov in stanj delimo v posamezne skupine (Garrity in sod., 2005; 607–624), ki jih nekateri imenujejo tudi patotipe (Nataro in Kaper, 1998).

2.3.3.1 Sevi IPEC

Med seve IPEC, ki povzročajo črevesne bolezni, kot so diareje, enterokolitis in kolitis, uvrščamo enteropatogene seve *E. coli* (EPEC), enterotoksigene seve *E. coli* (ETEC), enteroinvazivne seve *E. coli* (EIEC), enteroagregativne seve *E. coli* (EAEC), difuzno adherentne seve *E. coli* (DAEC) in seve *E. coli*, ki sintetizirajo verotoksine (VTEC) (Garrity in sod., 2005; 607–624).

2.3.3.1.1 Enteropatogeni sevi *E. coli* (EPEC)

Sevi vključujejo le posamezne serotipe O:H, ki so povezani z boleznimi. Za EPEC seve je značilna zmožnost pritrjanja in povzročitve poškodbe tkiva ter nezmožnost proizvodnje verotoksinov (Garrity in sod., 2005; 613).

Sevom EPEC omogoča vezavo na epitelne celice gostitelja protein zunanje membrane intimin, ki ga kodira gen *eae* (Nataro in Kaper, 1998). Pri okužbi sevi EPEC inducirajo oblikovanje visoko organizirane aktinske strukture oz. aktinski podstavek znotraj gostiteljske epitelne celice, ki so vidne kot histopatološke spremembe črevesnega epitela – t. i. A/E lezije (ang. "attaching-and-effacing lesion"). Vsi geni, ki so vključeni v indukcijo te strukture, so na 35 kb velikem kromosomskem otoku patogenosti LEE (ang. "locus of enterocyte effacement"). Geni *sep* kodirajo komponente proteinov sekretornega sistema tipa III, geni *esp* pa kodirajo proteine, ki se izločajo preko tega sistema. Ta sekretorni sistem proteinov se aktivira ob stiku z gostiteljsko celico, kar poveča izločanje proteinov Esp. Za sprožitev signalne transdukcije v gostiteljsko celico je potrebna celotna aktivnost genov LEE, ki vključujejo gene *eae*, *esp* in *sep*, kar povzroči oblikovanje aktinskih podstavkov (Nisan in sod., 1998). Čeprav sevi EPEC lahko vdrejo v epitelne celice, se znotraj le teh ne delijo ter ne morejo pobegniti iz vakuole fagocitov, kar kaže na to, da niso specifično prilagojeni za preživetje znotraj celice (Nataro in Kaper, 1998).

Sevi EPEC primarno povzročajo resno diarejo pri otrocih mlajših od dveh let, predvsem v nerazvitih delih sveta. Izolirali so jih tudi iz otrok starejših od dveh let, ki pa so v le redkih primerih tudi zboleli. Razlog za relativno odpornost odraslih in starejših otrok ni znana. Mogoče je to posledica izgube specifičnih receptorjev s starostjo. Posamezne primere bolezni so opazili pri nekaterih odraslih z ogrožujočimi dejavniki (diabetiki, osebe z aklorhidrijo, starejši). Prenos sevov EPEC poteka fekalno-oralno ter s kontaminiranimi rokami, hrano ali javnimi površinami, kot so prevozna sredstva (Nataro in Kaper, 1998).

2.3.3.1.2 Enterotoksigeni sevi *E. coli* (ETEC)

V skupino ETEC uvrščamo seve *E. coli*, ki proizvajajo enega ali več enterotoksinov. Ti so lahko termo-labilni (LT, ang. "heat-labile toxin"; LT-I in LT-II) ali termo-stabilni (ST, ang. "heat-stable toxin"). LT-I in ST sta tesno sorodna s kolera toksinom in sta kodirana v plazmidu, LT-II pa v kromosomu. V sevih najdemo LT-I in ST posebej ali skupaj. Pogosto sta povezana z omejenim številom serotipov O:K:H (Garrity in sod., 2005; 607–624).

Sevi ETEC naselijo površino sluznice zgornjega dela tankega črevesja (Torres in sod., 2005), kjer se s fimbrijami pritrdijo na epitelne celice. Ne vdrejo v epitelne celice, temveč zaradi aktivnosti ST ali LT povzročajo diarejo (Nataro in Kaper, 1998).

Sevi ETEC so pogosto povezani z dvema glavnima kliničnima znakoma: otroško diarejo pri otrocih v nerazvitih delih sveta (Torres in sod., 2005) in v 20–40 % primerov s t. i. potovalno diarejo, ki je posledica kontaminirane hrane in vode, in se pojavlja pri ljudeh, ki prvič potujejo v nerazvite države. Sevi ETEC lahko v 10–30 % primerov povzročajo tudi sporadično endemično diarejo pri dojenčkih. Infekcija zahteva relativno veliko infektivno dozo. Pri izpostavljenem posamezniku se lahko razvije imunost sluznice za okužbe s sevi ETEC. Šolski otroci in odrasli redko kažejo znake okužbe s sevi ETEC (Nataro in Kaper, 1998).

2.3.3.1.3 Enteroinvazivni sevi *E. coli* (EIEC)

Sevi EIEC so biokemijsko, genetsko in po patogenezi zelo sorodni sevom iz rodu *Shigella*. Vdrejo lahko v epitelij debelega črevesja ljudi, tam rastejo in proizvajajo enega ali več sekretornih enterotoksinov, ki bi bili lahko pomembni pri povzročanju diareje. Velikokrat se seve EIEC napačno identificira kot seve vrste *Shigella* ali nepatogene seve *E. coli* (Nataro in Kaper, 1998). Z virulenco so povezani mnogi kromosomski in plazmidni geni (Garrity in sod., 2005; 607–624). Geni potrebni za invazivnost so zapisani v plazmidu (Nataro in Kaper, 1998). Med sevi EIEC najdemo malo različnih serotipov (Garrity in sod., 2005; 607–624).

Patogeneza vključuje vstop v epitelno celico, lizo endocitozne vakuole, znotrajcelično delitev, usmerjeno gibanje skozi citoplazmo in razširjenje v sosednje epitelne celice. Ko pride do okužbe, zaporedje teh dogodkov izsili močno vnetno reakcijo, ki je v veliki meri opazna kot čir (Nataro in Kaper, 1998).

Navadno se s sevi EIEC okužimo z vodo ali s hrano, opazili pa so tudi prenos s človeka na človeka. V razvitih državah je teh okužb manj, vendar pa občasno pride do večjih izbruhov zaradi okužene hrane (npr. v restavracijah) (Nataro in Kaper, 1998).

2.3.3.1.4 *Enteroagregativni sevi E. coli (EAEC)*

Za enteroagregativne seve *E. coli* je značilen poseben vzorec pritrditve (agregativno) *in vitro* na celice HEp-2 (trajna linija celic humanega karcinoma grla, ki jih uporabljajo za gojitev različnih virusov (<http://www.bfro.uni-lj.si/gost/smd/mikroslo/>)). V celičnih kulturah se opazi izrazito avtoaglutinacijo med bakterijskimi celicami in površino celic HEp-2, kot tudi na krovno stekelce z značilno plastovitostjo, ki jo najbolje opišemo z modelom zloženih opek (Garrity in sod., 2005; 607–624). Sevi EAEC ne sintetizirajo LT ali ST, na celični površini pa imajo t. i. agregativne vezavne fimbrije (AAF ang. "aggregative adherence fimbriae"), ki so kodirane v plazmidu (Nataro in Kaper, 1998).

V prvi fazi se sevi EAEC vežejo na črevesno sluznico in/ali na plast sluzi tankega ali debelega črevesja. Fimbrije tipa AAF so pomemben dejavnik, ki pospeši začetno kolonizacijo. V drugi fazi povzročijo povečano izločanje sluzi. Bakterije s sluzjo tvorijo močan biofilm, za katerega predvidevajo, da jim omogoča stalno kolonizacijo in povzročanje dolgotrajne diareje (≥ 14 dni). Tretja faza vključuje sintezo citotoksinov, kar povzroča poškodbe črevesnih celic (Nataro in Kaper, 1998). Sevi EAEC pogosto povzročajo potovalne diareje pa tudi akutne in kronične diareje (Garrity in sod., 2005; 607–624).

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

Difuzno adherentne seve *E. coli* določimo na podlagi vzorca difuzne adherence na celice HEp-2 (Garrity in sod., 2005; 607–624). Sevi DAEC imajo fimbrije, ki so kodirane v plazmidu ali v kromosomu in so sorodne fimbrijam iz družine Dr (Nataro in Kaper, 1998).

O značilnostih diareje, ki jo povzročajo sevi DAEC, je malo znanega. Nevarnost za diarejo povezano s sevi DAEC je povečana pri otrocih starih 1–5 let (Nataro in Kaper, 1998).

2.3.3.1.6 *Sevi E. coli, ki sintetizirajo verotoksine (VTEC)*

Seve vrste *E. coli* uvrščamo v to skupino na podlagi njihove zmožnosti izdelave verotoksinov. Sevi VTEC sintetizirajo vsaj štiri učinkovite z bakteriofagom posredovane

verotoksine: VT1, VT2, VT2c in VT2d. Lahko so prisotni eden, dva ali trije različni verotoksini (Karmali in sod., 2010). V to skupino sodi nad 100 različnih serotipov, najpogostejše serološke skupine pa so O157, O6, O26, O91, O103, O111, O113, O117, O118, O121, O128 in O145 (Garrity in sod., 2005; 607–624). V Sloveniji v zadnjih nekaj letih prevladujejo sevi iz serološke skupine O26 (Trkov, neobjavljeno).

Glavni vir sevov VTEC, ki povzročajo bolezni pri človeku, je živina, predvsem hrana govejega izvora, še posebej premalo skuhana govedina in nepasterizirano mleko (Karmali in sod., 2010).

Podskupina sevov VTEC so **enterohemoragični sevi *E. coli* (EHEC)**, ki povzročajo hemoragični kolitis (ang. "hemorrhagic colitis") in hemolitični uremični sindrom (ang. "haemolytic uremic syndrome") ter sintetizirajo verotoksine (Garrity in sod., 2005; 607–624). Hemoragični kolitis se prične z značilnimi nenadnimi krči v trebuhu, v nekaj urah jim sledi krvava diareja, ki hitro napreduje in nakazuje na krvavitve v gastrointestinalnem traktu. Diarejo lahko spremlja nizka vročina. Hemolitični uremični sindrom zajema tri pojave: akutna odpoved ledvic, trombocitopenijo in mikroangiopatično hemolitično anemijo (ang. "microangiopathy haemolytic anemia") (Karmali in sod., 2010).

Sevi EHEC imajo enake klinične in patogene značilnosti kot prototipski sev *E. coli* O157:H7 (Garrity in sod., 2005; 607–624). Nekateri sevi EHEC povzročajo tudi A/E lezije na epitelnih celicah in imajo 60-MDa velik plazmid (Nataro in Kaper, 1998).

Sevi EHEC imajo gene, ki kodirajo adhezine: *efa-1* (ang. "EHEC factor for adherence") in *toxB*, ter gene, ki kodirajo posrednike vezave: *iha*, *cah* (ang. "calcium-binding antigen 43 homologue") in *ompA* (ang. "outer membrane protein A") (Torres in sod., 2005). Zaradi vezave na epitelne celice in kolonizacije je pomemben protein zunanje membrane, intimin. Posledično pa lahko povzročijo tudi A/E lezije (Nataro in Kaper, 1998).

Sevi O157:H7 imajo plazmid pO157, ki kodira katalazo-peroksidazo, specializiran sistem transporta železa in hemolizin (enterohemolizin). Med VT pozitivnimi sevi jih ima 90 %

tudi gen za enterohemolizin. Liza eritrocitov sprosti hem in hemoglobin, kar poveča rast sevov O157:H7 in jim služi kot vir železa (Nataro in Kaper, 1998).

2.3.3.2 Sevi ExPEC

Med zunajčrevesne patogene *E. coli* (ExPEC) uvrščamo uropatogene seve *E. coli* (UPEC), seve *E. coli*, ki povzročajo neonatalni meningitis (NMEC), seve *E. coli*, patogene za ptice (APEC), in seve *E. coli*, ki povzročajo sepsa (SePEC) (Antão in sod., 2009^b).

Zunajčrevesni patogeni sevi *E. coli* kažejo precejšnjo genomsko raznolikost in imajo širok nabor virulentnih dejavnikov, kot so adhezini, toksini, mehanizmi za privzem železa, lipopolisaharidi, polisaharidne kapsule, invazine in mehanizme za izogib imunskemu sistemu (Antão in sod., 2009^b). Najdemo jih pri vseh starostnih skupinah, lahko se pojavijo na kateremkoli delu izven črevesja (Garrity in sod., 2005; 607–624).

2.3.3.2.1 Uropatogeni sevi *E. coli* (UPEC)

Uropatogeni sevi *E. coli* (UPEC) so primarni povzročitelji okužb urinarnega trakta, ki vključujejo cistitis (vnetje sečnega mehurja) in pielonefritis (vnetje glomerulov v ledvicah). Te bakterije so pridobile veliko virulentnih dejavnikov in razvile strategije, ki pospešijo bakterijsko rast in prisotnost v neugodnem okolju gostiteljevega urinarnega trakta. Izražanje adhezinov, kot so fimbrije tipa 1 in P-fimbrije, omogoča sevom UPEC vezavo in vstop v gostiteljeve celice in tkiva znotraj urinarnega trakta, medtem ko izražanje sideroforjev omogoča privzem gostiteljeve zaloge železa. Toksini povzročajo obsežne poškodbe tkiva, pospešijo širjenje bakterij, sproščajo gostiteljeve nutiente in onemogočajo imunske efektorske celice. Imajo tudi zmožnost prilagoditve in vplivanja na veliko gostiteljevih signalnih poti, vključno z vnetnim odzivom, preživetjem gostiteljeve celice in citoskeletno dinamiko. Med toksini, ki jih proizvajajo sevi UPEC, so: α -hemolizin (HlyA), ki ga po nekaterih podatkih proizvaja približno polovica vseh sevov UPEC, njegovo izražanje pa poveča resnost bolezni pri pacientu, proteina Vat (ang. "vacuolating autotransporter toxin") in Sat (ang. "secreted autotransporter toxin") ter citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (Wiles in sod., 2008).

Ugotovili so, da obstajajo sevi *E. coli*, ki so lahko prisotni v urinarnem traktu več mesecev ali let in ne povzročajo kliničnih znakov; ta pojav imenujemo asimptomatska bakteriurija (ABU, ang. "asymptomatic bacteriuria"). Z gostiteljem so v komenzalizmu podobnem odnosu in v nekaterih primerih lahko celo zaščitijo urinarni trakt pred kolonizacijo z bolj patogenimi sevi UPEC (Wiles in sod., 2008).

Primarni rezervoar sevov UPEC je lahko črevesni trakt človeka, saj se sevi, izolirani kot UPEC, pogosto ujemajo z izolati iz blata iste osebe (Wiles in sod., 2008). Možen vir je torej tudi hrana, če sevi iz živil kolonizirajo prebavni trakt ali pri prehodu skozi prebavni trakt zaidejo v sečila.

2.3.3.2.2 Sevi *E. coli*, ki povzročajo neonatalni meningitis (NMEC)

Skupina sevov NMEC je pogosto povezana s serološkimi skupinami O7, O18ac, O1 in O6, ki imajo antigen K1 enak kapsuli vrste *Neisseria meningitidis* tipa B (Garrity in sod., 2005; 607–624). Večino sevov NMEC (77 %) se uvršča v filogenetsko skupino B₂ (Johnson T. in sod., 2008).

Različni virulentni dejavniki se pri sevih NMEC različno pogosto pojavljajo: S-fimbrije (24 %); fimbrije Dr (3,8 %); nefimbrijski adhezini (3,6–25,6 %) (Antão in sod., 2009^b); adhezini I, ki ga kodira gen *yqi* (> 60 %) (Antão in sod., 2009^a).

2.3.3.2.3 Sevi *E. coli*, patogeni za ptice (APEC)

Sevi APEC povzročajo bolezni perutnine, kar ima ponavadi za posledico velike ekonomske izgube v perutninski industriji. Pri piščancih, puranih, racah in drugih ptičjih vrstah so večinoma povezani z okužbo zunajčrevesnih tkiv. Sevi APEC običajno povzročijo primarno okužbo respiratornih poti. Pri resnih sistemskih okužbah se bolezen konča s poginom okužene živali (Antão in sod., 2009^a).

Kolonizacijo respiratornih poti jim omogočajo fimbrije tipa 1 in P-fimbrije. Fimbrije tipa 1 so pomembne v prvih fazah kolonizacije, P-fimbrije pa šele v kasnejših. Ugotovili so, da ima 99 % sevov *E. coli* izoliranih iz obolelih ptic gen *csgA*, ki je odgovoren za biosintezo curlina, ki sestavlja t. i. curlijeva vlakna, ki so bistvena pri povzročanju sepse (Antão in sod., 2009^a).

2.3.4 Sevi *E. coli* pri drugih živalih

Kot pri ljudeh, so tudi pri živalih sevi vrste *E. coli* lahko komenzali ali pa povzročitelji bolezni. Pri rejnih živalih so sevi vrste *E. coli* povezani z različnimi patološkimi stanji, ki vključujejo kolibaciliarno diarejo, kolibaciliarno toksemijo pri prašičih, sistemsko kolibacilozo, koliformni mastitis in okužbe urinarnega trakta (Garrity in sod., 2005; 607–624).

2.4 VIRULENTNI DEJAVNIKI

Z virulenco opredeljujemo stopnjo patogenosti mikroba oziroma njegovo sposobnost povzročanja bolezni, ki je rezultat skupnega vpliva produktov enega ali več genov za virulentne dejavnike (Johnson, 1991).

Virulentne dejavnike lahko razdelimo v več skupin: adhezine, toksine, invazine, mehanizme za privzem železa in faktorje za izogibanje obrambnemu sistemu gostitelja (Bahrani-Mougeot in sod., 2002).

2.4.1 Adhezini

Adhezine uvrščamo med pomembnejše dejavnike bakterijske patogenosti, ker omogočijo začetek pritrditve na gostitelja in s tem otežujejo odstranitev z mesta okužbe oziroma iz telesa (Mulvey, 2002). Bakterijski adhezini so površinske strukture, ki so vključene v kolonizacijo gostiteljevega tkiva, lahko pa sprožijo tudi imunski odgovor gostitelja (Holden in Gally, 2004). Adhezini so lahko fimbrijski ali afimbrijski (Garrity in sod., 2005; 609-610).

Večina sevov vrste *E. coli* ima fimbrijske adhezine. Opisanih je bilo že več kot 30 različnih fimbrij. Razdelimo jih na osnovi lastnosti adhezinov za vezavo na eritrocite različnih gostiteljev v prisotnosti sladkorja manoze. Tako imamo dva glavna tipa fimbrij: za manozo-občutljive (MS), ki ob prisotnosti α -D-manoze izgubijo zmožnost zlepljanja eritrocitov in za manozo-odporne (MR), ki to lastnost ohranijo. Med MS fimbrije, ki jih najdemo pri večini sevov vrste *E. coli*, uvrščamo tudi fimbrije tipa 1. Geni zanje so v kromosomu. Fimbrije tipa 1 povezujejo bakterijo z mukoznimi površinami, z gostiteljevimi neceličnimi sestavinami in z raznimi vnetnimi celicami. Na izražanje fimbrij tipa 1 vplivajo okolje in rastni pogoji. MR fimbrije, med katere uvrščamo fimbrije P, S, F1C in družino adhezinov Dr, pogosto delujejo kot virulentni dejavniki ter služijo za posredno vrstno- ali organ-specifično povezavo bakterije. Geni za te proteine so v kromosomu ali plazmidih. V kromosomu so pogosto skupaj z drugimi virulentnimi geni v t. i. otokih patogenosti (PAIs, ang. "pathogenicity islands"). Pri vrsti *E. coli* MR fimbrije lepo prikažejo sposobnost vrste za prilagoditev na receptor-specifične epitelne celice določenega gostitelja, primarno preko horizontalne pridobitve genskih kaset s plazmidi, fagi ali drugimi mobilnimi elementi DNA, ki omogočajo kolonizacijo. Dokaz za takšne horizontalne prenose fimbrijskih genov pri *E. coli* je velika podobnost med genetsko organizacijo fimbrijskih operonov med *E. coli* in drugimi člani družine *Enterobacteriaceae*. Bakterije se lahko vežejo tudi z adhezini, ki so afimbrijski oz. nefimbrijski (Garrity in sod., 2005; 609–610).

2.4.1.1 Fimbrije tipa 1

Fimbrije tipa 1 so za manozo-občutljive. So polimeri podenot pilina FimA. Eno fimbrijo sestavlja približno 100 enakih proteinskih podenot (Antão in sod., 2009^b). Fimbrije tipa 1 kodira osem genov *fim*. Zgrajene so iz helikalne palčke ali fibrile, ki jo gradijo podenote FimA, in iz konice, ki jo gradijo protein FimH ter adapterska proteina FimF in FimG (Mulvey, 2002). Gen *fimC* je periplazmatski šaperon, ki usmerja sestavljanje fimbrij tipa 1 (Antão in sod., 2009^b). FimH je ključen protein za pritrjevanje. S C-terminalnim delom je zasidran v konico fibrile, N-terminalni del pa služi za vezavo ogljiko-hidratnih receptorjev (Mulvey, 2002). Za receptor-specifičen ali manozna-specifičen adhezin fimbrije tipa 1 je odgovoren produkt gena *fimH* (Antão in sod., 2009^b). Podenota FimH lahko veže

glikoproteine, ki vsebujejo monomanozo ali oligomanozo. Tisti, ki vežejo monomanozo z nizko afiniteto, so ponavadi povezani s komenzalnimi črevesnimi sevi, tisti, ki pa vežejo monomanozo z visoko afiniteto, pa s sevi UPEC (Le Bouguenec, 2005).

Genetski zapisi za fimbrije tipa 1 so zelo variabilni, kar vpliva na lastnost vezave FimH. Gena *fimB* in *fimE* regulirata faze variacije fimbrij tipa 1 pri sevih *E. coli*. Uroplakin 1a je primarni receptor za vezavo fimbrij tipa 1. Ta glikoprotein tvori glikoproteinske plake, ki pokrivajo lumen mehurja. FimH sodeluje tudi pri vezavi med bakterijami pri njihovi agregaciji in tvorbi biofilmov ter pri kolonizaciji v orofarinksu (Mulvey, 2002).

Podenota FimH lahko deluje tudi kot invazin, saj sodeluje pri vdoru v celice gostitelja, kjer se razmnožujejo in so zaščitene pred gostiteljevo obrambo in antibiotiki (Le Bouguenec, 2005). Med sevi *E. coli* ima 50–70 % zapis za fimbrije tipa 1 (Antão in sod., 2009^b).

Fimbrije tipa 1 so pogosti pri sevih *E. coli* in sevih iz rodu *Salmonella*. Raziskave so pokazale, da so si posamezni geni iz gruče genov *fim* lahko med omenjenimi sevi bolj ali manj sorodni. Predvidevajo, da se je večkrat zgodil horizontalni prenos iste gruče genov, zaradi česar imajo različne regije posamezne gruče genov lahko različno evolucijsko zgodovino (Boyd in Hartl, 1999). Poleg vrste *E. coli* in vrst iz rodu *Salmonella* so fimbrije tipa 1 našli tudi pri sevih vrste *Pseudomonas putida* in *Klebsiella pneumoniae* (Captani in sod., 2006).

2.4.1.2 S-fimbrije

S-fimbrije so zgrajene iz ene večje podenote SfaA, velike 16-kDa, ter treh manjših podenot SfaG, SfaH in SfaS, ki so kodirane v gruči genov *sfa* (Antão in sod., 2009^b). Večja podenota SfaA omogoča vezavo na glikolipide in plazminogen endotelnih celic in je skupaj z eno od manjših podenot SfaS pomembna za vezavo na gostiteljsko celico. SfaS tvori konico fimbrije in se veže na sialično kislino v receptorjih (Mulvey, 2002).

Izražanje genov *sfa* je odvisno od posameznih okoljskih pogojev, kot so temperatura, osmolarnost in prisotnost glukoze ter regulacije na molekularni stopnji z regulatornima proteinoma, ki ju kodirata gena *sfaB* in *sfaC* (Antão in sod., 2009^b).

S-fimbrije se specifično vežejo na človeški epitelij, kot so žilni endotelij žil v ledvicah, kapilarni endotelij v intersticiju in visceralni epitelij glomerulov, kjer so prisotni sialično-kislinski ostanki. Pomembne so tudi za razvoj vnetja mehurja, saj so sialično-kislinski ostanki prisotni tudi na notranji površini mehurja S-fimbrije vežejo tudi komponente ekstracelularnega matriksa fibronektin in laminin (Antão in sod., 2009^b).

Najpogosteje jih najdejo pri sevih *E. coli*, ki povzročajo sepso, vnetje ledvic in meningitis pri novorojencih. Bakterijam olajšajo širjenje po telesu in med gostiteljskimi tkivi (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Mulvey, 2002).

2.4.1.3 Intimin

Intimin (Eae) je 94 kDa velik protein v zunanji membrani, ki ga kodira gen *eae*, in je pomemben za intiminsko vezavo na gostiteljsko celico (Vallance in Finlay, 2000). Gen *eae* je del otoka patogenosti LEE, kjer so kodirani tudi drugi pomembni virulentni dejavniki (Ochoa in sod., 2000).

Intimin se iz citoplazme prenese v periplazmo, in se nato vsidra v zunanjo membrano (http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway?ece05130+Z5110). Lahko se veže na 90 kDa velik protein Tir, ki ga predhodno izdelata bakterija, nato pa se s translokacijo prenese v membrano gostiteljske celice. Intimin in protein Tir tako predstavljata povezavo med bakterijo in gostiteljsko celico (Vallance in Finlay, 2000).

2.4.1.4 Curljeva vlakna

Poleg flagel in fimbrij so curljeva vlakna tretja skupina struktur na površini sevov *E. coli*. Sestavljena so samo iz ene podenote imenovane curlin, ki se razlikuje od vseh poznanih fimbrijskih proteinov. Večina naravnih izolatov *E. coli* ima gen za curlin, vendar lahko

samo nekateri sestavijo podenote v curlijeva vlakna. Curlijeva vlakna so kodirana z gručo genov *csg* (ang. "curlin subunit gene"). Izražanje genov, ki kodirajo curlijeva vlakna, je kompleksno z več kontrolnimi elementi, kot so H-NS, RpoS in OmpR (Antão in sod., 2009^b).

Curlijevi polimeri imajo lahko medsebojni vpliv ali se povežejo s številnimi človeškimi proteini, kot so proteini matriksa fibronektin in laminin ter proteini fibrinolitičnega sistema, s proteini plazme in s plazminogenom. Te specifične interakcije pospešijo prilagoditev bakterij, ki izražajo curlin, na različne niše v okuženem gostitelju (Antão in sod., 2009^b).

Curlijeva vlakna lahko omogočijo tudi vezavo na teflon in nerjaveče jeklo ter sodelujejo pri razvoju biofilma pri *E. coli*. Nastanek biofilma pri *E. coli* je odvisen od gena *csgA*, zato predvidevajo, da so curlijeva vlakna pomembna pri začetnih fazah razvoja biofilma med fazo pritrjanja (Barnhart in Chapman, 2006).

2.4.1.5 Nefimbrijski adhezini Iha in Hra

Adhezin Iha (ang. "IrgA homologue adhesin") je protein, ki ima tako ime zaradi visoke homologije z enterobaktinskim sideroforjem IrgA bakterije *Vibrio cholerae* (Leveille in sod., 2006). Iha je protein v zunanji membrani, ki ga kodira gen *iha* (Johnson in sod., 2005). Je kateholatni sideroforni receptor, ki lahko v celice privzema enterobaktin in sorodne spojine (Leveille in sod., 2006).

Nefimbrijski adhezin Hra (ang. "heat-resistant agglutinin") je proti vročini odporen protein zunanje membrane, ki zleplja človeške ter živalske eritrocite in črevesne celice neodvisno od prisotnosti manoze (Srinivasan in sod., 2003). Gen *hra* je eden od značilnih označevalcev, ki so povezani z bakteriemijo. V eni od raziskav so gen *hra* ugotovili pri 45 % sevov izoliranih iz krvi, pri fekalnih izolatih pa je bil prisoten le v 20 % izolatov (Johnson J. R. in sod., 2008).

2.4.2 Toksini in invazini

Nekatere patogene bakterije med ali po kolonizaciji gostiteljevega tkiva sproščajo različne toksine in invazine, ki poškodujejo gostiteljeve celice ali ekstracelularni matriks med njimi. Na ta način lahko prodrejo v globlje celične plasti, kjer so bolj zaščitene pred delovanjem imunskega sistema in protimikrobnimi snovmi.

2.4.2.1 Enterohemolizin

Enterohemolizin je povezan s sevi vrste *E. coli*, ki povzročajo hemoragični kolitis in hemolitični uremični sindrom (LeBlanc, 2003). Glede na primarno strukturo je enterohemolizin podoben α -hemolizinu. Uvrščamo ga med citolizine, ki tvorijo pore v membrani celic, v družino RTX (ang. "repeats in toxin") proteinov (Schmidt in sod., 1995).

2.4.2.2 Hemolizin alfa

Hemolitični sevi vrste *E. coli* največkrat sintetizirajo in izločajo α -hemolizin. Sintezo in izločanje omogočajo proteini zunanje membrane TolC in produkti genov *hlyA*, *hlyB*, *hlyC* in *hlyD*, ki so kodirani v operonu *hly*. Protein HlyA ima hemolitično funkcijo, HlyC pa z acilacijo aktivira HlyA. Proteina HlyB in HlyD tvorita membranski kompleks, ki skupaj s proteinom TolC omogočita sekrecijo HlyA preko zunanje membrane. α -hemolizin za svoje delovanje po sekreciji potrebuje tudi dvovalentne kalcijeve katione (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Johnson, 1991).

Aktiviran hemolizin se veže na gostiteljske celice in povzroči nastanek eritrocitnih duhkov. α -hemolizin razgrajuje eritrocite vseh sesalcev in celo rib. Toksičen je tudi za levkocite, fibroblaste in uroepitelne celice in sodeluje pri vnetju, poškodbi ter oslabitvi imunskega sistema gostitelja (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Johnson, 1991).

Hemolizin običajno sintetizirajo zelo virulentni sevi. Končni učinki hemolizina so oviranje funkcije fagocitov, sprostitev železa iz eritrocitov in direktna toksičnost za gostiteljeva tkiva (Johnson, 1991).

2.4.2.3 Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 ali CNF1

Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (CNF1) je pogosto povezan z okužbami sečil. CNF1 je protein, ki ga kodira en sam gen. Predvidevajo, da CNF1 sproži spremembe v citoskeletu gostiteljskih celic in s tem omogoči vstop v celico sevom, ki so sicer nepatogeni in neinvazivni. Delovanje CNF1 v mehurju povzroči luščenje uroepitelnih celic, v črevesju inducira propad epitelnih celic, poveča permeabilnost celičnih plasti ter zmanjša sposobnost fagocitoze imunskih celic (Bahrani-Mougeot in sod., 2002).

2.4.2.4 Avtotransportni toksini

Avtotransportni toksini sami vodijo svoje izločanje preko zunanje membrane. Sestavljeni so iz treh podenot: signalnega zaporedja, α -domene in β -domene. β -domena naredi v zunanji membrani hidrofilno poro, skozi katero α -domena, ki je nosilka funkcije proteina, potuje na celično površino. Tam lahko ostane kovalentno vezana na membrano ali pa se s proteolizo sprosti v okolje (Guyer in sod., 2000; Kostakioti in Stathopoulos, 2004; Restieri in sod., 2007).

Avtotransportni proteini so pogosto virulentni dejavniki. Pri vseh je zaporedje β -domene ohranjeno, α -domene pa so raznolike in lahko delujejo kot adhezini, proteaze, hemaglutinini, citotoksini, enterotoksini, mucinaze, imunoglobulinske proteaze in mediatorji celične gibljivosti (Guyer in sod., 2000; Kostakioti in Stathopoulos, 2004; Restieri in sod., 2007).

Primer avtotransporterskih proteinov pri sevih *E. coli* sta Sat in Vat. Sat (ang. "secreted autotransporter toxin") pogosto povezujejo z zelo virulentnimi sevi. Najprej povzroči vakuolizacijo, nato pa tudi smrt epitelnih celic ledvic in mehurja pa tudi nekaterih drugih celičnih tipov. V gostitelju povzroči močan imunski odgovor, ima pa tudi proteolitično aktivnost. Zapis za Sat pogosteje najdemo pri sevih ExPEC (Heimer in sod., 2004; Guyer in sod., 2000).

Tudi protein Vat (ang. "vacuolating autotransporter toxin") je avtotransporter, ki povzroči vakuolizacijo embrionalnih fibroblastov pri kokoših in je najpomembnejši virulentni dejavnik sevov APEC. Pri okužbah sečil povzroči lizo uroepitelnih celic in pripomore k hitrejši kolonizaciji globljih tkiv (Parham in sod., 2005).

2.4.2.5 Omptini

Omptin T ali peptidaza zunanje membrane (ang. "outer membrane endopeptidase T") cepi peptidno vez med bazičnimi aminokislinami (Baaden in Sansom, 2004; McCarter in sod., 2004). OmpT katalizira tudi aktivacijo plazminogena v plazmin in razgrajuje številne pozitivno nabite protimikrobne peptide, zato predvidevajo, da ima pri sevih UPEC zaščitno vlogo. OmpT cepi protimikrobni peptid protamin, ki ga izločajo epitelne celice mehurja (McCarter in sod., 2004).

2.4.2.6 Verotoksini

Verotoksini (VT) so podobni šigatoksinom, ki jih proizvaja *Shigella dysenteriae* tipa 1 (Karmali in sod., 2010). Verotoksine sintetizira nad 100 različnih serotipov, najpogostejše serološke skupine O pa so O157, O6, O26, O91, O103, O111, O113, O117, O118, O121, O128, O145 (Trkov M. in sod., 2008). Poznamo dve glavni skupini verotoksinov VT1 in VT2 in dva podtipa VT2c in VT2d. V bakteriji je lahko prisoten zapis za enega, dva ali tri različne VT (Karmali in sod., 2010).

VT so zgrajeni iz 32 kDa velike encimsko-aktivne podenote A, povezane s pentamerom iz 7,5 kDa velikih podenot B (vezavne podenote) (Karmali, 1989).

Splošen način delovanja takšnih toksinov vključuje vezavo podenote B na glikolipidni receptor Gb3 (ang. "globotriaosylceramide") na tarčni celici, toksini vstopijo z receptorsko posredovano endocitozo. Podenota A se sprosti v citosol in povzroči depurinacijo adenina v 28S rRNA, kar inhibira sintezo proteinov in povzroči apoptozo v evkariontski celici (Karmali in sod., 2010).

Vir bakterij, ki sintetizirajo VT, so različne, pogosto zdrave domače živali, zlasti govedo. Z iztrebki okuženih živali se širijo v okolje, v vodo, na zelenjavo in sadje (Trkov M. in sod., 2008). V prebavilu goveda največkrat ugotovijo prisotnost verotoksina tipa VT2c (Fröhlich in sod., 2009). V mleku in siru so pogosteje zasledili prisotnost verotoksinov iz skupine VT2 (Stephan in sod., 2008).

2.5 ZDRAVLJENJE OKUŽB Z *E. coli*

Vedno se zdravi zunajčrevesne okužbe in meningitis povzročen z *E. coli*. Pri črevesnih okužbah je zdravljenje odvisno od starosti bolnika in identifikacije patogena.

Za zdravljenje se najpogosteje uporablja protimikrobne učinkovine iz skupin β -laktamov, tudi β -laktamov s širokim spektrom delovanja, kinolone in kombinacijo trimetoprim-sulfometoksazol. Problem pri zdravljenju predstavlja odpornost, ki je v Evropski uniji in drugod po svetu čedalje večja. Čeprav so povzročitelji črevesnih okužb najmanj odporni, se število odpornih sevov iz leta v leto povečuje.

2.5.1 Odpornost proti protimikrobnim snovem

Pri sevih izoliranih iz živil v zadnjem času ugotavljajo pojavljanje determinant odpornosti proti kinolonom, ki jih ne moremo izslediti z difuzijskimi antibiogrami. Problematične so t. i. PMQR (ang. "plasmid-mediated quinolone resistance"). Tehnika multipleksnega PCR je hitra in zanesljiva za hiter pregled Qnr-pozitivnih sevov, saj lahko na tak način ugotovimo vse do sedaj poznane gene *qnr* (Cattoir in sod., 2007).

2.6 *E. coli* V ŽIVILIH

O prisotnosti različnih sevov vrste *E. coli* v živilih je malo podatkov. Podatke, kjer sevi niso povezani z izbruhi bolezni, pogosto pridobivamo z rutinskimi monitoringi v prehranskih in proizvodnih obratih, kjer *E. coli* najpogosteje zaide v hrano preko okužene vode ali okuženih živali (DuPont, 2007).

2.7 BAKTERIJE, KI SO ŽE BILE IZOLIRANE IZ ŽIVIL IN SO FENOTIPSKO ZELO PODOBNE *E. coli*

2.7.1 *Leclercia*

Leta 1962 je Leclerc opazil rumeno obarvane bakterije, ki so bile podobne *E. coli* na osnovi rezultatov testa IMVC. Razlikovale so se po rumenem pigmentu in fermentaciji večjega števila sladkorjev. Predlagal je uvrstitev v novo vrsto rodu označeno kot *Escherichia adecarboxylata*. Leta 1986 je Tamura s sodelavci z DNA-DNA hibridizacijo ugotovil zelo nizko sorodnost z rodом *Escherichia*, zato je znotraj družine *Enterobacteriaceae* predlagal nov rod *Leclercia* z eno samo vrsto *Leclercia adecarboxylata* (*L. adecarboxylata*). Tipični sev je bil izoliran iz pitne vode (Garrity in sod., 2005; 698–701).

Sevi vrste *L. adecarboxylata* imajo lastnosti, ki so značilne za *Enterobacteriaceae*, saj so po Gramu negativne, majhne, paličasto oblikovane celice, s peritrihimi flageli in gibljive pri temperaturi med 25 °C in 36 °C (Garrity in sod., 2005; 698–701). So fakultativni anaerobi in so mezofilni. Rezultat oksidaznega testa je negativen, vsebnost G-C parov DNA pa je 52–54 % (Stock in sod., 2004). V preglednici 3 so navedene glavne biokemijske značilnosti, ki se jih uporablja pri identifikaciji.

Preglednica 3: Biokemijske značilnosti vrste *L. adecarboxylata*^a (Garrity in sod., 2005; 598 in 701).

TEST	<i>L. adecarboxylata</i>
indol	+
metil rdeče	+
Voges-Proskauer	-
citrat	-
vodikov sulfid	-
ureaza	d
hidroliza želatine	-
oksidazni test	-
ONPG	+
lizin-dekarboksilaza	-
arginin-dihidrolaza	-
ornitin-dekarboksilaza	-
rumena pigmentacija	d
KCN	+
<i>Fermentacija sladkorjev:</i>	
L-arabinoza	+
myo-inozitol	-
manitol	+
melibioza	+
L-ramnoza	+
salicin	+
D-sorbitol	-
celobioza	+
D-glukoza	+
dulcitol	+
D-arabitol	+

^aZnaki: -, 0-10 % pozitivnih; [-], 11-25 % pozitivnih; d, 26-75 % pozitivnih; [+], 76-89 % pozitivnih; +, 90-100 % pozitivnih. Vključeni so pozitivni testi po dveh dneh inkubacije pri 36 °C, z izjemo hidrolize želatine (22 °C).

Sevi vrste *L. adecarboxylata* so razširjeni v naravi in so jih že izolirali iz hrane, vode in drugih okoljskih virov, prav tako pa tudi iz različnih kliničnih vzorcev, kot so kri, sputum, urin in gnojne rane (Stock in sod., 2004). Verjetno gre za oportunističnega patogena, ki lahko pri človeku povzroči zunajčrevesne okužbe. Občasno jih lahko izoliramo v človeškem blatu, vendar še ni bilo zabeleženo, da povzročajo diarejo ali druge oblike črevesnih okužb (Garrity in sod., 2005; 698-701). Pogosto jih izolirajo neposredno iz

okuženega urinarnega trakta, vendar se jih zaradi fenotipske podobnosti med rodovoma pri identifikaciji lahko spregleda ali zameja z *E. coli* (Stock in sod., 2004).

Večina sevov je občutljivih za colistin, nalidiksinsko kislino, sulfadiazin, gentamicin, streptomycin, kanamicin, tetraciklin, kloramfenikol, karbenicilin, cefaloridin in ampicilin. Odporni so proti penicilinu (Garrity in sod., 2005; 698–701).

2.7.2 *Buttiauxella*

Rod *Buttiauxella* je dobil ime po francoskem mikrobiologu Reneju Buttiauxu. Sevi iz rodu *Buttiauxella* so po Gramu negativni, gibljivi s peritrihimi flageli, ravni bacili, velikosti $0,5\text{--}0,7 \times 2,3 \mu\text{m}$, ki se pojavljajo posamezno ali v parih, kar jih uvršča v družino *Enterobacteriaceae*. So fakultativni anaerobi in kemoorganotrofi. Vsebnost G-C parov DNA je 47–51 %. Med seboj jih je fenotipsko zelo težko ločiti. Optimalni pogoji za rast so pri temperaturi med 25 °C in 35 °C . Večina jih je psihrotolerantnih in rastejo pri temperaturi 4 °C (Garrity in sod., 2005; 641–645).

Tipična vrsta rodu je *Buttiauxella agrestis* (*B. agrestis*), ki je bila opisana leta 1982 (Garrity in sod., 2005; 641-645). Je edina vrsta tega rodu, ki jo lahko identificiramo s testom test Api 20E.

Ostale vrste (*Buttiauxella brennerae*, *Buttiauxella ferragutiae*, *Buttiauxella gaviniae*, *Buttiauxella izardii*, *Buttiauxella noackiae* in *Buttiauxella warmboldiae*) so opisali leta 1996 (Garrity in sod., 2005; 641–645). V preglednici 4 so navedene glavne biokemijske značilnosti, ki se jih uporablja pri identifikaciji.

Preglednica 4: Značilnosti vrst iz rodu *Buttiauxella*^a (Garrity in sod., 2005; 595 in 642).

TEST	<i>B. agrestis</i>	<i>Buttiauxella brennerae</i>	<i>Buttiauxella ferruginae</i>	<i>Buttiauxella gaviniae</i>	<i>Buttiauxella izardii</i>	<i>Buttiauxella noackiae</i>	<i>Buttiauxella warmboldiae</i>
hibridizacijska skupina	1	4	2	3	5	6	7
indol	-	-	-	-	-	d	-
citrat	+	-	-	[-]	-	d	d
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-
lizin-dekarboksilaza	-	-	+	-	-	-	-
arginin-dihidrolaza	-	-	-	[-]	-	d	-
ornitin-dekarboksilaza	+	d	[+]	-	+	-	-
vodikov sulfid	-	-	-	-	-	-	-
ureaza	-	-	-	-	-	-	-
hidroliza želatine	-	-	-	-	-	-	-
oksidazni test	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	+	+
acetat	[+]	d	+	[+]	+	+	+
KCN	+	+	+	[+]	+	+	-
metil rdeče	+	+	+	+	+	+	+
L-fenilalanin deaminaza	-	-	-	-	-	d	-
N-acetil-D-galaktozamin	+	+	+	d	+	+	+
N-acetil-L-glutamat	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil-L-glutamin	-	-	-	[-]	-	[+]	-
N-acetilglicin	-	-	-	-	-	-	-
3-hidroksifenilacetat	-	-	[+]	-	-	-	-
3-hidroksibenzoat	-	-	-	-	-	-	-
5-ketoglukonat	-	+	-	+	d	+	-
malonat	+	+	-	+	+	+	+
3-metil-D-glukopiranozid	+	d	[+]	+	[+]	[+]	-
fenilacetat	d	-	d	[-]	d	d	-
3-fenilpropionat	-	-	-	-	-	-	-
L-prolin	[+]	+	[+]	+	+	[+]	+

^aZnaki: -, 0–10 % pozitivnih; [-], 11–25 % pozitivnih; d, 26–75 % pozitivnih; [+], 76–89 % pozitivnih; +, 90–100 % pozitivnih. Vključeni so pozitivni testi po dveh dneh inkubacije pri 36 °C, z izjemo hidrolize želatine (22 °C).

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 4: Značilnosti vrst iz rodu *Buttiauxella*^a (Garrity in sod., 2005; 595 in 642).

TEST	<i>B. agrestis</i>	<i>Buttiauxella brennerae</i>	<i>Buttiauxella ferrugutiae</i>	<i>Buttiauxella gaviniae</i>	<i>Buttiauxella izardii</i>	<i>Buttiauxella noackiae</i>	<i>Buttiauxella warmboldiae</i>
<i>Kislinski test:</i>							
adonitol	–	d	–	d	–	–	–
D-arabinoza	d	–	–	d	+	d	+
D-arabitol	–	d	–	d	–	–	–
D-tagatoza	–	–	–	[–]	–	–	–
palatinoza	+	+	+	+	d	+	–
laktuloza	–	–	–	–	–	–	–
maltitol	[+]	+	+	[+]	d	[+]	–
α-metil-D-glukopiranozid	–	d	[–]	–	–	–	–
rafinoza	d	+	[–]	–	–	–	–
L-arginin	–	–	–	–	–	[–]	–
dulcitol	–	–	–	[–]	–	–	–
L-fukoza	[+]	–	–	d	[+]	–	+
glicerol	d	–	–	–	–	–	–
laktoza	+	+	–	–	+	–	–
mucate	d	+	[–]	d	d	+	–
sukroza	–	–	–	[–]	–	–	–
tartrat	d	[–]	–	d	[–]	+	–
<i>Fermentacija sladkorjev:</i>							
myo-inozitol	–	–	–	–	–	–	d
D-sorbitol	–	–	+	–	–	–	–
melibioza	+	+	–	–	d	–	–
L-arabinoza	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnoza	+	d	+	+	+	+	+
salicin	+	+	+	+	+	+	+

^aZnaki: –, 0–10 % pozitivnih; [–], 11–25 % pozitivnih; d, 26–75 % pozitivnih; [+], 76–89 % pozitivnih; +, 90–100 % pozitivnih. Vključeni so pozitivni testi po dveh dneh inkubacije pri 36 °C, z izjemo hidrolize želatine (22 °C).

Analiza 16S rRNA tipskega seva vrste *B. agrestis* jasno uvršča rod v družino *Enterobacteriaceae* v skupino *Gammaproteobacteria* (glej Prikaz dela bakterijskega drevesa življenja, slika 1). Stopnja sorodnosti vseh sedmih tipskih sevov rodu *Buttiauxella* je zelo visoka (99,1–99,7 %) (Garrity in sod., 2005; 641–645), zato s pomočjo analize 16S rRNA lahko določimo le rod *Buttiauxella*, ne pa tudi vrste (Spröer in sod., 1999).

Znotraj rodu *Buttiauxella* pa se sevi na osnovi DNA hibridizacije delijo v 7 hibridizacijskih skupin, ki predstavljajo vseh 7 vrst tega rodu in so si med seboj podobne od 45–65 % (Garrity in sod., 2005; 641–645).

Prvotno so mislili, da je naravni habitat rodu *Buttiauxella* voda, čeprav je bil le tipski sev vrste *Buttiauxella ferragutiae* izoliran iz neonesnažene vode, tipski sevi ostalih vrst pa so bili izolirani iz polžev (Müller in sod., 1996).

O pomenu vrst iz rodu *Buttiauxella* je znanega bolj malo, zato tudi patogenost sevov iz rodu *Buttiauxella* za ljudi in živali še ni povsem razjasnjena (Garrity in sod., 2005; 641–645). V letu 2002 sta bila opisana dva primera izolacije sevov iz tega rodu iz kliničnih vzorcev. Sev vrste *B. agrestis* so izolirali iz okužene rane na glavi pacienta iz Pariza, kar je potrdila identifikacija z Api-50CHE in analiza 16S rRNA (Fihman in sod., 2002), sev vrste *Buttiauxella gaviniae* pa so izolirali iz vzorca urina pacienta z nevrološkimi težavami in okužbo mehurja, kar je potrdila identifikacija s kompletom Api-20E in analiza 16S rRNA (De Baere in sod., 2002).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Bakterijski sevi

V diplomskem delu smo analizirali seve, ki so jih na IVZ – OSM v letih 2007 in 2008 izolirali iz živil v okviru t. i. internega nadzora proizvajalcev oziroma ponudnikov hrane. Vseh 124 sevov (preglednica 5), od tega 68 iz leta 2007 in 56 iz leta 2008, je bilo primarno identificiranih (glej 3.2.1.1) kot *E. coli*.

Preglednica 5: Zbirka sevov IVZ – OSM.^a

Zap. št.	Prot. št.	Leto izolacije	Vrsta vzorca	Občutljivost za protimikrobne snovi																			
				AMP	CEFO	KLOR	CIP	GEN	KAN	NAL	STR	SUL	TET	TRI	SXT	NEO	APR	FLOR	AMO	CEFA	ENR	CEFT	CEFP
0701	2758	2007	sveža listnata zelen.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0702	2803	2007	solata	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0703	2855/1	2007	haše omaka	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0704	2855/2	2007	haše omaka	I	I	S	I	S	S	S	S	I	R	I	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	I
0705	2861	2007	ribja gotova jed	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0706	3372	2007	n. p.	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0707	3481/1	2007	surovo mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0708	3491/4	2007	surovo mleto meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0709	3492/1	2007	surovo mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0710	3493/5	2007	surovo mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0711	1291/1	2007	n. p.	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0712	1291/2	2007	n. p.	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0713	n.p.	2007	blato	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0714	2075/1	2007	obarjena šunka	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0715	2075/2	2007	obarjena šunka	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0716	2473	2007	n. p.	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0717	2550/1	2007	n. p.	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0718	2615	2007	tatarski biftek	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt

^a Razlaga oznak: n. p. – ni podatka; Zap. št. – zaporedne številke, ki smo jih uporabljali na Oddelku za biologijo; Prot. št. – protokolne številke, ki so jih uporabljali na IVZ; AMP – ampicilin; CEFO – cefotaksim; KLOR – kloramfenikol; CIP – ciprofloksacim; GEN – gentamicin; KAN – kanamicin; NAL – nalidiksinska kislina; STR – streptomycin; SUL – sulfonamidi; TET – tetraciklin; TRI – trimetoprim; SXT – kombinacija trimetoprima in sulfometoksazola; NEO – neomicin; APR – apramicin; FLOR – florfenikol; AMO – amokssicilin; CEFA – cefalotin; ENR – enrofloksacin; CEFT – ceftazidim; CEFP – cefpodoksin; n.p. – ni podatka; nt – sevi niso bili testirani; S – občutljiv; I – intermediarno odporen; R – odporen.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 5**: Zbirka sevov IVZ – OSM.^a

Zap. št.	Prot. št.	Leto izolacije	Vrsta vzorca	Občutljivost za protimikrobne snovi																			
				AMP	CEFO	KLOR	CIP	GEN	KAN	NAL	STR	SUL	TET	TRI	SXT	NEO	APR	FLOR	AMO	CEFA	ENR	CEFT	CEFP
0719	2720/1	2007	mleto mešano meso	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0720	2720/2	2007	mleto mešano meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0721	2720/3	2007	mleto mešano meso	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0722	2720/4	2007	mleto mešano meso	S	S	I	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0723	2720/5	2007	mleto mešano meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0724	2778	2007	n. p.	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0725	3371/2	2007	meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0726	3374/3	2007	meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0727	3423/2-lap	2007	meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0728	3491/3	2007	meso	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0729	3545	2007	meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0730	3645/1	2007	meso	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0731	3646/1	2007	meso	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0732	3645/2	2007	meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0733	3479/5	2007	meso	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0734	3659/5	2007	meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0735	4019/5	2007	n. p.	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0736	4165/5	2007	mleto meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt

^a **Razlaga oznak:** n. p. – ni podatka; Zap. št. – zaporedne številke, ki smo jih uporabljali na Oddelku za biologijo; Prot. št. – protokolne številke, ki so jih uporabljali na IVZ; AMP – ampicilin; CEFO – cefotaksim; KLOR – kloramfenikol; CIP – ciprofloksacim; GEN – gentamicin; KAN – kanamicin; NAL – nalidiksinska kislina; STR – streptomycin; SUL – sulfonamidi; TET – tetraciklin; TRI – trimetoprim; SXT – kombinacija trimetoprima in sulfometoksazola; NEO – neomicin; APR – apramicin; FLOR – florfenikol; AMO – amokssicilin; CEFA – cefalotin; ENR – enrofloksacin; CEFT – ceftazidim; CEFP – cefpodoksin; n.p. – ni podatka; nt – sevi niso bili testirani; S – občutljiv; I – intermediarno odporen; R – odporen.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 5**: Zbirka sevov IVZ – OSM.^a

Zap. št.	Prot. št.	Leto izolacije	Vrsta vzorca	Občutljivost za protimikrobne snovi																				
				AMP	CEFO	KLOR	CIP	GEN	KAN	NAL	STR	SUL	TET	TRI	SXT	NEO	APR	FLOR	AMO	CEFA	ENR	CEFT	CEFP	
0737	4131	2007	goveje meso	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	I	
0738	4180	2007	goveje meso	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0739	4219/1	2007	mleto mešano meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0740	4220/1-a	2007	mleto mešano meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0741	4257/1	2007	mleto meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0742	4226	2007	sveža zelenjava	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0743	4475/1	2007	surovo mleto meso	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0744	4474/3	2007	mleto meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0745	8/1-4527lap	2007	pečenica	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0746	4498	2007	goveje meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0747	4501/1	2007	goveje meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0748	4501/2	2007	goveje meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0749	3371/3	2007	meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0750	3423/2 eo	2007	meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0751	3423/3-lap	2007	meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0752	3423/3-eo	2007	meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0753	3694-a	2007	solata z zelenjavo	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0754	3694-b	2007	solata z zelenjavo	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt

^a **Razlaga oznak:** n. p. – ni podatka; Zap. št. – zaporedne številke, ki smo jih uporabljali na Oddelku za biologijo; Prot. št. – protokolne številke, ki so jih uporabljali na IVZ; AMP – ampicilin; CEFO – cefotaksim; KLOR – kloramfenikol; CIP – ciprofloksacim; GEN – gentamicin; KAN – kanamicin; NAL – nalidiksinska kislina; STR – streptomycin; SUL – sulfonamidi; TET – tetraciklin; TRI – trimetoprim; SXT – kombinacija trimetoprima in sulfometoksazola; NEO – neomicin; APR – apramicin; FLOR – florfenikol; AMO – amokssicilin; CEFA – cefalotin; ENR – enrofloksacin; CEFT – ceftazidim; CEFP – cefpodoksin; n.p. – ni podatka; nt – sevi niso bili testirani; S – občutljiv; I – intermediarno odporen; R – odporen.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 5**: Zbirka sevov IVZ – OSM.^a

Zap. št.	Prot. št.	Leto izolacije	Vrsta vzorca	Občutljivost za protimikrobne snovi																			
				AMP	CEFO	KLOR	CIP	GEN	KAN	NAL	STR	SUL	TET	TRI	SXT	NEO	APR	FLOR	AMO	CEFA	ENR	CEFT	CEFP
0755	4219/3	2007	mleto mešano meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0756	4220/1-b	2007	mleto mešano meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0757	4475/2	2007	surovo mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0758	8/1 tbx	2007	pečenica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S
0759	8/2 lap	2007	pečenica	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0760	8/2 tbx	2007	pečenica	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0761	8/4 lap	2007	pečenica	R	S	S	S	S	S	I	I	S	R	S	S	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	I
0762	8/5 lap	2007	pečenica	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0763	3645/3	2007	meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0764	2012	2007	surovo goveje meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0765	2615	2007	tatarski biftek	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0766	3007/2	2007	goveje meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0767	3694-a	2007	solata z zelenjavo	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0768	3694	2007	solata z zelenjavo	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0801	172/1A	2008	mleto meso	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	nt
0802	172/1B	2008	mleto meso	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	nt
0803	181	2008	mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	nt
0804	229	2008	pripravljena solata	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt

^a **Razlaga oznak:** n. p. – ni podatka; Zap. št. – zaporedne številke, ki smo jih uporabljali na Oddelku za biologijo; Prot. št. – protokolne številke, ki so jih uporabljali na IVZ; AMP – ampicilin; CEFO – cefotaksim; KLOR – kloramfenikol; CIP – ciprofloksacim; GEN – gentamicin; KAN – kanamicin; NAL – nalidiksinska kislina; STR – streptomycin; SUL – sulfonamidi; TET – tetraciklin; TRI – trimetoprim; SXT – kombinacija trimetoprima in sulfometoksazola; NEO – neomicin; APR – apramicin; FLOR – florfenikol; AMO – amokssicilin; CEFA – cefalotin; ENR – enrofloxacin; CEFT – ceftazidim; CEFP – cefpodoksin; n.p. – ni podatka; nt – sevi niso bili testirani; S – občutljiv; I – intermediarno odporen; R – odporen.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 5**: Zbirka sevov IVZ – OSM.^a

Zap. št.	Prot. št.	Leto izolacije	Vrsta vzorca	Občutljivost za protimikrobne snovi																			
				AMP	CEFO	KLOR	CIP	GEN	KAN	NAL	STR	SUL	TET	TRI	SXT	NEO	APR	FLOR	AMO	CEFA	ENR	CEFT	CEFP
0805	239/2/1	2008	mleto meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0806	239/2/2	2008	mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt
0807	240/5	2008	pečenica	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt
0808	326/1	2008	surovo mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt
0809	326/3	2008	surovo mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	nt
0810	326/4	2008	surovo mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	nt
0811	326/5	2008	surovo mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	nt
0812	446/1	2008	pečenica	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	nt
0813	446/5	2008	pečenica	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0814	447/1	2008	mešano mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt
0815	450	2008	mešano mleto meso	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	nt
0816	470/3	2008	mešano mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt
0817	527/1	2008	mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt
0818	527/2	2008	mleto meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0819	527/2 I	2008	mleto meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0820	527/2 II	2008	mleto meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0821	602/2	2008	mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	nt
0822	728/4	2008	mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	I	I	S	S	nt

^a **Razlaga oznak:** n. p. – ni podatka; Zap. št. – zaporedne številke, ki smo jih uporabljali na Oddelku za biologijo; Prot. št. – protokolne številke, ki so jih uporabljali na IVZ; AMP – ampicilin, CEFO – cefotaksim; KLOR – kloramfenikol; CIP – ciprofloksacim; GEN – gentamicin; KAN – kanamicin; NAL – nalidiksinska kislina; STR – streptomycin; SUL – sulfonamidi; TET – tetraciklin; TRI – trimetoprim; SXT – kombinacija trimetoprima in sulfometoksazola; NEO – neomicin; APR – apramicin; FLOR – florfenikol; AMO – amokssicilin; CEFA – cefalotin; ENR – enrofloksacin; CEFT – ceftazidim; CEFP – cefpodoksin; n.p. – ni podatka; nt – sevi niso bili testirani; S – občutljiv; I – intermediarno odporen; R – odporen.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 5**: Zbirka sevov IVZ – OSM.^a

Zap. št.	Prot. št.	Leto izolacije	Vrsta vzorca	Občutljivost za protimikrobne snovi																				
				AMP	CEFO	KLOR	CIP	GEN	KAN	NAL	STR	SUL	TET	TRI	SXT	NEO	APR	FLOR	AMO	CEFA	ENR	CEFT	CEFP	
0823	753/4	2008	mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	nt
0824	863 Eo I	2008	namaz bakalar	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt
0825	863 Eo II	2008	namaz bakalar	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	nt
0826	768/4	2008	mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt
0827	996	2008	mleto meso	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	nt
0828	1011/1	2008	slaščičarski izdelki	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0829	1001	2008	slaščica	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	nt
0830	1011/4 Eo-12	2008	surova pečenica	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0831	1011/4 Eo-2	2008	surova pečenica	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0832	1011/4 Eo-11A	2008	surova pečenica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt
0833	1064	2008	gotova jed	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	nt
0834	1064/3	2008	surovo meso	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	R	R	S	S	S	R	I	S	S	nt
0835	1327/1 1.	2008	testo	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt
0836	1327/1 2.	2008	testo	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0837	1351/III	2008	solata	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	nt
0838	1354/3	2008	mleto meso	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	nt
0839	1524/1	2008	solata	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	nt
0840	1524/3	2008	solata	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt

^a **Razlaga oznak:** n. p. – ni podatka; Zap. št. – zaporedne številke, ki smo jih uporabljali na Oddelku za biologijo; Prot. št. – protokolne številke, ki so jih uporabljali na IVZ; AMP – ampicilin; CEFO – cefotaksim; KLOR – kloramfenikol; CIP – ciprofloksacim; GEN – gentamicin; KAN – kanamicin; NAL – nalidiksinska kislina; STR – streptomycin; SUL – sulfonamidi; TET – tetraciklin; TRI – trimetoprim; SXT – kombinacija trimetoprima in sulfometoksazola; NEO – neomicin; APR – apramicin; FLOR – florfenikol; AMO – amokssicilin; CEFA – cefalotin; ENR – enrofloksacin; CEFT – ceftazidim; CEFP – cefpodoksin; n.p. – ni podatka; nt – sevi niso bili testirani; S – občutljiv; I – intermediarno odporen; R – odporen.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 5**: Zbirka sevov IVZ – OSM.^a

Zap. št.	Prot. št.	Leto izolacije	Vrsta vzorca	Občutljivost za protimikrobne snovi																				
				AMP	CEFO	KLOR	CIP	GEN	KAN	NAL	STR	SUL	TET	TRI	SXT	NEO	APR	FLOR	AMO	CEFA	ENR	CEFT	CEFP	
0841	1524/5	2008	solata	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
0842	1580	2008	solata	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	nt
0843	1688/4	2008	testenine z mesom	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	nt
0844	1796/1	2008	mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	nt
0845	1796/2	2008	mleto meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0846	1796/3	2008	mleto meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0847	1796/4	2008	mleto meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0848	1796/5	2008	mleto meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0849	1795/1	2008	mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	nt
0850	1795/4	2008	mleto meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0851	1795/5	2008	mleto meso	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0852	1918	2008	delikatesno živilo	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt
0853	1914	2008	suhi čaj	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	nt
0854	1919	2008	majonezni preliv	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nt
0855	2558	2008	mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	nt
0856	2754	2008	mleto meso	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	nt

^a Razlaga oznak: n. p. – ni podatka; Zap. št. – zaporedne številke, ki smo jih uporabljali na Oddelku za biologijo; Prot. št. – protokolne številke, ki so jih uporabljali na IVZ; AMP – ampicilin, CEFO – cefotaksim; KLOR – kloramfenikol; CIP – ciprofloksacin; GEN – gentamicin; KAN – kanamicin; NAL – nalidiksinska kislina; STR – streptomycin; SUL – sulfonamidi; TET – tetraciklin; TRI – trimetoprim; SXT – kombinacija trimetoprima in sulfometoksazola; NEO – neomicin; APR – apramicin; FLOR – florfenikol; AMO – amoksisicilin; CEFA – cefalotin; ENR – enrofloksacin; CEFT – ceftazidim; CEFP – cefpodoksin; n.p. – ni podatka; nt – sevi niso bili testirani; S – občutljiv; I – intermediarno odporen; R – odporen.

3.1.2 Gojišča

3.1.2.1 Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)

Za pripravo tekočih gojišč LB smo v deionizirani vodi raztopili 25 g/l gojišča LB (0,5-odstotni kvasni ekstrakt, 1 % tripton, 1 % NaCl). V 150 ml erlenmajerice smo odpipetirali po 10 ml raztopljenega gojišča in ga sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C in pod pritiskom 2 bara.

3.1.2.2 Priprava trdnih gojišč LB

Za pripravo trdnih gojišč LB smo v deionizirani vodi raztopili 25 g/l gojišča LB in 15 g/l agarja ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C in pritiskom 2 bara. Ko se je gojišče v vodni kopeli ohladilo na približno 55 °C, smo ga vlili v sterilne plastične petrijevke.

3.1.3 Kemikalije

BIOLIFE ITALIANA:

- agar (agar technical).

FERMENTAS:

- PCR Master Mix #K0171 (0,05 enot/ μ l Taq DNA-polimeraze v reakcijskem pufu: 4mM MgCl₂, 0,4 mM vsakega od dNTPjev (dATP, dCTP, dGTP, dTTP));
- Dream Taq Green PCR Master Mix #K1081 (0,05 enot/ μ l Taq DNA-polimeraze v reakcijskem pufu: 2 \times Dream Taq Green buffer, 4mM MgCl₂, 0,4 mM vsakega od dNTPjev (dATP, dCTP, dGTP, dTTP));
- standardna DNA lestvica 1 kb DNA Ladder #SM0311/2/3;
- DNA lestvica 1 kb Plus DNA Ladder #SM1331/2/3;
- standardna DNA lestvica 50 bp DNA Ladder #SM0371;
- destilirana voda brez nukleaz;
- nanašalni elektroforezni puffer 6 \times ;
- komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela – GeneJET™ Gel Extraction Kit.

KEMIKA:

- EDTA.

MERCK:

- izopropanol;
- 96 % etanol;
- 80 % etanol;
- kloroform;
- natrijev klorid;
- K₂HPO₄;
- MgSO₄ \times 7H₂O;
- CTAB.

RIEDEL DE HAËN:

- borova kislina.

ROTH:

- baza Tris.

SEAKEM:

- agaroz.

SIGMA

- etidijev bromid;
- LB (Luria-Broth medium).

3.1.4 Pufri in reagenti

3.1.4.1 Ločevanje nukleinskih kislin z elektroforezo na agaroznem gelu

Za pripravo agaroznih gelov in elektroforezo smo uporabili:

- pufer $5 \times$ TBE (0,45 mM Tris-borat; 10mM EDTA), ki smo ga hranili pri sobni temperaturi;
- agarozo za pripravo gela;
- nanašalni elektroforezni pufer (0,25-odstotni bromofenol modro, 0,25-odstotni ksilencianol, 40-odstotna saharoza).

3.1.5 Kompleti in testi

3.1.5.1 Komplet za izolacijo genomske DNA

Komplet za izolacijo genomske DNA, Genomic DNA Purification Kit #K0512 (Fermentas), vsebuje:

- pufer TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA),
- raztopino "lysis solution": v kompletu, pripravljena za uporabo,
- raztopino "precipitation solution": v kompletu, 10 × koncentrirana, pred uporabo smo jo morali razredčiti,
- raztopino "NaCl solution": v kompletu, 1,2 M raztopina NaCl.

3.1.5.2 Komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela

Komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela, GeneJET™ Gel Extraction Kit #K0692 (Fermentas), vsebuje:

- raztopino "Binding Buffer",
- raztopino "Wash Buffer",
- raztopino "Elution Buffer".

3.1.5.3 Dodatne raztopine, ki jih ni v kompletu za izolacijo genomske DNA

- kloroform,
- pufer TE z RNAzo (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 50 µg/ml RNaza).

3.1.6 Pribor in oprema

Pri delu smo uporabili naslednjo opremo:

- ciklični termostat GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer),
- ciklični termostat UNO II (Biometra),
- namizno centrifugo (Eppendorf Centrifuge 5417C),
- sistem za elektroforezo DNA 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma),
- avtomatske pipete (Eppendorf),
- nastavki z različnim volumnom za avtomatske pipete,
- vibracijski mešalnik (SBD),
- laboratorijske rokavice,
- laboratorijska steklovina: čaše, merilni valji, elrenmajerice ...,
- cepilne zanke za enkratno uporabo (1 µl, 10 µl),
- mikrocentrifugirke (Eppendorf, Hamburg, Nemčija),
- mirocentrifugirke za verižno reakcijo s polimerazo (PCR) – 200 µl (MicroAmp, Perkin Elmer),
- plastične petrijevke,
- magnetno mešalo (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- tehtnica (KERN_{PFB}),
- avtoklav (Kambič, Slovenija),
- plinski gorilnik (Tlos, Zagreb, Hrvaška).

3.2 METODE

3.2.1 Fenotipske metode

3.2.1.1 Izolacija in identifikacija sevov na Oddelku za sanitarno mikrobiologijo na IVZ

Identifikacija sevov iz živil je bila narejena na osnovi testov IMVC in ISO-standarda 16649-2:2001 ter modifikiranih ISO-standardov 7251:1993 in 16654:2001. Tako identificirani sevi so v preglednici 5.

3.2.1.1 Identifikacija sevov na Oddelku za medicinsko mikrobiologijo na IVZ

V laboratoriju na Oddelku za medicinsko mikrobiologijo (OMM) na IVZ so ponovno preverili fenotipske lastnosti vseh sevov s testi IMVC, poleg tega pa so ugotavljali še aktivnost encima ureaze in razgradnjo glukoze, manitola in sorbitola.

3.2.1.2 Ugotavljanje odpornosti proti protimikrobnim snovem –antibiogram

Za vse seve so na IVZ – OMM izdelali antibiogram s pomočjo standardnih diskov prepojenih s protimikrobnimi snovmi, rezultati so odčitani po standardih CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

3.2.2 Genotipske metode

3.2.2.1 Priprava vzorčne DNA za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

3.2.2.1.1 Priprava bakterijskih lizatov

Eno cepilno zanko bakterijske kulture smo prenesli iz trdnega gojišča v mikrocentrifugirko in dodali 200 µl sterilne destilirane vode. Bakterije smo resuspendirali s kratkim mešanjem na vibracijskem mešalniku. Nato smo resuspendirane celice segrevali 10 minut v vreli vodi in jih nato centrifugirali 10 minut pri 14.000 obr./min v namizni centrifugi pri sobni temperaturi. Supernatant, v kateri je celokupna celična DNA, smo uporabili kot matrično DNA za verižno reakcijo s polimerazo (PCR).

3.2.2.1.2 Izolacija genomske DNA

S cepilno zanko smo postrgali od 10 mg do 20 mg bakterijske kulture s trdnega gojišča LB in jo s kratkim mešanjem na vibracijskem mešalniku oz. premešanjem z avtomatsko pipeto suspendirali v 200 µl pufra TE. Vzorcju smo dodali 400 µl raztopine "lysis solution", premešali in inkubirali 5 minut pri 65 °C. Takoj po koncu inkubacije smo vzorcju dodali 600 µl kloroforma, nežno premešali z obračanjem mikrocentrifugirke (od 3- do 5-krat) in centrifugirali 2 minuti pri 10.000 obr./min. Zgornjo vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 800 µl sveže pripravljene precipitacijske raztopine (720 µl sterilne deionizirane vode, 80 µl 10 × "precipitation solution") in previdno mešali z obračanjem mikrocentrifugirke 1 do 2 minuti pri sobni temperaturi. Vzorce smo nato centrifugirali 2 minuti pri 10.000 obr./min, odstranili supernatant in z nežnim vorteksiranjem usedlino DNA popolnoma raztopili v 100 µl 1,2 M raztopine NaCl. Dodali smo 300 µl 96 % hladnega etanola in inkubirali 1 uro pri -20 °C. Večinoma smo vzorce v zamrzovalniku pustili dlje časa, tudi preko noči, saj smo ugotovili, da je bil pri teh vzorcih izkoristek izolacije DNA boljši. Po končani inkubaciji smo vzorce centrifugirali 4 minute pri 10.000 obr./min. Nato smo odlili etanol, usedlino sprali s 500 µl 80 % hladnega etanola in vzorce še enkrat centrifugirali 30 sekund pri 10.000 obr./min. Spet smo odlili etanol in vzorce posušili pri 37 °C. DNA smo nato raztopili v 30–50 µl pufra TE z RNAzo. Vzorce smo do ponovne uporabe shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

Uspešnost izolacije genomske DNA smo preverjali tako, da smo 3 µl izolata pomešali z 0,5 µl nanašalnega pufra in vzorec nanegli v jamico 0,9 % agaroznega gela. DNA smo z agarozno gelsko elektroforezo ločevali približno 30 minut pri napetosti 12 V/cm gela, v pufri 1 × TBE. Glede na jakost fluorescence ob presvetlitvi gelov z UV-svetlobo valovne dolžine 302 nm in primerjavo fluorescence vzorcev s fluorescenco standardov z znano koncentracijo DNA smo okvirno ugotovili količino DNA v vzorcih. Na podlagi tega smo določili, kolikšen del vzorca smo kasneje uporabili v reakcijskih mešanicah za PCR.

3.2.2.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

3.2.2.2.1 Začetni oligonukleotidi za reakcijo PCR

V preglednici 6 so prikazani začetni oligonukleotidi, ki smo jih izbrali za pomnoževanje delov genov za 16S rRNA, za ugotavljanje filogenetskih skupin po Clermontu, za ugotavljanje plazmidno-kodiranih determinant odpornosti proti kinolonom in za virulentne dejavnike, ki smo jih uporabili pri pomnoževanju s PCR.

Preglednica 6: Uporabljeni začetni oligonukleotidi.

Kategorija	Oznaka	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Produkt (bp)	Referenca
filogenetske skupine	ChuA1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	Clermont in sod., 2000
	ChuA2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
	YjaA1	TGAAGTGTCCAGGAGACGCTG	211	
	YjaA2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
	TspE4.C2-1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	
TspE4.C2-2	CGCGCCAACAAAGTATTACG			
16S rRNA	Fd1	AGAGTTTGATCCTGGCTCA	1399	Hicks in sod., 1992
	1392	ACGGGCGGTGTGTRC ^a		Olsen in sod., 1986
plazmidno-kodirane determinante odpornosti proti kinolonom (PMQR)	QnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580	Cattoir in sod., 2007
	QnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
	QnrBm-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG ^a	264	
	QnrBm-R	TTTGCYGYCYGCCAGTCGAA ^a		
	QnrCm-F	GGGTTGTACATTTATTGAATCG	308	Wang in sod., 2009
	QnrCm-R	CACCTACCCATTTATTTTCA		
	QnrDm-F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	582	Cavaco in sod., 2009
	QnrDm-R	AACAAGCTGAAGCGCCTG		
	QnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	Cattoir in sod., 2007
QnrSm-R	TCTAAACCGTCCGAGTTCGGCG			
Adhezini				
fimbrije tipa 1 (<i>fimH</i>)	FimH1	AACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG	465	Ambrožič Avguštin, neob.
	FimH2	ATTGCGTACCAGCATTAGCAATGTCC		
S- fimbrije (<i>sfaDE</i>)	Sfa1	CTCCGGAGAAGTGGTGCATCTTAC	410	Le Bouguenec in sod., 1992
	Sfa2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA		
curljeva vlakna (<i>crl</i>)	Crls	TTTCGATTGTCTGGCTGTATG	250	Ambrožič Avguštin, neob.
	Crla	CTTCAGATTCAGCGTCGTC		
intimin (<i>eae</i>)	EaeF	GGYACGCTTTTTTCCTTCCTG ^a	376	b
	EaeR	TCGTACCARAGGAATCGGAG ^a		
ne fimbrijski adhezin Iha (<i>iha</i>)	Iha-F	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	827	Johnson in sod., 2000
	Iha-R	TCCTTAAGCTCCC CGGCTGA		
ne fimbrijski adhezin Hra (<i>hra</i>)	Hra-F	TACGGTATTCAGTGGCGGTATC	474	Ambrožič Avguštin, neob.
	Hra-R	TCGTCCTTGTAACCTCACACTGC		
Toksini				
enterohemolizin	Hlyen1	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG	1551	Ambrožič Avguštin, neob.
	Hlyen2	TCTCGCTGATAGTGTGGTA		
α - hemolizin (<i>hlyA</i>)	HlyA1	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177	Yamamoto inn sod., 1995
	HlyA2	ACCATATAAGCGGTCATCCCCTCA		
citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (<i>cnf</i>)	Cnf1-1	TCGTTATAAAATCAAACAGTG	445	Ambrožič Avguštin, neob.
	Cnf1-2	CTTTACAATATTGACATGCTG		
avtotransporterski toksin Sat (<i>sat</i>)	Sat1	ACTGGCGGACTCATGCTGT	387	Ruiz in sod., 2002
	Sat2	AACCCTGTAAAGAAGACTGAGC		
avtotransporterski toksin Vat (<i>vat</i>)	Vat1	GAACACAGTTCATCTGATCTCC	418	Parham in sod., 2005
	Vat2	GAATATATCAAATTGGTCCCCC		
omptin T (<i>ompT</i>)	OmpT1	CAGAGTATCTGTCCGGTGCCCTCA	581	Ambrožič Avguštin, neob.
	OmpT2	TACGGTTCATGTTTCCTTCGAC		
verotoksin 1 (<i>vtx1</i>)	Vtx1F	GTTTGCAGTTGATGTCAGAGGGA	259	b
	Vtx1R	CAACGAAATGGCAGTTTATCTGC		
verotoksin 2 (<i>vtx2</i>)	Vtx2F	GCCTGTCGCCAGTTATCTGACA	421	b
	Vtx2R	GGAATGCAAATCAGTCGTCCTC		

^a M = A ali C, H = A ali C ali T, Y = C ali T, R = A ali G

^b Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov je povzeto iz kompleta "DEC Primer Mix" (Statens Serum Institut (SSI), Denmark).

3.2.2.2.2 Sestava reakcijskih mešanic za PCR

Pri reakcijah PCR smo uporabili "PCR Master Mix" ali "Dream Taq Green PCR Master Mix". Kot matrično DNA smo v reakcijah uporabili bakterijski lizat ali pa izolirano genomsko DNA.

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje delov genov *chuA*, *yjaA* in fragmenta TspE4.C2 (multipleksni PCR) smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirke z volumnom 200 µl odpipetirali 2 µl matrične DNA, po 1 µl začetnih oligonukleotidov ChuA1, ChuA2, YjaA1, YjaA2, TspE4.C2-1, TspE4.C2-2, 25 µl PCR Master mix-a (Fermentas) in 17 µl destilirane vode.

Za vse seve, kjer po analizi nismo zasledili pomnožkov PCR, ali so bili ti zelo slabo vidni, smo pomnožili vsak gen posebej.

Reakcijske mešanice za pomnoževanje delov genov *fimH*, *sfa*, *iha*, *hra*, *hlyA*, *sat*, *vat*, *hlyen*, *crl*, *vtx1*, *vtx2*, *eae*, *ompT* in *cnf* smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirke z volumnom 200 µl odpipetirali 12,5 µl PCR Master mix-a (Fermentas), 1 µl izbranega začetnega oligonukleotida F (10 pmol/µl), 1 µl izbranega začetnega oligonukleotida R (10 pmol/µl), 1 µl matrične DNA in 9,5 µl destilirane vode.

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje delov genov *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, in *qnrS* (multipleksni PCR) smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirke z volumnom 200 µl odpipetirali 2 µl matrične DNA, po 1 µl začetnih oligonukleotidov QnrAm-F, QnrAm-R, QnrBm-F, QnrBm-R, QnrCm-F, QnrCm-R, QnrDm-F, QnrDm-R, QnrSm-F in QnrSm-R, 25 µl PCR Master mix-a (Fermentas) in 13 µl destilirane vode.

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje gena za 16S rRNA smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirke z volumnom 200 µl odpipetirali 25 µl PCR Master mix-a (Fermentas), po 2 µl posameznega začetnega oligonukleotida z oznako Fd1 in 1392, 2 µl matrične DNA in 19 µl destilirane vode.

3.2.2.2.3 Pogoji pomnoževanja s PCR

- Pogoji za pomnoževanje delov genov *chuA*, *yjaA* in fragmenta TspE4.C2 (multipleksni PCR):

začetna denaturacija	94 °C	5 minut	1 ×
denaturacija	94 °C	30 sekund	30 ×
prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 sekund	
pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1 ×

- Pogoji za pomnoževanje delov genov *fimH*, *sat*, *vat*, in *cnf*:

začetna denaturacija	95 °C	5 minute	1 ×
denaturacija	94 °C	30 sekund	30 ×
prileganje začetnih oligonukleotidov	64 °C	30 sekund	
pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1 ×

- Pogoji za pomnoževanje delov genov *iha*, *hlyen* in *hlyA*:

začetna denaturacija	95 °C	5 minut	1 ×
denaturacija	94 °C	30 sekund	30 ×
prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 sekund	
pomnoževanje	72 °C	90 sekund	
končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1 ×

- Pogoji za pomnoževanje delov genov *ompT*, *hra* in *sfa*:

začetna denaturacija	95 °C	5 minut	1 ×
denaturacija	94 °C	30 sekund	30 ×
prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 sekund	
pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1 ×

- Pogoji za pomnoževanje delov genov *crl*, *vtx1*, *vtx2* in *eae*:

začetna denaturacija	95 °C	5 minut	1 ×
denaturacija	94 °C	30 sekund	30 ×
prileganje začetnih oligonukleotidov	50 °C	30 sekund	
pomnoževanje	72 °C	40 sekund	
končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1 ×

- Pogoji za pomnoževanje delov genov *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, in *qnrS* (multipleksni PCR):

začetna denaturacija	95 °C	4 minute	1 ×
denaturacija	94 °C	30 sekund	30 ×
prileganje začetnih oligonukleotidov	54 °C	30 sekund	
pomnoževanje	72 °C	45 sekund	
končno pomnoževanje	72 °C	7 minut	1 ×

- Pogoji za pomnoževanje delov genov za 16S rRNA:

začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1 ×
denaturacija	94 °C	30 sekund	30 ×
prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 sekund	
pomnoževanje	72 °C	90 sekund	
končno pomnoževanje	72 °C	10 minut	1 ×

3.2.2.3 Agarozna gelska elektroforeza

Z elektroforezo na agaroznih gelih smo preverjali prisotnost in velikost nastalih pomnožkov PCR oz. fragmentov DNA. Glede na pričakovano velikost analiziranih fragmentov DNA smo pripravili gele z gostoto 0,9–2,5 % agaroze. Gel smo pripravili tako, da smo ustrezni količini agaroze dodali puffer 1 × TBE ter segrevali, dokler se agaroz ni popolnoma raztopila. Na približno 50 do 60 °C ohlajenem gelu smo dodali etidijev bromid do končne koncentracije v gelu 0,5 µg/ml. Gel smo nato vlili v nosilce z vstavljenimi glavnički za jamice in počakali, da se strdi.

Kot označevalec velikosti smo v jamice dodali 1-kilobazno ali 50-bp lestvico (Fermentas). V jamice smo vnesli po 5 µl pomnožkov PCR skupaj z nanašalnim elektroforeznim pufrom v razmerju 5 : 1.

Po elektroforezi 1 kb lestvice (1 kb DNA Ladders #SM0311/2/3, Fermentas) zasledimo fragmente sledeče velikosti (v baznih parih): 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250. Po elektroforezi 1 kb lestvice (1 kb Plus DNA Ladders #SM1331/2/3, Fermentas) zasledimo fragmente sledeče velikosti: 20000, 10000, 7000, **5000**, 4000, 3000, 2000, **1500**, 1000, 700, **500**, 400, 300, 200 in 75 bp. Po elektroforezi 50 bp lestvice (50 bp DNA Ladders #SM0371, Fermentas) pa so fragmenti veliki 1000, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, **250**, 200, 150, 100 in 50 bp.

S primerjavo hitrosti potovanja fragmentov ene izmed standardnih lestvic in pomnožkov PCR smo ugotovili njihovo velikost.

3.2.2.4 Ugotavljanje filogenetskih skupin in podskupin sevov *E. coli*

Seve *E. coli* smo uvrstili v filogenetske skupine in podskupine na osnovi prisotnosti dveh genov *chuA*, *yjaA* in DNA fragmenta TspE4.C2, kot je prikazano v preglednici 2.

3.2.2.4 Pomnoževanje dela gena za 16S rRNA

Pri izbranih sevih smo pomnožili del gena za 16S rRNA po postopku opisanem v poglavju 3.2.2.2.

3.2.2.5 Čiščenje fragmenta dobljenega v reakciji PCR in ugotavljanje nukleotidnega zaporedja dela gena za 16S rRNA

Po pomnoževanju smo pomnožke PCR (50 µl) vnesli v jamice na agaroznem gelu ter po elektroforezi iz gela izrezali del, kjer smo zasledili fragment DNA ustrezne velikosti. Nato smo s pomočjo kompleta GeneJET™ Gel Extraction Kit po navodilih proizvajalca očistili iskane fragmente. Očiščene fragmente smo poslali na sekvenciranje v MacroGen inc. (Seoul, Korea).

3.2.2.6 Genotipska identifikacija na podlagi nukleotidnega zaporedja dela gena za 16S rRNA (analiza 16S rRNA)

Po obdelavi nukleotidnih zaporedij dela gena za 16S rRNA s pomočjo programov BLASTn (na spletni strani: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ter Sequence Match in Classifier na spletni strani RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) smo seve iz podskupine A₀ in seve, ki po naknadni identifikaciji na IVZ – OMM niso povsem zanesljivo *E. coli*, primerjali z nukleotidnimi zaporedji iz baze podatkov in jih tako tudi identificirali.

3.2.2.7 Ugotavljanje prisotnosti virulentnih dejavnikov

Z metodo PCR smo preverili prisotnost nekaterih virulentnih dejavnikov iz dveh kategorij: adhezini in toksini. –Reakcije PCR so opisane v poglavju 3.2.2.2.

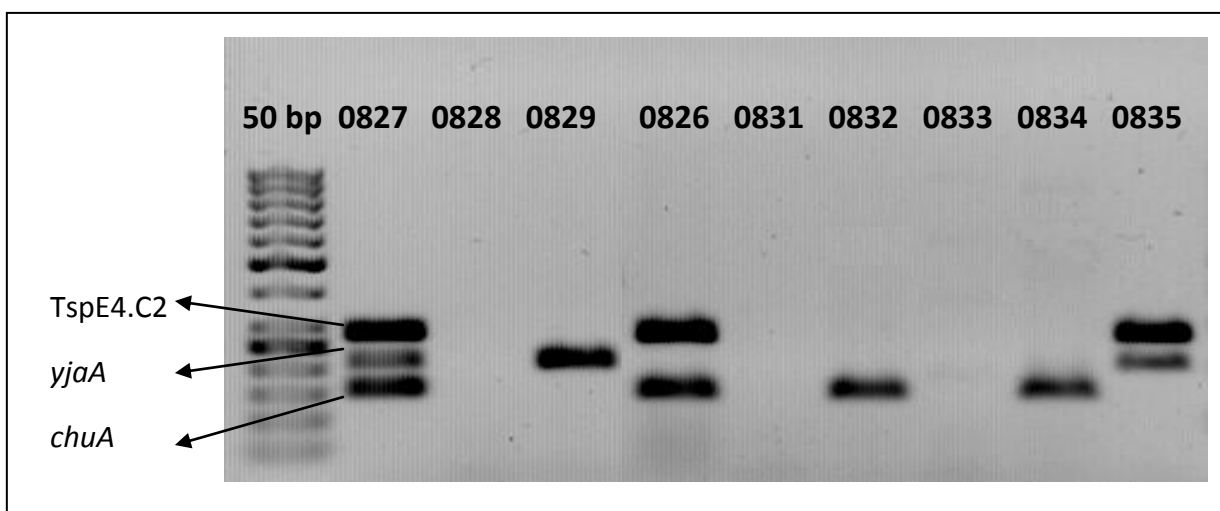
3.2.2.8 Ugotavljanje prisotnosti plazmidno-kodiranih determinant odpornosti proti kinolonom

Pri vseh preučevanih sevih smo z metodo PCR preverili prisotnost plazmidno-kodiranih determinant odpornosti proti kinolonom (PMQR) iz skupine *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* in *qnrS*). Reakcije PCR so opisane v poglavju 3.2.2.2.

4 REZULTATI

4.1 FILOGENETSKE SKUPINE

Seve smo na podlagi prisotnosti ali odsotnosti delov genov *chuA* in *yjaA* ter fragmenta TspE4.C2 (preglednica 2) uvrstili v filogenetske skupine in podskupine (preglednica 7). Na sliki 2 je prikazan primer agaroznega gela po ločitvi pomnožka PCR.



Slika 2: Primer elektroforeze pomnožkov PCR treh filogenetskih označevalcev. Sev 0827 smo uvrstili v filogenetsko podskupino B₂₃, seve 0828, 0831 in 0833 v podskupino A₀, sev 0829 v podskupino A₁, sev 0826 v podskupino D₂, seva 0832 in 0834 v skupino B₁ in sev 0835 v podskupino B₂₂. Oznaka 50 bp: 50 bp lestvica (Fermentas).

Preglednica 7: Uvrstitev sevov iz IVZ – OSM v filogenetske skupine in podskupine.^a

Zaporedna št.	Filogenetska (pod)skupina	Zaporedna št.	Filogenetska (pod)skupina
0701	A ₀	0745	A ₀
0702	A ₀	0746	A ₀
0703	B ₁	0747	A ₀
0704	B ₁	0748	A ₀
0705	A ₀	0749	A ₀
0706	A ₀	0750	A ₀
0707	A ₀	0751	A ₀
0708	A ₀	0752	A ₀
0709	A ₀	0753	A ₁
0710	A ₁	0754	A ₀
0711	A ₁	0755	A ₀
0712	A ₁	0756	A ₀
0713	A ₁	0757	B ₁
0714	A ₀	0758	B ₁
0715	A ₀	0759	A ₀
0716	A ₀	0760	A ₀
0717	A ₁	0761	A ₁
0718	B ₁	0762	A ₀
0719	A ₁	0763	A ₁
0720	A ₁	0764	B ₁
0721	B ₁	0765	B ₁
0722	A ₁	0766	B ₁
0723	A ₁	0767	A ₁
0724	A ₁	0768	A ₀
0725	A ₀	0801	A ₁
0726	A ₀	0802	D ₂
0727	A ₀	0803	B ₁
0728	B ₁	0804	A ₁
0729	A ₀	0805	A ₀
0730	B ₁	0806	B ₁
0731	B ₁	0807	A ₀
0732	A ₀	0808	B ₁
0733	B ₁	0809	B ₁
0734	A ₀	0810	A ₀
0735	D ₁	0811	B ₁
0736	A ₀	0812	B ₁
0737	B ₁	0813	B ₁
0738	A ₁	0814	A ₀
0739	A ₀	0815	B ₁
0740	A ₀	0816	A ₀
0741	A ₀	0817	A ₀
0742	A ₀	0818	A ₀
0743	B ₁	0819	A ₀
0744	A ₀	0820	A ₀

^a Navedena sta podatka o zaporedni številki seva in filogenetski skupini, ugotovljeni na podlagi prisotnosti ali odsotnosti delov genov *chuA* in *yjaA* ter fragmenta TspE4.C2.

Nadaljevanje **preglednice 7**: Uvrstitev sevov iz IVZ – OSM v filogenetske skupine in podskupine.^a

Zaporedna št.	Filogenetska (pod)skupina	Zaporedna št.	Filogenetska (pod)skupina
0821	D ₁	0839	A ₁
0822	D ₂	0840	A ₁
0823	B ₁	0841	A ₁
0824	A ₀	0842	D ₁
0825	A ₀	0843	D ₁
0826	D ₂	0844	A ₁
0827	B ₂₃	0845	A ₀
0828	A ₀	0846	A ₀
0829	A ₁	0847	A ₀
0830	A ₀	0848	A ₀
0831	A ₀	0849	D ₁
0832	B ₁	0850	A ₀
0833	A ₀	0851	A ₀
0834	B ₁	0852	A ₀
0835	B ₂₂	0853	B ₁
0836	B ₁	0854	A ₀
0837	D ₁	0855	D ₂
0838	B ₁	0856	B ₁

^a Navedena sta podatka o zaporedni številki seva in filogenetski skupini, ugotovljeni na podlagi prisotnosti ali odsotnosti delov genov *chuA* in *yjaA* ter fragmenta TspE4.C2.

V celotni zbirki 124-ih sevov iz let 2007 in 2008 je bilo 82 sevov (66 %) iz filogenetske skupine A, od tega 60 sevov (48 %) iz podskupine A₀ in 22 sevov (18 %) iz podskupine A₁; 30 sevov (24 %) iz filogenetske skupine B₁; 2 seva (2 %) iz filogenetske skupine B₂, od tega en sev (1 %) iz podskupine B₂₂ in 1 sev (1 %) iz podskupine B₂₃; 10 (8 %) sevov iz filogenetske skupine D, od tega 6 sevov (5 %) iz podskupine D₁ in 4 sevi (3 %) iz podskupine D₂ (preglednica 8).

Preglednica 8: Število (odstotek) sevov *E. coli* iz zbirk 2007 in 2008, ki smo jih uvrstili v posamezne filogenetske skupine.

Filogenetska (pod)skupina		Število (odstotek) sevov enega leta				Število (odstotek) vseh sevov	
		Zbirka 2007		Zbirka 2008		Skupaj	
A	A ₀	52 (77)	37 (54)	30 (54)	23 (41)	82 (66)	60 (48)
	A ₁		15 (22)		7 (13)		22 (18)
B ₁		15 (22)	15 (22)	15 (27)	15 (27)	30 (24)	30 (24)
B ₂	B ₂₂	0	0	2 (4)	1 (2)	2 (2)	1 (1)
	B ₂₃		0		1 (2)		1 (1)
D	D ₁	1 (2)	1 (2)	9 (16)	5 (9)	10 (8)	6 (5)
	D ₂		0		4 (7)		4 (3)

4.2 PREVERJANJE IDENTIFIKACIJE SEVOV, KI SO BILI UVRŠČENI V FILOGENETSKO PODSKUPINO A₀ PO CLERMONTU

Pri vseh sevih iz zbirke IVZ – OSM so na IVZ – OMM ponovno na osnovi biokemijskih testov identificirali seve in na podlagi rezultatov potrdili prvotno identifikacijo vrste *E. coli*. Izjema so bili sevi 0708, 0715 in 0716 (vsi uvrščeni v filogenetsko podskupino A₀), za katere so ugotovili, da pripadajo rodovom *Yersinia* (0708), *Buttiauxella* (0715) in *Aeromonas* (0716) (preglednica 9).

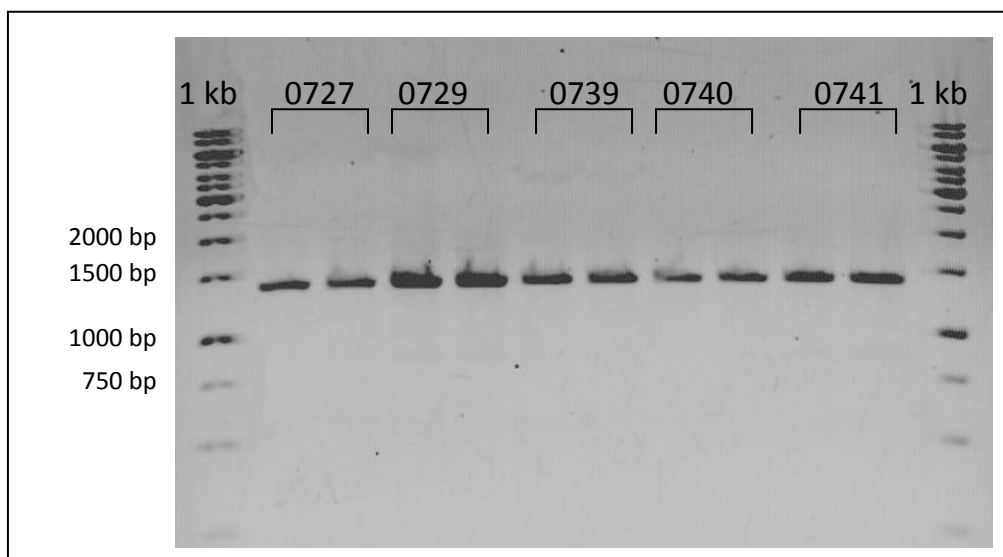
Preglednica 9: Sevi, ki po dodatni fenotipski identifikaciji niso bili opredeljeni kot *E. coli*.

Zaporedna številka	Filo. sk.	Indol/urea	Genotipska identifikacija (odstotek verjetnosti) ^a		
			Classifier	Sequence Match	BLASTn
0708	A ₀		<i>Yersinia</i> (100)	<i>Y. aldovae</i> <i>Y. bercovieri</i> <i>Y. intermedia</i> <i>Y. sp.</i> <i>Y. kristensenii</i>	<i>Y. intermedia</i> (99) <i>Y. kristensenii</i> (99) <i>Yersinia mollaretii</i> (99) <i>Y. aldovae</i> (99) <i>Y. bercovieri</i> (99)
0715	A ₀		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. brennerae</i> <i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>Buttiauxella sp.</i> <i>Pantoea sp.</i>	<i>Pantoea sp.</i> (99) <i>B. agrestis</i> (99) <i>B. brennerae</i> (98) <i>B. ferragutiae</i> (98) <i>B. noackiae</i> (98) <i>Enterobacter sp.</i> (98) <i>B. gaviniae</i> (98) <i>K. intermedia</i> (98)
0716	A ₀		<i>Aeromonas</i> (100)	<i>A. veronii</i> <i>Aeromonas sp.</i> <i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i> (99) <i>A. veronii</i> (99) <i>A. hydrophila</i> (99) <i>Aeromonas sp.</i> (99)

Navedeni so podatki o zaporedni številki seva, uvrščenosti v filogenetsko podskupino, in genotipski identifikaciji na podlagi nukleotidnega zaporedja dela gena 16S rRNA.

^a**Okrajšave rodov:** rod *Aeromonas*: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii*; rod *Buttiauxella*: *B. ferragutiae*, *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. gaviniae*, *B. noackiae*; rod *Kluyvera*: *K. intermedia*; rod *Yersinia*: *Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii*.

Pri vseh sevih *E. coli* iz podskupine A₀ smo pomnožili del gena za 16S rRNA z začetnima oligonukleotidoma Fd1 in 1392 (zaporedja dela gena za 16S rRNA teh sevov so v prilogi A). Dobljeno nukleotidno zaporedje vseh pomnožkov PCR smo analizirali s programom BLASTn na spletni strani: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> in s programoma Sequence Match in Classifier na spletni strani RDP: <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp> in jih uvrstili v rodove. Slika 3 prikazuje ločevanje delov genov za 16S rRNA z gelsko elektroforezo.



Slika 3: Primer elektroforeze pomnožkov PCR dela gena za 16S rRNA. Oznaka 1 kb prikazuje lestvico (1 kb DNA Ladders #SM0311/2/3, Fermentas).

Nadalje smo ugotovili, da se je od 57-ih sevov, ki so bili po dodatni fenotipski identifikaciji opredeljeni kot *E. coli* in uvrščeni v filogenetsko podskupino A₀, 26 sevov uvrstilo v rod *Buttiauxella*, 4 sevi v rod *Leclercia*, enega seva nismo mogli opredeliti (program Classifier ga s 46 % verjetnostjo uvršča v rod *Enterobacter*), ostali sevi, teh je 26, pa so bili uvrščeni v skupino *Escherichia/Shigella*. V preglednici 10 so prikazani vsi rezultati identifikacije teh 57-ih sevov.

Preglednica 10: Genotipska identifikacija sevov iz zbirke IVZ – OSM uvrščenih v filogenetsko podskupino A₀.

zaporedna številka	indol/urea	genotipska identifikacija (odstotek verjetnosti) ^a		
		Classifier	Sequence Match	BLASTn
0701	urea +/-	<i>Enterobacteriaceae</i> (100)	<i>L. adecarboxylata</i> <i>Pantoea sp.</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>L. adecarboxylata</i> (99) <i>Pantoea sp.</i> (99) <i>Enterobacter sp.</i> (99) <i>E. cloacae</i> (99) <i>Enterobacter ludwigii</i> (99) <i>Pantoea agglomerans</i> (99)
0702	urea -	<i>Enterobacteriaceae</i> (100)	<i>L. adecarboxylata</i> <i>Pantoea sp.</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>E. cloacae</i>	<i>L. adecarboxylata</i> (99) <i>Pantoea sp.</i> (99) <i>Enterobacter sp.</i> (99) <i>E. cloacae</i> (99) <i>E. ludwigii</i> (99) <i>P. agglomerans</i> (99)
0705	urea +/-	<i>Enterobacteriaceae</i> (100)	<i>L. adecarboxylata</i> <i>Pantoea sp.</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>E. cloacae</i>	<i>L. adecarboxylata</i> (99) <i>Pantoea sp.</i> (99) <i>Enterobacter sp.</i> (99) <i>E. cloacae</i> (99) <i>E. ludwigii</i> (99) <i>P. agglomerans</i> (99)
0706		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. brennerae</i> <i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>Buttiauxella sp.</i>	<i>B. agrestis</i> (97) <i>Pantoea sp.</i> (97) <i>B. ferragutiae</i> (97) <i>Buttiauxella sp.</i> (97) <i>B. brennerae</i> (97) <i>B. noackiae</i> (97) <i>B. gaviniae</i> (97)
0707		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella sp.</i> <i>Enterobacter sp.</i>	<i>B. agrestis</i> (99) <i>B. noackiae</i> (99) <i>Buttiauxella sp.</i> (99) <i>Pantoea sp.</i> (99) <i>B. izardii</i> (98) <i>B. ferragutiae</i> (98) <i>B. gaviniae</i> (98)
0709	urea +/-	<i>Enterobacteriaceae</i> (100)	<i>L. adecarboxylata</i> <i>Pantoea sp.</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>E. cloacae</i> <i>P. agglomerans</i>	<i>E. cloacae</i> (99) <i>Enterobacter sp.</i> (99) <i>L. adecarboxylata</i> (99) <i>Pantoea sp.</i> (99) <i>E. ludwigii</i> (99) <i>P. agglomerans</i> (99)

^aOkrajšave rodov: rod Brenneria: *B. nigrifluens*, *B. quercina*; rod Buttiauxella: *B. ferragutiae*, *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae*, *B. warmboldiae*; rod Escherichia: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*; rod Enterobacter: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. ludwigii*; rod Kluyvera: *K. ascorbata*, *K. cochleae*; rod Leclercia: *L. adecarboxylata*; rod Pantoea: *P. agglomerans*; rod Pectobacterium: *P. carotovorum*, *P. cypripedii*, *P. wasabiae*; rod Photorhabdus: *P. luminescens*; rod Salmonella: *S. enterica*, *S. typhi*; rod Shigella: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 10**: Genotipska identifikacija sevov iz zbirke IVZ – OSM uvrščenih v filogenetsko podskupino A₀.

zaporedna številka	indol/urea	genotipska identifikacija (odstotek verjetnosti) ^a		
		Classifier	Sequence Match	BLASTn
0714	indol -	<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Pantoea</i> sp. <i>Buttiauxella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	<i>B. agrestis</i> (99) <i>B. noackiae</i> (99) <i>B. ferragutiae</i> (99) <i>Buttiauxella</i> sp. (99) <i>B. gaviniae</i> (99) <i>Pantoea</i> sp. (99) <i>B. izardii</i> (99) <i>B. warmboldiae</i> (99) <i>B. brennerae</i> (99) <i>Enterobacter</i> sp. (98) <i>E. amnigenus</i> (98) <i>P. agglomerans</i> (98) <i>Erwinia</i> sp. (98) <i>Klebsiella</i> sp. (97)
0725	indol -	<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	<i>B. agrestis</i> (98) <i>Pantoea</i> sp. (98) <i>B. noackiae</i> (97) <i>Buttiauxella</i> sp. (97) <i>B. ferragutiae</i> (97) <i>B. izardii</i> (97) <i>B. gaviniae</i> (97) <i>Enterobacter</i> sp. (97) <i>B. warmboldiae</i> (97) <i>Enterobacter amnigenus</i> (97)
0726	indol -	<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella</i> sp. <i>Pantoea</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	<i>B. noackiae</i> (98) <i>B. agrestis</i> (98) <i>Buttiauxella</i> sp. (98) <i>Pantoea</i> sp. (98) <i>B. ferragutiae</i> (98) <i>B. izardii</i> (98) <i>B. gaviniae</i> (98) <i>B. brennerae</i> (98) <i>B. warmboldiae</i> (98) <i>E. amnigenus</i> (98) <i>P. agglomerans</i> (98)

^aOkrajšave rodov: rod *Brenneria*: *B. nigrifluens*, *B. quercina*; rod *Buttiauxella*: *B. ferragutiae*, *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae*, *B. warmboldiae*; rod *Escherichia*: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*; rod *Enterobacter*: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. ludwigii*; rod *Kluyvera*: *K. ascorbata*, *K. cochleae*; rod *Leclercia*: *L. adecarboxylata*; rod *Pantoea*: *P. agglomerans*; rod *Pectobacterium*: *P. carotovorum*, *P. cyripedii*, *P. wasabiae*; rod *Photorhabdus*: *P. luminescens*; rod *Salmonella*: *S. enterica*, *S. typhi*; rod *Shigella*: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 10**: Genotipska identifikacija sevov iz zbirke IVZ – OSM uvrščenih v filogenetsko podskupino A₀.

zaporedna številka	indol/urea	genotipska identifikacija (odstotek verjetnosti) ^a		
		Classifier	Sequence Match	BLASTn
0727		<i>Escherichia/ Shigella</i> (100)	<i>Shigella sonnei</i> <i>Photorhabdus luminescens</i> <i>Shigella sp.</i> <i>E. coli</i> <i>Brenneria quercina</i> <i>Brenneria nigrifluens</i> <i>Pectobacterium cypripedii</i> <i>Pectobacterium carotovorum</i> <i>Pectobacterium wasabiae</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>Shigella flexneri</i> (99) <i>Escherichia sp.</i> (99) <i>S. sonnei</i> (99) <i>P. luminescens</i> (99) <i>Shigella sp.</i> (99)
0729		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. brennerae</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferrugutiae</i> <i>Buttiauxella sp.</i>	<i>Pantoea sp.</i> (98) <i>B. agrestis</i> (97) <i>Buttiauxella sp.</i> (97) <i>B. brennerae</i> (97) <i>B. ferrugutiae</i> (97) <i>B. noackiae</i> (97) <i>B. gaviniae</i> (97) <i>B. warmboldiae</i> (96) <i>Enterobacter sp.</i> (96) <i>P. agglomerans</i> (96)
0732		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. brennerae</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferrugutiae</i> <i>Buttiauxella sp.</i> <i>Pantoea sp.</i>	<i>Pantoea sp.</i> (97) <i>B. agrestis</i> (97) <i>Buttiauxella sp.</i> (97) <i>B. ferrugutiae</i> (97) <i>B. noackiae</i> (96) <i>B. gaviniae</i> (96) <i>B. izardii</i> (96) <i>B. warmboldiae</i> (96) <i>Enterobacter sp.</i> (96) <i>Enterobacter aerogenes</i> (96) <i>E. amnigenus</i> (96) <i>P. agglomerans</i> (95)

^aOkrajšave rodov: rod *Brenneria*: *B. nigrifluens*, *B. quercina*; rod *Buttiauxella*: *B. ferrugutiae*, *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae*, *B. warmboldiae*; rod *Escherichia*: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*; rod *Enterobacter*: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. ludwigii*; rod *Kluyvera*: *K. ascorbata*, *K. cochleae*; rod *Leclercia*: *L. adecarboxylata*; rod *Pantoea*: *P. agglomerans*; rod *Pectobacterium*: *P. carotovorum*, *P. cypripedii*, *P. wasabiae*; rod *Photorhabdus*: *P. luminescens*; rod *Salmonella*: *S. enterica*, *S. typhi*; rod *Shigella*: *S. bodyii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 10**: Genotipska identifikacija sevov iz zbirke IVZ – OSM uvrščenih v filogenetsko podskupino A₀.

zaporedna številka	indol/urea	genotipska identifikacija (odstotek verjetnosti) ^a		
		Classifier	Sequence Match	BLASTn
0734		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. gaviniae</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella</i> sp. <i>B. ferragutiae</i> <i>Enterobacter</i> sp.	<i>B. noackiae</i> (98) <i>B. agrestis</i> (98) <i>Buttiauxella</i> sp. (98) <i>Pantoea</i> sp. (98) <i>B. ferragutiae</i> (98) <i>B. gaviniae</i> (98) <i>B. izardii</i> (98) <i>Enterobacter</i> sp. (98) <i>E. amnigenus</i> (98) <i>P. agglomerans</i> (98)
0736		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. gaviniae</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella</i> sp. <i>Pantoea</i> sp.	<i>B. ferragutiae</i> (99) <i>B. agrestis</i> (99) <i>Pantoea</i> sp. (99) <i>B. noackiae</i> (99) <i>B. gaviniae</i> (99) <i>B. izardii</i> (98) <i>B. brennerae</i> (98) <i>B. wermboldiae</i> (98) <i>Enterobacter</i> sp. (98) <i>E. aerogenus</i> (97) <i>E. amnigenus</i> (97) <i>Erwinia</i> sp. (97)
0739		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>S. sonnei</i> <i>P. luminescens</i> <i>Shigella</i> sp. <i>B. quercina</i> <i>B. nigrifluens</i> <i>P. cypripedii</i> <i>P. carotovorum</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Escherichia</i> sp. (99) <i>S. sonnei</i> (99)
0740		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. flexneri</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99)
0741		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. flexneri</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99)
0742		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>E. coli</i> <i>S. sonnei</i> <i>P. luminescens</i> <i>Escherichia</i> sp. <i>Shigella</i> sp.	<i>Shigella</i> sp. (99) <i>E. coli</i> (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Escherichia</i> sp. (99)

^aOkrajšave rodov: rod *Brenneria*: *B. nigrifluens*, *B. quercina*; rod *Buttiauxella*: *B. ferragutiae*, *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae*, *B. wermboldiae*; rod *Escherichia*: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*; rod *Enterobacter*: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. ludwigii*; rod *Kluyvera*: *K. ascorbata*, *K. cochleae*; rod *Leclercia*: *L. adecarboxylata*; rod *Pantoea*: *P. agglomerans*; rod *Pectobacterium*: *P. carotovorum*, *P. cypripedii*, *P. wasabiae*; rod *Photobacterium*: *P. luminescens*; rod *Salmonella*: *S. enterica*, *S. typhi*; rod *Shigella*: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 10**: Genotipska identifikacija sevov iz zbirke IVZ – OSM uvrščenih v filogenetsko podskupino A₀.

zaporedna številka	indol/urea	genotipska identifikacija (odstotek verjetnosti) ^a		
		Classifier	Sequence Match	BLASTn
0744		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestia</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	<i>B. noackiae</i> (98) <i>B. agrestis</i> (98) <i>Buttiauxella</i> sp. (98) <i>Pantoea</i> sp. (98) <i>B. ferragutiae</i> (98) <i>B. gaviniae</i> (98) <i>B. warmboldiae</i> (97) <i>E. amnigenus</i> (97) <i>P. agglomerans</i> (97)
0745		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Escherichia fergusonii</i> <i>Escherichia</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>E. fergusonii</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99) <i>Escherichia</i> sp. (99) <i>S. flexneri</i> (99)
0746	indol-	<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	<i>B. agrestis</i> (96) <i>B. noackiae</i> (96) <i>Buttiauxella</i> sp. (96) <i>B. ferragutiae</i> (96) <i>Pantoea</i> sp. (96) <i>B. izardii</i> (96) <i>B. gaviniae</i> (96) <i>Enterobacter</i> sp. (96) <i>B. warmboldiae</i> (96) <i>P. agglomerans</i> (95)
0747		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. gaviniae</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella</i> sp.	<i>Buttiauxella</i> sp. (99) <i>B. ferragutiae</i> (99) <i>Pantoea</i> sp. (99) <i>B. agrestis</i> (99) <i>B. noackiae</i> (99) <i>B. gaviniae</i> (99) <i>B. izardii</i> (99) <i>B. brennerae</i> (98) <i>B. warmboldiae</i> (98) <i>Enterobacter</i> sp. (98) <i>Erwinia</i> sp. (97)

^a**Okrajšave rodov:** rod Brenneria: *B. nigrifluens*, *B. quercina*; rod Buttiauxella: *B. ferragutiae*, *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae*, *B. warmboldiae*; rod Escherichia: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*; rod Enterobacter: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. ludwigii*; rod Kluyvera: *K. ascorbata*, *K. cochleae*; rod Leclercia: *L. adecarboxylata*; rod Pantoea: *P. agglomerans*; rod Pectobacterium: *P. carotovorum*, *P. cyripedii*, *P. wasabiae*; rod Photorhabdus: *P. luminescens*; rod Salmonella: *S. enterica*, *S. typhi*; rod Shigella: *S. bodyii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*.

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 10: Genotipska identifikacija sevov iz zbirke IVZ – OSM uvrščenih v filogenetsko podskupino A₀.

zaporedna številka	indol/urea	genotipska identifikacija (odstotek verjetnosti) ^a		
		Classifier	Sequence Match	BLASTn
0748		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>Buttiauxella</i> sp. <i>Pantoea</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	<i>B. agrestis</i> (98) <i>Buttiauxella</i> sp. (98) <i>Pantoea</i> sp. (98) <i>B. noackiae</i> (98) <i>B. ferragutiae</i> (98) <i>B. gaviniae</i> (98) <i>P. agglomerans</i> (98) <i>B. brennerae</i> (97)
0749		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. brennerae</i> <i>B. agrestis</i> <i>B. gaviniae</i> <i>B. noackiae</i> <i>Buttiauxella</i> sp.	<i>B. agrestis</i> (99) <i>Pantoea</i> sp. (99) <i>Buttiauxella</i> sp. (98) <i>B. ferragutiae</i> (98) <i>B. noackiae</i> (98) <i>B. gaviniae</i> (98) <i>B. izardii</i> (98) <i>B. warmboldiae</i> (98) <i>E. amnigenus</i> (97) <i>Enterobacter</i> sp. (97)
0750		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella</i> sp.	<i>B. agrestis</i> (98) <i>Pantoea</i> sp. (98) <i>Buttiauxella</i> sp. (98) <i>B. noackiae</i> (98) <i>B. ferragutiae</i> (98) <i>B. izardii</i> (98) <i>B. gaviniae</i> (98) <i>B. warmboldiae</i> (98) <i>Enterobacter</i> sp. (98) <i>B. brennerae</i> (98)
0751		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Escherichia</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. flexneri</i> <i>Shigella</i> sp.	<i>Shigella</i> sp. (99) <i>E. coli</i> (99) <i>Escherichia</i> sp. (99) <i>S. flexneri</i> (99)
0752		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. gaviniae</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella</i> sp.	<i>B. agrestis</i> (99) <i>Pantoea</i> sp. (98) <i>B. noackiae</i> (98) <i>B. ferragutiae</i> (98) <i>B. gaviniae</i> (98) <i>B. brennerae</i> (98) <i>B. warmboldiae</i> (98) <i>Enterobacter</i> sp. (98)

^aOkrajšave rodov: rod *Brenneria*: *B. nigrifluens*, *B. quercina*; rod *Buttiauxella*: *B. ferragutiae*, *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae*, *B. warmboldiae*; rod *Escherichia*: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*; rod *Enterobacter*: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. ludwigii*; rod *Kluyvera*: *K. ascorbata*, *K. cochleae*; rod *Leclercia*: *L. adecarboxylata*; rod *Pantoea*: *P. agglomerans*; rod *Pectobacterium*: *P. carotovorum*, *P. cypripedii*, *P. wasabiae*; rod *Photobacterium*: *P. luminescens*; rod *Salmonella*: *S. enterica*, *S. typhi*; rod *Shigella*: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*.

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 10: Genotipska identifikacija sevov iz zbirke IVZ – OSM uvrščenih v filogenetsko podskupino A₀.

zaporedna številka	indol/urea	genotipska identifikacija (odstotek verjetnosti) ^a		
		Classifier	Sequence Match	BLASTn
0754		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Escherichia</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. flexneri</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>Escherichia</i> sp. (99) <i>S. flexneri</i> (99)
0755		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. flexneri</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99) <i>Escherichia</i> sp. (99)
0756		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Escherichia</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. flexneri</i>	<i>Shigella</i> sp. 100 <i>E. coli</i> (99) <i>Escherichia</i> sp. (99) <i>S. flexneri</i> (99)
0759		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Escherichia</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>S. flexneri</i> <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>Escherichia</i> sp. (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99)
0760		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>E. fergusonii</i> <i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. flexneri</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>E. fergusonii</i> (99) <i>Escherichia</i> sp. (99) <i>Shigella</i> sp. (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>S. sonnei</i> (99)
0762		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>E. fergusonii</i> <i>Escherichia</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99) <i>E. fergusonii</i> (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Escherichia</i> sp. (99)
0768		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Escherichia</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. flexneri</i>	<i>Shigella</i> sp. (99) <i>E. coli</i> (99) <i>Escherichia</i> sp. (99) <i>S. flexneri</i> (99)
0814		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardi</i> <i>Buttiauxella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	<i>B. noackiae</i> (99) <i>B. agrestis</i> (99) <i>Buttiauxella</i> sp. (99) <i>B. ferragutiae</i> (99) <i>B. gaviniae</i> (99) <i>Enterobacter</i> sp. (99) <i>P. agglomerans</i> (99) <i>E. amnigenus</i> (99) <i>Pantoea</i> sp. (99)

^aOkrajšave rodov: rod Brenneria: *B. nigrifluens*, *B. quercina*; rod Buttiauxella: *B. ferragutiae*, *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae*, *B. warmboldiae*; rod Escherichia: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*; rod Enterobacter: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. ludwigii*; rod Kluyvera: *K. ascorbata*, *K. cochleae*; rod Leclercia: *L. adecarboxylata*; rod Pantoea: *P. agglomerans*; rod Pectobacterium: *P. carotovorum*, *P. cypripedii*, *P. wasabiae*; rod Photorhabdus: *P. luminescens*; rod Salmonella: *S. enterica*, *S. typhi*; rod Shigella: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 10**: Genotipska identifikacija sevov iz zbirke IVZ – OSM uvrščenih v filogenetsko podskupino A₀.

zaporedna številka	indol/urea	genotipska identifikacija (odstotek verjetnosti) ^a		
		Classifier	Sequence Match	BLASTn
0805	indol -	<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. gaviniae</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. warmboldiae</i> <i>Buttiauxella</i> sp.	<i>Pantoea</i> sp. (99) <i>B. agrestis</i> (99) <i>Buttiauxella</i> sp. (99) <i>B. brennerae</i> (99) <i>B. noackiae</i> (98) <i>B. gaviniae</i> (98) <i>B. ferragutiae</i> (98) <i>B. warmboldiae</i> (98) <i>K. intermedia</i> (98) <i>Enterobacter</i> sp. (98) <i>Kluyvera cochleae</i> (98) <i>E. amnigenus</i> (98) <i>Kluyvera ascorbata</i> (97)
0807		<i>Enterobacter</i> (46)	<i>Enterobacter</i> sp. <i>Enterobacter cowanii</i> <i>E. cloacae</i> <i>E. hermannii</i> <i>Yersinia</i> sp.	<i>E. hermannii</i> (99) <i>Yersinia</i> sp. (99) <i>E. cowanii</i> (99) <i>Enterobacter</i> sp. (98) <i>Salmonella typhi</i> (98) <i>Salmonella enterica</i> (98)
0810		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>S. sonnei</i> <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Escherichia</i> sp. (99) <i>S. sonnei</i> (99)
0816		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. brennerae</i> <i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella</i> sp.	<i>B. agrestis</i> (99) <i>Pantoea</i> sp. (99) <i>B. brennerae</i> (99) <i>B. ferragutiae</i> (99) <i>B. noackiae</i> (99) <i>B. izardii</i> (99) <i>B. warmboldiae</i> (98) <i>Enterobacter</i> sp. (98) <i>E. amnigenus</i> (98)

^aOkrajšave rodov: rod *Brenneria*: *B. nigrifluens*, *B. quercina*; rod *Buttiauxella*: *B. ferragutiae*, *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae*, *B. warmboldiae*; rod *Escherichia*: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*; rod *Enterobacter*: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. ludwigii*; rod *Kluyvera*: *K. ascorbata*, *K. cochleae*; rod *Leclercia*: *L. adecarboxylata*; rod *Pantoea*: *P. agglomerans*; rod *Pectobacterium*: *P. carotovorum*, *P. cypripedii*, *P. wasabiae*; rod *Photobacterium*: *P. luminescens*; rod *Salmonella*: *S. enterica*, *S. typhi*; rod *Shigella*: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 10**: Genotipska identifikacija sevov iz zbirke IVZ – OSM uvrščenih v filogenetsko podskupino A₀.

zaporedna številka	indol/urea	genotipska identifikacija (odstotek verjetnosti) ^a		
		Classifier	Sequence Match	BLASTn
0817	indol -	<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	<i>Buttiauxella</i> sp. (98) <i>B. agrestis</i> (98) <i>B. noackiae</i> (98) <i>B. ferragutiae</i> (98) <i>B. izardii</i> (98) <i>B. gaviniae</i> (98) <i>B. warmboldiae</i> (97) <i>B. brennerae</i> (97) <i>P. agglomerans</i> (97) <i>Enterobacter</i> sp. (97) <i>E. amnigenus</i> (97)
0818		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. gaviniae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella</i> sp. <i>B. noackiae</i> <i>Pantoea</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	<i>B. agrestis</i> (99) <i>B. noackiae</i> (99) <i>Buttiauxella</i> sp. (99) <i>B. ferragutiae</i> (99) <i>Pantoea</i> sp. (99) <i>B. izardii</i> (99) <i>B. gaviniae</i> (99) <i>Enterobacter</i> sp. (98) <i>E. amnigenus</i> (98) <i>P. agglomerans</i> (98)
0819		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	<i>B. agrestis</i> (99) <i>Pantoea</i> sp. (99) <i>B. noackiae</i> (98) <i>Buttiauxella</i> sp. (98) <i>B. izardii</i> (98) <i>B. ferragutiae</i> (98) <i>B. gaviniae</i> (98) <i>P. agglomerans</i> (98) <i>E. amnigenus</i> (98) <i>Enterobacter</i> sp. (97)
0820		<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. izardii</i> <i>Buttiauxella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	<i>Buttiauxella</i> sp. (98) <i>B. agrestis</i> (98) <i>Pantoea</i> sp. (98) <i>B. noackiae</i> (98) <i>B. izardii</i> (98) <i>B. ferragutiae</i> (98) <i>B. gaviniae</i> (98) <i>Enterobacter</i> sp. (97) <i>E. amnigenus</i> (97)

^a**Okrajšave rodov:** rod *Brenneria*: *B. nigrifluens*, *B. quercina*; rod *Buttiauxella*: *B. ferragutiae*, *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae*, *B. warmboldiae*; rod *Escherichia*: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*; rod *Enterobacter*: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. ludwigii*; rod *Kluyvera*: *K. ascorbata*, *K. cochleae*; rod *Leclercia*: *L. adecarboxylata*; rod *Pantoea*: *P. agglomerans*; rod *Pectobacterium*: *P. carotovorum*, *P. cypripedii*, *P. wasabiae*; rod *Photobacterium*: *P. luminescens*; rod *Salmonella*: *S. enterica*, *S. typhi*; rod *Shigella*: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 10**: Genotipska identifikacija sevov iz zbirke IVZ – OSM uvrščenih v filogenetsko podskupino A₀.

zaporedna številka	indol/urea	genotipska identifikacija (odstotek verjetnosti) ^a		
		Classifier	Sequence Match	BLASTn
0824		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Escherichia</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. flexneri</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99) <i>Escherichia</i> sp. (99)
0825		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Shigella</i> sp. <i>S. flexneri</i> <i>B. nigrifluens</i> <i>P. cypripedii</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99) <i>Shigella dysenteriae</i> (99) <i>Shigella boydii</i> (99)
0828	indol -	<i>Buttiauxella</i> (98)	<i>B. agrestis</i> <i>B. gaviniae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>B. noackiae</i> <i>Pantoea</i> sp.	<i>B. agrestis</i> (97) <i>Buttiauxella</i> sp. (97) <i>B. ferragutiae</i> (97) <i>B. noackiae</i> (97) <i>Pantoea</i> sp. (97) <i>Enterobacter</i> sp. (97) <i>B. izardii</i> (97) <i>B. brennerae</i> (96) <i>B. warmboldiae</i> (96) <i>E. amnigenus</i> (96)
0830	indol -	<i>Buttiauxella</i> (100)	<i>B. agrestis</i> <i>B. gaviniae</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>Buttiauxella</i> sp. <i>Pantoea</i> sp.	<i>B. agrestis</i> (97) <i>Buttiauxella</i> sp. (97) <i>B. ferragutiae</i> (97) <i>B. noackiae</i> (97) <i>B. izardii</i> (97) <i>B. gaviniae</i> (97) <i>Enterobacter</i> sp. (96) <i>B. warmboldiae</i> (96)
0831	indol -	<i>Buttiauxella</i> (98)	<i>B. agrestis</i> <i>B. noackiae</i> <i>B. ferragutiae</i> <i>Buttiauxella</i> sp.	<i>B. agrestis</i> (97) <i>B. noackiae</i> (97) <i>Buttiauxella</i> sp. (97) <i>Pantoea</i> sp. (97) <i>B. izardii</i> (97) <i>B. gaviniae</i> (97) <i>B. warmboldiae</i> (97) <i>E. amnigenus</i> (97)
0833		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>S. flexneri</i> <i>E. coli</i> <i>S. sp</i> <i>B. nigrifluens</i> <i>P. cypripedii</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>S. sp</i> (99) <i>S. dysenteriae</i> (99) <i>S. boydii</i> (99)

^a**Okrajšave rodov:** rod *Brenneria*: *B. nigrifluens*, *B. quercina*; rod *Buttiauxella*: *B. ferragutiae*, *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae*, *B. warmboldiae*; rod *Escherichia*: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*; rod *Enterobacter*: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. ludwigii*; rod *Kluyvera*: *K. ascorbata*, *K. cochleae*; rod *Leclercia*: *L. adecarboxylata*; rod *Pantoea*: *P. agglomerans*; rod *Pectobacterium*: *P. carotovorum*, *P. cypripedii*, *P. wasabiae*; rod *Photorhabdus*: *P. luminescens*; rod *Salmonella*: *S. enterica*, *S. typhi*; rod *Shigella*: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 10**: Genotipska identifikacija sevov iz zbirke IVZ – OSM uvrščenih v filogenetsko podskupino A₀.

zaporedna številka	indol/urea	genotipska identifikacija (odstotek verjetnosti) ^a		
		Classifier	Sequence Match	BLASTn
0845		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. flexneri</i> <i>B. quercina</i> <i>B. nigrifluens</i> <i>P. carotovorum</i> <i>P. cyripedii</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99) <i>S. dysenteriae</i> (99) <i>S. boydii</i> (99)
0846		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Escherichia</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. flexneri</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99)
0847		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Escherichia</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. flexneri</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>Escherichia</i> sp. (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99)
0848		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Escherichia</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. flexneri</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>Escherichia</i> sp. (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99)
0850		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Shigella</i> sp. <i>S. flexneri</i> <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99) <i>S. dysenteriae</i> (99) <i>S. boydii</i> (99)
0851		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>Escherichia</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. flexneri</i>	<i>E. coli</i> (100) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99)
0852		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (100)	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99) <i>Escherichia</i> sp. (99)
0854		<i>Escherichia</i> / <i>Shigella</i> (99)	<i>S. sonnei</i> <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> (99) <i>S. sonnei</i> (99) <i>S. flexneri</i> (99) <i>Shigella</i> sp. (99)

^a**Okrajšave rodov:** rod *Brenneria*: *B. nigrifluens*, *B. quercina*; rod *Buttiauxella*: *B. ferragutiae*, *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae*, *B. warmboldiae*; rod *Escherichia*: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*; rod *Enterobacter*: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. ludwigii*; rod *Kluyvera*: *K. ascorbata*, *K. cochleae*; rod *Leclercia*: *L. adecarboxylata*; rod *Pantoea*: *P. agglomerans*; rod *Pectobacterium*: *P. carotovorum*, *P. cyripedii*, *P. wasabiae*; rod *Photobacterium*: *P. luminescens*; rod *Salmonella*: *S. enterica*, *S. typhi*; rod *Shigella*: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*.

Glede na rezultate genotipske identifikacije smo iz nadaljnjih analiz izločili 34 sevov, ki se ne uvrščajo v vrsto *E. coli*. Preglednica 11 prikazuje pravilnejšo razporeditev 45-ih sevov vrste *E. coli* iz leta 2007 in 45-tih sevov vrste *E. coli* iz leta 2008 v filogenetske skupine in podskupine. V filogenetsko skupino A smo še vedno uvrstili velik odstotek sevov (53 %), od tega 26 % v podskupino A₀ in 22 % v podskupino A₁. V filogenetsko skupino B₁ smo uvrstili 33 % sevov, v skupino D 11 % sevov, v skupino B₂ pa le 2 % sevov.

Preglednica 11: Število (odstotek) sevov *E. coli* iz zbirk 2007 in 2008, ki so se dejansko uvrstili v posamezne filogenetske skupine.

Filogenetska (pod)skupina		Število (odstotek) sevov enega leta				Število (odstotek) vseh sevov	
		Zbirka 2007 – 45 sevov		Zbirka 2008 – 45 sevov		Skupaj – 90 sevov	
A	A ₀	29 (64)	14 (31)	19 (42)	12 (27)	48 (53)	26 (29)
	A ₁		15 (33)		7 (16)		22 (24)
B ₁		15 (33)	15 (33)	15 (33)	15 (33)	30 (33)	30 (33)
B ₂	B ₂₂	0	0	2 (4)	1 (2)	2 (2)	1 (1)
	B ₂₃		0		1 (2)		1 (1)
D	D ₁	1 (2)	1 (2)	9 (20)	5 (11)	10 (11)	6 (7)
	D ₂		0		4 (9)		4 (4)

4.3 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI GENOV, KI KODIRAJO VIRULENTNE DEJAVNIKE

Z metodo PCR smo preverili prisotnost nekaterih virulentnih dejavnikov iz skupine adhezinov in toksinov. V analizo smo vključili 84 sevov *E. coli* (preglednica 12).

Preglednica 12: Prisotnost virulentnih dejavnikov sevov vrste *E. coli* iz zbirke IVZ – OSM.^a

Kategorije		Adhezini ^b						Toksin ^b							
Zapor. št.	Filo. sk.	<i>fimH</i>	<i>sfa</i>	<i>eae</i>	<i>crl</i>	<i>iha</i>	<i>hra</i>	<i>hlyen</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf</i>	<i>sat</i>	<i>vat</i>	<i>ompT</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>
0727	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0739	A ₀	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0740	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0741	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0742	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0745	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0751	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0754	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0755	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0756	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0759	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0760	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0762	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0768	A ₀	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
0810	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0824	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0825	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0833	A ₀	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0845	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0846	A ₀	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0847	A ₀	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0848	A ₀	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0850	A ₀	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0851	A ₀	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0852	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0854	A ₀	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0710	A ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
0711	A ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0712	A ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0713	A ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0717	A ₁	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
0719	A ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0720	A ₁	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
0722	A ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0723	A ₁	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-

^a Sevi so razporejeni glede na filogenetsko skupino.

^b Prisotnosti gena je označena z znakom +, odsotnosti pa z znakom -.

nt – sevov nismo preverjali za prisotnost virulentnih dejavnikov.

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 12: Prisotnost virulentnih dejavnikov sevov vrste *E. coli* iz zbirke IVZ – OSM.^a

Kategorije		Adhezini						Toksini							
Zap. št.	Filo. sk.	<i>fimH</i>	<i>sfa</i>	<i>eae</i>	<i>crl</i>	<i>iha</i>	<i>hra</i>	<i>hlyen</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf</i>	<i>sat</i>	<i>vat</i>	<i>ompT</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>
0724	A ₁	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
0738	A ₁	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0753	A ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0761	A ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
0763	A ₁	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
0767	A ₁	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
0801	A ₁	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
0804	A ₁	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0829	A ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0839	A ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0840	A ₁	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0841	A ₁	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
0844	A ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0703	B ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0704	B ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0718	B ₁	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
0721	B ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0728	B ₁	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
0730	B ₁	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0731	B ₁	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
0733	B ₁	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0737	B ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0743	B ₁	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0757	B ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0758	B ₁	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
0764	B ₁	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
0765	B ₁	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
0766	B ₁	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
0803	B ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0806	B ₁	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
0808	B ₁	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
0809	B ₁	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
0811	B ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0812	B ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0813	B ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0815	B ₁	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

^a Sevi so razporejeni glede na filogenetsko skupino.

^b Prisotnosti gena je označena z znakom +, odsotnosti pa z znakom –.

nt – sevov nismo preverjali za prisotnost virulentnih dejavnikov.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 12**: Prisotnost virulentnih dejavnikov sevov vrste *E. coli* iz zbirke IVZ – OSM.^a

Kategorije		Adhezini						Toksini							
Zap. št.	Filo. sk.	<i>fimH</i>	<i>sfa</i>	<i>eae</i>	<i>crl</i>	<i>iha</i>	<i>hra</i>	<i>hlyen</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf</i>	<i>sat</i>	<i>vat</i>	<i>ompT</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>
0823	B ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0832	B ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0834	B ₁	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0836	B ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0838	B ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0853	B ₁	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0856	B ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0835	B ₂₂	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
0827	B ₂₃	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
0735	D ₁	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0821	D ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0837	D ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0842	D ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0843	D ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0849	D ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0802	D ₂	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
0822	D ₂	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
0826	D ₂	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0855	D ₂	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

nt – sevov nismo preverjali za prisotnost virulentnih dejavnikov.

Vsi sevi *E. coli* so imeli prisoten gen *crl*, 74 sevov (88 %) je imelo *fimH*, deset sevov (12 %) je imelo gen *vtx2* (priloga C), devet sevov (11 %) je imelo gen *hra*, osem sevov (10 %) je imelo gen *ompT* in *hlyen*, šest sevov (7 %) je imelo gen *vtx1* in *iha*, trije sevi (4 %) so imelo gen *eae* in po en sev (1 %) je imel gen *hlyA*, *vat* in *sfa*. Pri nobenemu od sevov nismo ugotovili prisotnosti genov *cnf* in *sat* (preglednica 13).

Preglednica 13: Odstotek sevov vrste *E. coli* iz zbirke IVZ – OSM s prisotnim virulentnim dejavnikom.

Virulentni dejavniki	<i>E. coli</i> s prisotnim virulentnim dejavnikom	
	Število sevov	Odstotek sevov (%)
<i>crl</i>	84	100
<i>fimH</i>	74	88
<i>vtx2</i>	10	12
<i>hra</i>	9	12
<i>hlyen</i>	8	10
<i>ompT</i>	8	10
<i>iha</i>	6	7
<i>vtx1</i>	6	7
<i>eae</i>	3	4
<i>sfa</i>	1	1
<i>hlyA</i>	1	1
<i>vat</i>	1	1
<i>sat</i>	0	0
<i>cnf</i>	0	0

4.4 PORAZDELITEV VIRULENTNIH DEJAVNIKOV GLEDE NA FILOGENETSKE (POD)SKUPINE

V preglednici 14 so prikazani odstotki posameznih virulentnih dejavnikov, ki so se pojavljali znotraj različnih filogenetskih skupin in podskupin. Kot je bilo že omenjeno, je bil gen *crl* prisoten pri vseh sevih *E. coli*. V vseh filogenetskih skupinah je bil prisoten tudi gen za FimH. Gen *vtx2* je bil prisoten v podskupinah A₀, A₁ in skupini B₁; gen *hra* v podskupini A₁, skupini B₁ in pri sevu iz podskupine B₂₂; gen *hlyen* pri podskupinah A₀, A₁ in skupini B₁; gen *ompT* pri podskupinah A₁, D₂, skupini B₁ in pri enem sevu iz podskupin B₂₂ in B₂₃; gen *iha* v podskupini A₁, skupini B₁ in pri sevu iz podskupine B₂₃; gen *vtx1* pri podskupini A₀, skupini B₁ in pri sevu iz podskupine B₂₂; gen *eae* pri skupini B₁; gena *sfa* in *hlyA* pri podskupini A₁ ter gen *vat* pri podskupini D₂.

Preglednica 14: Odstotek sevov iz posamezne filogenetske (pod)skupine, s prisotnimi virulentnimi dejavniki

Filo. sk.	Št. test. sevov	Odstotek sevov, ki ima gen za virulentni dejavnik													
		Adhezini						Toksini							
		<i>fimH</i>	<i>sfa</i>	<i>eae</i>	<i>crl</i>	<i>iha</i>	<i>hra</i>	<i>hlyen</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf</i>	<i>sat</i>	<i>vat</i>	<i>ompT</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>
A ₀	22	82	0	0	100	0	0	5	0	0	0	0	0	6	6
A ₁	20	100	5	0	100	10	25	5	5	0	0	0	10	0	10
B ₁	30	90	0	10	100	10	10	20	0	0	0	0	7	13	23
B ₂	1	100	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	100	100	0
B ₂ ₃	1	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0
D ₁	6	83	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D ₂	4	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	25	50	0	0

Podatki zbrani v preglednici 15 kažejo statistično značilne povezave med virulentnimi dejavniki *hlyen*, *vtx2* in *eae* ter filogenetsko skupino B₁, med virulentnima dejavnikoma *vat* in *ompT* ter filogenetsko podskupino D₂ in med virulentnim dejavnikom *ompT* in filogenetsko skupino B₂.

Preglednica 15: Porazdelitev virulentnih dejavnikov po filogenetskih (pod)skupinah.

Prevalenca (N [%]) sevov																										
Filogenetske skupine											Skupaj															
VD	A		P		B ₁		P		B ₂		P		D		P											
<i>fimH</i>	36	(40)	0,7379		27	(30)	1		2	(2)	1		9	(10)	1		74	(88)								
<i>sfa</i>	1	(1)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		1	(1)								
<i>eae</i>	0	(0)	0,2409		3	(3)	0,0426*		0	(0)	1		0	(0)	1		3	(4)								
<i>crl</i>	42	(47)	1		30	(33)	1		2	(2)	1		10	(11)	1		84	(100)								
<i>iha</i>	2	(2)	0,6758		3	(3)	0,6616		1	(1)	0,1385		0	(0)	1		6	(7)								
<i>hra</i>	5	(6)	1		3	(3)	1		1	(1)	0,2039		0	(0)	0,5906		9	(11)								
Filogenetske podskupine											Skupaj															
VD	A ₀		P		A ₁		P		B ₂		P		B ₂ ₃		P		D ₁		P		D ₂		P			
<i>fimH</i>	18	(20)	0,4428		20	(22)	0,1079		1	(1)	1		1	(1)	1		5	(6)	0,5443		4	(4)	1		74	(88)
<i>sfa</i>	0	(0)	1		1	(1)	0,2381		0	(0)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		1	(1)
<i>eae</i>	0	(0)	0,5633		0	(0)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		3	(4)
<i>crl</i>	22	(24)	1		20	(22)	1		1	(1)	1		1	(1)	1		6	(7)	1		4	(4)	1		84	(100)
<i>iha</i>	0	(0)	0,3327		2	(2)	0,6248		0	(0)	1		1	(1)	0,0714		0	(0)	1		0	(0)	1		6	(7)
<i>hra</i>	0	(0)	0,1036		5	(6)	0,3050		1	(1)	0,1190		0	(0)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		9	(11)

^a VD - virulentni dejavniki, N - število. Vrednosti P, ki so statistično značilne oz. takrat ko je $P < 0,05$, so v tabeli označene z zvezdico. Znak * pomeni $P < 0,05$.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 15**: Porazdelitev virulentnih dejavnikov po filogenetskih (pod)skupinah.

Prevalenca (N [%]) sevov																		
Filogenetske skupine											Skupaj							
VD	A		P		B ₁		P		B ₂			P		D		P		
<i>hlyen</i>	2	(2)	0,2646		6	(7)	0,0221*		0	(0)	1		0	(0)	0,5872		8	(10)
<i>hlyA</i>	1	(1)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		1	(1)
<i>vat</i>	0	(0)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		1	(1)	0,1190		1	(1)
<i>ompT</i>	2	(2)	0,2646		2	(2)	0,7055		2	(2)	0,0080*		2	(2)	0,2415		8	(10)
<i>vtx1</i>	1	(1)	0,2016		4	(5)	0,1804		1	(1)	0,1385		0	(0)	1		6	(7)
<i>vtx2</i>	2	(2)	0,0882		7	(8)	0,0303*		0	(0)	1		0	(0)	0,5997		10	(12)

Filogenetske podskupine											Skupaj																			
VD	A ₀		P		A ₁		P		B ₂			P		B ₂		P		D ₁		P		D ₂		P						
<i>hlyen</i>	1	(1)	0,6742		1	(1)	0,6732						0	(0)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		8	(10)				
<i>hlyA</i>	0	(0)	1		1	(1)	0,2301						0	(0)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		1	(1)				
<i>vat</i>	0	(0)	1		0	(0)	1						0	(0)	1		0	(0)	1		1	(1)	0,0476*		1	(1)				
<i>ompT</i>	0	(0)	0,1039		2	(2)	1						1	(1)	0,0952		1	(1)	0,0952		0	(0)	1		2	(2)	0,0436*		8	(10)
<i>vtx1</i>	1	(1)	1		0	(0)	0,3279						1	(1)	0,0714		0	(0)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		6	(7)
<i>vtx2</i>	1	(1)	0,2799		1	(1)	0,4389						0	(0)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		0	(0)	1		10	(12)

^a VD - virulentni dejavniki, N - število. Vrednosti P, ki so statistično značilne oz. takrat ko je $P < 0,05$, so v tabeli označene z zvezdico. Znak * pomeni $P < 0,05$.

4.5 PORAZDELITEV VIRULENTNIH DEJAVNIKOV GLEDE NA VRSTO VZORCA

Zanimalo nas je v katerih živilih lahko najdemo seve z več virulentnimi dejavniki in kateri so najbolj pogosti, zato smo rezultate analizirali, jih statistično obdelali in strnili v preglednici 16.

Statistično značilnih povezav med virulentnimi dejavniki in vrsto vzorca nismo zasledili, smo pa pri sevih izoliranih iz mesa ali mesnih izdelkov opazili več različnih virulentnih dejavnikov. Pri sevih izoliranih iz mesa smo namreč zasledili vse testirane virulentne dejavnike razen *sat* in *cnf*, ki ju nismo zasledili pri nobenem sevu iz celotne zbirke, pri sevih izoliranih iz solate in druge zelenjave smo ugotovili prisotnost genov *fimH*, *crl*, *hlyen*, *vtx1* in *vtx2*, pri sevih izoliranih iz drugih živil (namazi, omake, slaščice, testo, čaj) pa smo zasledili *fimH*, *crl*, *eae*, *hra*, *ompT*, *vtx1* in *vtx2*.

Preglednica 16: Porazdelitev virulentnih dejavnikov glede na vrsto vzorca ^a

Prevalenca (N [%]) sevov							
VD	Vzorec oz. živilo						Skupaj
	Meso in mesni izdelki	P	Solata in dr. zelenjava	P	Ostalo	P	
<i>fimH</i>	51 (65)	0,7033	7 (9)	0,2712	12 (15)	1	70 (89)
<i>sfa</i>	1 (1)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	1 (1)
<i>eae</i>	2 (3)	1	0 (0)	1	1 (1)	0,4213	3 (4)
<i>crl</i>	57 (72)	1	9 (11)	1	13 (16)	1	79 (100)
<i>iha</i>	5 (6)	0,3145	0 (0)	1	0 (0)	0,5843	5 (6)
<i>hra</i>	6 (8)	0,6663	0 (0)	1	1 (1)	1	7 (9)
<i>hlyen</i>	6 (8)	1	2 (3)	0,2246	0 (0)	0,3403	8 (10)
<i>hlya</i>	1 (1)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	1 (1)
<i>vat</i>	1 (1)	1	0 (0)	1	0 (0)	1	1 (1)
<i>ompT</i>	7 (9)	0,4315	0 (0)	0,5865	1 (1)	1	8 (10)
<i>vtx1</i>	4 (5)	0,6686	1 (1)	0,5283	1 (1)	1	6 (8)
<i>vtx2</i>	8 (10)	0,7174	2 (3)	0,3184	0 (0)	0,2004	10 (13)

^aVD – virulentni dejavnik; N - število. Vrednosti P so statistično značilne ko je $P < 0,05$.

4.6 UGOTAVLJANJE ODPORNOSTI PROTI PROTIMIKROBNIM SNOVEM

4.6.1 Genotipsko testiranje odpornosti

4.6.1.1 Plazmidno kodirane determinante odpornosti proti kinolonom (PMQR)

Pri vseh sevih iz let 2007 in 2008 smo z metodo PCR preverili prisotnost plazmidno kodiranih determinant odpornosti proti kinolonom (PMQR) iz skupine *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* in *qnrS*). Pri nobenem preučevanem sevu nismo zasledili pomnožka PCR, ki bi ustrežal velikosti pričakovanega pomnožka za dele genov *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* in *qnrS*.

4.7 ANALIZA PODATKOV O OBCUTLJIVOSTI SEVOV *E. coli*

Na IVZ – OSM so izbrane seve testirali za občutljivost za protimikrobne snovi. Podatke smo strnili in jih statistično obdelali.

Med sevi *E. coli* jih je bilo največ odpornih proti amoksicilinu, streptomycinu, ampicilinu, sulfonamidom, cefalotinu in tetraciklinu. Intermediarno odpornih jih je bilo največ za cefalotin, amoksicilin, streptomycin, tetraciklin, cefpodoksin in ampicilin. Zelo malo jih je intermediarno odpornih ali odpornih proti trimetoprimu, trimetoprim/sulfometoksazolu, nalidiksinski kislini, kloramfenikolu, cefotaksimu, kanamicinu in ciprofloksacinu. Vsi sevi so bili občutljivi za gentamicin, ceftazidim, neomicin, apramicin, florfenikol in enrofloksacin (preglednica 17).

Med zbirkama sevov vrste *E. coli* iz let 2007 in 2008 smo opazili večje razlike v številu sevov odpornih proti streptomycinu, tetraciklinu, sulfonamidom in ampicilinu. Sevi iz leta 2008 so bili za omenjenje štiri antibiotike veliko bolj občutljivi kot sevi iz leta 2007, kjer jih je bilo več intermediarno odpornih in odpornih (preglednica 17).

Preglednica 17: Povzetek ugotovitev testiranja odpornosti za seve *E.coli*, primerjava let 2007 in 2008.

Protimikrobne snovi (PMS)	Število (odstotek) testiranih sevov <i>E. coli</i> , ki so					
	občutljivi za PMS		intermediarno odporni proti PMS		odporni proti PMS	
	2007	2008	2007	2008	2007	2008
Neomicin	nt	35 (100)	nt	0	nt	0
Apramicin	nt	35 (100)	nt	0	nt	0
Florfenikol	nt	35 (100)	nt	0	nt	0
Enrofloksacin	nt	35 (100)	nt	0	nt	0
Ceftazidim	nt	35 (100)	nt	0	nt	0
Gentamicin	20 (100)	35 (100)	0	0	0	0
Ciprofloksacin	19 (95,0)	35 (100)	1 (5,0)	0	0	0
Kanamycin	19 (95,0)	35 (100)	0	0	1 (5,0)	0
Cefotaksim	19 (95,0)	33 (94,3)	1 (5,0)	2 (5,7)	0	0
Kloramfenikol	19 (95,0)	34 (97,1)	1 (5,0)	0	0	1 (2,9)
Nalidiksinska kislina	19 (95,0)	33 (94,3)	1 (5,0)	0	0	2 (5,7)
Trim. / sulfo. ^a	19 (95,0)	33 (94,3)	0	0	1 (5,0)	2 (5,7)
Trimetoprim	19 (95,0)	32 (91,4)	0	0	1 (5,0)	3 (8,6)
Cefpodoksim	17 (85,0)	nt	3 (15,0)	nt	0	nt
Sulfonamidi	13 (65,0)	33 (94,3)	2 (10,0)	0	5 (25,0)	2 (5,7)
Ampicilin	14 (70,0)	28 (80,0)	3 (15,0)	3 (8,6)	3 (15,0)	4 (11,4)
Tetraciklin	10 (50,0)	29 (82,9)	7 (35,0)	3 (8,6)	3 (15,0)	3 (8,6)
Streptomycin	4 (20,0)	25 (71,4)	12 (60,0)	6 (17,1)	4 (20,0)	4 (11,4)
Amoksicilin	nt	17 (48,6)	nt	13 (37,1)	nt	5 (14,3)
Cefalotin	nt	13 (37,1)	nt	18 (51,4)	nt	4 (11,4)

nt – sevov nismo testirali.

^a kombinacija trimetoprima in sulfometoksazola

Med 20-imi testiranimi sevi *E. coli* iz leta 2007 je bil en sev (5 %) občutljiv za vse protimikrobne snovi, deset sevov (50 %) je bilo vsaj proti eni snovi intermediaro odpornih in devet sevov (45 %) odpornih vsaj proti eni protimikrobni snovi. Med 35-imi testiranimi sevi *E. coli* iz leta 2008 pa je bilo osem sevov (23 %) občutljivih za vse protimikrobne snovi, 16 sevov (46 %) je bilo vsaj proti eni protimikrobni snovi intermediaro odpornih in deset sevov (29 %) odpornih vsaj proti eni protimikrobni snovi.

Opazili smo tudi razlike v odpornosti sevov znotraj vrste *E. coli*, ki so bili uvrščeni v različne filogenetske skupine in podskupine (preglednici 18 in 19). Najbolj odporni sta bili podskupina D₂ in skupina B₁, manj podskupina A₁, najmanj pa podskupini D₁ in A₀. Podskupini B₂₂ in B₂₃ z drugimi nismo mogli primerjati, saj smo iz obeh imeli le po en sev. Statistično značilnih razlik pa vendar nismo našli.

Preglednica 18: Primerjava odpornosti proti protimikrobnim snovem med posameznimi filogenetskimi (pod)skupinami sevov vrste *E. coli*.

Filogenetska (pod)skupina	Odporen / intermed. ^c	Odpornost proti protimikrobnim snovem (%)																			
		Ampicilin	Cefotaksim	Kloramfenikol	Ciprofloksacin	Gentamicin	Kanamicin	Nalidiksinska k. ^a	Streptomycin	Sulfonamid	Tetraciklin	Trimetoprim	Trim. / sulfo. ^b	Neomicin	Apramicin	Florfenikol	Amoksicilin	Cefalotin	Enrofloxacin	Ceftazidim	Ampicilin
A ₀	R	0	0	0	0	0	0	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	I	0	0	0	0	0	0	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	0	50	16,7	0	0
A ₁	R	15,4	0	0	0	0	0	7,7	15,4	15,4	23,1	7,7	0	0	0	0	0	20	0	0	0
	I	0	0	7,7	0	0	0	0	38,5	0	30,8	0	0	12,5	0	0	0	0	60	0	0
B ₁	R	12	0	4	0	0	4	0	12	16	8	8	8	0	0	0	0	15,4	15,4	0	0
	I	24	12	0	4	0	0	0	40	8	20	0	0	16,7	0	0	0	7,7	53,8	0	0
B ₂	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B ₂ ₃	R	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0
	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D ₁	R	0	0	0	0	0	0	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	I	0	0	0	0	0	0	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	0	60	100	0	0
D ₂	R	25	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	25	0	0	0	0	0	0	0	0
	I	0	0	0	0	0	0	0	25	0	25	0	0	0	0	0	0	25	50	0	0

^a nalidiksinska kislina

^b kombinacija trimetoprima in sulfometoksazola

^c I pomeni intermedarno odporen, R pomeni odporen

Preglednica 19: Občutljivost za nekatere testirane protimikrobne snovi glede na posamezne filogenetske skupine sevov *E. coli*^a

PMS	Odporni sevi (N [%])												Skupaj
	Filogenetske (pod)skupine												
	A ₀	P	A ₁	P	B ₁	P	B ₂	P	D ₁	P	D ₂	P	
Streptomycin	1 (2)	1	2 (4)	0,6639	3 (5)	1	0 (0)	1	1 (2)	1	1 (2)	0,4770	8 (15)
Amoksicilin	0 (0)	0,2993	1 (3)	0,5610	2 (6)	1	1 (3)	0,2689	0 (0)	1	1 (3)	0,2689	5 (14)
Ampicilin	0 (0)	1	2 (4)	0,6639	3 (5)	1	1 (2)	0,6639	0 (0)	1	1 (2)	0,4294	7 (13)
Sulfonamidi	0 (0)	1	2 (4)	0,6639	4 (7)	0,6861	0 (0)	1	0 (0)	1	1 (2)	0,4294	7 (13)
Cefalotin	0 (0)	1	0 (0)	1	2 (6)	0,6176	1 (3)	0,2184	0 (0)	1	1 (3)	0,3990	4 (11)
Tetraciklin	0 (0)	1	3 (5)	0,1364	2 (6)	0,6861	0 (0)	1	0 (0)	1	1 (3)	0,3787	6 (11)

^aPMS – protimikrobna snov; N - število. Vrednosti P so statistično značilne ko je $P < 0,05$.

5 RAZPRAVA

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti virulentni potencial sevov *E. coli*, ki so jih izolirali na IVZ – OSM iz vzorcev mesa oziroma druge hrane, ki so jih dobili iz t. i. internega nadzora proizvajalcev oziroma ponudnikov hrane. Na IVZ – OSM so nam odstopili 124 sevov, ki so jih izolirali iz različnih vzorcev po modificiranem ISO-standardu 7251:1993, modificiranem ISO-standardu 16654:2001 in ISO-standardu 16649-2:2001.

Prvi korak pri genotipizaciji je bil uvrstitev sevov v filogenetske skupine po Clermontu. Ugotovili smo, da se je zelo veliko število sevov (48 %) uvrščalo v filogenetsko podskupino A₀. Rezultat smo primerjali z literaturo in ugotovili, da je bil med našimi sevi odstotek podskupine A₀ nenavadno visok (Gordon in sod., 2008), zato smo prosili laboratorij IVZ – OMM za ponovno razširjeno biokemijsko vrsto vseh 124-ih sevov. Po ponovni biokemijski identifikaciji so za tri seve, ki smo jih uvrstili v filogenetsko podskupino A₀, ugotovili, da se niso uvrstili v vrsto *E. coli*.

Prav tako smo želeli potrditi, da se ostali sevi, uvrščeni v filogenetsko podskupino A₀, uvrščajo v vrsto *E. coli*, zato smo pomnožili gen za 16S rRNA. Pomnožke PCR smo izrezali iz gela, jih očistili in jih poslali na sekvenciranje v MacroGen inc. (Seoul, Korea). Začetna oligonukleotida za sekvencijsko reakcijo sta bila enaka kot za pomnožek 16S rRNA, in sicer Fd1 in 1392. Dobljena zaporedja smo analizirali s programom BLASTn na spletni strani <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> in s programoma Sequence Match in Classifier na spletni strani RDP: <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>. Pri nadaljnjih analizah smo se osredotočili predvsem na podatke, ki smo jih dobili s pomočjo programa Classifier.

Z enakim postopkom smo analizirali tudi tri seve, za katere so po dodatni biokemijski identifikaciji ugotovili, da se niso uvrstili v vrsto *E. coli*. S programom Classifier smo med temi sevi identificirali po en sev iz rodu *Buttiauxella*, *Aeromonas* in *Yersinia*.

Od 57-ih sevov, po dodatni biokemijski identifikaciji uvrščenih v vrsto *E. coli*, ki smo jih uvrstili v filogenetsko podskupino A₀, se je na podlagi zaporedja za 16S rRNA v vrsto *E. coli* uvrstilo le 26 (46 %) sevov. Od ostalih sevov smo jih 26 (46 %) uvrstili v rod

Buttiauxella, štiri (7 %) v vrsto *Leclercia adecarboxylata*, enega pa s programom Classifier nismo mogli identificirati. Seve, ki se niso uvrstili v vrsto *E. coli* smo izločili iz nadaljnjih analiz.

Od preostalih sevov, ki so se uvrstili v filogenetsko podskupino A₀, jih je zagotovo 26 (29 % vseh sevov *E. coli*) pripadalo vrsti *E. coli*. Tako se je v filogenetsko skupino A uvrščalo kar 48 sevov (53 % vseh sevov *E. coli*), kar je še vedno veliko več, kot omenjajo drugi avtorji. Podoben rezultat je dobil le Johnson s sod., 2009, ki je iz govejega mesa izoliral 35 % sevov, iz svinjskega mesa 51 % sevov, iz piščančjega mesa 29 % sevov in iz puranjega mesa 43 % sevov, ki se uvrščajo v filogenetsko skupino A.

Od ostalih sevov *E. coli* se jih je uvrstilo v filogenetsko podskupino A₁ 22 (24 %), v skupino B₁ 30 (33 %), v podskupino B₂ en sev (1 %), v podskupino B₂₃ en sev (1 %), v podskupino D₁ 6 (7 %) in v podskupino D₂ 4 (4 %). Če našo zbirko živilskih sevov primerjamo z zbirko komenzalnih sevov *E. coli* (Čitar, 2010), opazimo drugačno razvrstitev v filogenetske skupine (33 % B₂, 30 % D, 22 % A, 14 % B₁). Med komenzalnimi sevi sta bili najpogosteje zastopani skupini B₂ in D, kamor so bili naši živilski sevi le redko uvrščeni. Razlika je tudi pri uvrščanju v skupini A in B₁, kjer je situacija ravno nasprotna, kar smo tudi pričakovali.

Glede na to, da veljata filogenetski skupini B₂ in D za najbolj virulentni, skupini A in B₁ pa naj bi imeli najmanj zapisov za virulentne dejavnike (Picard in sod., 1999), razvrstitev naših živilskih sevov v filogenetske skupine ni bila tako zaskrbljujoča.

Pri genotipizaciji teh sevov smo se odločili za verotoksine (*vtx1* in *vtx2*), ker so za *E. coli*, povezane s hrano, zelo pomembni, saj povzročajo resna obolenja. V povezavi z njimi smo izbrali tudi gen za intimin in enterohemolizin. Med adhezini smo izbrali gene za fimbrije tipa 1, S-fimbrije, curlin, protein Iha in protein Hra, med toksini pa še gen za α -hemolizin, citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1, omptin T ter proteina Sat in Vat. Iz preglednice 13 je razvidno, da so imeli vsi sevi vrste *E. coli* prisoten gen za curlin, pri 88 % sevov gen *fimH*, pri 12 % gen *vtx2*, pri 11 % gen *hra*, pri 10 % gena *hlyen* in *ompT*, pri 7 % gena *iha* in *vtx1*, pri 4 % gen *eae*, pri 1 % gene *sfa*, *hlyA* in *vat*, gena *sat* in *cnf* pa pri nobenem sevu.

Med sevi iz filogenetske podskupine A₀ je bil najpogostejši gen za fimbrije tipa 1 (82 %), zelo redko (5 %) pa smo pomnožili gen za enterohemolizin in verotoksine. Vsi sevi iz podskupine A₁ so imeli gen za fimbrije tipa 1, nekaj sevov (25 %) je imelo gen za protein Hra, malo sevov (10 %) je imelo gen za protein Iha, verotoksin 2 in omptin T, samo po en sev (5 %) pa je imel gen za enterohemolizin, α -hemolizin ter S-fimbrije. Večina sevov iz skupine B₁ je imela prisoten gen za fimbrije tipa 1 (90 %), nekaj sevov je imelo gen za verotoksin 2 (23 %) in enterohemolizin (20 %), redki sevi pa so imeli gene za verotoksin 1 (13 %), Iha (10 %), Hra (10 %), intimin (10 %) in omptin T (7 %). V podskupino B₂ se je uvrstil le en sev, pri katerem smo uspeli pomnožiti gen za fimbrije tipa 1, Hra, verotoksin 1 in omptin T. V podskupino B₂ se je prav tako uvrstil le en sev, ki je imel prisoten gen za fimbrije tipa 1, Iha in omptin T. Pri sevih iz podskupine D₁ smo v 83 % zasledili gen za fimbrije tipa 1, drugih testiranih virulentnih dejavnikov, razen gena za curlin, niso imeli. Vsi sevi iz podskupine D₂ so imeli gen za fimbrije tipa 1, nekaj sevov je imelo tudi gen za protein omptin T (50 %) in Vat (25 %).

Pokazali smo tudi statistično značilne povezave med virulentnimi dejavniki *hlyen*, *vtx2* in *eae* ter filogenetsko skupino B₁; med virulentnima dejavnikoma *vat* in *ompT* ter filogenetsko podskupino D₂ in med virulentnim dejavnikom *ompT* in filogenetsko skupino B₂ (preglednica 15).

Čeprav so živilski sevi veliko bolj občutljivi za protimikrobne učinkovine kakor humani in živalski izolati, se tudi med temi sevi povečuje delež odpornih sevov, zato smo delu priložili podatke o občutljivosti nekaterih sevov za protimikrobne snovi, ki so jih pripravili na IVZ – OMM. Iz preglednice 17 je razvidno, da so bili sevi *E. coli* najbolj odporni proti streptomycinu (15 %), amoksicilinu (14 %), ampicilinu (13 %), sulfonamidu (13 %), cefalotinu (11 %) in tetraciklinu (11 %). Najbolj intermediarno odporni so bili proti cefalotinu (51 %), amoksicilinu (37 %), streptomycinu (33 %), tetraciklinu (18 %), cefpodoksinu (15 %), ampicilinu (11 %) in sulfonamidu (10 %). Iskali smo tudi statistično značilno povezavo med odpornostjo in sevi iz različnih filogenetskih skupin, vendar je nismo mogli dokazati.

V okviru diplomskega dela smo tudi preverili prisotnost izbranih plazmidno-kodiranih determinant odpornosti proti kinolonom (PMQR), ker so lahko le-te prisotne, antibiogram odčitano po CLSI-standardih pa takšne seve opredeli kot občutljive. Pri nobenem sevu nismo ugotovili prisotnosti teh determinant.

6 SKLEPI

- V diplomskem delu smo ugotovili nekatere fenotipske in genotipske lastnosti 124-ih sevov iz zbirke IVZ – OSM iz let 2007 in 2008, identificiranih kot sevi vrste *E. coli*.
- Seve smo uvrstili v filogenetske skupine. Primarno jih je bilo 60 (48 %) uvrščenih v podskupino A₀.
- Po dodatni genotipski identifikaciji na podlagi analize delov genov za 16S rRNA smo ugotovili, da se je od teh 60-ih sevov 27 uvrstilo v rod *Buttiauxella*, 4 v rod *Leclercia*, po en sev v rod *Yersinia*, *Aeromonas*, enega seva nismo mogli identificirati, le 25 sevov pa je pripadalo vrsti *E. coli*.
- Po fenotipski in genotipski identifikaciji smo seve *E. coli* (n = 90) uvrstili v filogenetske skupine: 29 % sevov v podskupino A₀, 24 % sevov v podskupino A₁, 33 % sevov v skupino B₁, 1 % sevov v podskupino B₂, 1 % sevov v podskupino B₂, 7 % sevov v podskupino D₁ in 4 % sevov v podskupino D₂.
- Vsi sevi vrste *E. coli* so imeli gen *crl* za curlin in v 88 % primerih tudi gen *fimH*.
- Ugotovili smo statistično značilne povezave med virulentnimi dejavniki *hlyen*, *vtx2* in *eae* ter filogenetsko skupino B₁; med virulentnima dejavnikoma *vat* in *ompT* ter filogenetsko podskupino D₂ in med virulentnim dejavnikom *ompT* in filogenetsko skupino B₂.
- Sevi *E. coli* so bili najbolj odporni proti streptomycinu (15 %), amoksicilinu (14 %), ampicilinu (13 %), sulfonamidu (13 %), cefalotinu (11 %) in tetraciklinu (11 %).
- Največ sevov odpornih proti antibiotikom je bilo v skupini B₁ in podskupini D₂, manj jih je bilo v podskupinah B₂, D₁ in A₁, redko so bili odporni sevi iz podskupine A₀.
- Pri nobenem sevu nismo potrdili prisotnosti plazmidno-kodiranih determinant odpornosti proti kinolonom iz skupine *qnr*.

7 POVZETEK

Vsak človek ima naravno mikrobioto, ki naseljuje njegove sluznice in kožo in je s človekom v komenzalnem sožitju. Večina teh bakterij je neškodljivih in sodeluje pri razgradnji hrane in s tem pridobivanju hranil. Ena takšnih je bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*), ki večinoma ne povzroča okužb, če pa zaide izven prebavil in/ali ima virulentne dejavnike, lahko povzroča različne črevesne in zunajčrevesne okužbe. Vnos zunajčrevesnih sevov je možen tudi s hrano, zato so živila pomemben izvor sevov *E. coli*.

Ker so nas zanimale fenotipske in genotipske lastnosti sevov *E. coli*, ki se nahajajo v živilih, smo v diplomskem delu analizirali 124 sevov izoliranih iz vzorcev živil, identificiranih kot *E. coli*, z zbirke Inštituta za varovanje zdravja v Ljubljani, Oddelka za sanitarno mikrobiologijo (IVZ – OSM) iz let 2007 in 2008. Želeli smo ugotoviti njihovo uvrščanje v filogenetske skupine, prisotnost različnih virulentnih dejavnikov znotraj posameznih filogenetskih skupin ter prisotnost plazmidno-kodiranih determinant odpornosti proti kinolonom in tako opredeliti njihov virulentni potencial.

Najprej smo seve uvrstili v filogenetske skupine in podskupine po Clermontu. Ugotovili smo, da se je zelo veliko število sevov (48 %) uvrstilo v filogenetsko podskupino A₀. Po ponovni biokemijski identifikaciji na OMM so za tri seve ugotovili, da se niso uvrstili v vrsto *E. coli*.

Želeli smo potrditi, da so ostali sevi, ki so bili uvrščeni v filogenetsko podskupino A₀ pripadali vrsti *E. coli*, zato smo analizirali gen za 16S rRNA s programi BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ter Sequence Match in Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).

Te tri nevrščene seve smo uvrstili v rodove *Buttiauxella*, *Aeromonas* in *Yersinia*. Med sevi, prej uvrščenimi v filogenetsko podskupino A₀, smo identificirali 46 % sevov iz rodu *Buttiauxella*, 7 % sevov vrste *Leclercia adecarboxylata*, enega seva nismo mogli identificirati, ostalih 46 % sevov iz filogenetske podskupine A₀ pa smo dejansko uvrstili v vrsto *E. coli*.

V filogenetsko skupino A smo dejansko uvrstili 53 % vseh sevov *E. coli*, in sicer 29 % v podskupino A₀ in 24 % v podskupino A₁. V skupino B₁ smo jih uvrstili 33 %, v vsako od podskupin B₂₂ in B₂₃ 1 %, v podskupino D₁ 7 % in v podskupino D₂ 4 %.

Pri genotipizaciji teh sevov smo se odločili za genske zapise adhezinov (FimH, Sfa, Eae, Crl, Iha, Hra) in toksinov (enterohemolizin, α -hemolizin, CNF1, Sat, Vat, OmpT, Vtx1, Vtx2). Pri vseh sevih vrste *E. coli* smo zasledili gen *crl*, pri 88 % gen *fimH*. Ugotovili smo tudi statistično značilne povezave med virulentnimi dejavniki *hlyen*, *vtx2* in *eae* ter filogenetsko skupino B₁; med virulentnima dejavnikoma *vat* in *ompT* ter filogenetsko podskupino D₂ in med virulentnim dejavnikom *ompT* in filogenetsko skupino B₂.

Delu smo priložili podatke o občutljivosti nekaterih sevov za protimikrobne snovi, ki so jih pripravili na IVZ – OMM. In podatke analizirali. Sevi *E. coli* so bili najbolj odporni proti streptomycinu (14,5 %), amoksicilinu (14,3 %), ampicilinu (12,7 %), sulfonamidu (12,7 %), cefalotimu (11,4 %) in tetraciklinu (10,9 %).

Preverili smo tudi prisotnost izbranih plazmidno-kodiranih determinant odpornosti proti kinolonom (PMQR) in pri nobenem sevu nismo ugotovili prisotnosti teh determinant.

8 VIRI

- Antão E., Gürlebeck D., Ewers C., Wieler L. 2009^a. Signature-Tagged Mutagenesis in a Chicken Infection Model Leads to the Identification of a Novel Avian Pathogenic *Escherichia coli* Fimbrial Adhesin. PLoS One, 11, 4: e7769.
- Antão E., Wieler L., Ewers C. 2009^b. 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.
- 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.
- Barnhart M. M., Chapman M. R. 2006. Curli biogenesis and function. Annual review of microbiology, 60: 131–147.
- Boyd E. F., Hartl D. L. 1999. Analysis of the type 1 pilin gene cluster *fim* in *Salmonella*: its distinct evolutionary histories in the 5' and 3' regions. Journal of bacteriology, 181, 4: 1301–1308.
- 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.
- Captani G., Eidam O., Glockshuber R., Grütter M. G. 2006. Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. Microbes and infection, 8: 2284–2290.
- 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: 364–397.
- Cavaco L. M., Hasman H., Yia S., Aarestrup F. M. 2009. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enteritica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53, 2: 603–608.

- 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.
- Čitar M. 2010. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije.
- De Baere T., Wauters G., Kämpfer P., Labit C., Claeys G., Verschraegen G., Vaneechoutte M. 2002. Isolation of *Buttiauxella* from a spinal cord patient with urinary bladder pathology. *Journal of clinical microbiology*, 40, 10: 3867–3870.
- DuPont H. L. 2007. The growing threat of foodborne bacterial enteropathogens of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*, 45: 1353–1361.
- Fihman V., Rottman M., Benzerara Y., Delisle F., Labia R., Philippon A., Arlet G. 2002. BUT-1: a new member in the chromosomal inducible class C beta-lactamases family from a clinical isolate of *Buttiauxella* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 213, 1: 103–111.
- Fröhlich J., Baljer G., Menge C. 2009. Maternally and naturally acquired antibodies to shiga toxins in a cohort of calves shedding shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 75, 11: 395–3704.
- 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.
- 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.
- Guyer D. M., Henderson I. R., Nataro P. J., Mobley H. L. 2000. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 38, 1: 53–66.
- 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.

- Hicks R., Amann R. I., Stahl D. A. 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescens. *Applied and environmental microbiology*, 58: 2158–2163.
- Holden N. J., Gally D. L. 2004. Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *Journal of medical microbiology*, 54: 585–593.
- Johnson J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology reviews*, 4, 1: 80–128.
- Johnson J. R., Jelacic S., Schoening L. M., Clabots C., Shaikh N., Mobley H. L. T., Tarr P. I. 2005. The IrgA homologue 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., Kuskowski M. A., Nougayrede J. P., Oswald E. 2008. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* *pks* genomic island. *Journal of clinical microbiology*, 46, 12: 3906–3911.
- Johnson J. R., McCabe J. S., White D. G., Johnston B., Kuskowski M. A., McDermott P. 2009. Molecular analysis of *Escherichia coli* from retail meats (2002-2004) from the United States National Antimicrobial Resistance Monitoring System. *Clinical infectious diseases*, 49: 195–201.
- Johnson J. R., Russo T. A., Tarr P. I., Carlino U., Bilge S. S., Vary J. C. Jr., Stell A. L. 2000. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iron*(*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infection and immunity*, 68: 3040–3047.
- Johnson T., Wannemuehler Y., Johnson S., Nolan L. 2008. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Applied and environmental microbiology*, 74, 22: 7043–7050.
- Karmali M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 2, 1: 15–38.
- Karmali M. A., Gannon V., Sargeant J. M. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary microbiology*, 140: 360–370.
- Kostakioti M., Stathopoulos C. 2004. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and immunity*, 72, 10: 5548–5554.

- Le Bouguenec C. 2005. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. International journal of medical microbiology, 295: 471–478.
- LeBlanc J. J. 2003. Implication of virulence faktors in *Escherichia coli* O157:H7 pathogenesis. Critical reviews in microbiology, 29, 4: 277–296.
- 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.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th edition. Upper Saddle River, Prentice-Hall international
- 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.
- Müller H. E., Brenner D. J., Fanning G. R., Grimont P. A. D., Kämpfer P. 1996. Emended description of *Buttiauxella agrestis* with recognition of six new species of *Buttiauxella* and two new species of *Kluyvera*: *Buttiauxella ferragutiae* sp. nov., *Buttiauxella gaviniae* sp. nov., *Buttiauxella brennerae* sp. nov., *Buttiauxella izardii* sp. nov., *Buttiauxella noackiae* sp. nov., *Buttiauxella warmboldiae* sp. nov., *Kluyvera cochleae* sp. nov., and *Kluyvera georgiana* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 46, 1: 50–63.
- Mulvey M. A. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. Cellular microbiology, 4, 5: 257–271.
- Nataro J. P., Kaper J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical microbiology reviews, 11, 1: 142–201.
- Nisan I., Wolff C., Hanski E., Rosenshine I. 1998. Interaction of enteropathogenic *Escherichia coli* with host epithelial cells. Folia Microbiologica (Praha), 43, 3: 247–252.
- Ochoa T., Barletta F., Contreras C., Mercado E. 2000. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Tropical medicine and hygiene, 102, 9: 852–856.

- Olsen G. J., Lane D. J., Giovannoni S. J., Pace N. R., Stahl D. A. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual review of microbiology*, 40: 337–365.
- Parham N. J., Pollard S. J., Desvaux M., Scott-Tucker A., Liu C., Fivian A., Henderson I. R. 2005. Distribution of serine protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae* among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, 43, 8: 4076–4082.
- Park J. W., Oh Y. S., Lim J. Y., Roh D. H. 2006. Isolation and characterization of cold-adapted strains producing β -galactosidase. *The Journal of Microbiology*, 44, 4: 396–402.
- Picard B., Garcia J. S., Gouriou S., Duriez P., Brahim 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.
- 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.
- Ruiz J., Simon K., Horcajada J. P., Velasco M., Barranco M., Roig G., Moreno-Martinez A., Martinez J. A., Jimenez de Anta T., Mensa J., Vila J. 2002. Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *Journal of clinical microbiology*, 40: 4445–4449.
- 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.
- Spröer C., Mendrock U., Swiderski J., Lang E., Stackebrandt E. 1999. The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1433–1438.
- Stephan R., Schumacher S., Corti S., Krause G., Danuser J., Beutin L. 2008. Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *Journal of dairy science*, 91: 2561–2565.

- Stock I., Burak S., Wiedemann B. 2004. Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical profiles of *Leclercia adecarboxylata* strains. *Clinical Microbiology Infection*, 10: 724–733.
- Torres A. G., Zhou X., Kaper J. B. 2005. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infection and immunity*, 73, 1: 18–29.
- Trkov M., Berce I., Dovečar D., Grilc E., Bujko M., Kraigher A. 2008. Odkrivanje nekaterih genov, povezanih z virulenco, pri sevih *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe. *Zdravstveno varstvo*, 47: 81–88.
- Vallance B., Finlay B. 2000. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 97, 16: 8799–8806.
- Wang M., Guo Q., Xu X., Wang W., Ye Xinyu, Wu S., Hooper D. C., Wang M. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35, 5: 1892–1899.
- Wiles T., Kulesus R., Mulvey M. 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and molecular pathology*, 85, 1: 11–19.
- 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.
- Yarza P., Richter M., Peplies J., Euzéby J., Amann R., Schleifer K. H., Ludwig W., Glöckner F. O., Rossello-Mora R. 2008. The all-species living tree (Release LTP_s100). *System appl microbiol*, 31: 241–250.
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (9. december, 2009)
- <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp> (9. december, 2009)
- <http://www.bfro.uni-lj.si/gost/smd/mikroslo/> (23. april, 2010)
- http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway?ece05130+Z5110 (15. maj, 2010)
- <http://www.gov.si/mz-splet.nsf> (21. april, 2010)
- <http://www.mkgp.gov.si/index.php> (21. april, 2010)

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin za vodenje pri delu in veliko mero prilagodljivosti. Pod njenim vodstvom sem ob delu v laboratoriju zares uživala.

Zahvaljujem se recenzentki, prof. dr. Darji Žgur-Bertok, in predsednici komisije, doc. dr. Marjanci Starčič Erjavec, ki sta mi z izjemno hitro recenzijo diplomskega dela omogočili tako hitro zagovarjanje diplomskega dela.

Hvala vsem zaposlenim na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, ki so mi kadarkoli priskočili na pomoč, še posebej dr. Zdravku Podlesku in Gregorju Bajcu.

Najlepša hvala tudi Brigiti Nograšek, Idi Istinič in Moniki Primon za pomoč v laboratoriju in moralno podporo.

Za zbirko sevov in sodelovanje pri izvedbi dodatnih testov se zahvaljujem dr. Minki Trkov z Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije.

Za finančno in moralno podporo se zahvaljujem družini. Za motivacijo, pomoč in potrpljenje med študijem se najlepše zahvaljujem fantu Blažu. Hvala tudi vsem prijateljem, ki so mi v času študija stali ob strani, še posebej Moniki Hribar za njeno vztrajnost in motivacijo.

PRILOGE

PRILOGA A: Nukleotidna zaporedja pomnožkov PCR dobljenih z začetnima oligonukleotidoma Fd1 in 1392. Navedena sta zaporedna številka izolata ter začetni oligonukleotid, s katerim je bilo ugotovljeno nukleotidno zaporedje (v oklepaju). Nukleotidov označenih s črko N se ni dalo določiti.

0701 (Fd1)

GCAGGCCTNACNCATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGC
TAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGC
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTA
CCCGCAAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGCAAAGTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAAT
TCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT
GGACAAAGACTGACGCTCANGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACG
CGTTAAGTCGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAATGAATTGACGGGGCC
CGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAA

0702 (Fd1)

GGGGGGCGGCCTACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGT
GGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGT
AGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGAT
GTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGG
TCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC
TTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGAC
GTTACCCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCA
AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAA
TCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGCAAAGTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGT
AGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGC
CCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGC
TAACCGGTTAAGTCGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAATGAATTGANN
GGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTATTTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTA

0705 (Fd1)

CCGGCAGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTG
GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTA
GCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGT
GCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGGCAGGATCCCTAGCTGGTC
TGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTT
CGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGT
TACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCC
CCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGCAAAGTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGA
ATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC
CTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAA
CGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGG
GCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGNTTAATTCGATGCACGCGAGA

0706 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

GCTACCATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGAAGCTTGGTCTGGGTGACAAGCGGCGGACGGGT
GAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCG
CATAACGTCCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCTCATGTGCCCCATGG
GATTATCTAGTAGGTGAGGTAATGGGTCACCTATGCGACAATCCCTATCTGGGCTGAGAGGATG
ACCACCCCACTGGAAGTACGACACGGTCCACACTCCTACGGGAGGGGGCAGTGGGGAATATT
GCGCAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCCTGCCCGCGTGTAAAAAAGCCTTCTGGTTGTAAA
GAACCTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCGCAGAA
GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
CCTGGGAACTGCATTGCAAAGTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAG
ACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGT
CGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGA
GAATTCGCTAGAGATACCTTAGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTC
AGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCA
GCGGTTTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACG
TCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGA
AGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAA
CTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCT

0707 (Fd1)

CGCAGGCTACCATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTA
ATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCC
AGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACAATCCCTAGCTGGTCTGAG
AGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACT
CGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCG
GGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATT
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG
GACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTANACGATGTGCGACTTGTAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGC
GTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC
CGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCACGCGAAAACCTTACCTAC

0708 (Fd1)

CGGCAGCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAGTAGTTACTACTTTGCCGGCGAGCG
GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTA
GCTAATACCGCATGACCTCGTAAGAGCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCGGATGT
GCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTC
TGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTT
CGGGTTGTAAGCACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGCAATCGTGTTAATAGCACGATTGATTGACGT
TACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCC
CCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGA
ATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC
CTGGACAAAGACTGACGCTCANGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCTGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAA
CGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACCGGG
GCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGACCTTA

0709 (Fd1)

GGGCAGCTACACATGCAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGG
ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTA
ATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCC
AGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGA
GAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG
GTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGCGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTAC
CCGCAAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAAT
TCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT
GGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACG
CGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC
CGACAAGCGGTGGAGCATGGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAGANCTTACCTACTC

0714 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

CGGCTACCATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGG
GTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATAC
CGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTTGCCATCAGATGTGCCAGAT
GGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACAATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG
ATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAAAAGGCCTTCGGGTTGT
AAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCGCA
GAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCCGATGTGAAATCCCCGGGCT
CAACCTGGGAACTGCATTGCAAAGTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACA
AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTA
AGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCC
ACAGAATTCGGTAGAGATACCTTAGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGC
CAGCGTTCCGGCCGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCAATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACAGTGTCTACAATGGCGCATACAAAGA
GAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCCGGAGTCTGC
AACTCGACTCCGTGAAGTCCGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATG

0715 (1392)

TAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATC
CGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCA
TTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTC
CAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCTCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGT
TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCAACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACC
TGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACTAAGCTATCTCTAGCGAATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGT
AAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
CATTGAGTTTTAACCTTTCGGCCGTAATCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAA
GCCACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT
AATCCTGTTTGCCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGC
CACCAGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACA
AGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACT
TGACAGACCGCCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGCACCCCTCCGTTAT
ACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGCTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAATCACTGCGGTT
ATTAACCACATTGCCTTCCTCCTCGCTGAAGGTA

0716 (Fd1)

GCGGGCTACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAAGTAGCTTGCTACTTTTGC CGGGGAGCG
GCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGTCGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTA
GCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGGATG
AACCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGT
CTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCT
TCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGAC
GTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCA
AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAA
GCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAAAGTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTA
GAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC
CCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGTTCGATTTGGAGGCTGTGTCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCT
AACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGG
GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAC

0720 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

GGCACGGCTAAACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTG
GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTA
GCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTTGGCCATCGGATGT
GCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTC
TGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTT
CGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGT
TACCCGCAAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAG
CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCC
CCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGA
ATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC
CTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGTTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAA
CGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGG
GCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTT
GACATCCACGGAAGTTTTAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATC
CTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCA
TACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTG
GAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAGAATG

0724 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

CGGCGGCTACACATGCAAGTCGAACGGTAAACAGGAAACAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG
CTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTG
CCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
GAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTC
GGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTT
ACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAA
TTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCC
TGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAAC
GCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTG
ACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCAT
GGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCC
TTTGTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGT
GGGATGACGTAAGTCATCATGACCCTTACGACCAGGGCTACACACGCTACAATGGCGCAT
ACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGG
AGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCC

0725 (Fd1)

GCTACCATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACAAGCGGCGGACGGGT
GAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCG
CATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGG
GATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACAATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATG
ACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCATGCCGCGTGTATGAAAAAGGCCTTCGGGTTGTAA
AGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCGCAGA
AAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCA
ACCTGGGAACTGCATTCTAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGGACA
AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCG
TTAAGTCGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAAATTGACGGGGG
GCCCCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAGAAC

0726 (Fd1)

GCTACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGG
GTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATAC
CGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGGCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGAT
GGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACAATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG
ATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAAT
ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT
AAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCGCA
GAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCCGATGTGAAATCCCCGGGCT
CAACCTGGGAACTGCATTGCAAAGTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGAC
AAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCGGGAGCTAACGCG
TTAAGTCGACCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAATGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGCAGAA

0727 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

AGGCTAACCATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAACAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGA
CGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAA
TACCGCATAACGTGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGGCTCTTGCCATCGGATGTGCCA
GATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAG
AGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACC
CGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCG
GGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTC
CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGG
ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGGAGCTAACGCG
TTAAGTCGACCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACA
TCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTGAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGT
TGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAA
GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGATTGGAGTCT
GCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCA

0729 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

CGGAGACTACCATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGGTCCTGGGTGACAAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGGAGCTAA
TACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCTCATGTGCCCA
GATGGGATTAGCTATTAGGTGAGGTAATGGGTCTCCTATGCGACAATCCCTAGCTGGGCTGAGA
GGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCACACTCCTACGGGAGGGGGCAGTGGGA
ATATTGCGCAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCATGCCGCGTGTGTGAAAAAAGCCTTCGGGTT
GTAAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATGTGGTTAATACCGCAGTGATGACGTTACTCGCA
GAAGAAGCACCGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGGCAAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTTCGAGATGTGAAATCCCCGGGC
TCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCA
GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGAC
AAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTT
AAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGC
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATC
CAGAGAATTCGCTAGAGATAGCTTAGTGCCTTCGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTG
CCAGCGTTCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAG
AGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTG
CAACTCGACTCCGCGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAGAGT

0732 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

GCGGCAGCTACCATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGGTCCTGGGTGACAAGCGGCGG
ACGGGTGAGAAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGGAAACGGTAGCTA
ATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCGATCTCATGTGCC
CCATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGGTACCTATGCGACAATCCCTAGCTGGGCTGAG
AGGATGACCACCCCACTGGAAGTGAAGACACGGTCCCACTCCTCCGGGAGGCGGCAGTGGGG
AATATTGCGCAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCATGCCGCGTGTATAAAAAAAGCCTTCTGGT
TGTAAGAAGTCTTCCGAGGAGGAAAGGGTTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTC
GCAGAAGAAGCACCGGCTACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAA
TCGGAATTAAGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTTCGGATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCC
AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGA
CAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGT
TAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACAT
CCAGAGAATTCGCTAGAGATAGCTTAGTGCCTTCGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTG
TCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTT
GCCAGCGTTCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAA
GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCGGAGTCT
GCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCT

0734 (Fd1)

GCCGGCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACAAGCGGCG
GACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCT
AATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCC
CAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACAATCCCTAGCTGGTCTGA
GAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG
GTTGTAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTAC
TCGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGCAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAAT
TCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT
GGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACG
CGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACAGCCGCAAGGTGATAAACTCAAATGAATTGACACGGG
GCCCCACAAGCGGTGGGAGCATGTGTTTTATTTCTATGCAACGCGAAGAACC

0736 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

GGCGGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGC
TAATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGC
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACAATCCCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTA
CTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGAGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGCAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAA
TTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCC
TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAAC
GCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTG
ACATCCACAGAATTCGGTAGAGATACCTTAGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATG
GCTGTGTCAGCTCGTGTGTTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTT
TGTTGCCAGCGGTTTCGGCCGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAAC
AAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTGCTAGTCCGGATCGGAG
TCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCT

0739 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

GGCAGGACTACNCATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAACAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTG
GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTA
GCTAATACCGCATAACGTTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGT
GCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTC
TGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTT
CGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGT
TACCCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAG
CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCC
CCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGA
ATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC
CTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAA
CGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGG
GCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTT
GACATCCACGGAAGTTTTAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTCAGTCGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATC
CTTTGTTGCCAGCGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGG
TGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCA
TACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTG
GAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGNGATCAGAAGCC

0740 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

GACTAACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGA
CGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAA
TACCGCATAACGTTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCA
GATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAG
AGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACC
CGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCG
GGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTC
CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGG
ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCG
TTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACA
TCCACGGAAGTTTTAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGT
TGCCAGCGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAA
GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCT
GCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATG

0741 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

CTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGG
GTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATAC
CGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGA
TGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAG
GATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTG
TAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGC
AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCT
CAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACG
AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTA
AGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCC
ACGGAAGTTTTAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTG
CAGCGTCCGGCCGGGAACCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCACTGAGCCCTTACGACCAGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAG
AGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTG
CAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCC

0742 (Fd1)

CATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAACAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAG
TAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCAT
AACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGA
TTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC
CAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGC
ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG
TACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAG
AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAA
TTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACC
TGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACT
GACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGA
CCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCAACAAGCG
GTGGAGCATGTGTTTANTCGATGCACGCGAGACCTTACCTGGTCTTG

0744 (Fd1)

GCTACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGG
GTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATAC
CGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTTTGCCATCAGATGTGCCAGAT
GGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG
ATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAAT
ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT
AAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCGCA
GAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCT
CAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACA
AAGACTGACGCTCACGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTTCTCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTA
AGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCGCAAGGTTAAACTCAATGAATTGACGGGGGCCGACAA
CGGTTGAGCATGTNNNTATTCGATGCAACGCGAGAACCCTTACTACTCTTGA

0745 (Fd1)

CGGCAGCTAACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAATCAGCTTGCTGCATTCGCTGACGAGT
GGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGT
AGCTAATACCGCATAACGTGCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTTTGCCATCGGAT
GTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTG
GTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGC
CTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGA
CGTTACCCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC
AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAA
ATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGT
AGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGC
CCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACCGGTAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGC
TAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCACGCGAAGA

0746 (Fd1)

TTGCGGAGCTACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACAAGCGG
CGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG
CTAATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTTTGCCATCAGATGTG
CCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACAATCCCTAGCTGGTCT
GAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCATGCCGCGTGTATGAAAAAGGCCTTC
GGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTT
ACTCGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAA
TTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAAGCGGCCCCC
TGGACAAAGACTGACGCTCACGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTTTCTCCTTGAGGAGTGGCTTCCNGAGCTA
CGCGTTAANTCGACCGCCCTGGGGAGNACGGCCNCNNGGTTAAACTCAATGAATNACGGGGGC
CCGACAGCGTNNNCATGTGTTTAATTCGATGCACNCGAGAACCCTTACTACTCTGAC

0747 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

CGGCTACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAA
TACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCA
GATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACAATCCCTAGCTGGTCTGAGA
GGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAAAAGGCCTTCGGGTT
GTAAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCG
CAGAAAAACACCGGCTAACTCCGTGCCACCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACTGCATTGCAAAGTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCC
AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGA
CAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGTTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGT
TAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACAT
CCACAGAATTCGGTAGAGATACCTTAGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTG
TCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTT
GCCAGCGGTTCCGGCCGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATTGGCGCATACAAA
GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCT
GCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCT

0748 (Fd1)

GGCCTACCATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGACG
GGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATA
CCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCCCA
TGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGGTACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAG
GATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTG
TAAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCGC
AGAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGC
TCAACCTGGGAACTGCATTGCAAAGTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCA
GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGAC
AAAGACTGACGCTCACGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTT
AAGTCGACCGCCTGGGGGAGTACAGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACNGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTATTCGATGCACGCGAAGAACCCT

0749 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

GACTACCATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGGACGGG
TGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACC
GCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATG
GGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA
AAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCGCAG
AAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTC
AACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAAGCGGCCCCCTGGACAA
AGACTGACGCTCACGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTTTCTCTTGAGGAGTGGCTTCTGGAGCTAACGCGTTA
AGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAATGAATTGACGGGGGCCGCACA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGA
GAATTCGCTAGAGATAGCTTAGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTC
AGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCA
GCGGTTTCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACG
TCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGA
AGCGACCTCGCGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAA
CTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTA

0750 (Fd1)

GGCGGACTAACCATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGG
GGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG
CTAATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTG
CCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
GAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTC
GGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCTTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTT
ACTCGAAAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCAGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAA
TTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCC
TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGANGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAAC
GCGTTAAGTCGACCGCCTGGAGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTATTTTCGATGCAACGCGAAACCTT

0751 (Fd1)

AGCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGAC
GGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAAT
ACCGCATAACGTTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCA
GATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAG
AGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACC
CGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCG
GGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTC
CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGG
ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTC
CACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGGAGCTAACCGC
TTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG

0752 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

GCTACCATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGAGAAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGGCGGACG
GGTGAGTAGTGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATA
CCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGA
TGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG
ATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT
AAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCGCA
GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGTGCAAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGCT
CAACCTGGGAACTGCATTTCGACACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACA
AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCGGGAGCTAACGCGTTA
AGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCC
AGAGAATTCGCTAGAGATACTTAGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGC
CAGCGGTTTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGA
GAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTGCTAGTCCGGATCGGAGTCTGC
AACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTA

0754 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

GCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAACAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACG
GGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATA
CCGCATAACGTGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAG
ATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA
GGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGA
ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTT
GTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG
CAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGC
TCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACG
AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTA
AGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCC
ACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTG
CAGCGTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAA
AGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTG
CAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCA

0755 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

AGCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGAC
GGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAAT
ACCGCATAACGTGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCA
GATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAG
AGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACC
CGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCG
GGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATT
CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGG
ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCG
TTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACA
TCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGT
TGCCAGCGTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAA
GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCT
GCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCC

0756 (Fd1)

GGCGGCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCG
GACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCT
AATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGC
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTA
CCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATT
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG
GACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGC
GTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC
CGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACC

0759 (Fd1)

GGCAGCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG
CTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTG
CCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
GAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTC
GGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTT
ACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAA
TTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCC
TGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAAC
GCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGACCTTACCTGG

0760 (Fd1)

CTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAATCAGCTTGCTGATTGCTGACGAGTGGCGGACGG
GTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATAC
CGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGA
TGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAG
GATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTG
TAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGC
AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCT
CAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACG
AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGTGCGACTTGNAGGTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAG
TCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAA
GCGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACTGTCT

0762 (Fd1)

GGCAGCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAATCAGCTTGCTGCATTTCGCTGACGAGTGCC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGC
TAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGCCTCTTGCCATCGGATGTGC
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTA
CCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATT
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG
GACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGC
GTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACC

0768 (Fd1)

GGCAGCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTTGCTTCGCTGACGAGTGCC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGC
TAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGCCTCTTGCCATCGGATGTGC
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTA
CCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATT
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG
GACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGC
GTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC
CGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAGAACCCTTACCT

0805 (1392)

ATAGCTTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGGCGAGTTGCAGACTCCGATC
CGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCA
TTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCCTC
CAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGT
TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCAACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACC
TGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACTAAGCTATCTCTAGCGAATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGT
AAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
CATTTGAGTTTTAAACCTTTCGCGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAA
GCCACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT
AATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGC
CACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACA
AGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACT
TGACAGACCGCCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTA
CCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTCTTCTCTGCGAGTAACGTCAATCACTGCGGTTA
TTAACCACAATGCCTTCTCCTCGCTGAAGTACTTTA

0807 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

CAGGCCTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGC
TAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGAA
CCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
GAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTC
GGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATACGGTTAATAACCGTGTGCGATTGACGTT
ACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCCGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATCCGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGATAGAGGGGGGTAGAA
TTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCC
TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAAC
GCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTG
ACATCCACAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGTGAGACAGGTGCTGCATG
GCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTT
TGTGTCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCGAAGTCATGCGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGTACAATGGCGCATAAC
AAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAG
TCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAGAATGCC

0810 (Fd1)

AGCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAACAGCTTGCTGTTTTGCTGACGAGTGGCGGAC
GGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAAT
ACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCA
GATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAG
AGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACC
CGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCG
GGCTCAACCTGGGAACCTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAAATC
CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGG
ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGG
TTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGC
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTATTCGATGCAACGCGAAGACCTTACCTGGTCT

0814 (Fd1)

CTACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGT
GAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCG
CATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGG
GATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATG
ACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA
AGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCGCAGA
AGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCCGATGTGAAATCCCCGGGCTCA
ACCTGGGAACTGCATTGCAAAGTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAA
GACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAG
TCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTAC

0816 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

GGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAA
TACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCA
GATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA
GGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTT
GTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCG
CAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCCGATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACTGCATTGCAAAGTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCC
AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGA
CAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGT
TAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACAT
CCAGAGAATTCGCTAGAGATAGCTTAGTGCCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTG
TCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTT
GCCAGCGGTTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAAAA
GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCGGAGTCT
GCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTAT

0817 (Fd1)

CGGCAGCTACCATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACAAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTA
ATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCACATGTGCC
AGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACAATCCCTAGCTGGTCTGAG
AGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCATGCCGCGTGTATGAAAAAGGCCTTCGGGT
TGTAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTC
GCAGAAAAACACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTA
ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGG
GCTCAACCTGGGAACTGCATTCTAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTC
AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTATAGATCTGGAGGAATAACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGA
CAAAGACTGACGCTCACGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGT
TAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCANGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGC
ACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAGAA

0818 (Fd1)

CTAACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGG
TGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACC
GCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATG
GGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA
AAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCGCAG
AAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCG
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTC
AACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGG
TGTAGCGGTGAAATGCGTATAGATCTGGAGGAATAACCGGTGGCGAAGCGGCCCCCTGGACAA
AGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCCGAGCTAACGCGTTAA
GTCGACCGCCTGGGGAGTACAGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA

0819 (Fd1)

ATGGCGCAGCTACCATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGC
TAATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGC
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACAATCCCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTA
CTCGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAAT
TCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT
GGACAAAGACTGACGCTCACGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGGAG
TCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACG
CGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGC
CCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAGAA

0820 (Fd1)

AGCTACCATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGNAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGGCGGACGGG
TGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACC
GCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATG
GGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACAATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA
AAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCGCAG
AAAAAACACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTC
AACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAAGAGGGGGGTAGAATTCAGG
TGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAA
AGACTGACGCTCACGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAANCCTAAG
TCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACA
CGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAGAACCTTACCTACTTCT

0824 (Fd1)

GGCGGCAGCTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGT
GGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGT
AGCTAATACCGCATAACGTGCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGAT
GTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTG
GTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGC
CTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGA
CGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC
AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAA
ATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGT
AGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGC
CCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCTCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGC
TAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACG
GGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGNTTAATTCGATGCAACGCGAAGA

0825 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

GCAGCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGG
ACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTA
ATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCC
AGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGA
GAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG
GTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTAC
CCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCCGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCG
GGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTC
CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGG
ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTC
CACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGGAGCTAACGCG
TTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACA
TCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGT
TGCCAGCGTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAGTCATCATGCCCCTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATTGGCGCATAAAA
GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCT
GCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGC

0828 (Fd1)

GGCGGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCG
GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTA
GCTAATACCGCATAACGTCCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGT
GCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTC
TGAGAGGATGACCACCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTT
CGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGT
TACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAG
CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACCGCAGGCGGTCTGTCAAGTCAGATGTGAAATCC
CCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGCAAAGTGGCANGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGA
ATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCT
CTGGACAAAGACTGACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACTCTGGT
AGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGGATGTTGTTCCCGTGAGGAGTGTCTTCCGAGAGCT
AACGCGTCAACTCGACCGCCTGGGAGAGTACGCGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGAC
GGGCGCCCCGACAAGNGGAGCATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAATC

0830 (Fd1)

GGGCAGCTACCATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAA
TACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCA
GATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA
GGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTT
GTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCG
CAGAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCC
AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGA
CAAAGACTGACGCTCACGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGAGTCCA
CGCCGTAAACGATGTCTACTTGTAGGTTGTTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAAGCGTT
AAGTCGACCGCCCTGGGGAGTACGGCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGC
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTATTCGATGCAACGCGAGAACCTTACCTACTCTC

0831 (Fd1)

GCTACCATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGGCGGACG
GGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATA
CCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGA
TGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG
ATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT
AAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCGCA
AAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCT
CAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACA
AAGACTGACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAAGAGTGTCTTCCAGAGCTAACGCGTTA
AGTCCACCGCCTGGGGAGTACGCCGAGGTTAAACTCATATGAATTGACGGGGGCCCGCANAG
CGGTGGAGCATGTGTTTATTCGATGCAACGCGAAGACCTTACCTACTCGTGA

0833 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

CGGCAGCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGC
TAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGC
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTAAATACCTTTGCTCATTGACGTTA
CCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATT
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG
GACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGC
GTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC
CGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGAC
ATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGG
CTGTTCGTGAGTTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTT
GTTGCCAGCGGTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACA
AAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGT
CTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCA

0845 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

GGCAGCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAAGTGGC
GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGC
TAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGC
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTAAATACCTTTGCTCATTGACGTTA
CCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGGTAGAA
TTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCC
TGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAAC
GCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGG
CCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTG
ACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCAT
GGCTGTTCGTGAGTTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCC
TTTGTGCCAGCGGTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAGTCAATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCAT
ACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGG
AGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCA

0846 (Fd1)

CGGCAGGCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG
CTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTG
CCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
GAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTC
GGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTT
ACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAA
TTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCC
TGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAAC
GCGTTAAGTCGACCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGC
CCGACAAGCGGTGGAGCATGTGTTTTATTTCGATGCAACGCGAAGACCTTACCT

0847 (Fd1)

GGCAGCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG
CTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTG
CCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
GAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTC
GGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTT
ACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAA
TTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCC
TGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAAC
GCGTTAAGTCGACCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCC
CGACAAGCGGTGAGCATGTGTTTTATTTCGATGCAACGCGAACAACCTTACC

0848 (Fd1)

GGGGCGGCAGCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAG
TGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGG
TAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGAT
GTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTG
GTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGC
CTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGA
CGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC
AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAA
ATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGT
AGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGC
CCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGC
TAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACG
GGGCCCGCACAAAGCGTGGAGCATGTGNTTAATTCGATGCAACGCGAAGAAC

0850 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

AGGCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCG
GACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCT
AATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGC
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTA
CCCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATT
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG
GACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGC
GTTAAGTCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC
CGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGAC
ATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGG
CTGTTCGTACGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTT
GTTGCCAGCGCTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAGTCAATGGCCCTTACGACCAGGCTACACACGTGTACATAAAGTGGCGCATAACA
AAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGT
CTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGNGATCAGAATGCC

0851 (Fd1)

GCGGCAGCTACACATGCAAGTCGAACGGTAAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTG
GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTA
GCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGT
GCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTC
TGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTT
CGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGT
TACCCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCC
CCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGA
ATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC
CTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAA
CGCGTTAAGTCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGG
GCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAC

0852 (Fd1)

GCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGAAGCTTGGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGAC
GGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAAT
ACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCA
GATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAG
AGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACC
CGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCG
GGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTC
CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGG
ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTC
CACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGGAGCTAACCGG
TTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGGTGGTTTATTCGATGCAACGCGAGANNTACCTGGTC

0854 (sestavljeno zaporedje; Fd1, 1392)

GCTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAACAGCTTGCTGTTTTGCTGACGAGTGGCGGAC
GGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAAT
ACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCA
GATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAG
AGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACC
CGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCG
GGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTC
CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGG
ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTC
CACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGGAGCTAACCGG
TTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACA
TCCACAGAACTTTTCAGAGATGGGAAGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTGAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGT
TGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAA
GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCT
GCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATG

PRILOGA B: Nukleotidna zaporedja pomnožkov PCR dobljenih z začetnima oligonukleotidoma vtx2F in vtx2R. Navedena sta zaporedna številka izolata ter začetni oligonukleotid, s katerim je bilo ugotovljeno nukleotidno zaporedje (v oklepaju). Nukleotidov označenih s črko N se ni dalo določiti.

0710 (vtx2)

CTCTTATTCCGGCGCGACAGAACGCGCCCCCTGATGATGGCAATTCAGTATAACGGCCACAGTA
CCCAGTATCGCTGATATATTATTAAGGATATTCTCCCCACTCTGACACCATCCTCTCCCCGATA
CTCCGGAAGCACATTGCTGATTGCCCCAGTTCAGAGTGAGGTCCACGTCCTCCCGGCGTCATC
GTATACACAGGAGCAGTTTCAGACAGTGCCTGACGAAATTCTCTCTGTATCTGCCTGAAGCGTA
AGGCTTCTGCTGTGACAGTGACAAAACGCGAAGTCTGCTCTGGATGCATCTCTGGTCATTGTATT
ACCACTGAACTCCATTAACGCCAGATATGATGAAACCAGTGAGTGACGACTGTTTGCATTCCAA
CCTTTTACGACTTGTGATCATCAAGTAAGCGAAATAATTCTTCATCATTTAGTTTCTTACATTG
ATTATTACAACCCTACTCACTTCTTGCCTATATTTTCTGGTATGACTATGACCATCCTCGGAACC
AACATCAAGGGCTATCTTTTTTATAGTTTGACTGTCTGGAGTGACGACTGATTTGCATTCCAAN
AGCCCGGCAGCATTGAGTTTCGGTCTTTTTGATGGACCCTGCCCTTCTTTCAGACCAACTATAT
ATTCCGGTACAGACGCGCGCCCCGCCGTCCTCCATAATAACAAAACACCGGNCCCCCTAACCCCC
ATTCCAAACAGATCACCTCCGCTCGCACTGTTTTTTTTTCTCCTTTACTCTCTGGGCGTTTTAGT
CAGATCACTTTCCGCCCCGCTCCCTCCTCCCTCTCACTTGCCAAGGCTCTGCTTGTCTTTCAGA
CCCAATTCCCCCCCCCTCCGTAATACCACTCCCTTTAATAATTCATATTCCTCCCGAGTCATCTTA
ATCCCTCACAAACCACGTATTCTGTTTTTCTTCC

0764 (vtx2)

CTCTCTCCGGCGCGACGGAACGCGCCCCCTGATGATGGCAATTCAGTATAACCGCCACTGTGC
CCAGTATCGCTGATATATTATTAAGGATATTCGCCCCACTCTGACACCACCCTCTCCCCGAAAC
TCCGGAAGCACATTGCTGATTCTCCCCAGTTCAGTGTGAGGTCTACTTCTTCCGGTGTTCATCGT
ATACACAGGAGCAGTTTCAGACAGTGCCTGACGAAATTCTCTCTGTATCTGCCTGAAGCGTAAG
GCTTCTGCTGTGACAGTGACAAAACGCGAAGTCTGCTCTGGATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC
CACTGAACTCCATTAACGCCAGATATGATGAAACCAGTGAGTGACGACTGTTTGCATTCCCATG
TTGAGTCCGGAGTCTGCCGCTCTCCCTTCAAAGTTCTAGCTTATTTGGGACCTCTCACATTTCCG
GAGCATTACGCCACACCTGGTAAAAAAAGTCTACAACCTCCACAAAATTTTTCAAGAAATTTA
GCAATGTGGCAGTCATTAAANAAAAAGGATCTATTTGTTCCCCACGCCGAACAGTCTATATA
ACCCCGCAGCATGCCCGTTCTGACAATTAATAAACTACCTCTTTTCTCAGACCTCACCTCAC
GCTTAGACATACGCGAGCGCGCTGTCACGCCCTAATATGATAGCCGCCGCCCTAGCTCCACT
ACAACCAAATCACCTCCGCTACTTCTTTTTAATTTCTACCTTACTCTACATCATTACATGTAG
ACGACTCCCACCGCTGTCGTCCTCTATAGCCANTGCTATGCATCTCGATGTCTTTCAGTACCAGTA
CTACTCGTCGCTATCTTCCCTCGCATATAACGATCATAGTCATGCCGTAATTCTGAATGCCGTC
AAACAGTAATCTAGNNTGCGTAACCTCNTAACATCTTAA