

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tanja ARBITER

**ZAPISI ZA SISTEME PRIVZEMA ŽELEZA IN OTOKE PATOGENOSTI
V KONJUGATIVNIH PLAZMIDIH IZVENČREVESNIH SEVOV
*Escherichia coli***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IRON-UPTAKE SYSTEMS AND PATHOGENICITY ISLANDS ON
CONJUGATIVE PLASMIDS OF EXTRAINTESTINAL *Escherichia coli*
STRAINS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

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

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Darjo Žgur-Bertok, za somentorico doc.dr. Marjanca Starčič Erjavec in za recenzentko doc. dr. Blagajano Herzog Velikonja.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Somentorica: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Recenzentka: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof.dr. Franc Viktor Nekrep
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tanja Arbiter

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dn
UDK 579.25:577.21(043)=863
KG plazmidi/konjugativni plazmidi/*Escherichia coli*/izvenčrevesni patogeni sevi/otoki patogenosti/PAI /sistemi privzema železa/sideroforji
AV ARBITER, Tanja
SA ŽGUR-BERTOK, Darja (mentorica) /STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (somentorica) /HERZOG VELIKONJA, Blagajana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2007
IN ZAPISI ZA SISTEME PRIVZEMA ŽELEZA IN OTOKE PATOGENOSTI V KONJUGATIVNIH PLAZMIDIH IZVENČREVESNIH SEVOV *Escherichia coli*
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP X, 92 str., 13 pregl., 24 sl., 6 pril., 59 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V diplomskem delu smo preučevali 30 konjugativnih plazmidov izvenčrevesnih patogenih sevov bakterije *Escherichia coli*. S konjugativnim prenosom smo iz donorskih sevov prenesli v laboratorijski sev DH5α konjugativne plazmide z determinantami odpornosti proti antibiotikom. Ugotavliali smo odpornost sevov ExPEC proti nekaterim antibiotikom. Z verižno reakcijo s polimerazo smo pomnoževali dele otokov patogenosti in zapise sistemov za privzem železa in jih zaznali z agarozno gelsko elektroforezo. Z metodo alkalne denaturacije smo izolirali nekatere izmed plazmidov in jim določili približno dolžino. Določali smo kolicinogenost sevov. Rezultati so pokazali, da so nekateri otoki patogenosti prisotni v konjugativnih plazmidih. Vsi zapisi za preučevane sisteme privzema železa se tudi nahajajo v konjugativnih plazmidih. Glede na zapise, ki smo jih uspeli pomnožiti, se proučevani konjugativni plazmidi med seboj razlikujejo. ExPEC imajo zapise za različne sisteme privzema železa, ki so lahko del otokov patogenosti ali pa ne.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Dn
UDC 579.25:577.21(043)=863
CX plasmids/conjugative plasmids/*Escherichia coli*/extraintestinal pathogenic strains/
pathogenicity islands/PAI/iron uptake systems/siderophores
AU ARBITER, Tanja
AA ŽGUR-BERTOK, Darja (supervisor) /STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (co-
advisor) /HERZOG VELIKONJA, Blagajana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2007
TI IRON-UPTAKE SYSTEMS AND PATHOGENICITY ISLANDS ON
CONJUGATIVE PLASMIDS OF EXTRAINTESTINAL *Escherichia coli*
STRAINS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 92 p., 13 tab., 24 fig., 6 ann., 59 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In this work we have studied 30 conjugative plasmids of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* bacterial strains. By conjugation we have transferred plasmids with determinants for antimicrobial resistance from donors to laboratory strain DH5α. We have studied resistance to some antibiotics of ExPEC strains. We amplified, with polymerase chain reaction, regions of genes in pathogenicity islands and iron-uptake systems and then detected fragments by agarose gel electrophoresis. By alkaline lysis we isolated some of the conjugative plasmids and tried to determine their size. Some of the strains were producing colicins. We have shown, that some of the pathogenicity islands are located on conjugative plasmids. All of studied iron-uptake systems are located on conjugative plasmids. According to our data, conjugative plasmids of ExPEC strains differ from one another in size and genes carrying. ExPEC strains have multiple iron-uprake systems that are, or not, parts of pathogenicity islands.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i>	3
2.2 KONJUGATIVNI PLAZMIDI	4
2.3 OTOKI PATOGENOSTI	5
2.3.1 Otoki patogenosti ExPEC	8
2.4 SISTEMI ZA PRIVZEM ŽELEZA.....	9
2.4.1 Sideroforji	10
2.5 KOLICINI	14
2.6 DETERMINANTE ODPORNOSTI PROTI ANTIBIOTIKOM	15
3 MATERIAL IN METODE	17
3.1 MATERIAL	17
3.1.1 Bakterijski sevi.....	17
3.1.2 Gojišča	19
3.1.3 Kemikalije	20
3.1.4 Encimi	21
3.1.5 Začetni oligonukleotidi.....	22
3.1.6 Pufri in reagenti.....	23
3.1.7 Oprema	23
3.2 METODE	24
3.2.1 Preverjanje odpornosti sevov <i>E. coli</i> proti antibiotikom	24
3.2.2 Shranitev zbirke izvenčrevesnih patogenih sevov <i>E. coli</i>.....	24
3.2.3 Konjugacija sevov <i>E. coli</i>	24
3.2.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	25
3.2.3 Izolacija plazmidne DNA z alkalno denaturacijo.....	29
3.2.4 Restrikcija plazmidne DNA	29
3.2.5 Agarozna gelska elektroforeza	29
3.2.6 Določanje kolicinogenosti sevov <i>E. coli</i>	30
4 REZULTATI.....	31
4.1 ODPORNOST SEVOV TA ExPEC PROTI NEKATERIM ANTIBIOTIKOM	31
4.2 PRISOTNOST OTOKOV PATOGENOSTI V KONJUGATIVNIH PLAZMIDIH SEVOV ExPEC	33
4.2.1 PAI I₅₃₆-IV₅₃₆.....	33
4.2.2 PAI I_{J96}-II_{J96}	35
4.2.3 PAI I_{CFT073}-II_{CFT073}.....	37

4.3 PRISOTNOST ZAPISOV ZA SISTEME PRIVZEMA ŽELEZA V KONJUGATIVNIH PLAZMIDIH SEVOV ExPEC	39
4.3.1 Aerobaktinski sistem	39
4.3.2 Salmohelinski sistem	41
4.3.3 Jersinijabaktinski sistem.....	43
4.3.4 Sideroforna receptorja Iha in IreA	45
4.3.5 Avtotransporterski hemoglobinski proteazi Hbp in PicU	47
4.4 PRISOTNOST KOLICINOV V KONJUGATIVNIH PLAZMIDIH SEVOV TA ExPEC	49
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	55
6 POVZETEK (SUMMARY).....	63
7. VIRI	64
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nekateri antibiotiki in njihove lastnosti (Charpentier in Tuomanen, 2000; Ruiz, 2003; Silva, 1996).....	16
Preglednica 2: Laboratorijski sevi <i>E. coli</i>	17
Preglednica 3: Klinični sevi <i>E. coli</i>	17
Preglednica 4: Konjugante seva DH5α <i>E. coli</i>	18
Preglednica 5: Koncentracije antibiotikov v gojišču LB.....	19
Preglednica 6: Uporabljeni začetni oligonukleotidi.	22
Preglednica 7: Programi PCR za pomnoževanje zapisov za sisteme privzema železa in otoke patogenosti.....	26
Preglednica 8: Število in odstotek kolicinogenih sevov v zbirkri ExPEC.....	49
Preglednica 9: Dejanske dolžine fragmentov konjugativnih plazmidov po restrikciji in ocenjena velikost plazmidov.	52
Preglednica 10: Opis konjugativnih plazmidov zbirke ExPEC in njihova teoretična velikost.	53
Preglednica 11: Število otokov patogenosti prisotnih v konjugantah ExPEC.	54
Preglednica 12: Število genov, povezanih s privzemom železa prisotnih v konjugantah sevov ExPEC.	54
Preglednica 13: Zapisi za nekatere virulentne dejavnike v PAI.	59

KAZALO SLIK

Slika 1: Pospoljena struktura otoka patogenosti (Schmidt in Hensel, 2004).....	7
Slika 2: Delež sevov TA zbirke ExPEC odpornih proti posameznemu antibiotiku.....	31
Slika 3 :Delež donorjev v zbirki ExPEC, ki so dali konjugante.....	32
Slika 4: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti delov genov otoka patogenosti PAI IV ₅₃₆	33
Slika 5: Prisotnost delov genov otokov patogenosti PAI I ₅₃₆ -IV ₅₃₆ v posameznem sevu ExPEC	34
Slika 6: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti delov genov otoka patogenosti PAI II _{J96}	35
Slika 7: Prisotnost delov genov PAI I-II _{J96} v posameznem sevu ExPEC.....	36
Slika 8: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti delov genov otoka patogenosti PAI I _{CFT073}	37
Slika 9: Prisotnost delov genov PAI I-II _{CFT073} v posameznem sevu ExPEC.....	38
Slika 10: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti gena <i>iucD</i>	39
Slika 11: Prisotnost genov za aerobaktinski sistem privzema železa v posameznem sevu ExPEC	40
Slika 12: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti gena <i>iroN</i>	41
Slika 13: Prisotnost genov za salmohelinski sistem privzema železa v posameznem sevu ExPEC	42
Slika 14: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti gena <i>fyuA</i>	43
Slika 15: Prisotnost genov za jersinijabaktinski sistem privzema železa v posameznem sevu ExPEC	44
Slika 16: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti gena <i>ireA</i>	45
Slika 17: Prisotnost genov <i>iha</i> in <i>ireA</i> za sideroforna receptorja v posameznem sevu ExPEC	46
Slika 18: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti gena <i>hbp</i>	47
Slika 19: Prisotnost genov <i>hbp</i> in <i>picU</i> za avtotransporterski proteazi v posameznem sevu ExPEC	48
Slika 20: Test produkcije kolicinov donorskih sevov TA in konjugant TR.....	49
Slika 21: Elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti plazmidov v sevih TR.....	50
Slika 22: Elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti plazmidov v sevih MR.....	51
Slika 23: Prevalenca otokov patogenosti v sevih ExPEC	55
Slika 24: Prevalenca zapisov za sisteme privzema železa med sevi ExPEC	57

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Rezultati pomnoževanja delov otokov patogenosti sevov ExPEC s PCR.
Priloga B: Rezultati PCR za preverjanje prisotnosti zapisov za sisteme privzema železa sevov ExPEC.
Priloga C: Odpornost proti antibiotikom sevov TA zbirke ExPEC.
Priloga D: Donorski sevi TA.
Priloga E: Kolicinogenost in mere cone lize donorjev TA in konjugant TR.
Priloga F: Odpornosti proti antibiotikom konjugant MR in TR.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APEC	ptičja patogena <i>E. coli</i> (» <u>A</u> avian <u>P</u> athogenic <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli«)
ATP	adenozintrifosfat
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
bp	bazni par
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleozidni fosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
ExPEC	izvenčrevesni patogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (» <u>E</u> xtraintestinal <u>P</u> athogenic <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli«)
g	gravitacijski pospešek 10 m na sekundo
HPI	otok visoke patogenosti (» <u>H</u> igh <u>P</u> athogenicity <u>I</u> sland«)
Kb	kilobazni par
LB	Luria Bertani
mM	mikromolarnost
obr./min	obratov na minuto
PAI	otok patogenosti (» <u>P</u> athogenicity <u>I</u> sland«)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (» <u>P</u> olimerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction«)
RNAza	ribonukleaza
SDS	natrijev dodecilsulfat (» <u>S</u> odium <u>D</u> odecile <u>S</u> ulphate«)
št.	število
TBE	tris borat EDTA
TE	tris EDTA
tRNA	prenašalna ribonukleinska kislina
V	volt
UV	ultravijolična svetloba

1 UVOD

Izvenčrevesni patogeni sevi *Escherichia coli* (ExPEC) povzročajo najrazličnejše okužbe, lahko tudi s smrtnim izidom. ExPEC so najpogosteji po Gramu negativni povzročitelji okužb genitourinarnega trakta, intraabdominalnih okužb, pljučnice, okužb operacijskih ran, meningitisa, osteomielitisa in bakteremije. Sevi, ki povzročajo bolezen, se razlikujejo od komenzalov v tem, da imajo različne virulentne dejavnike, kot so adhezini, toksini, kapsule, invazini, determinante odpornosti proti serumu in sisteme privzema železa.

Sistemi privzema železa so pomembni za bakterije, ker jim omogočajo rast v gostitelju, kjer je koncentracija železa zelo nizka. Bakterije privzemajo železo iz laktoferina in transferina s sideroforji. Sideroforji so nizkomolekularni helatorji železa in so virulentni ali z virulenco povezani dejavniki.

Bakterijski patogeni imajo v kromosomih regije, koncentrirane z geni za virulenco in drugačnim odstotkom baznih parov G in C, ki jih imenujemo otoki patogenosti (PAI). Virulentni dejavniki so lahko zapisani tudi v izvenkromosomski DNA, v plazmidih. Plazmidi se lahko vključujejo v genom in spet izključujejo, ob tem lahko s seboj odvzamejo del kromosomske DNA. Še posebej so zanimivi plazmidi, ki so konjugativni. Konjugativni plazmidi se s konjugativnim prenosom širijo med sevi iste vrste in tudi med različnimi vrstami. Ob tem v bakterijsko populacijo širijo različne zapise, kot so zapisi za virulentne dejavnike in odpornost proti antibiotikom.

V diplomskem delu smo analizirali 30 sevov s konjugativnimi plazmidmi z determinantami odpornosti proti antibiotikom za prisotnost sistemov privzema železa in z otoki patogenosti. Otoki patogenosti igrajo kot mobilni elementi vlogo pri evoluciji in nastanku novih potencialno patogenih vrst.

1.1 NAMEN DELA

V diplomskem delu smo zato analizirali prisotnost zapisov za otoke patogenosti in sisteme privzema železa v 30 konjugativnih plazmidih z determinantami odpornosti proti antibiotikom, ki smo jih odkrili v sevih ExPEC. Sevi izvirajo iz izolatov pacientov z okužbo urinarnega trakta, kroničnih okužb ran, ran podkožja, sluznic in spolovil. Izolirali so jih na Inštitutu za Mikrobiologijo in Imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Preverili smo prisotnost otokov patogenosti PAI I-IV₅₃₆, PAI I-II_{J96} in PAI I-II_{CFT073}. Preverjali smo tudi prisotnost zapisov za privzem Fe sideroforjev in sintezo Fe sideroforjev aerobaktina, salmohelina, jersinijabaktina, siderofornih receptorjev IreA in Iha ter avtotransportskih hemoglobinskih proteaz Hbp in PicU. Doslej še nismo zasledili, da bi bili otoki patogenosti izvenčrevesnih sevov *Escherichia coli* kdaj odkriti v konjugativnih plazmidih. Prav tako nismo zasledili nobene raziskave, ki bi pregledala pogostost zapisov za sisteme privzema železa v konjugativnih plazmidih v sevih ExPEC.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Escherichia coli*

Rod *Escherichia* spada v družino *Enterobacteriaceae*, deblo γ -proteobakterije. Vrsto *Escherichia coli* (*E. coli*) je odkril nemški zdravnik Theodor Escherich leta 1885 in se po njem tudi imenuje. Je po Gramu negativen bacil s peritrikimi flageli. Ima kemoorganotrofen metabolizem in je fakultativni anaerob. Optimalna temperatura rasti je 37 °C. Najdemo jo v prebavnem traktu človeka in topokrvnih živali, tudi v vodi ali prsti (Madigan in sod., 2003). V črevesju je del normalne flore, torej je komenzal in živi v sožitju s svojim gostiteljem. Sintetizira vitamin K, vitamin B₇ (biotin), prispeva k tvorbi feca in absorpciji hrane. Vendar so nekateri sevi lahko patogeni. Virulentni sevi povzročajo vrsto različnih okužb, od črevesnih do izvenčrevesnih (Kaper in sod., 2004).

Patogenost je sposobnost bakterij, da povzročijo bolezen pri gostitelju. Patogenost je odvisna od lastnosti bakterije, to je od njenih virulentnih dejavnikov, in od sprejemljivosti gostitelja. Ponavadi patogeni z veliko virulentnimi dejavniki povzročajo bolezensko stanje. Včasih je gostiteljeva obramba tako učinkovita, da okužba izzveni asimptomatsko. Ob zmanjšani odpornosti ali ob vstopu v telesne predele, kjer ponavadi ni mikrobov, pa tudi manj virulentne bakterije lahko povzročijo bolezen (Koren, Ihn, Gubina, 2002).

Komenzalni sevi *E. coli* redko povzročajo bolezen, razen pri imunokompromitiranih osebah ali, če so razdrte gastrointestinalne prepreke. Patogeni sevi imajo nabor različnih virulentnih dejavnikov (kot so toksini, adhezini, fimbrije, hemolizin, kapsula) in lahko povzročajo bolezensko stanje pri zdravih ljudeh. Ločimo črevesne (intestinalne) patogene in izvenčrevesne patogene seve *E. coli* (ExPEC). Črevesni patogeni sevi povzročajo gastroenteritis ali kolitis. ExPEC sevi lahko povzročajo bolezenska stanja skoraj vseh organov ali tkiv telesa. Najbolj tipične so okužbe urinarnega trakta, meningitis, različne intraabdominalne okužbe, pljučnice, okužbe venskih vstavkov, osteomielitis ter okužbe mehkih tkiv (Kaper in sod., 2004). Klinični izolat *E. coli* lahko označimo kot ExPEC, če ima izvenčrevesne virulentne dejavnike ali, če povzroča bolezensko stanje izven črevesa pri ljudeh. Za razliko od komenzalnih sevov *E. coli* so ExPEC sevi večinoma pripadniki

filogenetske skupine B2 ali D in imajo gene za adhezine, invazine, kapsule, sisteme za privzem železa, mehanizme za izogibanje gostiteljevi obrambi in toksine. Virulentni dejavniki so pogosto zapisani v mobilnih genetskih elementih, tako imenovanih otokih patogenosti, in tudi konjugativnih plazmidih, ki jim omogočajo razširjanje med različnimi sevi in tudi vrstami (Russo in Johnson, 2000).

Med ExPEC prištevamo tudi ptičjo patogeno *Escherichia coli* ali APEC, ki povzoča pljučne okužbe, perikarditis in septikemijo pri ptičih. Ker ima zelo podoben nabor virulentnih dejavnikov kot človeške patogene ExPEC, jo uvrščamo v to skupino (Kaper in sod., 2004).

2.2 KONJUGATIVNI PLAZMIDI

Konjugacija je prenos DNA iz donorske celice v recipientsko celico ob neposrednem stiku med celicama. V konjugativnem prenosu se konjugativni plazmid prenese iz donorja v recipienta. Konjugativni plazmid je krožna izvenkromosomska DNA z informacijo za samopomnoževanje in prenos. Ti plazmidi so približno 100 kb dolgi in so ponavadi v eni do dveh kopijah na celico. V njih je vsa informacija za konjugativni prenos, ki obsega približno 33 kb (mesto začetka prenosa *oriT*, regija *tra* z geni za prenos in uravnavanje prenosa, replikacijska regija z geni *rep* za podvojevanje in mobilni elementi). V konjugativnih plazmidih so lahko tudi različni geni povezani z metabolizmom, virulenco, simbiozo in odpornostjo proti antibiotikom. Pri konjugativnem prenosu v primeru sevov Hfr, to so sevi, ki imajo konjugativni plazmid vključen v kromosom, se lahko ob nepravilnem zaključku terminacije prenosa prenese tudi del kromosomske DNA. Zato igrajo pomembno vlogo pri horizontalnem prenosu genov. Za konjugacijo potrebujetejo bakterije pilus, ki je sestavljen iz pilina. Podenote pilina polimerizirajo in tvorijo votel cilinder dolžine 2-3 µm, ki izrašča iz površine bakterijske celice in posreduje kontakt med donorsko in recipientsko celico. Ko se vzpostavi kontakt to prepozna protein TraM. Protein TraY se veže na DNA blizu mesta *oriT*, zraven se veže tudi protein IHF (integration host factor) in skupaj upogneta DNA, kar omogoči vezavo relaksaze TraI. TraI cepi eno verigo DNA v mestu *nic*, se nato veže na njen 5' konec in odvija verigo. Sledi prenos ene verige DNA v recipienta v smeri od 5' proti 3'. Najprej se prenese vodilna regija plazmida. Protein TraD posreduje prenos enoverižne DNA skozi celično membrano in steno v

recipienta. Sočasno s prenosom v donorski celici poteka tudi sinteza komplementarne verige z mehanizmom kotalečega se kroga (»rolling circle«). Konjugativni prenos se konča, ko TraI doseže dvojerižno mesto *oriT*. Po prenosu enoverižne DNA v recipienta sledi sinteza komplementarne verige in cirkularizacija. Recipient tako postane donor in konjugativni plazmid se hitro širi v bakterijski populaciji (Firth in sod., 1996).

V zbirki ECOR, ki predstavlja referenčno zbirko sevov *E. coli*, ima približno 15 % sevov konjugativne plazmide (Boyd in sod., 1996). Konjugativne plazmide so našli tudi v patogenih sevih. Najbolj znani konjugativni plazmidi so plazmidi pColV. V plazmidih pColV so zapisi za kolicin V, aerobaktinski sistem privzema železa, determinante odpornosti proti serumu in fagocitozi ter adhezine (Waters in Crosa, 1991). V plazmidu pColV-K30 v sevu ExPEC je poleg aerobaktina kodirana tudi hemoglobinska proteaza Hbp (Otto in sod., 1998). Zapis za salmohelinski sistem privzema železa je tudi v konjugativnem plazmidu p300 v uropatogeni *E. coli* (Sorsa in sod., 2003). Plazmid pAPEC-02-ColV, iz ptičje patogene *E. coli* (APEC), ki je dolg 180 kb in spada tudi v skupino ExPEC, kodira kolicin V, aerobaktinski in salmohelinski sistem privzema železa, determinante odpornosti proti serumu (*iss*), Tsh (tempetaturno občutljiva hemaglutinaza), hemolizin (*hlyF*), in tri ABC-transportne sisteme (Sit, Ets in Eit) (Johnson in sod., 2006a). Plazmid pAPEC-01-ColBM, velik 174,24 kb, nosi zapise za kolicina B in M in ostale zapise enake pAPEC-02-ColV. Sklepajo, da se je pAPEC-01-ColBM razvil iz plazmida ColV (Johnson in sod., 2006b).

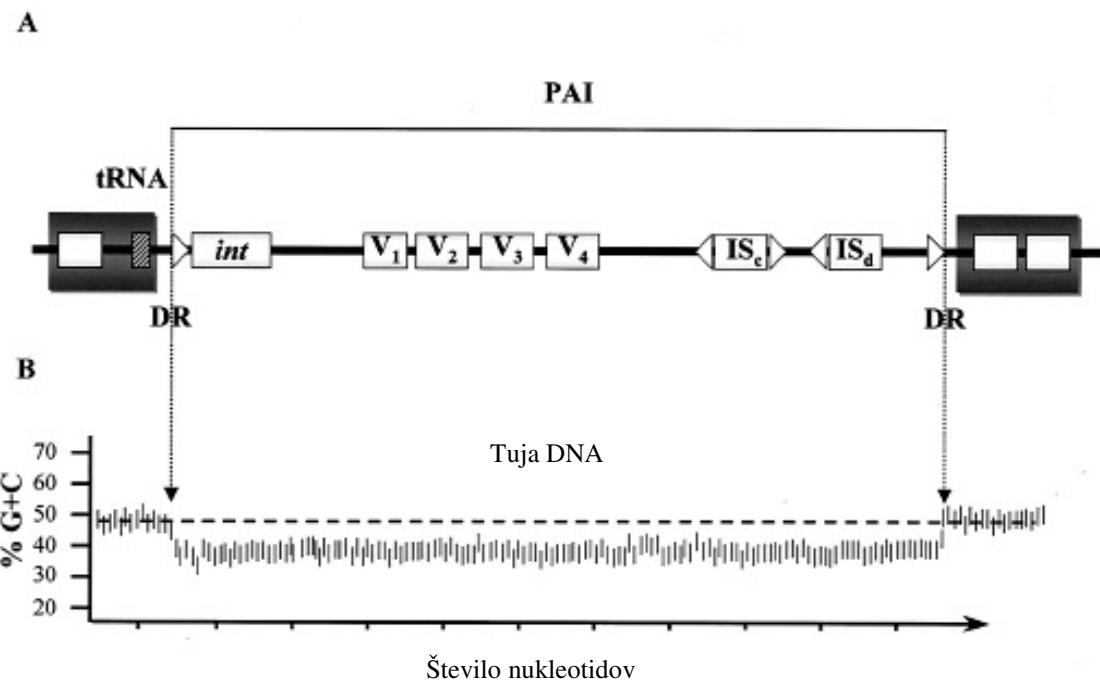
2.3 OTOKI PATOGENOSTI

Bakterijski genom je konstantno podvržen spremembam. To so lahko točkovne mutacije, inverzije, translokacije, rekombinacije, delecije ali insercije. Izguba ali pridobitev celotnih genov (operonov) so spremembe, ki v večji meri in zelo hitro spremenijo lastnosti bakterij. Take večje spremembe imenujemo »kvantni skoki« (»quantum leaps«). Posredujejo jih deli kromosoma, t.i. genomske otoki, ki kodirajo različne funkcionalne gene in mobilne elemente, ki jim omogočajo razširjanje v bakterijski populaciji. Poznamo več vrst genomskeh otokov, kot so ekološki otoki, saprofitski otoki, simbiontski ali patogeni. Otoki patogenosti ali PAI so najbolje opisani genomske otoki. Igrajo pomembno vlogo, saj imajo gruče genov za virulentne dejavnike, ki omogočajo bakteriji selekcijsko prednost v

patogenezi. Bakterija tako lahko v enem koraku postane potencialno patogena. Otoke patogenosti so odkrili Jörg Hacker in sodelavci leta 1990, ko so raziskovali uropatogeni sev *E. coli* 536. Opazili so, da se geni za P-fimbrije, alfa-hemolizin in približno 30 kb kromosoma izgubijo skupaj v enem dogodku in ne posamezno. Po tem dogodku je sev postal nepatogen (Schmidt in Hensel, 2004).

Definicija otoka patogenosti, ki je shematsko prikazan na sliki 1:

- imajo virulentne gene
- prisotnost v patogenih sevih in odsotnost ali naključna prisotnost v manj ali nepatogenih sevih
- drugačen odstotek baz G in C v primerjavi s preostalim genomom
- zasedanje dolgih regij v kromosomu (>30 kb)
- predstavljajo zgoščene, jasne genske enote, pogosto obdane z neposrednimi ponovitvami
- nahajajo se blizu ali v genih za tRNA
- imajo mobilne elemente (elemente IS, kodirajo integraze, transposaze, imajo ori)
- so nestabilni (Hacker in sod., 1997)



Slika 1: Posplošena struktura otoka patogenosti.

A - otoki patogenosti so ločene enote, vstavljeni v gene za tRNA v genome bakterij. Imajo mobilne gene za integraze (*int*), virulentne gene (V1-V4), popolna insercijska zaporedja (ISc) ali delna insercijska zaporedja (ISd). Meje otoka patogenosti sta ponavadi neposredni ponovitvi (DR, trikotnik), ki omogočajo insercijo ali delecijo PAI.

B - Vsebnost gvanina in citozina je v PAI drugačna kot v preostalem genomu bakterije (Schmidt in Hensel, 2004).

Otoki patogenosti se lahko prenašajo vertikalno in horizontalno. Horizontalno se prenašajo s transformacijo (če je vrsta naravno kompetentna), s konjugacijo če so integrirani v konjugativne plazmide (dokazano pri vrsti *Staphylococcus aureus*) in manjši s transdukциjo (Schmidt H. in Hensel M., 2004). Integraza in neposredne ponovitve omogočajo PAI, da se izrežejo iz kromosoma. Delecije PAI so neodvisne od *recA* in imajo frekvenco od 10^{-6} do 10^{-5} . Potekajo s homologno rekombinacijo med neposrednima ponovitvama na obeh koncih PAI, ki jo sprožijo integraze, zapisane v samem otoku patogenosti. Tvori se krožni intermediat, ki se lahko vključi v plazmid ali tvori episom. Delecijo sprožijo zunanji pogoji, kot sta 20 °C in prehod med logaritmično in stacionarno fazo rasti (Middendorf in sod., 2004). Sklepajo, da je za bakterijo, ki povzroča kronične okužbe, ugodnejše izgubiti

PAI, ker imajo manj virulentni sevi boljšo možnost preživetja in persistence v gostitelju (Morschhäuser in sod., 2000).

2.3.1 Otoki patogenosti ExPEC

Najbolj so proučeni PAI uropatogenih sevov *E. coli*. To so sevi 536, J96 in CFT073. Odkrili so jih tudi v sevu C5 in RS218, ki povzročata meningitis ter sevu AL863, ki povzroča sepso (Schmidt in Hensel, 2004).

2.3.1.1 *E. coli* 536

Uropatogeni sev 536 ima štiri otoke patogenosti. Označujemo jih PAI I₅₃₆, PAI II₅₃₆, PAI III₅₃₆ in PAI IV₅₃₆. Zavedati se moramo, da so PAI po definiciji nestabilni in zato se lahko njihova dolžina in sestava spreminja (Schmidt in Hensel, 2004). Največjo prevalenco ima PAI IV₅₃₆, sledi PAI III₅₃₆, zanjim PAI II₅₃₆ in najmanjšo PAI I₅₃₆. PAI I₅₃₆, PAI II₅₃₆ in PAI III₅₃₆ imajo ostanke insercijskih zaporedij, ki se pogosto nahajajo v virulentnih plazmidih, transpozazo IS100 in dele profaga CP-933. To nakazuje, da so ti PAI nastali z večkratnimi rekombinacijami in integracijami različnih mobilnih elementov. PAI IV₅₃₆ nima insercijskih zaporedij. Zanimivo je tudi, da je uporaba kodonov v teh štirih PAI drugačna kot v preostalem genomu. Če primerjamo PAI med seboj je uporaba kodonov drugačna v PAI IV₅₃₆ kot pri PAI I₅₃₆, PAI II₅₃₆ in PAI III₅₃₆. To dokazuje, da so sevi pridobili otoke patogenosti s horizontalnim prenosom (Dobrindt in sod., 2002).

PAI I₅₃₆ je dolg 76.843 baznih parov in je lociran v genu *selC* za selenocisteinsko tRNA. Obdan je z 16 bp dolgimi neposrednimi ponovitvami in ima 46 % baz G in C. Kodira nefunkcionalno integrazo bakteriofaga. Ima zapis za alfa-hemolizin, fimbrije F17, fimbrije CS12 in različne, še ne opisane fimbrije in adhezine (Dobrindt in sod., 2002).

PAI II₅₃₆ je dolg 102.200 baznih parov in leži v genu *leuX* za levcinsko tRNA. Odstotek baz G in C je 46 in kodira delujočo integrazo faga. Obdajajo ga 18 bp dolge neposredne ponovitve. Kodira virulentne dejavnike: P-fimbrije, alfa-hemolizin, adhezin Hek in hemaglutininu podobne adhezine (Dobrindt in sod., 2002).

PAI III₅₃₆ ima dolžino 68.124 bp in je integriran v gen *thrW* za treoninsko tRNA. Ima 47 % baz G in C. Obdan je s 47 bp dolgima neposrednima ponovitvama. Kodira delujočo integrazo faga in virulentne delavниke: S-fimbrije, sistem privzema železa *iro*, sideroforni

receptor podoben HmuR, avtotransportski adhezin Sap in hemoglobinsko proteazo, podobno TSH. (Dobrindt in sod., 2002).

PAI IV₅₃₆ ima dolžino 30.200 bp in je lociran v genu *asnT* za asparaginsko tRNA. Ima 57 % baz G in C. Sestavljen je iz dela, ki je zelo podoben otoku patogenosti HPI vrst rodu *Yersinia* in kodira jersinijabaktinski sistem privzema železa. Ker je brez neposrednih ponovitev je bolj stabilen (Dobrindt in sod., 2002).

2.3.1.2 *E. coli* J96

V tem sevu so do sedaj našli dva PAI. PAI I_{J96} je dolg 170 kb in kodira alfa-hemolizin in fimbrije PapG. Lociran je v bližini gena *pheV* za fenilalaninsko tRNA. Ima zapis za bakteriofagno integrizo in zaporedje podobno *oriT* (Swenson in sod., 1996).

PAI II_{J96} je dolg 110 kb in kodira virulentne dejavnike: alfa-hemolizin, CNF-1, fimbrije PRS in proti toploti odporen hemaglutinin Hrh. Vstavljen je v gen *pheU* za fenilalaninsko tRNA. (Schmidt in Hensel, 2004). Obdan je s 135 bp dolgima nepravilnima neposrednima ponovitvama in ima zapis za fagno integrizo (Swenson in sod., 1996).

2.3.1.3 *E. coli* CFT073

Tudi v sevu CFT073 sta dva otoka patogenosti. Prvi, PAI I_{CFT073} meri 58 kb, ima 42,9 % baz G in C. Vstavljen je v bližino gena *metV* za metioninsko tRNA. Ima insercijska zaporedja, transpozazo in 9 bp dolgi neposredni ponovitvi. Zaradi kratkih neposrednih ponovitev je ta otok patogenosti stabilnejši (Kao in sod., 1997). V njem so geni za alfa-hemolizin, P fimbrije, aerobaktinski sistem privzema železa in sideroforni receptor Iha (Schmidt in Hensel, 2004).

Drugi otok PAI II_{CFT073} je dolg 100 kb in leži med genoma *dnaQ* in *yafV*. Ima insercijska zaporedja in zapise za transpozaze. Poleg teh kodira tudi hemoglobinsko proteazo PicU, sekrecijski sistem tipa 1, Fbp (ferric binding protein) in gene, povezane z metabolizmom sladkorjev (Parham in sod., 2005).

2.4 SISTEMI ZA PRIVZEM ŽELEZA

Element železo (Fe) je nujen za rast *E. coli*. Je ključna komponenta citokromov, železo-žveplovih proteinov in feredoksina, ki so prenašalci elektronov v dihalni verigi. Železo-žveplovi proteini so del cikla trikarboksilnih kislin. Poleg tega je tudi kofaktor katalaze,

peroksidaze in superoksid dismutaze, ki ščitijo celico pred kisikovimi radikalji. Je del encimov, ki sodelujejo pri biosintezi pirimidinov, aromatskih aminokislín in DNA. V anaerobnih pogojih je v oksidacijskem stanju Fe^{2+} in topen. V aerobnih pogojih je v oksidacijskem stanju Fe^{3+} in tvori netopne minerale. Zato ga ponavadi v okolju primanjuje in mikroorganizmi so razvili spojine, ki z visoko afiniteto vežejo železo in jih imenujemo sideroforji. Še posebej primanjuje železa v človeškem ali živalskem telesu, saj je vezano na specifične proteine, t.i. železo vezavne proteine, kot sta transferin in laktoferin. Patogeni mikroorganizmi imajo razvite sideroforje, ki imajo višjo afiniteto do železa kot gostiteljevi železo-vezavni proteini (Earhart, 1996).

2.4.1 Sideroforji

Sideroforji so nizkomolekularni visokoafinitetni železovi helatorji. Sintetizirajo se le, ko v okolju primanjuje železa. Preferenčno vežejo Fe^{3+} pred Fe^{2+} , kompleks Fe-siderofor prepozna specifični sideroforni receptorji v zunanji membrani in ga transportirajo v periplazmo. Skozi notranjo celično membrano vstopi kompleks Fe-siderofor s posredovanjem proteina TonB. TonB je periplazemski membranski protein, ki priskrbi energijo ABC-transporterju za prehod Fe-sideroforja v citoplazmo. V citoplazmo vstopi Fe-siderofor preko od ATP odvisnega ABC-transportera. V citoplazmi se železo sprosti iz kompleksa na dva načina. Lahko se Fe^{3+} reducira v Fe^{2+} in sprosti iz kompleksa, ker ima siderofor nižjo afiniteto do dvovalentnega železa. Drugi način je, da se siderofor encimsko razgradi in se tako sprosti železo. Poznamo hidroksamatne sideroforje, derivate hidroksamatne kisline in kateholne sideroforje, derivate katehola. Vsi sevi *E. coli* sintetizirajo kateholni siderofor enterobaktin, nekateri pa tudi aerobaktin, salmohelin in jersinijabaktin. *E. coli* lahko uporablja tudi sideroforje, ki jih ni sama sintetizirala, če ima za njih specifični receptor. Sinteza sideroforjev kontrolira količina železa v celici, če je visoka, je to vezano tudi na protein Fur, ki je regulatorni protein. Tako se represor Fur ne more vezati na promotorje genov za sintezo sistemov za privzem železa. Če je koncentracija Fe nizka je Fur prost in se lahko veže na svoja vezavna zaporedja (»Fur box«) v promotorskih zaporedjih in inducira transkripcijo genov za sintezo sideroforjev in njihovih receptorjev (Earhart, 1996). Sistemi privzema železa so virulentni dejavniki ali z virulenco povezani (Crosa, 1989), mutante *E. coli* z okvarjenimi geni za privzem železa ne morejo povzročiti bolezni v poskusni živali (Torres in sod., 2001). Sideroforji omogočajo

bakteriji rast v gostitelju, kjer je koncentracija železa zelo nizka, poleg tega nekateri sideroforni receptorji igrajo vlogo tudi pri kolonizaciji epitela in vdoru bakterije v celico (Russo in sod., 2002; Léveillé in sod., 2006; Feldmann in sod., 2007). Patogene bakterije, ki imajo več različnih sistemov za privzem železa, so v prednosti pred tistimi z manj, ker jim to omogoča seleksijsko prednost. Zaradi naključne mutacije lahko pride do inaktivacije sistema ali pa gostiteljeva obramba s protitelesi prepozna siderofor ali receptor za siderofor. Različni sideroforji lahko privzemajo železo iz različnih virov ali pa v različnih okoljih oziroma delih telesa (Russo in sod., 2001).

2.4.1.1 Aerobaktinski sistem

Prvič je bil aerobaktin izoliran iz bakterije *Enterobacter aerogenes*. Je hidroksamatni siderofor in bolje oskrbuje bakterije z železom od enterobaktina,

- ker ga lahko bakterije ponovno uporabijo, ne da bi ga razgradile,
- ker se hitreje prenaša preko membrane,
- ker je stabilnejši,
- ima višjo afiniteto za železo od enterobaktina pri nevtralni vrednosti pH,
- ne inducira nastanka specifičnih protiteles, ker ne tvori kompleksov s serumskimi proteini.

Za biosintezo aerobaktina potrebujejo bakterije gene *iucA*, *iucB*, *iucC* in *iucD*. Gen *iutA* kodira zunanjemembranski receptorski protein. (Earhart, 1996). Promotor operona *iut* ima vezavno mesto za regulator Fur in je tako uravnavan. Aerobaktinske determinante najdemo največkrat v kromosому, pa tudi v plazmidih (Johnson, 1991). Informacija za sintezo aerobaktina in njegov privzem obsega 7,5 kb (Carbonetti in Williams, 1984). Dokazali so višjo prevalenco zapisov za aerobaktin v sevih, ki povzročajo izvenčrevesne okužbe, kot so sepsa, meningitis in pielonefritis, kot v komenzalnih sevih (Carbonetti in sod., 1986). Zanimivo je, da zapise za aerobaktinski sistem obdajata obrnjeni ponovitvi insercijskih zaporedij, kar nakazuje, da se lahko sistem prenaša samostojno brez pomoči konjugacije, transdukcije ali transformacije. Prenaša se s homologno rekombinacijo s proteinom RecA (Waters in Crosa, 1991).

2.4.1.2 Salmohelinski sistem

Salmohelin je glikozilirani enterohelin in zato je bolj hidrofilen od enterobaktina. Za njegovo sintezo je potreben lokus *iro*, ki ga sestavlja dva operona. *iroBCDE* so geni za sintezo (Bäumler in sod., 1996), za privzem pa zunanjemembranski receptor, ki ga kodira *iroN* (Bäumler in sod., 1998). Odkrili so ga pri vrsti *Salmonella enterica*. Prisoten je tudi v različnih sevih *E. coli* in ga označujemo kot gručo genov *iroBCDEN_{E. coli}* (Hantke in sod, 2003). Lokus je uravnavan s Fur, vezavna mesta za regulator so v promotorjih genov *iroB* in *iroN* (Grass, 2006). Geni so lahko prisotni v kromosomu ali v plazmidu. Celotna informacija za sintezo in privzem je dolga približno 9,5 kb (Sorsa in sod., 2003). Po glikozilaciji se salmohelin izloči, kompleks Fe-salmohelin prepozna IroN in ga transportira v periplazmo. Tu ga IroE hidrolizira do Fe-kateholat, da ga lahko prepozna transporter FepBCDG in prenese preko celične membrane (Lin in sod., 2005). IroN ima poleg receptorja za sideroforje tudi druge vloge. V sevih ExPEC sodeluje pri vdoru bakterij v celice mehurja in je t.i. internalizacijski faktor (Feldmann in sod., 2007). Ima tudi vlogo virulentnega dejavnika pri neonatalnem meningitisu. Zaradi razširjenosti med sevi *E. coli* in *Salmonella* spp, vlogah pri patogenezi in lokaciji v zunanji membrani bi bil dober kandidat za cepivo. IroN je lahko receptor tudi za ostale kateholne sideroforje in ne samo salmohelin (Nègre in sod., 2004).

2.4.1.3 Jersinijabaktinski sistem

Jersinijabaktinski sistem privzema železa so odkrili pri patogenih vrstah rodu *Yersinia*. Za biosintezo je potreben 22 kb dolg zapis ali lokus *ybt*. Sintezni geni so *irp1*, *irp2*, *ybtA*, *ybtT* in *ybtE*, receptor za siderofor in bakteriocin pesticin kodira gen *fyuA*. Sinteza jersinijabaktina je uravnana z aktivatorjem YbtA, z represorjem Fur in samim jersinijabaktinom, ki je aktivator. Je pomemben za virulenco, saj mutante v receptorskem ali sinteznih genih, niso več tako virulentne kot divji tip (Bearden in sod., 1997). Jersinijabaktin je poliketidni neribosomski peptid, ki vsebuje tudi fenolno skupino (Grass G., 2006). Spada v manjšo skupino fenolatnih sideroforjev in je podoben piohelinu in anguibaktinu, sideroforjema vrst *Pseudomonas aeruginosa* in *Vibrio anguillarum*. Sinteza je neribosomska (»thiotemplate«) (Carniel E., 2001). Jersinijabaktin ima višjo afiniteto do železa kot enterobaktin in aerobaktin (Perry in sod., 1999). Zunanjemembranski receptor FyuA prepozna Fe-siderofor in ga prenese preko zunanje membrane, preko notranje pa

pride z ABC-transporterjem Yfe (Bearden in sod., 1998). V rodu *Yersinia* je lokus *ybt* del kromosomskega otoka patogenosti HPI (High-Pathogenicity Island) in je nujen za izražanje virulence. Lokus *ybt* se kot del HPI pojavlja tudi v drugih rodovih družine *Enterobacteriaceae*, našli so ga v patogenih sevih *E. coli* in to v kromosomski DNA. Prisoten je tudi v vrstah *Citrobacter* spp., *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* in *Enterobacter* in se tudi izraža (Schubert in sod, 2000; Carniel E., 2001). HPI v *E. coli* ima samo gene *ybt*, medtem ko ima v vrstah *Yersinia* tudi lokus *hms*, ki je odgovoren za pigmentacijo. V *E. coli* nastaja jersinijabaktin in verjetno pripomore k njeni virulenci. Zanimivo je, da sevi z jersinijabaktinskim sistemom privzema železa posedujejo tudi enterobaktin, zato sklepajo da ima jersinijabaktin še kakšno drugo vlogo v virulenci (Schubert in sod., 1998). HPI ima visoko prevalenco med patogenimi izvenčrevesnimi sevi *E. coli*, še posebej v sevih, ki povzročajo meningitis dojenčkov (Clermont in sod., 2001). Ugotovili so, da so sevi ExPEC s HPI bolj virulentni za poskusne živali. Sklepajo, da je to zaradi bolj učinkovitega privzema železa v gostitelju, imunosupresije gostitelja in aktivatorja genov sinteze sideroforja YbtA (Schubert in sod., 2002).

2.4.1.5 Sideroforni receptor Iha

Protein Iha je bil prvič opisan kot adhezin enterohemoragične *E. coli* leta 2000 (Tarr in sod., 2000). Nato so odkrili, da je virulentni faktor pri okužbah urinarnega trakta in deluje kot adhezin in tako prispeva h kolonizaciji (Johnson in sod, 2005). Je tudi homolog receptorja IrgA za enterobaktin v *Vibrio cholerae* (Mey in sod., 2002), zato so raziskali vlogo pri metabolizmu železa in ugotovili, da je zunanjemembranski receptor za kateholatne sideroforje. Gen *iha* je uravnavan s proteinom Fur, v promotorju je njegovo vezavno mesto. Ni uravnavan z adherenco bakterije na gostiteljsko celico in je neodvisen od stika med bakterijami in gostiteljskimi celicami. Zapis za protein je dolg 2 kb. Prenos Fe-siderofor poteka preko proteina TonB (Léveillé in sod., 2006).

2.4.1.6 Sideroforni receptor IreA

Ta gen so odkrili, ko so sev CP9 *E. coli* gojili v humanem urinu. Zasledovali so povišanje izražanja genov in odkrili gen *ireA* (»iron responsive element«). Zapis je dolg 2,7 kb. Izražanje je uravnavano s proteinom Fur in reprimirano z Fe. Izražanje gena *ireA* je

povišano v urinu, ascitni tekočini in krvi. Protein IreA je od TonB odvisni sideroforni receptor v zunanji membrani (Russo in sod., 2001).

2.4.1.7 Hemoglobinska proteaza Hbp

E. coli lahko uporabi kot vir železa tudi hem. Hbp je zunajcelična proteaza, ki prepozna hemoglobin, ga razgradi in veže hem. Spada v skupino proteaznih avtotransporterjev. Prvič so protein odkrili v humanem patogenem sevu EB1, izoliranem iz okužene rane abdomna. Ima homologijo s proteinom Tsh, izoliranem iz ptičje patogene *E. coli*. Gen *hbp* je dolg približno 3 kb. Gen so našli tudi v plazmidu pColV-K30. Sintetizira se v citoplazmi kot prekurzor in ima signalna zaporedja za prenos preko notranje in zunanje celične membrane. Signalna zaporedja se med prehodi membrane odcepijo. To je značilnost vseh avtotransporterjev (Otto in sod., 1998). Zanimivo je, da Hbp iz bakterije *E. coli* posreduje hem tudi vrsti *Bacteroides fragilis* in tako prispeva k nastanku abscesa v trebušni votlini. *B. fragilis* preprečuje uničenje *E. coli* z inhibicijo delovanja nevtrofilcev. Tako obe vrsti sinergistično prispevata k tvorbi abscesa. Pri tem je nujno, da sta prisotni obe vrsti, *B. fragilis* in *E. coli* s funkcionalnim genom *hbp*. Hbp se zato pogosteje pojavlja v sevih, ki povzročajo absces kot pri drugih izvenčrevesnih okužbah (Otto in sod., 2002).

2.4.1.8 Hemoglobinska proteaza PicU

Proteaza PicU je homolog proteina Pic iz vrste *Shigella flexneri* in enteroagregativne *E. coli* (Henderson in sod, 1999). Prvič je bila identificirana v uropatogenem sevu CFT073. Gen *picU* je dolg 4,3 kb. Spada med serinske proteaze, avtotransporterje in razgrajuje hemoglobin, mucin, spektrin, pepsin in humani koagulacijski faktor V. S tem pripomore k kolonizaciji epitela urinarnega trakta. Je zunajcelični protein (Parham in sod., 2004).

2.5 KOLICINI

E. coli izdeluje bakteriocine, imenovane kolicini. Bakteriocini so spojine, ki preprečujejo rast sevom iste vrste ali ozko sorodnih vrst. Kolicini so pogosto kodirani v plazmidih. Sinteza kolicionov je uravnana s sistemom SOS, torej celice sintetizirajo kolicine ob okoljskem stresu. Celice jih izločijo tako, da lizirajo. Na zunanji membrani tarčnih celic kolicini prepoznajo določen receptor. Ločimo tri načine delovanja kolicinov: tvorjenje por

v celični membrani, nukleazna aktivnost in razgradnja ali inhibicija sinteze celične stene. Sevi so nanje lahko odporni, tolerantni ali občutljivi (Riley in Wertz, 2002).

2.6 DETERMINANTE ODPORNOSTI PROTI ANTIBIOTIKOM

Antibiotiki so kemijske snovi, ki s svojim delovanjem uničujejo mikroorganizme (baktericidni antibiotiki) ali zavirajo njihovo rast (bakterostatični antibiotiki). So snovi, ki preprečujejo normalno delovanje bakterijske celice z delovanjem na celično steno, citoplazemsko membrano, sintezo proteinov, sintezo nukleinskih kislin ali interferirajo z metabolizmom bakterije (Madigan in sod., 2003).

Mehanizmi odpornosti proti antibiotikom so:

- encim, ki inaktivira antibiotik
- črpalke, ki izločijo antibiotik
- preprečevanje vnosa antibiotika
- spremembra metabolne poti, na katero deluje antibiotik

Odpornost proti antibiotikom pridobijo bakterije z mutacijami (t.i. vertikalna evolucija) ali s horizontalnim prenosom DNA (t.i. horizontalna evolucija). V primeru horizontalne evolucije so genske determinante odpornosti lahko v plazmidih, jih prenašajo fagi ali se prenašajo s transformacijo. Najpogosteje bakterije pridobijo odpornost proti antibiotikom s transformacijo in s plazmidi. Ena ugodna mutacija pomeni, da bakterija lahko nekaj časa preživi, za popolno odpornost proti antibiotiku je ponavadi potrebno spremeniti ali pridobiti celoten gen ali več genov. Mutacije, selekcije in horizontalni prenosi skupaj pripomorejo k hitrim prilagoditvam bakterij na spremembe v okolju, v tem primeru na prisotnost antibiotikov (Tenover, 2006).

V preglednici 1 so prikazane nekatere lastnosti antibiotikov in mehanizmi odpornosti.

Preglednica 1: Nekateri antibiotiki in njihove lastnosti (Charpentier in Tuomanen, 2000; Ruiz, 2003; Silva, 1996).

ANTIBIOTIK	SKUPINA	MEHANIZEM DELOVANJA	MEHANIZEM ODPORNOSTI
ampicilin	beta-laktamski	inhibicija sinteze celične stene	encim beta-laktamaza, spremenjeno tarčno mesto
tetraciklin	tetraciklini	preprečitev sinteze proteinov z vezavo na ribosomsko podenoto 30 S	aktivnen iznos antibiotika
streptomycin	aminoglikozidi	preprečitev sinteze proteinov z vezavo na ribosomsko podenoto 30 S	modifikacija antibiotika, spremenjeno tarčno mesto
kanamicin	aminoglikozidi	preprečitev sinteze proteinov z vezavo na ribosomsko podenoto 30 S	modifikacija antibiotika, spremenjeno tarčno mesto
trimetoprim	diaminopirimidini	preprečitev nastanka folne kisline z vezavo na tetrahidrofolat-reduktazo	spremenjena tetrahidrofolat-reduktaza
kloramfenikol	aromatski	preprečitev sinteze proteinov z vezavo na ribosomsko podenoto 50 S	modifikacija tarčnega mesta
nalidinska kislina	kinoloni	preprečitev sinteze DNA z vezavo na DNA-girazo	spremenjena giraza, aktivnen iznos antibiotika iz celice, zmanjšana propusnost celične membrane

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Bakterijski sevi

Vsi sevi se nahajajo v zbirki Katedre za molekularno genetiko Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

3.1.1.1 Laboratorijski sevi *E. coli* (preglednica 2)

Preglednica 2: Laboratorijski sevi *E. coli*.

sev	Genotip	vir
DH5α	Φ80dlacZΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endAI</i> BRL life <i>recAI hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i>	
MS1013	DH5α s <i>pRK100 (Ap^rTc^r)</i>	M.Starčič Erjavec
HB101	<i>hsdR hsdM recA13 supE44 leuB6 lacZ proA2</i>	D. Erlich
RU4404	MM294::Tn1725 Cm ^r <i>thi endA hsdR</i>	R. Schmitt
RU4406	MM294::Tn1725 Kn ^r <i>thi endA hsdR</i>	R. Schmitt
CL173	Thr leuB proA his argE	B Bachmann

3.1.1.2 Klinični sevi *E. coli*, uporabljeni kot pozitivne kontrole za prisotnost PAI (preglednica 3)

Preglednica 3: Klinični sevi *E. coli*.

sev	Genotip	Vir
536	PAI I ₅₃₆ , PAI II ₅₃₆ , PAI III ₅₃₆ , PAI IV ₅₃₆ , PAI I _{CFT073} , PAI II _{CFT073} ,	E. Moreno Pujol
J96	PAI I _{J96} , PAI II _{J96} PAI I _{CFT073} , PAI II _{CFT073} ,	E. Moreno Pujol

3.1.1.3 Klinični izolati izvenčrevesnih patogenih sevov *E. coli* (sevi DL, TA)

Izolirali so jih na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, bodisi v laboratoriju za bakterijsko diagnostiko (vodja mag. Veronika Križan-

Mergouth) - sevi DL, bodisi v laboratoriju za diagnostiko aerobnih in anaerobnih bakterijskih infekcij (vodja prof.dr., Marija Gubina) - sevi TA. Seve DL, ki jih je 110, so izolirali iz bolnikov z okužbo sečil, 216 sevov TA, pa iz ran podkožja in površja, kroničnih ran in spolovil. Izvor seva podrobneje razлага priloga D.

3.1.1.4 Konjugante seva DH5α *E. coli* (sevi MR in TR) s konjugativnimi plazmidi prenešenimi iz kliničnih izolatov *E. coli* DL in TA

Iz sevov DL je M. Rijavec s konjugacijo prenesel plazmide v sev DH5α (Rijavec, 2004), vseh je bilo 19 in 11 iz sevov TA (preglednica 4).

Preglednica 4: Konjugante seva DH5α *E. coli*.

konjuganta	Opis	odpornost proti antibiotikom
MR2	Konjugativni plazmid iz DL2	ApTp
MR6	Konjugativni plazmid iz DL6	ApTp
MR7	Konjugativni plazmid iz DL7	Ap
MR8	Konjugativni plazmid iz DL8	Tc
MR14	Konjugativni plazmid iz DL14	ApTcKn
MR17	Konjugativni plazmid iz DL 17	Cm
MR22	Konjugativni plazmid iz DL 22	Tp
MR37	Konjugativni plazmid iz DL 37	Ap
MR41	Konjugativni plazmid iz DL 41	Ap
MR43	Konjugativni plazmid iz DL 43	Tp
MR46	Konjugativni plazmid iz DL 46	Sm
MR48	Konjugativni plazmid iz DL 48	Ap
MR56	Konjugativni plazmid iz DL 56	Tc
MR76	Konjugativni plazmid iz DL 76	Ap
MR81	Konjugativni plazmid iz DL 81	Ap
MR84	Konjugativni plazmid iz DL 84	ApTcKnTp
MR108	Konjugativni plazmid iz DL 108	Sm
MR109	Konjugativni plazmid iz DL 109	Tc
MR110	Konjugativni plazmid iz DL 110	Tp
TR10	Konjugativni plazmid iz TA10	Ap
TR49	Konjugativni plazmid iz TA49	ApTp
TR50	Konjugativni plazmid iz TA50	ApTp
TR71	Konjugativni plazmid iz TA71	ApTp
TR74	Konjugativni plazmid iz TA74	ApSm
TR103	Konjugativni plazmid iz TA103	Ap
TR160	Konjugativni plazmid iz TA160	ApTcTp
TR171	Konjugativni plazmid iz TA171	TcSm
TR174	Konjugativni plazmid iz TA174	TcSmTpCm
TR177	Konjugativni plazmid iz TA177	Sm
TR212	Konjugativni plazmid iz TA212	Ap

3.1.2 Gojišča

3.1.2.1 Tekoče gojišče Luria-Bertani (LB)

Za pripravo tekočega gojišča smo v 1 l destilirane vode raztopili 25 g osnove za gojišče LB, odpipetirali v epruvete, ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Do nadaljnje uporabe smo jih shranili pri 4 °C.

3.1.2.2 Trdno gojišče LB

Za pripravo trdnega gojišča smo v 1 l destilirane vode raztopili 25 g osnove za gojišče LB in 15 g agarja, ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo do 50 °C smo ga razlili v plastične petrijevke.

3.1.2.3 Gojišča LB z antibiotiki

Antibiotike smo dodali tekočemu ali trdnemu gojišču po avtoklaviraju v koncentracijah, kot so prikazane v preglednici 5.

Preglednica 5: Koncentracije antibiotikov v gojišču LB.

antibiotik	koncentracija (mg/ml)
ampicilin	100
tetraciklin	100
streptomycin	150
kanamicin	30
trimetoprim	25
kloramfenikol	50
nalidinska kislina	25

3.1.2.4 Mehki agar

V 1 l destilirane vode smo raztopili 25 g osnove gojišča LB in 7 g agarja, odpipetirali v epruvete ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C.

3.1.2.5 Gojišče LB s 30-odstotnim glicerolom

V 1 l destilirane vode smo raztopili 25 g osnove gojišča LB ter dodali 30 % (v/v) glicerola. Gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C.

3.1.3 Kemikalije

BIO-RAD, Hercules, Kalifornia, ZDA

- SDS
- trajna gojišča

Biozym, Oldendorf, Nemčija

- agarozna

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemčija

- agar
- LB

Fermentas, Vilna, Litva

- mešanica dNTP-jev »dNTP mix«
- MgCl₂
- pufer za *Taq* DNA polimerazo z (NH₄)₂SO₄
- standardna lestvica DNA 1-kb, »GeneRuler 1kb Ladder, ready to use«
- standardna lestvica DNA Lambda-19, »Lambda Mix Marker,19«
- nanašalni pufer za DNA

Gibco BRL, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA

- pufer »React 3« za restriktijsko endonukleazo *EcoRI*

Kemika, Zagreb, Hrvaška

- D+ glukoza
- saharozna
- ledocetna kislina

Merck, Darmstadt, Nemčija

- 96-odstotni etanol
- kloroform
- izoamilalkohol
- izopropanol
- NaCl
- bromfenol modro

SIGMA, St. Louis, Missouri, ZDA

- etidijev bromid

- baza TRIS
- borova kislina
- TRIS-HCl
- EDTA
- K-acetat
- NaOH
- fenol
- ksilencianol
- glicerol
- ampicilin
- tetraciklin
- streptomycin
- kanamicin
- trimetoprim
- kloramfenikol
- nalidinska kislina

3.1.4 Encimi

Fermentas, Vilna, Litva

- *Taq*-polimeraza

Gibco BRL, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA

- restriktijska endonukleaza *EcoRI*

3.1.5 Začetni oligonukleotidi

Jena bioscience GmbH, Jena, Nemčija

Preglednica 6: Uporabljeni začetni oligonukleotidi.

oznaka	nukleotidno zaporedje (5'-3')
fyuA 1	TGATTAACCCCGCGACGGGAA
fyuA 2	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA
Irp2 f	AAGGATTGCTGTTACCGGAC
Irp2 r	TCGTCGGGCAGCGTTCTTCT
iroN f	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCG
iroN r	GACGCCGACATTAAGACGCAG
P52-A	GGCTGAGAAATATCAACATCCG
P52-B	ATCGCACATCCGAAGAACGACT
iutA f	GGCTGGACATCATGGAACTGG
iutA r	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG
Aer 1	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT
Aer 2	AATATCTCCTCCAGTCCGGAGAAG
ireA f	TGGTCTTCAGCTATATGG
ireA r	ATCTATGATTGTGTTGGT
Hbp f	GGTGAAGGTACGCTGACGGT
Hbp r	GCGTGACGCTGGAGTTATCT
picU f	TCAGGCCGGTAAGAACAGCAAAAT
picU r	ACGGTAAGAGTGTGGATGGCGGAGTC
iha f	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA
iha r	TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA
I.9	TAATGCCGGAGATTCTATTGTC
I.10	AGGATTGTCAGGGCTTT
orfIup	CATGTCCAAAGCTCGAGC
orfIdown	CTACGTCAGGCTGGCTTT
sfaAI1	CGGGCATGCATCAATTATCTTG
sfaAI2	TGTGTAGATGCAGTCACTCCG
IRP2FP	AAGGATTGCTGTTACCGGAC
IRP2RP	TCGTCGGGCAGCGTTCTTCT
papGIf	TCGTGCTCAGGTCCGGAATT
papGIr	TGGCATCCCACATTATCG
Hlyd	GGATCCATGAAAACATGGTTAATG
Cnf	GATATTGTTGCCATTGGTTACC
RPAi	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA
RPAf	TCGCCACCAATCACAGCGAAC
Cft073.2Ent1	ATGGATGTTGATCGCGC
Cft073.2Ent2	ACGAGCATGTGGATCTGC

3.1.6 Pufri in reagenti

3.1.6.1 Agarozna gelska elektroforeza

- $10 \times$ TBE (0,45 mM tris-borat, 10 mM EDTA)
- elektroforezni agarozni gel (30 ml $0,5 \times$ TBE, agaroza, 1,3 µl etidijevega bromida s koncentracijo 10 mg/ml)
- nanašalni pufer (komercialni ali 0,25 % bromfenol modrega, 0,25 % ksilen cianola, 40 % saharoze)

3.1.6.2 Izolacija plazmidne DNA

- raztopina I (50 mM glukoza, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl, pH 8)
- raztopina II (0,2 M NaOH in 1-odstotni SDS)
- raztopina III (60 ml 5M K-acetata, 11,5 ml ledocetne kisline, 28,5 ml H₂O)
- mešanica fenol-kloroform-izoamilalkohol v razmerju 25:24:1
- izopropanol
- 70-odstotni etanol
- pufer TE z RNAzo

3.1.7 Oprema

- stresalnik (Infors HT, Bottmingen, Švica)
- aparatura za PCR:
 - GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Ontario, Kanada)
 - Biometra UNO II (Biometra, Göttingen, Nemčija)
- namizna centrifuga (Eppendorf centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- centrifuga Rotanta 460R (Hettich AG, Bäch, Švica)
- avtomatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- termoblok Constantemp (Technilab, Los Angeles, Kalifornija, ZDA)
- elektroforeza 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma, Stockholm, Švedska)
- UV transiluminator 2011 Macrovue (LKB Bromma, Stockholm, Švedska)
- termostatirana kopel LBB – »Multi temp II« (Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, ZDA)
- kopel isotemp 215 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, ZDA)

- spektrofotometer UV/VIS Spectrometer (Perkin Elmer, Ontario, Kanada)
- vibracijski stresalnik EV 100 (Tehnica, Železniki, Slovenija)
- sistem za slikanje gelov UVI tec (St. John Innovations Centre, Cambridge, Velika Britanija)
- tehnica exacta 310EB (Tehnica, ŽELEZNIKI, Slovenija)
- tehnica ET-1111 (Tehnica, ŽELEZNIKI, Slovenija)

3.2 METODE

3.2.1 Preverjanje odpornosti sevov *E. coli* proti antibiotikom

Na trdno gojišče LB z antibiotikom smo do posameznih kolonij razmazali eno kolonijo seva *E. coli* in inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo odčitali rezultate. Če je sev rasel pomeni, da je odporen proti določenemu antibiotiku.

3.2.2 Shranitev zbirke izvenčrevesnih patogenih sevov *E. coli*

Seve iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani smo preimenovali, tako da smo jim dali svojo oznako TA in zaporedno številko. Nato smo posamezen sev nacepili v tekoče gojišče LB in inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo odpipetirali 0,75 ml v krioampule in dodali 0,75 ml LB s 30 % glicerola. Shranili smo jih v dveh paralelkah pri –80 °C.

3.2.3 Konjugacija sevov *E. coli*

Na ploščo z gojiščem LB smo razmazali kolonijo recipientskega seva (DH5α, HB101, RU4404 ali RU4406), čez njo kolonijo donorskega izvenčrevesnega patogenega seva TA z odpornostjo proti antibiotiku. Inkubirali smo preko noči pri 37 °C. Zatem smo preverili rast konjugant, ki so pridobile odpornost proti antibiotikom, tako da smo jih nacepili na ustrezna selekcijska trdna gojišča z antibiotiki. Na enaka gojišča smo nacepili tudi donorski in recipientski sev za kontrolo. Inkubirali smo jih preko noči pri 37 °C. Če smo dobili kakšno kolonijo, smo jo precepili na enako gojišče in spet inkubirali preko noči pri 37 °C. Tako dobljene domnevne konjugante smo razmazali na ploščo LB z drugim recipientskim sevom. Ponovili smo postopek konjugacijskega prenosa in selekcije z antibiotiki. Če so konjugante rastle na gojišču z antibiotiki, smo potrdili prisotnost konjugativnega plazmida.

3.2.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

3.2.4.1 Priprava lizata celic za verižno reakcijo s polimerazo

V 5 ml tekočega gojišča LB z ali brez antibiotikov smo nacepili eno kolonijo seva *E. coli*. Inkubirali smo preko noči s stresanjem pri 37 °C. En ml kulture smo odpipetirali v mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 min pri 13000 obr./min (17900 g). Supernatant smo odstranili in resuspendirali celice v 200 µl sterilne destilirane vode. Suspenzijo smo inkubirali 10 min pri 100 °C in nato centrifugirali 10 min pri 13000 obr./min (17900 g). Stopetdest µl supernatanta smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in do uporabe sranili pri -20 °C.

3.2.1.3 Reakcijska mešanica za verižno reakcijo s polimerazo

Petdeset µl reakcijske mešanice je vsebovalo:

- 1 µl začetnega nukleotida 1
- 1 µl začetnega nukleotida 2
- 1 µl 10 mM mešanice dNTP-jev
- 5 µl 10 × pufer za *Taq* DNA-polimerazo z (NH₄)₂SO₄
- 5 µl 25 mM MgCl₂
- 0,2 µl *Taq*-polimeraze
- 10 µl celičnega lizata
- 26,8 µl destilirane sterilne vode

3.2.1.4 Pogoji verižne reakcije s polimerazo

V preglednici 7 so navedeni programi po katerih smo izvajali verižno reakcijo s polimerazo.

Preglednica 7: Programi PCR za pomnoževanje zapisov za sisteme privzema železa in otoke patogenosti.

Tarčni gen	Uporabljeni oligonukleotidi	Dolžina produkta bp	Program
<i>fyuA</i> (jersinijabaktin-receptor)	<i>fyuA</i> 1 <i>fyuA</i> 2	880	94 °C 2,55 min 94 °C 30 s 63 °C 30 s 25 ciklov 72 °C 3 min 72 °C 10 min
<i>Irp2</i> (jersinijabaktin-sintezni gen)	<i>Irp2</i> f <i>Irp2</i> r	280	94 °C 5 min 94 °C 1 min 61 °C 1 min 35 ciklov 72 °C 1 min 72 °C 8 min
<i>iroN</i> (salmohelin-receptor)	<i>iroN</i> f <i>iroN</i> r	665	94 °C 2,5 min 94 °C 30 s 68 °C 30 s 25 ciklov 72 °C 2 min 72 °C 10 min
<i>iroCD</i> (salmohelin-sintezni gen)	P52-A P52-B	971	94 °C 2,55 min 94 °C 30 s 63 °C 1 min 30 ciklov 72 °C 1 min 72 °C 10 min
<i>iutA</i> (aerobaktin-receptor)	<i>iutA</i> f <i>iutA</i> r	302	94 °C 4 min 94 °C 1 min 68 °C 1 min 35 ciklov 72 °C 1 min 72 °C 10 min
<i>iucD</i> (aerobaktin-sintezni gen)	Aer 1 Aer 2	602	94 °C 4,5 min 94 °C 30 s 62 °C 30 s 35 ciklov 72 °C 50 s 72 °C 10 min

Preglednica 8: Programi PCR za pomnoževanje zapisov za sisteme privzema železa in otoke patogenosti.

Tarčni gen	Uporabljeni oligonukleotidi	Dolžina produkta bp	Program
<i>ireA</i> (sideroforni receptor)	ireA f ireA r	415	94 °C 2,5 min 94 °C 30 s 55 °C 1 min 25 ciklov 72 °C 30 s 72 °C 7 min
<i>hbp</i> (hemoglobin proteaza)	hbp f hbp r	925	94 °C 4,5 min 94 °C 30 s 65 °C 1 min 35 ciklov 72 °C 1 min 72 °C 10 min
<i>picU</i> (hemoglobin proteaza)	picU f picU r	372	94 °C 2 min 94 °C 15 s 70 °C 30 s 30 ciklov 72 °C 45 s 72 °C 10 min
<i>iha</i> (sideroforni receptor)	iha f iha r	827	94 °C 4 min 94 °C 30 s 58 °C 30 s 30 ciklov 72 °C 1 min 72 °C 10 min
PAI I ₅₃₆	I.9 I.10	1801	94 °C 5 min 94 °C 1 min 56 °C 1 min 30 ciklov 72 °C 1 min 72 °C 10 min
PAI II ₅₃₆	orfIup orfIdown	1041	94 °C 5 min 94 °C 1 min 62 °C 1 min 30 ciklov 72 °C 1 min 72 °C 10 min

Preglednica 9: Programi PCR za pomnoževanje zapisov za sisteme privzema železa in otoke patogenosti.

Tarčni gen	Uporabljeni oligonukleotidi	Dolžina produkta bp	Program
PAI III ₅₃₆	sfaAI1 sfaAI2	161	94 °C 5 min 94 °C 1 min 63 °C 1 min 72 °C 1 min 72 °C 10 min
PAI IV ₃₅₆	IRP2FP IRP2RP	265	94 °C 5 min 94 °C 1 min 61 °C 1 min 72 °C 1 min 72 °C 10 min
PAI I _{J96}	papGI _f papGI _r	500*	94 °C 5 min 94 °C 30 s 57 °C 30 s 72 °C 1 min 72 °C 10 min
PAI II _{J96}	Hlyd cnf	2390	94 °C 5 min 94 °C 1 min 61 °C 1 min 72 °C 2,5 min 72 °C 10 min
PAI I _{CFT073}	RPAi RPAf	921	94 °C 5 min 94 °C 1 min 63 °C 1 min 72 °C 1 min 72 °C 10 min
PAI II _{cft073}	Cft073.2Ent1 Cft073.2Ent2	420	94 °C 5 min 94 °C 30 s 56 °C 30 s 72 °C 1 min 72 °C 10 min

* Dolžine fragmenta nismo mogli natančno določiti.

3.2.3 Izolacija plazmidne DNA z alkalno denaturacijo

Posamezno kolonijo bakterij smo nacepili v 10 ml gojišča LB in jih inkubirali preko noči s stresanjem pri 37 °C. Kulturo smo nato 5 min centrifugirali pri 8000 obr./min (7000g). Supernatant smo odstranili in celice resuspendirali v 200 µl ledeno hladne raztopine I. Nato smo dodali 400 µl sveže raztopine II in nežno premešali. Inkubirali smo 5 min na ledu in zatem dodali 300 µl ledeno hladne raztopine III in inkubirali 15 min na ledu. Po centrifugiranju 5 min pri 13000 obr./min (17900 g) smo prenesli 800 µl supernatanta v novo mikrocentrifugirko in mu dodali enak volumen mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohola. Sledilo je centrifugiranje 5 min pri 7500 obr./min (6000 g). Zgornjo vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko ter ji dodali enak volumen mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohola. Ponovno smo centrifugirali 5 min pri 7500 obr./min (6000 g), preneseli zgornjo fazo in ji dodali enak volumen kloroforma. Centrifugirali smo 5 min pri 7500 obr./min (6000 g) in odpipetirali zgornjo fazo v novo mikrocentrifugirko. Vodni fazi smo dodali 0,6 kratni volumen izopropanola ter centrifugirali 20 min pri 13000 obr./min (17900 g). Supernatant smo zavrgli in dodali 1 ml 70-odstotnega etanola, zatem smo centrifugirali še 10 min pri 13000 obr./min (17900 g). Odstranili smo supernatant ter osušili DNA v topli sobi in jo raztopili v 20 µl pufra TE z RNAZo s koncentracijo 50µg/ml.

3.2.4 Restrikcija plazmidne DNA

Plazmide smo rezali z encimom *Eco*RI. V restriktijsko mešanico smo odpipetirali 16 µl plazmidne DNA, 2 µl 10 × pufra React, 0,5 µl encima ter 2 µl destilirane vode. Mešanico smo inkubirali 1 h pri 37 °C.

3.2.5 Agarozna gelska elektroforeza

Vzorce smo pred nanosom zmešali z nanašalnim pufrom v razmerju 5:1. Uspešnost pomnoževanja fragmentov genov s PCR smo preverili tako, da smo vzorce vnesli v 1-odstotni agarozni gel. Izolacijo plazmidne DNA smo preverjali v 0,6 ali 0,4-odstotnem agaroznem gelu. V gel smo vnesli rezane in nerezane plazmide. Elektroforeza je tekla pri napetosti 100 V/cm in v 0,5 × pufru TBE. Kot označevalca dolžine smo uporabljali standardno lestvico DNA 1-kb in standardno lestvico DNA Lambda-19.

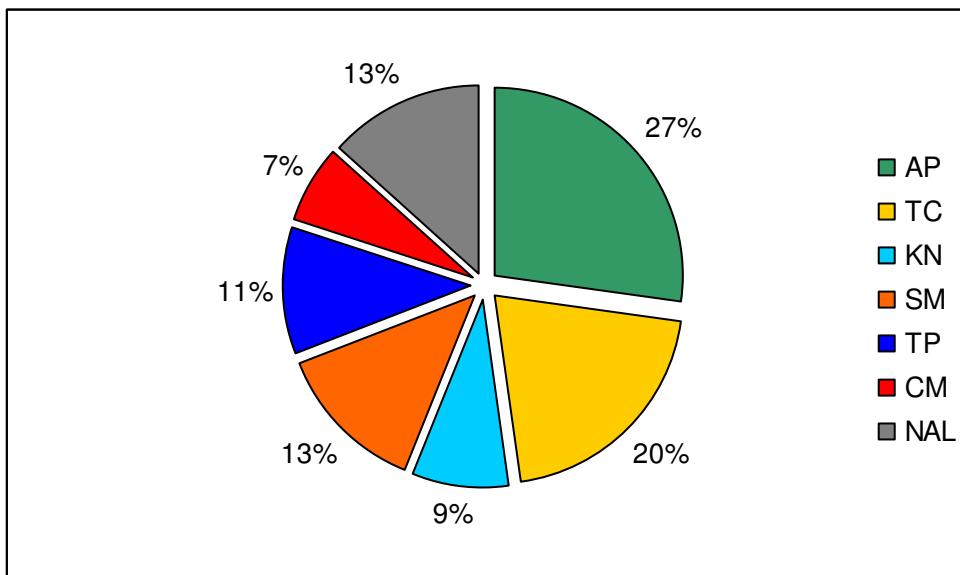
3.2.6 Določanje kolicinogenosti sevov *E. coli*

S sterilnimi zobotrebci smo prepikirali na ploščo gojišča LB kolonije izvornih sevov in konjugant izvenčrevesnih sevov *E. coli*, za katere smo želeli preveriti kolicinogenost. Ploščo smo inkubirali preko noči pri 37 °C. S sterilno zanko smo prenesli indikatorski sev CL173 v 5 ml tekočega gojišča LB. Inkubirali smo na stresalniku preko noči pri 37 °C. Ploščo LB s kolonijami smo v digestoriju izpostavili za 15 min hlapom kloroformu, nakapljanega na staničevino. Lizirane bakterije smo zračili 15 min pri sobni temperaturi, da je kloroform izhlapel. S segrevanjem smo raztopili mehki agar in ga odpipetirali po 4 ml v dve mali epruveti. Epruveti smo inkubirali 10 min pri 46 °C. Ohlajenemu mehkemu agarju smo dodali 200 µl kulture indikatorskega bakterijskega seva, ki je občutljiv za kolicine in z njim prelili lizirane kolonije. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Na ploščah liziranih in z indikatorskim sevom prelitih kolonij so bile vidne cone lize indikatorskega seva okoli kolonij, ki so sintetizirale kolicin.

4 REZULTATI

4.1 ODPORNOST SEVOV TA ExPEC PROTI NEKATERIM ANTIBIOTIKOM

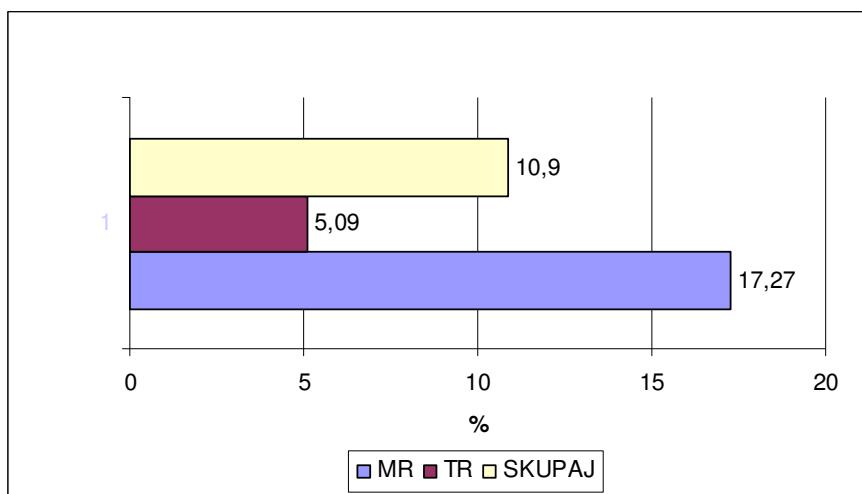
V zbirki TA je 88 (41 %) sevov občutljivih za uporabljeni antibiotiki, 128 (59 %) pa je odpornih proti vsaj enemu antibiotiku. Delež odpornih sevov proti posameznim antibiotikom prikazuje slika 2. Osnova za izračune so rezultati povzeti v prilogi C.



Slika 2: Delež sevov TA zbirke ExPEC odpornih proti posameznemu antibiotiku.

(AP-ampicilin, TC-tetraciklin, KN-kanamicin, SM-streptomicin, TP-trimetoprim, CM-kloramfenikol, NAL-nalidinska kislina)

V zbirki TA je največ, 93 (27 %) sevov odpornih proti ampicilinu, malo manj, 69 (20 %), proti tetraciklinu, sledi 44 (13 %) sevov odpornih proti streptomycinu in 45 (13 %) proti nalidinski kislini, nato 37 (11 %) proti trimetoprimu, nazadnje še 29 (8 %) proti kanamicinu in 23 (7 %) proti kloramfenikolu. Odpornost posameznih sevov proti antibiotikom je bila osnova za konjugacije, v katerih so bili odporni sevi donorji konjugativnih plazmidov. Konjugante smo selezionirali z antibiotiki v gojišču in tako pridobili tiste bakterije, ki so vsebovale le konjugativne plazmide z determinantami odpornosti proti antibiotikom.



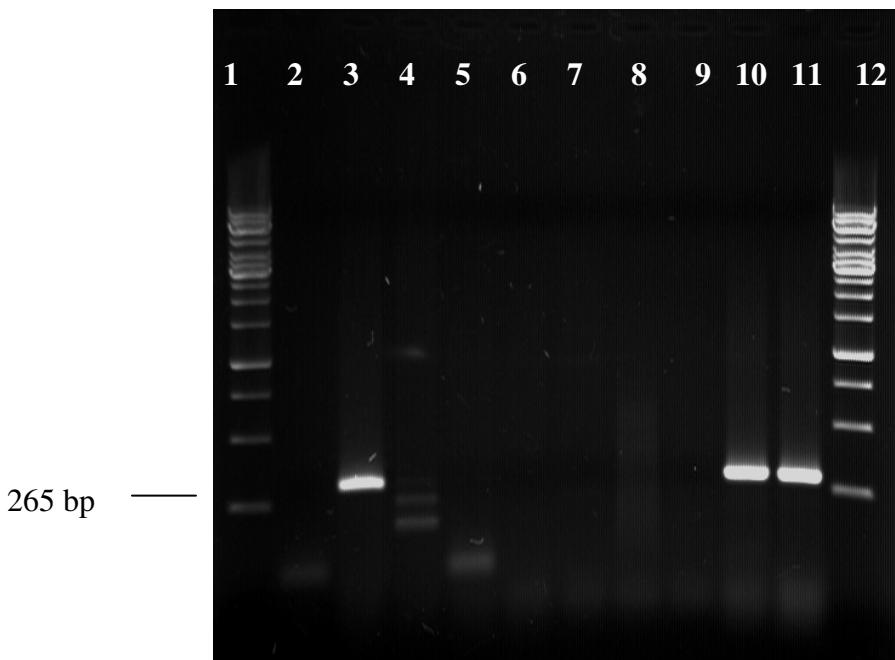
Slika 3 :Delenec donorjev v zbirki ExPEC, ki so dali konjugante.

Na sliki 3 vidimo, da smo uspeli izolirati konjugante le s 30 donorji (11 %) od 326 izhodnih sevov ExPEC. Iz zbirke uropatogenih sevov DL, ki jih je 110, je bilo 19 (17 %) donorjev (konjugante so sevi MR), iz zbirke neuropatogenih ExPEC TA, ki jih je skupno 216, pa le 11 (5 %) donorjev (konjugante so sevi TR).

4.2 PRISOTNOST OTOKOV PATOGENOSTI V KONJUGATIVNIH PLAZMIDIH SEVOV ExPEC

4.2.1 PAI I₅₃₆-IV₅₃₆

S PCR smo preverili prisotnost delov genov otokov patogenosti v donorskih sevih in konjugantah, ki smo jih izolirali (poglavlje 4.1). Pri nobenem preiskanem sevu nismo uspeli namnožiti delov otokov PAI I₅₃₆, PAI II₅₃₆ in PAI III₅₃₆. Edino v primeru zapisa PAI IV₅₃₆ smo dobili produkte PCR pri 20 (66 %) donorskih in 17 konjugantah (57 %) sevov ExPEC. Tako lahko predpostavimo, da je PAI IV₅₃₆ prisoten v 57 % konjugativnih plazmidov, v nekaterih sevih pa je prisoten v kromosomu. Glede na rezultate lahko rečemo, da je v naši zbirki ExPEC PAI IV₅₃₆ večinoma v konjugativnih plazmidih. Slika 4 prikazuje primer agarozmega elektroforeznega gela za preverjanje prisotnosti PAI IV₅₃₆.



Slika 4: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti delov genov otoka patogenosti PAI IV₅₃₆. Produkte PCR smo vnesli v 1-odstotni agarozni gel in jih po elektroforezi pogledali pod UV lučjo (1,12-standardna lestvica DNA 1-kb, 2-negativna kontrola z vodo, 3-pozitivna kontrola (sev 536), 4-sev DH5α negativna kontrola, 5-sev MR8, 6-DL7, 7-MR7, 8-DL6, 9-MR6, 10-DL2 in 11-MR2). Seva MR2 in DL2 imata del zapisa PAI IV₅₃₆, sevi 6,7,in 8 ne. Fragmenti standardne lestvice DNA 1-kb so: 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp. Levo od slike je označena dolžina produkta PCR.

SEV	PAI I	PAI II	PAI III	PAI IV
2				
6				
7				
8				
14				
17				
22				
37				
41				
43				
46				
48				
56				
76				
81				
84				
108				
109				
110				
10				
49				
50				
71				
74				
103				
160				
171				
174				
177				
212				

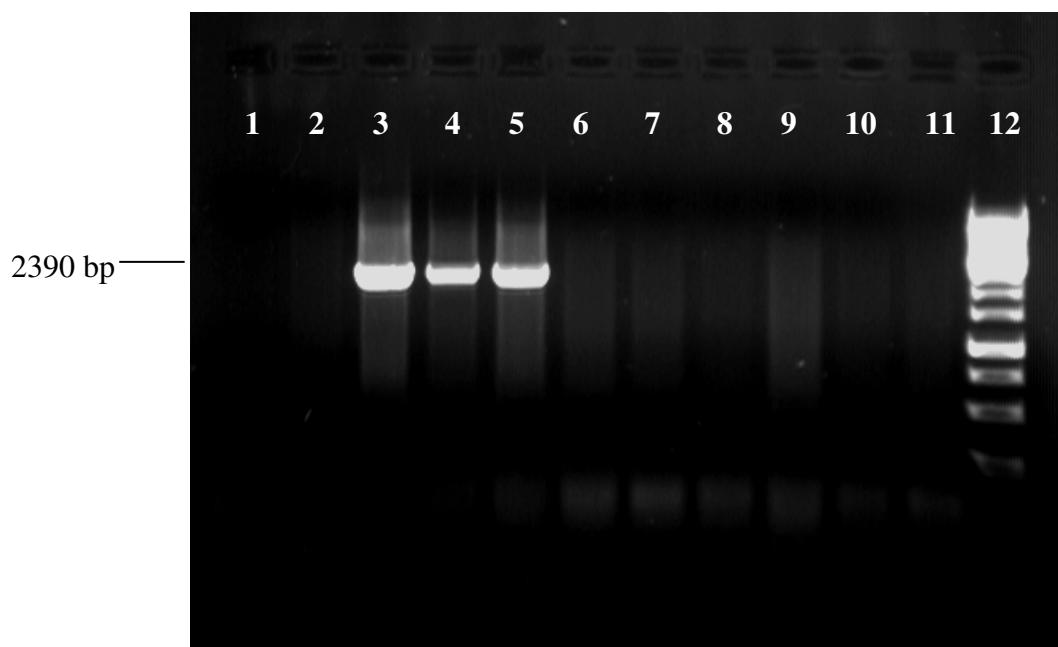
Slika 5: Prisotnost delov genov otokov patogenosti PAI I₅₃₆-IV₅₃₆ v posameznem sevu ExPEC.

Oranžna barva pomeni, da je PAI prisoten v donorskem sevu, modra, da je PAI prisoten v konjuganti. Prazno polje pomeni, da sev nima PAI.

Na sliki 5 vidimo porazdelitev PAI I₅₃₆-IV₅₃₆ v naši zbirki donorskih sevov in konjugant. Kot je razvidno so PAI prisotni v nekaterih donorskih sevih vendar ne v vseh konjugantah. Kar pomeni, da so zapisi PAI v nekaterih konjugativnih plazmidih.

4.2.2 PAI I_{J96}-II_{J96}

Dele genov PAI I_{J96} smo uspeli namnožiti le pri donorskih sevih, samo 1 (3 %) sev ga ima. To pomeni, da PAI I_{J96} ni prisoten v konjugativnih plazmidih. Dele genov PAI II_{J96} smo uspeli namnožiti tako pri donorskih sevih kot konjugantah, pri obeh pri 1 (3 %) sevu, kar pomeni, da je PAI II_{J96} zapisan v 3% konjugativnih plazmidov. Slika 6 nam prikazuje primer agaroznega elektroforeznega gela za preverjanje prisotnosti dela PAI II_{J96}.



Slika 6: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti delov genov otoka patogenosti PAI II_{J96}.

Produkte PCR smo vnesli v 1-odstotni agarozni gel in jih po elektroforezi pogledali pod UV lučjo (1-negativna kontrola z vodo , 2-sev DH5α, 3-počitivna kontrola J96, 4-sevDL110, 5-sev MR110, 6-DL109, 7-MR109, 8-DL108, 9-MR108, 10-DL84, 11-MR84 in 12-standardna lestvica DNA 1-kb). Seva MR110 in DL110 imata del zapisa PAI, sevi 109,108,84 pa ne. Fragmenti standardne lestvice DNA 1-kb so: 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp. Levo od slike je označena dolžina produkta PCR.

SEV	PAI I	PAI II
2		
6		
7		
8		
14		
17		
22		
37		
41		
43		
46		
48		
56		
76		
81		
84		
108		
109		
110		
10		
49		
50		
71		
74		
103		
160		
171		
174		
177		
212		

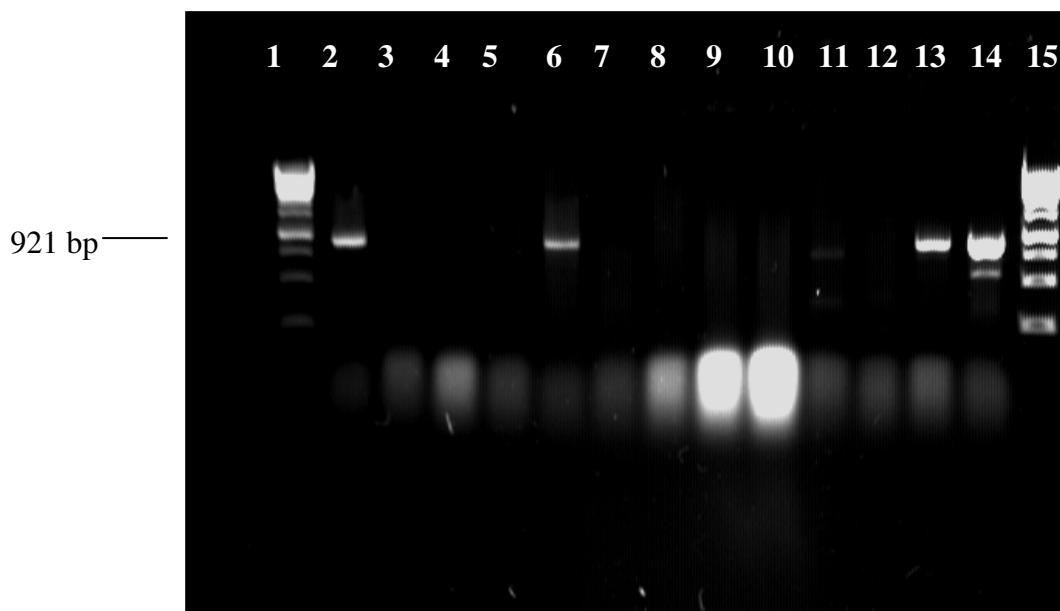
Slika 7: Prisotnost delov genov PAI I-II_{J96} v posameznem sevu ExPEC.

Oranžna barva pomeni, da je PAI prisoten v donorskem sevu, modra, da je PAI prisoten v konjuganti. Prazno polje pomeni, da sev nima PAI.

Na sliki 7 vidimo prisotnost delov genov PAI v posameznem sevu. PAI I ni prisoten v nobenem sevu, PAI II pa samo v enem donorskem in v eni konjuganti. To pomeni, da je zapis PAI II_{J96} v enem konjugativnem plazmidu.

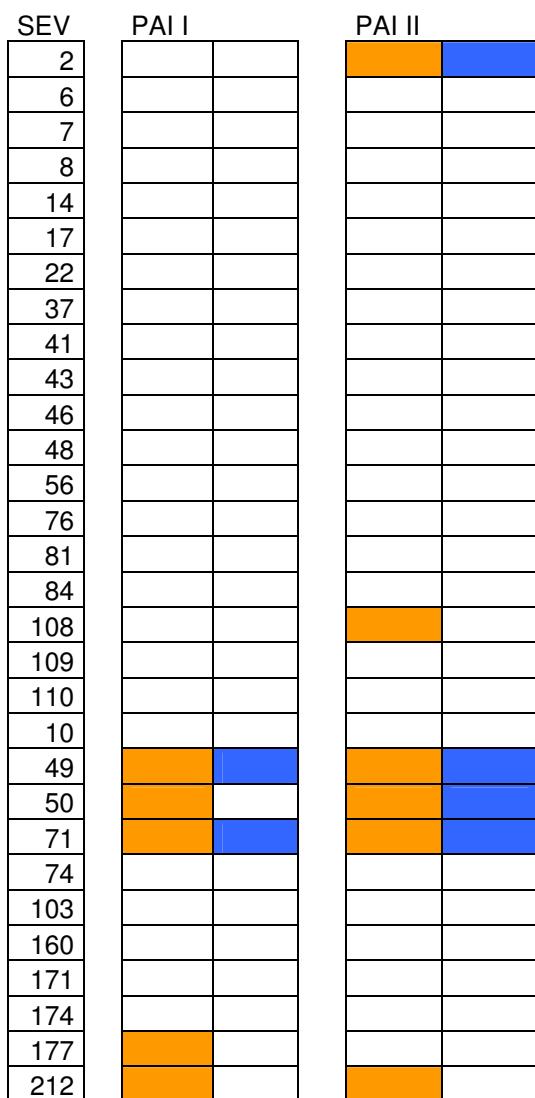
4.2.3 PAI I_{CFT073}-II_{CFT073}

Dele genov PAI I_{CFT073} smo uspeli namnožiti pri 5 (17 %) donorskih sevih in pri 2 (7 %) konjugantah sevov. Dele genov PAI II_{CFT073} smo uspeli namnožiti pri 6 (20 %) donorskih sevih v sevih in pri 4 (13 %) konjugantah sevov. Slika 8 nam prikazuje primer agaroznega elektroforeznega gela za preverjanje prisotnosti dela PAI I_{CFT073}.



Slika 8: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti delov genov otoka patogenosti PAI I_{CFT073}.

Produkte PCR smo vnesli v 1-odstotni agarozni gel in jih po elektroforezi pogledali pod UV lučjo (1, 15-standardna lestvica DNA 1-kb, 2-pozitivna kontrola CFT073, 3-negativna kontrola z vodo, 4-sev DH5 α , negativna kontrola, 5-sev TR177, 6-TA177, 7-TR171, 8-TA171, 9-TR160, 10-TA160, 11-TR74, 12-TA74, 13-TR71, 14-TA71). Sevi TA177, TA71 in TR71 imajo zapis dela PAI, sevi 171,160 in 74 pa ne. Fragmenti standardne lestvice DNA 1-kb so: 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp. Levo od slike je označena dolžina produkta PCR.



Slika 9: Prisotnost delov genov PAI I-II_{CFT073} v posameznem sevu ExPEC.

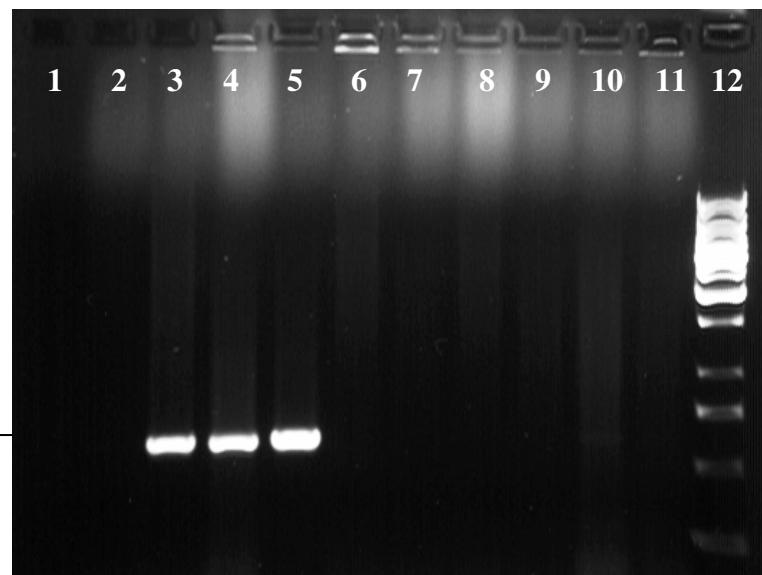
Oranžna barva pomeni, da je PAI prisoten v donorskem sevu, modra, da je PAI prisoten v konjuganti. Prazno polje pomeni, da sev nima PAI.

Slika 9 prikazuje prisotnost delov genov PAI I in II_{CFT073}. Pri nekaterih sevih je PAI prisoten v konjugativnem plazmidu, pri drugih ne.

4.3 PRISOTNOST ZAPISOV ZA SISTEME PRIVZEMA ŽELEZA V KONJUGATIVNIH PLAZMIDIH SEVOV ExPEC

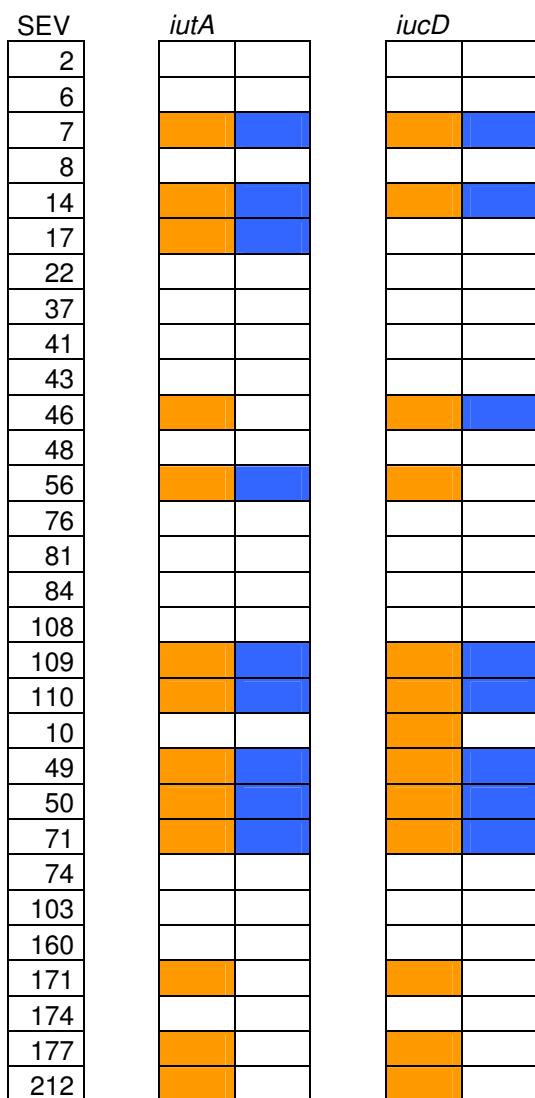
4.3.1 Aerobaktinski sistem

V primeru ugotavljanja pogostosti pojavljanja zapisov za aerobaktinski sistem privzema železa smo zasledovali prisotnost dveh genov: *iutA*, ki je gen za zunanjemembranski receptor in *iucD*, ki je eden od genov za biosintezo. Rezultati PCR so dali produkte obeh genov *iutA* in *iucD* pri 13 (43 %) donorskih sevih. Pri konjugantah smo uspeli namnožiti oba gena v 8 (26%) sevov. To pomeni, da imajo vsi sevi tako receptor kot tudi sintezne gene za aerobaktin. Razvidno je, da je v večini primerov zapis za aerobaktinski sistem v konjugativnih plazmidih. Na sliki 10 je primer agaroznega elektroforeznega gela za preverjanje produktov PCR gena *iucD*.



Slika 10: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti gena *iucD*.

Produkte PCR smo vnesli v 1-odstotni agarozni gel in jih po elektroforezi pogledali pod UV lučjo (1-negativna kontrola z vodo, 2-negativna kontrola sev DH5α 3-pozitivna kontrola MS1013, 4-sev DL109, 5-sev MR109, 6-sev DL108, 7-sev MR108, 8-sev DL84, 9-sev MR84, 10-sev DL81, 11-sev MR81, 12-standardna lestvica DNA 1-kb). Seva DL108 in MR108 imata gen *iucD*, ostali ne. Fragmenti standardne lestvice DNA 1-kb so: 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp. Levo od slike je označena dolžina produkta PCR.

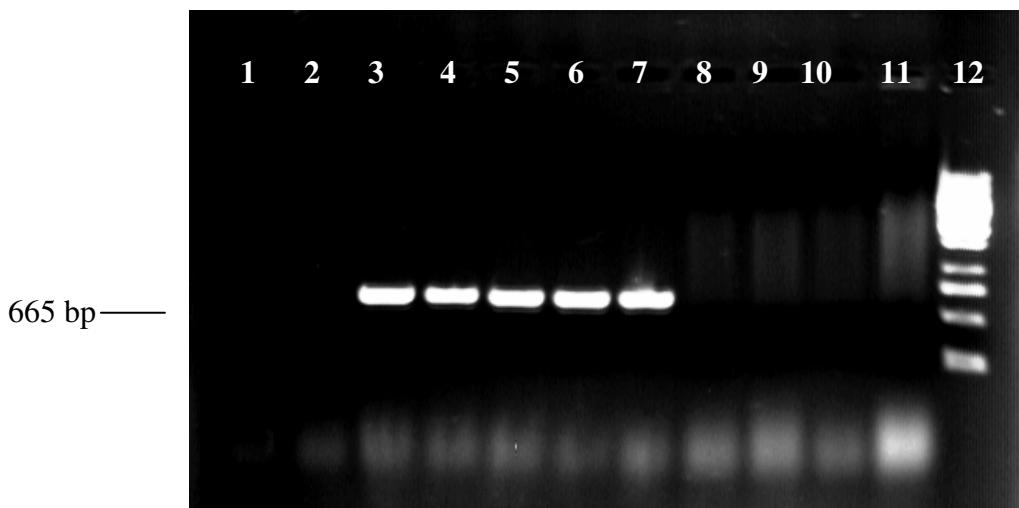


Slika 11: Prisotnost genov za aerobaktinski sistem privzema železa v posameznem sevu ExPEC. Oranžna barva pomeni, da je gen prisoten v donorskem sevu, modra, da je gen prisoten v konjuganti. Prazno polje pomeni, da sev nima gena.

Iz slike 11 je razvidno, da imajo nekateri sevi sistem zapisan v kromosomu, večinoma pa v plazmidu. Nekateri sevi imajo samo zapis za aerobaktinski receptor in ne zapisa za sintezo.

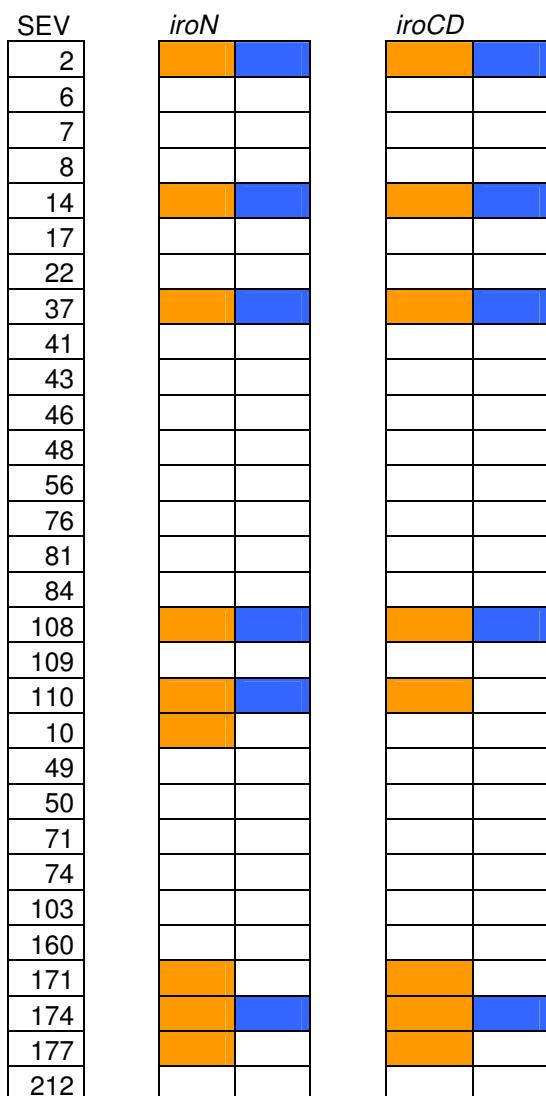
4.3.2 Salmohelinski sistem

S PCR smo uspeli namnožiti gen za receptor salmohelina *iroN* pri 9 (30 %) donorskih sevih in gen za sintezo *iroCD* pri 8 (27 %) donorskih sevih. To pomeni, da nekateri sevi uporabljajo salmohelin, ki ga niso sami sintetizirali, ampak ga je sintetiziral nek drug sev. Vzporedni so rezultati pri konjugantah, saj smo uspeli namnožiti gen za receptor pri konjugantah 6 (20 %) sevov, gen za sintezo pa pri konjugantah 5 (17 %) sevov. Zanimivo je, da je tudi v tem primeru sistema privzema železa le ta večinoma zapisan v konjugativnih plazmidih. Na sliki 12 je primer agaroznega elektroforeznega gela za preverjanje produktov PCR gena *iroN*.



Slika 12: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti gena *iroN*.

Produkte PCR smo vnesli v 1-odstotni agarozni gel in jih po elektroforezi pogledali pod UV lučjo (1-negativna kontrola z vodo, 2-negativna kontrola sev DH5α 3-pozitivna kontrola MS1013, 4-sev DL110, 5-sev MR110, 6-sev DL108, 7-sev MR108, 8-sev DL56, 9-sev MR56, 10-sev DL8, 11-sev MR8, 12-standardna lestvica DNA 1-kb). Sevi DL110, MR110, DL108 in MR108 imajo gen *iroN*, ostali ne. Fragmenti standardne lestvice DNA 1-kb so: 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp. Levo od slike je označena dolžina produkta PCR.

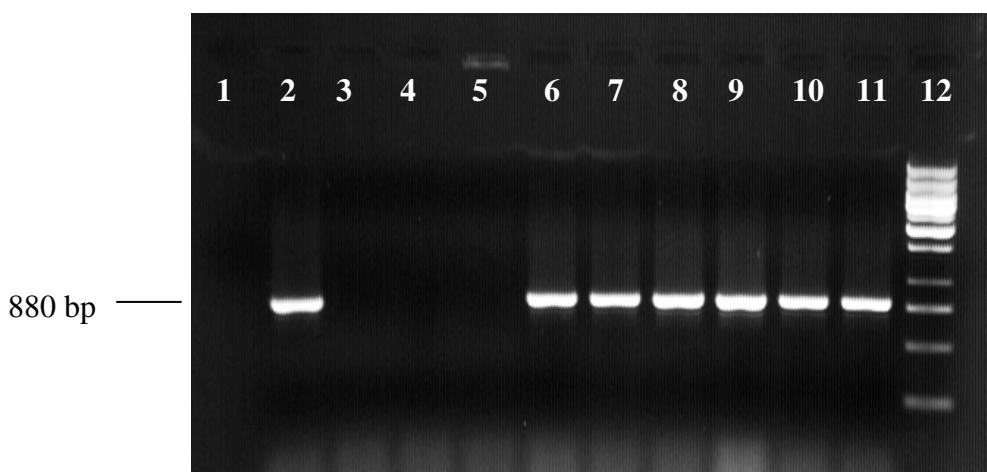


Slika 13: Prisotnost genov za salmohelinski sistem privzema železa v posameznem sevu ExPEC. Oranžna barva pomeni, da je gen prisoten v donorskem sevu, modra, da je gen prisoten v konjuganti. Prazno polje pomeni, da sev nima gena.

Iz slike 13 je razvidno, da imajo sevi salmohelinski sistem zapisan tudi v plazmidu. Nekateri sevi imajo samo gen za salmohelinski receptor in ne genov za sintezo.

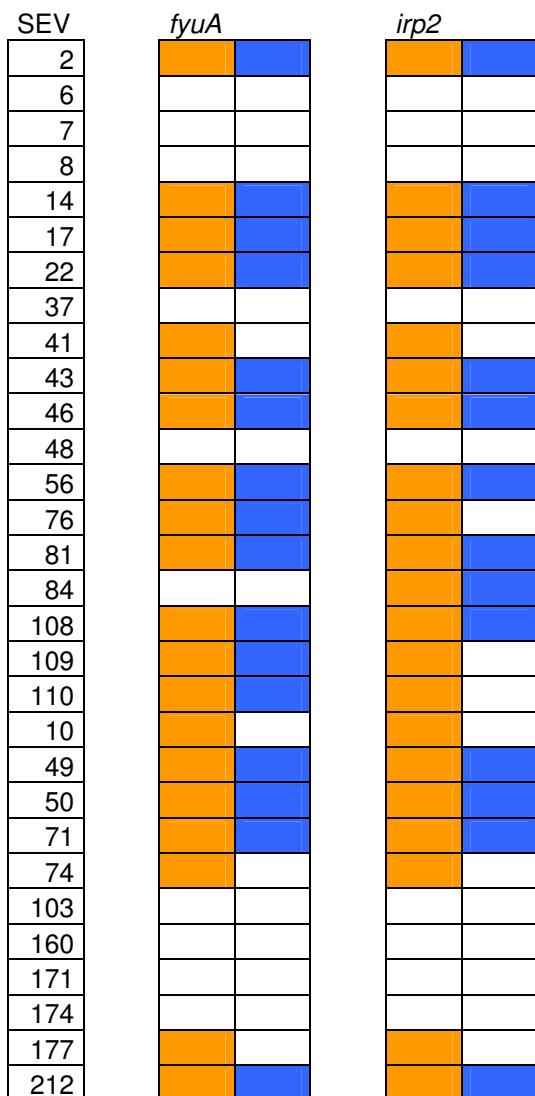
4.3.3 Jersinijabaktinski sistem

Za jersinijabaktinski sistem smo uspeli namnožiti gen *fyuA* za zunanjemembranski receptor pri 20 (67 %) donorskih sevih in pri 16 (53 %) konjugantah. Presenetljivo malce več kot gena za receptor smo uspeli namnožiti gena *irp2* za sintezo jersinijabaktina, pri 21 donorskih sevih (70 %) in pri konjugantah 14 (47 %) sevov. Višji odstotek konjugant je imelo gen za receptor kot gen za sintezo jersinijabaktina. Večji delež donorskih sevov je imelo zapis za sintezo kot gen za receptor. Jersinijabaktinski sistem je večinoma zapisan v konjugativnih plazmidih. Gen za receptor smo zasledili v konjugativnem plazmidu pri 53 % sevov, gen za sintezo pa pri 46 % sevov.



Slika 14: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti gena *fyuA*.

Produkte PCR smo vnesli v 1-odstotni agarozni gel in jih po elektroforezi pogledali pod UV lučjo (1-negativna kontrola z vodo, 2-počitivna kontrola 536, 3-negativna kontrola sev DH5α, 4-sev DL37, 5-sev MR37, 6-sev DL22, 7-sev MR22, 8-sev DL17, 9-sev MR17, 10-sev DL14, 11-sev MR14, 12-standardna lestvica DNA 1-kb). Sevi DL22, MR22, DL17, MR17, DL14 in MR14 imajo gen *fyuA*, ostala dva ne. Fragmenti standardne lestvice DNA 1-kb so: 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp. Levo od slike je označena dolžina produkta PCR.



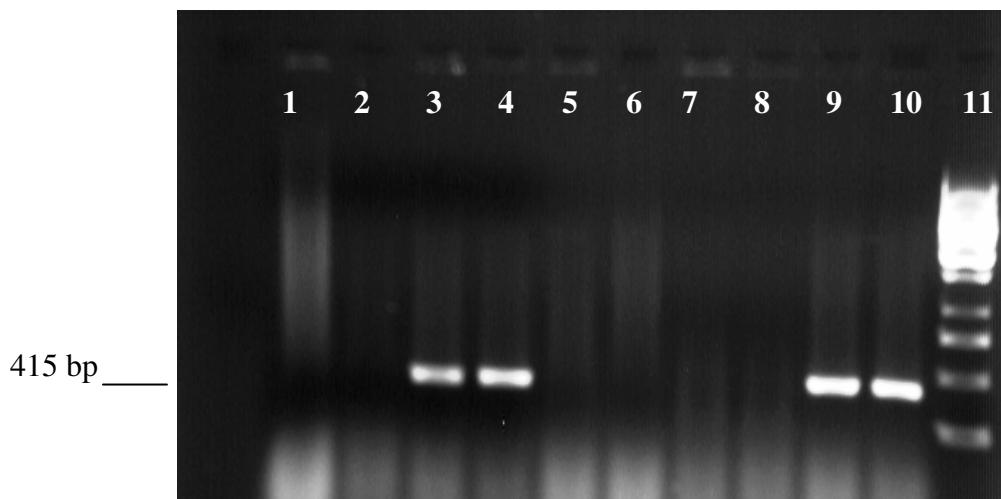
Slika 15: Prisotnost genov za jersinijabaktinski sistem privzema železa v posameznem sevu ExPEC.

Oranžna barva pomeni, da je gen prisoten v donorskem sevu, modra, da je gen prisoten v konjuganti. Prazno polje pomeni, da sev nima gena.

Iz slike 15 je razvidno, da so v nekaterih sevih geni za jersinijabaktin v konjugativnem plazmidu. Sev (84) ima samo sintezni gen in ne zapisa za receptor, kar je nenavadno.

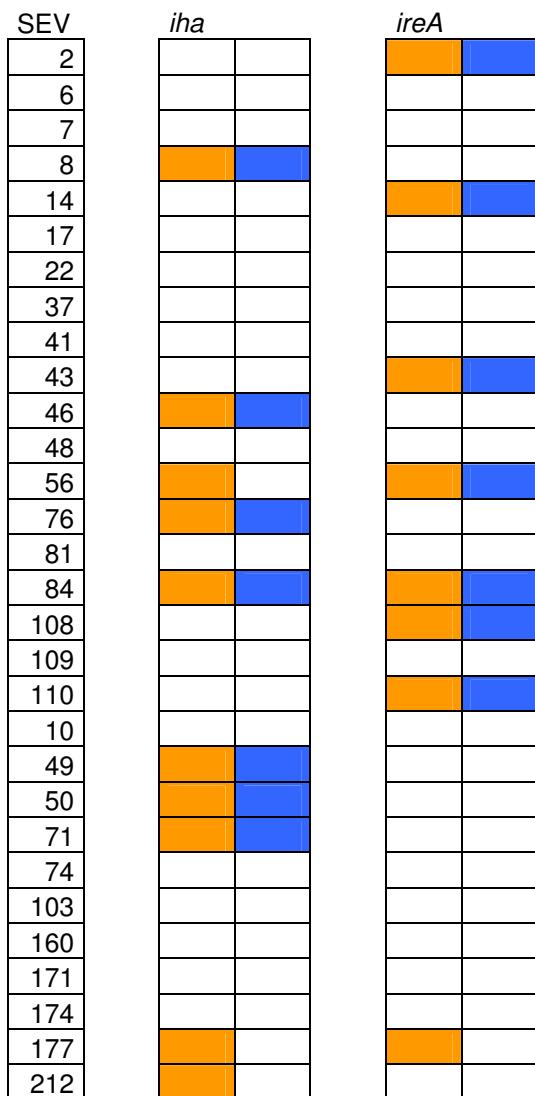
4.3.4 Sideroforna receptorja Iha in IreA

Gen *iha* za sideroforni receptor smo uspeli pomnožiti pri 10 (33 %) donorskih sevih in pri konjugantah 7 (23 %) sevov. Gen *iha* je v 23 % zapisan v konjugativnem plazmidu. Gen *ireA* smo uspeli pomnožiti pri 8 (27 %) donorskih sevih in pri konjugantah 7 (23 %) sevov. Slika 16 nam prikazuje primer agaroznega elektroforeznega gela za preverjanje produktov PCR gena *ireA*.



Slika 16: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti gena *ireA*.

Produkte PCR smo vnesli v 1-odstotni agarozni gel in jih po elektroforezi pogledali pod UV lučjo (1-negativna kontrola z vodo, 2-negativna kontrola sev DH5α, 3-sev DL14, 4-sev MR14, 5-sev DL7, 6-sev MR7, 7-sev DL6, 8-sev MR6, 9-sev DL2, 10-sev MR2, 11-standardna lestvica DNA 1-kb). Sevi DL14, MR14, DL2 in MR2 imajo gen *ireA*, ostali ne. Fragmenti standardne lestvice DNA 1-kb DNA so: 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp. Levo od slike je označena dolžina produkta PCR.



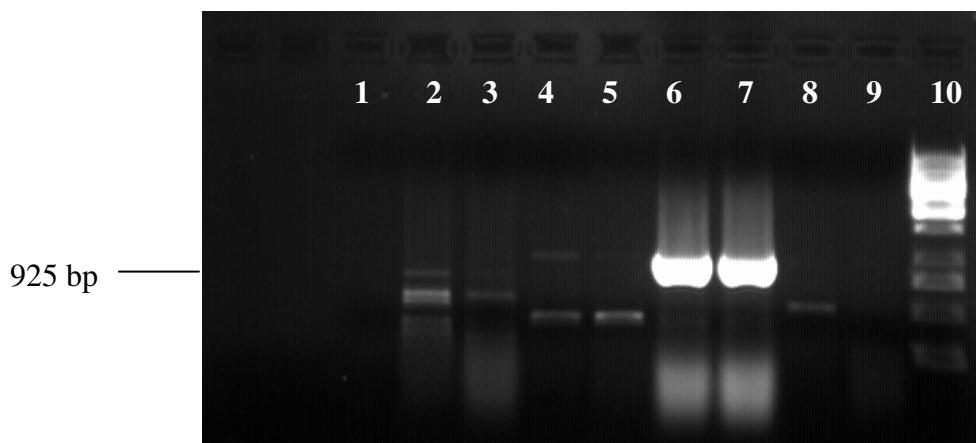
Slika 17: Prisotnost genov *iha* in *ireA* za sideroforma receptorja v posameznem sevu ExPEC.

Oranžna barva pomeni, da je gen prisoten v donorskem sevu, modra, da je gen prisoten v konjuganti. Prazno polje pomeni, da sev nima gena.

Iz slike 17 je razvidno, da sta receptorja večinoma zapisana v konjugativnih plazmidih.

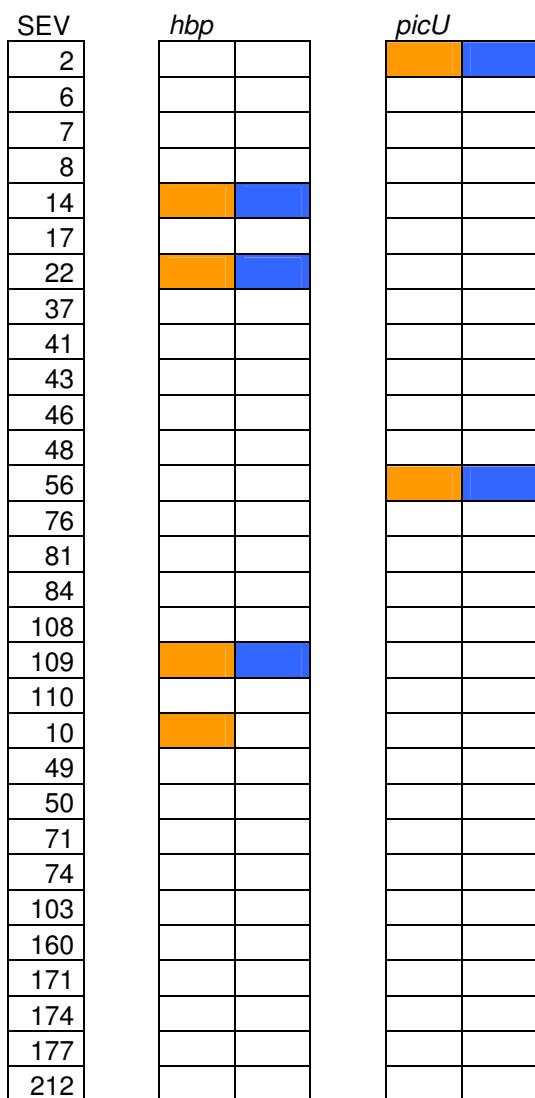
4.3.5 Avtotransporterski hemoglobinski proteazi Hbp in PicU

Gen *hbp* za hemoglobinsko proteazo smo uspeli pomnožiti pri 4 (13 %) donorskih sevih in pri konjugantah 3 (10 %) sevov. Gen *picU* smo uspeli pomnožiti pri 2 (7%) donorskih sevih in konjugantah 2 (7%) sevov. Slika 18 nam prikazuje primer agaroznega elektroforeznega gela za preverjanje produktov PCR gena *hbp*.



Slika 18: Agarozni elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti gena *hbp*.

Produkte PCR smo vnesli v 1-odstotni agarozni gel in jih po elektroforezi pogledali pod UV lučjo (1-negativna kontrola z vodo, 2-negativna kontrola sev DH5α, 3-sev MS1013, 4-sev DL110, 5-sev MR110, 6-sev DL109, 7-sev MR109, 8-sev DL108, 9-sev MR108, 10-standardna lestvica DNA 1-kb). Seva DL109 in MR109 imata gen *hbp*, ostali ne. Fragmenti standardne lestvice DNA 1-kb so: 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp. Levo od slike je označena dolžina produkta PCR.



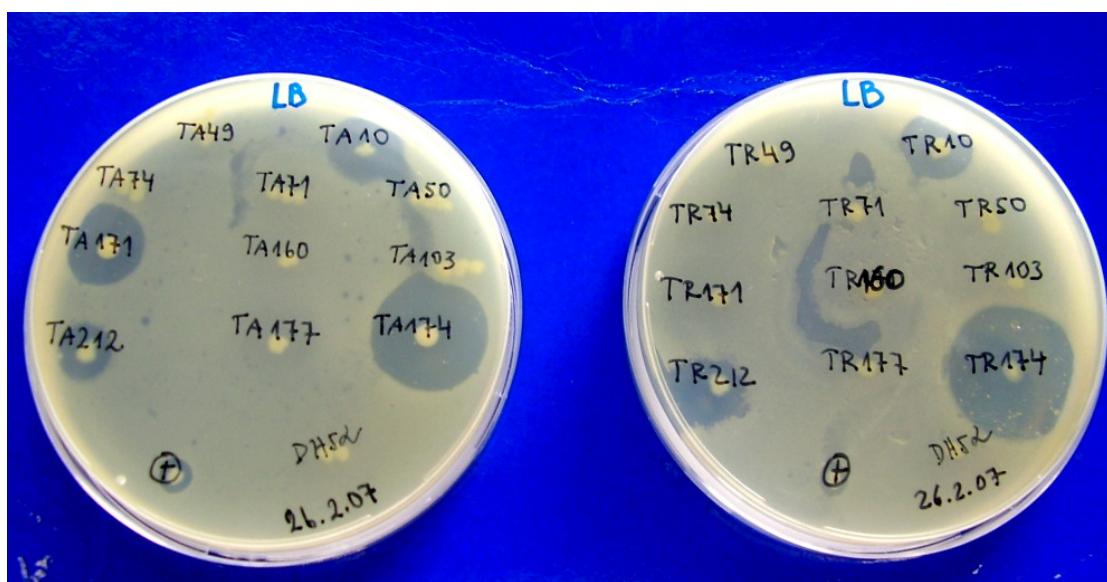
Slika 19: Prisotnost genov *hbp* in *picU* za avtotransporterski proteazi v posameznem sevu ExPEC.

Oranžna barva pomeni, da je gen prisoten v donorskem sevu, modra, da je gen prisoten v konjuganti. Prazno polje pomeni, da sev nima gena.

Na sliki 19 vidimo, da je sevov, ki bi imeli gena *hbp* in *picU*, malo. Gena sta večinoma konjugativnih plazmidih.

4.4 PRISOTNOST KOLICINOV V KONJUGATIVNIH PLAZMIDIH SEVOV TA ExPEC

V zbirki so bili kolicinogeni 4 donorski sevi TA in konjugante 3 sevov, medtem ko je bilo v zbirki DL kolicinogenih 11 donorskih sevov in konjugante 11 sevov. Skupno je bilo kolicinogenih 15 (50 %) donorskih sevov in konjugante 14 (47 %) sevov. Na sliki 20 vidimo kolicinski test na ploščah. V preglednici 8 so navedeni števila in odstotki kolicinogenih donorskih sevov in njihovih konjugant. Rezultati testa kolicinogenosti so v prilogi E.



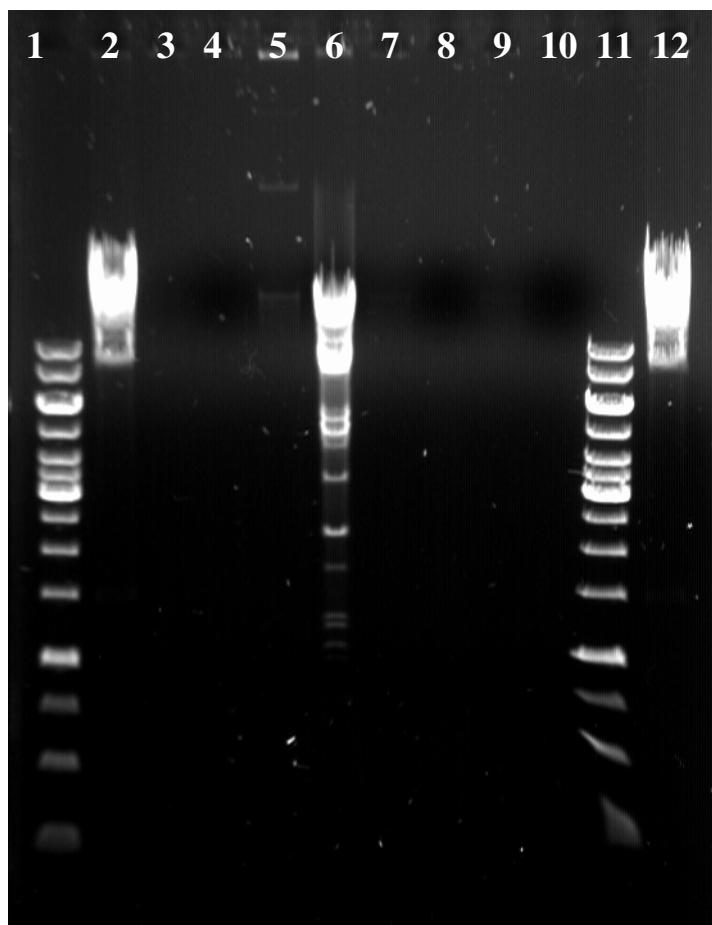
Slika 20: Test produkcije kolicinov donorskih sevov TA in konjugant TR.

Preglednica 10: Število in odstotek kolicinogenih sevov v zbirki ExPEC.

sev	N	kolicinogeni sevi	% kolicinogenih sevov
TA	11	4	36
TR	11	3	27
DL	19	11	58
MR	19	11	58
donorji	30	15	50
konjugante	30	14	47

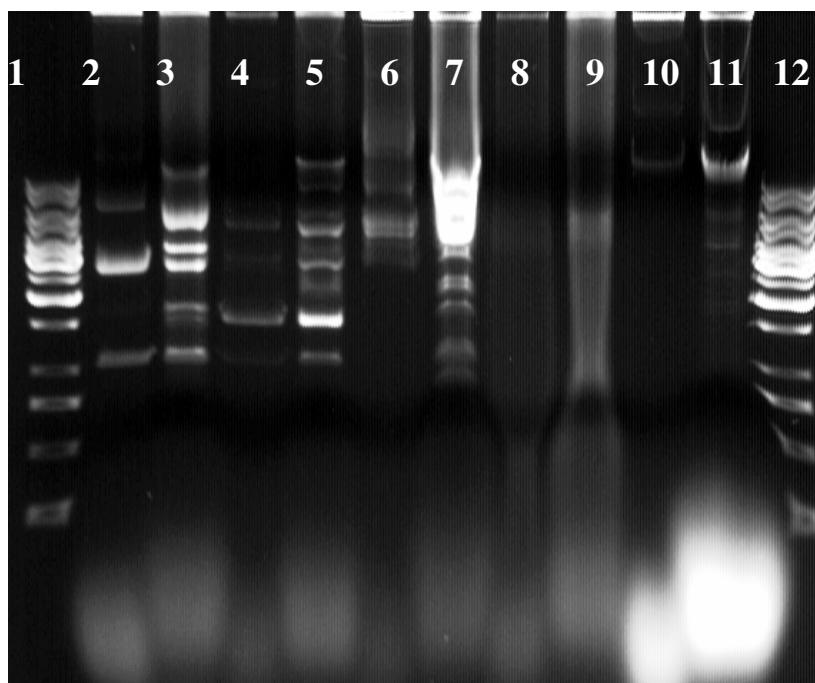
4.5 IZOLACIJA KONJUGATIVNIH PLAZMIDOV SEVOV ExPEC

Iz konjugant MR in TR smo z alkalno lizo izolirali plazmidno DNA in jo rezali z encimom *Eco*RI. Razrezano in nerazrezano plazmidno DNA smo vnesli v agarozni elektroforezni gel in odčitali približno dolžino fragmentov po restrikciji (sliki 21, 22).



Slika 21: Elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti plazmidov v sevih TR.

Razrezano in nerazrezano plazmidno DNA smo vnesli v 0,5-odstotni agarozni gel ter po elektroforezi pregledali pod UV lučjo (1,11-standardna lestvica DNA 1-kb, 2,12-standardna lestvica DNA Lambda-19, 3,4,7,8,9,10-neuspela izolacija plazmida, 5-nerazrezan plazmid TR177, 6- razrezan plazmid iz TR177). Fragmenti standardne lestvice DNA 1-kb: 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp.



Slika 22: Elektroforezni gel za preverjanje prisotnosti plazmidov v sevih MR.

Razrezano in nerazrezano plazmidno DNA smo vnesli v 0,5 % agarozni gel ter po elektroforezi pregledali pod UV lučjo (1,12-standardna lestvica DNA 1-kb, 2-nerazrezana MR109, 3-razrezana MR109, 4-nerazrezana MR84, 5-razrezana MR84, 6-nerazrezana MR76, 7-razrezana MR76, 8-nerazrezana MR56, 9-razrezana MR56, 10-nerazrezana MR46, 11-razrezana MR46). Fragmenti standardne lestvice DNA 1-kb so: 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp.

Iz pridobljenih podatkov o dolžinah fragmentov po restrikciji smo določili približno velikost konjugativnih plazmidov. Približne velikosti so zbrane v preglednici 9.

Preglednica 11: Dejanske dolžine fragmentov konjugativnih plazmidov po restrikciji in ocenjena velikost plazmidov.

SEV	fragmenti bp	Velikost plazmida (bp)
DL2	800,1200,2000,2200,4000,5000, 7000, 13000	35400
DL6		
DL7	verjetno 2 plazmida: 7000, 10000; 1000, 1500, 2000	18800
DL8		
DL14	700, 900,1100,1200,2000, 2500, 3000, 4000,4500,10000,13000	43500
DL17	verjetno 2 plazmida	
DL22	1500	
DL37	en velik plazmid	
DL41		
DL43		
DL46	3000, 3500, 4500, 6000, >10000	27000
DL48		
DL56	750,1100,1400, 1500, 2000,2500, 6000, 7000, 12000	34250
DL76	750,1000,1200,2500, 3000,3500, 5000, 6000, 8000, 10000	49500
DL81	1600, 1800	3400
DL84	1000, 1600, 2500, 3000, 4000, 8000,12000	32100
DL108	1500, 2000, 5000	8500
DL109	1200, 1500, 1800, 3000, 4000, 6000, 13000	30500
DL110	750,1300,1500, 1800,3000, 6000,10000, 15000	39550
TA 10		
TA49		
TA50	5000, 6000, 7000, 8000, 10000, 3<10000	72000
TA71		
TA74		
TA103	6000, 8000, 10000, 2<10000	47000
TA160	4000, 6000	10000
TA171	4000, 10000, <10000	25000
TA174		
TA177	1000, 1200, 1300, 1750, 2250, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000	44000
TA212	6000, 10000	16000

Kjer v preglednici 9 ni navedene dolžine fragmentov, plazmida nismo uspeli izolirati.

Iz pridobljenih podatkov pomnoževanja DNA in produktov PCR za posamezen sev, smo ocenili tudi teoretično velikost plazmidov. Sešeli smo približne dolžine genskih zapisov v bp, ki smo jih poiskali v literaturi. Rezultati so podani v preglednici 10.

Preglednica 12: Opis konjugativnih plazmidov zbirke ExPEC in njihova teoretična velikost.

SEV	Odpornost proti antibiotiku, zapisana v konjugativnem plazmidu	namnoženi genski zapisi v konjugativnem plazmidu	teoretična velikost plazmida (bp)
DL2	ApTp	<i>iroN, iroCD, fyuA, irp2, ireA, picU, PAI IV₅₃₆, PAI II_{CFT073}</i>	200.200
DL6	ApTp		32.000
DL7	Ap	<i>iutA, iucD</i>	38.500
DL8	Tc	<i>aha</i>	33.000
DL14	ApKnTc	<i>iutA, iucD, iroN, iroCD, fyuA, irp2, ireA, hbp, PAI IV₅₃₆</i>	107.700
DL17	Cm	<i>iutA, fyuA, irp2, PAI IV₅₃₆</i>	85.700
DL22	Tp	<i>fyuA, irp2, hbp, PAI IV₅₃₆</i>	86.700
DL37	Ap	<i>iroN, iroCD</i>	40.500
DL41	Ap	<i>PAI 4 536</i>	61.200
DL43	Tp	<i>fyuA, irp2, ireA, PAI IV₅₃₆</i>	85.700
DL46	Sm	<i>iucD, fyuA, irp2, iha, PAI IV₅₃₆</i>	91.200
DL48	Ap		31.000
DL56	Tc	<i>iutA, fyuA, irp2, ireA, picU, PAI IV₅₃₆</i>	191.700
DL76	Ap	<i>fyuA, iha, PAI IV₅₃₆</i>	65.200
DL81	Ap	<i>fyuA, irp2, PAI IV₅₃₆</i>	86.700
DL84	ApKnTcTp	<i>irp2, ireA, iha</i>	36.000
DL108	Sm	<i>iroN, iroCD, fyuA, irp2, ireA, PAI IV₅₃₆</i>	95.200
DL109	Tc	<i>iutA, iucD, fyuA, hbp, PAI IV₅₃₆</i>	73.700
DL110	Tp	<i>iutA, iucD, iroN, fyuA, ireA, PAI IV₅₃₆, PAI II_{J96}</i>	184.700
TA10	Ap		31.000
TA49	ApTp	<i>iutA, iucD, irp2, fyuA, iha, PAI IV₅₃₆, PAI I_{CFT073}, PAI II_{CFT073}</i>	252.200
TA50	ApTp	<i>iutA, iucD, irp2, fyuA, iha, PAI IV₅₃₆, PAI II_{CFT073}</i>	194.200
TA71	ApTp	<i>iutA, iucD, irp2, fyuA, iha, PAI IV₅₃₆, PAI I_{CFT073}, PAI II_{CFT073}</i>	252.200
TA74	ApSm		32.000
TA103	Ap		31.000
TA160	ApTcTp		34.000
TA171	TcSm		32.000
TA174	TcSmTpCm	<i>iroN, iroCD</i>	43.500
TA177	Sm		31.000
TA212	Ap	<i>fyuA, irp2, PAI IV₅₃₆</i>	83.700

Preglednica 13: Število otokov patogenosti prisotnih v konjugantah ExPEC.

št. PAI	št. sevov
1 PAI	12 sevov
2 PAI	3 sevi
3 PAI	2 seva
0 PAI	13 sevov

Preglednica 14: Število genov, povezanih s privzemom železa prisotnih v konjugantah sevov ExPEC.

Št. Različnih genov	Št. sevov
8	1
7	0
6	1
5	6
4	2
3	4
2	6
1	1
0	9

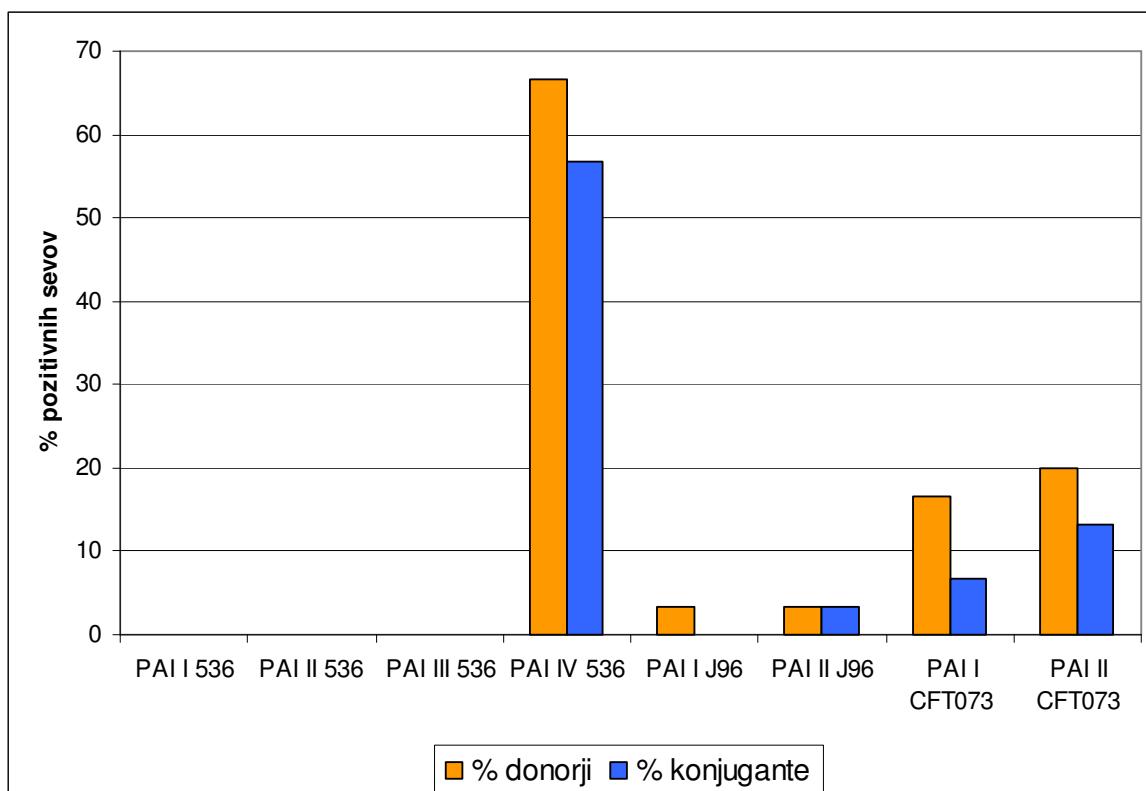
V preglednicah 11 in 12 je prikazano kolikšno je število posameznih sevov z različnimi otoki patogenosti ali zapisi za sisteme privzema železa. Največ, 13 sevov ni imelo PAI, 12 sevov je imelo en PAI, 3 sevi so imeli 2 različna PAI in 2 seva tri različne PAI.

Tudi zapisov za sisteme privzema železa največ sevov-9, ni imelo nobenega zapisa. Po 6 sevov je imelo ali 5 različnih zapisov ali pa 2 različna zapisa. Štirje sevi so imeli 3 različne zapise, 2 seva po štiri različne zapise in en sev je imel ali 6 različnih zapisov ali 1 zapis.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

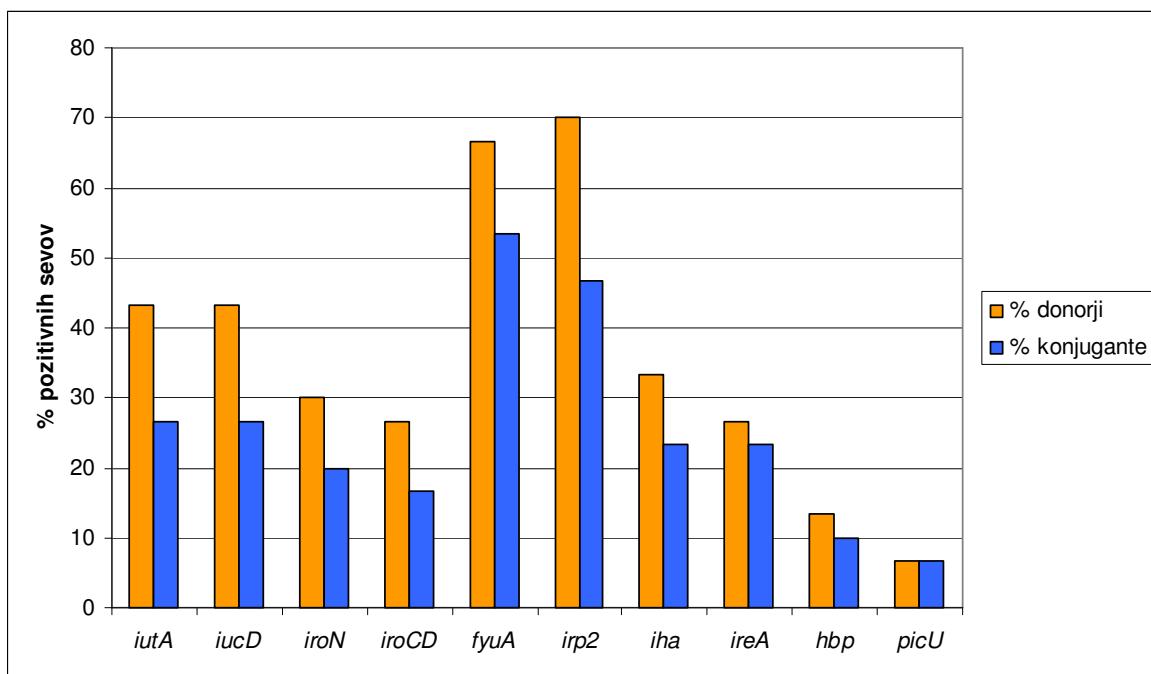
Iz sevov zbirke ExPEC smo uspeli s konjugativnim prenosom prenesti v sev DH5 α 30 (11 %) konjugativnih plazmidov z determinantami odpornosti proti antibiotikom. Donorji predstavljajo 11 % sevov zbirke ExPEC. Referenčna zbirka ECOR vsebuje 15 % konjugativnih plazmidov (Boyd in sod., 1996), zato lahko rečemo, da so rezultati primerljivi. Upoštevati moramo, da so v celicah verjetno tudi nekonjugativni plazmidi in konjugativni plazmidi brez determinant odpornosti proti antibiotikom. Največ plazmidov, preučevanih v tej raziskavi, je imelo determinante odpornosti proti ampicilinu 18 (60 %), sledijo zapisi za trimetoprim 11 (37 %), zatem za tetraciklin 8 (27 %), nato še za streptomycin 6 (20 %) in kanamicin ter za kloramfenikol 2 (7 %). Rezultati in izračuni so v prilogi F.

Determinante odpornosti proti antibiotikom so primerljive z deleži odpornosti proti antibiotikom vseh sevov TA zbirke ExPEC, kjer je tudi največ sevov odpornih proti ampicilinu, tetraciklinu, nalidinski kislini in streptomycinu. Razlika je v tem, da je bilo več konjugant odpornih proti trimetoprimu, kot donorskih sevov. Najmanj konjugant je bilo odpornih proti kloramfenikolu.



Slika 23: Prevalenca otokov patogenosti v sevih ExPEC .

Iz slike 23 je razvidno, da ima med vsemi otoki patogenosti najvišjo prevalenco PAI IV₅₃₆. Vsi rezultati in izračuni so v prilogi A. Kar 67 % donorskih sevov in konjugante 57 % sevov ima ta PAI. Sledi PAI II_{CFT073} z 20 % v donorskih sevih in konjugantah 13 % sevov. Na tretjem mestu je PAI I_{CFT073}, ki ga ima 17 % donorskih sevov in konjugante 7 % sevov. PAI I in II seva J96 imata enako pogostost pojavljanja v donorskih sevih 3 %, v konjugantah je le PAI II_{J96}. V nobenem vzorcu nismo našli otokov patogenosti PAI I₅₃₆, PAI II₅₃₆ in PAI III₅₃₆. Iz naših rezultatov je razvidno, da so otoki patogenosti bili večinoma prisotni v konjugativnih plazmidih. Rezultati so primerljivi z raziskavo, ki so jo opravili Sabaté M in sod., leta 2006 med sevi UPEC, kjer je bila tudi najvišja prevalenca otoka PAI IV₅₃₆ (89 % UPEC), sledi PAI I_{CFT073} (73 %), PAI II_{CFT073} (46 %). Kar se tiče pogostosti PAI I-III₅₃₆ so jih Sabaté in sod. našli v višjem odstotku. PAI I₅₃₆ se pojavlja v 33 %, PAI II₅₃₆ v 20 % in PAI III₅₃₆ v 2 %. PAI I_{J96} niso zaznali v nobenem sevu, mi smo ga v enem, PAI II_{J96} so Sabaté in sod. našli pri 34 % sevov, mi pa pri 3 %. Tako pogosto pojavljanje PAI IV₅₃₆ lahko pripisemu temu, da ta otok patogenosti nima neposrednih ponovitev na obeh koncih in je zato bolj stabilen in ker ni tako velik (30 kb), zato se lažje prenaša med bakterijami kot ostali otoki patogenosti, ki so ponavadi dolgi okrog 100 kb. Pričakovali bi, da bo pojavljanje PAI I_{CFT073} malo bolj pogosto, ker ni tako dolg (58 kb). Res je, da smo mi preiskovali zbirko sevov ExPEC, ki vsebuje uropatogene seve, seve iz ran in spolovil, za razliko od uropatogenih sevov, ki so jih proučevali Sabaté in sod. Pomembno je tudi dejstvo, da so otoki patogenosti nestabilni in se lahko sami izbrišejo iz genoma, ali se izključi iz PAI le en del. Z izbranimi začetnimi oligonukleotidi pomnožujemo s PCR le odseke PAI, ki so dolgi od 161 do 2390 bp, kar predstavlja le majhen del PAI, v primerjavi s 30 kb do 170 kb, kolikor je dolg celoten PAI. Zato ne moremo ob neuspeli pomnožitvi kar trditi, da celega otoka patogenosti ni. Res je, da so oligonukleotidi pripravljeni tako, da se prilegajo zaporedjem, ki so značilna za otoke patogenosti, vendar so negativni rezultati lahko tudi lažno negativni, saj je mogoče, da se je izključil iz PAI samo tisti del zaporedja, na katerega se prilega začetni oligonukleotidi, preostali del PAI pa je še vedno v genomu. Zanimivo je tudi, da smo zaznali PAI tudi v konjugativnih plazmidih, saj so PAI zelo dolgi. Vendar izgleda, da se PAI premeščajo tudi v konjugativne plazmide, ki jim verjetno omogočajo hitrejše širjenje v populaciji kot na primer proces transdukcije.



Slika 24: Prevalenca zapisov za sisteme privzema železa med sevi ExPEC.

Rezultati in izračuni za sliko 24 so v prilogi B. Iz slike 24 lahko vidimo, da se najbolj pogosto pojavljajo zapisi za jersinijabaktinski sistem privzema železa, tako v donorskih sevih kot v konjugantah. Sledijo zapisi za aerobaktinski sistem in nato za salmohelinski sistem. Gen *iha* za sideroforni receptor se pogosteje pojavlja kot gen *ireA*. Z najnižjo pogostostjo se pojavljata gena *hbp* in *picU* za avtotransporterski proteazi. Vse zapise za sisteme privzema železa v naši raziskavi najdemo v konjugativnih plazmidih.

Zapis za aerobaktinski sistem privzema železa so že opisali v konjugativnem plazmidu (Carbonetti in Williams, 1984). V naši raziskavi se je gen *iutA* pojavljal v 43 % donorskih sevov. Gen *iutA* se v zbirki ECOR pojavlja v 29 % in raziskava uropatogenih sevov kaže da, se pojavlja pri 50 % sevov (Johnson in sod., 2001). Gen *iucD* se je v naši raziskavi pojavljal v 43 %, v raziskavi Obata-Yasuoka in sod., 2002, se med vaginalnimi sevi pojavlja v 35 %. Prevalenca zapisov za aerobaktinski sistem je najvišja v sevih, ki povzročajo pielonefritis (73 %), nato med sevi ki povzročajo cistitis (49 %) in bakteremijo (58 %) (Johnson, 1991). Zapise za salmohelinski sistem privzema železa so tudi našli v konjugativnem plazmidu (Sorsa in sod., 2003). V naši raziskavi se je gen *iroN* pojavljal v 30 % donorskih sevov in konjugantah 20 % sevov. Gen *iroN* se v zbirki ECOR pojavlja v 22 %, v uropatogenih sevih v 40% (Johnson in sod., 2001). Zapise za jersinijabaktinski sistem do sedaj še niso opisali v konjugativnem plazmidu, kar je zanimivo, saj se je v naši

raziskavi pojavljal najbolj pogosto od vseh. V naši raziskavi se je gen *fyuA* pojavljal v 67 % donorskih sevov, v raziskavi Johnsona in sod., 2001 pa v 64 % ECOR in 90 % UPEC. V raziskavi Koczura in Kaznowskega, 2003, se je zapis za jersinijabaktin pojavljal v 86 % sevov ExPEC. Gena *irp2* in *fyuA* se pojavljata v 77 % (Koczura in Kaznowski, 2003).

Gena *iha* za sideroforni receptor do sedaj še niso opisali v konjugativnem plazmidu. Bauer in sod. so leta 2002 dokazali prisotnost gena v 34 % sevov ExPEC, mi smo ga zaznali v 33 %. Rezultata sta primerljiva. Gena *ireA* prav tako še niso zasledili v konjugativnem plazmidu. V naši raziskavi se je pojavljal v 27 % donorskih sevov, Russo in sod., 2001, so ga našli s pogostostjo pojavljanja v 26 % sevov ExPEC.

Gen *hbp* so že našli v konjugativnem plazmidu (Otto in sod, 1998). V naši raziskavi se je pojavljal s pogostostjo 13 %, Otto in sod., so leta 2002 opravili raziskavo, kjer je bila prevalenca *hbp* v 31 % sevov ExPEC. Gena *picU* do sedaj še niso opisali v konjugativnem plazmidu. V našem primeru se je pojavljal s pogostostjo 7 %, v uropatogenih sevih se pojavlja s pogostostjo 22 % (Parham in sod., 2004).

Preglednica 15: Zapisi za nekatere virulentne dejavnike v PAI.

PAI I ₅₃₆	α -hemolizin adhezin CS12 fimbrijski adhezin F17
PAI II ₅₃₆	α -hemolizin fimbrijski adhezin P adhezin Hek adhezin podoben Hemagglutininu
PAI III ₅₃₆	S-fimbrije salmohelin receptor hema podoben HmuR adhezin Sap hemoglobin-proteaza podobna Tsh
PAI IV ₅₃₆	Jersinijabaktin
PAI I _{J96}	α -hemolizin P-fimbrije (PapG)
PAI II _{J96}	α -hemolizin fimbrije PRS CNF1
PAI I _{CFT073}	α -hemolizin P-fimbrije (PapG) Iha Aerobaktin
PAI II _{CFT073}	P-fimbrije PicU

S krepkim so označeni tisti, ki smo jih uporabili za primerjavo.

V preglednici 13 so našteti nekateri virulentni dejavniki, ki so zapisani v PAI. PAI III₅₃₆ kodira salmohelinski sistem privzema železa. V naši raziskavi nismo uspeli pomnožiti v nobenem vzorcu PAI III₅₃₆, zanimivo pa je, da smo zapisa *iroN* in *iroCD* uspeli namnožiti. To potrjuje, da v naših izolatih zapis za salmohelinski sistem ni del PAI III₅₃₆. Zapis za jersinijabaktinski sistem, ki smo ga preučevali v sklopu zapisov za privzem železa je enak tistemu ki je v PAI IV₅₃₆, saj se začetni oligonukleotidi prilegajo na enak gen *irp2*, to je gen za sintezo jersinijabaktina. Ker je prevalenca gena *irp2* za jersinijabaktinski sistem privzema železa (70 % donorski sevi in konjugante 47 % sevov) skoraj enaka kot PAI IV₅₃₆ (67 % donorski sevi in konjugante 57% sevov) lahko rečemo, da je gen *irp2*, ki smo ga namnoževali v sklopu zapisov za privzem železa, del PAI IV₅₃₆. Tudi če pogledamo v katerih sevih sta se pojavljala gen *irp2* in PAI IV₅₃₆, vidimo, da so

bili rezultati popolnoma enaki v primeru donorskih sevov, razlikovali so se le pri nekaterih konjugantah. Zato lahko rečemo, da je v naših sevih zapis za jersinijabaktinski sistem privzema železa večinoma del PAI IV₅₃₆, in je lahko v konjugativnem plazmidu ali pa ne. V PAI I_{CFT073} je gen *iha* in zapis za aerobaktinski sistem privzema železa. V naših sevih ExPEC se zapis za aerobaktinski sistem pojavlja v 43 % donorskih sevov in v konjugantah 27 % sevov. Gen *iha* se pojavlja v 33 % donorskih sevov in v konjugantah 23 % sevov. PAI I_{CFT073} se pojavlja v 17 % donorskih sevov in konjugantah 7 % sevov. Verjetno sta v nekaterih sevih zapis za aerobaktin in gen *iha* del PAI_{CFT073} v nekaterih pa ne. PAI II_{CFT073} ima zapis za PicU, pojavlja se v 20 % donorskih sevov in v konjugantah 13 % sevov, gen *picU* ima 7 % donorskih sevov in konjugant. Glede na rezultate lahko rečemo, da je v nekaterih sevih *picU* del PAI II_{CFT073}.

Test kolicinogenosti je pokazal, da je ta lastnost večinoma zapisana v konjugativnih plazmidih, ali pa tudi ne. V prilogi E lahko vidimo velikosti cone lize indikatorske kulture, ki je še posebej zanimiva pri donorskem sevu TA174 in konjuganti tega seva TR174, saj je zelo velika, glede na preostale. Ta zapis za kolicin bi bilo zanimivo preučiti.

Prisotnost konjugativnih plazmidov v sevih TR in MR smo poskušali potrditi z izolacijo plazmidov z alkalno lizo. Dvajset plazmidov smo uspešno izolirali, a 10 jih kljub večkratnim poskusom nismo uspeli izolirati. Razlog težav pri izolaciji plazmidov je verjetno ta, da so bili preveliki, da bi jih lahko izolirali. Mogoče so se izgubili ali pa vključili v kromosom. Pogosto najdemo v konjugativnih plazmidih tudi neposredne ponovitve ali druge mobilne elemente, ki jim omogočajo spremenljivost in nestabilnost, četudi je v recipientskem sevu okvarjen sistem Rec, pomemben za homologno rekombinacijo.

Izolirane plazmide smo rezali z encimom *EcoRI* in dobljenim fragmentom smo poskušali z metodo gelske elektroforeze približno določiti dolžino. Rezultati so zelo različni, gibljejo se od 10 kb do 72 kb. Ker je znano, da mora biti konjugativni plazmid velik najmanj 30 kb, saj so tako dolgi zapisi potrebni za podvajanje in za konjugativni prenos plazmida, lahko ugotovimo, da je naša ocena velikosti plazmida, glede na dolžino dobljenih fragmentov, verjetno premajhna. Eden izmed možnih razlogov napake je, da so se podobno dolgi

fragmenti prekrivali med seboj in se med elektroforezo niso dobro ločili. Poleg tega je težko oceniti dolžino večjih fragmentov. Če primerjamo dejanske velikosti s teoretično velikostjo plazmidov, ki smo jo izračunali glede na znane dolžine zapisov, ugotovljenih v plazmidih, so kar precejšnje razlike. Teoretične velikosti se gibljejo v rangu od 31 kb do 252 kb. Vendar je teoretična velikost le minimalna velikost, ki bi jo moral imeti plazmid, glede na to katere zapise ima.

Zanimivo je, da pri konjugantah 13 sevov nismo uspeli pomnožiti nobenega delnega zapisa PAI. En PAI smo zaznali v konjugantah 12 sevov, dva PAI v konjugantah 3 sevov in tri PAI v konjugantah 2 sevov. Konjuganta 1 seva ima osem različnih genov, povezanih s privzemom železa, konjuganta 1 seva ima šest različnih, konjugante 6 sevov imajo po pet ali po dva različna gena, konjuganti 2 sevov imata štiri različne gene, tri različne gene imajo konjugante 4 sevov, 1 sev ima le en gen in kar 9 sevov nima nobenega zapisa za sistem privzema železa. Različnost konjugant v zapisih in s tem neposredno konjugativnih plazmidov je velika, zato lahko sklepamo, da to niso enaki plazmidi ampak edinstveni. Bakterije z več različnimi sistemi privzema železa lahko bolje konkurirajo z drugimi bakterijami in gostiteljem za dostopno železo. Z naborom različnih sideroforjev ji le ti omogočajo preživetje v različnih predelih telesa, kjer so tudi različni pogoji in ne igrajo vloge le pri patogenezi.

SKLEPI:

- Ugotovili smo, da je število konjugativnih plazmidov v zbirki ExPEC podobno kot v referenčni zbirki sevov *E. coli* (ECOR).
- V konjugativnih plazmidih smo uspeli namnožiti zapise PAI IV₅₃₆, PAI II_{J96}, PAI I_{CFT073} in PAI II_{CFT073}, kar je pomemben rezultat, saj še nismo zasledili, da bi kdo potrdil prisotnost otokov patogenosti v konjugativnih plazmidih pri bakteriji *E. coli*.
- Pogostost pojavljanja proučevanih PAI je v naših donorskih sevih ExPEC podobna kot v uropatogenih sevih.
- Uspeli smo namnožiti zapise za jersinijabaktinski sistem privzema železa, *iha*, *ireA* in *picU* v konjugativnih plazmidih, česar tudi še nismo zasledili v literaturi.
- Pogostost pojavljanja proučevanih zapisov za sisteme privzema železa je v naših donorskih sevih ExPEC podobna kot v uropatogenih sevih.
- Preučevani konjugativni plazmidi zbirke ExPEC so med seboj različni.

6 POVZETEK (SUMMARY)

Izvenčrevesni patogeni sevi *Escherichia coli* (ExPEC) povzročajo najrazličnejše okužbe genitourinarnega trakta, intraabdominalne okužbe, pljučnice, okužbe operacijskih ran, okužbe venskih vstavkov, meningitis, osteomielitis in bakteremijo. V diplomskem delu smo analizirali 30 sevov ExPEC s konjugativnimi plazmidi, ki vsebujejo determinante odpornosti proti antibiotikom, zapise za sisteme privzema železa in otoke patogenosti. Preverili smo prisotnost otokov patogenosti PAI I-IV₅₃₆, PAI I-II_{CFT073} in PAI I-II_{J96}. Preverjali smo tudi prisotnost zapisov za sintezo sideroforjev aerobaktina, salmohelina, jersiniabaktina, siderofornih receptorjev IreA in Iha ter avtotransportskih hemoglobinskih proteaz Hbp in PicU. Preverjali smo tudi kolicinogenost sevov. Prisotnost zapisov smo preverjali s pomnoževanjem s PCR in gelsko elektroforezo. Plazmidno DNA smo izolirali z alkalno denaturacijo in jo razrezali z restriktazo *EcoRI*. Rezultati so pokazali, da so deli otokov patogenosti PAI IV₅₃₆, PAI I_{J96}, PAI II_{J96}, PAI I_{CFT073} in PAI II_{CFT073} prisotni v zbirki donorskih sevov. PAI IV₅₃₆, PAI II_{J96}, PAI I_{CFT073} in PAI II_{CFT073} pa so prisotni tudi v zbirki konjugant, kar pomeni, da so ti PAI zapisani v konjugativnih plazmidih. Proučevali smo pogostost pojavljanja genov za sisteme privzema železa in ugotovili, da so vsi prisotni tako v donorskih sevih kot v konjugantah. To pomeni, da so vsi proučevani zapisi za privzem železa v konjugativnih plazmidih. Izoliranim plazmidom smo poskušali določiti velikost, ki pa se ni najbolje ujemala s teoretično velikostjo, ki smo jo izračunali glede na prisotnost zapisov, potrjeno s PCR. Ugotovili smo, da so v zbirki konjugant ExPEC raznoliki konjugativni plazmidi, vredni nadaljnega proučevanja.

7. VIRI

- Bauer R.J., Zhang L., Foxman B., Siitonen A., Jantunen M.E., Saxen H., Marrs C.F. 2002. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha* and *iroN*_{E. coli}. Journal of Infectious Diseases, 185: 1521-1524.
- Bäumler A.J., Tsolis R.M., van der Velden A.W.M., Stojiljkovic I., Anic S., Heffron F. 1996. Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*. Gene, 183: 207-213.
- Bäumler A.J., Norris T.L., Lasco T., Voigt W., Reissbrodt R., Rabsch W., Heffron F. 1998. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. Journal of Bacteriology, 180: 1446-1453.
- Bearden S.W., Fetherston J.D., Perry R.D. 1997. Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. Infection and Immunity, 65: 1659-1668.
- Bearden S.W. Staggs T.M., Perry R.D. 1998. An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB11. Journal of Bacteriology, 180: 1135-1147.
- Boyd E.F., Holl C.W., Rich S.M., Hartl D.L. 1996. Mosaic structure of plasmids from natural populations of *Escherichia coli*. Genetics, 143: 1091-1100.
- Carbonetti N.H., Williams P.H. 1984. A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid ColV-K30. Infection and Immunity, 46: 7-12.
- Carbonetti N.H., Boonchai S., Parry S.H., Väisänen-Rhen V., Korhonen T.K., Williams P.H. 1986 Aerobactin-mediated iron uptake by *Escherichia coli* isolates from human extraintestinal infections. Infection and Immunity, 51: 966-968.
- Carniel E. 2001. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron uptake island. Microbes and Infection, 3: 561-569.
- Charpentier E., Tuomanen E. 2000. Mechanisms of antibiotic resistance and tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. Microbes and Infection, 2: 1855-1864.
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2001. The *Yersinia* high-pathogenicity island is highly predominant in virulence-associated phylogenetic groups of *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters, 196: 153-157.

- Crosa J.H. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 53: 517-530.
- Dobrindt U., Blum-Oehler G., Nagy G., Schneider G., Johann A., Gottschalk G., Hacker J. 2002. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I₅₃₆ to PAI IV₅₃₆) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infection and Immunity*, 70: 6365-6372.
- Earhart C.F. 1996. Uptake and metabolism of iron and molybdenum. V: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Neidhardt F. C., Curtiss III R., Ingraham J. L., Lin E. C. C., Low Jr K. B., Magasanik B., Reznikoff W. S., Riley M., Schaechter M., Umbarger H. E. (eds). 2nd ed. Washington, ASM Press:1075-1276
- Firth N., Ippen-Ihler K., Skurray R.A. 1996. Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation. V: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Neidhardt F. C., Curtiss III R., Ingraham J. L., Lin E. C. C., Low Jr K. B., Magasanik B., Reznikoff W. S., Riley M., Schaechter M., Umbarger H. E. (eds). 2nd ed. Washington, ASM Press: 2377-2395.
- Feldmann F., Sorsa L.J., Hildinger K., Schubert S. 2007. The salmochelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in vitro. *Infection and Immunity*, 75: 3183-3187.
- Grass G. 2006. Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done. *BioMetals*, 19: 159-172.
- Hacker J., Bender L., Ott M., Wingender J., Lund B., Marre R., Goebel W. 1990. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microbial Pathogenesis*, 8:213-225.
- Hacker J., Blum-Oehler G., Mühlendorfer I., Tschäpe H. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact in microbial evolution. *Molecular Microbiology*, 23: 1089-1097.
- Hantke K., Nocholson G., Rabsch W., Winkelmann G. 2003. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 3677-3682.

- Henderson I.R., Czeczulin J., Eslava C., Noriega F, Nataro J.P. 1999. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. Infection and Immunity, 67:5587-5596.
- Johnson J.R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clinical Microbiology Reviews, 4 :80-128.
- Johnson J.R., Delavari P., Kuskowski M., Stell A.L. 2001. Phylogenetic distribution of exstraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. Journal of Infectious Diseases, 183:78-88.
- 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 : 965-971.
- Johnson T.J., Siek K.E., Johnson S.J., Nolan L.K. 2006a. DNA Sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. Journal of Bacteriology, 188: 745-758.
- Johnson T.J., Johnson S.J., Nolan L.K. 2006b. Complete DNA Sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. Journal of Bacteriology, 188: 5975-5983.
- Kao J-S., Stucker D.M., Warren J.W., Mobley H.L.T. 1997. Pathogenicity island sequences of pyelonephritogenic *Escherichia coli* CFT073 are associated with virulent uropathogenic strains. Infection and Immunity, 65: 2812-2820.
- Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews, 2: 123-140
- Koczura R., Kaznowski A. 2003. The *Yersinia* high-pathogenicity island and iron-uptake systems in clinical isolates of *Escherichia coli*. Journal of Medical Microbiology, 52: 637-642.
- Koren S., Ihan A., Gubina M. 2002. Patogeneza in širjenje bakterijskih okužb. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ihan A., Gubina M.(ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 65-74.
- Léveillé 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 functions as a catecholate siderophore receptor. Infection and Immunity, 74 : 3427-3436.

- Lin H., Fischbach M.A., Liu D.R., Walsh C.T. 2005. *In vitro* characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *Journal of the American Chemical Society*, 127: 11075-11084.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. 10th ed. Upper Saddle River, Pearson Education, Inc: 1019 str.
- Mey A.R., Wyckoff E.E., Oglesby A.G., Rab E., Taylor R.K., Payne S.M. 2002. Identification of the *Vibrio cholerae* enterobactin receptors VctA and IrgA: IrgA is not required for virulence. *Infection and Immunity*, 70: 3419-3426.
- Middendorf B., Hochhut B., Leipold K., Dobrindt U., Blum-Oehler G., Hacker J. 2004. Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *Journal of Bacteriology*, 186: 3086-3096.
- Morschhäuser J., Köhler G., Ziebuhr W., Blum-Oehler G., Dobrindt U., Hacker J. 2000. Evolution of microbial pathogens. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 355: 695-704.
- Nègre V.L., Bonacorsi S., Schubert S., Bidet P., Nassif X., Bingen E. 2004. The siderophore receptor IroN, but not the high-pathogenicity island or the hemin receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis. *Infection and Immunity*, 72: 1216-1220.
- Obata-Yasuoka M., Ba-Thein W., Tsukamoto T., Yoshikawa H., Hayashi H. 2002. Vaginal *Escherichia coli* share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal *E. coli*. *Microbiology*, 148: 2745-2752.
- Otto B.R., van Dooren S.J.M., Nuijens J.H., Luirink J., Oudega B. 1998. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. *Journal of Experimental Medicine*, 6: 1091-1103.
- Otto B.R., van Dooren S.J.M., Dozois C.M., Luirink J., Oudega B. 2002. *Escherichia coli* hemoglobin protease autotransporter contributes to synergistic abscess formation and heme-dependent growth of *Bacteroides fragilis*. *Infection and Immunity*, 70: 5-10.
- Parham N.J., Srinivasan U., Desvaux M., Foxman B., Marrs C.F., Henderson I.R. 2004. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 230: 73-83.
- Parham N.J., Pollard S.J., Chaudhuri R.R., Beatson S.A., Desvaux M., Russell M.A., Ruiz J., Fivian A., Vila J., Henderson I.R. 2005. Prevalence of pathogenicity island II_{CFT073}

- genes among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology, 43: 2425-2434.
- Perry R.D., Balbo P.B., Jones H.A., Fetherston J.D., DeMoll E. 1999. Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. Microbiology, 145: 1181-1190.
- Rijavec M. 2004. Analiza uropatogenih sevov *Escherichia coli* za prisotnost plazmidov, kolicinov in sistema prevzema železa *iro*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 97str.
- Riley M.A., Wertz J.E. 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. Biochimie, 84: 357-364.
- Ruiz J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51: 1109-1117.
- Russo T.A., Johnson J.R. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. Journal of Infectious Diseases, 181:1753-1754
- Russo T.A., Carlino U.B., Johnson J.R. 2001. Identification of a new iron-regulated virulence gene *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. Infection and Immunity, 69: 6219-6216.
- Russo T.A., McFadden C.D., Carlino-MacDonald U.,B., Beanan J.M., Barnard T.J., Johnson J.R. 2002. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. Infection and Immunity, 70: 7156-7160.
- Sabaté M., Moreno E., Pérez T., Andreu A., Prats G. 2006. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. Clinical Microbiology Infection, 12: 880-886.
- Schmidt H., Hensel M. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clinical Microbiology Reviews, 17:14-56.
- Schubert S., Rakin A., Karch H., Carniel E., Heesemann J. 1998. Prevalence of the “high-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. Infection and Immunity, 66: 480-485.

- Schubert S., Cuenca S., Fischer D., Heesemann J. 2000. High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. *Journal of Infectious Diseases*, 182: 1268-1271.
- Silva J. 1996. Mechanisms of antibiotic resistance. *Current Therapeutic Research*, 57: 30-35.
- Sorsa L.J., Dufke S., Heesemann J., Schubert S. 2003. Characterization of an *iroBCDEN* gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. *Infection and Immunity*, 71: 3285-3293.
- Swenson D.L., Bukanov N.O., Berg D.E., Welch R.A. 1996. Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J96: cosmid cloning and sample sequencing. *Infection and Immunity*, 64: 3736-3743.
- Tarr P.I., Bilge S.S., Vary J.C., Jelacic S., Habeeb R.L., Ward T.R., Baylor M.R., Besser T.E. 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infection and Immunity*, 68: 1400-1407.
- Tenover F.C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Medicine*, 119: 3-10.
- Torres A.G., Redford P., Welch R.A., Payne S.M. 2001. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infection and Immunity*, 69: 6179-6185.
- Waters V.L., Crosa J.H. 1991. Colicin V virulence plasmids. *Microbiological Reviews*, 55: 437-450.

ZAHVALA

Zahvaljujem se metorici Darji Žgur-Bertok za omogočanje izvedbe diplomskega dela in pomoč pri pisanju naloge. Hvala somentorici Marjanci Starčič Erjavec za pomoč v laboratoriju in pri pisanju naloge. Še posebej se zahvaljujem recenzentki za recenzijo diplome navkljub bolezni.

Hvala prof.dr.Mariji Gubina za izvenčrevesne seve *E. coli*.

Hvala E. Moreno Pujol za seve s PAI, ki smo jih uporabili za pozitivne kontrole.

Hvala vsem na katedri za pomoč, vzpodbude in spravljanje v dobro voljo.

PRILOGE

Прiloga A: Резултати помноževanja делов отоков патогености севов ExPEC s PCR.

SEV	PAI 1 536	PAI 2 536	PAI 3 536	PAI 4 536	PAI 1 J96	PAI 2 J96	PAI 1 CFT073	PAI 2 CFT073
MR2	-	-	-	+	-	-	-	+
DL2	-	-	-	+	-	-	-	+
MR6	-	-	-	-	-	-	-	-
DL6	-	-	-	-	-	-	-	-
MR7	-	-	-	-	-	-	-	-
DL7	-	-	-	-	-	-	-	-
MR8	-	-	-	-	-	-	-	-
DL8	-	-	-	-	+	-	-	-
MR14	-	-	-	+	-	-	-	-
DL14	-	-	-	+	-	-	-	-
MR17	-	-	-	+	-	-	-	-
DL17	-	-	-	+	-	-	-	-
MR22	-	-	-	+	-	-	-	-
DL22	-	-	-	+	-	-	-	-
MR37	-	-	-	-	-	-	-	-
DL37	-	-	-	-	-	-	-	-
MR41	-	-	-	+	-	-	-	-
DL41	-	-	-	+	-	-	-	-
MR43	-	-	-	+	-	-	-	-
DL43	-	-	-	+	-	-	-	-
MR46	-	-	-	+	-	-	-	-
DL46	-	-	-	+	-	-	-	-
MR48	-	-	-	-	-	-	-	-
DL48	-	-	-	-	-	-	-	-
MR56	-	-	-	+	-	-	-	-
DL56	-	-	-	+	-	-	-	-
MR76	-	-	-	+	-	-	-	-
DL76	-	-	-	+	-	-	-	-
MR81	-	-	-	+	-	-	-	-
DL81	-	-	-	+	-	-	-	-
MR84	-	-	-	-	-	-	-	-
DL84	-	-	-	-	-	-	-	-
MR108	-	-	-	+	-	-	-	-
DL108	-	-	-	+	-	-	-	+
MR109	-	-	-	+	-	-	-	-
DL109	-	-	-	+	-	-	-	-
MR110	-	-	-	+	-	+	-	-
DL110	-	-	-	+	-	+	-	-

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: Rezultati pomnoževanja delov otokov patogenosti sevov ExPEC s PCR.

SEV	PAI 1 536	PAI 2 536	PAI 3 536	PAI 4 536	PAI 1 J96	PAI 2 J96	PAI 1 CFT073	PAI 2 CFT073
TR10	-	-	-	-	-	-	-	-
TA10	-	-	-	+	-	-	-	-
TR49	-	-	-	+	-	-	+	+
TA49	-	-	-	+	-	-	+	+
TR50	-	-	-	+	-	-	-	+
TA50	-	-	-	+	-	-	+	+
TR71	-	-	-	+	-	-	+	+
TA71	-	-	-	+	-	-	+	+
TR74	-	-	-	-	-	-	-	-
TA74	-	-	-	+	-	-	-	-
TR103	-	-	-	-	-	-	-	-
TA103	-	-	-	-	-	-	-	-
TR160	-	-	-	-	-	-	-	-
TA160	-	-	-	-	-	-	-	-
TR171	-	-	-	-	-	-	-	-
TA171	-	-	-	-	-	-	-	-
TR174	-	-	-	-	-	-	-	-
TA174	-	-	-	-	-	-	-	-
TR177	-	-	-	-	-	-	-	-
TA177	-	-	-	+	-	-	+	-
TR212	-	-	-	+	-	-	-	-
TA212	-	-	-	+	-	-	+	+
% donorji	0	0	0	66,67	3,33	3,33	16,67	20
% konjug.	0	0	0	56,67	0,00	3,33	6,67	13,33

Priloga B: Rezultati PCR za preverjanje prisotnosti zapisov za sisteme privzema železa sevov ExPEC.

SEV	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>iroN</i>	<i>iroCD</i>	<i>fyuA</i>	<i>irp2</i>	<i>iha</i>	<i>ireA</i>	<i>hbp</i>	<i>picU</i>
MR2	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
DL2	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
MR6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
DL7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MR8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
DL8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
MR14	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
DL14	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
MR17	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
DL17	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MR22	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
DL22	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
MR37	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
DL37	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
MR41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL41	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MR43	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
DL43	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
MR46	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
DL46	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
MR48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR56	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+
DL56	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
MR76	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
DL76	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
MR81	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
DL81	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MR84	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
DL84	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
MR108	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
DL108	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
MR109	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
DL109	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
MR110	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
DL110	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-

Se madaljuje

Nadaljevanje priloge B: Rezultati PCR za preverjanje prisotnosti zapisov za sisteme privzema železa sevov ExPEC.

SEV	<i>iutA</i>	<i>iucD</i>	<i>iroN</i>	<i>iroCD</i>	<i>fyuA</i>	<i>irp2</i>	<i>iha</i>	<i>ireA</i>	<i>hbp</i>	<i>picU</i>
TR10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TA10	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
TR49	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
TA49	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
TR50	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
TA50	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
TR71	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
TA71	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
TR74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TA74	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
TR103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TA103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TR160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TA160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TR171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TA171	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
TR174	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
TA174	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
TR177	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TA177	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
TR212	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
TA212	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
% donorji	43,33	43,33	30,00	26,67	66,67	70,00	33,33	26,67	13,33	6,67
% konjugante	26,67	26,67	20,00	16,67	53,33	46,67	23,33	23,33	10,00	6,67

Priloga C: Odpornost proti antibiotikom sevov TA zbirke ExPEC.

SEV	AP	TC	KN	SM	TP	CM	NAL
TA1	+	-	-	-	-	-	-
TA2	-	-	-	-	-	-	-
TA3	-	-	-	-	-	-	-
TA4	+	+	+	+	+	-	+
TA5	-	-	-	-	-	-	-
TA6	-	-	+	-	-	-	-
TA7	-	-	-	-	-	-	-
TA8	+	-	-	+	-	-	-
TA9	-	-	-	-	-	-	-
TA10	+	-	-	-	-	-	+
TA11	+	-	-	-	-	-	-
TA12	+	+	-	-	-	-	-
TA13	+	+	-	-	-	+	-
TA14	+	-	-	+	-	-	-
TA15	+	+	-	+	-	-	-
TA16	+	-	-	-	-	-	-
TA17	-	+	+	+	-	-	+
TA18	+	-	+	-	-	-	-
TA19	+	-	-	-	+	-	+
TA20	-	-	-	-	-	-	-
TA21	-	-	-	-	-	-	-
TA22	-	-	+	-	-	-	-
TA23	-	-	+	-	-	-	-
TA24	-	-	-	-	-	-	-
TA25	-	-	-	-	-	-	-
TA26	-	-	-	-	-	-	-
TA27	-	-	-	-	-	-	-
TA28	+	-	+	+	-	-	+
TA29	+	-	-	-	-	-	+
TA30	-	-	-	-	-	-	+
TA31	+	-	-	+	+	-	+
TA32	-	-	-	-	-	-	+
TA33	+	-	-	+	-	-	-
TA34	-	-	-	-	-	-	-
TA35	-	-	-	-	-	-	+
TA36	-	-	-	-	-	-	-
TA37	-	-	-	-	-	-	-
TA38	-	-	-	-	-	-	-
TA39	-	-	-	-	-	-	-
TA40	-	-	-	-	+	-	-
TA41	-	-	-	-	-	-	-
TA42	+	-	-	-	-	-	-
TA43	+	+	-	+	+	-	+
TA44	-	-	-	-	-	-	-
TA45	+	-	-	-	-	-	-
TA46	+	-	-	-	-	-	-

Nadaljevanje priloge C

SEV	AP	TC	KN	SM	TP	CM	NAL
TA47	-	-	-	-	-	-	-
TA48	-	-	-	-	-	-	-
TA49	+	+	+	+	+	-	+
TA50	+	+	+	+	+	-	+
TA51-a	-	-	-	-	-	-	-
TA51-b	-	-	-	-	-	-	-
TA52	-	-	-	-	-	-	-
TA53	+	-	-	+	-	-	-
TA54	-	-	-	-	-	-	-
TA55	-	-	-	-	-	-	-
TA56	+	-	+	+	+	-	-
TA57	-	-	-	-	-	-	-
TA58	+	-	-	-	-	-	-
TA59	-	-	-	-	-	-	-
TA60	-	-	-	-	-	-	-
TA61	-	-	-	-	-	-	-
TA62	-	-	-	-	-	-	-
TA63	-	-	-	-	-	-	-
TA64	-	-	-	-	-	-	-
TA65	-	-	+	-	-	-	-
TA66	-	-	-	-	-	-	-
TA67	-	-	-	-	-	-	-
TA68	-	-	-	-	-	-	-
TA69	-	-	-	-	-	-	-
TA70	-	-	-	-	-	-	-
TA71	+	-	-	+	+	-	+
TA72	-	+	-	-	-	-	-
TA73	-	-	-	-	-	-	+
TA74	+	-	-	+	+	-	+
TA75	+	+	+	+	+	+	-
TA76	+	-	-	+	+	-	-
TA77	+	-	+	+	+	-	-
TA78	+	-	-	-	-	-	-
TA79	+	+	-	+	+	+	-
TA80	-	-	-	-	-	-	-
TA81	-	+	-	-	-	-	-
TA82	-	-	-	-	-	-	-
TA83	+	+	-	-	+	+	+
TA84	+	+	-	-	-	-	+
TA85	+	-	-	-	-	-	-
TA86	+	-	-	-	-	-	-
TA87	-	-	-	-	-	-	+
TA88	+	-	-	-	-	-	-
TA89	-	-	-	-	-	-	-
TA90	-	-	-	-	-	-	-
TA91	+	+	+	+	-	-	-
TA92	+	+	+	+	-	-	-

Nadaljevanje priloge C

SEV	AP	TC	KN	SM	TP	CM	NAL
TA93	+	+	-	-	-	-	-
TA94	-	-	-	-	-	-	-
TA95	-	-	-	-	-	-	-
TA96	-	-	-	-	-	-	-
TA97	-	-	-	-	-	-	-
TA98	+	-	+	+	-	-	-
TA99	+	-	+		+	-	-
TA100	-	-	-	-	-	-	-
TA101	+	+	-	-	+	+	-
TA102	+	+	-	-	-	-	-
TA103	+	+	-	-	-	-	-
TA104	-	+	-	-	-	-	-
TA105	-	-	-	-	-	-	-
TA106	+	+	+	-	+	+	+
TA107	-	-	-	-	-	-	-
TA108	+	-	-	-	-	-	-
TA109	+	+	-	-	-	-	-
TA110	-	-	-	-	-	-	-
TA111	+	+	-	-	-	-	-
TA112	-	+	-	-	-	-	-
TA113	-	-	-	-	-	-	-
TA114	+	+	-	+	+	-	-
TA115	+	+	-	-	+	-	-
TA116	-	-	-	-	-	-	-
TA117	+	-	-	-	-	-	-
TA118	-	+	-	-	-	-	+
TA119	-	+	-	-	-	+	+
TA120	-	-	-	-	-	-	-
TA121	+	+	-	-	-	-	-
TA122	+	+	-	-	-	-	-
TA123	+	+	+	+	-	+	-
TA124	+	-	-	+	-	-	-
TA125	+	+	-	+	-	-	-
TA126	+	+	-	+	+	+	+
TA127	+	+	-	+	+	-	-
TA128	+	+	+	+	+	+	+
TA129	+	+	-	-	-	-	+
TA130	-	+	-	-	-	-	-
TA131	-	-	-	-	-	-	+
TA132	-	-	-	-	-	-	+
TA133	-	-	-	-	-	-	-
TA134	-	+	-	-	-	-	+
TA135	+	-	-	-	-	-	-
TA136	-	-	-	-	-	-	-
TA137	-	-	-	-	-	-	-
TA138	-	+	-	-	-	-	-
TA139	+	+	-	-	-	-	-

Nadaljevanje priloge C

SEV	AP	TC	KN	SM	TP	CM	NAL
TA140	-	+	-	-	-	-	-
TA141	+	-	-	-	-	-	-
TA142	-	-	-	-	-	-	-
TA143	+	+	-	+	+	+	+
TA144	-	-	-	-	-	-	-
TA145	-	-	-	-	-	-	-
TA146	+	+	+	+	+	-	-
TA147	+	+	-	-	-	-	-
TA148	-	-	-	-	-	-	-
TA149	-	-	-	-	-	-	-
TA150	+	-	-	+	-	-	-
TA151	-	-	-	-	-	-	-
TA152	-	+	-	-	-	-	-
TA153	-	-	-	-	-	-	+
TA154	-	-	-	-	-	-	-
TA155	+	-	-	-	-	-	-
TA156	-	-	-	-	-	-	-
TA157	+	-	-	-	-	-	-
TA158	+	+	-	-	-	+	+
TA159	+	+	-	-	+	+	+
TA160	+	+	-	-	+	+	+
TA161	+	-	-	-	-	-	-
TA162	-	-	-	-	-	-	-
TA163	-	-	-	-	-	-	-
TA164	-	-	-	-	-	-	-
TA165	-	+	-	-	-	-	-
TA166	+	+	+	+	+	+	-
TA167	-	+	-	-	-	-	-
TA168	+	+	-	+	+	+	+
TA169	-	+	+	-	-	-	-
TA170	-	+	-	-	-	-	-
TA171	+	+	-	+	+	+	+
TA172	-	+	-	-	-	-	-
TA173	-	-	-	-	-	-	-
TA174	+	+	-	+	+	+	+
TA175	+	+	-	-	+	+	-
TA176	-	-	-	-	-	-	-
TA177	+	-	-	+	-	-	-
TA178	+	+	+	+	+	+	+
TA179	-	-	-	-	-	-	-
TA180	-	-	-	-	-	-	-
TA181	-	-	-	-	-	-	-
TA182	-	-	-	-	-	-	-
TA183	-	-	+	-	-	-	-
TA184	-	-	-	-	-	-	-
TA185	-	-	-	-	-	-	-
TA186	+	+	-	-	-	+	+

Nadaljevanje priloge C

SEV	AP	TC	KN	SM	TP	CM	NAL
TA187	-	-	-	-	-	-	-
TA188	-	+	-	-	-	-	-
TA189	-	-	-	-	-	-	-
TA190	-	-	-	-	-	-	-
TA191	+	+	+	+	+	+	+
TA192	-	+	-	-	-	-	-
TA193	+	-	-	-	-	-	-
TA194	+	+	-	+	+	+	-
TA195	+	+	-	+	+	-	+
TA196	-	-	-	-	-	-	-
TA197	-	-	-	-	-	-	-
TA198	+	+	+	+	-	-	-
TA199	-	-	-	-	-	-	-
TA200	-	-	-	-	-	-	-
TA201	-	-	-	-	-	-	-
TA202	-	-	-	-	-	-	-
TA203	-	-	-	-	-	-	-
TA204	-	-	-	-	-	-	-
TA205	-	-	-	+	-	-	+
TA206	-	-	-	-	-	-	+
TA207	+	-	-	-	-	-	+
TA208	+	+	-	-	-	-	-
TA209	+	-	+	-	-	-	-
TA210	-	-	-	-	-	-	+
TA211	-	-	-	-	-	-	-
TA212	+	+	-	+	+	-	+
TA213	-	-	-	-	-	-	-
TA214	-	-	-	-	-	-	-
TA215	+	-	+	-	-	-	-
TA216	-	-	-	-	-	-	-

Priloga D: Donorski sevi TA.

oznaka TA	letnica rojstva	spol	vzorec	SKUPINA	izolirano
TA10	1965	Ž	bris rane - vršek desnega palca	II	<i>P. aeruginosa</i> 50%, <i>E. coli</i> 50%
TA49	1964	Ž	bris rane med operacijo	I	<i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> - vse poraslo po bogativi
TA50	1951	M	bris preležanine - na levem boku	II	<i>S. aureus</i> 40%, <i>E. coli</i> 30%, bakterije 30%
TA71	1933	Ž	operacijska rana - med operacijo	I	SKN 70%, <i>E. coli</i> 30%
TA74	1968	M	bris ejakulata	III	SKN, <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i>
TA103	1964	M	bris rane	I	<i>E. coli</i> 100%
TA160	1931	M	bris razjede na koži - 2. prst desne noge	II	<i>S. aureus</i> 40%, <i>E. coli</i> 20%, difteroidi 40%
TA171	1934	Ž	bris rane - razjede skralno	II	<i>E. faecalis</i> 60%, <i>S. aureus</i> 30%, <i>E. coli</i> 10%
TA174	1951	M	bris rane - noge	I	<i>E. coli</i> 100%
TA177	2006	M	bris ušesa (sluhovoda)	I	<i>E. coli</i> - poraslo po bogativi
TA212	1933	M	bris preležanine - na trtici	II	<i>E. coli</i> 80%, bakterije 20%

Priloga E: Kolicinogenost in mere cone lize donorjev TA in konjugant TR.

SEV	kolicinogenost	premer kolonije (mm)	premer cone lize (mm)	površina cone lize (mm ²)
TR10	+	4	14	1232
TA10	+	4	13	1062
TR49	-			
TA49	-			
TR50	-			
TA50	-			
TR71	-			
TA71	-			
TR74	-			
TA74	-			
TR103	-			
TA103	-			
TR160	-			
TA160	-			
TR171	-			
TA171	+	4	15	1414
TR174	+	3	24	3619
TA174	+	4	21	2771
TR177	-			
TA177	-			
TR212	+	3	12	905
TA212	+	3	10	628
DH5α	-			

+ pomeni, da je sev kolicinogen

- pomeni, da sev ni kolicinogen

Priloga F: Odpornosti proti antibiotikom konjugant MR in TR.

konjuganta	odpornost proti antibiotikom	AP	TC	KN	SM	TP	CM	NAL
MR2	ApTp	+				+		
MR6	ApTp	+				+		
MR7	Ap	+						
MR8	Tc		+					
MR14	ApTcKn	+	+	+				
MR17	Cm						+	
MR22	Tp					+		
MR37	Ap	+						
MR41	Ap	+						
MR43	Tp					+		
MR46	Sm				+			
MR48	Ap	+						
MR56	Tc		+					
MR76	Ap	+						
MR81	Ap	+						
MR84	ApTcKnTp	+	+	+		+		
MR108	Sm				+			
MR109	Tc		+					
MR110	Tp					+		
TR10	Ap	+						
TR49	ApTp	+				+		
TR50	ApTp	+				+		
TR71	ApTp	+				+		
TR74	ApSm	+			+			
TR103	Ap	+						
TR160	ApTc	+	+			+		
TR171	TcTp		+		+			
TR174	TcSmTpCm		+		+	+	+	
TR177	Sm				+			
TR212	Ap	+						
	N %	18 60	8 27	2 7	6 20	11 37	2 6,7	0 0

+ pomeni, da je sev odporen proti antibiotiku.