

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Manuela ČITAR

VIRULENTNI DEJAVNIKI IZOLATOV BAKTERIJE
***Escherichia coli* IZ BLATA ZDRAVIH LJUDI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Manuela ČITAR

**VIRULENTNI DEJAVNIKI IZOLATOV BAKTERIJE *Escherichia coli*
IZ BLATA ZDRAVIH LJUDI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**VIRULENT FACTORS OF *Escherichia coli* ISOLATES FROM FECES
OF HEALTHY HUMANS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

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

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Darja Žgur-Bertok, za somentorico doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec ter za recenzentko doc. dr. Blagajana 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:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Manuela Čitar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	DN
DK	UDK 579.61.065 : 616-092 (043) = 163.6
KG	<i>Escherichia coli</i> /komenzalni sevi/filogenetske skupine/filogenetske podskupine/virulentni dejavniki/okužbe/občutljivost za protimikrobne učinkovine/PCR
AV	ČITAR, Manuela
SA	ŽGUR-BERTOK, Darja (mentorica)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (somentorica)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjava 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2010
IN	VIRULENTNI DEJAVNIKI IZOLATOV BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i> IZ BLATA ZDRAVIH LJUDI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 97 str., 17 pregl., 13 sl., 2 pril., 71 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Praviloma bakterija <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) in gostitelj sobivata v mutualističnem odnosu, vendar so sevi <i>E. coli</i> zaradi specifičnih virulentnih dejavnikov sposobni povzročiti gostitelju številne črevesne in zunajčrevesne okužbe. Medtem ko črevesne okužbe povzročajo sevi <i>E. coli</i> pridobljeni iz okolja, je črevesna mikrobiota posameznika rezervoar <i>E. coli</i>, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe. Da bi ugotovili prevalenco potencialno patogenih zunajčrevesnih sevov <i>E. coli</i> med črevesno mikrobioto, smo zbirko 90 sevov <i>E. coli</i>, izoliranih iz blata zdravih ljudi v obdobju od 01. 03. do 04.09. 2009 na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani s pomočjo metode PCR pregledali za filogenetsko razvrstitev v (pod)skupine in prisotnost zapisov za naslednje dejavnike, povezane z virulenco: <i>cnf1</i>, <i>hlyA</i>, <i>papGII</i>, <i>papGIII</i>, <i>sfaDE</i>, <i>afa/draBC</i>, <i>iucD</i>, <i>usp</i>, <i>tcpC</i>, <i>traJ</i>. Naši rezultati kažejo, da je 30 (33 %) vseh pregledanih izolatov spadalo v skupino B2, 27 (30 %) v skupino D, 20 (22 %) v skupino A in 13 sevov (14 %) v skupino B1. Zapis <i>cnf1</i> smo zasledili pri 5 (6 %) sevih, <i>hlyA</i> pri 7 (8 %), <i>papGII</i> pri 7 (8 %), <i>papGIII</i> pri 3 (3 %), <i>sfaDE</i> pri 15 (17 %), <i>afa/draBC</i> pri 4 (4%), <i>iucD</i> pri 35 (39 %), <i>usp</i> pri 22 (24 %), <i>tcpC</i> pri 7 (8 %) in <i>traJ</i> pri 23 (26 %) vseh testiranih sevov. Naši rezultati kažejo, da med sevi, ki tvorijo človeško črevesno mikrobioto, obstaja visok virulentni potencial, ki omogoča nastanek različnih zunajčrevesnih okužb.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND	Dn
DC	UDC 579.61.065 : 616-092 (043) = 163.6
CX	<i>Escherichia coli</i> /commensal strains/phylogenetic group/phylogenetic subgroup/virulence factors/infections/susceptibility to antimicrobials/PCR
AU	ČITAR, Manuela
AA	ŽGUR-BERTOK, Darja (supervisor)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (co-advisor)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjava 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2010
TI	VIRULENT FACTORS OF <i>Escherichia coli</i> ISOLATES FROM FECES OF HEALTHY HUMANS
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XIII, 97 p., 17 tab., 13 fig., 2 ann., 71 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Usually, <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) and its host coexist in mutual benefit, but there are several highly adapted <i>E. coli</i> strains that have acquired specific virulence factors and can cause an impressive variety of different types of intestinal and extraintestinal diseases. While intestinal infections are caused by <i>E. coli</i> strains acquired from environment, the reservoir of extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> strains is the intestinal microbiota. In order to screen for the prevalence of potentially extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> strains in the intestinal microbiota, a collection of 90 <i>E. coli</i> strains isolated at the Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana in the time period from 01. 03. to 04. 09. 2009 from feces of healthy humans, was using the method of PCR amplification screened for the phylogenetic (sub)groups and the following virulence (related) genes: <i>cnf1</i> , <i>hlyA</i> , <i>papGII</i> , <i>papGIII</i> , <i>sfaDE</i> , <i>afa/draBC</i> , <i>iucD</i> , <i>usp</i> , <i>tcpC</i> , <i>traJ</i> . Our results showed that 30 (33 %) of the studied <i>E. coli</i> isolates belonged to the B2 group, 27 (30 %) to the D group, 20 (22 %) to the A group, and 13 (14 %) to the B1 group. The <i>cnf1</i> gene sequence was detected in 5 (6 %) of strains, <i>hlyA</i> in 7 (8 %), <i>papGII</i> in 7 (8 %), <i>papGIII</i> in 3 (3 %), <i>sfaDE</i> in 15 (17 %), <i>afa/draBC</i> in 4 (4 %), <i>iucD</i> in 35 (39 %), <i>usp</i> in 22 (24 %), <i>tcpC</i> in 7 (8 %), <i>traJ</i> in 23 (26 %) of the tested isolates. Our results indicate that in the human gut microbiota a high enough virulence potential is harboured in the strains to enable the <i>E. coli</i> strains to cause different extraintestinal infections.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VIII
	KAZALO SLIK	X
	KAZALO PRILOG	XI
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1	UVOD	1
1.1	NAMEN DELA	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1	Komenzalni sevi <i>E. coli</i>	4
2.1.2	Sevi ExPEC	5
2.1.3	Sevi IPEC	9
2.2	FILOGENETSKE SKUPINE IN PODSKUPINE	11
2.3	VIRULENTNI DEJAVNIKI	13
2.3.1	Adhezini	15
2.3.1.1	P-fimbrije (<i>papGII</i> in <i>papGIII</i>)	16
2.3.1.2	S-fimbrije (<i>sfaDE</i>)	16
2.3.1.3	<i>Afa/draBC</i>	17
2.3.2	Toksini	17
2.3.2.1	Citotoksični nekrotizirajoči faktor tipa 1 (CNF1)	18
2.3.2.2	α -hemolizin (HlyA)	18
2.3.2.3	Uropatogeni specifični protein Usp	19
2.3.3	Sistemi za privzem železa	19
2.3.4	Dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu	20
2.3.5	Konjugacija - sistem za širjenje virulentnih dejavnikov	23

2.4	ANTIBIOTIKI	24
2.4.1	Tarče delovanja protimikrobnih učinkovin	24
2.4.2	Mehanizmi odpornosti proti antibiotikom	26
2.4.2.1	Odpornost proti β -laktamskim antibiotikom (ampicilin)	28
2.4.2.2	Odpornost proti tetraciklinom	28
2.4.2.3	Odpornost proti kinolonom (ciprofloksacin)	28
2.4.3	Testiranje odpornosti proti antibiotikom	29
3	MATERIALI IN METODE	30
3.1	MATERIALI	30
3.1.1	Bakterijski sevi	30
3.1.1.1	Zbirka BJ	30
3.1.1.2	Sevi, ki povzročajo okužbe kože in mehkih tkiv (sevi SSTI)	33
3.1.1.3	Uropatogeni sevi (sevi UTI)	38
3.1.1.4	Standardni pozitivni - kontrolni bakterijski sevi	43
3.1.2	Gojišča	44
3.1.2.1	Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)	44
3.1.2.2	Priprava trdnih gojišč LB v petrijevkah	44
3.1.3	Kemikalije	44
3.1.4	Pufri in reagenti	47
3.1.4.1	Ločevanje nukleinskih kislin z elektroforezo v agaroznem gelu	47
3.1.5	Encimi	48
3.1.6	Oprema	48
3.2	METODE	49
3.2.1	Gojenje sevov	49
3.2.2	Priprava lizatov	49
3.2.3	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	49
3.2.3.1	Sestava reakcijske mešanice za PCR pri določevanju filogenetske (pod)skupine	50
3.2.3.2	Sestava reakcijske mešanice za PCR pri ugotavljanju prisotnosti zapisov za virulentne dejavnike	50
3.2.4	Elektroforeza DNA v agaroznem gelu	54
3.2.5	Statistične metode	54

4	REZULTATI	56
4.1	PREVALENCA FILOGENETSKIH (POD)SKUPIN	56
4.2	PREVALENCA VIRULENTNIH DEJAVNIKOV	58
4.2.1	Adhezini	59
4.2.2	Toksini	61
4.2.3	Sistem za privzem železa	62
4.2.4	Dejavnik za izogibanje imunskemu sistemu	63
4.2.5	Konjugacija - sistem za širjenje virulentnih dejavnikov	63
4.3	ŠTEVILO VIRULENTNIH DEJAVNIKOV PO FILOGENETSKIH (POD)SKUPINAH	64
4.4	PORAZDELITEV VIRULENTNIH DEJAVNIKOV GLEDE NA FILOGENETSKE (POD)SKUPINE	66
4.5	PORAZDELITEV VIRULENTNIH DEJAVNIKOV IN FILOGENETSKIH (POD)SKUPIN GLEDE NA SPOL	69
4.6	PORAZDELITEV VIRULENTNIH DEJAVNIKOV IN FILOGENETSKIH (POD)SKUPIN GLEDE NA OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE	70
5	RAZPRAVA	73
6	SKLEPI	85
7	POVZETEK	86
8	VIRI	89
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Statistični podatki in občutljivost za antibiotike sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ..	31
Preglednica 2: Podatki o sevih <i>E. coli</i> zbirke SSTI, dobljeni v predhodnih raziskavah. ..	34
Preglednica 3: Podatki o sevih <i>E. coli</i> zbirke UTI, dobljeni v predhodnih raziskavah.	39
Preglednica 4: Pozitivne kontrole sevov <i>E. coli</i> za verižno reakcijo s polimerazo.	43
Preglednica 5: Pregled s PCR pomnoževanih odsekov DNA za določevanje filogenetskih (pod)skupin in pripadajoči program (Clermont in sod., 2000).	50
Preglednica 6: Pregled s PCR pomnoževanih odsekov DNA za ugotavljanje prisotnosti zapisov za virulentne dejavnike in pripadajoči programi.	52
Preglednica 7: Uvrstitev sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ v filogenetske (pod)skupine.	57
Preglednica 8: Prevalenca preučevanih virulentnih dejavnikov sevov zbirke BJ.	58
Preglednica 9: Prevalenca sevov glede na število zapisanih virulentnih dejavnikov po filogenetskih (pod)skupinah.	64
Preglednica 10: Porazdelitev virulentnih dejavnikov po filogenetskih (pod)skupinah.	67
Preglednica 11: Porazdelitev virulentnih dejavnikov in filogenetskih (pod)skupin glede na spol.	69
Preglednica 12: Porazdelitev virulentnih dejavnikov in filogenetskih (pod)skupin glede na občutljivosti za ampicilin in tetraciklin.	71

Preglednica 13: Občutljivosti za testirane antibiotike glede na posamezne filogenetske skupine sevov BJ in glede na vse testirane seve BJ.	75
Preglednica 14: Primerjava prevalenc filogenetskih (pod)skupin in virulentnih dejavnikov sevov <i>E. coli</i> zbirk BJ, UTI in SSTI.	76
Preglednica 15: Občutljivosti za testirane antibiotike sevov BJ, sevov zbirke UTI in zbirke SSTI glede na posamezne filogenetske skupine in glede na skupno število posameznih zbirk.	78
Preglednica 16: Prevalenca filogenetskih skupin in virulentnih dejavnikov izolatov naše raziskave, v primerjavi z izolati prejšnjih raziskav, izvedenih na črevesni mikrobioti zdravih ljudi.	80
Preglednica 17: Prevalenca občutljivosti za antibiotike izolatov <i>E. coli</i> zbirke BJ v primerjavi z izolati prejšnjih raziskav s črevesno mikrobioto zdravih ljudi.	83

KAZALO SLIK

Slika 1:	Shematski prikaz določevanja filogenetskih skupin in podskupin na podlagi pomnoževanja specifičnih produktov PCR.	12
Slika 2:	Primer difuzijske metode Etest za ugotavljanje MIK za tetraciklin in ampicilin.	29
Slika 3:	Primer elektroforeze pomnožkov PCR za določanje filogenetske (pod)skupine sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ.	56
Slika 4:	Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena <i>papGII</i> sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ.	59
Slika 5:	Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena <i>papGIII</i> sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ.	59
Slika 6:	Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena <i>sfaDE</i> sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ.	60
Slika 7:	Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena <i>afa/draBC</i> sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ.	60
Slika 8:	Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena <i>cnf1</i> sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ.	61
Slika 9:	Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena <i>hlyA</i> sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ.	61
Slika 10:	Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena <i>usp</i> sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ.	62
Slika 11:	Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena <i>iucD</i> sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ.	62
Slika 12:	Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena <i>tcpC</i> sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ.	63
Slika 13:	Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena <i>traJ</i> sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ.	63

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke BJ glede na razvrščanje v filogenetskih (pod)skupinah, na prisotnost virulentnih dejavnikov in glede na število prisotnih virulentnih dejavnikov pri vsakem posameznem sevu.
- Priloga B: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke UTI in zbirke SSTI glede na razvrstitev v filogenetsko podskupino in na prisotnost gena *traJ*.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Amp	ampicilin
Cip	ciprofloksacin
CpG	dinukleotidni motiv iz citozina in gvanina (ang. cytosine-phosphate-guanine)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
DAEC	difuzno adherentni sevi <i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
EAEC	enteroagregativi sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. enteroaggregative <i>E. coli</i>)
EIEC	enteroinvazivni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. enteroinvasive <i>E. coli</i>)
EHEC	enterohemoragični sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. enterohaemorrhagic <i>E. coli</i>)
EPEC	enteropatogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. enteropathogenic <i>E. coli</i>)
ETEC	enterotoksigeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. enterotoxigenic <i>E. coli</i>)
ExPEC	zunajčrevesni patogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. extraintestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i>).
IL	interlevkin
IPEC	črevesni patogeni sevi <i>E. coli</i> (ang. intestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i>)
LB	tekoče gojišče Luria-Bertani
LRR	z levcinom bogate ponovitve (ang. leucine-rich repeat)
MAC	kompleks, ki napade membrano (ang. membrane attack complex)
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija (ang. minimal inhibitory concentration)
MPEC	sevi <i>Escherichia coli</i> , ki povzročajo mastitise (ang. mammary pathogenic <i>E. coli</i>)
NEMEC	sevi <i>Escherichia coli</i> , ki povzročajo neonatalni meningitis (ang. neonatal meningitis associated <i>E. coli</i>)
PAIs	otoki patogenosti (ang. pathogenicity islands)
PIs	otočki patogenosti (ang. pathogenicity islets)

PAMP	molekulski motivi patogenih mikroorganizmov (ang. pathogen-associated molecular pattern)
PBP	penicilin vezavni proteini (ang. PBP-penicillin binding proteins)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PMQR	plazmidno posredovana odpornost proti kinolonom (ang. plasmid - mediated quinolone resistance)
SEPEC	sevi <i>Escherichia coli</i> , ki povzročajo sepso (ang. sepsis associated <i>E. coli</i>)
SSTI	okužba kože in mehkih tkiv (ang. skin and soft tissue infections)
Tc	tetraciklin
TIR	domena Toll - interlevkinskega receptorja (ang. Toll-interleukin receptor)
TLR	Tollu-podoben receptor (ang. Toll-like receptor)
TNF	dejavnik tumorske nekroze (ang. tumor necrosis factor)
UPEC	uropatogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. uropathogenic <i>E. coli</i>)
UTI	okužba urinarne poti (ang. urinary tract infections)
Zbirka BJ	zbirka komenzalnih sevov <i>E. coli</i> Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani
Zbirka SSTI	klinična zbirka patogenih sevov <i>E. coli</i> izoliranih iz različnih okužb kože in mehkih tkiv v Laboratoriju za diagnostiko aerobnih in anaerobnih bakterijskih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani
Zbirka UTI	klinična zbirka patogenih sevov <i>E. coli</i> urinarnih okužb, izoliranih v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko okužb sečil na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani

1 UVOD

Naravno mikrobioto človeka in drugih živali sestavljajo vsi mikroorganizmi (od bakterij do nekaterih vrst gliv), ki naseljujejo sluznice in kožo zdravih gostiteljev. Predstavniki normalne mikrobiote so s človekom v komenzalnem sožitju. Normalna mikrobiota kolonizira gostitelja že takoj po rojstvu in predstavlja za gostitelja velik zaklad, saj ga ščiti pred vdorom in kolonizacijo patogenih mikrobov in posledično razvojem okužbe ter je pomembna pri presnovi in sintezi nekaterih rastnih dejavnikov. Sestava naravne mikrobiote se razlikuje med posameznimi anatomskimi predeli, različna je tudi od gostitelja do gostitelja, saj nanjo vplivajo različni fiziološki dejavniki (kot so npr. temperatura telesne površine, vlaga, ...), spreminja se pa tudi skozi čas (Seme, 2002 a).

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je del normalne črevesne mikrobiote in večinoma ne povzroča okužb, a v določenih primerih lahko *E. coli* povzroča različne črevesne (sevi IPEC) in zunajčrevesne okužbe (sevi ExPEC).

Da so lahko sevi *E. coli* patogeni oz. sposobni povzročiti bolezensko stanje gostitelja, je odvisno od lastnosti bakterije, torej od njenih genskih zapisov za virulentne dejavnike (različne fimbrije in adhezine, toksine, sisteme za privzem železa, ...), od zdravstvenega stanja gostitelja in tudi od same interakcije patogenega mikroorganizma in gostitelja.

S preventivnim zdravljenjem oz. cepljenjem, ki bi vzbudilo specifično delovanje imunskega sistema proti specifičnim virulentnim dejavnikom, bi lahko preprečili okužbe z *E. coli*, pod pogojem, da ne bi kakorkoli škodovali komenzalnim sevom, ki so del naravne človeške mikrobiote (Russo in Johnson, 2003).

1.1 NAMEN DELA

Črevesne okužbe povzročajo sevi *E. coli*, ki so pridobljeni iz okolja, a rezervoar *E. coli*, ki povzročijo zunajčrevesne okužbe, je črevesna mikrobiota posameznika. Namen diplomskega dela je ugotoviti prevalenco potencialno patogenih zunajčrevesnih sevov *E. coli* med črevesno mikrobioto zdravih ljudi, torej takih, ki ne kažejo nobenih bolezenskih znakov.

Pri delu smo uporabili zbirko 90 izolatov bakterije *E. coli*, ki je bila izolirana iz blata zdravih ljudi (zbirka BJ). Zbirko BJ so izolirali v laboratoriju skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Vseh 90 izolatov smo s pomočjo metode verižne reakcije s polimerazo (PCR) uvrstili v filogenetske (pod)skupine, ugotavljali pa smo tudi prisotnost zapisov izbranih virulentnih dejavnikov oz. dejavnikov, povezanih z virulenco sevov *E. coli*, sposobnimi zunajčrevesnih okužb, zlasti okužb urinarne poti (*papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *tcpC*, *iucC*, *usp*, *cnf1*, *hlyA*, *traJ*). Namen naloge je bil tudi ugotovitev povezave med filogenetskimi skupinami in naborom genetskih zapisov virulentnih dejavnikov ter odpornostjo proti antibiotikom. Dobljene podatke smo primerjali s podatki, ki so jih v skupini za molekularno genetiko dobili z enakimi poskusi na kliničnih zbirkah sevov urinarnih okužb (sevi UTI) in okužb kože in mehkih tkiv (sevi SSTI).

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Escherichia coli*

Bakterijo *E. coli* je prvič opisal nemški pediater Theodor Escherich v poznih letih 19. stoletja (Kaper, 2005). Bakterijo *E. coli* uvrščamo med γ -proteobakterije, v red *Enterobacteriales*, družino *Enterobacteriaceae* in rod *Escherichia* (Madigan in sod., 2003). Je eden izmed najbolj raziskanih prokariotskih organizmov, nekateri jo celo imenujejo za kraljico genetike.

Bakterije iz reda *Enterobacteriales* so paličaste oblike zmerne velikosti ($0,3 - 1,0 \times 1,0 - 6,0 \mu\text{m}$), ki se barvajo po Gramu negativno. So fakultativno anaerobne, oksidaza negativne, katalaza pozitivne, z zelo preprostimi prehranjevalnimi zahtevami, saj fermentirajo glukozo v številne končne produkte in reducirajo nitrat. Po obliki so nesporulirajoči bacili, ki so, kadar so giblivi, peritriho običkani (Madigan in sod., 2003; Murray in sod., 2005).

Enterobakterije so mikroorganizmi, ki jih najdemo razširjene po vsem svetu. Kolonizirajo črevesni trakt in so del črevesne mikrobiote človeka in številnih toplokrvnih živali (Murray in sod., 2005). Enterobakterije imajo fimbrije, katere omogočajo bakterijam pritrditev na specifične receptorje, ki se nahajajo na membrani epitelijskih celic gostitelja (Murray in sod., 2005). Nekatero so sposobne konjugacije, ki omogoča horizontalni genski prenos (Tortora in sod., 2001). Enterobakterije so klasificirali na podlagi biokemijskih lastnosti, antigenske strukture, hibridizacije in določevanje zaporedja nukleinskih kislin (Murray in sod., 2005). Danes poznamo mnogo tehnik izolacije in identifikacije enterobakterij. V kliničnih okoljih so najuporabnejši biokemijski testi, ločimo pa jih lahko tudi na podlagi antigenov s serološkimi metodami (Tortora in sod., 2001).

Za *E. coli* lahko rečemo, da je vsestranski mikroorganizem, saj med njenimi sevi najdemo komezalne seve, črevesne patogene (IPEC - intestinal pathogenic *E. coli*) in

zunajčrevesne patogene (ExPEC - extraintestinal pathogenic *E. coli*). Do take razlike med posameznimi sevi *E. coli* pride, ker se razlikujejo po prisotnosti virulentnih zapisov. Z vidika patogenosti, glede na nabor virulentnih dejavnikov, večina sevov IPEC, ki lahko povzroči črevesno okužbo, ni sposobna povzročiti zunajčrevesna obolenja, tako kakor večina sevov ExPEC, ki lahko povzroči zunajčrevesno okužbo, ni sposobna povzročiti črevesne okužbe (Russo in Johnson, 2003; Wiles in sod., 2008).

Virulentne seve *E. coli* lahko glede na prisotnost različnih virulentnih dejavnikov in na podlagi povzročanja podobnih bolezenskih znakov in stanj razdelimo na različne skupine (Bielaszewska in sod. 2007, Wiles in sod. 2008), ki jih imenujemo patotipi in jih označimo s kraticami.

2.1.1 Komenzalni sevi *E. coli*

Zdrav človek živi v sožitju z mikrobioto (komezali), ki kolonizira določene dele telesa: sluznice, kožo in črevesje. Črevesno mikrobioto sestavljajo številne bakterije in posamezne vrste gliv, ki so pripete v mukusu na črevesno steno in jih tako tok ne more odstraniti.

Bakterije iz rodu *Escherichia* živijo v spodnjem delu prebavila človeka in toplokrvnih živali, kjer so najštevilčnejši fakultativni anaerobi (Kuhar in sod., 1998). Kot del črevesne mikrobiote igrajo pomembno vlogo pri presnovi, saj so sposobne sinteze različnih vitaminov, zlasti vitamina K, ki ga gostitelj ni sposoben sintetizirati. Zaradi njihove sposobnosti življenja v oksičnih in anoksičnih pogojih domnevajo, da te bakterije uporabljajo kisik, ki je prisoten v črevesju in tako omogočajo še boljšo vzpostavitev anaerobnih okoljskih pogojev v debelem črevesju. Kot komezali onemogočajo tudi naselitev oz. kolonizacijo patogenih bakterij (Madigan in sod., 2003).

Nekateri sevi *E. coli*, ki imajo zapise za virulentne dejavnike (zapisi za adhezine, toksine, kapsule, invazine,...) so sposobni povzročiti številne črevesne in zunajčrevesne okužbe oz. različne oportunistične okužbe (Murray in sod., 2005). Komenzalni sevi načeloma ne povzročajo bolezenskih stanj, saj nimajo prisotnih zapisov za virulentne dejavnike. Vsekakor ob prisotnosti drugih dejavnikov, kot so tujek v človeškem telesu (npr. kateter),

gostiteljeva anatomska oz. funkcijska nepravilnost ali visok oz. mešan inokulum (npr. fekalna kontaminacija) v peritonealni votlini (potrebušnici) lahko sodelujejo pri nastanku različnih zunajčrevesnih okužb (Russo in Johnson, 2003). Komenzale seve in seve ExPEC najdemo kot del črevesne mikrobiote, medtem ko prisotnost sevov IPEC v črevesju zdravih ljudi vedno nakazuje na okužbo, ki se bo z veliko verjetnostjo razvila v bolezensko stanje (razvoj gastroenteritisov).

2.1.2 Sevi ExPEC

Sevi ExPEC imajo sposobnost za kolonizacijo drugih gostiteljskih niš kot so krvni sistem, osrednje živčevje in urinarna pot (Russo in Johnson, 2003). Genom sevov ExPEC je običajno daljši kot genom seva *E. coli* K12 ali genom komenzalnih sevov, saj imajo sevi ExPEC še zapise, ki omogočajo preživetje v zunajčrevesnem okolju (Wiles in sod., 2008). Na sam začetek in potek bolezni poleg virulentnih dejavnikov vpliva tudi splošno stanje gostitelja in sposobnost obrambe njegovega imunskega sistema (Koren, 2002).

V primerjavi z drugimi mikroorganizmi, ki so del črevesne mikrobiote, je *E. coli* tista, ki povzroča največje število zunajčrevesnih okužb (Moreno in sod., 2009). Do razmeroma visoke pestrosti obolenj, ki jih povzročajo sevi ExPEC, je prišlo zaradi spremembe genomskega materiala tekom evolucijskih procesov, kot so modifikacija že obstoječih genov, izguba genov in pogosto prevzem drugih genov s horizontalnimi prenosi (Bielaszewska in sod., 2007). Praviloma je mobilni genetski material tisti, ki ima zapise za virulentne dejavnike. Tako je omogočeno prenašanje le teh med različnimi sevi in posledično nastajanje novih kombinacij virulentnih dejavnikov (Kaper in sod., 2004).

Patotip *E. coli*, ki povzroča okužbo urinarne poti, označimo kot UPEC (ang. uropathogenic *E. coli*). Okužba urinarne poti (UTI), pri kateri je *E. coli* najštevilčnejši povzročitelj, je najpogostejša zunajčrevesna okužba. Do takih akutnih okužb lahko pride tudi pri pacientih s čisto normalno urinarno potjo, torej takim, ki ne kažejo nobenih anatomskih ali drugih funkcionalnih anomalij. Po statističnih izračunih vsaj 10 do 20 % žensk najmanj enkrat v življenju zboli za UTI (Le Bouguenec in sod., 1992). Zdrava sečila so bakteriološko sterilna, izjema je iztočni del sečnice, ki ga normalno naseljujejo različne komenzalne

bakterije (Petrovska, 2002). Večina bakterij, ki povzročajo okužbo sečil, izvira iz prebavil. Redkeje povzročajo okužbo sečil bakterije s kože ali iz bolnišničnega okolja (npr. trajni urinski kateter) (Car in Marinko, 2003). Običajna pot širjenja okužbe je ascendentna – transuretralna, redko hematogena. Človeško telo se brani takemu premiku bakterij z normalnim tokom, pretokom in iztokom seča, zlasti pa z normalnim delovanjem sečnih zaklopk. Bakterije, ki lahko kolonizirajo mehur in druge dele sečne poti so zmožne dovolj trdnega pritrdjanja na sluznico (Petrovska, 2002). Adhezini, ki omogočajo adherenco na uroepitelijske celice so za kolonizacijo urinarne poti in s tem nastanek akutnih UTI ob odsotnosti katerekoli anatomske ali funkcijske anomalije sečil, bistveni. (Le Bouguenec in sod., 1992). UTI je pogostejša pri ženskah. Vzrok tega je različna anatomska zgradba moškega in ženskega telesa. Ženske imajo kratko sečnico, ki se navzven odpira v vlažno (za bakterije ugodno območje za rast) območje vulve, medtem ko se dolga moška sečnica odpira v razmeroma suh predel kože in sluznice. Da pride do takega števila UTI pri ženskah je pomembna tudi zelo majhna razdalja med anusom in sečnico, ki omogoča pogost prenos črevesnih bakterij v sečila (Petrovska, 2002; Murray in sod., 2005). To potrjuje dejstvo, da sevi, izolirani kot UPEC, pogosto sovpadajo z izolati iz blata iste osebe (Wiles in sod., 2008). Ko enkrat sevi UPEC vstopijo v urinarno pot in kolonizirajo mehur, povzročijo cistitis. Lahko pa se povzpnejo po sečevodu do ledvic, kjer povzročajo pielonefritis (Wiles in sod., 2008). Daleč najpogostejši povzročitelj akutnega nezapletenega cistitisa pri mlajših ženskah je *Escherichia coli* (80 %), v manjšem deležu *Staphylococcus saprophyticus* (5 do 15 %), redko druge bakterije (*Enterobacteriace*, *Enterococci*) (Car in Marinko, 2003). Vsako leto zaradi nezapletenega cistitisa zboli približno 130 - 170 milijonov žensk v rodnem obdobju od katerih je pri 85 do 95 % primerov povzročiteljica *E. coli*. Kriva je tudi za 90 % nezapletenih pielonefritisov pri ženskah v rodni dobi, za katerim letno zboli 5,4 milijonov žensk širom sveta (Russo in Johnson, 2003).

Nedavne raziskave so z različnimi postopki (signature-tagged mutagenesis) omogočile razvoj modela, ki pojasnjuje potek okužbe s sevi UPEC (Kaper in sod., 2004). Uropatogeni sevi najprej kolonizirajo črevo gostitelja. Nato pride do kontaminacije periuretralnega predela oz. mehurja, kjer v roku od 4 do 24 ur zaradi spremembe okolja pride do nastanka fimbrij tipa 1, ki imajo poglobljeno vlogo v začetni fazi UTI (Kaper in sod., 2004). Da lahko

pride do okužbe morajo bakterije imeti zapis za adhezine, ki jim omogočajo pritrjevanje na gostiteljske celice. Tako pritrjevanje onemogoča kasnejše luščenje in njihovo odstranitev s tokom urina. Sevi *E. coli*, ki so invazivni, po pritrtanju vstopijo v epitelijske celice, kjer se razmnožujejo. V citosolu takih celic najdemo zelo veliko število bakterij (več tisoč). Take »polne« celice telo odstrani s tokom seča, saj so te dovzetne za luščenje in tako lahko telo po hitrem postopku odstrani veliko število patogenih bakterij. Ta proces povzroči, da nezrele epitelijske celice, ki so bolj dovzetne za okužbo, pridejo na površje. V mišjem modelu so opazili, da so sevi UPEC vstopili v celice v predelku, podobnem poznemu endosomu, ki se v celici nahaja znotraj zapletenega omrežja aktinskih filamentov. Podvojevanje bakterij je na tem mestu omejeno, zaradi česar so tudi sevi manj dovzetni za delovanje mnogih antibiotikov. To omogoča ponovitev UTI, saj taki manj dovzetni sevi predstavljajo nekakšne rezervoarje (Wiles in sod., 2008). Same UTI se po navadi začnejo v spodnjih sečilih - v uretri (uretritis) ter mehurju (cistitis) in se naknadno širijo v zgornja sečila vse do ledvic (pielonefritis) (Petrovska, 2002). Ugotovili so, da so pri sevih, ki povzročajo samo cistitise fimbrije tipa 1 konstantno prisotne, medtem ko se pri sevih, ki povzročajo še pielonefritise, nastanek fimbrij tipa 1 omeji oz. neha in se na bakterijski površini pojavijo fimbrije P (Kaper in sod., 2004). Ko bakterije pridejo do ledvičnega epitelija ga poškodujejo s hemolizinom in si tako omogočijo prosto pot do krvnega sistema, kar vodi v bakteriemijo (Kaper in sod., 2004). Do takih akutnih okužb lahko pride tudi pri pacientih, ki nimajo anatomskih ali drugih funkcionalnih anomalij urinarne poti (Le Bouguenec in sod., 1992).

Čeprav je lahko le majhno število *E. coli* sposobno povzročati cistitise in akutne pielonefritise v zdravem človeku, nikakor ne obstaja določen fenotipski profil takih sevov. Zaenkrat so različne virulentne dejavnike zasledili v različnih odstotkih med različnimi podskupinami UPEC (Kaper in sod., 2004). Sevi UPEC imajo majhne in velike otoke patogenosti, ki imajo zapise za skupine genov, katerih niso zasledili v genomu bakterij, ki prebivajo v črevesju (Kaper in sod., 2004).

Patotip *E. coli*, ki povzroča neonatalni meningitis označimo kot NEMEC (ang. neonatal meningitis associated *E. coli*), medtem ko patotip, ki povzroča sepso, označimo kot SEPEC

(ang. sepsis associated *E. coli*) (Kaper in sod., 2004; Russo in Johnson, 2003; Shpigel in sod., 2008).

E. coli, je za streptokoki skupine B drugi najpogostejši mikroorganizem, ki povzroča meningitis pri novorojenčkih (Russo in Johnson 2003; Kaper, 2005). Zaradi povečane rabe ampicilina z namenom zmanjšanja razširjenosti okužb, ki jih povzročajo streptokoki skupine B, se je število primerov neonatalnega meningitisa povzročenih z *E. coli* povečalo, saj je okoli 85 % *E. coli* odpornih proti ampicilinu. Razen pri novorojenčkih je *E. coli* sposobna povzročati meningitis pri pacientih po kirurški operaciji možganov ali kot posledica travme in tudi kot posledica nepravilno ozdravljene bakteriemije (Russo in Johnson, 2003).

Bakterija *E. coli* je zmožna povzročiti okužbo v skoraj vsakem organu in mestu v gostitelju. Pri vseh okužbah pa lahko posledično pride do bakteriemije in kasneje do sepse in septičnega šoka. Kar 1,3 % vseh smrti je posledica zapletov, ki nastanejo zaradi take vrste sepse (Russo in Johnson, 2003).

Lahko omenim, da so sevi ExPEC sposobni tudi okužbe abdominalne in medenične votline. Take okužbe predstavljajo drugo najpogostejšo zunajčrevesno okužbo, ki jo povzročajo sevi ExPEC. Ob taki okužbi se lahko razvijejo različna bolezenska stanja: akutni peritonitis, vnetje slepiča, intraperitonealni absces, divertikulitis, ... Iz brisov takih obolenj so sicer lahko izolirali *E. coli* kot edinega povzročitelja, a pogosto so razen sevov ExPEC izolirali še druge komponente črevesne mikrobiote (Russo in Johnson, 2003).

Nekateri sevi ExPEC lahko povzročijo tudi pljučnico, ampak pojav takih okužb je redek. Po Gramu negativni bacili so na splošno povzročitelji 2 do 5 % vseh evidentiranih pljučnic, saj po Gramu negativni bacili le redko kolonizirajo orofarings. Po drugi strani pa pri hospitaliziranih bolnikih, ti sevi zelo pogosto povzročajo pljučnice in predstavljajo najpogostejši vzrok (20 do 70 %) vseh takih okužb, še posebej pri bolnikih po operaciji in pri bolnikih v intenzivni negi (Russo in Johnson, 2003).

Omembe vredno je tudi dejstvo, da so sevi ExPEC sposobni povzročiti okužbo kirurških ran, osteomielitis in miositis. Število ocenjenih primerov je zaenkrat premajhno, da bi bilo možno z zanesljivostjo oceniti pogostost takšnih primerov, vendar pa so omenjene študije še v teku (Russo in Johnson, 2003).

Trenutno se znanstveniki ukvarjajo z domnevnim novim patotipom t.i. sevi MPEC (ang. mammary pathogenic *E. coli*), ki povzročajo mastitise pri doječih ženskah in še pogosteje pri živalih, ki proizvajajo mleko (Shpigel in sod., 2008).

Posebej je treba poudariti, da črevesje predstavlja pomemben rezervoar za bakterije, ki lahko povzročajo zunajčrevesne okužbe. Iz tega je razvidno, da je populacijska struktura *E. coli*, ki kolonizira človeško črevo, zelo pomembna pri sami patogenezi zunajčrevesnih okužb (Moreno in sod., 2009).

2.1.3 Sevi IPEC

Sevi IPEC so razvili sposobnost povzročanja gastrointestinalnih bolezni, med katere prištevamo enteritis, enterokolitis in kolitis. Seve IPEC delimo v 6 različnih patotipov.

Patotip, ki povzroča navadno drisko, označimo kot seve EPEC (enteropatogeni sevi *E. coli*). Sevi EPEC najpogosteje povzročajo drisko pri majhnih otrocih. Starejši otroci in odrasli redko zbolijo, kar je najverjetneje posledica odpornosti pridobljene v otroštvu. Ti sevi povzročajo propad mikrovilusov, ki se kaže kot močna vodena driska zaradi motene absorpcije.

Patotip, ki povzroča hemoragični kolitis, označimo kot sev EHEC (enterohemoragični sevi *E. coli*). Sevi EHEC izdelujejo *Shigelli* podoben toksin. Lahko povzročajo blago drisko ali pa hemoragični kolitis. Nevarni so predvsem pri otrocih in starejših ljudeh zaradi možnosti kasnejših zapletov in komplikacij, kot je hemolitični uremični sindrom (HUS).

Patotip, ki povzroča potovalno drisko, označimo kot ETEC (enterotoksigeni sevi *E. coli*). V to skupino spadajo sevi, ki so sposobni tvoriti dva različna toksina. Prvi je termostabilen (ST) drugi pa termolabilen (LT). Ti sevi se prenašajo s hrano in vodo.

Patotip, ki povzroča, perzistentno vodeno drisko z dehidracijo, označimo kot EAEC (enteroagregativi sevi *E. coli*). Najpogosteje najdemo patotipe EAEC pri otrocih v državah v razvoju.

Patotip, ki povzroča dolgotrajno drisko, označimo kot DAEC (difuzno adherentni sevi *E. coli*). Omenjeni sevi izločajo enterotoksin in se pritrdijo na enterocite.

Patotip, ki povzroča krvavo drisko, označimo kot EIEC (enteroinvazivni sevi *E. coli*) in tvori zadnjo, šesto skupino. Bolna oseba kaže močne abdominalne bolečine, zvišano telesno temperaturo in krvavo drisko s prisotnostjo levkocitov. Sevi EIEC so edini, ki so sposobni povzročiti škodo debelemu črevesju, vsi ostali naštetih patotipi povzročajo škodo le tankemu črevesju.

Sevi skupine EHEC so najpogostejši povzročitelji bolezni v razvitih državah, medtem ko ostalih pet skupin najdemo predvsem v državah v razvoju (Shpigel in sod., 2008; Murray in sod., 2005)

2.2 FILOGENETSKE SKUPINE IN PODSKUPINE

Analize so pokazale, da sevi *E. coli* spadajo v štiri večje filogenetske skupine A, B2, B1 in skupino D (Clermont in sod., 2000).

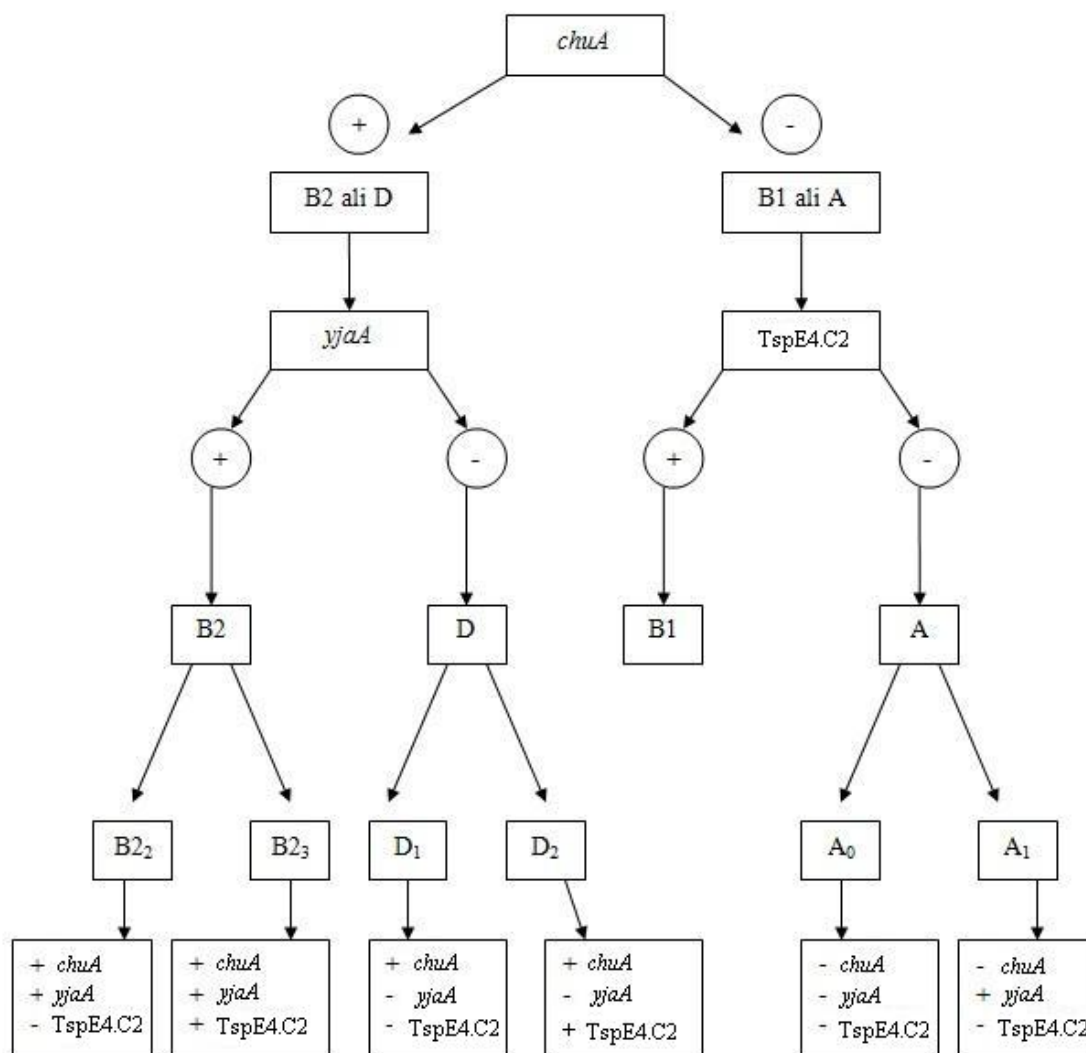
Študije so pokazale, da dve tretjini sevov *E. coli*, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe (ExPEC) spada v filogenetsko skupino B2, manjše število takih sevov pa spada v skupino D (Moreno in sod., 2009; Zhang in Foxman, 2003). Komenzalni sevi *E. coli*, ki ne kažejo prisotnosti virulentnih značilnosti, spadajo v glavnem v filogenetski skupini A in B1, le redko najdemo med komezali seve, ki jih po filogenetskih analizah uvrstimo v skupino B2 (Moreno in sod., 2009; Zhang in Foxman, 2003). Sevi, ki spadajo v filogenetsko skupino B2 ali D, imajo, za razliko od sevov filogenetskih skupin B1 in A, bolj pogosto zapise za virulentne dejavnike (Zhang in sod., 2002).

Seve *E. coli* v omenjene skupine uvrščamo na različne načine, z metodama multilfokusne encimske elektroforeze in ribotipizacije, katerih slaba stran je kompleksnost in dolgotrajnost, in z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki je preprosta in hitra in se je zato uveljavila. Metoda s PCR temelji na določenih genih oz. fragmentih DNA (slika 1), ki so specifični oz. določevalni za posamezne filogenetske skupine: *chuA*, gen potreben za transport hema pri enterohemoragičnih O157:H7 *E. coli*, gen *yjaA* in fragment TspE4.C2 oba z neznano funkcijo (Clermont in sod., 2000).

Sevi, ki spadajo v skupino B2 imajo prisotna gena *chuA* in *yjaA*. Sevi, ki spadajo v skupino D imajo prisoten gen *chuA* in odsoten *yjaA*. Sevi uvrščeni v skupino B1 nimajo *chuA* ampak imajo TspE4.C2, medtem ko sevi, ki spadajo v skupino A nimajo ne *chuA* ne TspE4.C2 (Clermont in sod., 2000).

Za uvrščanje sevov v filogenetske podskupine ponovno lahko gledamo kombinacije prej omenjenih genov oz. fragmentov *chuA*, *yjaA* in TspE4.C2. Če pogledamo razvrstitev v same podskupine, potem seve lahko uvrstimo v podskupino A0 (skupina A) če nima *chuA*, *yjaA* in TspE4.C2. V podskupino A₁ (skupina A) uvrščamo seve, ki nimajo *chuA* in *yjaA*,

ampak imajo TspE4.C2. V podskupino B2₂ (skupina B2) spadajo tisti sevi s prisotnima *chuA* in *yjaA* in odsotnim TspE4.C2. Podskupina B2₃ (skupina B2) ima prisotne vse tri: *chuA*, *yjaA* in TspE4.C2. Skupino D lahko delimo v dve podskupini in sicer podskupina D₁ in podskupina D₂. V podskupino D₁ spadajo tisti sevi, ki imajo *chuA* in nimajo *yjaA* in TspE4.C2, medtem ko v podskupino D₂ spadajo tisti, ki imajo *chuA* in TspE4.C2 in nimajo gena *yjaA* (Escobar-Parámo in sod., 2004).



Slika 1: Shematski prikaz določevanja filogenetskih skupin in podskupin na podlagi pomnoževanja specifičnih produktov PCR.

2.3 VIRULENTNI DEJAVNIKI

Virulenca je definirana kot sposobnost organizma, da povzroči bolezen v točno določenem gostitelju. Virulenca je rezultat skupnega vpliva produktov enega ali več genov za virulentne dejavnike, ki razlikujejo potencialnega patogena od komenzalnih črevesnih sevov in gostitelja (Johnson, 1991). Virulentni potencial bakterije je odvisen od števila in vrste virulentnih dejavnikov, velikost inokuluma in prisotnosti kopatogenov (Russo in Johnson, 2000).

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

S pritrditvijo na gostiteljske strukture se mikrobni patogeni izogibajo odstranjevanju in izločanju s telesnimi tekočinami (kri, seč, črevesna vsebina). Pripenjanje na površino gostiteljskih celic je nujen korak pri kolonizaciji in prvi korak, ki omogoči invazivno okužbo (Johnson, 1991). Virulentni dejavniki patogenih *E. coli*, ki so pomembni v nadaljnjih fazah okužbe, so toksini. Delujejo lahko na veliko različnih gostiteljskih celičnih procesov npr. na beljakovinsko sintezo, celično delitev, transkripcijo, apoptozo, ionsko sekrecijo, signalno transdukcijo, na citoskelet in na delovanje mitohondrijev (Kaper in sod., 2004). Poleg različnih adhezinov in toksinov imajo bakterije še zapise za različne druge virulentne dejavnike (kapsula, sistem za privzem železa, sistem za izmik imunskemu odzivu gostitelja), ki jim olajšujejo preživetje v gostitelju in kasnejšo okužbo, t. i. preživetveni faktorji (fitness factors) (Kaper, 2005). Sinergistično delovanje različnih virulentnih dejavnikov tako omogoča bakterijam, da so patogene (Kuhar in sod., 1998).

Zapisi za številne virulentne dejavnike, ki okarakterizirajo patogene *E. coli* niso del normalne genomske DNA sevov, ampak so rezultat različnih insercij s pomočjo mobilnih genetskih elementov (F-faktor, transpozoni, bakteriofagi,...) (Kaper, 2005; Oelschlaeger in sod., 2002; Guyer in sod., 2001). Omenjeni genomski odseki so načeloma večji od 10 kb, pogosto se ti geni nahajajo ob genih za tRNA, vključujejo prisotnost mobilnih DNA (kot so transpozoni in insercijski elementi) in genov za integracijo in vsebujejo atipično vsebnost nukleotidov G + C. Te posebne odseke DNA imenujemo otoki patogenosti (PAIs - Pathogenicity islands). Obstajajo tudi manjše verzije otokov patogenosti, katere imenujemo otočki patogenosti (PI - Pathogenicity islets), npr. PI, ki ima zapis za gen *usp*. Znanstveniki ob navzočnosti naštetih karakteristik domnevajo, da so sevi UPEC pridobili otoke patogenosti s pomočjo horizontalnih prenosov (Oelschlaeger in sod., 2002; Guyer in sod., 2001). Prav horizontalni prenos otokov PAI, ki lahko kodirajo adhezine, toksine, sisteme za pridobivanje železa, mehanizme za sekrecijo in kapsule, predstavlja pomembno orodje v evoluciji sevov UPEC (Emödy in sod., 2003).

Kot je že prej omenjeno imajo sevi UPEC posebne lastnosti, ki jim omogočajo urovirulenco. Take lastnosti načeloma kažejo sevi, ki jih uvrščamo v filogenetsko skupino B2. Ti sevi kažejo specifične adhezine kot so npr. fimbrije P, S ali Dr, ki jim olajšajo kolonizacijo v sečnem predelu in vsebujejo zapise za toksine, kot sta hemolizin in citotoksični nekrotizirajoči faktor 1 (CNF1), ki izzovejo vnetni odziv in tako UTI (Zhang in Foxman, 2003).

Virulentne dejavnike *E. coli* lahko, glede na mesto delovanja, ločimo v dve skupini; v tiste, ki jih bakterija izpostavi na celični površini in v tiste, ki jih proizvede znotraj celice in nato izloči na mesto delovanja. Med virulentne dejavnike, ki spadajo v prvo skupino sodijo različne vrste fimbrij s poglavitno vlogo pritrdjanja na površino gostiteljskih celic hkrati pa lahko služijo tudi za invazijo v tkiva, pri formaciji biofilmov ali pri indukciji citokinov, medtem ko med najpomembnejše virulentne dejavnike druge skupine prištevamo α -hemolizin, CNF-1 in aerobaktin (Emödy in sod., 2003).

Da lahko pride do kolonizacije, okužbe in kasnejšega bolezenskega stanja je poleg prisotnosti zapisov za virulentne dejavnike pomembna tudi regulacija ekspresije takih

genov. Regulacija ekspresije je velikokrat pogojena z okoljskimi dejavniki kot so npr. temperatura ter razpoložljivost hranil in železa. Za evolucijo patogenih sevov je razen pridobivanja zapisov za virulentne dejavnike (strukturna evolucija) zelo pomembna tudi evolucija regulacije ekspresije takih dejavnikov. Kombinirana kapaciteta adaptacije omogoča virulentnim bakterijam preživetje in proces patogeneze pri selektivnih okoljskih pogojih kot so v tarčnem gostiteljskem organu. Adaptacija je za bakterijo bistvena, saj ji omogoča sintezo virulentnih dejavnikov le takrat, ko jih res potrebuje in tako ne pride do potrate energije (Emödy in sod., 2003).

Sam cilj preiskav posebnosti virulentnih dejavnikov kateregakoli patogenega organizma je kasnejši razvoj sredstev, kateri bi delovali proti virulentnim dejavnikom (npr. cepivo) in tako preprečili okužbe (Johnson, 1991).

2.3.1 Adhezini

Patogeni sevi *E. coli* imajo prisotne specifične genetske zapise za adhezine, ki jim omogočajo kolonizacijo različnih, za to bakterijo neobičajnih niš. Adhezija je rezultat specifične interakcije med enim adhezinom (proteinska struktura), ki se nahaja na bakterijski površini in glikoproteiskim receptorjem na površini gostiteljske celice. Poimenovanje oz. klasifikacija adhezinov pogosto temelji na imenu receptorskega mesta gostiteljske celice (Le Bouguénec, 2005).

Poznamo dve različni vrsti adhezinov. Prvi so nameščeni na koncu fimbrije in jih imenujemo fimbrijski adhezini (kot npr. fimbrije tip I, PapG), medtem ko so drugi nameščeni neposredno na površini bakterijske celice in jih imenujemo nefimbrijski adhezini (npr. adhezini družine Afa/Dr) (Garcia in Le Bouguénec, 1996).

Fimbrije so nitaste strukture, ki v premeru merijo od 5 do 10 nm, sestavljajo jih beljakovinske enote in se morfološko in funkcijsko razlikujejo od flagelov in spolnih pilov (Kaper in sod., 2004; Johnson, 1991). Flageli so debelejši, daljši, bolj fleksibilni in odgovorni za premikanje. Spolni pili so debelejši in predstavljajo pomembno strukturo pri konjugaciji.

Adhezini olajšajo kolonizacijo urinarne poti in spodbujajo bakterijsko perzistenco v črevesju in vagini, kar lahko predstavlja rezervoar za ponovno UTI (Zhang in Foxman, 2003).

2.3.1.1 P-fimbrije (*papGII* in *papGIII*)

Najbolj preiskani in verjetno tudi najbolj pomembni adhezini so P-fimbrije. P-fimbrije prepoznajo glikolipide. Veliko število študij je potrdilo, da P-fimbrije pogosteje nastopijo pri sevih *E. coli*, ki povzročajo UTI, kot pri sevih, ki so del normalne človeške črevesne mikrobiote. P-fimbrije so dominantna značilnost sevov, ki povzročajo pielonefritis (Zhang in Foxman, 2003). P-fimbrije so zapisane v operonu *pap*, ki vsebuje 11 genov (Le Bouguénec, 2005). P fimbrije ločimo v štiri večje razrede (I, II, III in IV). Razred II P-fimbrij pogosteje srečamo pri sevih, ki povzročajo pielonefritise, medtem ko je razred III bolj pogost pri sevih, ki povzročajo cistitise. Razred IV P-fimbrij so tudi pogosto zasledili pri sevih povezanih z UTI. Veliko različnih študij je že dokazalo, da sevi, ki povzročajo UTI, imajo pogosteje zapis za tovrstne gene v primerjavi s sevi, izoliranimi iz blata. Z upoštevanjem rezultatov velikega števila različnih študij so ocenili, da ima P-fimbrije približno 80 % sevov *E. coli*, izoliranih iz bolnikov s pielonefritsom in 31 % izolatov pri pacientih s cistitisom (Zhang in Foxman, 2003). Protein, imenovan PapG, se nahaja na konici P-fimbrije in omogoča prepoznavo in vezavo na receptorsko glikolipidsko molekulo gostiteljske celice, zlasti ledvične.

2.3.1.2 S-fimbrije (*sfaDE*)

S-fimbrije pogosto tvorijo sevi, ki povzročajo neonatalni meningitis in UTI (Sokolowska-Köhler in sod., 1997). Zapisane so v operonu *sfa*, ki ga sestavlja devet genov (Balsalobre in sod., 2003). Pogostost pojavljanja tega tipa fimbrij pri sevih UPEC je več kot dvakrat večja, kot pri fekalnih izolatih (Zhang in Foxman, 2003). S-fimbrije prepoznajo in se pripenjajo na α -sialil- β -galaktozidno enoto glikoproteinov na celični površini. Fimbrije S se ne sintetizirajo konstitutivno, ampak so, podobno kot ostali adhezivni dejavniki, močno

regulirane s signali okolja kot so na primer temperatura, osmolarnost in rastne razmere (Sokolowska-Köhler in sod., 1997).

2.3.1.3 *Afa/draBC*

Družina adhezinov Afa/Dr vključuje zapis za med seboj različne adhezijske gene. Nekateri geni kot npr. *afa*, *daa* in *dra* kažejo med seboj zelo podobno gensko organizacijo, medtem ko drugi npr. *afaE* vodi v nastanek antigensko različnih beljakovin. Družina Afa/Dr je zanimiva, ker vsebuje obe vrsti adhezinov: fimbrijske in nefimbrijske adhezine. V adhezine Afa uvrščamo zelo heterogeno skupino beljakovin. Velika večina teh adhezinov se veže na enak receptor epitelijskih celic - antigen Dr na membransko beljakovino DAF (»decay-accelerating factor«). Zaradi tega adhezine Afa imenujemo tudi adhezine Afa/Dr (Le Bouguénec, 2005). Adhezini te družine so zapisani v operonih *afa*, *dra* in *daa*, ki imajo značilno strukturo: vsi vsebujejo namreč vsaj 5 genov, v genu E je zapis za adhezina, katerega zaporedje se od operona do operona razlikuje, geni od A do D pa imajo zapise za dodatne proteine in njihova nukleotidna zaporedja so bolj ohranjena. Adhezini družine Afa/Dr so sicer značilni za seve, ki povzročajo drisko, a ker je ta receptor pogost v predelu urinarne poti, adhezine te družine pogosto najdemo tudi v sevih UPEC (Servin, 2005). V urinarni poti se bakterije *E. coli* s pomočjo teh adhezinov lahko »vzpenjajo«, kar pomeni lažjo kolonizacijo celotne urinarne poti (Zhang in Foxman, 2003). Prisotnost genov Afa/dra družine povezujemo s kroničnimi ali pogostimi UTI in diarejami pri otrocih (Diard in sod., 2006).

2.3.2 Toksini

Bakterijske celice so sposobne s pomočjo različnih mehanizmov prenesti toksine iz svoje citoplazme, kjer jih sintetizirajo, do/v gostiteljsko celico, kjer delujejo (Kaper in sod., 2004).

Pri uropatogenih sevih *E. coli* so pogosti trije toksini: citotoksični nekrotizirajoči faktor tipa 1 (CNF1), α -hemolizin (HlyA) in uropatogeni specifični protein (Usp). Poleg teh treh

je znanih še nekaj toksinov, npr. Sat (ang. secreted autotransporter toxin) in Vat (ang. vacuolating autotransporter toxin), katere povezujejo z uropatogenimi sevi *E. coli*, saj jih sevi UPEC pogosto tvorijo. Toksin Sat povzroča poškodbo ledvičnega epitelija ob okužbi zgornjih sečnih poti, medtem ko specifična vloga toksina Vat zaenkrat še ni znana (Zhang in Foxman, 2003; Wiles in sod., 2008).

2.3.2.1 Citotoksični nekrotizirajoči faktor tipa 1 (CNF1)

Citotoksični nekrotizirajoči faktor ali CNF1 je virulentni dejavnik, ki je pogosto povezan z okužbami sečil. CNF1 je protein, ki v mehurju povzroči luščenje uroepitelnih celic (Bahrani-Mougeot in sod., 2002). Produkcija CNF1 je bolj pogosta pri kliničnih izolatih kot pri bakterijah, izoliranih iz fekalij (Kuhar in sod., 1998). Približno tretjina sevov UPEC ima zapis za toksin CNF1, ki je velik 113 kDa in povzroča apoptozo epiteljskih celic mehurja, spodbuja njihovo eksfoliacijo in tako si bakterija poveča dostop do spodaj ležečih tkivnih celic (Wiles in sod., 2008). Davis in sod. so dokazali, da CNF1, ki ga proizvajajo sevi UPEC, inhibira fagocitno in kemotaktično sposobnost nevtrofilcev (Davis in sod., 2005, 2006).

2.3.2.2 α -hemolizin (HlyA)

Alfa-hemolizin kodira okoli 50 % sevov UPEC in njegova prisotnost kaže na povišano resnost UTI. HlyA je toksin, velik 110 kDa, ki povzroča 2 nm široko poro v gostiteljski celici, kar vodi v njeno lizo. S tem si bakterija omogoča pridobivanje nutrientov in drugih snovi (npr. topno železo), saj kolonizira zelo revna okolja (Wiles in sod., 2008).

Znanstveniki so v različnih raziskavah ugotovili, da nobenega od omenjenih toksinov (CNF1 in HlyA) sevi UPEC ne sproščajo v okolje nezaščitenega, ampak jih obdajo z vezikli zunanje membrane (ang. OMVs - outer membrane vesicles) in jih s tem zaščitijo (Wiles in sod., 2008).

2.3.2.3 Uropatogeni specifični protein Usp

Kurazono in sod., so leta 2000 v študiji za ugotavljanje homolognih genov *zot* (ang. *zot* - zonula occludens toxin gene pri *Vibrio cholerae*) pri sevih UPEC identificirali 4167 - bp dolg PAI, ki ga znanstveniki običajno pripisujejo uropatogenim sevom. Ugotovili so, da ta PAI vsebuje gen *usp* (dolga 1038 bp), ki kodira beljakovino s 346 aminokislinami, ki so jo Kurazono in sod., imenovali uropatogeni-specifični protein Usp (ang. uropathogenic-specific protein) (Nakano in sod., 2001; Kurazono in sod., 2000). Yamamoto in sod., so v svoji študiji zasledili povezavo gena *usp* s sevi UPEC, saj so ga bistveno pogostejše odkrili v sevih, ki povzročajo UTI v primerjavi s sevi, izolirani iz blata zdravih ljudi. Usp ne deluje citotoksično kot CNF1 in HlyA. Predvidevajo, da Usp poviša okužbeni potencial bakterijskih patogenov in s tem pripomore k razširjanju po urinarni poti, kako pa še ni pojasnjeno (Yamamoto in sod., 2001).

2.3.3 Sistemi za privzem železa

Pri sesalcih je raven prostega železa zelo nizka, približno 10^{-25} M v krvi in še nižja v drugih predelih gostitelja. Železo predstavlja esencialno hranilo za bakterijo, saj ga ta v svoji citoplazmi potrebuje okoli 10^{-6} M (Wiles in sod., 2008). *E. coli* potrebuje železo za prenos kisika, elektronski transport, sintezo DNA ter kot kofaktor pri metabolizmu peroksidov. Bakterije so tako razvile sisteme za privzem železa, ki jim omogočajo preživetje in rast. Enega izmed sistemov predstavljajo siderofori z visoko afiniteto do ionskega železa (Fe^{+3}), ki bakterijam omogočajo privzemanje železa in njegovo kopičenje v bakterijskem citosolu (Wiles in sod., 2008). Skoraj vsi sevi *E. coli* imajo zapise za siderofor imenovan enterobaktin, proti kateremu se evkariontski organizmi dobro branijo, saj so znanstveniki ugotovili, da npr. gostiteljeva beljakovina lipokalin 2 deluje kot bakteriostatično sredstvo s specifično vezavo in privzemom enterobaktina. Patogeni sevi *E. coli*, še zlasti sevi UPEC, pa imajo zapise za nabor različnih sideroforjev, med katere lahko prištevamo salmohelin, jersiniabaktin in aerobaktin (Wiles in sod., 2008). Aerobaktin je značilen pri sevih, ki povzročajo pielonefritise in cistitise (Zhang in Foxman, 2003).

2.3.4 Dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu

Organizem se pred vdorom tujkov v telo ščiti na različne načine. Pri sesalcih so se razvili trije različni nivoji zaščite pred vdorom patogenov:

- anatomske pregrade,
- prirojen imunski sistem in
- pridobljen imunski sistem.

Da patogeni mikrob lahko okuži in povzroči bolezensko stanje gostiteljskega organizma, mora prodreti skozi anatomske, torej fizične in kemijske ovire, ki nespecifično inhibirajo invazijo patogenov. Ti pregradi sta predvsem koža in sluznica, ki sta stalno prekriti z izločki različnih žlez. Poleg kože in sluznice, tudi gostiteljske telesne tekočine (kot npr. kri, seč, solze) onemogočajo mikrobno kolonizacijo in okužbo, saj izpirajo sterilne niše telesa.

Če patogeni mikroorganizmi premagajo prej omenjene nespecifične prirojene pregrade, lahko inficirajo gostitelja. Ob tem dogodku se aktivira imunski sistem gostitelja. Poznamo prirojen in pridobljen imunski sistem.

Za prirojen imunski sistem je značilen nespecifičen odziv brez imunskega spomina. Do takega odziva pride takoj in v polni meri, ne glede na to, ali je gostitelj že prej prišel v stik z enakim antigenom (tujim mikroorganizmom) ali ne. V prirojen imunski odziv spada vnetje, vročina, imunske celice, ki delujejo nespecifično (npr. levkociti ali bele krvne celice, makrofagi) in komplementni sistem.

Komplement predstavlja pomembno in začetno fazo gostiteljske obrambe pred vdorom povzročitelja bolezni. Komplementni sistem predstavlja niz beljakovin, ki v kaskadni reakciji sprožijo nastanek membranskega kompleksa (MAC-membrane attack complex). Komplex MAC napada membrano tujka, v njej tvori pore, ki povzročajo lizo celic. Komplement sprožijo različni dražljaji, med drugim komponente celične stene bakterij. Ugotovili so, da so gladki sevi, v primerjavi s hrapavimi, veliko bolj odporni proti komplementnemu sistemu in da je stopnja odpornosti sorazmerna s količino

lipopolisaharidov, ki jih sev na svoji površini vsebuje. Ugotovili so tudi, da določeni plazmidi nudijo bakterijam rahlo okrepljen odpor proti delovanju komplementnega sistema, zlasti takrat, ko bakterija že kaže delno odpornost. Bakterija se uničenju s strani nespecifičnega imunskega sistema oz. komplementa izogiba na več načinov in pri vseh sodelujejo kapsularni polisaharidi, stranske verige O-polisaharidov in površinske beljakovine. Bakterija se gostiteljskemu imenskemu delovanju izmuzne z onemogočanjem aktivacije kaskadne reakcije komplementnega sistema s kislimi polisaharidi, z onemogočanjem komplementnih beljakovin, da dosežejo tarčna mesta v bakterijski membrani, ali s preprečevanjem normalnega delovanja kompleksa MAC, kljub temu, da doseže zunanjo membrano (geni *traT* in geni *iss* - increased serum survival) (Johnson, 1991). Študije kažejo, da so izolati bolnikov, ki kažejo znake pielonefritisa in cistitisa, odporni proti delovanju komplementnega sistema, medtem ko sevi bolnikov z asimptomatično bakteriurijo, kažejo večjo občutljivost za delovanje komplementnega sistema, kot testirani sevi, ki so del naravne črevesne mikrobiote (Johnson, 1991).

Izmik zelo hitremu odgovoru prirojenega imunskega sistema je za mikroorganizem esencialnega pomena v začetnih fazah okužbe (Cirl in sod., 2008). Akterji gostiteljevega prirojenega imunskega odziva, kot so monociti, makrofagi, nevtrofilci, dendritične celice in komplement, prepoznajo širok spekter različnih molekulskih vzorcev, ki so značilni za mikrobne patogene, gostitelj pa jih ne vsebuje. Gostiteljevo telo je tako sposobno takoj zaznati invazijo mikroorganizmov, kot so bakterije, glive, protozoji in virusi s pomočjo specifičnih receptorjev, ki so dveh vrst: tisti, ki olajšajo receptorsko posredovano fagocitozo (kot npr. CR3) in tisti, ki sprožijo takojšnji vnetni odziv s sekrecijo vnetnih citokinov (TNF1, TNF2, IL-1), interferonov in kemokinov (kot npr. TLR-receptorji). TLR-receptorji sprožajo tudi izražanje kostimulacijskih molekul, ki omogočajo aktivacijo limfocitov T in posledično vodijo do aktivacije in dozorevanja limfocitov B (Kumar in sod., 2004; Repnik in sod., 2004; Cirl in sod., 2008).

Leta 1985 so Kathryn V. Anderson in sodelavci odkrili receptor Toll pri vinski mušici (*Drosophila melanogaster*), ki je nujen za razvoj dorzoventralne osi zarodka. Kasneje so ugotovili, da je receptor Toll pomemben tudi pri obrambi odraslega osebk pred okužbo z glivo *Aspergillus fumigatus* (Beutler, 2004; Lemaitre in sod., 1996). Nato so pri sesalcih

odkrili homologne proteine receptorja Toll in jih poimenovali Toll-u podobni receptorji (TLR, ang. Toll-like receptors). TLR-receptorji so integralne membranske signalizacijske beljakovine tipa 1, ki prehajajo membrano le enkrat. Zunajcelična domena (C-terminalni del) je iz več tandemskih ponovitev, bogatih z levcinom in jo zato označimo kot LRR (ang. leucine-rich repeat), medtem ko je citoplazemska domena (N-terminalni del) strukturno zelo podobna citoplazemski domeni receptorja za interleukin-1 in jo zato imenujemo Toll/interleukin-1 receptor (TIR) (Muzio in Mantovani, 2000). Do danes je znanih 10 različnih TLR-receptorjev pri sesalcih, od katerih je trenutno za osem vloga znana (Takeda in Akira, 2004). Vsak od teh receptorjev prepozna različne in specifične molekule posameznih patogenih mikroorganizmov, katere imenujemo PAMPs (ang. pathogen - associated molecular patterns) ali molekulski motivi patogenih mikroorganizmov (Kaisho in Akira, 2006; Beutler, 2004). Domena LRR je vključena v prepoznavanju različnih molekul PAMP, medtem ko je domena TIR nepogrešljiva pri signaliziranju (Kaisho in Akira, 2006). TLR2 je bistvenega pomena pri prepoznavanju mikrobnih lipopeptidov. TLR1 in TLR6 se vežeta s TLR2, kar omogoča subtilno razlikovanje in prepoznavanje triacilnih za prvega (TLR1) in diacilnih lipopeptidov za drugega (TLR6). TLR4 je pomemben receptor, saj zazna prisotnost LPS. Bakterijska DNA lahko predstavlja tudi pomembno vezavno mesto za tovrstne receptorje, saj ni metilirana enako, kot je značilno za DNA gostitelja; TLR9 prepozna motive CpG (citozion-fosfat-gvanin) v bakterijski DNA, TLR3 prepozna virusno dvoverižno DNA. TLR5 specifično prepozna beljakovino flagelin (Takeda in Akira, 2004).

TLR-receptorji so zelo pomembni zaradi njihove imuno - adjuvantske funkcije in omogočajo takojšnjo gostiteljsko obrambo.

Glede na opisano vlogo, ki jo TLR-receptorji igrajo pri naravnemu imunskemu odzivu ni presenetljivo dejstvo, da so mikroorganizmi razvili sofisticirane mehanizme za izmik odzivu oz. preprečitev s TLR-receptorji posredovanega imunskega odgovora. Cirl in sod. (2008) so ugotovili, da obstajajo različni bakterijski patogeni, med katerimi je *E. coli*, ki so sposobni direktnega inhibiranja s TLR-receptorji posredovanega imunskega odgovora, saj imajo zapis (*tcpC*) za strukturno homologno beljakovino signalizacijske domene TLR-receptorjev. Homologna beljakovina TcpC omogoča bakterijam v celicah z naravnim

imunskim odgovorom večjo znotrajcelično preživetje, saj z interferenco v TLR-signalni poti prepreči sintezo in izločanje vnetnih citokinov in tako omogoča bakterijsko znotrajcelično akumulacijo. Avtorji poročajo tudi, da so z epidemiološkimi študijami dokazali, da imajo zapis za *TcpC* samo patogeni sevi, saj je bil pri izolatih iz blata zdravih ljudi zapis maloštevilen (Cirl in sod. 2008).

Za pridobljen imunski sistem je značilen specifičen odziv z imunskim spominom. Do odziva pride šele po nekaj dneh ali tednih. Predstavljajo ga posebni tipi levkocitov – limfociti. Med limfocite spadajo T-celice in B-celice. Specifični imunski sistem lahko delimo v dve kategoriji, celično posredovan imunski odziv in humoralni imunski odziv. Prvi predstavlja obrambo pred patogenimi mikroorganizmi, ki so že vdrli v celice. T-limfociti so odgovorni za posredovanje tovrstne imunosti. Poglavitno nalogo pri humoralni imunosti pokrivajo limfociti B, saj ti proizvajajo protitelesa, ki specifično prepoznajo in odstranijo povzročitelja bolezni (antigen). Humoralna imunost je usmerjena proti patogenom, ki prosto plavajo v krvi in limfni tekočini in proti patogenim produktom kot so toksini (Madigan in sod., 2003; Vozelj, 2000).

2.3.5 Konjugacija - sistem za širjenje virulentnih dejavnikov

Konjugacija je prenos DNA, do katerega pride ob neposrednem stiku donorske celice z recipientsko celico. Tak prenos genetskega materiala posredujejo plazmidi. Plazmidi, ki omogočajo konjugacijo, t.i. konjugativni plazmidi, morajo imeti zapis za prenos oz. morajo imeti zbirko genov *tra* v t.i. prenosni regiji (ang. transfer region). V prenosni regiji je približno 40 genov, ki kodirajo beljakovine z različnimi funkcijami, ki so vse potrebne za konjugativni prenos, od replikacije in prenosa DNA do nastanka in stabilizacije paritvenega para. Večina omenjenih genov (*traY-finO*) je del ene transkripcijske enote, katere glavni pozitivni regulator je gen *traJ* (Lewin, 2004; Firth in sod., 1996).

2.4 ANTIBIOTIKI

Antibiotiki so naravne substance, saj so večinoma sekundarni produkti metabolne aktivnosti mikroorganizmov oz. živih celic. Navadno jih izdelujejo glive ali bakterije. Antibiotiki s svojim delovanjem inhibirajo rast (bakteriostatični učinek) oziroma povzročajo propad (baktericidni učinek) drugih mikroorganizmov. V zadnjem času je veliko antibiotikov izdelanih s sintezo ali kemijsko modifikacijo naravne substance, s tem se izboljšajo njihove protimikrobne in farmakološke lastnosti. Takim sintetsko modificiranim oz. sintetiziranim antibiotikom rečemo kemoterapevtiki (Madigan in sod., 2003; Kotnik, 2002).

Na uporabnost določenega antibiotika pomembno vplivajo njegove lastnosti: selektivna toksičnost (antibiotik deluje na bakterijo ali druge mikroorganizme brez da bi škodoval zdravljenemu gostitelju); širok spekter delovanja; dolga razpolovna doba v plazmi; dobro prodiranje v medceličnino, celice in likvor; možno peroralno jemanje in odsotnost stranskih učinkov pri jemanju (Kotnik, 2002; Madigan in sod., 2003).

Antibiotike lahko delimo po izvoru (naravni, polysintetski in sintetski), po kemijski strukturi ali po tarči oz. mehanizmu delovanja.

2.4.1 Tarče delovanja protimikrobnih učinkovin

Tarče delovanja protimikrobnih učinkovin so encimi ali metabolni procesi, ki so ključni za normalno delovanje bakterijske celice. Glede na tarče delovanja protimikrobne učinkovine delimo v naslednje skupine:

- Zaviralci sinteze znotrajceličnih beljakovin:

Protimikrobne učinkovine, katerih tarče so ribosomi delujejo zelo selektivno, saj se bakterijski ribosomi razlikujejo od evkariontskih (Tenover, 2006). V to skupino spadajo aminoglikozidi, tetraciklini, kloramfenikoli, makrolidi, piranozidni antibiotiki- linkozamidi, fucidinska kislina.

Tetraciklini so zelo pomembna skupina antibiotikov, ki se zelo pogosto uporablja za zdravljenje, saj so tetraciklini široko spektralni antibiotiki, ki inhibirajo skoraj vse po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije. Bakteriostatično delujejo tako, da preprečijo vezavo aminoacil-t-RNA na akceptorsko mesto in onemogočajo translacijo. Vežejo se na ribosomsko podenoto 30S in tako preprečijo beljakovinsko sintezo.

- Zaviralci sinteze nukleinskih kislin:

V to skupino spadajo sulfonamidi, trimetoprim, kinoloni. Kinoloni (ciprofloksacin, nalidiksična kislina, norfloksacin) so danes ena najpomembnejših skupin antibiotikov, ki jih pridobivamo sintetično. Osnovna spojina je nalidiksična kislina. Tarča kinolonov so bakterijske topoizomeraze in tako preprečujejo podvojevanje bakterijske DNA in delujejo bakteriostatično. Topoizomeraze so encimi, ki uravnavajo zvijanje kovalentno zaprte verige DNA. Glede na način delovanja ločimo dve skupini topoizomeraz. Topoizomeraze I cepijo le eno verigo DNA in omogočijo prehod druge verige skozi nastalo vrzel. Dodajo ali odvzamejo le en navoj. Topoizomeraze II pa cepijo obe verigi in tako omogočijo prehod drugega dela vijačnice skozi nastalo vrzel, ki jo nato zaprejo. Slednje naenkrat dodajo ali odvzamejo dva navoja. Najbolj raziskane topoizomeraze pri *E. coli* sta DNA-giraza in topoizomeraza IV, ki spadata v skupino topoizomeraz II. DNA-girazo najdemo v celotni domeni *Bacteria*. Kinolone lahko uporabljamo za zdravljenje po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih okužb (Madigan in sod., 2003; Murray in sod., 2005).

- Zaviralci sinteze celične stene:

V to skupino uvrščamo glikopeptide, bacitracine, betalaktame. Antibiotiki, ki spadajo med betalaktame oz. med β -laktamske antibiotike, imajo skupen element v molekularni zgradbi, tj. β -laktamski obroč in so po delovanju baktericidni, ker zavirajo sintezo peptidoglikana. Vstopajo skozi bakterijsko steno in se vežejo na penicilin vezavne proteine (PBP), ki so v citoplazemski membrani. Katalizirajo navzkrižno povezavo stranskih skupin linearne peptidoglikanske verige. Posledica je, da ne pride do zamreženja celične stene (transpeptidacije) in bakterije postanejo zelo

občutljive za lizo. Kompleksi β -laktam/ PBP povzročijo tudi sproščanje avtolizinov, ki razgradijo nedokončano celično steno (Madigan in sod. 2003). Med β -laktamske antibiotike štejemo peniciline, cefalosporine in karbapeneme. Penicilini so najbolj razširjena skupina antibiotikov. Danes obstaja vrsta polsintetičnih in sintetičnih izpeljank z izboljšanimi farmakokinetičnimi in antibakterijskimi lastnostmi. Posebno pomembno je, da so iz prej sorazmerno ozko delujočih penicilinov razvili mnogo širokospektralnih derivatov, kot npr. ampicilin (Madigan in sod., 2003; Kotnik, 2002).

- Zaviralci delovanja celične membrane:

Zaviralci delovanja celične membrane selektivno zavirajo procese v citoplazemski membrani in tako ovirajo razmnoževanje prokariontskih celic. Zaradi različne strukture evkariontske in prokariontske citoplazemske membrane, zaviralci večinoma niso strupeni za evkariontske celice. npr.: polimiksini (Madigan in sod., 2003; Kotnik, 2002).

2.4.2 Mehanizmi odpornosti proti antibiotikom

Veliko je bilo že objavljenih definicij odpornosti. Odpornost proti antibiotikom lahko označimo kot fenotipsko in/ali genotipsko bakterijsko lastnost, katero lahko opredelimo glede na njen izvor (naravna oz. pridobljena odpornost) ali vrsto (enojna, večkratna ali navzkrižna odpornost) (Davison in sod., 2000). Odpornost proti protimikrobnim učinkovinam je zmožnost bakterijske rasti kljub prisotnosti teh učinkovin.

Sama evolucija je zaradi selekcijskega pritiska pripeljala do razvoja odpornosti. Lahko bi rekli, da je to predvidljiv in zagotovo neizogiben proces (Wright, 2003). Nekatere bakterije so proti določenim skupinam učinkovin naravno odporne, druge pa ne. Tako srečamo naravno (intrizično) in pridobljeno bakterijsko odpornost. O naravni odpornosti govorimo takrat, kadar je vsa bakterijska vrsta odporna proti neki skupini antibiotikov zaradi značilnih strukturnih ali fizioloških lastnosti (npr. mikoplazme, nimajo celične stene in so zato odporne proti penicilinom). Na pridobljeno odpornost nakazuje dejstvo, da samo posamezni sevi neke bakterijske vrste ali rodu kažejo odpornost proti določenim

antibiotikom oz. skupini takih antibiotikov (Davison in sod., 2000; Seme, 2002 b). Selekcijo odpornih bakterijskih sevov namreč omogoča predvsem množična in nekritična uporaba antibiotikov. Odpornost je lahko posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega zapisa. Kadar je odpornost posledica mutacij genov v kromosomu, se prenaša večinoma le vertikalno (iz generacije v generacijo). Kadar ima zapis za odpornost samostojni genski zapis, se ta lahko prenaša horizontalno z mobilnimi genetskimi elementi, kot so plazmidi, transpozoni, bakteriofagi in integroni, največkrat s konjugacijo ali transformacijo (Davison in sod., 2000). Pri bakterijah se geni lahko prenašajo znotraj vrste, med različnimi vrstami, različnimi rodovi, ali pa celo med po Gramu pozitivnimi in po Gramu negativnimi bakterijami (Madigan in sod., 2003). Zelo je pomembno dejstvo, da se odpornost proti določeni skupini antibiotikov pri zdravljenu gostitelju, ne razvija samo pri ciljni skupini bakteriji, ki povzročajo okužbo ampak se odpornost pojavlja tudi pri bakterijah, ki so del naravne črevesne mikrobiote (Guillemot, 1999). Mutacija in selekcija, skupaj z mehanizmi za horizontalni genski prenos omogočajo številnim bakterijam, da se hitro prilagodijo po uvedbi novega protimikrobnega sredstva. Kljub temu, da posamezna mutacija v poglavitnem bakterijskem genu omogoča le rahlo zmanjšano dovzetnost za antibiotik, vseeno omogoča bakteriji preživetje, dokler ne pride do dodatnih mutacij oz. pridobitve dodatnih genetskih informacij, s pomočjo katerih si zagotovi odpornost proti novi protimikrobni učinkovini. Le v redkih primerih pride lahko do popolne odpornosti zaradi enkratne posamezne mutacije (Tenover, 2006).

Poznamo šest glavnih mehanizmov odpornosti:

- odsotnost strukture, na katero protimikrobna učinkovina deluje;
- neprepustnost oz. zmanjšana prepustnost bakterijske membrane za protimikrobno učinkovino;
- encimska razgradnja protimikrobne učinkovine;
- sprememba tarčnega mesta delovanja protimikrobne učinkovine z mutacijo;
- nastanek nove metabolne poti z mutacijo in
- prisotnost membranskih črpalk, ki izčrpajo protimikrobno učinkovino iz celice (Tenover, 2006; Wright, 2003).

2.4.2.1 Odpornost proti β -laktamskim antibiotikom (ampicilin)

Odpornost proti β -laktamom je lahko posledica:

- spreminjanja normalnih PBP;
- tvorbe dodatnih, novih PBP;
- uporabe alternativnih peptidoglikanskih transpeptidaz;
- nepropustnosti zunanje membrane pri po Gramu negativnih bakterijah;
- izločanja β -laktamaz (encim, ki cepi amidno vez v β -laktamskem obroču in s tem inaktivira antibiotike)
- aktivnega izčrpavanja iz mesta delovanja.

2.4.2.2 Odpornost proti tetraciklinom

Po Gramu negativne in pozitivne bakterije so lahko odporne proti tovrstnim antibiotikom zaradi aktivnega črpanja antibiotika iz celice s posebnimi membranskimi beljakovinami, ki jih kodirajo v horizontalnem genskem prenosu pridobljeni geni. Po Gramu negativne bakterije so odporne proti tetraciklinom tudi zaradi nastanka določenih kromosomskih mutacij, ki spremenijo samo prepustnost celične membrane za to protimikrobno učinkovino (Seme, 2002 b).

2.4.2.3 Odpornost proti kinolonom (ciprofloksacin)

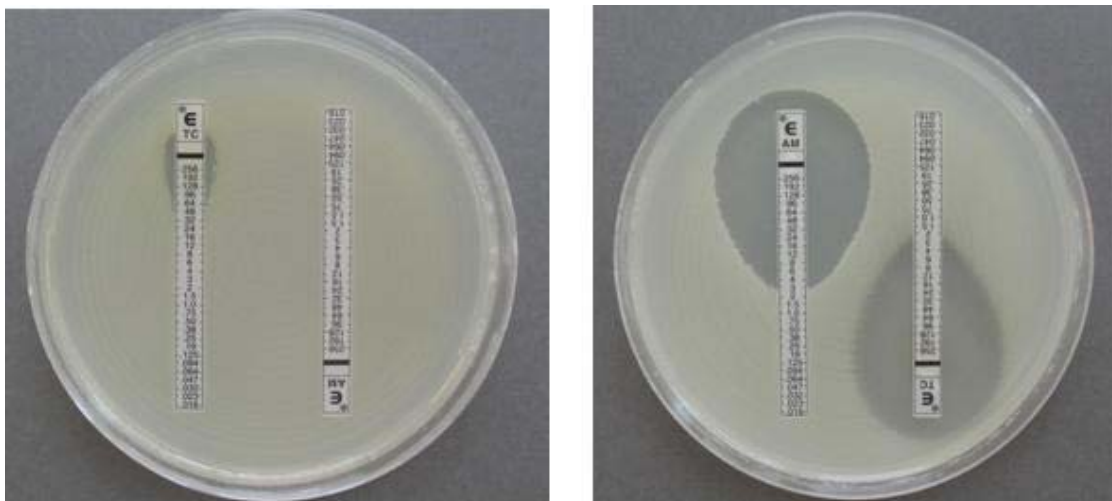
Vsi kinoloni imajo isti mehanizem delovanja in sicer inhibirajo delovanje encimov topoizomeras (DNA-giraza in topoizomerasa IV) tako, da tvorijo kompleks antibiotik/ encim/ DNA, ki vodi v inhibicijo podvajanja DNA. Praviloma do odpornosti vodijo spontane točkovne mutacije v genih, ki kodirajo encime, pogosto v kombinaciji z zmanjšanjem izražanja porinov zunanje membrane in s povišanjem izražanja genov, ki kodirajo črpalke katere omogočajo izčrpavanje antibiotika iz celice torej izčrpavanje iz mesta delovanja (Hopkins in sod., 2005).

Znanstveniki so tudi že leta 1987 odkrili plazmid PMQR (ang. plasmid – mediated quinolone resistance), ki ima zapis za odpornost proti kinolonom, torej bakterije lahko

odpornost pridobijo tudi s pomočjo horizontalnih prenosov med sevi (Hopkins in sod., 2005).

2.4.3 Testiranje odpornosti proti antibiotikom

Obstajajo različni načini testiranja sevov za odpornost proti antibiotikom. Med najbolj razširjenim načinom testiranja spada metoda Etest, s katero pridobimo informacijo o minimalni inhibitorni koncentraciji (MIK) za določen sev. Z navedeno metodo so v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko infekcij sečil Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani testirali seve zbirke BJ za odpornost proti trem antibiotikom: ampicilinu, tetraciklinu in ciprofloksacinu. MIK je najmanjša koncentracija protimikrobnega zdravila, ki po 18 ali 24 urah izpostavljenosti prepreči rast mikroorganizmov pri temperaturi 35 °C do 37 °C. Vrednosti MIK v µg/ml so odčitani po 24 urni inkubaciji neposredno iz skale na Etestu, v točki, kjer je rob inhibicijske elipse sekal Etest.



Slika 2: Primer difuzijske metode Etest za ugotavljanje MIK za tetraciklin in ampicilin.

Levo plošča z nacepljenim sevom BJ73, ki je odporen proti obema antibiotikoma in desno plošča s sevom BJ75, ki je občutljiv za oba antibiotika.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

3.1.1.1 Zbirka BJ

Sevi, ki smo jih uporabili pri diplomskem delu, predstavljajo zbirko BJ skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Zbirka BJ vsebuje 90 izolatov *E. coli*, izoliranih iz blata zdravih ljudi moškega in ženskega spola različnih starosti, ki niso prejeli nobenih antimikrobnih zdravil za terapevtske oziroma profilaktične namene. Zbirka je bila zbrana v obdobju od 01. 03. do 04. 09. 2009. Vzorec blata so udeleženci dali prostovoljno in ga tudi sami odvzeli in takoj prenesli na selektivno gojišče MacConkey (zrastejo samo po Gramu negativne bakterije). Z gojišča MacConkey so rožnato obarvane kolonije, domnevno *E. coli*, prenesli na gojišče EMB, kjer so preverjali za *E. coli* značilno kovinsko obarvanost. Naknadno so še naredili teste za indol, metil-rdeče, Voges-Proskauer in citrat, da bi potrdili, da so izolirani sevi res vrste *E. coli*. Od vsake osebe so v zbirko vključili samo en izolat *E. coli*. Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani so za vsak izolat zbirke BJ določili minimalno inhibitorno koncentracijo za ampicilin, tetraciklin in ciprofloksacin.

Preglednica 1: Statistični podatki in občutljivost za antibiotike sevov *E. coli* zbirke BJ.

Oznaka BJ	Spol	Starost	Ap [mg/ml]	Interpretacija za Ap	Cip [mg/ml]	Interpretacija za Cip	Tc [mg/ml]	Interpretacija za Tc
BJ1	M	43 let	>256	R	0,023	S	96	R
BJ2	Ž	16 let	>256	R	0,064	S	3	S
BJ3	Ž	41 let	2	S	0,023	S	2	S
BJ4	Ž	41 let	>256	R	0,006	S	64	R
BJ5	Ž	42 let	4	S	0,023	S	2	S
BJ6	Ž	15 let	4	S	0,012	S	1,5	S
BJ7	Ž	18 mesecev	2	S	0,012	S	2	S
BJ8	M	70 let	4	S	0,006	S	2	S
BJ9	M	70 let	3	S	0,023	S	2	S
BJ10	M	61 let	4	S	0,006	S	2	S
BJ11	M	61 let	2	S	0,023	S	1,5	S
BJ12	M	41 let	3	S	0,125	S	1,5	S
BJ13	M	16 mesecev	8	S	0,047	S	4	S
BJ14	Ž	25 let	6	S	0,023	S	2	S
BJ15	M	25 let	>256	R	0,032	S	96	R
BJ16	M	25 let	>256	R	0,032	S	2	S
BJ17	M	21 let	2	S	0,032	S	2	S
BJ18	M	21 let	>256	R	0,023	S	1,5	S
BJ19	M	65 let	3	S	0,032	S	3	S
BJ20	Ž	25 let	>256	S	0,047	S	1,5	S
BJ21	Ž	26 let	96	R	8	R	128	R
BJ22	Ž	23 let	>256	R	0,023	S	256	R
BJ23	M	23 let	6	S	0,016	S	2	S
BJ25	Ž	22 let	1,5	S	0,006	S	3	S
BJ26	Ž	22 let	>256	R	0,016	S	4	S
BJ27	Ž	23 let	>256	R	0,016	S	4	S
BJ28	Ž	22 let	>256	R	0,016	S	2	S
BJ29	Ž	67 let	2	S	0,012	S	1,5	S
BJ30	Ž	58 let	3	S	0,012	S	2	S
BJ31	M	67 let	1	S	0,008	S	4	S
BJ32	M	65 let	3	S	0,008	S	3	S
BJ33	M	78 let	4	S	0,016	S	2	S
BJ34	M	26 let	3	S	0,012	S	2	S
BJ35	M	56 let	8	S	0,016	S	6	I
BJ36	M	19 mesecev	3	S	0,032	S	4	S
BJ37	M	44 let	1,5	S	0,012	S	3	S
BJ38	Ž	41 let	3	S	0,008	S	6	I
BJ39	M	56 let	1,5	S	0,008	S	3	S
BJ40	Ž	23 let	4	S	0,016	S	>256	R
BJ41	Ž	49 let	3	S	0,023	S	4	S
BJ42	Ž	55 let	3	S	0,016	S	2	S
BJ43	Ž	20 let	6	S	0,016	S	>256	R
JB44	M	20 let	8	S	0,023	S	16	R
BJ45	Ž	23 let	3	S	0,008	S	4	S

Opomba: Ž - ženski spol; M - moški spol; S - občutljiv; R - odporen in I - intermediaren.

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1: Statistični podatki in občutljivost za antibiotike sevov *E. coli* zbirke BJ.

Oznaka BJ	Spol	Starost	Ap [mg/ml]	Interpretacija za Ap	Cip [mg/ml]	Interpretacija za Cip	Tc [mg/ml]	Interpretacija za Tc
BJ46	Ž	52 let	4	S	0,016	S	4	S
BJ47	Ž	28 let	>256	R	0,016	S	2	S
BJ48	Ž	9 mesecev	6	S	0,016	S	4	S
BJ49	M	28 let	3	S	0,016	S	4	S
BJ50	Ž	23 let	4	S	0,012	S	128	R
BJ51	M	21 let	2	S	0,012	S	3	S
BJ52	Ž	15 let	4	S	0,016	S	4	S
BJ53	Ž	79 let	>256	R	8	R	>256	R
BJ54	Ž	73 let	>256	R	0,25	S	>256	R
BJ55	Ž	44 let	3	S	0,012	S	2	S
BJ56	Ž	20 let	3	S	0,023	S	4	S
BJ57	Ž	24 let	6	S	0,012	S	6	I
BJ58	Ž	25 let	2	S	0,016	S	4	S
BJ59	M	23 let	>256	R	0,016	S	4	S
BJ60	M	21 let	2	S	0,016	S	4	S
BJ61	M	23 let	4	S	0,016	S	6	I
BJ62	Ž	23 let	2	S	0,016	S	2	S
BJ63	M	24 let	>256	R	0,25	S	4	S
BJ64	Ž	21 let	>256	R	0,023	S	96	R
BJ65	Ž	21 let	3	S	0,012	S	1,5	S
BJ66	M	27 let	4	S	0,016	S	6	I
BJ67	M	21 let	4	S	0,016	S	1,5	S
BJ68	Ž	22 let	6	S	0,032	S	6	I
BJ69	Ž	22 let	4	S	0,023	S	4	S
BJ70	M	23 let	>256	R	0,008	S	96	R
BJ71	M	23 let	>256	R	0,032	S	1,5	S
BJ72	M	27 let	>256	R	0,19	S	128	R
BJ73	M	25 let	>256	R	0,125	S	64	R
BJ74	M	24 let	>256	R	0,125	S	128	R
BJ75	M	4 leta	4	S	0,012	S	3	S
BJ76	Ž	8 let	6	S	0,016	S	3	S
BJ77	Ž	11 let	>256	R	0,023	S	2	S
BJ78	M	25 let	6	S	0,032	S	4	S
BJ79	Ž	2 meseca	16	I	0,023	S	4	S
BJ80	Ž	37 let	6	S	0,012	S	4	S
BJ82	Ž	2,3 let	8	S	0,016	S	3	S
BJ83	M	31 let	8	S	0,012	S	2	S
BJ84	M	5 let	6	S	0,012	S	4	S
BJ88	M	52 let	2	S	0,012	S	6	I
BJ89	Ž	53 let	4	S	0,016	S	6	I
BJ92	M	26 let	3	S	0,012	S	3	S
BJ93	Ž	52 let	6	S	0,016	S	3	S
BJ94	M	68 let	>256	R	0,016	S	3	S
BJ95	M	23 let	8	S	0,016	S	2	S
BJ96	Ž	24 let	8	S	0,016	S	3	S
BJ97	M	56 let	8	S	0,016	S	2	S

Opomba: Ž - ženski spol; M - moški spol; S - občutljiv; R - odporen in I - intermediaren.

3.1.1.2 Sevi, ki povzročajo okužbe kože in mehkih tkiv (sevi SSTI)

Okrajšava SSTI pomeni v ang. skin and soft tissue infections. Med seve *E. coli* zbirke SSTI štejemo 102 sevov izoliranih v Laboratoriju za diagnostiko aerobnih in anaerobnih bakterijskih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani v obdobju od 28. 08. do 30. 11. 2008.

Čitar M. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2010

Preglednica 2: Podatki o sevih *E. coli* zbirke SSTI, dobljeni v predhodnih raziskavah.

Oznaka seva	Filog. sk.	<i>papGII</i>	<i>pap GIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	Amp	Cip	Tc
TA3	B2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
TA5	B2	0	1	1	0	1	1	1	0	1	S	S	S
TA6	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA7	B2	0	1	1	0	1	1	1	0	0	S	S	S
TA8	B2	1	0	1	0	1	1	1	1	0	R	S	S
TA10	B2	0	0	1	0	0	0	1	1	0	R	S	S
TA11	B2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	S	S
TA16	B2	0	0	1	0	1	1	0	0	1	R	S	S
TA18	B1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	R	S	S
TA20	B2	0	1	0	0	0	0	1	1	1	S	S	n
TA24	D	0	0	1	0	1	0	0	1	0	S	S	S
TA25	B2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
TA26	B2	0	1	1	0	1	1	1	0	0	S	S	S
TA27	B2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	S	R	S
TA30	B1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	R	S	S
TA31	B2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	S
TA33	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R
TA35	A	0	1	0	0	0	0	0	0	0	S	R	S
TA36	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA37	B2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	S	S	S
TA42	B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	S
TA43	B2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	R	R
TA44	B2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	S	S	S
TA45	B2	0	1	0	0	1	1	1	0	1	R	S	S
TA46	B2	0	1	1	0	0	1	1	0	1	R	S	S
TA49	B2	0	1	1	0	0	1	0	0	0	R	S	R
TA50	B2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	R	S	R
TA55	B2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	S	S	S

Opomba: 1 - pozitiven rezultat; 0 - negativen rezultat; S - občutljiv; R - odporen in I - intermediaren; n - ni bilo določeno.

Se nadaljuje

Čitar M. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2010

Nadaljevanje **preglednice 2**: Podatki o sevih *E. coli* zbirke SSTI, dobljeni v predhodnih raziskavah.

Oznaka seva	Filog. sk.	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	Amp	Cip	Tc
TA56	B2	0	0	1	0	1	1	1	1	1	R	S	S
TA57	D	0	0	1	0	1	1	0	0	0	S	S	S
TA60	D	1	0	0	0	0	0	0	1	0	S	S	S
TA65	B2	0	0	1	0	0	0	1	1	1	S	S	S
TA67	B2	0	0	1	0	0	0	1	1	1	S	S	S
TA70	B2	0	0	1	0	1	1	1	0	0	S	S	S
TA71	B2	0	1	1	0	1	0	0	0	0	R	R	S
TA72	A	0	0	0	0	0	1	0	1	0	S	S	R
TA73	B2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S	R	S
TA81	B2	0	1	1	0	1	1	1	0	1	S	S	R
TA82	B2	1	0	1	0	1	1	1	1	0	S	S	S
TA83	A	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	R	R
TA84	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R
TA85	B2	1	0	0	0	0	0	1	1	0	R	S	S
TA91	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
TA93	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
TA94	B2	1	0	0	0	0	0	1	1	0	S	S	S
TA95	B2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	S	S	S
TA96	B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA99	B2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	R	S	S
TA101	B2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	S
TA103	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
TA106	B1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	R	R	R
TA107	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA110	B2	0	0	1	0	1	1	1	0	1	S	S	S
TA112	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA113	A	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S	S	S
TA115	B2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	S	S

Opomba: 1 - pozitivni rezultat; 0 - negativni rezultat; S - občutljiv; R - odporen in I - intermediaren; n - ni bilo določeno.

Se nadaljuje

Čitar M. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2010

Nadaljevanje **preglednice 2**: Podatki o sevih *E. coli* zbirke SSTI, dobljeni v predhodnih raziskavah.

Oznaka seva	Filog. sk.	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	Amp	Cip	Tc
TA116	D	0	0	0	1	0	0	1	1	0	S	S	S
TA117	D	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	S	S
TA118	B2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	S	R	S
TA127	D	0	0	1	0	0	1	0	1	0	R	S	R
TA128	D	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	R	R
TA129	B2	1	0	1	0	1	1	1	1	1	R	S	S
TA130	B2	1	0	1	0	1	1	1	1	0	S	S	S
TA131	B2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	S	R	S
TA133	B2	0	0	1	0	1	1	1	0	1	S	S	S
TA136	B2	0	0	1	0	0	0	0	1	1	S	S	S
TA140	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA142	B2	0	0	1	0	1	1	1	0	1	S	S	S
TA143	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	I
TA144	A	0	0	1	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA147	B2	0	0	0	0	0	1	1	0	1	R	S	R
TA155	B2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	R	S	S
TA156	A	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S	S	S
TA157	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	S
TA158	B2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	R	R	R
TA161	B2	0	0	1	0	1	1	1	0	1	R	S	S
TA162	B2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	S	S	S
TA168	B2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	R	R
TA169	A	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S	S	S
TA171	B2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	R	R
TA174	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R
TA176	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA178	B1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	R	R
TA179	B2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S	S	S

Opomba: 1 - pozitivni rezultat; 0 - negativni rezultat; S - občutljiv; R - odporen in I - intermediaren; n - ni bilo določeno.

Se nadaljuje

Čitar M. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2010

Nadaljevanje **preglednice 2**: Podatki o sevih *E. coli* zbirke SSTI, dobljeni v predhodnih raziskavah.

Oznaka seva	Filog. sk.	<i>papGII</i>	<i>pap GIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	Amp	Cip	Tc
TA180	D	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S	S	S
TA183	B2	0	1	1	0	1	1	1	0	0	S	S	S
TA186	B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	I	R
TA188	B2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	S	S	S
TA192	B2	0	0	1	0	1	1	1	0	0	S	S	S
TA194	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
TA195	B2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	R	R
TA196	D	1	0	0	0	1	0	1	1	0	S	S	S
TA198	D	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	S	R
TA199	B2	0	0	0	0	1	1	0	0	1	S	S	S
TA203	B2	0	1	1	0	1	1	1	0	1	S	S	S
TA206	B2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S	R	S
TA207	B2	1	1	0	0	1	1	1	0	1	R	S	S
TA208	B2	0	1	0	0	1	1	1	1	1	R	S	R
TA209	B2	0	0	0	0	1	1	1	0	1	R	S	S
TA210	B2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S	R	S
TA213	B2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	S	S	S
TA216	B1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	S	S	S

Opomba: 1 - pozitiven rezultat; 0 - negativen rezultat; S - občutljiv; R - odporen in I - intermediaren; n - ni bilo določeno.

3.1.1.3 Uropatogeni sevi (sevi UTI)

Okrajšava UTI pomeni v ang. urinary tract infections. Med seve *E. coli* zbirke UTI štejemo 110 izolatov, ki so bili enako kot sevi SSTI, izolirani na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko okužb sečil v obdobju med 01. 02 do 30. 05. 2002.

Čitar M. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2010

Preglednica 3: Podatki o sevih *E. coli* zbirke UTI, dobljeni v predhodnih raziskavah.

Oznaka seva	Filog. sk.	<i>papGII</i>	<i>pap GIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	Amp	Cip	Tc
DL 1	B2	0	1	1	0	1	1	1	0	1	S	S	S
DL 2	B2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL 3	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL 4	D	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S	S	S
DL 5	B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL 6	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL 7	B2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	S	R
DL 8	B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R
DL 9	B2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	S	R
DL 10	A	1	0	0	0	0	0	0	1	0	S	S	R
DL 11	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL 12	B2	0	1	1	0	1	1	1	0	0	R	S	R
DL 13	B2	1	0	1	0	1	1	1	1	0	R	S	R
DL 14	A	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	S	R
DL 15	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
DL 16	B2	1	0	1	0	1	0	1	1	1	R	S	S
DL 17	D	1	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL 18	B2	1	0	1	0	1	1	1	1	1	S	S	S
DL 19	D	1	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL 20	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL 21	D	1	0	0	0	0	0	0	1	0	R	S	R
DL 22	B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R
DL 23	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	R	R
DL 24	B2	1	0	0	0	0	1	1	1	0	S	S	R
DL 25	B2	0	1	1	0	0	1	1	1	0	S	S	R
DL 26	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R
DL 27	A	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	S	R
DL 28	D	0	0	0	0	0	0	1	1	0	R	S	R

Opomba: 1 - pozitivni rezultat; 0 - negativni rezultat; S - občutljiv; R - odporen in I - intermediaren.

Se nadaljuje

Čitar M. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2010

Nadaljevanje **preglednice 3**: Podatki o sevih *E. coli* zbirke UTI, dobljeni v predhodnih raziskavah.

Oznaka seva	Filog. sk.	<i>papGII</i>	<i>pap GIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	Amp	Cip	Tc
DL 29	B2	0	0	1	0	1	1	1	0	0	S	S	S
DL 30	B2	1	1	0	0	1	1	1	1	1	S	S	S
DL 31	B2	0	1	1	0	1	1	1	0	1	S	S	S
DL 32	B2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
DL 33	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL 34	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	S
DL 35	D	1	0	0	0	0	0	0	1	0	S	S	R
DL 36	B2	1	0	0	0	1	0	1	1	0	R	S	R
DL 37	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL 38	B2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	R	S	R
DL 39	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R
DL 40	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	S
DL 41	B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	S
DL 42	B2	1	0	1	0	1	1	0	1	1	S	S	S
DL 43	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL 44	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
DL 45	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R
DL 46	D	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	S	R
DL 47	D	1	0	0	0	0	0	0	1	0	R	S	R
DL 48	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R
DL 49	A	0	0	0	1	0	0	0	1	0	S	S	S
DL 50	B2	0	0	0	1	0	0	1	1	0	S	S	R
DL 51	A	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S	S	R
DL 52	B2	0	0	1	0	0	0	1	1	1	S	S	S
DL 53	B2	0	1	1	0	1	1	1	0	1	S	S	S
DL 54	B2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
DL 55	B2	1	1	0	0	1	1	1	1	1	S	S	S

Opomba: 1 - pozitivni rezultat; 0 - negativni rezultat; S - občutljiv; R - odporen in I - intermediaren.

Se nadaljuje

Čitar M. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2010

Nadaljevanje **preglednice 3**: Podatki o sevih *E. coli* zbirke UTI, dobljeni v predhodnih raziskavah.

Oznaka seva	Filog. sk.	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	Amp	Cip	Tc
DL 56	D	1	0	0	0	1	0	0	1	0	S	R	R
DL 57	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL 58	B2	0	0	1	0	1	1	1	0	1	S	S	S
DL 59	B2	0	1	1	0	1	1	1	0	1	S	S	S
DL 60	B2	0	1	1	0	1	1	1	0	0	S	S	S
DL 61	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL 62	B2	0	1	1	0	1	0	1	1	1	R	S	R
DL 63	D	1	0	0	0	0	0	0	1	0	R	S	R
DL 64	B2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
DL 65	B2	1	0	1	0	1	1	1	1	1	S	S	R
DL 66	A	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	S	R
DL 67	A	1	0	1	0	1	0	0	0	0	R	S	R
DL 68	B2	1	0	1	0	1	1	1	0	1	R	S	R
DL 69	B2	1	0	1	0	1	1	1	1	0	R	S	R
DL 70	B2	0	0	1	0	0	0	1	0	1	R	S	S
DL 71	D	1	0	0	0	0	0	1	1	0	S	S	R
DL 72	B2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	S	S	S
DL 73	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL 74	B2	1	0	1	0	1	0	1	1	1	R	S	S
DL 75	B2	1	0	0	0	0	0	1	1	0	S	S	S
DL 76	D	1	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL 77	B2	0	1	0	0	1	1	1	0	1	S	S	S
DL 78	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL 79	D	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
DL 80	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL 81	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL 82	B2	1	0	1	0	1	0	1	1	1	R	S	S
DL 83	B2	1	0	0	0	0	0	1	1	0	S	S	S

Opomba: 1 - pozitivni rezultat; 0 - negativni rezultat; S - občutljiv; R - odporen in I - intermediaren.

Se nadaljuje

Čitar M. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2010

Nadaljevanje **preglednice 3**: Podatki o sevih *E. coli* zbirke UTI, dobljeni v predhodnih raziskavah.

Oznaka seva	Filog. sk.	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	Amp	Cip	Tc
DL 84	A	1	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R
DL 85	B2	0	1	1	0	1	1	1	0	1	S	S	S
DL 86	B1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL 87	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
DL 88	B2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
DL 89	B2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	R
DL 90	A	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	R	R
DL 91	B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R
DL 92	B2	1	1	1	0	0	1	1	1	1	S	S	S
DL 93	B2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
DL 94	A	1	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
DL 95	B2	1	0	0	0	0	0	1	1	0	R	S	R
DL 96	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL 97	D	1	0	0	0	0	0	1	1	0	R	S	R
DL 98	B2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	R	S	R
DL 99	A	1	0	0	0	0	0	0	1	0	S	S	S
DL 100	B2	1	0	1	0	0	1	1	1	1	R	S	R
DL 101	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
DL 102	B2	0	1	1	0	1	1	1	0	1	S	S	S
DL 103	B2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S	S	S
DL 104	A	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S	S	R
DL 105	B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL 106	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL 107	D	0	0	0	0	0	0	1	1	0	R	S	R
DL 108	B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	S
DL 109	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
DL 110	B2	0	0	0	0	1	1	0	1	0	R	S	R

Opomba: 1 - pozitivni rezultat; 0 - negativni rezultat; S - občutljiv; R - odporen in I - intermediaren.

3.1.1.4 Standardni pozitivni - kontrolni bakterijski sevi

V preglednici 2 so prikazani sevi *E. coli*, ki smo jih uporabili kot pozitivne kontrole v verižni reakciji s polimerazo.

Preglednica 4: Pozitivne kontrole sevov *E. coli* za verižno reakcijo s polimerazo.

Gen oz. fragment	Pozitivna kontrola
<i>cnf1</i>	sev J96
<i>hlyA</i>	sev 536
<i>papGII</i>	sev TA11
<i>papGIII</i>	sev 536
<i>sfaDE</i>	sev 536
<i>afa/draBC</i>	sev DL50
<i>iucD</i>	sev Nissle 1917
<i>usp</i>	sev TA11
<i>tcpC</i>	sev TA155
<i>traJ</i>	sev CSH118
<i>chuA</i> <i>yjaA</i> TspE4.C2	sev TA71

3.1.2 Gojišča

3.1.2.1 Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)

Za pripravo tekočih gojišč LB smo v 1L deionizirane vode raztopili 25 g/l gojišča LB (0,5 % kvasni ekstrakt, 1 % tripton, 1 % NaCl), ter dodali potrebno količino vode. Gojišče smo dobro premešali z magnetnim mešalom. Nato smo odpipetirali v epruvete (5 ml oz. 10 ml) ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C.

3.1.2.2 Priprava trdnih gojišč LB v petrijevkah

Za pripravo 1L trdnih gojišč LB smo v deionizirani vodi raztopili 25 g/l gojišča LB in 15 g/l agarja ter dobro premešali na magnetnem mešalu. Stopljeno gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 55 °C, smo ga nalili v sterilne plastične petrijevke.

3.1.3 Kemikalije

BIOLABS, New England, ZDA

- mešanica dNTP-jev »dNTP mix«

BIOLIFE ITALIANA, MILANO, ITALIJA

- agar-agar

FERMENTAS, Vilna, Litva

- $MgCl_2$ (25mM)
- pufer za *Taq* DNA-polimerazo
- bromfenol modro

- standardna DNA - lestvica 50-bp (velikosti fragmentov v bp: 1000, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, **250**, 200, 150, 100 in 50 bp)
- standardna DNA - lestvica 100-bp (velikosti fragmentov v bp: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100 bp)
- standardna DNA - lestvica 1-kb (velikosti fragmentov v bp: 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250 bp)
- DNA - lestvica »MassRulerTM DNA Ladder Mix« (velikosti fragmentov v bp 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, **1031**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100 in 80 bp)
- bromfenol modro

RIEDEL DE HAËN

- borova kislina

ROTH

- baza Tris

SEAKEM

- agaroza

SIGMA Chemicals, St. Louis, Missouri, ZDA

- etidijev bromid (10 mg/ml)
- LB (Luria-Broth medium)
- baza TRIS
- borova kislina
- TRIS-HCl
- EDTA
- Na-citrat

- ksilencianol
- agaroz

PHARMACIA Biotech, Piscataway, New Jersey, ZDA

Začetni oligonukleotidi:

- CNF1-1 (CTGACTTGCCGTGGTTTAGTCGG)
- CNF1-2 (TACACTATTGACATGCTGCCCCGGA)
- Aer1 (TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT)
- Aer2 (AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG)

JENA Bioscience GmbH

Začetni oligonukleotidi:

- hlyA.1 (AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT)
- hlyA.2 (ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA)
- papG_III r (GGCCTGCAATGGATTACCTGG)
- papG_III f (CCACCAAATGACCATGCCAGAC)
- papG_II r (CGGGCCCCAAGTAACTCG)
- papG_II f (GGGATGAGCGGGCCTTTGAT)
- SFA-1 (CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC)
- SFA-2 (CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA)
- afa/draBC-f (GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC)
- afa/draBC-r (CCCGTAACGCGCCAGCATCTC)
- ChuA. 1 (GACGAACCAACGGTCAGGAT)
- ChuA.2 (TGCCGCCAGTACCAAAGACA)
- YjaA.1 (TGAAGTGTCAGGAGACGCTG)

- YjaA.2 (ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC)
- TspE4C2.1 (GAGTAATGTCGGGGCATTCA)
- TspE4C2.2 (CGCGCCAACAAAGTATTACG)
- N6 (ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT)
- N7 (CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT)
- tcpC-for (GGCAACAATATGTATAATATCCT)
- tcpC-rev (GCCCAGTCTATTCTGCTAAAGA)
- PTraJ-1(TCCAAAAATGATGATGAAT)
- PTraJ-2 (ATAGGAACCTCCTCACAAAG)

3.1.4 Pufri in reagenti

3.1.4.1 Ločevanje nukleinskih kislin z elektroforezo v agaroznem gelu

Za pripravo agaroznih gelov in elektroforezo smo uporabili naslednje raztopine:

- **5 X TBE** (0,45 mM Tris-borat; 10 mM EDTA), ki smo ga hranili pri sobni temperaturi;
- **agarozo** za pripravo gela;
- **1 % elektroforezni agarozni gel**, smo pripravljali tako, da smo agarozo (1,2 g) dodali v 120 ml pufra 0.5 x TBE, segreli, da se je agaroza raztopila, ohladili do 60 °C ter nato v gel dodali 6 µl etidijevega bromida (10 mg/ml);
- **1, 5 % elektroforezni agarozni gel** smo pripravili z dodatkom agaroze (1,8 g) v 120 ml pufra 0.5 x TBE, segreli, da se je agaroza raztopila, ohladili do 60 °C ter nato v gel dodali 6 µl etidijevega bromida (10 mg/ml);
- **2 % elektroforezni agarozni gel** smo pripravili tako, da smo 2,4 g agaroze dodali 120 ml pufra 0,5 x TBE. Nato smo mešanico segreli dokler se agaroza ni popolnoma stopila. Ohlajenemu gelu do 60 °C smo dodali 6 µl etidijevega bromida (10 mg/ml) in vlili v naprej pripravljen plastični nosilec za gelček;

- **nanašalni elektroforezni pufer** (0,25 % bromfenol modro; 0,25 % ksilen cianol; 40 % saharoza, sterilna voda).

3.1.5 Encimi

FERMENTAS

- *Taq* DNA-polimeraza

3.1.6 Oprema

Spisek opreme, ki smo jo uporabljali pri našem delu:

- rotacijski stresalnik (Biofuge 13, Heraeus),
- aparatura za PCR:
 - GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Ontario, Kanada),
 - Biometra UNO II (Biometra, Gottingen, Nemčija),
- namizna centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg, Nemčija),
- termoblock Constantemp (Techlab, Los Angeles, Kalifornija, ZDA),
- sistem za elektroforezo DNA 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma, Stockholm, Švedska),
- UV luč 2011 Macrovue (UV 302 nm) (LKB Bromma, Stockholm, Švedska),
- avtomatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija),
- vroča kopel LBB – »Multi temp II« (Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, ZDA).

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje sevov

Vse uporabljene seve smo gojili ali na trdnih gojiščih LB ali v tekočih gojiščih LB. Inkubirali smo jih preko noči pri 37 °C, tekoča gojišča pa smo inkubirali na stresalniku pri isti temperaturi.

3.2.2 Priprava lizatov

Seve, iz katerih smo pripravili lizate in jih hranili pri –80 °C smo nacepili na plošče LB do posameznih kolonij in inkubirali preko noči pri 37 °C. Po prekonočni inkubaciji smo posamezno kolonijo vsakega seva BJ prenesli v 5 ml tekočega gojišča LB in inkubirali na rotacijskem stresalniku preko noči pri 37 °C. Drugi dan smo prenesli 1 ml prekonočne bakterijske kulture v sterilno mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 minuto pri 14 000 obratih na minuto. Odlili smo supernatant in bakterijam dodali 200 µl sterilne destilirane vode. Bakterije smo resuspendirali s kratkim mešanjem na vibracijskem mešalniku. Resuspendirane celice smo nato inkubirali 10 minut pri 100 °C, zatem smo celice centrifugirali 10 minut pri 14 000 obratih na minuto v namizni centrifugi pri sobni temperaturi. Iz dobljenega supernatanta smo 150 µl prenesli v svežo sterilno mikrocentrifugirko in do uporabe hranili pri –80 °C. Supernatant, v kateri je celokupna celična DNA, smo uporabili kot matrično DNA pri kasnejši izvedbi verižne reakcije s polimerazo.

3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda, ki omogoča hitro pomnoževanje DNA *in vitro*. Metoda poteka v treh stopnjah. V prvi stopnji reakcijsko mešanico segrejemo na določeno temperaturo, ki je od 90 do 96 °C, in tako omogočamo denaturacijo oz. razklenitev dvojne vijačnice DNA. Na tako razviti in ločeni verigi se začetni oligonukleotidi prilegajo na matrično DNA. Tudi ta stopnja poteka ob določeni

temperaturi, ki je običajno okoli temperature tališča obeh začetnih oligonukleotidov. Po uspešnem prileganju sledi sinteza komplementarne verige, s termostabilno DNA-polimerazo, ko temperaturo dvignemo na optimalno njeno delovanje (72 °C za *Taq*-polimerazo).

3.2.3.1 Sestava reakcijske mešanice za PCR pri določevanju filogenetske (pod)skupine

Končni volumen za PCR je bil 20 µl. Mešanica je vsebovala 1 µl začetnih oligonukleotidov ChuA.1 (20 pmol/µl), 1 µl ChuA.2 (20 pmol/µl), 1 µl YjaA.1 (20 pmol/µl), 1 µl YjaA.2 (20 pmol/µl), 1 µl TspE4C2.1 (20 pmol/µl), 1 µl TspE4C2.2 (20 pmol/µl), 0,4 µl dNTP-jev s koncentracijo 10mM, 2 µl pufru za *Taq*-polimerazo, 2 µl MgCl₂ s koncentracijo 25 mM, 0,5 µl *Taq*-polimeraze (5 U/ µl), 6,1 µl sterilne destilirane vode in 3 µl celičnega lizata.

Preglednica 5: Pregled s PCR pomnoževanih odsekov DNA za določevanje filogenetskih (pod)skupin in pripadajoči program (Clermont in sod., 2000).

Začetni oligonukleotid	Produkt (bp)	Program	Pozitivna kontrola	Referenca
ChuA.1 (GACGAACCAACGGTCAGGAT) ChuA.2 (TGCCGCCAGTACCAAAGACA)	279	94 °C 4 min 1×	TA71	Clermont in sod., 2000
YjaA.1 (TGAAGTGTCAAGGAGACGCTG) YjaA.2 (ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC)	211	94 °C 30s 59 °C 30s 30×		
TspE4C2.1 (GAGTAATGTCGGGGCATTCA) TspE4C2.2 (CGCGCCAACAAAGTATTACG)	152	72 °C 30s		
		72 °C 5 min 1×		

3.2.3.2 Sestava reakcijske mešanice za PCR pri ugotavljanju prisotnosti zapisov za virulentne dejavnike

Za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *cnf*, *hlyA*, *papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *iucD*, *usp*, *tcpC* in *traJ* smo imeli 25 µl reakcijske mešanice. Mešanica je vsebovala po 0,5 µl posameznih začetnih oligonukleotidov koncentracije 20 pmol/µl, 0,5 µl 10 mM dNTP-jev, 2,5 µl 10 × pufru za *Taq*-polimerazo z (NH₄)₂SO₄, 2,5 µl 25 mM MgCl₂,

0,125 μ l *Taq*-polimeraze koncentracije 5 U/ μ l, 13,375 μ l destilirane sterilne vode in 5 μ l celičnega lizata. V preglednici so shematično prikazani geni z zapisi za posamične virulentne dejavnike, ki smo jih pomnoževali in tako ugotavljali njihovo prisotnost, zaporedja posameznih uporabljenih oligonukleotidov, velikost produktov in pogoji pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo.

Preglednica 6: Pregled s PCR pomnoževanih odsekov DNA za ugotavljanje prisotnosti zapisov za virulentne dejavnike in pripadajoči programi.

Posamezen odsek DNA	Začetni oligonukleotidi	Produkt (bp)	Program	Pozitivna kontrola	Referenca
<i>papGII</i>	papG _{II} r (CGGGCCCCCAAGTAACTCG) papG _{II} f (GGGATGAGCGGGCCTTTGAT)	190	<u>95 °C 2,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 55 °C 1 min 25× <u>72 °C 30 sec</u> 72 °C 7 min 1×	TA11	Johnson in Brown, 1996
<i>papGIII</i>	papG _{III} r (GGCCTGCAATGGATTACCTGG) papG _{III} f (CCACCAAATGACCATGCCAGAC)	258	<u>94 °C 2,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 63 °C 30 sec 25× <u>72 °C 3 min</u> 72 °C 10 min 1×	536	Johnson in Brown, 1996
<i>sfaDE</i>	SFA-1 (CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC) SFA-2 (CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA)	408	<u>94 °C 3 min 1×</u> 94 °C 2 min 65 °C 1 min 25× <u>72 °C 2 min</u> 72 °C 10 min 1×	536	Le Bouguenec in sod., 1992
<i>afa/draBC</i>	afa/draBC-r (GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC) afa/draBC-f (CCCGTAACGCGCCAGCATCTC)	594	<u>95 °C 4 min 1×</u> 94 °C 30 sec 63 °C 30 sec 25× <u>68 °C 3 min</u> 72 °C 10 min 1×	DL50	Johnson in Stell, 2000
<i>cnfI</i>	CNF1-1 (CTGACTTGCCGTGGTTTAGTCGG) CNF1-2 (TACACTATTGACATGCTGCCCCGA)	1295	<u>94 °C 4 min 1×</u> 94 °C 1,5 min 59 °C 1,5 min 30× <u>72 °C 2 min</u> 72 °C 5 min 1×	J96	Kuhar in sod., 1998

Se nadaljuje

Nadaljevanje **preglednice 6**: Pregled s PCR pomnoževanih odsekov DNA za ugotavljanje prisotnosti zapisov za virulentne dejavnike in pripadajoči programi.

Posamezen odsek DNA	Začetni oligonukleotidi	Produkt (bp)	Program	Pozitivna kontrola	Referenca
<i>hlyA</i>	hlyA.1 (AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT) hlyA.2 (ACCATATAAGCGGTCATTCCCCGTCA)	1177	<u>95 °C 2,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 64 °C 30 sec 30×	536	Yamamoto in sod., 1995
<i>usp</i>	N6 (ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT) N7 (CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT)	1000	<u>94°C 2,5 min 1×</u> 94°C 30 sec 68°C 1 min 30×	TA11	Nakano in sod., 2001
<i>iucD</i>	Aer1 (TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT) Aer2 (AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG)	602	94 °C 4,5 min 1×	Nissle	Yamamoto in sod., 1995
<i>tcpC</i>	tcpC-for (GGCAACAATATGTATAATATCCT) tcpC-rev (GCCCAGTCTATTTCTGCTAAAGA)	386	94 °C 30 sec 60 °C 30 sec 25×	TA155	Starčič Erjavec in sod., 2010
<i>traJ</i>	PTraJ-1 (TCCAAAAAATGATGATGAAT) PTraJ-2 (ATAGGAACCTCCTCACAAAG)	210	<u>94 °C 4,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 60 °C 30 sec 30x <u>72 °C 30 sec</u> 72 °C 10 min 1×	CSH118	To delo

3.2.4 Elektroforeza DNA v agaroznem gelu

Elektroforeza je standardna separacijska metoda, ki jo uporabljamo za zaznavanje in ločevanje fragmentov DNA. Sama elektroforeza temelji na dejstvu, da lahko snovi biološkega izvora v vodi ionizirajo. Tako dobimo molekule, ki so pozitivno nabite in molekule, ki so negativno nabite. To lastnost izkoriščamo pri elektroforezi, saj ionizirane molekule izpostavimo električnemu polju in tako kationi potujejo proti katodi in anioni proti anodi. Hitrost potovanja je odvisna od celokupnega naboja, velikosti in oblike delcev, ter od poroznosti medija, v katerem se delec giblje. Molekule nukleinskih kislin, ki so zaradi fosfatnih skupin negativno nabite, potujejo skozi pore gela in se ločijo na osnovi velikosti in konformacije, kjer manjše in bolj zvite molekule potujejo hitreje. Glede na analizo različne DNA smo pripravili gele z gostoto od 1 % do 2 % agaroze. Produkti PCR za gene *iucD*, *cnf1*, *hlyA*, *afa/draBC*, *usp* in *sfaDE* so bili večji od 500 bp in smo jih vnesli v 1 % agarozni gel, produkte PCR za gene *papGII*, *papGIII*, *traJ* in produkte PCR, s katerimi smo preverjali filogenetsko skupino, smo vnesli v 2 % gele, saj je njihova velikost manjša od 300 bp, medtem ko smo produkt PCR za gen *tcpC*, ki je velik 386 bp, vnesli v 1,5 % gelček. Gel smo pripravili tako, da smo ustrezni količini agaroze dodali pufer $0,5 \times$ TBE ter segrevali, dokler se agarosa ni popolnoma raztopila. Ko je bil gel ohlajen na približno 50 - 60 °C, smo mu dodali etidijev bromid do končne koncentracije 0,5 µg/ml. Gel smo nato vlili v nosilce in počakali, da se strdi. Kot označevalec velikosti smo v jamice dodali 3 µl standardne DNA - lestvice 1-kb, standardne DNA - lestvice 50-bp, standardne DNA - lestvice 100-bp ali standardne DNA - lestvice »MassRuler™ DNA Ladder Mix«. V jamice smo vnesli po 5 µl pomnožkov PCR skupaj z nanašalnim elektroforeznim pufrom v razmerju 5:1. Gelska elektroforeza je tekla pri napetosti 120 V v pufru $0,5 \times$ TBE. Po končani elektroforezi smo gele presvetlili z UV-svetlobo valovne dolžine 302 nm in slikali rezultate.

3.2.5 Statistične metode

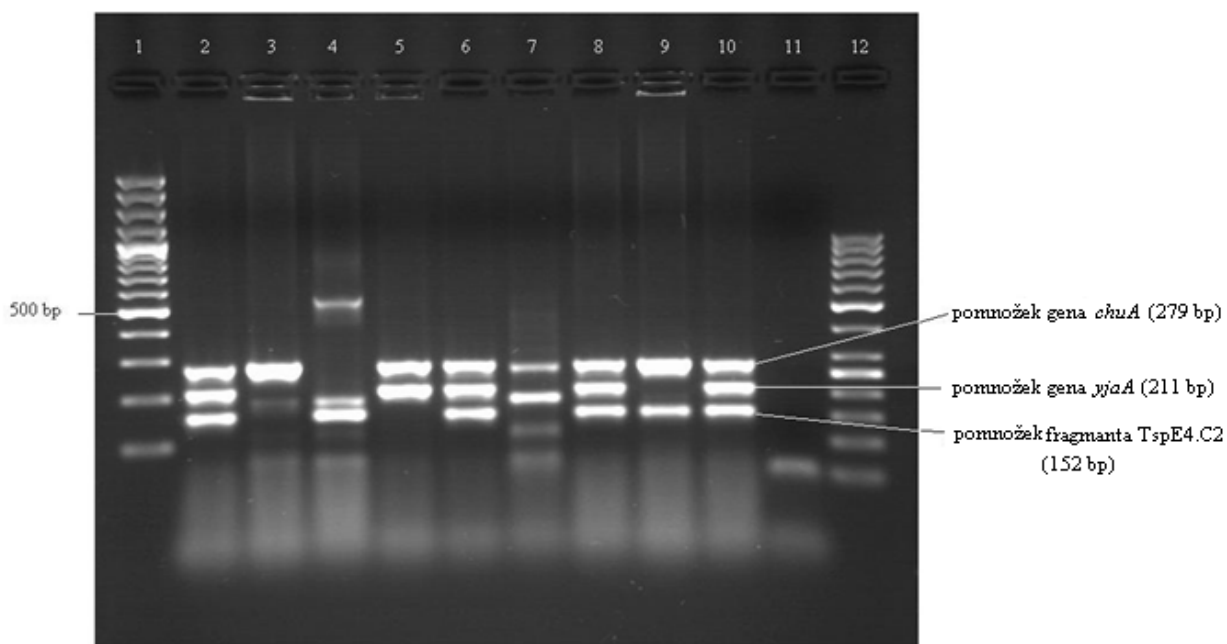
Statistično značilnost povezav dobljenih rezultatov smo ugotavljali s programom Fisher's exact test (Langsrud, 2004). Ta program je posebej prirejen za številčno majhne vzorce.

Kot statistično značilne rezultate štejemo tiste rezultate, ki imajo vrednost $P \leq 0,05$. Takrat lahko trdimo, da sta primerjana podatka statistično značilno povezana.

4 REZULTATI

4.1 PREVALENCA FILOGENETSKIH (POD)SKUPIN

Z metodo PCR pri določanju filogenetskih (pod)skupin smo testirali vseh 90 sevov zbirke BJ. Na sliki 4 je prikazan rezultat gelske elektroforeze produktov PCR za določanje filogenetskih (pod)skupin izbranih sevov BJ.



Slika 3: Primer elektroforeze pomnožkov PCR za določanje filogenetske (pod)skupine sevov *E. coli* zbirke BJ.

Legenda: 1 - standardna DNA - lestvica 100-bp (Fermentas), 2 - sev TA71 (pozitivna kontrola), 3 - sev BJ1, 4 - sev BJ6, 5 - sev BJ31, 6 - sev BJ34, 7 - sev BJ5, 8 - sev BJ71, 9 - sev BJ74, 10 - sev BJ97, 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA - lestvica 50-bp (Fermentas).

Preglednica 7: Uvrstitev sevov *E. coli* zbirke BJ v filogenetske (pod)skupine.

Filogenetska skupina	Prevalenca sevov N (%)	Filogenetska podskupina	Prevalenca sevov N (%)
A	20 (22)	A0	7 (8)
		A1	13 (14)
B1	13 (14)		
B2	30 (33)	B2 ₂	1 (1)
		B2 ₃	29 (32)
D	27 (30)	D1	21 (23)
		D2	6 (7)

Kot je razvidno iz preglednice 7, smo največ, 30 (33 %) sevov zbirke BJ uvrstili v skupino B2. Druga najbolj številčna skupina je bila D s kar 27 (30 %) sevi. Sledila jima je skupina A z 20 (22 %) sevi in skupina B1 s 13 (14 %) sevi. Najštevilčnejša je bila podskupina B2₃, v katero smo uvrstili 29 sevov (32 %), sledila ji je podskupina D1 z 21 sevi (23 %). Ko smo še podrobneje pregledali dobljene rezultate smo opazili, da od 30-ih izoliranih sevov, ki je spadalo v skupino B2, kar 29 (97 %) od teh je spadalo v podskupino B2₃ in, da je samo 1 sev spadal v podskupino B2₂.

4.2 PREVALENCA VIRULENTNIH DEJAVNIKOV

Z verižno reakcijo s polimerazo smo testirali vseh 90 sevov zbirke BJ za deset izbranih genskih zapisov virulentnih dejavnikov; iz skupine adhezinov smo preverjali *papGIII*, *papGII*, *sfaDE* in *afa/draBC*, iz skupine toksinov smo preverjali *cnf1*, *hlyA* in *usp*, iz skupine sistemov za privzem železa smo preverjali *iucD*, iz skupine za izogibanje imunskemu sistemu smo preverjali *tcpC* in izmed genov za konjugacijo smo preverjali *traJ*. Na slikah od št. 5 do št. 14 so prikazani primeri elektroforeznih gelov za posamezne gene. Vsi rezultati vseh PCR so zbrani v prilogi A, medtem ko so izračunani rezultati za dobljene podatke prikazani v preglednicah od številke 8 do številke 10.

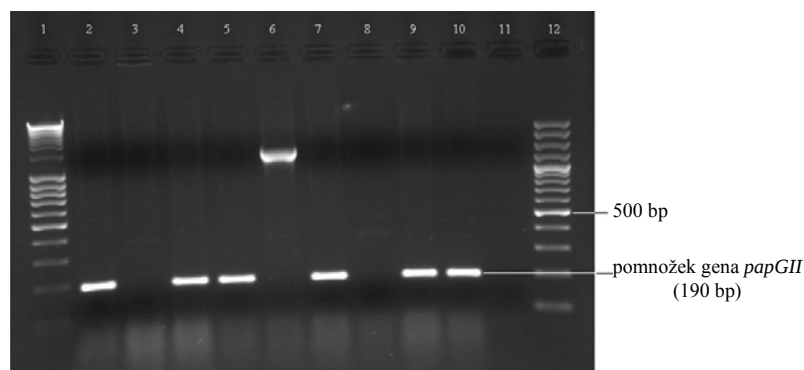
Preglednica 8: Prevalenca preučevanih virulentnih dejavnikov sevov zbirke BJ.

	Število oz. prevalenca zapisov virulentnih dejavnikov (N [%])									
	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>usp</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	<i>traJ</i>
Število pozitivnih izolatov	7	3	15	4	22	7	5	35	7	23
Odstotek pozitivnih izolatov	8 %	3 %	17 %	4 %	24 %	8 %	6 %	39 %	8 %	26 %

Če povzamemo preglednico 8, je bil med sevi zbirke BJ najštevilčnejši zapis virulentnega dejavnika *iucD* s kar 35 pozitivnimi sevi (39 %), temu je sledil *traJ* s 23 (26 %), *usp* s 22 (24 %), *sfaDE* s 15 (17 %), *tcpC*, *hlyA* in *papGII* s 7 (8 %), *cnf1* s 5 (6 %), *afa/draBC* s 4 (4 %) in *papGIII* s 3 (3 %) pozitivnimi izolati.

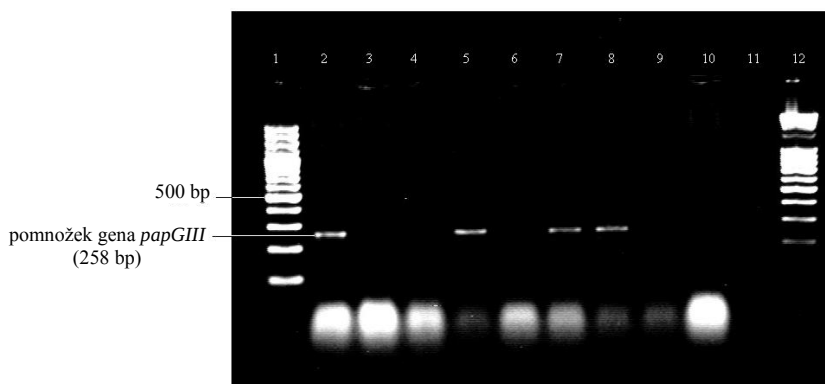
4.2.1 Adhezini

Ugotovili smo, da je bil gen *papGII* v 7 (8 %), *papGIII* v 3(3 %), *sfaDE* v 15 (17 %) in *afa/draBC* v 4 (4 %) pregledanih sevov.



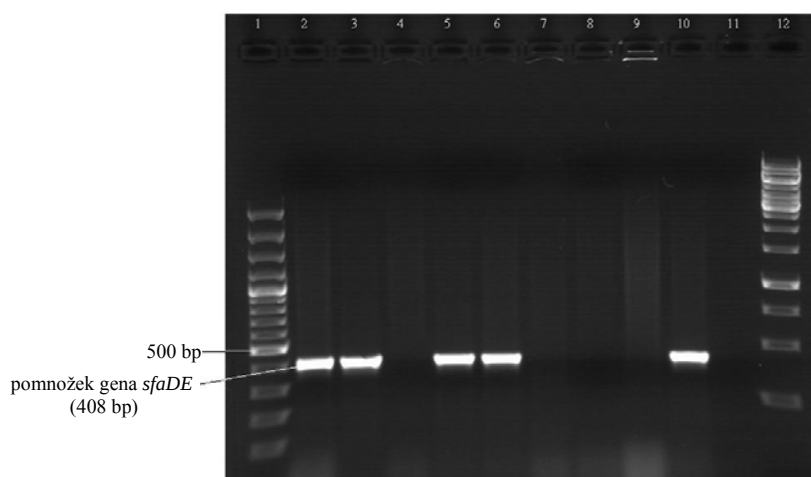
Slika 4: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *papGII* sevov *E. coli* zbirke BJ.

Legenda: 1 - standardna DNA - lestvica »MassRuler™ DNA Ladder Mix«, 2 - *E. coli* TA11 (pozitivna kontrola), 3 - sev BJ54, 4 - sev BJ12, 5 - sev BJ29, 6 - sev BJ34, 7 - sev BJ51, 8 - sev BJ89, 9 - sev BJ60, 10 - sev BJ96, 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA - lestvica 100-bp (Fermantas).



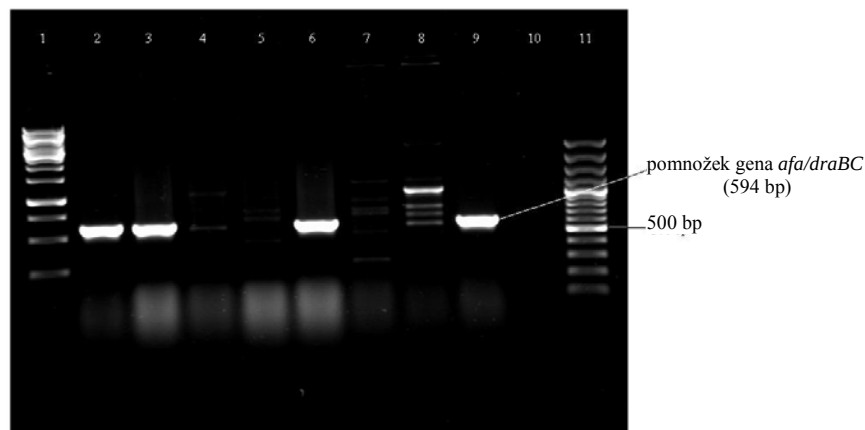
Slika 5: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *papGIII* sevov *E. coli* zbirke BJ.

Legenda: 1 - standardna DNA - lestvica 100-bp (Fermantas), 2 - sev *E. coli* 536 (pozitivna kontrola), 3 - sev BJ28, 4 - sev BJ58, 5 - sev BJ30, 6 - sev BJ78, 7 - sev BJ32, 8 - sev BJ33, 9 - sev BJ62, 10 - sev BJ15, 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA - lestvica »MassRuler™ DNA Ladder Mix«.



Slika 6: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *sfaDE* sevov *E. coli* zbirke BJ.

Legenda: 1 - standardna DNA - lestvica 100-bp (Fermentas), 2 - *E. coli* 536 (pozitivna kontrola), 3 - sev BJ19, 4 - sev BJ21, 5 - sev BJ32, 6 - sev BJ33, 7 - sev BJ16, 8 - sev BJ50, 9 - sev BJ1, 10 - sev BJ7, 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA - lestvica 1-kbp (Fermentas).

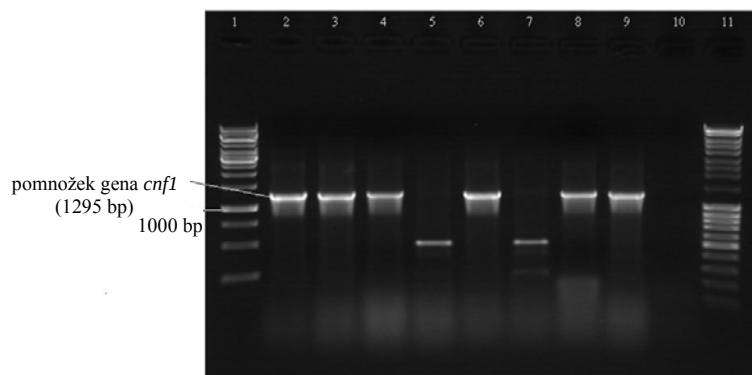


Slika 7: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *afa/draBC* sevov *E. coli* zbirke BJ.

Legenda: 1 - standardna DNA - lestvica 1-kbp (Fermentas), 2 - *E. coli* DL50, 3 - sev BJ37, 4 - sev BJ29, 5 - sev BJ14, 6 - sev BJ59, 7 - sev BJ62, 8 - sev BJ66, 9 - sev BJ54, 10 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 11 - standardna DNA - lestvica 100-bp (Fermentas).

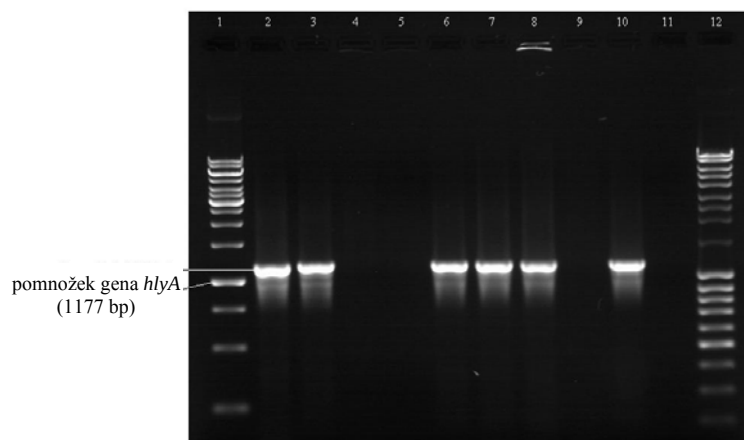
4.2.2 Toksini

Ugotovili smo, da je bil med toksini najbolj pogosti zapis za gen *usp* s kar 22 (24 %) pozitivnih izolatov, sledil mu je zapis za gen *hlyA* v 7 (8 %) sevov in nazadnje zapis *cnf1* v 5 (6 %) od 90 testiranih izolatov.



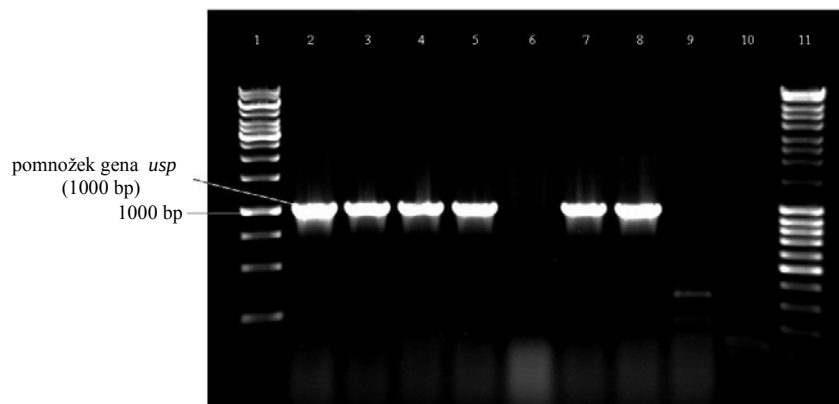
Slika 8: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *cnf1* sevov *E. coli* zbirke BJ.

Legenda: 1 - standardna DNA - lestvica 1-kbp (Fermentas), 2 - sev *E. coli* J96 (pozitivna kontrola), 3 - sev BJ19, 4 - sev BJ27, 5 - sev BJ2, 6 - sev BJ30, 7 - sev BJ37, 8 - sev BJ32, 9 - sev BJ33, 10 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 11 - standardna DNA - lestvica »MassRuler™ DNA Ladder Mix«.



Slika 9: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *hlyA* sevov *E. coli* zbirke BJ.

Legenda: 1 - standardna DNA - lestvica 1-kbp (Fermentas), 2 - sev *E. coli* 536 (pozitivna kontrola), 3 - sev BJ19, 4 - sev BJ52, 5 - sev BJ84, 6 - sev BJ30, 7 - sev BJ57, 8 - sev BJ75, 9 - sev BJ12, 10 - sev BJ27, 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA - lestvica »MassRuler™ DNA Ladder Mix«.

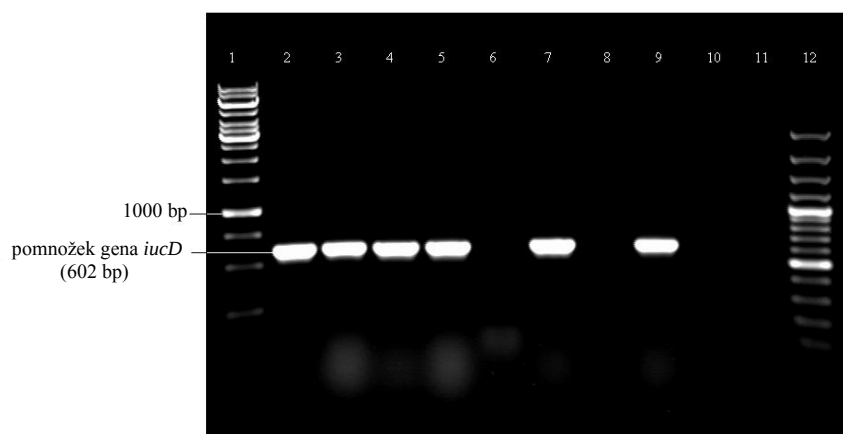


Slika 10: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *usp* sevov *E. coli* zbirke BJ.

Legenda: 1 - standardna DNA - lestvica 1-kbp (Fermentas), 2 - sev *E. coli* TA11 (pozitivna kontrola), 3 - sev BJ27, 4 - sev BJ30, 5 - sev BJ32, 6 - sev BJ4, 7 - sev BJ33, 8 - sev BJ57, 9 - sev BJ16, 10 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 11 - standardna DNA - lestvica »MassRuler™ DNA Ladder Mix«.

4.2.3 Sistem za privzem železa

Naši rezultati so pokazali, da je bilo od vseh 90 testiranih izolatov zdravih ljudi kar 35 (39 %) pozitivnih, torej takih z zapisom za gen *iucD*.

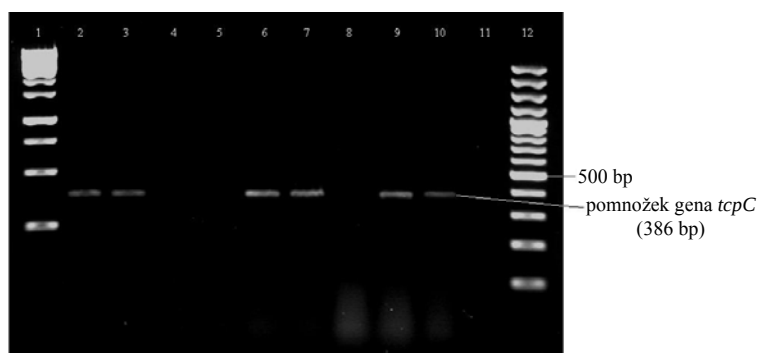


Slika 11: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *iucD* sevov *E. coli* zbirke BJ.

Legenda: 1 - standardna DNA - lestvica 1-kbp (Fermentas), 2 - sev Nissle 1917 (pozitivna kontrola), 3 - sev BJ69, 4 - sev BJ73, 5 - sev BJ83, 6 - sev BJ26, 7 - sev BJ95, 8 - sev BJ50, 9 - sev BJ11, 10 - sev BJ66, 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA - lestvica 100-bp (Fermentas).

4.2.4 Dejavnik za izogibanje imunskemu sistemu

Zapis za gen *tcpC* ni bil razširjen med izolati črevesne mikrobiote zbirke BJ, saj je bilo samo 7 (8 %) takih, ki so imeli zapis *tcpC*.

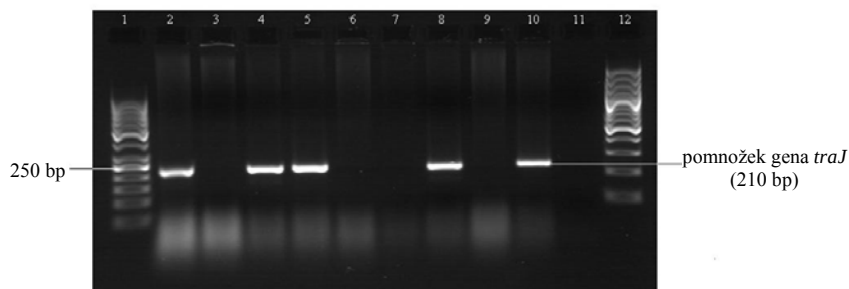


Slika 12: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *tcpC* sevov *E. coli* zbirke BJ.

Legenda: 1 - standardna DNA - lestvica 1-kbp (Fermentas), 2 - sev *E. coli* TA155 (pozitivna kontrola), 3 - sev BJ30, 4 - sev BJ23, 5 - sev BJ42, 6 - sev BJ32, 7 - sev BJ33, 8 - sev BJ64, 9 - sev BJ38, 10 - sev BJ57, 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA - lestvica 100-bp (Fermentas).

4.2.5 Konjugacija - sistem za širjenje virulentnih dejavnikov

Zapis za gen *traJ* je imelo 23 (26 %) sevov zbirke BJ.



Slika 13: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *traJ* sevov *E. coli* zbirke BJ.

Legenda: 1 - standardna DNA - lestvica 50-bp (Fermentas), 2 - sev *E. coli* CSH118 (pozitivna kontrola), 3 - sev BJ5, 4 - sev BJ10, 5 - sev BJ27, 6 - sev BJ21, 7 - sev BJ30, 8 - sev BJ34, 9 - sev BJ19, 10 - sev BJ26, 11 - negativna kontrola (sterilna destilirana voda), 12 - standardna DNA - lestvica 100-bp (Fermentas).

4.3 ŠTEVILO VIRULENTNIH DEJAVNIKOV PO FILOGENETSKIH (POD)SKUPINAH

Preglednica 9: Prevalenca sevov glede na število zapisanih virulentnih dejavnikov po filogenetskih (pod)skupinah.

Št. VD	Prevalenca (N [%])										Vsi sevi BJ n = 90
	A n = 20	A0 n = 7	A1 n = 13	B1 n = 13	B2 n = 30	B2 ₂ n = 1	B2 ₃ n = 29	D n = 27	D1 n = 21	D2 n = 6	
0	11 (55)	3 (43)	8 (62)	12 (92)	4 (13)	1 (100)	3 (10)	9 (33)	9 (43)	0 (0)	36 (40)
1	5 (25)	2 (29)	3 (23)	1 (8)	4 (13)	0 (0)	4 (14)	12 (44)	8 (38)	4 (67)	22 (24)
2	3 (15)	2 (29)	1 (8)	0 (0)	4 (13)	0 (0)	4 (14)	4 (15)	2 (10)	2 (33)	11 (12)
3	1 (5)	0 (0)	1 (8)	0 (0)	5 (17)	0 (0)	5 (17)	2 (7)	2 (10)	0 (0)	8 (9)
4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (30)	0 (0)	9 (31)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (10)
5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (13)	0 (0)	4 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (4)
Povpr. št. VD	0,7	0,9	0,6	0,1	2,7	0	3	1	0,9	1,3	1,4

Opomba: VD - virulentni dejavniki, N - število.

Naša študija je pokazala (preglednica 9), da je imelo kar 54 izolatov (60 %) zapis za vsaj enega izmed preučevanih virulentnih dejavnikov. 22 (24 %) je bilo takih, ki so imeli zapis za samo en virulentni dejavnik. Več kot polovico tistih sevov oz. 13 %, ki je imelo zapis za en sam virulentni dejavnik, ga je imelo za gen *iucD*. Od tistih 24 % je bilo še nekaj takih, ki so imeli zapis *traJ* (8 %), *afa/draBC* (2 %) in *usp* (1 %). Če ne upoštevamo dejavnikov za preživetje oz. prisotnost zapisa *iucD* in *traJ*, so imeli samo trije (3 %) sevi zbirke BJ zapis za en virulentni dejavnik. Če upoštevamo dejstva, da večina sevov z zapisom za 1 virulentni dejavnik je imelo zapis *iucD* ali *traJ*, in da *iucD* in *traJ* veljata za preživetvena faktorja, se prevalenca sevov, ki je imela zapis za vsaj en testiran virulentni dejavnik zmanjša iz 60 % na 39 %. Prevalenca sevov je padala z višanjem števila prisotnih zapisov za pregledane virulentne dejavnike. Opazili smo tudi, da večina izolatov, ki ni imelo zapisa za kateregakoli od testiranih virulentnih dejavnikov, je sodilo v filogenetsko skupino A ali B1, medtem ko je bilo takih sevov v skupini B2 najmanj. Ob izračunu povprečja virulentnih dejavnikov na sev se to še posebej jasno vidi. Sevi v skupini B2 so imeli

največje število virulentnih dejavnikov, v povprečju kar 2,7; skupini B2 je sledila skupina D z v povprečju 1 virulentnim dejavnikom; skupina A z 0,7 virulentnih dejavnikov na sev; medtem ko je imela skupina B1 samo 0,1 virulentnih dejavnikov na sev. Če pogledamo zbrane podatke še podrobneje vidimo, da je filogenetska podskupina B2₃ v povprečju imela zapise za kar 3 virulentne dejavnike.

4.4 PORAZDELITEV VIRULENTNIH DEJAVNIKOV GLEDE NA FILOGENETSKE (POD)SKUPINE

Znanstveniki (Picard in sod., 1999) so s študijo na miškah dokazali, da obstaja povezava med filogenetskimi skupinami in zunajčrevesno virulenco sevov bakterije *E. coli*. Ugotovili so, da je filogenetska skupina B2 najbolj virulentna, sledi ji skupina D. Najmanj zapisov za virulentne dejavnike imata skupini A in B1, in sta torej tudi skupini z najmanjšim virulentnim potencialom.

Čitar M. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2010

Preglednica 10: Porazdelitev virulentnih dejavnikov po filogenetskih (pod)skupinah.

VD	Prevalenca (N [%])sevoj																			
	Filogenetska skupina																			
	A		P	B1		P	B2		P	D	P	Skupaj								
<i>papGII</i>	0	(0)	0,3412	0	(0)	0,5875	4	(13)	0,2160	3	(11)		0,4242	7	(8)					
<i>papGIII</i>	0	(0)	1	0	(0)	1	3	(10)*	0,0346	0	(0)	0,5511	3	(3)						
<i>sfaDE</i>	0	(0)*	0,0196	0	(0)	0,1148	15	(50)***	3,39*10 ⁻⁹	0	(0)**	0,0042	15	(17)						
<i>afa/draBC</i>	1	(5)	1	0	(0)	1	0	(0)	0,2969	3	(11)°	0,0790	4	(4)						
<i>usp</i>	0	(0)*	0,0024	0	(0)*	0,0327	18	(60)***	8,27*10 ⁻⁸	4	(15)	0,1918	22	(24)						
<i>hlyA</i>	0	(0)	0,3412	0	(0)	0,5875	6	(20)*	0,0050	1	(4)	0,6698	7	(8)						
<i>cnf1</i>	0	(0)	0,5827	0	(0)	1	5	(17)**	0,0032	0	(0)	0,3169	5	(6)						
<i>iucD</i>	8	(40)	1	0	(0)**	0,0013	16	(53)°	0,0663	11	(41)	0,8179	35	(39)						
<i>tcpC</i>	0	(0)	0,3412	0	(0)	0,5875	7	(23)***	0,0003	0	(0)°	0,0978	7	(8)						
<i>traJ</i>	5	(25)	1	1	(8)	0,1710	13	(43)*	0,0010	4	(15)	0,1873	23	(26)						
VD	Filogenetska podskupina																			
	A0		P	A1		P	B2 ₂		P	B2 ₃		P	D1	P	D2	P	Skupaj			
<i>papGII</i>	0	(0)	1	0	(0)	0,5875	0	(0)	1	4	(14)	0,2060	3	(14)	0,3472	0		(0)	1	7
<i>papGIII</i>	0	(0)	1	0	(0)	1	0	(0)	1	3	(10)*	0,0311	0	(0)	1	0	(0)	1	3	(3)
<i>sfaDE</i>	0	(0)	0,5957	0	(0)	0,1148	0	(0)	1	15	(52)***	1,69*10 ⁻⁹	0	(0)*	0,0181	0	(0)	0,5842	15	(17)
<i>afa/draBC</i>	0	(0)	1	1	(8)	0,4704	0	(0)	1	0	(0)	0,3008	1	(5)	1	2	(33)*	0,0211	4	(4)
<i>usp</i>	0	(0)	0,1876	0	(0)*	0,0327	0	(0)	1	18	(62)***	3,53*10 ⁻³	3	(14)	0,2603	1	(17)	1	22	(24)
<i>hlyA</i>	0	(0)	1	0	(0)	0,5875	0	(0)	1	6	(21)**	0,0041	0	(0)	0,1933	1	(17)	0,3938	7	(8)
<i>cnf1</i>	0	(0)	1	0	(0)	1	0	(0)	1	5	(17)**	0,0027	0	(0)	0,5869	0	(0)	1	5	(6)
<i>iucD</i>	3	(43)	1	5	(39)	1	0	(0)	1	16	(55)*	0,0380	9	(43)	0,7990	2	(33)	1	35	(39)
<i>tcpC</i>	0	(0)	1	0	(0)	0,5875	0	(0)	1	7	(24)***	0,0002	0	(0)	0,1933	0	(0)	1	7	(8)
<i>traJ</i>	3	(43)	0,3658	2	(15)	0,5024	0	(0)	1	13	(45)*	0,0085	2	(10)°	0,0844	2	(33)	0,6432	23	(26)

Opombe: VD - virulentni dejavniki, N - število. Vrednosti P, ki so statistično značilne oz. takrat ko je $P < 0,05$, so v tabeli označene z zvezdico. Znak * pomeni $P < 0,05$; ** pomeni $P < 0,005$ in *** pomeni $P < 0,0005$. Vrednosti P, ki so na meji, da bi bile statistično značilne oz. takrat, ko je $0,05 < P < 0,10$, so v tabeli označene s kroglcem in z rumenim ozadjem.

Iz preglednice 10 je razvidno, da je imela filogenetska skupina B2 najštevilčnejšo prisotnost zapisov za raziskane virulentne dejavnike, sledila ji je skupina D. V sevih skupine B1 nismo našli zapisov za kateregakoli od pregledanih virulentnih dejavnikov, razen 1 seva, ki je imel zapis *traJ*, kar kaže na prisotnost konjugativnega plazmida. Pri skupini A 8 sevov (40 %) je imelo zapis *iucD*, 1 sev (5 %) pa je imel zapis za adhezine *afa/draBC*. Iz tabele je razvidno, da so imeli sevi, ki so sodili v filogenetsko skupino B2 in D, zapise za skoraj vse virulentne dejavnike. Dobljeni rezultati nakazujejo, da vsi sevi, ki so imeli zapise za virulentne dejavnike in ki so spadali v filogenetsko skupino B2, so spadali tudi v filogenetsko podskupino B2₃, saj tisti sev, katerega smo uvrstili v podskupino B2₂, ni imel zapisa za kateregakoli od preučevanih virulentnih dejavnikov.

4.5 PORAZDELITEV VIRULENTNIH DEJAVNIKOV IN FILOGENETSKIH

(POD)SKUPIN GLEDE NA SPOL

Preglednica 11: Porazdelitev virulentnih dejavnikov in filogenetskih (pod)skupin glede na spol.

	Prevalenca (N [%])		P
	Ženski spol n = 46 (51)	Moški spol n = 44 (49)	
VD			
<i>papGII</i>	3 (7)	4 (9)	0,7107
<i>papGIII</i>	1 (2)	2 (5)	0,6124
<i>sfaDE</i>	7 (15)	8 (18)	0,7817
<i>afa/draBC</i>	1 (2)	3 (7)	0,3554
<i>usp</i>	10 (22)	12 (27)	0,6269
<i>hlyA</i>	3 (7)	4 (9)	0,7107
<i>cnf1</i>	2 (4)	3 (7)	0,6733
<i>iucD</i>	14 (30)	21 (48)	0,1299
<i>tcpC</i>	5 (11)	2 (5)	0,4349
<i>traJ</i>	8 (17)	15 (34) ^o	0,0917
Št. VD			
0	21 (46)	15 (34)	0,2889
1	13 (28)	9 (20)	0,4656
2	4 (9)	7 (16)	0,3483
3	3 (7)	5 (11)	0,4800
4	3 (7)	6 (14)	0,3099
5	0 (0)	0 (0)	1
6	2 (4)	2 (5)	1
Povprečje VD	1,2	1,7	
Filogenetska (pod)skupina			
A	11 (24)	9 (20)	0,8016
A0	5 (11)	2 (5)	0,4349
A1	6 (13)	7 (16)	0,7701
B1	10 (22) ^o	3 (7)	0,0700
B2	13 (28)	17 (39)	0,3724
B22	0 (0)	1 (2)	0,4888
B23	13 (28)	16 (36)	0,5002
D	12 (26)	15 (34)	0,4922
D1	8 (17)	13 (30)	0,2161
D2	4 (9)	2 (5)	0,6771
Občutljivost za antibiotike			
Ap	33 (72)	32 (73)	1
Cip	44 (96)	44 (100)	0,4946
Tc	33 (72)	33 (75)	0,7846

Opomba: VD - virulentni dejavniki, N - število. Vrednosti P, ki so na meji, da bi bile statistično značilne oz.

takrat, ko je $0,05 < P < 0,10$, so v tabeli označene s krogcem in z rumenim ozadjem.

V preglednici 11 lahko opazimo, da so moško črevesno mikrobioto v povprečju sestavljali sevi *E. coli*, ki so kazali večjo prevalenco testiranih virulentnih dejavnikov, saj je v povprečju mikrobiota moškega spola imela 1,7 virulentnih dejavnikov, v primerjavi s 1,2 ženskega spola. Med izolati iz gostiteljev moškega spola je bilo več takih (66 %), ki so kazali prisotnost vsaj enega zapisa testiranih virulentnih dejavnikov, v primerjavi z izolati iz gostiteljev ženskega spola (55 %). Iz preglednice je tudi razvidno, da smo pri moškemu spolu zasledili več takih sevov, ki so spadali v filogenetsko skupino B2 in D. Pomembno je povedati, da naši rezultati ne nakazujejo na noben statistično značilen rezultat.

4.6 PORAZDELITEV VIRULENTNIH DEJAVNIKOV IN FILOGENETSKIH

(POD)SKUPIN GLEDE NA OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE

Analiza podatkov, dobljenih z Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, o občutljivosti sevov zbirke BJ za testirane antibiotike je pokazala, da je bilo 88 (98 %) sevov občutljivih za ciprofloksacin, 65 (72 %) za ampicilin in 66 (73 %) za tetraciklin. V analizo porazdelitve virulentnih dejavnikov in filogenetskih (pod)skupin glede na občutljivosti za antibiotike, smo vključili samo rezultate za ampicilin in tetraciklin.

Preglednica 12: Porazdelitev virulentnih dejavnikov in filogenetskih (pod)skupin glede na občutljivosti za ampicilin in tetraciklin.

	Prevalenca (N [%]) občutljivosti					
	Ampicilin			Tetraciklin		
	Občutljiv n = 65 (72)	Odporen n = 24 (27)	P	Občutljiv n = 66 (73)	Odporen n = 16 (18)	P
VD						
<i>papGII</i>	7 (11)	0 (0)	0,1826	7 (11)	0 (0)	0,3355
<i>papGIII</i>	3 (5)	0 (0)	0,5604	3 (5)	0 (0)	1
<i>sfaDE</i>	14 (22) ^o	1 (4)	0,0579	13 (20) ^o	0 (0)	0,0624
<i>afa/draBC</i>	2 (3)	2 (8)	0,2934	3 (5)	1 (6)	1
<i>usp</i>	19 (29)	3 (13)	0,1652	20 (30) ^o	1 (6)	0,0583
<i>hlyA</i>	6 (9)	1 (4)	0,6691	6 (9)	0 (0)	0,5916
<i>cnf1</i>	4 (6)	1 (4)	1	5 (8)	0 (0)	0,5774
<i>iucD</i>	20 (31)	15 (63)*	0,0134	27 (41)	7 (44)	1
<i>tpcC</i>	6 (9)	1 (4)	0,6691	5 (8)	0 (0)	0,5774
<i>traJ</i>	13 (20)	10 (42) ^o	0,0555	18 (27)	4 (25)	1
Povprečje VD	1,5	1,4		1,6	0,8	
Filog. (pod)sk.						
A	13 (20)	7 (29)	0,3970	13 (20)	6 (38)	0,1844
A0	3 (5)	4 (17) ^o	0,0815	2 (3)	5 (31)*	0,0026
A1	10 (15)	3 (13)	1	11 (17)	1 (6)	0,4442
B1	12 (19)*	0 (0)	0,0314	12 (18)	0 (0)	0,1106
B2	24 (37)	6 (25)	0,3250	25 (38) ^o	2 (13)	0,0749
B2 ₂	1 (2)	0 (0)	1	1 (2)	0 (0)	1
B2 ₃	23 (35)	6 (25)	0,4485	24 (36) ^o	2 (13)	0,0786
D	16 (25)	11 (46) ^o	0,0701	16 (24)	8 (50) ^o	0,0644
D1	14 (22)	7 (29)	0,5743	13 (20)	6 (38)	0,1844
D2	2 (3)	4 (17)*	0,0430	3 (5)	2 (13)	0,2498

Opombe: VD - virulentni dejavniki, N - število. Statistično značilne vrednosti P, so v tabeli označene z zvezdico. Znak * pomeni $P < 0,05$; ** pomeni $P < 0,005$ in *** pomeni $P < 0,0005$. Rezultati označeni z rdečim ozadjem so statistično značilni, medtem ko vrednosti P, ki so na meji, da bi bile statistično značilne oz. takrat, ko je $0,05 < P < 0,10$, so v tabeli označene s krogcem in z rumenim ozadjem.

Iz zgornje preglednice je razvidno, da ni bilo statističnih značilnih razlik med sevi, ki so bili občutljivi za ampicilin in tetraciklin, v primerjavi s tistimi sevi, ki so bili odporni, razen za *iucD* v povezavi z ampicilinom. Vidno je tudi, da v večini primerov občutljivi sevi za ampicilin in tetraciklin so kazali prisotnost večjega števila zapisov za pregledane virulentne dejavnike. Povprečje zapisov za virulentne dejavnike se ni razlikovalo dosti med sevi, občutljivimi za ampicilin v primerjavi s tistimi, ki so bili odporni. Večjo razliko smo opazili pri sevih, ki so imeli zapis za odpornosti proti tetraciklinu, saj so kazali v povprečju

polovico manj zapisov za virulentne dejavnike (0,8), v primerjavi z občutljivimi sevi (1,6). Rezultati, zbrani v zgornji tabeli, kažejo tudi statistično značilno povezavo med odpornostjo proti ampicilinu in podskupino D2 in odpornostjo proti tetraciklinu in podskupino A0. Pomembno je označiti tudi, da noben sev skupine B1 ni bil odporen proti omenjenim antibiotikom in da je obstajala statistična povezava med sevi skupine B1 in občutljivostjo za ampicilin. Čeprav nismo zasledili številne statistično značilne rezultate lahko omenim, da sevi, ki so bili odporni proti ampicilinu ali tetraciklinu so kazali tudi zmanjšan odstotek prisotnih zapisov za virulentne dejavnike v primerjavi z občutljivimi sevi. Računali smo tudi statistično značilno korelacijo med prisotnostjo zapisa odpornosti proti antibiotikom in filogenetske skupine za seve zbirke BJ. Povezave med filogenetsko podskupino D2 in prisotnostjo zapisa za ampicilin in med filogenetsko podskupino A0 in zapisom za odpornosti proti tetraciklinu so bile statistično značilne.

Pomembno je tudi, da je bilo 12 od 16 sevov odpornih proti tetraciklinu hkrati odpornih tudi proti ampicilinu.

Treba je še poudariti, da je 53 sevov od 90 testiranih (59 %) bilo občutljivih za vse tri testirane antibiotike, medtem ko sta imela samo dva seva (BJ21 in BJ53) zapise za odpornost proti vsem trem testiranim antibiotikom.

5 RAZPRAVA

Želeli smo oceniti virulentni potencial sevov *E. coli* naravne črevesne mikrobiote zdravih ljudi. S tem namenom smo najprej z metodo PCR ugotavljali razporejenost izoliranih sevov zbirke BJ v 4 filogenetske skupine in ustrezne podskupine in nato prav tako s PCR določevali prisotnost zapisov virulentnih dejavnikov: *cnf1*, *hlyA*, *papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *iucD*, *usp*, *tcpC*, *traJ*. Dodatno smo s programom Fisher's exact test preverili statistično značilne povezave filogenetskih (pod)skupin in virulentnih dejavnikov povezanih s spolom in občutljivostjo za antibiotike (Langsrud, 2004).

Glede na to, da so v številnih študijah ugotovili, da sevi *E. coli*, ki veljajo za patogene oz. potencialno patogene spadajo v filogenetsko skupino B2 ali D, smo pričakovali uvrstitev večine pregledanih sevov iz blata zdravih ljudi v filogenetsko skupino A ali B1, katere štejejo za komenzale. Iz zbranih rezultatov (preglednica 7) vidimo, da temu ni tako, saj smo največ sevov zbirke BJ uvrstili v skupino B2, kateri sledi skupina D, skupina A in nazadnje skupina B1.

Iz dobljenih rezultatov zbranih v preglednici 8 vidimo, da so bili med zapisi za virulentne dejavnike najštevilčnejši zapisi *iucD*, *traJ* in *usp*, in da je bila prevalenca sevov, ki so imeli tovrstne zapise, mnogo višja v primerjavi s prevalenco zapisov drugih virulentnih dejavnikov. Še posebej izstopa zapis *iucD*, ki smo ga našli v kar 39 % sevov. Velik odstotek sevov z *iucD* med sevi zdravih ljudi bi lahko razložili z dejstvom, da sistemi za privzem železa ne predstavljajo prave virulentne dejavnike, ampak bolj »fitness« dejavnike, torej dejavnike, ki bakterijam omogočajo lažje preživetje v gostitelju in niso nujno povezani z virulentnostjo seva. Pomembno je tudi omeniti dejstvo, da med sevi zdravih ljudi smo zasledili tudi veliko število zapisov *traJ* (26 %), kar nakazuje na številčnost konjugativnih plazmidov, ki omogočajo konjugacijo in s tem širjenje drugih virulentnih dejavnikov in odpornosti proti antibiotikom med sevi zdravih ljudi. Enako kot za gen *iucD* velja za prisotnost zapisa *traJ*, saj tudi prisotnost konjugativnega plazmida ne velja za pravi virulentni dejavnik. Glede na domnevno funkcijo toksina Usp je zaskrbljujoče dejstvo velikega števila prisotnih zapisov pri sevih zbirke BJ (24 %).

Prevalenca testiranih virulentnih dejavnikov je bila najvišja pri skupini B2 in D. Tudi dejstvo (preglednica 9), da povprečno število virulentnih dejavnikov, ki je bil pri skupini B2 enako 2,7 in pri skupini D enako 1, potrjuje ti dve skupini za virulentni. Če upoštevamo visoko povprečno število virulentnih dejavnikov sevov BJ v skupini B2 in D, lahko trdimo, da imajo izolirani sevi iz zdravih ljudi nezanemarljiv in kar visok virulentni potencial. Iz dobljenih podatkov v preglednici 9 vidimo, da je zelo visok delež (60 %) sevov zbirke BJ imel zapis za vsaj en virulentni dejavnik. Tudi ob upoštevanju aerobaktina in konjugativnega plazmida kot »fitness« dejavnika delež sevov, ki je imelo zapis za vsaj en drugačen virulentni dejavnik, je ostalo še vedno visoko (34 %) in še dodatno potrdilo virulentni potencial domnevanih komenzalov. Če povzamemo, dobljeni rezultati potrjujejo visoko prevalenco prilagojenih sevov *E. coli* med črevesno mikrobioto zdravih ljudi, ki lahko povzročijo gostitelju zunajčrevesne okužbe.

Računali smo tudi statistično značilne povezave s programom Fisher's exact test (Langsrud, 2004) in ugotovili (preglednica 10), da je obstajala statistična korelacija med nekaterimi filogenetskimi skupinami in virulentnimi dejavniki. Statistično značilno korelacijo smo zasledili med prisotnostjo zapisov *papGIII*, *sfaDE*, *usp*, *hlyA*, *cnf1*, *tcpC*, *traJ* in filogenetsko skupino B2. Zasledili smo tudi značilno povezavo med zapisi *papGIII*, *sfaDE*, *usp*, *hlyA*, *cnf1*, *iucD*, *tcpC*, *traJ* in podskupino B2₃ ter tudi med prisotnostjo zapisa z *afa/draBC* in filogenetsko podskupino D2.

Glede na to, da smo v pregledani literaturi zasledili, da obstaja razlika v mikrobioti črevesja ženskega in moškega spola, smo preverili, ali je tudi naša študija zaznala tovrstno razliknost. V preglednici 11 je razvidno, da v naši gostiteljski populaciji ni bilo statistično značilnih razlik med sevi izoliranimi iz moških in žensk, o katerih so poročali Gordon in sod., (2005).

Preglednica 13: Občutljivosti za testirane antibiotike glede na posamezne filogenetske skupine sevov BJ in glede na vse testirane seve BJ.

Filogenetska (pod)skupina	Prevalenca (N [%]) občutljivosti sevov zbirke BJ					
	Ampicilin	P	Ciprofloksacin	P	Tetraciklin	P
A	13 (65)	0,3970	19 (95)	0,3970	13 (65)	0,1844
A0	3 (43) ^o	0,0815	6 (86)	0,1503	2 (29)**	0,0026
A1	10 (77)	1	13 (100)	1	11 (85)	0,4442
B1	12 (92)*	0,0314	13 (100)	1	12 (92)	0,1106
B2	24 (80)	0,3250	30 (100)	0,5506	25 (83) ^o	0,0749
B2 ₂	1 (100)	1	1 (100)	1	1 (100)	1
B2 ₃	23 (79)	0,4485	29 (100)	1	24 (83) ^o	0,0786
D	16 (59) ^o	0,0701	26 (96)	0,5124	16 (59)	0,0644
D1	14 (67)	0,5743	20 (95)	0,4142	13 (62)	0,1844
D2	2 (33)*	0,0430	6 (100)	1	3 (50)	0,2498
Skupaj	65 (72)		88 (98)		66 (73)	

Opombe: VD - virulentni dejavniki, N – število. Statistično značilne vrednosti P, so v tabeli označene z zvezdico. Znak * pomeni $P < 0,05$; ** pomeni $P < 0,005$ in *** pomeni $P < 0,0005$. Vrednosti P, ki so na meji, da bi bile statistično značilne oz. takrat, ko je $0,05 < P < 0,10$, so v tabeli označene s krogcem in z rumenim ozadjem.

Sevi zbirke BJ (preglednica 12 in 13) so bili najbolj občutljivi za ciprofloksacin (98 %), sledila je občutljivost za tetraciklin in ampicilin (73 % oz. 72 %). Pričakovali smo, da bo najvišja občutljivost za ciprofloksacin, saj je ta antibiotik sintetičnega izvora, ki ga tudi redkeje uporabljamo. Najbolj občutljiva med vsemi filogenetskimi skupinami je bila skupina B1. Razberemo lahko tudi, da so bili sevi filogenetskih skupin B1 in B2 najbolj občutljivi za vse tri antibiotike.

Da bi lažje ugotavljali virulentni potencial domnevanih komenzalnih sevov zbirke BJ, smo se odločili primerjati dobljene rezultate z rezultati predhodnih raziskav izolatov *E. coli* dveh patogenih zbirk (zbirka UTI in SSTI) skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani (preglednici 14 in 15).

Preglednica 14: Primerjava prevalenc filogenetskih (pod)skupin in virulentnih dejavnikov sevov *E. coli* zbirk BJ, UTI in SSTI.

	Prevalenca (N [%])			
	Zbirka BJ (90)	Zbirka UTI (110)	Zbirka SSTI (102)	UTI + SSTI (212)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
VD				
<i>papGII</i>	7 (8)	37 (34)	10 (10)	47 (22)
<i>papGIII</i>	3 (3)	14 (13)	15 (15)	29 (14)
<i>sfaDE</i>	15 (17)	26 (23)	37 (36)	63 (30)
<i>afa/draBC</i>	4 (4)	2 (2)	1 (1)	3 (1)
<i>hlyA</i>	7 (8)	28 (26)	31 (30)	59 (28)
<i>cnf1</i>	5 (6)	25 (23)	33 (32)	58 (27)
<i>usp</i>	22 (24)	48 (44)	45 (44)	93 (44)
<i>iucD</i>	35 (39)	46 (42)	48 (47)	94 (44)
<i>tcpC</i>	7 (8)	23 (21)	26 (25)	49 (23)
<i>traJ</i>	23 (26)	40 (36)	25 (25)	65 (31)
Povprečje VD	1,4	2,6	2,7	2,6
Filog. (pod)sk.				
A	20 (22)	28 (25)	12 (12)	40 (19)
A0	7 (8)	4 (4)	1 (1)	5 (2)
A1	13 (14)	24 (22)	11 (11)	35 (17)
B1	13 (14)	6 (5)	9 (9)	15 (7)
B2	30 (33)	55 (50)	65 (64)	120 (57)
B2 ₂	1 (1)	6 (5)	7 (7)	13 (6)
B2 ₃	29 (32)	49 (45)	58 (57)	107 (50)
D	27 (30)	21 (19)	16 (16)	37 (17)
D1	21 (23)	16 (15)	10 (10)	26 (12)
D2	6 (7)	5 (5)	6 (6)	11 (5)

Opomba: VD - virulentni dejavniki, N - število.

Če se osredotočimo na razporeditev sevov v filogenetske skupine (preglednica 14), se zdi smiselno primerjati skupno število potencialno patogenih (seštevek skupin B2 in D) in dejansko komenzalnih (seštevek skupin A in B1) sevov zbirke BJ s patogenimi sevi zbirke UTI in SSTI. V primerjavi z rezultati zbirk UTI in SSTI, kateri so kazali, da je bilo 156 (74 %) sevov skupine B2 ali D in 56 (26 %) sevov skupine A in B1, smo v naši študiji zasledili, da je 57 (63 %) sevov spadalo v skupino B2 ali D in 33 (37 %) je spadalo v skupino A ali B1. Iz primerjave je razvidno, da je bil odstotek sevov skupine B2 in D pri izolatih ExPEC samo za 10 % višji kot v primeru izoliranih sevov iz zdravih ljudi (Starčič Erjavec in sod., 2010). Ta rezultat še enkrat nakazuje in potrjuje visoko stopnjo virulence sevov, izoliranih iz črevesja zdravih ljudi. Preglednica 14 kaže še nekaj zanimivih podatkov. Zbirka UTI je vsebovala večje število sevov skupine A v primerjavi z izolatih iz

zdravih ljudi. Število sevov, ki je spadalo v skupino D, je pri izolatih zdravih ljudi bilo za kar 13 % višje v primerjavi s številom takih sevov pri patogenih zbirkah. Rezultati drugih študij, kot npr. študija Zhang in sod. (2002) so pokazali, da je 69 % izolatov zbirke UTI spadalo v skupino B2 ter rezultati študij Bingen in sod. (1998) in Picard in sod. (1999) so pokazali, da seve, ki so sposobni povzročati meningitis in druge mešane zunajčrevesne okužbe lahko mirno uvrščamo v skupino B2. Če pregledamo strukturo naše preučevane bakterijske populacije ugotovimo, da sledi trendom sevov ExPEC, izoliranih pri bolnikih z različnimi zunajčrevesnimi okužbami.

Zaradi relativno svežega odkritja in zanimivega mehanizma bakterij za izmik takojšnjemu odgovoru gostiteljske prirojene imunosti, smo primerjali naše rezultate z nedavno študijo, ki so jo izvršili Starčič Erjavec in sod. (2010). Gre za primerjavo izolatov zdravih ljudi zbirke BJ s patogenimi sevi zbirke UTI in sevi zbirke SSTI. Če pogledamo v preglednici 14 razporejenost zapisa za gen *tcpC* med različnimi filogenetskimi skupinami opazimo, da samo sevi skupine B2 (23 %) so imeli zapis *tcpC* oz. 8 % sevov celotne zbirke BJ. Tudi pri patogenih sevih zbirke UTI in SSTI so zapis *tcpC* zasledili le pri sevih, ki so spadali v filogenetsko skupino B2. Z izračunom statistično značilnih korelacij med prisotnostjo zapisov virulentnih dejavnikov in filogenetskih skupin, smo dokazali močno korelacijo med zapisom *tcpC* in filogenetsko skupino B2 in podskupino B2₃. Ekvivalentno našemu rezultatu so spoznali tudi Starčič Erjavec in sod. (2010), saj tudi oni pišejo o močni povezavi med prisotnostjo zapisa *tcpC* in filogenetsko skupino B2. Enako kot Starčič Erjavec in sod. (2010) smo tudi mi zaznali, da ni bilo nobene povezave med prisotnostjo zapisa *tcpC* in odpornostjo proti antibiotikom.

Preglednica 15: Občutljivosti za testirane antibiotike sevov BJ, sevov zbirke UTI in zbirke SSTI glede na posamezne filogenetske skupine in glede na skupno število posameznih zbirk.

Antibiotik	Filogenetska skupina	Prevalenca (N [%]) občutljivosti			
		Skupni patogeni UTI + SSTI (n = 212)	Izolati UTI (n = 110)	Izolati SSTI (n = 102)	Zbirka BJ (n = 90)
Ampicilin	A	18 (45)	12 (43)	6 (50)	13 (14)
	B1	9 (56)	5 (83)	4 (40)	12 (13)
	B2	72 (60)	32 (58)	40 (61)	24 (27)
	D	13 (37)	8 (38)	5 (36)	16 (18)
	Skupaj	112 (53)	57 (52)	55 (54)	65 (72)
Tetraciklin	A	13 (33)	6 (21)	7 (58)	13 (14)
	B1	11 (69)	4 (67)	7 (70)	12 (13)
	B2	85 (71)	33 (60)	52 (80)	25 (28)
	D	13 (37)	4 (19)	9 (64)	16 (18)
	Skupaj	122 (58)	47 (43)	75 (74)	66 (73)
Ciprofloksacin	A	32 (80)	23 (82)	9 (75)	19 (21)
	B1	12 (75)	5 (83)	7 (70)	13 (14)
	B2	104 (86)	52 (95)	52 (79)	30 (33)
	D	31 (89)	19 (91)	12 (86)	26 (29)
	Skupaj	179 (84)	99 (90)	80 (78)	88 (98)

Opomba: N - število. Rezultate za izolate zbirke UTI in SSTI smo dobili od skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Iz preglednice 15 opazimo, da so patogeni sevi, tako kot izolati zbirke BJ, bili najbolj občutljivi za ciprofloksacin. Iz tabele je razvidno, da so patogeni sevi (UTI + SSTI), v primerjavi s sevi zbirke BJ, bili manj občutljivi za vse tri testirane antibiotike.

Izvedenih je bilo že nekoliko različnih študij o značilno zmanjšani prevalenci virulentnih dejavnikov pri sevih, ki so kazali še odpornost proti antibiotikom. Lahko omenimo študijo Starčič Erjavec in sod. (2007), izvedeno s sevi UPEC, ki poročajo o zmanjšani količini zapisov virulentnih dejavnikov pri sevih, odpornih proti tetraciklinu. V primerjavi z navedeno študijo nismo zaznali nobene statistično značilne povezave med izolati iz naravne človeške mikrobiote in odpornostjo proti antibiotikom.

Glede na to, da so naši rezultati drugačni od pričakovanih, smo jih primerjali tudi z drugimi podobnimi študijami oz. tistimi, ki so analizirali izolate črevesne mikrobiote zdravih ljudi. Zaradi razlik o postavitvi omenjenih študij na komezalnih sevih oz. sevih, ki so del črevesne mikrobiote zdravih ljudi, moremo zelo kritično primerjati rezultate. Za boljšo preglednost nad rezultati drugih študij, smo njihove podatke zbrali v preglednici 16 in 17.

Čitar M. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2010

Preglednica 16: Prevalenca filogenetskih skupin in virulentnih dejavnikov izolatov naše raziskave, v primerjavi z izolati prejšnjih raziskav, izvedenih na črevesni mikrobioti zdravih ljudi.

Prevalenca (N [%]) izolatov													
Filogenetska skupina	Sevi zbirke BJ iz naše študije (n = 90)		Izolati iz prejšnjih raziskav										
			Izolati brisa rektuma ¹ (n = 71)	Izolati brisa rektuma ² (n = 88)	Izolati brisa rektuma ³ (n = 40)	Izolati iz vzorca blata ⁴ (n = 266)	Izolati iz vzorca blata ⁵			Izolati iz vzorca blata ⁶ (n = 168)			
							Zmerno topli pas (n = 176)	Tropski pas (n = 167)		Mali (n = 55)	Hrvaška (n = 57)	Francija (n = 56)	Skupaj (n = 168)
A	20	(22)	11 (15)	18 (20)	10 (25)	52 (20)	46 (26)	95 (57)		13 (24)	20 (35)	34 (61)	67 (40)
B1	13	(14)	13 (18)	11 (13)	6 (15)	33 (12)	14 (8)	32 (19)		32 (58)	18 (32)	7 (13)	57 (34)
B2	30	(33)	38 (54)	42 (48)	9 (23)	120 (45)	76 (43)	25 (15)		1 (2)	11 (19)	6 (11)	18 (11)
D	27	(30)	9 (13)	17 (19)	15 (38)	61 (23)	40 (23)	15 (9)		9 (16)	8 (14)	9 (16)	26 (15)
B2 ali D	57	(63)	47 (66)	59 (67)	24 (60)	181 (68)	116 (66)	40 (24)		10 (18)	19 (33)	15 (27)	44 (26)
VD													
<i>papGII</i>	7	(8)	13 (18)		9 (23)						19 (11) ^a		
<i>papGIII</i>	3	(3)	6 (8)		1 (3)								
<i>sfaDE</i>	15	(17)	11 (15) ^b	11 (13) ^c	7 (18) ^b	51 (19) ^b					6 (4) ^c		
<i>afa/draBC</i>	4	(4)	4 (6) ^d	2 (2) ^e	0 (0)	14 (5)					2 (1) ^f		
<i>hlyA</i>	7	(8)	10 (14) ^g	10 (11) ^h	4 (10)	51 (19) ^g					7 (4) ^h		
<i>cnf1</i>	5	(6)	9 (13)	6 (7)	4 (10)	43 (16)					6 (4)		
<i>usp</i>	22	(24)											
<i>iucD</i>	35	(39)		35 (40) ⁱ							27 (16) ⁱ		
<i>tcpC</i>	7	(8)											
<i>traJ</i>	23	(26)	31 (44) ^j		27 (68) ^j	137 (52) ^j							

¹ Podatki iz vira Sannes in sod., 2004; ² Podatki iz vira Zhang in sod., 2002; ³ Podatki iz vira Moreno in sod., 2009; ⁴ Podatki iz vira Gordon in sod., 2005 (pri izračunih so upoštevali izolate zdravih in bolnih gostiteljev hkrati); ⁵ Podatki iz vira Escobar-Páramo in sod., 2004; ⁶ Podatki iz vira Duriez in sod., 2001.

Opombe: VD - virulentni dejavniki, N - število. Različne študije so pregledale prisotnost različnih genov istega virulentnega dejavnika. Razlike smo označili in navedli ustrezne pregledane gene: ^a *pap*, ^b *sfa/focDE*, ^c *sfa/foc*, ^d *sfa*, ^e *afa/dra*, ^f *drb*, ^g *afa*, ^h *hlyD*, ⁱ *hly*, ^j *aer*, ^j *traT*

Kot smo že prej omenili, rezultati o razvrstitvi v filogenetske skupine niso sledili pričakovanju, saj smo večino izolatov zbirke BJ uvrstili v skupini B2 in D. Nekatere študije, kot npr. Sannes in sod. (2004) in Zhang in sod. (2002), podpirajo naše rezultate, druge študije pa, kot npr. Moreno in sod. (2009) in Duriez in sod. (2001), našim rezultatom nasprotujejo, saj so te zaznale zelo nizko prisotnost skupine B2 med izolati iz zdravih ljudi. Različni dejavniki lahko vplivajo na razporeditev sevov v filogenetske skupine do take mere, da se kažejo konkretne razlike v omenjenih raziskavah. Med takimi dejavniki lahko omenimo razlike v geografskem poreklu gostiteljske skupine, razlike v karakteristikah gostiteljske populacije ali razlike v odvzemu vzorcev (eni so brisi rektuma, drugi pa vzorci blata) oz. kombinacija vsega naštetega (Zhang in sod. 2002). Dokaz tega lahko zasledimo tudi v članku Escobar-Páramo in sod. (2004), kjer so primerjali strukturo komenzalnih sevov iz sedmih skupin zdravih ljudi porazdeljenih širom sveta. Študija nakaže pomembnost vloge geografskega porekla vzorcev na strukturo komenzalne populacije *E. coli*, saj se je struktura komenzalov skupine ljudi zmerno toplega pasu bistveno razlikovala od tiste pri ljudeh, naseljenih v tropskem pasu. V zmernem pasu so izolirali največ sevov skupine B2 in skupine D, medtem ko sta bila v tropskem pasu bolj pogosti skupini A in B1. Naši rezultati sledijo trendu prej omenjene študije, saj Slovenija geografsko spada v zmerno tople pas in smo večino izoliranih sevov uvrstili v filogenetsko skupino B2. Poleg že omenjenih dejavnikov, ki vplivajo na porazdelitev izolatov v filogenetske skupine ima lahko pomemben vpliv tudi socialno - ekonomski status gostitelja (kot npr. prehranske navade in osnovni higienski nivo). Druga raziskava, Gordon in sod. (2005) je zasledila pri razvrščanju v filogenetske skupine tudi vpliv spola in starosti gostitelja. Naši rezultati se ne skladajo z rezultati omenjenega članka, saj nismo zasledili statistično značilnih rezultatov, ki bi to hipotezo podpirali.

Če primerjamo prevalenco zapisov virulentnih dejavnikov, pregledanih v naši raziskavi, s prevalencami pri drugih študijah, navedenih v preglednici 16 ugotovimo, da ni večjih odstopanj med študijami. Lahko omenim tudi, da so enako kot mi Duriez in sod. (2001) zasledili, da je imela skupina B2 najvišjo prevalenco za testirane virulentne dejavnike. Skupini B2 po številu zapisov za virulentne dejavnike je sledila skupina D, skupina A in na zadnje skupina B1 z najnižjim številom zapisov za virulentne dejavnike. Enako kot naša in študija Duriez in sod. (2001) kaže raziskava Zhang in sod. (2002), saj so tudi oni zasledili,

da je imela največje število virulentnih dejavnikov filogenetska skupina B2. Da bi lahko bolje primerjali naše rezultate s študijo Zhang in sod. (2002), smo upoštevali skupini B2 in D kot eno samo in skupini A in B1 kot drugo ločeno skupino in s pomočjo programa Fisher's exact test (Langsrud, 2004) izračunali statistično značilno korelacijo med navedenimi skupinami in virulentnimi dejavniki. Zhang in sod. (2002) so zaznali statistično značilno povezavo med prvo skupino (torej B2 in D) in zapisi *sfa*, *aer*, *hlyA*, *drb* in *cnf1*, medtem ko smo v naši študiji zasledili povezavo s zapisi *sfaDE*, *iucD* in *hlyA*. Zasledili so tudi močno povezavo med prisotnostjo zapisa za S-fimbrije in za toksin CNF1 s filogenetsko skupino B2. V naši raziskavi smo zasledili statistično značilno povezavo skupine B2 z zapisom *cnf1* in močno korelacijo med skupino B2 in zapisom *sfaDE*. Med pregledanimi virulentnimi dejavniki smo zasledili tudi korelacijo med skupino B2 in D (skupaj) in genom *papGII* in *tcpC* ter še zelo močno korelacijo med omenjeno skupino in genom *usp* med sevi zbirke BJ. Na žalost slednjih rezultatov ne moremo primerjati s prej omenjeno študijo, saj Zhang in sod. seve niso pregledali za te dejavnike.

Duriez in sod. (2001) so zaznali, da je 26 % testiranih sevov imelo zapis za vsaj en virulentni dejavnik, medtem ko smo v naši študiji zasledili večjo prevalenco takih sevov, ki so imeli zapis za vsaj 1 virulentni dejavnik (60 %). Primerjavo omenjenih rezultatov moramo vsekakor jemati z rezervo, saj se nastavitve vseh omenjenih poskusov močno med seboj razlikujejo, npr. Duriez in sod. (2001) so v primerjavi z našo študijo sledili prisotnosti nekaj drugačnih virulentnih dejavnikov.

Sannes in sod. (2004) so izračunali tudi povprečje virulentnih dejavnikov na posamezne filogenetske skupine, in tudi oni navajajo, da so največ virulentnih dejavnikov kazali sevi skupine B2, sledili so jim sevi skupine D, skupine A in na zadnje sevi skupine B1, ki so imeli najmanjše število dejavnikov na sev. Naši rezultati se skladajo z rezultati omenjene raziskave.

Preglednica 17: Prevalenca občutljivosti za antibiotike izolatov *E. coli* zbirke BJ v primerjavi z izolati prejšnjih raziskav s črevesno mikrobioto zdravih ljudi.

Prevalenca (N [%]) izolatov								
	Sevi zbirke BJ iz naše študije (n = 90)	Izolati iz prejšnjih raziskav						
		Izolati iz vzorca blata ¹ (n = 184)		Izolati iz vzorca blata ² (n = 141)		Izolati iz vzorca blata ³ (n = 106)		Izolati iz vzorca blata ⁴ (n = 321)
Občutljivost						Camiri (n = 296)		Javillo (n = 25)
Amp	65 (72)	127 (69)	98 (70)	46 (43)		9 (3)		3 (12)
Cip	88 (98)	184 (100)	140 (99)			0 (0)		0 (0)
Tc	66 (73)		108 (77)	34 (32)		24 (8)		5 (20)

¹ Tvede in sod., 2001; ² Kronvall in sod., 2005; ³ Newman in Seidu, 2002; ⁴ Bartoloni in sod., 1998.

Opombe: N - število.

Zaradi visoke obolevnosti in razvijanja odpornosti proti širokospektralnim antibiotikom v razširjeni rabi, sevi ExPEC predstavljajo za javno zdravstvo veliko breme (Russo in Johnson, 2003; Davison in sod., 2000). Zaenkrat so večinoma tekle raziskave in različne nadzorne aktivnosti nad mehanizmi odpornosti, katere kažejo patogeni sevi, medtem ko je bilo bolj malo tovrstnih raziskav na komenzalnih sevih (Davison in sod., 2000). Če primerjamo rezultate za občutljivost za testirane antibiotike, dobljene v naši študiji, z drugimi podobnimi študijami (zbrani v preglednici 17) opazimo, da se tudi prevalenca občutljivosti za antibiotike zelo razlikuje med sevi zdravih ljudi iz študije do študije. Skupno točko lahko opazimo s študijo Tvede in sod. (2001) in Kronvall in sod. (2005), saj tudi njihovi rezultati poročajo, da je bila najvišja občutljivost med sevi zdravih ljudi za ciprofloksacin, medtem ko občutljivost za ampicilin in tetraciklin je bila v vseh treh študijah približno okoli 70 %. Lahko omenimo še študijo Newman in Seidu (2002) ter Bartoloni in sod. (1998), ki so zaznali zelo zaskrbljujoč nizek nivo občutljivosti za ampicilin in tetraciklin. Zaradi majhnega števila izvedenih raziskav na komenzalnih sevih, ob prisotnosti in odsotnosti antibiotične selekcije, trenutno žal nimamo na razpolago dovolj podatkov, da bi lahko z mero gotovosti komentirali in opredelili naše rezultate (Davison in sod., 2000).

Zaradi relativno hitrega širjenja odpornosti proti antibiotikom v zadnjem času potekajo različne raziskave, ki iščejo alternative uporabi antibiotikov kot npr. razvoj preventivnega cepljenja, s katerim bi selektivno uperili gostiteljevo telo proti bakteriji oz. proti specifičnim virulentnim dejavnikom, ne da bi škodovali naravni črevesni mikrobioti. Zasledili smo, da je trenutno v raziskavi cepivo z omenjenimi lastnostmi proti sevom ExPEC. Znanstveniki so s pomočjo pregleda bakterijskega genoma identificirali osem kandidatnih virulentnih struktur za razvoj cepiva oz. take strukture, ki jih bakterija tvori med okužbo gostitelja in kateri zapisi načeloma naj ne bi bili prisotni pri sevih naravne črevesne mikrobiote. Cepivo so že testirali na miškah in kaže dober odziv (Wieser in Schubert, 2010). Nekateri članki (Johnson, 1991) navajajo, da so sevi ExPEC sposobni konstantne kolonizacije črevesja gostitelja in lahko predstavljajo prevladujoč sev črevesnih bakterij pri približno 20 % zdravih ljudi. Naša študija je pokazala, da je 63 % testiranih sevov spadalo v potencialno patogeno filogenetsko skupino (skupina B2 ali D) oz. tako, ki je z veliko verjetnostjo imela zapise za različne dejavnike virulence, katere bi znanstveniki lahko upoštevali pri pripravi cepiva. Take okoliščine lahko vodijo do številnih zapletov, saj tudi ob upoštevanju dejstva, da je bila prevalenca zapisov virulentnih dejavnikov med filogenetskimi skupinami (B2 in D) nižja pri izolatih iz blata zdravih ljudi v primerjavi z izolati iz bolnikov, še vedno je ostal velik delež takih sevov, ki so kazali številne zapise za virulentne dejavnike. Taki rezultati so izjemno zaskrbljujoči, saj bi lahko ob uporabi specifičnega cepiva povzročali propad velikega števila sevov, ki so del naravne črevesne mikrobiote. Menimo tudi, da kolonizacija črevesja zdravih ljudi s sevi, ki spadajo v filogenetsko skupino B2 ali skupino D, predstavlja prvi korak za nastanek zunajčrevesnih okužb, še posebej UTI, saj sevi UPEC, ki spadajo v skupino A in B1, ne kažejo nobenega zapisa za virulentne dejavnike. Vsekakor je potrebno izvesti še veliko bolj temeljitih raziskav o virulentnemu potencialu komezalnih sevov, saj bi samo nadaljnje študije razjasnile mehanizme, ki omogočajo sevom ExPEC uspešno patogenezo.

6 SKLEPI

- Med izoliranimi sevi iz blata zdravih ljudi smo uvrstili 57 (63 %) v filogenetsko skupino B2 (33 %) ali D (30 %) in jih označili kot patogene. Glede na nabor virulentnih dejavnikov in uvrstitev v filogenetsko skupino sta imeli več kot dve tretjini izolatov potencial povzročanja zunajčrevesnih okužb, zato bi jih lahko imenovali sevi ExPEC.
- Izolati zbirke BJ, še posebej sevi, ki so spadali v filogenetsko skupino B2 in D, so imeli razširjen in bogat nabor virulentnih dejavnikov, ki so značilni za seve ExPEC.
- Izolati, ki so bili odporni proti ampicilinu in tetraciklinu, so imeli manjše število virulentnih dejavnikov.
- Glede na visok delež sevov skupine B2 bi lahko s specifičnim preventivnim cepljenjem povzročili več škode kot koristi, saj bi uničili vsaj tretjino (če ne štejemo seve skupine D) oz. dve tretjini (ob upoštevanju skupini B2 in D) naravne črevesne mikrobiote in omogočili npr. naselitev patogenih bakterij.
- Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da velik delež človeške črevesne mikrobiote sestavljajo sevi, katere lahko imenujemo ExPEC in kateri so torej sposobni povzročanja zunajčrevesnih okužb. Moramo se tudi zavedati, da obstajajo razlike med populacijami (demografske, geografske,...), ki onemogočajo posploševanje dobljenih rezultatov. Zaradi zgoraj navedenih sklepov je vsekakor treba nameniti večjo pozornost sevom normalne človeške mikrobiote, da bi lahko zmanjšali delež mogočih bodočih zapletov.

7 POVZETEK

Praviloma bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) in gostitelj sobivata v mutualističnem odnosu, vendar so sevi *E. coli* zaradi specifičnih virulentnih dejavnikov sposobni povzročiti gostitelju številne črevesne in zunajčrevesne okužbe. *E. coli* je najverjetneje za enkrat najbolj znana in najbolj raziskana bakterija, kljub temu ji še vedno ne priznavamo dovolj primarno vlogo patogenega mikroorganizma. S sporadičnimi, ampak akutnimi izbruhi črevesnih okužb zaradi sevov *E. coli*, se znanstveniki in zdravniki niso pretirano obremenjevali, saj za zmanjšanje pojavov takih izbruhov infekcij zadostujejo zaostreni minimalni higienski standardi pri pripravi hrane. Tak ukrep gotovo omejuje izbruhe črevesnih infekcij, nikakor pa se ne bojuje z vse bolj »močnimi« sevi ExPEC, ki so razvili in še vedno razvijajo odpornost proti antibiotikom. Medtem ko črevesne okužbe povzročajo sevi *E. coli*, ki so pridobljeni iz okolja, je črevesna mikrobiota posameznika rezervoar *E. coli*, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe.

Da bi ugotovili prevalenco potencialno patogenih zunajčrevesnih sevov *E. coli* med črevesno mikrobioto, smo zbirko 90 sevov *E. coli*, izoliranih iz blata zdravih ljudi v obdobju od 01. 03. do 04. 09. 2009 na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani s pomočjo metode PCR pregledali za filogenetsko razvrstitev v (pod)skupine in prisotnost zapisov za naslednje dejavnike, povezane z virulenco: *cnf1*, *hlyA*, *papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *iucD*, *usp*, *tcpC*, *traJ*. Naši rezultati kažejo, da je 30 (33 %) vseh pregledanih izolatov spadalo v skupino B2, 27 (30 %) v skupino D, 20 (22 %) v skupino A in 13 sevov (14 %) v skupino B1. Zapis *cnf1* smo zasledili pri 5 (6 %) sevih, *hlyA* pri 7 (8 %), *papGII* pri 7 (8 %), *papGIII* pri 3 (3 %), *sfaDE* pri 15 (17 %), *afa/draBC* pri 4 (4%), *iucD* pri 35 (39 %), *usp* pri 22 (24 %), *tcpC* pri 7 (8 %) in *traJ* pri 23 (26 %) od vseh testiranih sevov.

Iz Laboratorija za bakteriološko diagnostiko infekcij sečil Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani smo pridobili rezultate občutljivosti testiranih sevov zbirke BJ z metodo Etestov za tri različne antibiotike, in sicer za ampicilin, tetraciklin in ciprofloksacin, saj se naštetimi antibiotiki večinoma uporabljajo za

zdravljenje različnih zunajčrevesnih okužb, povzročenih s po Gramu negativnimi bakterijami (npr. infekcija urinarne poti). Rezultati Etestov kažejo, da sta bili najbolj in približno enako občutljivi za vse tri antibiotike skupini B1 in B2, najmanj in približno enako občutljivi pa skupini A in D. Izračunali smo statistične značilne korelacije, ki niso pokazale nobene povezave med prisotnostjo zapisa za odpornost proti antibiotikom in prisotnostjo konjugativnega plazmida, medtem ko je obstajala povezava med prisotnostjo zapisa za odpornost proti ampicilinu s podskupino D2 in zapisa za odpornost proti tetraciklinu s podskupino A0. Iz tega lahko sklepamo, da se zapis za odpornost naštetih antibiotikov ne prenaša s pomočjo konjugacije. Z izračuni statističnih povezav smo zasledili relevantno povezavo med prisotnostjo zapisov *papGIII*, *sfaDE*, *usp*, *hlyA*, *cnf1*, *tcpC*, *traJ* in skupino B2 in podskupino B2₃. Dodatno smo zasledili še povezavo med skupino B2₃ in zapisom *iucD* in povezavo med podskupino D2 in zapisom *afa/draBC*.

S primerjanjem rezultatov z drugimi študijami z izolati zdravih ljudi smo zasledili, da obstajajo številni dejavniki, ki vplivajo na strukturo mikrobiote. Zato primerjave niso povsem primerne, saj so se študije med seboj zelo razlikovale, npr. način vzorčenja (blato ali bris), število izoliranih kolonij, število pregledanih virulentnih dejavnikov, struktura pregledane populacije (starost, spol, geografska lokacija,...). Smiselno bi bilo narediti podrobnejšo študijo in upoštevati točno določeno populacijsko strukturo. Tako bi omogočili boljše razumevanje nastajanja zunajčrevesnih okužb zaradi prisotnosti sevov ExPEC v črevesju zdravih ljudi, tudi zaradi samih gostiteljevih karakteristik, in tako v bodoče omejiti nastajanje takih zapletov.

Če povzamemo rezultate zapisane v tej diplomski nalogi, lahko rečemo, da med sevi, ki tvorijo človeško črevesno mikrobioto obstaja visok virulentni potencial, ki omogoča nastanek različnih zunajčrevesnih okužb. Da bi se lahko v bodoče uspešno branili pred zunajčrevesnimi okužbami, npr. z izdelavo cepiva, so potrebne še podrobnejše študije o strukturi in funkciji virulentnih dejavnikov in o mehanizmih, ki dajejo komenzalom pomembno vlogo rezervoarja za seve ExPEC. Iz primerjav z drugimi študijami smo ugotovili, da so še posebej potrebne naknadne raziskave o strukturi gostiteljske populacije, saj rezultati nakazujejo obstajanje takih gostiteljskih skupin s podobnimi karakteristikami,

ki se razlikujejo od drugih gostiteljskih skupin in da se zgradba sevov *E. coli* zdravih ljudi razlikuje med gostiteljevimi skupinami in sledi trendu gostiteljevih značilnosti.

8 VIRI

- Bahrani-Mougeot F., Gunther IV N. W., Sonnenberg M. S., Moobley H. L. T. 2002. Uropathogenic *Escherichia coli*. V: *Escherichia coli*: Virulence mechanisms of a versatile pathogen. Sonnenberg M. S. (ed.). Amsterdam, Academic Press: 239 - 295.
- Balsalobre C., Morschhäuser J., Jass J., Hacker J., Uhlin B. E. 2003. Transcriptional analysis of the *sfa* determinant revealing mRNA processing events in the biogenesis of S-fimbriae in pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 185, 2: 620 - 629.
- Bartoloni A., Cutts F., Leoni S., Austin C. C., Mantella A., Guglielmetti P., Roselli M., Salazar E., Paradisi F. 1998. Patterns of antimicrobial use and antimicrobial resistance among healthy children in Bolivia. *Tropical Medicine and International Health*, 3, 2: 116 – 123.
- Beutler B. 2004. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40: 845 - 859.
- Bielaszewska M., Dobrindt U., Gärtner J., Gallitz I., Hacker J., Karch H., Müller D., Schubert S., Schmidt M. A., Sorsa L. J., Zdziarski J. 2007. Aspects of genome plasticity in pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 297: 625 - 639.
- Bingen E., Picard B., Brahimi N., Mathy S., Desjardins P., Elinon J., Denamur E. 1998. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *Journal of Infectious Diseases*, 177: 642 - 650.
- Car J., Marinko T. 2003. Zdravljenje nezapletene okužbe sečnega mehurja pri ženskah v družinski medicini. *Zdravstveni Vestnik*, 72: 79 - 83.

- Cirl C., Wieser A., Yadav M., Duerr S., Schubert S., Fischer H., Stappert D., Wantia N., Rodriguez N., Wagner H., Svanborg C., Miethke T. 2008. Subversion of Toll-like receptor signaling by unique family of bacterial Toll/ interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nature Medicine*, 14, 4: 399 - 406.
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 10: 4555 - 4558.
- Davis J. M., Rasmussen S. B., O'Brien A. D. 2005. Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. *Infection and Immunity*, 73, 9: 5301 - 5310.
- Davis J. M., Carvalho H. M., Rasmussen S. B., O'Brien A. D. 2006. Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infection and Immunity*, 74, 9: 4401 - 4408.
- Davison H.C., Chris Low J. C., Woolhouse M. E. J. 2000. What is antibiotic resistance and how can we measure it? *Trends in Microbiology*, 8, 12: 554 - 559.
- Diard S., Toribio A. L., Boum Y., Vigier F., Kansau I., Bouvet O., Servin A. 2006. Environmental signals implicated in Dr fimbriae release by pathogenic *Escherichia coli*. *Microbes and Infections*, 8: 1851 - 1858.
- Duriez P., Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E., Chaventré A., Elion J., Picard B., Denamur E. 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distinct human populations. *Journal of the Society for General Microbiology*, 147: 1671 - 1676.
- Emődy L., Kerényi M., Nagy G. 2003. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, Suppl.2: S29 - S33.

Escobar-Parámo P., Grenet K., Le Menac'h A., Rode L., Salgado E., Amorin C., Gouriou S., Picard B., Rahimy M. C., Andremont A., Denamur E., Ruimy R. 2004. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 9: 5698 - 5700.

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*: Cellular and molecular biology. Neidhardt F. C., Curtiss R. (eds.). Washington, ASM Press: 2377 - 2401.

Garcia M. I., Le Bouguénec C. 1996. Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 94, 3: 201 - 236.

Gordon D. M., Stern S. E., Collignon P. J. 2005. Influence of age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits. *Microbiology*, 151: 15 – 23.

Guillemot D. 1999. Antibiotic use in humans and bacterial resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 494 - 498.

Guyer D. M., Gunther N. W., Mobley H. L. T. 2001. Secreted proteins and other features specific to uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 183, Suppl. 1: S32 - S35.

Hopkins K. L., Davies R. H., Threlfall E. J. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 5: 358 - 373.

Johnson J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 4, 1: 80 - 128

- Johnson J. R. Brown J. J. 1996. A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant *papG* genes encoding the Gal(alpha 1-4)Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*; 173: 920 - 926.
- Johnson, J., Stell A. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 261 - 272.
- Kaisho T., Akira S. 2006. Toll-like receptor function and signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 5: 979 - 987.
- Kaper J. B. 2005. Pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295: 355 - 356.
- Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 123 - 140.
- Koren S., Ihan A., Gubina M. 2002. Patogeneza in širjenje bakterijskih okužb. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A.(ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 65 - 73.
- Kotnik V. 2002. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A.(ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 427 - 438.
- Kronvall G., Larsson M., Borén C., Kahlmeter G., Bartoloni A., Rossolini G. M., Grape M., Kristiansson C., Karlsson I. 2005. Extended antimicrobial resistance screening of the dominant fecal *Escherichia coli* and of rare resistant clones. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 6: 473 - 478.

- Kuhar I., Grabnar M., Žgur-Bertok D. 1998. Virulence determination of uropathogenic *Escherichia coli* in fecal strains from intestinal infections and healthy individuals. FEMS Microbiology Letters, 164: 243 - 248.
- Kumar H., Takeda K., Akira S. 2004. Toll-like receptors. V: Encyclopedia of biological chemistry. Vol. 4. Lennarz W. J. (ed.). Amsterdam, Elsevier Inc.: 190 - 194.
- Kurazono H., Yamamoto S., Nakano M., Nair G. B., Terai A., Chai W. 2000. Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding an uropathogenic-specific protein. Microbial Pathogenesis, 28, 3: 183 - 189.
- Langsrud Ø. 2004. Fisher's exact test. Oslo, Statistics Norway, Division for Statistical Methods and Standards.
- <http://www.langsrud.com/fisher.htm> (November, 2009): 1 str.
- Le Bouguénec C. 2005. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. International Journal of Medical Microbiology, 295: 471 - 478.
- Le Bouguénec C., Archambaud M., Labigne A. 1992. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa* and *sfa* adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, 30, 5: 1189 - 1193.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J. M., Hoffmann J. A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell, 86: 973 - 983.
- Lewin B. 2004. Genes VIII. 8th ed. Upper Saddle River, Pearson Prentice Hall: 1027 str.

- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. Upper Saddle River, Prentice-Hall international: 1019 str.
- Moreno E., Johnson J. R., Pérez T., Prats G., Kuskowski M. A., Andreu A. 2009. Structure and urovirulence characteristics of the fecal *Escherichia coli* population among healthy women. *Microbes and Infection*, 11: 274 - 280.
- Murray R. P., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. 2005. Medical microbiology. 5th ed. Philadelphia, Elsevier Mosby: 963 str.
- Muzio M., Mantovani A. 2000. Toll-like receptors. *Microbes and Infection*, 2: 251 - 255.
- Nakano M., Yamamoto S., Terai A., Ogawa O., Makino S., Hayashi H., Nair G. B., Kurazono H. 2001. Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS Microbiology Letters*, 205: 71 - 76.
- Newman M. J., Seidu A. 2002. Carriage of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in adult intestinal flora. *West African Journal of Medicine*, 21, 1: 48 – 50.
- Oelschlaeger T. A., Dobrindt U., Hacker J. 2002. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19: 517 - 521.
- Petrovska M. 2002. Okužbe sečil. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A.(ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 379 - 382.
- Picard B., Garcia J. S., Gouriou S., Duriez P., Brahimi N., Bingen E., Elion J., Denamur E. 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity*, 67, 2: 546 - 553.

- Repnik U., Bergant M., Jeras M. 2004. Lastnosti in možnosti uporabe dendritičnih celic, antigensko specifičnih modulatorjev imunskega odziva. Zdravniški vestnik, 73: 69 - 72.
- Russo T. A., Johnson J. R. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: Focus on an increasingly important endemic problem. Microbes and Infection, 5: 449 - 456.
- 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, 5: 1753 - 1754.
- Sannes M. R., Kuskowski M. A., Owens K., Gajewski A., Johnson J. R. 2004. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. Journal of Infectious Diseases, 190: 2121 – 2128.
- Seme K. 2002 a. Normalna mikrobna flora. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A.(ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 59 - 64.
- Seme K. 2002 b. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A.(ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439 - 446.
- Servin A. L. 2005. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, 18, 2: 264 - 292.
- Shpigel N. Y., Elazar S. and Rosenshine I. 2008. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. Current Opinion in Microbiology, 11: 60–65.
- Sokolowska-Köhler W., Schönian G., Bollmann R., Schubert A., Parschau J., Seeberg A., Presber W. 1997. Occurrence of S and F1C/ S-related fimbrial determinants and

their expression in *Escherichia coli* strains isolated from extraintestinal infections. Immunology and Medical Microbiology, 18, 1: 1 - 6.

Stračič Erjavec M., Rijavec M., Križan-Hergouth V., Fruth A., Žgur-Bertok D. 2007. Chloramphenicol- and tetracycline-resistant uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) exhibit reduced virulence potential. International Journal of Antimicrobial Agents, 30: 436 - 442.

Starčič Erjavec M., Jesenko B., Petkovšek Ž., Žgur-Bertok D. 2010. Prevalence and associations of *tcpC*, a gene encoding a Toll/interleukin-1 receptors domain-containing protein, among *Escherichia coli* urinary tract infection, skin and soft tissue infection, and commensal isolates. Journal of Clinical Microbiology, 48, 3: 966 - 968.

Takeda K., Akira S. 2004. Microbial recognition by Toll-like receptors. Journal of Dermatological Science, 34: 73 - 82.

Tenover F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. American Journal of Medicine, 119, Suppl. 1: S3 - S10.

Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. 2001. Microbiology: an introduction. 7th ed. San Francisco, Benjamin Cummings: 887 str.

Tvede M., Høiby N., Larsen L. A., Raben A., Astrup A. V. 2001. Antibiotic resistance of *E. coli* isolated from healthy persons. Ugeskr Laeger; 163: 4868 – 4871.

Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1. izdaja. Ljubljana, Založba DZS: 552 str.

Wieser A., Schubert S. 2010. Novel combined multiple subunit vaccine protects against extraintestinal pathogenic *E. coli*. V: 20th European Congress of Clinical

Microbiology and Infectious Diseases ECCMID, Vienna, Austria, 10 - 13 April, 2010.
Vienna, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

http://registration.akm.ch/2010eccmid_einsicht.php?XNABSTRACT_ID=103960&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=114&XNMASKEN_ID=900 (November 2009): 1 str.

Wiles T. J., Kulesus R. R., Mulvey M. A. 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, 85: 11 - 19.

Wright G. D. 2003. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7: 563 - 569.

Yamamoto S., Nakano M., Terai A., Yuri K., Nakata K., Nair G. B., Kurazono H., Ogawa O. 2001. The presence of the virulence island containing the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. *Journal of Urology*, 165, 4: 1347 - 1351.

Yamamoto S., Terai A., Yuri K., Kurazono H., Takeda Y., Yoshida O. 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 12: 85 - 90.

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

Zhang L., Foxman B. 2003. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* mediated urinary tract infections. *Frontiers in Bioscience*, 8: 235 - 244.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem somentorici doc. dr. Marjanci Starčič Erjavec za vse nasvete, usmerjanja, prilagodljivosti tekom nastajanja diplomske naloge in še posebej za zelo hitro in natančno popravilo diplomskega dela.

Mentorici prof. dr. Darji Žgur-Bertok se zahvaljujem za vse strokovne nasvete in hitro popravilo diplomskega dela.

Zahvaljujem se recenzentki doc. dr. Blagajani Herzog Velikonji za hitro recenzijo in pregled diplomske naloge.

Zahvala je namenjena tudi vsem zaposlenim na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, še posebej Barbari Kastelic Bokal; Gregorju Bajcu, Mateju Butala in dr. Zdravku Podlesku za pomoč v pripravljalnici, laboratoriju in prijazen odgovor na vsako moje vprašanje.

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

Za rezultate o občutljivosti sevov zbirke BJ za antibiotike se zahvaljujem vodji Laboratorija za bakteriološko diagnostiko infekcij sečil Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani mag. Veroniki Križan-Hergouth, dr. med.

Zaradi finančne in še posebej cenjene moralne podpore se iskreno zahvaljujem svojim staršem, sestri Sarah in fantu Borisu. Hvala za pomoč, motivacijo in še posebej za potrpljenje (vem, da ste ga veliko potrebovali), z vami je bilo vse veliko lažje.

Hvala vsem sošolcem in prijateljem za popestritev študijskih dni.

Ne nazadnje bi se rada zahvalila še Ivetu in Darkotu za vso tehnično pomoč, ki je omogočila popolno izdelavo te diplomske naloge.

PRILOGE

Priloga A: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke BJ glede na razvrščanje v filogenetskih (pod)skupinah, na prisotnost virulentnih dejavnikov in glede na število prisotnih virulentnih dejavnikov pri vsakem posameznem sevu.

Oznaka BJ	Filog. sk.	Filog. podsk.	<i>cnf1</i>	<i>iucD</i>	<i>hlyA</i>	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>usp</i>	<i>tcpC</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>traJ</i>	Št. pozitivnih VD
BJ1	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ2	B2	B2 ₃	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BJ3	A	A1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BJ4	D	D1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BJ5	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ6	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ7	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
BJ8	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ9	B2	B2 ₃	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	3
BJ10	B2	B2 ₃	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	4
BJ11	A	A1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BJ12	D	D1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	3
BJ13	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ14	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ15	D	D1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BJ16	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ17	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ18	A	A1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
BJ19	B2	B2 ₃	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	4
BJ20	A	A1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BJ21	D	D1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BJ22	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ23	B2	B2 ₃	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	3
BJ25	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ26	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
BJ27	B2	B2 ₃	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	6

Opomba: VD - virulentni dejavniki, 1 - pozitiven rezultat, 0 - negativen rezultat. Prazni prostori v stolpcu za filogenetsko podskupino kažejo na razvrščanje seva v filogenetsko skupino B1, ki nima podskupine.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **priloge A**: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke BJ glede na razvrščanje v filogenetskih (pod)skupinah, na prisotnost virulentnih dejavnikov in glede na število prisotnih virulentnih dejavnikov pri vsakem posameznem sevu.

Oznaka BJ	Filog. sk.	Filog. podsk.	<i>cnf1</i>	<i>iucD</i>	<i>hlyA</i>	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>usp</i>	<i>tcpC</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>traJ</i>	Št. pozitivnih VD
BJ28	D	D2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
BJ29	D	D1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	3
BJ30	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	6
BJ31	B2	B2 ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ32	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	6
BJ33	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	6
BJ34	B2	B2 ₃	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	3
BJ35	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ36	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ37	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
BJ38	B2	B2 ₃	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	3
BJ39	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ40	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ41	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ42	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
BJ43	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ44	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
BJ45	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ46	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
BJ47	D	D2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BJ48	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ49	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ50	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ51	B2	B2 ₃	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	4
BJ52	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ53	A	A0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BJ54	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1

Opomba: VD - virulentni dejavniki, 1 - pozitiven rezultat, 0 - za negativen rezultat. Prazni prostori v stolpcu za filogenetsko podskupino kažejo na razvrščanje seva v filogenetsko skupino B1, ki nima podskupine.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **priloge A**: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke BJ glede na razvrščanje v filogenetskih (pod)skupinah, na prisotnost virulentnih dejavnikov in glede na število prisotnih virulentnih dejavnikov pri vsakem posameznem sevu.

Oznaka BJ	Filog. sk.	Filog. podsk.	<i>cnf1</i>	<i>iucD</i>	<i>hlyA</i>	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>usp</i>	<i>tcpC</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>traJ</i>	Št. pozitivnih VD
BJ55	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ56	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ57	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	4
BJ58	B2	B2 ₃	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2
BJ59	A	A1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	3
BJ60	D	D1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
BJ61	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ62	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ63	B2	B2 ₃	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
BJ64	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
BJ65	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ66	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ67	B2	B2 ₃	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	4
BJ68	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ69	B2	B2 ₃	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	4
BJ70	D	D1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BJ71	B2	B2 ₃	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BJ72	A	A0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
BJ73	A	A0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
BJ74	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
BJ75	D	D2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2
BJ76	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ77	D	D1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
BJ78	B2	B2 ₃	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
BJ79	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Opomba: VD - virulentni dejavniki, 1 - pozitiven rezultat, 0 - negativen rezultat. Prazni prostori v stolpcu za filogenetsko podskupino kažejo na razvrščanje seva v filogenetsko skupino B1, ki nima podskupine.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **priloge A**: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke BJ glede na razvrščanje v filogenetskih (pod)skupinah, na prisotnost virulentnih dejavnikov in glede na število prisotnih virulentnih dejavnikov pri vsakem posameznem sevu.

Oznaka BJ	Filog. sk.	Filog. podsk.	<i>cnf1</i>	<i>iucD</i>	<i>hlyA</i>	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>usp</i>	<i>tcpC</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>traJ</i>	Št. pozitivnih VD
BJ80	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ82	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ83	D	D1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BJ84	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ88	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ89	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
BJ92	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ93	B2	B2 ₃	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	4
BJ94	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
BJ95	B2	B2 ₃	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	4
BJ96	B2	B2 ₃	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	3
BJ97	B2	B2 ₃	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	4

Opomba: VD - virulentni dejavniki, 1 - pozitiven rezultat, 0 - negativen rezultat. Prazni prostori v stolpcu za filogenetsko podskupino kažejo na razvrščanje seva v filogenetsko skupino B1, ki nima podskupine.

Priloga B: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke UTI in zbirke SSTI glede na razvrstitev v filogenetsko podskupino in na prisotnost gena *traJ*.

Sevi SSTI	Filog. podsk.	<i>traJ</i>	Št. poz. VD	Sevi SSTI	Filog. podsk.	<i>traJ</i>	Št. poz. VD
TA3	B2 ₃	1	2	TA107	D1	0	0
TA5	B2 ₂	0	6	TA110	B2 ₃	0	5
TA6		0	0	TA112		0	0
TA7	B2 ₃	0	5	TA113	A1	1	2
TA8	B2 ₃	0	6	TA115	B2 ₃	0	1
TA10	B2 ₃	1	4	TA116	D1	0	3
TA11	B2 ₃	0	2	TA117	D1	0	1
TA16	B2 ₃	0	4	TA118	B2 ₃	0	1
TA18		0	3	TA127	D2	0	3
TA20	B2 ₃	0	4	TA128	D1	1	2
TA24	D2	0	3	TA129	B2 ₃	0	7
TA25	B2 ₃	0	1	TA130	B2 ₃	0	6
TA26	B2 ₃	0	5	TA131	B2 ₃	0	2
TA27	B2 ₃	0	2	TA133	B2 ₃	0	5
TA30		1	4	TA136	B2 ₃	0	3
TA31	B2 ₃	1	2	TA140	A0	0	0
TA33		1	1	TA142	B2 ₃	0	5
TA35	A1	0	1	TA143	A1	0	0
TA36	D2	0	0	TA144	A1	1	2
TA37	B2 ₃	0	2	TA147	B2 ₃	0	3
TA42	B2 ₃	1	1	TA155	B2 ₃	0	3
TA43	B2 ₃	0	1	TA156	A1	1	2
TA44	B2 ₃	0	2	TA157	D2	0	0
TA45	B2 ₂	0	5	TA158	B2 ₃	0	2
TA46	B2 ₂	0	5	TA161	B2 ₃	0	5
TA49	B2 ₃	0	3	TA162	B2 ₃	0	2
TA50	B2 ₃	0	2	TA168	B2 ₃	1	2
TA55	B2 ₃	0	2	TA169	A1	0	1
TA56	B2 ₃	0	6	TA171	B2 ₃	1	2
TA57	D1	0	3	TA174	A1	0	0
TA60	D2	0	2	TA176	A1	0	0
TA65	B2 ₃	1	5	TA178		0	1
TA67	B2 ₃	0	4	TA179	B2 ₃	1	2
TA70	B2 ₃	0	4	TA180	D2	0	1
TA71	B2 ₃	0	3	TA183	B2 ₃	0	5
TA72	A1	1	3	TA186	B2 ₃	0	0
TA73	B2 ₂	1	2	TA188	B2 ₃	0	3
TA81	B2 ₃	0	6	TA192	B2 ₃	0	4
TA82	B2 ₃	0	6	TA194	A1	1	1
TA83	A1	1	2	TA195	B2 ₃	0	1
TA84		1	1	TA196	D1	0	4
TA85	B2 ₃	1	4	TA198	D1	1	2
TA91	D1	0	0	TA199	B2 ₃	0	3
TA93	D1	0	0	TA203	B2 ₃	0	6
TA94	B2 ₃	1	4	TA206	B2 ₃	0	1
TA95	B2 ₂	0	3	TA207	B2 ₂	0	6
TA96	B2 ₂	1	1	TA208	B2 ₃	1	7
TA99	B2 ₃	0	3	TA209	B2 ₃	0	4
TA101	B2 ₃	0	1	TA210	B2 ₃	0	1
TA103	D1	0	0	TA213	B2 ₃	1	3
TA106		0	4	TA216		0	1

Opomba: VD - virulentni dejavniki, 1 - pozitiven rezultat, 0 - negativen rezultat. Skupno število pozitivnih virulentnih dejavnikov upošteva zapise za vse testirane dejavnike pri zbirki BJ. Prazni prostori v stolpcu za filogenetsko podskupino kažejo na razvrščanje seva v filogenetsko skupino B1, ki nima podskupine.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **priloge B**: Preglednica rezultatov analize sevov *E. coli* zbirke UTI in zbirke SSTI glede na razvrstitev v filogenetsko podskupino in na prisotnost gena *traJ*.

Sevi UTI	Filog. podsk.	<i>traJ</i>	Št. poz. VD	Sevi UTI	Filog. podsk.	<i>traJ</i>	Št. poz. VD
DL1	B2 ₃	0	6	DL56	D2	1	4
DL2	B2 ₃	0	1	DL57		0	0
DL3		1	1	DL58	B2 ₃	0	5
DL4	D2	0	1	DL59	B2 ₃	1	7
DL5	B2 ₂	0	0	DL60	B2 ₃	0	5
DL6	A1	1	1	DL61		0	0
DL7	B2 ₂	1	2	DL62	B2 ₃	0	6
DL8	B2 ₃	1	1	DL63	D1	0	2
DL9	B2 ₂	1	2	DL64	B2 ₃	1	2
DL10	A0	1	3	DL65	B2 ₃	0	7
DL11	A1	0	0	DL66	A1	1	2
DL12	B2 ₃	0	5	DL67	A1	1	4
DL13	B2 ₃	0	6	DL68	B2 ₃	0	6
DL14	A1	1	2	DL69	B2 ₃	0	6
DL15	D1	0	0	DL70	B2 ₃	0	3
DL16	B2 ₃	1	7	DL71	D1	0	3
DL17	D1	0	1	DL72	B2 ₃	1	4
DL18	B2 ₂	1	8	DL73	A1	0	0
DL19	D1	0	1	DL74	B2 ₃	0	6
DL20	A0	0	0	DL75	B2 ₃	1	4
DL21	D1	0	2	DL76	D1	0	1
DL22	B2 ₃	1	1	DL77	B2 ₂	0	5
DL23	D2	0	0	DL78	A1	1	1
DL24	B2 ₃	1	5	DL79	D1	0	1
DL25	B2 ₃	0	5	DL80	A0	0	0
DL26	A1	1	1	DL81	D1	0	0
DL27	A1	1	2	DL82	B2 ₃	0	6
DL28	D1	0	2	DL83	B2 ₃	1	4
DL29	B2 ₃	1	5	DL84	A1	1	2
DL30	B2 ₃	0	7	DL85	B23	1	7
DL31	B2 ₃	0	6	DL86		0	1
DL32	B2 ₃	0	2	DL87	A1	0	0
DL33	A1	0	0	DL88	B2 ₃	0	1
DL34	D1	1	1	DL89	B2 ₃	1	2
DL35	D1	0	2	DL90	A1	1	2
DL36	B2 ₃	0	4	DL91	B2 ₃	1	1
DL37	A1	1	1	DL92	B2 ₃	0	7
DL38	B2 ₃	0	2	DL93	B2 ₃	0	2
DL39	A1	0	0	DL94	A1	0	1
DL40	A0	1	1	DL95	B2 ₃	1	4
DL41	B2 ₃	1	1	DL96	D2	0	0
DL42	B2 ₂	0	6	DL97	D2	0	3
DL43	A1	0	0	DL98	B2 ₃	1	4
DL44	A1	0	0	DL99	A1	1	3
DL45	A1	0	0	DL100	B2 ₃	0	6
DL46	D1	0	1	DL101		0	0
DL47	D1	0	2	DL102	B2 ₃	0	6
DL48		1	1	DL103	B2 ₃	0	1
DL49	A1	0	2	DL104	A1	0	1
DL50	B2 ₃	0	3	DL105	B2 ₃	0	0
DL51	A1	1	2	DL106	D1	0	0
DL52	B2 ₃	0	4	DL107	D1	1	3
DL53	B2 ₃	0	6	DL108	B2 ₃	1	1
DL54	B2 ₃	0	1	DL109	A1	0	0
DL55	B2 ₃	0	7	DL110	B2 ₃	1	4

Opomba: VD - virulentni dejavniki, 1 - pozitivne rezultate, 0 - negativne rezultate. Skupno število pozitivnih virulentnih dejavnikov upošteva zapise za vse testirane dejavnike pri zbirki B. Prazni prostori v stolpcu za filogenetsko podskupino kažejo na razvrščanje seva v filogenetsko skupino B1, ki nima podskupine.

Čitar M. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2010
