

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Blaž JESENKO

**RAZLIKOVANJE IZOLATOV BAKTERIJE
Escherichia coli IZ BLATA ZDRAVIH LJUDI Z
METODO ERIC-PCR**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Blaž JESENKO

**RAZLIKOVANJE IZOLATOV BAKTERIJE *Escherichia coli* IZ
BLATA ZDRAVIH LJUDI Z METODO ERIC-PCR**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DIFFERENTIATION OF *Escherichia coli* ISOLATES FROM STOOL
SAMPLES OF HEALTHY INDIVIDUALS WITH ERIC-PCR
METHOD**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratoriju Skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka 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 doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec, za somentorico prof. dr. Darja Žgur Bertok ter za recenzenta doc. dr. Blaž Stres.

Mentorica: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Somentorica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Recenzent: doc. dr. Blaž Stres

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Alojz Ihan

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Blaž Stres

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Blaž Jesenko

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dn
DK	UDK 579.25.083:577.2.083(043)=163.3
KG	<i>Escherichia coli</i> /komezalni sevi/blato zdravih ljudi/izolacija iz blata/filogenetske skupine/molekularne metode/ERIC-PCR
AV	JESENKO, Blaž
SA	STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (mentorica)/ŽGUR BERTOK, Darja (somentorica)/STRES, Blaž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	RAZLIKOVANJE IZOLATOV BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i> IZ BLATA ZDRAVIH LJUDI Z METODO ERIC-PCR
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 41 str., 6 pregl., 11 sl., 1 pril., 37 vir
IJ	Sl
JJ	sl/en
AI	Iz blata zdravih ljudi smo od 01. 03. do 04. 09. 2009 izolirali 90 izolatov bakterije <i>Escherichia coli</i> (po en izolat iz posameznika). Z namenom razlikovanja posameznih izolatov, vključno z izolati pridobljeni od ljudi, ki so živeli v isti skupnosti, smo izvedli ERIC-PCR. ERIC-PCR je tehnika verižnega pomnoževanja s polimerazo, s katero pridobimo za vsak sev različno število različno velikih pomnoženih fragmentov DNA. Z elektroforetskimi tehnikami lahko DNA ločimo ter glede na število in velikost pomnoženih fragmentov razberemo različne profile ERIC-PCR. Primerjava dobljenih profilov ERIC-PCR je pokazala, da se določeni sevi v zbirki ponavljajo ter tudi da se isti sevi nahajajo v širši populaciji in ne samo v isti družinski skupnosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Dn
DC UDK 579.25.083:577.2.083(043)=163.3
CX *Escherichia coli*/commensal strains/feces of healthy individuals/isolation from feces/phylogenetic groups/molecular methods/ERIC-PCR
AU JESENKO, Blaž
AA STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (supervisor)/ŽGUR BERTOK, Darja (co-advisor)/ STRES, Blaž (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2011
TI DIFFERENTIATION OF *Escherichia coli* ISOLATES FROM STOOL SAMPLES OF HEALTHY INDIVIDUALS WITH ERIC-PCR METHOD
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 41 p., 6 tab., 11 fig., 1 ann., 37 ref.
LA SI
AL sl/en
AB From feces of healthy volunteers 90 *Escherichia coli* isolates were isolated from March 1st till September 4th, 2009 (one isolate per person). In order to differentiate the isolates, including isolates from persons living in same community, the ERIC-PCR was performed. ERIC-PCR, a method based on the polymerase chain reaction, amplifies for each strain specific DNA fragments. The amplified DNA fragments are afterwards separated with electrophoresis techniques and ERIC-PCR profiles are determined. The analysis of obtained ERIC-PCR profiles showed that, some isolates in the analysed collection belong to the same strain and that some strains are found in a wider population and not only in the same family community.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO SLIK	VII
	KAZALO PREGLEDNIC	VIII
	KAZALO PRILOG	IX
1	UVOD	1
1.1	NAMEN DELA	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	BAKTERIJA <i>E. coli</i>	3
2.2	EPIDEMIOLOGIJA BAKTERIJE <i>E. coli</i>	3
2.2.1	Epidemiologija patogenih črevesnih sevov	3
2.2.2	Epidemiologija komenzalnih črevesnih sevov	4
2.2.3	Epidemiologija zunajčrevesnih sevov	5
2.3	DIAGNOSTIKA OKUŽB Z <i>E. coli</i>	6
2.4	METODE RAZLIKOVANJA SEVOV	7
2.4.1	Gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (PFGE)	7
2.4.2	Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP)	8
2.4.3	Polimorfizem pomnoženih fragmentov (AFLP)	8
2.4.4	Polimorfizem naključno pomnoženih fragmentov (RAPD)	9
2.4.5	REP-PCR	9
2.4.6	Metoda ERIC-PCR	10
3	MATERIALI IN METODE	13
3.1	MATERIALI	13
3.1.1	Bakterijski sevi (Zbirka BJ)	13
3.1.2	Gojišča	15
3.1.2.1	Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)	15
3.1.2.2	Priprava trdnih gojišč LB v petrijevkah	15
3.1.2.3	Priprava trdnih gojišč MacConkey (MAC)	15

3.1.2.4	Priprava trdnih gojišč eozin metilen modro (EMB)	15
3.1.2.5	Priprava trdnega citratnega gojišča po Simmonsu	16
3.1.3	Kemikalije	16
3.1.4	Pufri in reagenti	18
3.1.4.1	Ločevanje nukleinskih kislin z elektroforezo v agaroznem gelu	18
3.1.5	Encimi	18
3.1.6	Oprema	18
3.2	METODE	20
3.2.1	Gojenje izolatov	20
3.2.2	Izolacija sevov	20
3.2.3	Priprava lizatov	22
3.2.4	ERIC-PCR	23
3.2.4.1	Reakcijska mešanica	23
3.2.4.2	Program PCR	23
3.2.4.3	Elektroforeza	24
3.2.5	Statistična analiza	24
4	REZULTATI	25
4.1	IZOLACIJA	25
4.2	POMNOŽEVANJE Z ERIC-PCR	25
4.3	PROFILI ERIC-PCR	26
4.3.1	Frekvenca pojava fragmentov	29
4.3.2	Povezava med genetskimi lastnostmi sevov in dolžino pomnoženih fragmentov	30
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	32
5.1	RAZPRAVA	32
5.2	SKLEPI	36
6	POVZETEK	37
7	VIRI	38
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Načini prenosa sevov <i>E. coli</i> med ljudmi: (Manges in sod., 2007; Schlager in sod., 2002; Levy in sod., 1990; Ewers in sod., 2009; Foxman in sod., 2002)	6
Slika 2: Rast <i>E. coli</i> na ploščah MAC (NMC, 2011)	20
Slika 3: Rast bakterij na ploščah EMB (MESA, 2011)	20
Slika 4: Možna rezultata biokemijskega testa za indol (ASM, 2011a)	21
Slika 5: Možna rezultata biokemijskega testa metil rdeče (ASM, 2011b)	21
Slika 6: Možna rezultata biokemijskega testa Voges-Proskauer (ASM, 2011b)	22
Slika 7: Možna rezultata biokemijskega testa za citrat (MESA, 2011).....	22
Slika 8: Primer elektroforeze pomnožkov ERIC-PCR sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ	25
Slika 9: Primer elektroforeze neustreznih pomnožkov ERIC-PCR sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ.	26
Slika 10: Frekvenca pojava posamezne dolžine fragmentov v ERIC-PCR profilih.....	29
Slika 11: Primer nekonsistence dveh filogenetskih dreves (Tenailon in sod, 2010).....	34

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Starost, spol in znane družinske povezave med posamezniki, ki so sodelovali v raziskavi (n=90)	14
Preglednica 2: Pomnožki ERIC-PCR sevov <i>E. coli</i> zbirke BJ	27
Preglednica 3: S Fischerjevim točnim testom izračunane vrednosti P za korelacijo med lastnostmi sevov ter na gelčku odčitanimi velikostmi lis ERIC-PCR profilov	30
Preglednica 4: Število najdenih povezav med pomnožki ERIC-PCR in filogenetskimi skupinami.	31
Preglednica 5: Število najdenih povezav med pomnožki ERIC-PCR in virulentnimi dejavniki	31
Preglednica 6: Relativno število najdenih povezav med pomnožki ERIC-PCR ter filogenetskimi skupinami in virulentnimi dejavniki.....	34

KAZALO PRILOG

Priloga A: Prisotnost virulentnih dejavnikov v sevih BJ (Čitar, 2010)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par, enota dolžine zaporedja nukleinske kisline
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. » <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid«)
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
EMB	eozin metilen modro
ERIC	enterobakterijska ponavaljajoča se medgenska ohranjena zaporedja (ang. » <u>e</u> nterobacterial <u>r</u> epetitive <u>i</u> ntergenic <u>c</u> onsensus PCR«)
ERIC-PCR	PCR z začetnimi oligonukleotidi, ki nalegajo na zaporedja ERIC
IMVC	biokemijski test sestavljen iz testov indol, metil rdeče, Voges-Proskauer in citrat
kb	1000 baznih parov, enota dolžine zaporedja nukleinske kisline
LB	gojišče Luria-Bertani
MAC	gojišče MacConkey
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. » <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction«)
UPEC	uropatogeni sevi bakterije <i>Escherichia coli</i>
UTI	infekcije urinarnega trakta (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

1 UVOD

Mikrobiota, pestra in dinamična združba mikroorganizmov, naseljuje kožo in sluznice zdravih ljudi in običajno ne povzroča bolezenskih znakov. Sestava mikrobiote (nabor različnih bakterijskih in glivnih vrst) ter relativni deleži vrst se spreminjajo glede na posameznika, mesto kolonizacije ter časovno obdobje. Črevesna mikrobiota s svojo prisotnostjo ščiti posameznika pred patogenimi vrstami mikroorganizmov, sodeluje pri prebavi in sintetizira vitamin K ter biotin. Črevesno mikrobioto v distalnem delu ileuma ter debelem črevesu sestavljajo predvsem bakterije rodov *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* in *Bifidobacterium*. Rodova *Lactobacillus* in *Escherichia* sta prisotna v manjšem številu. Prve bakterije, ki kolonizirajo človekova prebavila, dobimo med prehodom skozi porodni kanal. Kasneje, tekom življenja, se sestava črevesne mikrobiote spreminja, odvisno od ustreznega inokuluma ter prilagojenosti seva, s katerim pride gostitelj v stik.

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je najbolj številčna fakultativno anaerobna bakterija v črevesni mikrobioti. Preživi tudi zunaj črevesja. Ni vrstno specifična in lahko kolonizira človeka in živali s stalno telesno temperaturo, prav tako tudi plazilce. V večini primerov ima gostitelj od *E. coli* korist, ali zaradi njene prisotnosti vsaj nima simptomov bolezni. A v primeru, da ima bakterija ustrezne virulentne dejavnike, ali v primeru poškodbe naravnih pregrad, lahko *E. coli* povzroča tudi bolezni. V človeku so to večinoma prebavne motnje ter okužbe urinarne poti, možna sta tudi sepsa in meningitis ter druge zunajčrevesne okužbe (Kaper in sod., 2004).

Sevi *E. coli* lahko vsebujejo različne plazmide. To so izvenkromosomski nosilci genetskih informacij, na katerih se pogosto nahajajo zapisi za virulentne dejavnike (Seme in sod., 2002). Plazmidi dodatno obogatijo pester nabor genov, ki ga premore *E. coli*. Jedro genoma, ki ga vsebujejo praktično vse bakterije *E. coli*, vsebuje slabih dva tisoč genov, kar pomeni da se bakterije iste vrste razlikujejo v preostalih genih. Celoten genom vsebuje v povprečju 4700 genov, pangenom sestavlja več kot deset tisoč različnih genov (Tenailon in sod., 2010).

Velika genomska spremenljivost omogoča bakteriji širok nabor interakcij z gostiteljem in drugimi mikroorganizmi. Možna je tudi njena vloga posrednika genov odpornosti proti antibiotikom in virulentnim dejavnikom, ki jih s horizontalnim prenosom lahko širi naprej (Kaper in sod., 2004).

Razlikovanje med posameznimi sevi *E. coli* je pomembno, saj tako lahko izsledimo vir okužbe s patogenim sevom in sledimo prenosu in razširjanju patogenih sevov, poleg tega pa je *E. coli* tudi indikatorski mikroorganizem za fekalno onesnaženje.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil zbrati izolate *E. coli* iz blata zdravih ljudi in s pomočjo metode ERIC-PCR razlikovati in analizirati posamezne izolate.

Na podlagi predhodnih objav lahko sklepamo, da isti komezalni sev *E. coli* lahko kolonizira prebavni trakt posameznikov, ki živijo v isti družinski skupnosti. Ker je bila naša zbirka zbrana z obljubo anonimnosti sodelujočim in socialnih povezav med posamezniki nismo iskali, obstaja verjetnost, da so sodelujoči v raziskavi nosilci istega seva.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *E. coli*

Bakterijo *E. coli* je leta 1885 prvi opisal Theodor Escherich. Spada med γ -proteobakterije, red *Enterobacteriales*, družino *Enterobacteriaceae*, rod *Escherichia*. Je nesporulirajoča, fakultativno anaerobna bakterija, ki se po Gramu barva negativno. Najpogosteje jo lahko najdemo kot del normalne črevesne mikrobiote ljudi in živali s stalno telesno temperaturo. V večini primerov je koristen komenzal, saj fermentira za nas neprebavljive snovi, proizvaja vitamin K in biotin. V primeru, da ima ustrezne virulentne dejavnike, je lahko patogena in povzroča črevesne ter zunajčrevesne okužbe (npr. urinarne poti) (Guarner in Malagelada, 2003). Ker ima zelo preproste prehrambene zahteve in lahko preživi krajše časovno obdobje izven gostitelja, jo uporabljamo kot indikatorski mikroorganizem za onesnaženje s fekalijami (Scott in sod., 2002).

2.2 EPIDEMIOLOGIJA BAKTERIJE *E. coli*

V grobem lahko razlikujemo komenzalne, črevesne patogene in zunajčrevesne patogene seve *E. coli*. Njihove epidemiološke poti se močno prekrivajo, vendar se razlikujejo po rezervoarjih in verjetnostih za razvoj določenega tipa bolezni.

2.2.1 Epidemiologija patogenih črevesnih sevov

Najbolje je raziskana epidemiologija črevesnih patogenih sevov. Črevesni patogeni sevi najbolj pogosto povzročajo prebavne motnje. Po zaužitju s patogenim sevom okužene hrane ali pijače le ta vpliva na epitelne celice tankega ali debelega črevesa. Vsem črevesnim patotipom je skupna zmožnost pritrditve na steno črevesja in povzročitve driske. Ko bolezen izzveni, sev ponavadi za nekaj časa postane večinski sev v črevesju. Prehod v večinski sev lahko poteka brez simptomov, lahko so prisotne druge prebavne motnje kot so bruhanje in abdominalni krči. Za širjenje v državah v razvoju so najbolj zaslužni asimptomatski nosilci. Slednjih je več kot v razvitem svetu, saj je v državah v razvoju tudi pojavnost črevesnih infekcij višja. V državah v razvoju bo otrok do 5. leta starosti na leto doživel približno 0,5 okužbe z enterotoksično *E. coli* (ETEC). Kasneje incidenca pade,

verjetno zaradi odpornosti proti posameznim sevom. Sevi ETEC so najbolj pogost vzrok potovalne diareje (Levine in sod., 1977). V razvitem svetu sta izvor črevesnih patogenih sevov *E. coli* večinoma živina ter jelenjad. Ocenjujejo, da je približno 15 % vsega goveda nosilec za človeka patogenega serotipa O157:H7 (Gansheroff in O'Brian, 2004). Pri govedu je incidenca omenjenih serotipov najnižja pozimi ter najvišja v pozni pomladi in je močno povezana s prehrano, ki jo živali uživajo. Ljudje se lahko neposredno okužijo zaradi stika z živaljo (kmečki turizem), črevesni patogeni sevi *E. coli* pa se širijo tudi preko prehranske verige, po številu okužb izstopajo nepasterizirano mleko in sokovi ter sveža zelenjava. Dokazan je primer širjenja seva O157:H7 preko semen lucerne. Okužena semena so poslali različnim pridelovalcem, ljudje so se okužili z zaužitjem presnih kalčkov, ki so pogнали iz okuženih semen (Breuer in sod., 2001). Tudi v razvitem svetu obstajajo asimptomatski nosilci patogenih *E. coli* vendar zaradi ustrežnejše priprave hrane ter višjih higienskih standardov infekcije s človeškim izvorom *E. coli* niso tako pogoste.

2.2.2 Epidemiologija komenzalnih črevesnih sevov

Vir komenzalnih sevov *E. coli* je v večini primerov ostala človeška populacija. Posamezne filogenetske skupine prevladujejo na določenih geografskih področjih (Tenailon in sod., 2010), pestrost klonov izoliranih iz posameznika je odvisna tudi od njegovih navad. Otrok pride v prvi stik z *E. coli* med prehodom skozi porodni kanal. Znano je, da pri daljših porodih otrok prejme več različnih sevov matere (Bettelheim in sod., 1974). V primeru carskega reza otrok črevesno mikrobioto pridobi iz okolja. Posamezni sevi se v črevesju tekom življenja menjavajo. Komenzalni sevi s prenosom na novega gostitelja nimajo težav. Prenos poteka oralno-fekalno, nanj vplivajo prehranjevalne navade in način življenja. Vir novega seva so lahko tudi domače živali, posamezni sevi se lahko skrivajo v družinskemu psu ali mački ter ponovno kolonizirajo lastnika po nekaj tednih ali celo mesecih. Poleg prehranjevalnih navad so pri parih pomembne tudi spolne navade, ki lahko znatno povečajo delež sevov, ki si jih partnerja delita. Komenzalni sevi se lahko širijo tudi med različnimi vrstami. V kmečkemu okolju je bil dokazan prenos z živine (domačih prašičev) na hlevske miši, perutnino, ki je bila v ločeni ogradi, na ločene prašiče v oddaljenem hlevu ter na oskrbnike prašičev. Kot vektor prenosa so delovale tudi muhe, ki so prenašale okuženi material (verjetno iztrebke) preko zraka (Levy in sod., 1990). Komenzalni sevi, ki

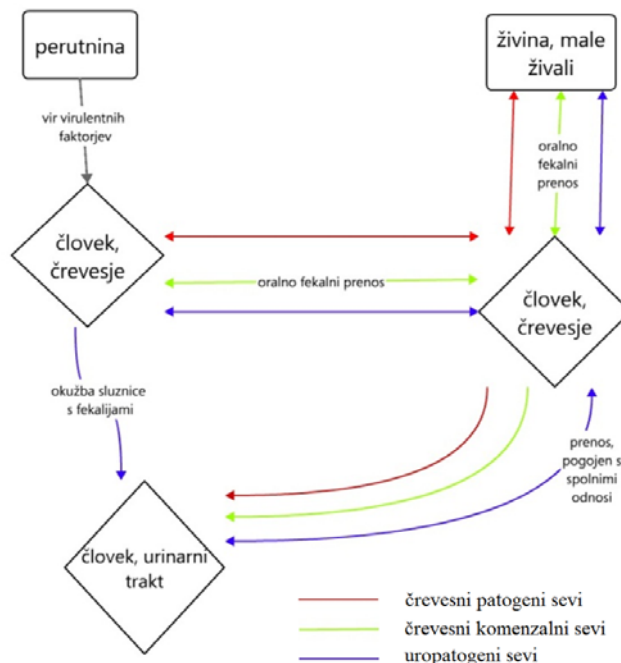
niso patogeni, lahko delujejo kot rezervoar genov. Sevi lahko imajo gene za rezistence proti antibiotikom in jih tako širijo naprej. Poročajo o širjenju ter povečanju prevalence komenzalnih sevov, ki imajo genetske zapise za beta-laktamaze z razširjenim delovanjem (sevi ESBL) (Pallecchi in sod., 2007). Komenzalni sevi lahko transformirajo patogene seve v seve odporne proti antibiotikom.

2.2.3 Epidemiologija zunajčrevesnih sevov

Kot že omenjeno so epidemiološke poti komenzalnih, patogenih črevesnih sevov in patogenih zunajčrevesnih sevov prepletene. Med zunajčrevesnimi *E. coli* imajo sevi, ki okužijo urinarni trakt (UTI) najbolj pestro epidemiologijo. Za seve UTI je značilno, da posedujejo ustrezne adhezine, ki jim omogočajo pričvrstitev na epitelne stene sečnice. To jim omogoča ascendentno okužbo mehurja (cistitis), v primeru ustreznih virulentnih dejavnikov lahko okužba napreduje v pielonefritis. Najbolj značilen adhezin pri uropatogeni *E. coli* (UPEC) so P-fimbrije. Patogeneza je v veliki meri odvisna od virulentnih dejavnikov, ki lahko določajo ekološko nišo, ki jo bo sev zasedel. Ob ustreznih pogojih bo bolezen povzročil tudi sev brez virulentnih dejavnikov. Primer tega je poseg kateterizacije, ki v nekaj tednih vodi do gotove okužbe sečil.

Vir UPEC je v večini primerov črevesna mikrobiota posameznika. V prebavni trakt lahko zaidejo oralno, ponavadi z minimalnimi količinami iztrebkov. Po zaužitju lahko novi sev s pomočjo zanj intrinzičnih lastnosti izpodrine tam prisotno *E. coli* in postane večinski sev posameznika. Na nove posameznike se lahko prenese oralno-fekalno, prenos je lahko pogojen s spolnimi odnosi. Dokazali so višji delež deljenih sevov UPEC med partnerjema v heteroseksualnih parih, delež je bil odvisen tudi od različnih spolnih navad (Foxman in sod., 2002). Posamezni sevi UPEC se lahko začasno skrijejo v hišnemu ljubljenu in kasneje spet kolonizirajo prebavni trakt človeka. Ljubljenu tako sevom UPEC služijo kot rezervoar (Schlager in sod., 2002). Izvor sevov UPEC ni dokazan, predlagani vir različnih sevov ter njihovih plazmidov je perutnina (Ewers in sod., 2009). Ptičji patogeni sevi (APEC) so glede na genom med najbolj podobnimi sevom UPEC, primerljivo hitro rastejo v urinu ter lahko okužijo ledvice glodavcev. Dokazali so tudi, da prenos plazmida z zapisom za virulentne dejavnike (pAPEC-O2-ColV) s seva APEC na človeškega

komenzalnega le temu poveča hitrost rasti na urinu in pozitivno vpliva na njegovo rast v ledvicah glodavcev (Skyberg in sod., 2006). Znano je, da ptičji sevi poleg oskrbnikov živali lahko okužijo tudi ljudi, ki se ukvarjajo s predelavo mesa. Z manjšo verjetnostjo lahko okužijo tudi končne potrošnike in tako predstavljajo pomemben vir rezistenc proti antibiotikom (Manges in sod., 2007).



Slika 1: Načini prenosa sevov *E. coli* med ljudmi: (Manges in sod., 2007; Schlager in sod., 2002; Levy in sod., 1990; Ewers in sod., 2009; Foxman in sod., 2002)

2.3 DIAGNOSTIKA OKUŽB Z *E. coli*

Bakterijo *E. coli* v Sloveniji najpogosteje izoliramo iz urina ali iztrebka. Vzorce z normalno sterilnih mest zasejemo na neselektivna gojišča, pri črevesnih okužbah na MacConkeyevo gojišče. Po biokemijski identifikaciji se z določeno verjetnostjo s serološkim določanjem uvrsti bakterije v posamezne enterovirulentne skupine. Za določanje toksinov se uporablja metoda z encimsko imunskim testom (ELISA) (Seme in sod., 2002). Pogosto se določa še odpornost proti antibiotikom z antibiogramom.

2.4 METODE RAZLIKOVANJA SEVOV

Ker z biokemijskimi in serološkimi metodami ter z antibiogrami ne moremo zanesljivo razlikovati posameznih sevov med seboj, so za razlikovanje bakterij na ravni seva razvili molekularne metode. Obstaja več različnih molekularnih metod, s katerimi bakterijske seve lahko razlikujemo zaradi razlik v zaporedju DNA (analiza restrikcijskih mest kromosomske DNA, hibridizacijske tehnike, itd.).

Trenutno največkrat uporabljene metode vključujejo pomnoževanje nukleinskih kislin z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in analizo velikosti fragmentov. Največja prednost metod PCR je njihova preprostost. Ko imamo ustrezne reagente in potrebno opremo, lahko z njo pomnožujemo DNA različnih organizmov. Osnovna reakcijska mešanica vsebuje enake reagente, z izjemo začetnih oligonukleotidov ter različnih koncentracij reagentov ter prilagojenih pogojev reakcije. Za podvojevanje ne potrebujemo velikih količin nukleinskih kislin ali njihovih virov, zato korak gojenja mikroorganizmov zagotavlja le vzorec za analizo le enega seva in ni potreben za povečanje količine vhodnega vzorca. V primeru, da vzorec prihaja iz naravno sterilnega predela, lahko izpustimo korak izolacije in opravimo analizo na samem vzorcu. Glavne težave pri metodah temelječih na PCR so kontaminacije (pri vsakem pomnoževanju moramo imeti negativno kontrolo) in slaba ponovljivost. Zaradi občutljivosti metode je končni rezultat močno odvisen od začetnega stanja, to je od točne koncentracije in stanja reagentov ter od stanja analizirane DNA. V primeru ponavljanja analize so le v najboljših pogojih vidni pasovi na elektroforeznem gelu na enakih mestih in so enako svetli (analiza DNA-prstnih odtisov bo po nekaj mesecih skladiščenja vzorca lahko dala različen rezultat od prvotnega).

2.4.1 Gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (PFGE)

PFGE ostaja zlati standard pri epidemioloških študijah. Celotno genomsko DNA režemo z restrikcijskimi encimi in nato ločujemo s pulzno gelsko elektroforezo. Fragmenti, velikosti nad 30 kb se pri klasični elektroforezi slabo ločujejo, zato pri elektroforezi v pulzirajočem polju spreminjamo usmerjenost električnega polja in s tem smer potovanja DNA. Večji fragmenti se na spremembo smeri počasneje odzovejo in zaradi tega počasneje potujejo.

Če uporabimo restrikcijski encim, ki ima ustrezno število prepoznavnih mest na genomu, dobimo na elektroforetskemu gelu za sev bakterije značilno sliko fragmentov DNA – DNA-prstni odtis. S primerjanjem DNA-prstnih odtisov različnih vzorcev lahko sklepamo o morebitni sorodnosti ali različnosti posameznih sevov, ki jih analiziramo. Pri testu zaradi občutljivosti velikih fragmentov DNA izvajamo izolacijo in restrikcijo DNA v agaroznih čepih. Metoda je zahtevna in zahteva veliko časa in ima še eno pomanjkljivost, DNA-prstni odtisi pa so med različnimi laboratoriji in izvajalci testa težko ponovljivi (Davis in sod., 2003).

2.4.2 Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP)

Metoda RFLP temelji na zaznavi razlike velikosti zaporedja DNA med specifičnimi restrikcijskimi mesti. Celotno genomsko DNA režemo z izbranimi restrikcijskimi encimi in nato ločujemo fragmente z gelsko elektroforezo. Z agaroznega gela prenesemo DNA na hibridizacijsko membrano. Pri postopku hibridizacije dosežemo vezavo označene sonde na tarčno nukleinsko kislino. DNA-prstni odtis je odvisen od velikosti specifičnega zaporedja, na katerega se veže specifična sonda. RFLP je starejša metoda, ki za ustrezne rezultate zahteva pazljivo izbiro hibridizacijske sonde in zadostno količino izolirane DNA. Zamuden je tudi proces hibridizacije.

2.4.3 Polimorfizem pomnoženih fragmentov (AFLP)

Metoda temelji na razgradnji DNA z restrikcijskimi encimi. Na restrikcijske fragmente se z ligacijo doda adapterske nukleotide. Za reakcijo PCR se nato uporabi začetne oligonukleotide, ki so komplementarni adapterskim oligonukleotidom. Pomnoženi fragmenti predstavljajo zaporedja med posameznimi restrikcijskimi mesti. Velikost fragmentov določamo z elektroforetskimi tehnikami. Za uspešno izvedbo metode je potrebno izvesti restrikcijsko razgradnjo, ligacijo z adapterskimi oligonukleotidi, reakcijo PCR, oceno velikosti in količino produktov.

2.4.4 Polimorfizem naključno pomnoženih fragmentov (RAPD)

Kot pove že ime, naključno pomnožujemo matrično DNA z uporabo PCR. Začetni oligonukleotidi so kratki in nespecifični (8–12 nukleotidov) in se vežejo na neznana mesta po analiziranemu genomu. Produkti so pomnožena naključna zaporedja. Po elektroforezi primerjamo različne DNA-prstne odtise. Metoda je zaradi uporabe številnih začetnih oligonukleotidov pogosto slabo ponovljiva.

2.4.5 REP-PCR

V bakterijskih kromosomih je več družin ponavljajočih se zaporedij DNA. Prva so bila opisana 38 bp dolga ponavljajoča se izvengenska palindromska (iz angl.: Repetitive Extragenic Pallindromic) zaporedja, ki so jih opisali kot možna neprevedena regulatorna zaporedja (Sharples in Lloyd, 1990). Podobne lastnosti imajo daljša in palindromska enterobakterijska ponavljajoča se intragenska zaporedja (ERIC iz angl.: Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus). REP in ERIC zaporedja nimajo homolognih delov (Versalovic in sod., 1991). Zadnjo družino ponavljajočih se elementov, BOX-elemente, so izolirali iz po Gramu pozitivne bakterije *Streptococcus pneumoniae*. BOX-elementi so po naravi modularni, zaradi različnih grozdov v katerih se lahko nahajajo, so jih poimenovali tudi mozaični ponavljajoči se elementi. Sestavljajo jih tri podenote box-A (59 bp), box-B (45 bp), box-C (50 bp). Zaporedje box-A je ohranjeno tudi med številnimi bakterijami, ki se barvajo po Gramu negativno (Lupski in Weinstock, 1992).

Na podlagi naštetih zaporedij so razvili več začetnih oligonukleotidov, ki nalegajo na nasprotno konce ponavljajočih se palindromskih zaporedij in jih pomnožujejo navzven. Produkt PCR naj bi tako predstavljal zaporedje med dvema motivoma, glede na različne dolžine med zaporedji naj bi bilo mogoče sklepati glede podobnosti vzorcev. Kljub omejenemu znanju o izvoru in funkcijah teh zaporedij so razvite metode DNA-prstnih odtisov učinkovit način za razlikovanje med mikrobi na nivoju vrste. S pomočjo računalniške obdelave slik elektroforeznih gelov je mogoča izdelava kladogramov, glede na rezultate je mogoče tudi sklepati o morebitnem človeškem oziroma živalskem izvoru

koliformne kontaminacije okolja (Dombek in sod., 2000) ter ali je posameznikova mikrobiota normalna in komenzalna (Wei in sod., 2004).

V literaturi se pogosto uporablja ime REP-PCR kot nadpomenka za pomnoževanje z vsemi začetnimi nukleotidi, ki nalegajo na ponavljajoča se zaporedja, torej ne samo za oligonukleotide, ki imajo tarčna zaporedja REP. Poleg naštetih začetnih oligonukleotidov so razvite metode na osnovi insercijskih elementov (npr. IS6110 *M. tuberculosis*, IS1245 *M. avium*) in polimorfnih regij bogatih z tandemskimi ponovitvami GC.

2.4.6 Metoda ERIC-PCR

Intergenske regije bakterijskih kromosomov vsebujejo specifična zaporedja, potrebna za regulacijo in kontrolo transkripcije in translacije. Med temi zaporedji so transkripcijski promotorji in terminatorji, signali za začetek in konec translacije ter vezavna mesta za regulatorne proteine. V intergenskih regijah najdemo tudi ohranjena zaporedja, ki (zaenkrat) nimajo znanih funkcij. Med njih spadajo repetitivna izvengenska palindromska zaporedja. Tvorijo stabilno strukturo stebila zanke. Nahajajo se v prepisanih, vendar ne prevedenih predelih operona, ki so med intergenskimi regijami ali v 3' neprevedenem delu transkripcijske enote. Ta palindromska zaporedja imajo verjetno funkcijo pri stabilnosti mRNA. Palindromske strukture naj bi upočasnile razgradnjo mRNA s strani 3'→5' eksonukleaz ter posledično povečajo izražanje navzgor ležečih zaporedij. Palindromi naj bi imeli podobno vlogo pri prekinitvi prevajanja mRNA. Večina kratkih ponavljajočih se zaporedij tvori nepopolne palindrome, ali so odvečna DNA. Zaporedja ERIC (enterobakterijska intergenska skupna zaporedja) se razlikujejo od ostalih intergenskih ponavljajočih se enot po tem, da so razširjene po večjem številu vrst.

Zaporedja ERIC najdemo v prepisanih delih intergenskih regij med člani družine *Enterobacteriaceae* ter *Vibrionaceae*. Število, v katerem se zaporedje pojavlja v genomih, je različno med vrstami. V genomu *E. coli* K-12 se pojavlja v 30 kopijah, v genomu bakterije *Salmonella enterica* (*S. enterica*) serotip Typhimurium LT2 je prisotno okoli 150 kopij, v *Photobacterium luminescens* je prisotno v več kot 700 kopijah. Skupno ERIC zaporedje je dolgo 127 bp in tvori nepopoln palindrom.

Če preučujemo ortologne intergenske regije med posameznimi vrstami, so v posameznih primerih zaporedja ERIC prisotna, medtem ko jih v ortoloških intergenskih regijah drugih vrst ni. Primerjave ohranjenosti zaporedij ERIC v ortoloških intergenskih regijah med različnimi vrstami so dale različne rezultate. Raven podobnosti med zaporedji v *E.coli* in *Vibrio cholerae* nakazuje na ohranjenost zaporedja ali pa horizontalni prenos.

V primeru analize ortoloških zaporedij ERIC med *E. coli* ter *S. enterica*, se substitucije kopičijo z nevtralno hitrostjo glede na sosednje gene (Hulton in sodelavci, 2001). Te rezultate bi lahko razložila glavna kopija zaporedij ERIC, ki bi bila pod evolucijskim pritiskom – iz te glavne kopije nastala zaporedja bi bila neselekcionirana, in bi zato nabirala substitucije hitreje.

S primerjavami zaporedij ERIC med in znotraj vrste niso uspeli najti te hipotetične glavne kopije. Prav tako še nista bila najdena način prenosa zaporedij ERIC ali statistična povezava s transpozicijskimi elementi. Nekatera pred kratkim vključena zaporedja v posameznih sevih nakazujejo na njihov horizontalen prenos, kar prav tako ni bilo potrjeno z najdbo zaporedij ERIC v plazmidih ali genomih fagov, ki bi tak prenos lahko izvedli. Natančna vloga zaporedij ERIC ni znana, z uporabo indeksa CAI (iz angl: Codon adaptation index) kot indikatorja genske ekspresije se je pokazalo, da so v okolici zaporedij ERIC bolj pogosto močno izraženi geni (Wilson in Sharp, 2006).

Glede na razlike v zaporedjih ERIC in njihov obstoj so razvili začetne oligonukleotide za metodo verižnega pomnoževanja DNA. Oligonukleotidi nalegajo na palindromska zaporedja in se pomnožujejo v nasprotni smeri. Pomnožila naj bi se DNA med blizu ležečimi zaporedji ERIC. Izkazalo se je, da ERIC-PCR deluje tudi izven rodov, ki vsebujejo zaporedja ERIC. Sprva so to dejstvo interpretirali kot obstoj zaporedij ERIC v širšem naboru rodov, z določanjem zaporedja celotnih genomov posameznih vrst se je izkazalo, da je metoda ERIC-PCR odvisna od drugih dejavnikov in ne samo od zaporedij ERIC. Z metodo pri bakterijah *E. coli* na gelu lahko ločimo tudi do 20 lis pomnožene DNA. Malo je verjetno, da v 4,6 mega baznih parov velikem genomu leži 20 od 30 kopij zaporedij ERIC v razdalji do 3000 baznih parov. Začetni oligonukleotidi se vežejo na neznana zaporedja drugod po genomu in pomnožujejo DNA, pomnožki niso nujno deli zaporedja med elementi ERIC (Gillings in Holley, 1997). Metoda je torej izpeljava metode pomnoževanja z naključnimi oligonukleotidi (RAPD). Na podlagi repetitivnih

ekstragenskih zaporedij (tudi rep-PCR) je osnovan sistem DiversiLab™, ki se uporablja predvsem za ugotavljanje poteka bolnišničnih infekcij. Sistem z reagenti v kompletu ter z obdelavo podatkov na spletu je po rezultatih primerljiv epidemiološkemu zlatemu standardu, metodi PFGE (Shutt in sod., 2005). Natančnost komercialnega sistema je dosežena s poenotenjem kemikalij za izolacijo in pomnoževanje DNA ter zamenjavo elektroforetskega gelčka z industrijskim, na katerem so posamezne kolone ločene. Avtomatsko odčitavanje velikosti pomnoženih fragmentov odstrani vpliv subjektivnosti in omogoči primerjavo DNA-prstnih odtisov, ki niso bili naneseni na isti gel.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi (Zbirka BJ)

Uporabljeni sevi sestavljajo zbirko BJ skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Zbirka vsebuje 90 izolatov *E. coli*, izoliranih iz blata po lastnemu mnenju zdravih ljudi moškega in ženskega spola različnih starosti. Udeleženci niso prejeli antimikrobnih zdravil bodisi v preventivne, bodisi v terapevtske 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 (na katerem zrastejo samo po Gramu negativne bakterije). Z gojišča MacConkey smo rožnato obarvane kolonije, ki so pomenile močno fermentacijo laktoze, prenesli na gojišče EMB (Eozin metilensko modro), kjer smo ponovno preverjali fermentacijo laktoze in za *E. coli* značilno kovinsko obarvanost kolonij. Naknadno smo naredili teste za indol, metil-rdeče, Voges-Proskauer in citrat, da bi potrdili, da izbrani izolirani sevi res biokemijsko ustrezajo vrsti *E. coli*. Od vsake osebe smo v zbirko vključili en izolat.

Preglednica 1: Starost, spol in znane družinske povezave med posamezniki, ki so sodelovali v raziskavi (n=90)

OZNAKA BJ	spol	starost (let)	Povezave
1	M	43	
2	Ž	16	
3	Ž	41	
4	Ž	41	
5	Ž	42	
6	Ž	15	
7	Ž	1,5	
8	M	70	
9	M	70	
10	M	61	
11	M	61	
12	M	41	
13	M	1,33	
14	Ž	25	skupnost 1, par
15	M	25	skupnost 1, par
16	M	25	skupnost 10
17	M	21	skupnost 10
18	M	21	
19	M	65	skupnost 1
20	Ž	25	
21	Ž	26	
22	Ž	23	
23	M	23	
25	Ž	22	
26	Ž	22	
27	Ž	23	
28	Ž	22	skupnost 8
29	Ž	67	skupnost 2
30	Ž	58	skupnost 2
31	M	67	skupnost 2
32	M	65	skupnost 2
33	M	78	skupnost 2
34	M	26	
35	M	56	
36	M	1,58	skupnost 3
37	M	44	skupnost 3
38	Ž	41	
39	M	56	
40	Ž	23	
41	Ž	49	
42	Ž	55	
43	Ž	20	
44	M	20	
45	Ž	23	
46	Ž	52	

OZNAKA BJ	Spol	starost (let)	povezave
47	Ž	28	
48	Ž	0,75	skupnost 4
49	M	28	skupnost 4
50	Ž	23	
51	M	21	
52	Ž	15	
53	Ž	79	
54	Ž	73	
55	Ž	44	
56	Ž	20	
57	Ž	24	
58	Ž	25	skupnost 8
59	M	23	
60	M	21	
61	M	23	
62	Ž	23	skupnost 9, par
63	M	24	
64	Ž	21	
65	Ž	21	
66	M	27	skupnost 9, par
67	M	21	
68	Ž	22	
69	Ž	22	
70	M	23	
71	M	23	
72	M	27	
73	M	25	
74	M	24	
75	M	4	skupnost 5
76	Ž	8	skupnost 5
77	Ž	11	skupnost 5
78	M	25	
79	Ž	0,17	
80	Ž	37	skupnost 6
82	Ž	2,3	skupnost 6
83	M	31	skupnost 6
84	M	5	skupnost 6
88	M	52	
89	Ž	53	
92	M	26	
93	Ž	52	skupnost 7
94	M	68	skupnost 7
95	M	23	skupnost 7
96	Ž	24	skupnost 7
97	M	56	skupnost 7

3.1.2 Gojišča

3.1.2.1 Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)

Za pripravo tekočih gojišč LB smo v 1 L 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 1 L 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.

3.1.2.3 Priprava trdnih gojišč MacConkey (MAC)

Za pripravo 1 L trdnih gojišč MAC smo v deionizirani vodi raztopili 50 g/L agarja MacConkey in 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.

3.1.2.4 Priprava trdnih gojišč eozin metilen modro (EMB)

Za pripravo 1 L trdnih gojišč EMB smo v deionizirani vodi raztopili 50 g/L agarja EMB in 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.

3.1.2.5 Priprava trdnega citratnega gojišča po Simmonsu

Za pripravo 1 L trdnega citratnega gojišča po Simmonsu smo v deionizirani vodi raztopili 1 g/L Na-citrata, 5 g/L NaCl, 1 g/L K_2HPO_4 , 1 g/L $NH_4H_2PO_4$, 0,2 g/L $MgSO_4$. Preverili smo, da je pH ustrezen ($6,8 \pm 0,2$) in ga po potrebi popravili s HCl oz. NaOH. Dodali smo 0,08 g/L bromtimol modrega ter 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
- EMB 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 »MassRuler™ 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

MERCK, Darmstadt, Nemčija

- MacConkey agar

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:

- ERIC1R 3'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5'
- ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

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:

- $5 \times$ TBE (0,45 mM Tris-borat; 10 mM EDTA), ki smo ga hranili pri sobni temperaturi;
- agarozo za pripravo gela;
- 1, 5 % elektroforezni agarozni gel smo pripravili z dodatkom agaroze (1,8 g) v 120 mL pufra $0,5 \times$ TBE, segreli, da se je agaroz raztopila, ohladili do 60 °C ter nato v gel dodali 6 μ L raztopine etidijevega bromida koncentracije 10 mg/mL;
- nanašalni elektroforezni pufer (0,25 % bromfenol modro; 0,25 % ksilen cianol; 40 % saharoza, sterilna voda).

3.1.5 Encimi

FERMENTAS

- *Taq*-polimeraza DNA

3.1.6 Oprema

Seznam 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),
- termoblok Constantemp (Techilab, 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 izolatov

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

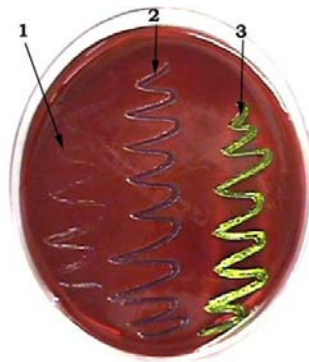
3.2.2 Izolacija sevov

Vzorci smo sprejeli nacepljene na plošče MAC, na katere so jih nacepili darovalci.



Slika 2: Rast *E. coli* na ploščah MAC (NMC, 2011)

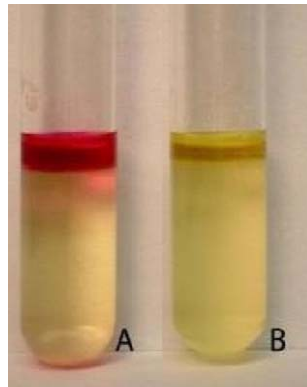
Temno vijolične kolonije smo precepili na plošče EMB, na katerem se *E. coli* sveti značilno kovinsko modro-zeleno.



Slika 3: Rast bakterij na ploščah EMB (MESA, 2011)

- 1) Bakterija ne fermentira laktoze
- 2) Laktozo fermentirajoča bakterija
- 3) *E. coli*

Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Izolate smo preverjali z biokemijskim testom IMVC. Teste smo odčitavali po 3 dneh, razen citratnega gojišča, ki smo ga odčitavali po enem tednu. Za seve, ki so bili indol pozitivni, metil rdeče pozitivni, metil rdeče negativni in citrat negativni, smo sklepali, da so *E. coli*.



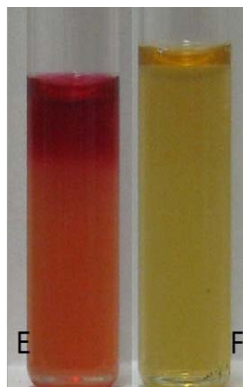
Slika 4: Možna rezultata biokemijskega testa za indol (ASM, 2011a)

A: Pozitiven test za indol, B: Negativen test za indol



Slika 5: Možna rezultata biokemijskega testa metil rdeče (ASM, 2011b)

C: Pozitiven test za produkcijo kislin, D: Negativen test za produkcijo kislin



Slika 6: Možna rezultata biokemijskega testa Voges-Proskauer (ASM, 2011b)

E: Pozitiven test za acetoin, F: Negativen test za acetoin



Slika 7: Možna rezultata biokemijskega testa za citrat (MESA, 2011)

G: Pozitiven testa za citrat, H: Negativen test za citrat

Za kratkoročno hranjenje smo jih precepili na plošče LB in hranili pri 4 °C. Seve smo spravili pri -80 °C v 15 % mešanici tekočega gojišča LB in glicerola.

3.2.3 Priprava lizatov

Seve smo gojili preko noči na rotacijskem stresalniku v tekočem gojišču LB pri 37 °C. Odpipetirali smo 1 mL kulture in jo centrifugirali eno minuto pri 14.000 obratih na minuto v namizni centrifugi pri sobni temperaturi. Odlili smo supernatant in celice resuspendirali v 200 µL sterilne destilirane vode. Celice smo kuhali v vreli vodi 10 minut in jih nato

centrifugirali 10 minut pri 14.000 obratih na minuto v namizni centrifugi pri sobni temperaturi. V sterilno mikrocentrifugirko smo nato prenesli 150 μL supernatanta in ga uskladiščili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do uporabe.

3.2.4 ERIC-PCR

Polimerazna verižna reakcija je standardna tehnika pomnoževanja DNA. Glavni in ponavljajoči se del je sestavljen iz korakov denaturacije, naleganja in pomnoževanja. Med denaturacijo se vijačnica DNA loči na posamezni verigi. Med naleganjem se začetni oligonukleotidi namestijo na komplementarna mesta na posamezni verigi. Med pomnoževanjem encim *Taq*-polimeraza pomnožuje odseke, ki se začnejo s pritrjenim začetnim oligonukleotidom. Začetna denaturacija in zaključno pomnoževanje sta koraka, ki zagotovita, da se vsa DNA začetnega vzorca denaturira in da se vsa DNA v končnem koraku pomnoži do konca.

3.2.4.1 Reakcijska mešanica

Za posamezno reakcijsko mešanico smo odpipetirali 13,375 μL destilirane vode, 2,5 μL pufru za *Taq*-polimerazo brez MgCl_2 , 2,5 μL MgCl_2 s koncentracijo 25 mM, 0,5 μL posameznega začetnega oligonukleotida s koncentracijama 20 pmol/ μL (ERIC1R in ERIC2) 0,5 μL mešanice dNTPjev s koncentracijo 10 mM, 0,125 *Taq*-polimeraze (5 U/ μL) in 5 μL celičnega lizata. Reakcijski volumen posamezne mešanice je znašal 25 μL .

3.2.4.2 Program PCR

Začetna denaturacija je potekala 4 min pri $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, denaturacija v nadaljnjih 35 krogih pomnoževanja je potekala 30 s pri isti temperaturi. Začetni oligonukleotidi so nalegali pri $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, pomnoževanje je potekalo 5 min pri $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po iztečenih 35 krogih pomnoževanja se je sinteza DNA zaključila s 7 min podaljševanja pri $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4.3 Elektroforeza

V 30 mL $0,5 \times$ pufru TBE smo med segrevanjem raztopili 0,45 g agaroze za elektroforezo. Ko je temperatura mešanice padla na $60 \text{ }^\circ\text{C}$ smo dodali etidijev bromid do končne koncentracije $5 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Mešanico smo vlili v nosilec za gel in počakali da se strdi. V jamice gela smo nanесли pomnoženo DNA in standardno lestvico 50 bp. Elektroforeza je potekala 90 minut pri 80 V v $0,5 \times$ pufru TBE. Gele smo slikali presvetljene z UV svetlobo valovne dolžine 302 nm. Lise profilov ERIC-PCR posameznih izolatov smo odčitali ročno. Velikost pomnoženih fragmentov smo ocenili na 50 baznih parov (bp), v primeru produktov večjih od 1000 bp pa na 100 bp. Ocenili smo intenzivnost lise na sliki elektroforetskega gelčka glede na standard na šibko, normalno in močno intenzivnost. Vrednosti smo vnesli v preglednico, na podlagi katere smo se odločali, katere izolate je potrebno ponovno skupaj preverjati na istemu gelu. V primeru, da sta bila lisi izolatov na istem gelu identični, smo ju šteli kot enak profil ERIC-PCR.

3.2.5 Statistična analiza

Za statistično analizo smo uporabili Fisherjev točni test, ki nam izračuna točno verjetnost P, da se pri več med seboj nepovezanih testih pojavi dobljeni rezultat. Za izračun smo uporabili program Excel z dodano matematično metodo za izračun Fisherjevega točnega testa (Agresti, 1992). Zaradi večjega števila opravljenih Fisherjevih točnih testov bi lahko uporabili Bonferronijev popravek, ki nam zmanjša verjetnost lažnih pozitivnih. Ker nam zmanjša samo verjetnost lažnih pozitivnih, ne pa tudi lažnih negativnih, ga nismo uporabili. Kljub upoštevanju Bonferronijevega popravka trditve v nadaljevanju dela še vedno držijo.

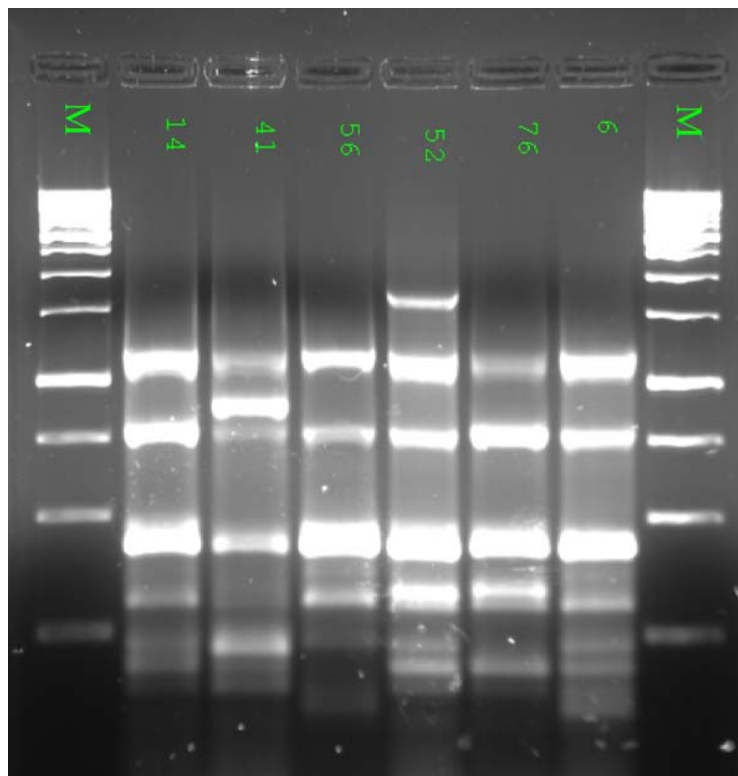
4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA

Od 110 vzorcev, ki smo jih prejeli od različnih udeležencev v raziskavi, smo v 90 primerih uspeli z izolacijo *E. coli*. Izolati 46 uspešnih izolacij so pripadali udeleženkam, 44 jih je bilo od udeležencev. Povprečna starost udeležencev, pri katerem nam je uspela izolacija, je bila 32,3 leta.

4.2 POMNOŽEVANJE Z ERIC-PCR

ERIC-PCR reakcija je proizvedla 81 različnih profilov ERIC-PCR. Iz treh izolatov nam z metodo ERIC-PCR ni uspelo pridobiti ustreznega DNA-prstnega odtisa. Eden od njih pri pomnoževanju ni tvoril produkta, druga dva sta tvorila premalo specifične produkte.

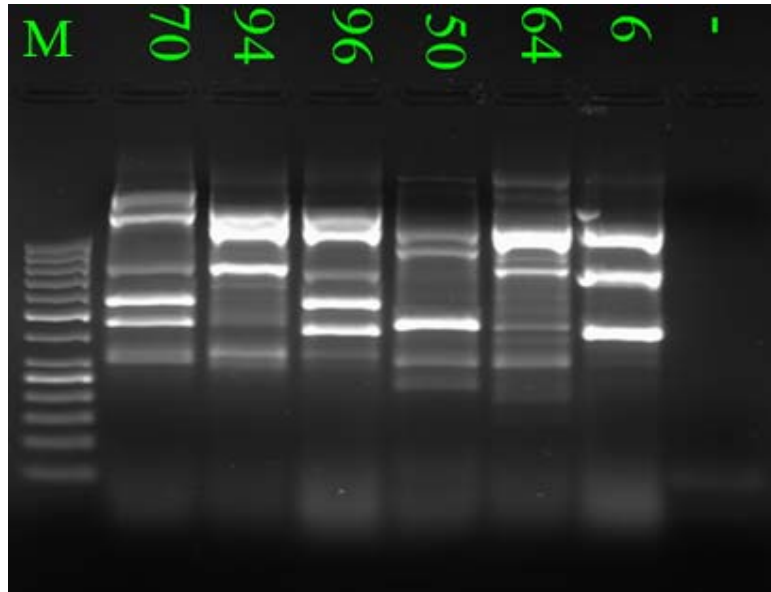


Slika 8: Primer elektroforeze pomnožkov ERIC-PCR sevov *E. coli* zbirke BJ

Na sliki od leve proti desni: 1 kb lestvica, sevi BJ14, BJ41, BJ56, BJ52, BJ76, BJ6, 1 kb lestvica.

Na Sliki 8 lahko vidimo primer profilov ERIC-PCR za 6 različnih izolatov. Vzorec BJ6 tvori profil, ki ima tri izrazite lise in tri šibkejše.

Na Sliki 8 opazimo, da ima vzorec BJ6 samo tri izrazite lise. V primeru enkratnega pomnoževanja bi tri šibkeje lise ostale neopažene.



Slika 9: Primer elektroforeze neustreznih pomnožkov ERIC-PCR sevov *E. coli* zbirke BJ.

Na sliki od leve proti desni 50 bp lestvica, sevi BJ70, BJ94, BJ96, BJ50, BJ64, BJ6, negativna kontrola.

Najmanjši fragmenti so na gelčku neopazni (glej sliko 8, sev BJ6)

4.3 PROFILI ERIC-PCR

V preglednici so velikosti pomnoženih fragmentov za posamezne seve in ustrezni profili ter oznake sevov.

Preglednica 2: Pomnožki ERIC-PCR sevov *E. coli* zbirke BJ

Ocenjena količina pomnožka oziroma velikost lise na elektroforetskemu gelčku je vnesena z uporabo barv. Za najslabše vidne lise oziroma najšibkejše pomnožene produkte smo uporabili črno barvo, za povprečno vidne produkte smo uporabili zeleno barvo, močno pomnoženi produkti pa so rdeče barve. Sevi BJ16, BJ17, BJ3 prihajajo od dveh med seboj povezanih posameznikov in enega nepovezanega. Seva BJ6 in BJ13 prihajata od nepovezanih posameznikov, ob upoštevanju genetskih lastnosti se izkaže, da seva nista identična. Sevi BJ30, BJ32 in BJ33 prihajajo od med seboj povezanih posameznikov

Oznaka BJ	2000	1900	1800	1700	1600	1500	1400	1300	1200	1100	900	850	800	750	700	650	600	550	500	450	400	350	300	250	200	150
BJ52					■				■					■					■	■		■		■	■	■
BJ27	■									■				■		■		■		■			■	■		
J9	■							■		■				■			■		■		■		■			
BJ7	■							■						■					■	■				■	■	
BJ51				■				■		■				■					■	■				■	■	
BJ97				■				■						■					■	■				■	■	
BJ95				■				■						■					■	■			■	■		
BJ23				■				■						■					■	■				■	■	
BJ2								■		■				■					■	■				■	■	
BJ71								■						■					■	■				■	■	
BJ14								■		■				■					■	■				■	■	
BJ42	■							■				■				■			■	■			■	■		
BJ70			■					■					■						■	■			■	■		
BJ77			■		■			■				■		■					■	■				■	■	
BJ34				■				■						■					■	■				■	■	
BJ29				■				■		■				■					■	■				■	■	
BJ94								■		■				■		■			■	■				■	■	
BJ4								■		■				■					■	■			■	■		
BJ96								■		■				■					■	■			■	■		
BJ93								■		■				■					■	■			■	■		
BJ74								■		■				■					■	■			■	■		
BJ6								■		■				■					■	■			■	■		
BJ13								■		■				■					■	■			■	■		
BJ56								■		■				■					■	■			■	■		
BJ76								■		■				■					■	■			■	■		
BJ31								■		■				■					■	■			■	■		
BJ84								■		■				■					■	■			■	■		
BJ35								■		■				■					■	■			■	■		
BJ62								■		■				■					■	■			■	■		
BJ44	■							■		■				■					■	■			■	■		
BJ89	■							■		■				■					■	■			■	■		
BJ18	■							■		■				■					■	■			■	■		
BJ10			■					■		■				■					■	■			■	■		
BJ60			■					■		■				■					■	■			■	■		
BJ12								■		■				■					■	■			■	■		
BJ21								■		■				■					■	■			■	■		
BJ1								■		■				■					■	■			■	■		

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2: Pomnožki ERIC-PCR sevov *E. coli* zbirke BJ

Oznaka BJ	2000	1900	1800	1700	1600	1500	1400	1300	1200	1100	900	850	800	750	700	650	600	550	500	450	400	350	300	250	200	150
BJ68							█		█				█						█			█				
BJ63							█		█				█						█			█				
BJ26							█	█	█	█			█							█		█	█			
BJ43							█	█	█				█							█		█	█			
BJ73							█	█	█								█			█		█			█	
BJ22							█		█				█							█		█	█		█	
BJ59							█		█				█		█					█		█	█		█	
BJ64								█	█	█		█								█		█	█			
BJ50								█	█	█		█								█		█	█		█	
BJ41								█	█			█		█						█		█	█		█	
BJ20								█	█				█			█				█		█	█		█	
BJ49								█	█				█							█		█	█		█	
BJ66								█	█				█							█		█	█		█	
BJ72								█	█				█		█					█		█	█		█	
BJ30								█	█	█										█		█	█		█	
BJ32								█	█	█										█		█	█		█	
BJ33								█	█	█										█		█	█		█	
BJ25								█	█	█										█		█	█		█	
BJ47									█	█			█			█				█		█	█		█	
BJ48									█	█			█							█		█	█		█	
BJ92									█	█									█	█	█	█		█	█	
BJ19	█								█	█			█							█		█	█		█	
BJ58				█			█		█	█										█		█	█		█	
BJ37			█					█	█	█										█		█	█		█	
BJ8							█		█	█										█		█	█		█	
BJ15							█		█	█										█		█	█		█	
BJ54							█		█	█										█		█	█		█	
BJ80							█		█	█										█		█	█		█	
BJ67							█		█	█										█		█	█		█	
BJ28								█	█	█					█					█		█	█		█	
BJ65								█	█	█										█		█	█		█	
BJ38								█	█	█		█								█		█	█		█	
BJ46								█	█	█			█							█		█	█		█	
BJ5								█	█	█							█			█		█	█		█	
BJ39								█	█	█							█			█		█	█		█	
BJ55								█	█	█									█		█	█		█	█	
BJ11									█	█		█								█		█	█		█	
BJ53									█	█								█		█		█	█		█	
BJ36									█	█					█				█		█	█		█	█	

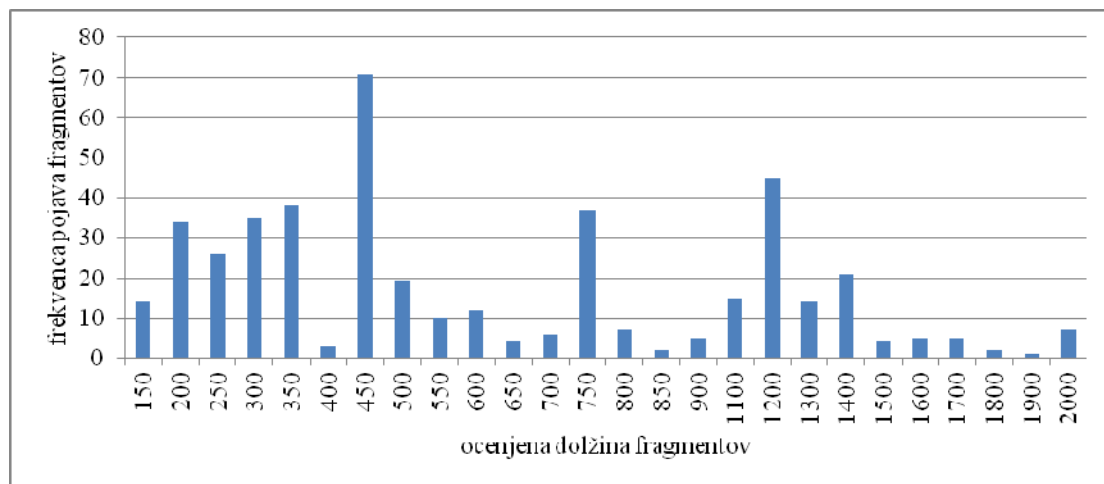
se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2: Pomnoški ERIC-PCR sevov *E. coli* zbirke BJ

Ornaka BJ	2000	1900	1800	1700	1600	1500	1400	1300	1200	1100	900	850	800	750	700	650	600	550	500	450	400	350	300	250	200	150
BJ78														■						■			■		■	
BJ61														■						■					■	■
BJ82																				■				■		■
BJ88																						■	■	■	■	■
BJ3									■	■										■					■	
BJ16									■	■										■					■	
BJ17									■	■										■					■	
BJ45									■	■										■		■				
BJ57									■	■										■				■	■	
BJ40									■	■										■				■	■	
BJ69																				■					■	■
BJ79																								■	■	■

4.3.1 Frekvenca pojava fragmentov

Prešteli smo kolikokrat so se posamezni fragmenti pojavili. Izkazalo se je, da so določene velikosti bolj pogoste od ostalih.



Slika 10: Frekvenca pojava posamezne dolžine fragmentov v ERIC-PCR profilih

Na sliki 10 je razvidno, da so se fragmenti velikosti 450, 750 in 1200 bp bolj pogosto pojavljali kot fragmenti ostalih velikosti.

Prešteli smo povezave med pomnožki ERIC-PCR in filogenetskimi skupinami ter jih glede na vrednost P vnesli v preglednico 4.

Preglednica 4: Število najdenih povezav med pomnožki ERIC-PCR in filogenetskimi skupinami.

	št. najdenih povezav $0,05 < P < 0,01$	št. najdenih povezav $P < 0,01$	št. vseh narejenih testov
filogenetske skupine	15	6	104

Prav tako smo prešteli povezave med pomnožki ERIC-PCR in virulentnimi faktorji ter jih glede na vrednost P vnesli v preglednico 5.

Preglednica 5: Število najdenih povezav med pomnožki ERIC-PCR in virulentnimi dejavniki

	št. najdenih povezav $0,05 < P < 0,01$	št. najdenih povezav $P <$ $0,01$	št. vseh opravljenih testov
virulentni dejavniki	26	12	338

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Izolacija bakterije *E. coli* iz vzorca blata zdravih posameznikov je uspela v 90 primerih od 110. Iz vseh vzorcev nismo uspeli izolirati bakterije *E. coli*. V večini primerov je bil za to kriv neustrezen odvzem oziroma predolg transport do laboratorija, kjer iz plošč ni bilo več mogoče izolirati žive bakterije. V šestih primerih za neuspešno izolacijo niso bili krivi postopki odvzema ali čas prenosa temveč dejstvo, da se je od posameznika pridobilo le en vzorec - namreč prehrana in pogoji odvzema močno vplivajo na razrast ter razmerje med vrstami črevesnih bakterij, in tako obstaja možnost, da je bil titer *E. coli* pod mejo zaznave. Možno je tudi, da sevi *E. coli* niso bili zaznani, če je posameznikov vzorec vseboval veliko različnih po Gram negativnih bakterij, ki so močno fermentirale laktozo. V primeru ponovnega odvzema bi najverjetneje pridobili še nekaj dodatnih sevov. Število uspešno izoliranih sevov *E. coli* torej nima epidemiološke informacije.

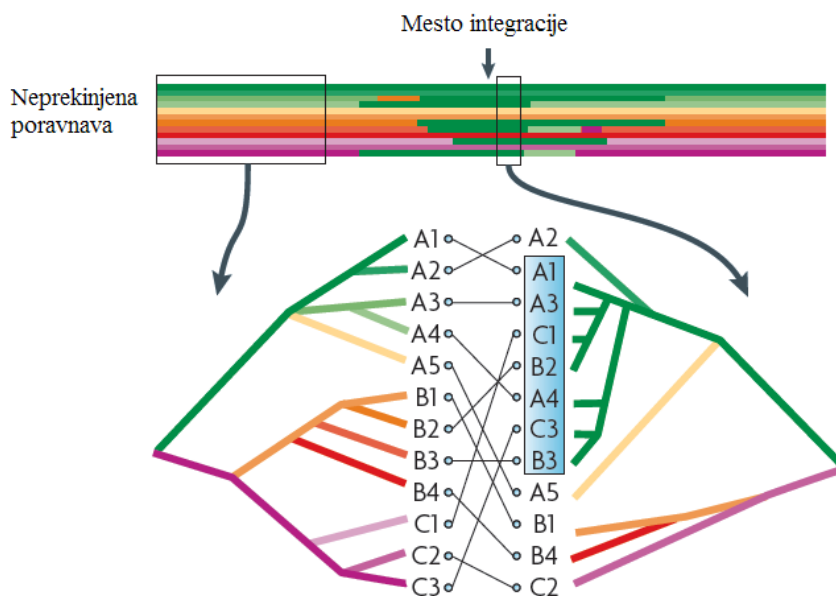
Verižna reakcija z ERIC začetnimi nukleotidi je v primeru 87 izolatov tvorila ustrezne pomnožke. Preostali trije izolati so imeli pomnožke, ki niso bili ustrezni za primerjavo (BJ75, BJ79, BJ83). Od teh treh sta dva vzorca proizvedla dve šibki in manjši, vendar identični lisi. Z drugimi metodami (primerjava filogenetske skupine in virulentnih faktorjev (Čitar, 2010) se je izkazalo, da seva nista identična. Podobno imata izolata BJ1 in BJ21 praktično identičen profil pomnožka. Kljub temu sta različna seva, ker ima slednji, z razliko od prvega, gen *iucD* (aerobaktinski sideroforni sistem za privzem železa) ter je odporen proti kinolonskemu antibiotiku ciprofloksacinu.

Ročno razvrstitev v različne profile ERIC-PCR smo opravili glede na razlike v velikosti in intenziteti lis na elektroforetskemu gelčku. V zbirki profilov ERIC-PCR je opazna močna prisotnost pomnožkov velikosti 450, 750, 1200 bp. V literaturi je omenjena povezava med zdravo črevesno mikrobioto ter ERIC-PCR pomnožki velikosti 500, 800 in 1000 bp. Ujemanje najbolj pogostih prisotnih fragmentov je bilo pričakovano, vendar obstaja

možnost, da je naključno, saj metodi glede pogojev PCR in načina izolacije nista popolnoma identični (Wei in sod., 2004).

Pri bakterijah se pojavlja vprašanje definicije vrste ter seva. Klasični definiciji sta biološka vrsta in fenetska definicija vrste. Pri slednji lahko pri mikroorganizmih opazujemo različne biokemične in fiziološke lastnosti, poleg morfoloških. Hibridizacija 70 % DNA tako spada pod fenetsko definicijo vrste. Biološka definicija vrste je v primeru bakterij problematična (Green in Dykhuizen, 1991). Tudi fenetska definicija vrste je v primeru bakterij težavna, ker je v posamezni vrsti ponavadi mnogo raznolikosti. Vse bakterije *E. coli* si med seboj delijo samo približno tretjino genov. Zaradi večjega števila fiksiranih mutacij v genomih bakterij kot pri mnogoceličnih evkariontih ter zaradi transdukcije, konjugacije in v manjši meri transformacije prihaja do sprememb v genomu, ki lahko bistveno vplivajo na organizem. Sev *E. coli*, ki je s horizontalnim prenosom genov prejel plazmid za odpornost proti penicilinu še vedno ostane sev iste vrste, postane pa fenotipsko nov sev.

Če določamo vrsto bakterije biokemijsko, lahko v primeru pridobljenih metabolnih lastnosti vrsto določimo napačno. Pri določanju s testom IMVC bi tako lahko *E. coli*, ki je pridobila zmožnost rasti na citratnem gojišču v oksičnih pogojih zamenjali za bakterijo iz rodu *Providencia*. Ker so dogodki, v katerih se spontano pripeti takšna mutacija redki (v primeru *E. coli* je opisan primer Cit⁺-mutante, ki se je pojavila v 31.500 generaciji (Lenski s sod., 2008) je v našem primeru za prepoznavo vrste nesmiselno uporabljati razširjene biokemične metode. V primeru, da nas zanima primerjava bakterij iste vrste med seboj, postanejo konjugacije, transdukcije in mutacije procesi, ki imajo vpliv na rezultate analiz. V genomu *E. coli* je približno 1000 *chi*-mest, na katerih se lahko vrši rekombinacija. V primeru, da se z mutacijo ali horizontalnim prenosom v genom vgradi fragment DNA, ki bakteriji nudi določeno selekcijsko prednost, se lahko omenjeni fragment razširi med ostalimi bakterijami svoje vrste s homologno rekombinacijo ohranjenih genov v svoji okolici (Tenaillon s sod., 2010). Iz tega razloga morajo metode, ki jih uporabljamo za analizo na nivoju vrste delovati na več različnih točkah. Če analiziramo genom na premalo točkah, obstaja nevarnost, da primerjamo samo mesta, ki niso variabilna.



Slika 11: Primer nekonsistence dveh filogenetskih dreves (Tenailon in sod, 2010)

V primeru analize filogenetske skupine na napačnem mestu genoma lahko dobimo neustrezno filogenetsko drevo.

Ker deluje metoda ERIC-PCR na podlagi pomnoževanja na mnogih različnih mestih po genomu, se je pričakovalo, da bodo bakterije, ki spadajo v isto filogenetsko skupino dale podobne pomnožke. S statistično analizo dobljenih podatkov se je izkazalo, da so filogenetske skupine bolj pogosto povezane s posameznimi lisami profilov ERIC-PCR.

Preglednica 6: Relativno število najdenih povezav med pomnožki ERIC-PCR ter filogenetskimi skupinami in virulentnimi dejavniki.

	št. najdenih povezav /100 testov $0,05 < P$	št. najdenih povezav/100 testov $P < 0,01$
filogenetske skupine	14,42	5,769
virulentni dejavniki	7,692	3,550
Razmerje fil.sk / vir. dej.	1,875	1,625

Ob upoštevanju različnega števila opravljenih statističnih testov se izkaže, da je bolj pogosta povezava med pomnožki ERIC-PCR in filogenetskimi skupinami (Preglednica 6).

Metoda ERIC-PCR je uporabna za študije raznolikosti, ločuje tudi med mešano kulturo in sestavnimi sevi te kulture. Začetni oligonukleotidi namreč nalegajo na mnoga mesta v

genomu. Zaradi te lastnosti lahko v primeru kontaminacije mešanice PCR pride samo do navidezno večje raznolikosti med sevi kot je v realnem stanju. V profilu ERIC-PCR kontaminirane mešanice se pokaže, kot da vsak sev doda zase specifične pomnožke. Kontaminacija nam tako lahko onemogoči odkritje dveh identičnih sevov, ne more pa takega odkritja povzročiti (Giovanni in sod., 1999).

Sevi, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, so bili pridobljeni iz širšega kolektiva ljudi, ki so samo delno bili izbrani naključno. Nekateri so si delili gospodinjstvo, nekateri so imeli isti delovni prostor in način prehranjevanja. To je bil poglavitni razlog za pregled zbirke, saj imajo ljudje s podobnimi navadami bolj pogosto podobno črevesno mikrobioto. Prevladujoči črevesni sev se predvidoma zamenja 3–4-krat na leto, prenos je navadno oralno-fekalni. Za omenjeni način prenosa je praviloma potreben neposreden stik ali vsaj bližina med nosilcema, saj bakterija v neustreznih pogojih propade. Med vsemi nosilci *E. coli*, ki so se izkazale za isti ERIC-tip, niso bile ugotovljene neposredne povezave. Vsaj teoretično obstaja možnost posrednega prenosa bakterije preko presne hrane, neprimerno obdelanega mesa in vode, večino bakterij verjetno pridobimo iz svojega neposrednega okolja. Ne moremo trditi, da smo med temi nepovezanimi osebki našli iste seve bakterij, ki so jih v nepovezanih dogodkih pridobili iz okolja. Majhnost slovenskega prostora je dejavnik, ki zaznavo takega prenosa, če že ne omogoča, vsaj naredi verjetno (Duriez, 2001). Ker namen dela ni bil iskati enakih sevov v vzorcih, temveč sestaviti zbirko, v kateri je čim več različnih sevov komenzalnih bakterij *E. coli*, načina prenosa bakterije med osebami nismo iskali. Obstaja tudi možnost, da so omenjeni sevi različni. Človekove črevesne bakterije so namreč odvisne od okolja, v katerem so. Urbanizacija in podobni način življenja po celem svetu sta pripeljala do tega, da so komenzalni sevi *E. coli* manj raznovrstni od ostalih divjih tipov te bakterije (Tenailon in sod., 2010). Glavni dejavniki, ki oblikujejo populacijo človeške črevesne *E. coli* so tako geografsko področje, čas vzorčenja ter klima območja. Ker so vsi trije faktorji za naše izolate identični, obstaja večja možnost odkritja močno podobnih izolatov.

Metode razlikovanja z ERIC začetnimi oligonukleotidi imajo svoje meje. V primeru, da bi iskali identične seve in preučevali njihov prenos, bi bilo potrebno preverjanje z dodatnimi metodami. Zlati standard ostaja gelska elektroforeza v pulzirajočemu električnem polju

(PFGE), podobno raven občutljivosti bi lahko dosegli z dodajanjem podobnih metod, ki so osnovane okoli drugih ponavljajočih se zaporedij v genomih bakterij (BOX, REP).

5.2 SKLEPI

- Večina udeležencev naše raziskave je nosilcev različnih sevov *E. coli*.
- Metoda ERIC-PCR je primerna za razlikovanje med različnimi sevi *E. coli*.
- S pomočjo metode ERIC-PCR lahko sklepamo na podobnosti med sevi.
- Posamezni sevi *E. coli* so enaki znotraj ožjih skupnosti, lahko pa se razširijo na druge posameznike izven teh skupnosti.

6 POVZETEK

Bakterija *E. coli* sodi v red *Enterobacteriales*, družino *Enterobacteriaceae*, rod *Escherichia*. V naravi kroži preko različnih prenašalcev, med ljudmi in živalmi. Bakterija je na ravni vrste izjemno raznolika in ima lahko pozitiven vpliv na človekov prebavni trakt, lahko pa je patogena. Prenaša se oralno-fekalno in s kontaminirano hrano. Ker v večini primerov ne more preživeti daljšega časovnega obdobja zunaj gostitelja, velja, da je večina prenosov z enega gostitelja na drugega znotraj iste družinske skupnosti. Prav tako je verjetnost, da si dve osebi delita sev, višja v primeru, da živita v istemu geografskemu področju. Iz blata 110 zdravih ljudi smo od 01. 03. do 04. 09. 2009 uspeli izolirati 90 izolatov bakterije *E. coli* (po en izolat iz posameznika). Z namenom razlikovanja posameznih izolatov, vključno z izolati pridobljeni od ljudi, ki so živeli v isti skupnosti, smo izvedli metodo ERIC-PCR. To je metoda verižnega pomnoževanja s polimerazo, s katero pridobimo za vsak sev različno število različno velikih pomnoženih fragmentov DNA. Z elektroforetskimi tehnikami smo ločili pomnožene produkte DNA in glede na število ter velikost pomnožkov razbrali različne profile ERIC-PCR. Primerjava dobljenih profilov ERIC-PCR je pokazala, da se določeni sevi v zbirki ponavljajo in da se isti sevi nahajajo v širši populaciji in ne samo v isti družinski skupnosti. Od 90 izolatov jih je 87 z metodo ERIC-PCR dalo ustrezne DNA-prstne odtise. DNA-prstne odtise smo razvrstili v 81 profilov ERIC-PCR. V posamezne profile so spadali tako ljudje (kot nosilci sevov), ki so spadali v isto družinsko skupnost, kot tudi med seboj nepovezani ljudje. V primeru enega profila je prišlo do enačenja dveh med seboj različnih sevov. Za zbirko sevov smo iz predhodnega dela posedovali podatke o filogenetskih skupinah, nekaterih virulentnih dejavnikih in odpornostih proti antibiotikom. S statističnimi metodami smo ugotavljali možne povezave med omenjenimi lastnostmi in velikostjo posameznih pomnožkov. Med posameznimi lastnostmi ter dolžinami pomnožkov smo našli močne statistične povezave. Izkaže se, da so posamezne dolžine pomnožkov najbolj povezane z filogenetskimi skupinami. Rezultat je v skladu s pričakovanji, saj so si sevi iz iste filogenetske skupine praviloma genetsko bolj podobni, kot sevi iz različnih filogenetskih skupin. Iz tega lahko sklepamo, da so si sevi, ki spadajo v enak ERIC-PCR profil najverjetneje zelo podobni ali sorodni.

7 VIRI

Agresti A. 1992. A survey of exact inference for contingency tables. *Statistical Science*, 7: 131 - 153

ASM. 2011a. Indole test. Washington, D.C., ASM - American Society for Microbiology: 1 str.
http://archive.microbelibrary.org/microbelibrary/files/ccImages/ArticleImages/Atlas_Indole/ (junij 2011)

ASM. 2011b. Methyl red and Voges Proskauer test. Washington, D.C., ASM - American Society for Microbiology: 1 str.
<http://archive.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=3029> (junij 2011): 1 str.

Bettelheim K. A., Breadon A., Faiers M.C., O'Farrel S.M. 1974. The origin of O serotypes of *Escherichia coli* in babies after normal delivery. *Journal of Hygiene*, 72: 67 - 70

Breuer T., Benkel D. H., Shapiro R. L. 2001. A multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 6: 977 - 982

Čitar M. 2011. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 97 str.

Davis M. A., Hancock D.D., Besser T.E., Call D.R. 2003. Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 5: 1843 - 1849

Dombek P. E., Johnson L. K., Zimmerley S. T., Sadowsky M. J. 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2572 - 2577

Duriez P. 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*, 147: 1671 - 1676

Ewers C., Antaño E. M., Diehl I., Philipp H. C., Wieler L. H. 2009. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 184 - 192

Foxman B., Manning S.D., Tallman P., Bauer R., Zhang L, Koopman J.S., Gillespie B., Sobel J. D., Marrs C. F. 2002. Uropathogenic *Escherichia coli* are more likely than commensal *E. coli* to be shared between heterosexual sex partners. *American Journal of Epidemiology*, 156: 1133 - 1140

- Gansheroff L.J., O'Brien A.D. 2004. *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle presented for slaughter in the U.S.: Higher prevalence rates than previously estimated. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 97: 2959 - 2961
- Gillings M., Holley M. 1997. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. Letters in Applied Microbiology, 25: 17 - 21
- Giovanni G., Watrud L., Seidler R.J., Widmer F. 1999. Fingerprinting of mixed bacterial strains and BIOLOG Gram-negative (GN) substrate communities by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence-PCR (ERIC-PCR). Current Microbiology, 38, 4: 217 - 223
- Green L., Dykhuizen D.E. 1991. Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. Journal of Bacteriology, 173, 22: 7257 - 7268
- Guarner F., Malagelada J.R. 2003. Gut flora in health and disease. Lancet, 360: 512 - 519
- Hulton C. S., Higgins C. F., Sharp P. M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. Molecular Microbiology, 5: 825 - 834.
- Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L., James T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology, 2: 123 - 140
- Lenski R.E., Blount Z.D., Borland C.Z. 2008. Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105, 23: 7899 - 7906
- Levy S. B., Marshall B., Petrowski D. 1990. Inter- and intraspecies spread of *Escherichia coli* in a farm environment in the absence of antibiotic usage. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 87: 6609 - 6613
- Levine M. M., Caplan E. S., Waterman D., Cash R. A., Hornick R. B., Snyder M. J. 1977. Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin. Infection and Immunity, 17: 78 - 82
- Lupski J.R., Weinstock G.M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. Journal of Bacteriology, 174: 4525 - 4529
- Manges A.R., Smith S.P., Lau B.J., Nuval C. J., Eisenberg J.S., Dietrich P. S., Riley L. W. 2007. Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: A case-control study. Foodborne Pathogens and Disease, 4, 4: 419 - 431
- MESA. 2011. Biochemical tests. Mesa, Mesa Community College: 1 str.
<http://www.mesacc.edu/~johnson/labtools/Dbiochem/ans5.html>, (junij, 2011)

NMC. 2011. *Escherichia coli*. Verona, NMC - Global organization for Mastitis Control and Milk Quality: 1 str.

<http://www.nmconline.org/ecoli.htm>, (junij, 2011)

Pallecchi L., Bartoloni A., Fiorelli C., Mantella A., Maggio T. D., Gamboa H., Gotuzzo E., Kronvall G., Paradisi F., Rossolini G.M., 2007, Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 2720 - 2725

Schlager T. A., Hendley J. O., Bell A. L., Whittam T. S. 2002. Clonal diversity of *Escherichia coli* colonizing stools and urinary tracts of young girls. *Infection and Immunity*, 70: 1225 - 1229

Scott T.M., Rose J. B., Jenkins T.M., Farrah S.R., Lukasik J. 2002. Microbial source tracking: Current methodology and future directions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 12: 5796 - 5803

Seme K. 2002. Normalna mikrobna flora V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 59 - 64

Sharples G. J., Lloyd R.G. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research*, 18: 6503 - 6509

Shutt C. K., Pounder J. I., Page S. R., Schaecher B. J., Woods G. L. 2005. Clinical evaluation of the DiversiLab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 1187 - 1192

Skyberg J. A., Johnson T. J., Johnson J. R., Clabots C., Logue C. M., Nolan L. K. 2006. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infection and Immunity*, 74: 6287 - 6292

Tenaillon O., Skurnik D., Picard D., Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8 :207 - 217

Versalovic J., Koeuth T., Lupski J. R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19: 6823 - 6831

Wei G., Pan L., Du H., Chen J., Zhao L. 2004. ERIC-PCR fingerprinting-based community DNA hybridization to pinpoint genome-specific fragments as molecular markers to identify and track populations common to healthy human guts. *Journal of Microbiological Methods*, 59: 91 - 108

Wilson L. A., Sharp P. M. 2006. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 1156 - 1168

ZAHVALA

Vesni, Ireni, Marjanci, Zdenki, Barbari, Manueli, Tanji in stricu Jankotu.

PRILOGE

Priloga A: Prisotnost virulentnih dejavnikov v sevih *E. coli* zbirke BJ (Čitar, 2010).

V posameznih stolpcih je zapisana: prisotnost filogenetskih skupin, podskupin in virulentnih dejavnikov. Okrajšave so: P fimbrije (*papGII*, *papGIII*) S-fimbrije (*sfaDE*), adhezini (*Afa/draBC*), citotoksični nekrotizirajoči faktor tipa 1 (*cnfI*), α -hemolizin (*HlyA*), uropatogeni specifični protein (*Usp*), sistemi za prevzem železa (*iucD*), protein vpleten v komunikacijo z celicami imunskega odziva (*tcpC*), gen za konjugacijo (*traJ*), odpornost na ampicilin, tetraciklin ciprofloksacin in skupno število vseh virulentnih dejavnikov.

Oznaka BJ	Fil. skup.	Fil. podskup.	<i>cnfI</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>	Inter. Amp.	Inter. Tc.	Inter. Cip.	št. VD
BJ1	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	S	0
BJ2	B2	B23	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	S	1
BJ3	A	A1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	1
BJ4	D	D1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	S	1
BJ5	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ6	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ7	B2	B23	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	S	S	S	2
BJ8	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ9	B2	B23	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	S	S	S	3
BJ10	B2	B23	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	S	S	S	4
BJ11	A	A1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	1
BJ12	D	D1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	S	S	S	3
BJ13	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ14	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ15	D	D1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	S	1
BJ16	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	S	0
BJ17	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ18	A	A1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	S	2
BJ19	B2	B23	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	S	S	S	4
BJ20	A	A1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	1
BJ21	D	D1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	1
BJ22	B2	B23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	S	0
BJ23	B2	B23	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	S	S	S	3
BJ25	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ26	B2	B23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	S	1
BJ27	B2	B23	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	R	S	S	6
BJ28	D	D2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	R	S	S	2
BJ29	D	D1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	S	S	S	3
BJ30	B2	B23	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	S	S	S	6
BJ31	B2	B22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ32	B2	B23	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	S	S	S	6
BJ33	B2	B23	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	S	S	S	6
BJ34	B2	B23	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	S	S	S	3

Nadaljevanje Priloge A: Prisotnost virulentnih dejavnikov v sevih *E. coli* zbirke BJ (Čitar, 2010).

Oznaka BJ	Fil. skup.	Fil. podskup.	<i>cnf1</i>	<i>iucD</i>	<i>hlyA</i>	<i>papGI</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>Usp</i>	<i>tcpC</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>traJ</i>	Inter. Amp	Inter. Tc	Inter. Cip	št. VD
BJ35	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	I	S	0
BJ36	B2	B23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ37	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	S	S	S	1
BJ38	B2	B23	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	S	I	S	3
BJ39	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ40	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	R	S	0
BJ41	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ42	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	S	S	S	1
BJ43	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	R	S	0
BJ44	B2	B23	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	S	R	S	1
BJ45	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ46	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	S	S	S	1
BJ47	D	D2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	S	1
BJ48	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ49	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ50	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	R	S	0
BJ51	B2	B23	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	S	S	S	4
BJ52	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ53	A	A0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R	1
BJ54	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	R	R	S	1
BJ55	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ56	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ57	B2	B23	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	S	I	S	4
BJ58	B2	B23	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	S	S	S	2
BJ59	A	A1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	R	S	S	3
BJ60	D	D1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	S	S	S	2
BJ61	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	I	S	0
BJ62	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ63	B2	B23	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	S	2
BJ64	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	R	S	1
BJ65	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ66	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	I	S	0
BJ67	B2	B23	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	S	S	S	4
BJ68	B2	B23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	I	S	0
BJ69	B2	B23	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	S	S	S	4

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: Prisotnost virulentnih dejavnikov v sevih *E. coli* zbirke BJ (Čitar, 2010).

Oznaka BJ	Fil. skup.	Fil. podskup.	<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>	Inter. Amp	Inter. Tc	Inter. Cip	št. VD
BJ70	D	D1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	S	1
BJ71	B2	B23	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	S	1
BJ72	A	A0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	R	R	S	2
BJ73	A	A0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	R	R	S	2
BJ74	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	R	S	1
BJ75	D	D2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	S	S	S	2
BJ76	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ77	D	D1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	R	S	S	2
BJ78	B2	B23	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	S	S	S	2
BJ79	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	I	S	S	0
BJ80	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ82	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ83	D	D1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	1
BJ84	B1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ88	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	I	S	0
BJ89	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	S	I	S	1
BJ92	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S	0
BJ93	B2	B23	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	S	S	S	4
BJ94	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	S	1
BJ95	B2	B23	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	S	S	S	4
BJ96	B2	B23	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	S	S	S	3
BJ97	B2	B23	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	S	S	S	4