

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Sladjana KOMAC

**REPLIKACIJSKA REGIJA RepFIIA, RepFIB IN IncP
PLAZMIDOV V IZOLATIH BAKTERIJE *Escherichia
coli***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Sladjana KOMAC

**REPLIKACIJSKA REGIJA RepFIIA, RepFIB IN IncP PLAZMIDOV V
IZOLATIH BAKTERIJE *Escherichia coli***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PLASMID REPLICATION REGIONS RepFIIA, RepFIB AND IncP IN
Escherichia coli ISOLATES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2015

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

Za mentorico diplomskega dela je imenovan prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK, za somentorico prof. dr. Marjanca STARČIČ ERJAVEC ter za recenzenta doc. dr. Tomaž ACCETTO.

Mentor: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK

Somentor: prof. dr. Marjanca STARČIČ ERJAVEC

Recenzent: doc. dr. Tomaž ACCETTO

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Članica: prof. dr. Marjanca STARČIČ ERJAVEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Tomaž ACCETTO
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Datum zagovora:

Sladjana KOMAC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dn
DK	UDK 579.25:579.61.065:577.2.083(043)=163.6
KG	<i>Escherichia coli</i> /komenzalni sevi/patogeni sevi/replikacijske regije plazmidov/virulentni dejavniki/PCR
AV	KOMAC, Sladjana
SA	ŽGUR-BERTOK, Darja (mentorica)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (somentorica)/ACCETTO, Tomaž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2015
IN	REPLIKACIJSKA REGIJA RepFIIA, RepFIB IN IncP PLAZMIDOV V IZOLATIH BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 67 str., 16 pregl., 12 sl., 6 pril., 40 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Bakterija <i>E. coli</i> je komenzalna bakterija, ki pa je ob naboru določenih dejavnikov virulence lahko tudi patogena bakterija. Ti dejavniki virulence so mnogokrat zapisani na plazmidih. V nalogi smo pregledali pogostnost zapisov plazmidnih replikacijskih regij RepFIIA, RepFIB in IncP med sevi v zbirki komenzalnih sevov <i>E. coli</i> (zbirka BJ), zbirki sevov UPEC (zbirka DL) in zbirki sevov SSTI <i>E. coli</i> (zbirka TA). Replikacijsko regijo RepFIIA smo našli v zbirki BJ pri 37 % sevov, v zbirki DL pri 30 % sevov, v zbirki TA pri 22 % sevov. Replikacijsko regijo RepFIB smo našli v zbirki BJ pri 33 % sevov, v zbirki DL pri 35 % sevov in v zbirki TA pri 23 % sevov. Replikacijsko regijo IncP smo našli v zbirki BJ pri 2 % sevov, v zbirki DL v 9 % in v zbirki TA v 2 % sevov. Glede na to, da obstajajo mozaično sestavljeni plazmidi, smo pogledali tudi prisotnost več replikacijskih regij v eni celici in ugotovili da sta RepFIIA in RepFIB hkrati prisotni v 16 % sevov zbirke BJ, v 23 % sevov zbirke DL in v 11 % sevov zbirke TA. Prisotnost vseh treh replikacijskih skupin hkrati v zbirki BJ nismo ugotovili, v zbirki DL je takšnih 5 % sevov in v zbirki TA je bil 1 % takšnih sevov. Poleg same prevalence med zbirkami sevov smo tudi iskali povezave med replikacijskimi regijami in dejavniki virulence, odpornostjo proti antibiotikom in filogenetskimi skupinami.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND	Dn
DC	UDC 579.25:579.61.065:577.2.083(043)=163.6
CX	<i>Escherichia coli</i> /commensal strains/pathogenic strains/plasmid replication regions/virulence factors/ PCR/
AU	KOMAC, Sladjana
AA	ŽGUR-BERTOK, Darja (supervisor)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (co-advisor)/ACCETTO, Tomaž (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjava 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2015
TI	PLASMID REPLICATION REGIONS RepFIIA, RepFIB AND IncP IN <i>Escherichia coli</i> ISOLATES
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XIII, 67 p, 16 tab., 12 fig., 6 ann., 40 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	The bacterium <i>E. coli</i> is a commensal bacterium, but possession of specific virulence factors can make the bacterium also pathogenic. These virulence factors are often encoded on plasmids. In this thesis we determined the prevalence of RepFIIA, RepFIB and IncP replication regions among commensal strains of <i>E. coli</i> (BJ collection), UPEC strains (DL collection) and SSTI <i>E. coli</i> (TA collection). The RepFIIA replication group was found among 37 % of strains in the BJ collection, among 30 % of strains in the DL collection and among 22 % of strains in the TA collection. The RepFIB replication region was found in 33 % of strains in the BJ collection, among 35 % strains in the DL collection and among 23 % of strains in the TA collection. The IncP replication region was found among 2 % of strains in the BJ collection, among 9 % of strains in the DL collection and 2 % of strains among the TA collection. Considering the fact that some plasmids are mosaic, we also determined the prevalence of multiple replication regions in one strain. The RepFIIA and RepFIB replication regions were found together among 16 % of strains in the BJ collection, among 23 % of strains in the DL collection and among 11 % of strains in the TA collection. All three replication regions were found together in no strain of the BJ collection, in 5 % of strains in the DL collection and in 1 % of strains in the TA collection. Further, correlations between replication regions and virulence factors, antibiotic resistance and phylogenetic groups were searched for.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBIN	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	14
1.1 NAMEN DELA	14
2 PREGLED OBJAV	16
2.1 BAKTERIJA <i>E. COLI</i>	16
2.1.1 Komenzalni sevi <i>E. coli</i>	17
2.1.2 Sevi ExPEC	20
2.1.3 Hitro določanje filogenetskih skupin in podskupin pri bakteriji <i>E. coli</i>	22
2.2 PLAZMIDI BAKTERIJE <i>E. COLI</i>	23
2.2.1 Klasifikacija plazmidov in inkompatibilnostne skupine	25
2.2.1.1 Inkompatibilnostna skupina IncF	25
2.2.1.2 Inkompatibilnostna skupina IncP	27
2.2.2 Replikacija plazmidov	27
2.2.2.1 Replikacijska regija RepFIIA	30
2.2.2.2 Replikacijska regija RepFIB	31
2.2.2.3 Replikacijska regija IncP	32
3 MATERIALI IN METODE	34
3.1 MATERIALI	34
3.1.1 Bakterijski sevi	34
3.1.1.1 Zbirka BJ – zbirka komenzalnih sevov <i>E. coli</i>	34
3.1.1.2 Zbirka sevov TA – zbirka sevov <i>E. coli</i> , izoliranih iz infekcij kože in mehkih tkiv	34
3.1.1.3 Zbirka sevov DL – zbirka sevov <i>E. coli</i> , izoliranih iz urinarnih infekcij	35
3.1.2 Gojišča	35
3.1.2.1 Priprava tekočega gojišča Luria - Bertani (LB)	35
3.1.2.2 Priprava trdnega gojišča (LB) v petrijevkah	35
3.1.3 Kemikalije	35
3.1.4 Začetni oligonukleotidi	36

3.1.5	Pufri in reagenti	36
3.1.5.1	Ločevanje nukleinskih kislin z elektroforezo v agaroznem gelu	36
3.1.6	Oprema	37
3.1.7	Metode	37
3.1.7.1	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	37
3.1.7.1.1	Gojenje sevov	38
3.1.7.1.2	Priprava lizatov	38
3.1.7.1.3	Sestava reakcijske mešanice PCR za ugotavljanje prisotnosti zapisov	38
3.1.7.1.4	Začetni oligonukleotidi za PCR	39
3.1.7.1.5	Pogoji pomnoževanja s PCR	39
3.1.7.1.6	Elektroforeza DNA v agaroznem gelu	40
3.1.7.1.7	Statistične metode	40
4	REZULTATI	42
4.1	PREVALENCA REPLIKACIJSKIH REGIJ MED ZBIRKAMI SEVOV <i>E. COLI</i> BJ, TA IN DL	42
4.1.1	Prevalenca replikacijske regije RepFIIA v zbirkah sevov <i>E. coli</i> BJ, TA in DL	42
4.1.2	Prevalenca replikacijske regije RepFIB med zbirkami sevov <i>E. coli</i> BJ, TA in DL	43
4.1.3	Prevalenca replikacijske regije IncP med zbirkami sevov <i>E. coli</i> BJ, TA in DL	44
4.1.4	Prevalenca več kot ene replikacijske regije RepFIIA, RepFIB in IncP v sevu med zbirkami sevov <i>E. coli</i> BJ, TA in DL	45
4.2	STATISTIČNO ZNAČILNA POVEZANOST REPLIKACIJSKIH REGIJ Z ZBIRKAMI SEVOV <i>E. COLI</i> BJ, DL, TA.	45
4.3	STATISTIČNO ZNAČILNA POVEZANOST REPLIKACIJSKIH REGIJ REPFIIA, REPFIIB IN INCP Z DEJAVNIKI VIRULENCE, ODPORNOSTI PROTI ANTIBIOTIKI IN FILOGENETSKIMI SKUPINAMI	46
4.3.1	Statistično značilna povezanost replikacijske regije RepFIIA z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotiki in filogenetskimi skupinami	47
4.3.2	Statistično značilna povezanost replikacijske regije RepFIB z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotiki in filogenetskimi skupinami	48
4.3.3	Statistično značilna povezanost replikacijske regije IncP z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotiki in filogenetskimi skupinami	49
4.3.4	Statistično značilna povezanost hkrati prisotnih replikacijskih regij RepFIIA in RepFIB z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotiki in filogenetskimi skupinami	50
5	RAZPRAVA	52

5.1	PREVALENCA REPLIKACIJSKIH REGIJ REPFIIA, REPFIB IN INCP V ZBIRKAH SEVOV <i>E. COLI</i> BJ, DL IN TA.	52
5.2	PREVALENCA REPLIKACIJSKIH REGIJ REPFIIA, REPFIB IN INCP V POVEZAVI Z DEJAVNIKI VIRULENCE, ODPORNOSTJO PROTI ANTIBIOTIKOM IN FILOGENETSKIMI SKUPINAMI.	54
6	SKLEPI	60
7	POVZETEK	61
8	VIRI	63
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO SLIK

Slika 1	Filogenetsko drevo 20 sevov <i>E. coli</i> in <i>Shigella</i> glede na 1878 genov genoma <i>Escherichia</i> (Touchon in sod., 2009).	19
Slika 2	Podvajanje plazmida po mehanizmu kotalečega se kroga (Chaudhari, 2014).	28
Slika 3	Podvajanje plazmida po theta mehanizmu (Chaudhari, 2014).	29
Slika 4	Podvajanje plazmida po mehanizmu premestitve verig (Chaudhari, 2014).	29
Slika 5	Mapa replikona RepFIIA (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2006).	31
Slika 6	Mapa replikona RepFIB (Gibbs in sod., 1993).	31
Slika 7	Regija <i>oriV</i> plazmida RK2 (Adamczyk in Jagura-Burdzy, 2003).	33
Slika 8	Rezultati pomnožkov PCR replikacijske regije RepFIIA na lizatih iz zbirke sevov BJ <i>E. coli</i> .	42
Slika 9	Rezultati pomnožkov PCR replikacijske regije RepFIB na lizatih iz zbirke sevov TA bakterije <i>E. coli</i> .	43
Slika 10	Rezultati pomnožkov PCR replikacijske regije IncP na lizatih iz zbirke sevov TA <i>E. coli</i> .	44
Slika 11	Mapa plazmida pRK100 (Ambrožič in sod., 1998).	55
Slika 12	Mapa organizacije genov na plazmidu RK2 (Waters, 1999).	56

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1	Pregled kombinacij genskih označevalcev <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> in fragment DNA TspE4C2 glede na filogenetske podskupine (Carlos in sod., 2010).	23
Preglednica 2	Lastnosti tipičnih plazmidov (Chaudhari, 2014).	24
Preglednica 3	Seznam znanih inkompatibilnostnih skupin (Inc) pri bakterijah iz skupine <i>Enterobacteriaceae</i> (Johnson in Nolan, 2009).	26
Preglednica 4	Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri PCR, njihovo nukleotidno zaporedje in velikost DNA, ki nastane pri PCR (Osborn, 2006).	39
Preglednica 5	Kontingenčna tabela 2x2, ki se uporablja pri Fisherjevem natančnem testu (Osborn, 2006).	41
Preglednica 6	Prevalenca replikacijske regije RepFIIA sevov zbirke BJ, TA, DL.	42
Preglednica 7	Prevalenca replikacijske regije RepFIB sevov zbirke BJ, TA, DL.	43
Preglednica 8	Prevalenca replikacijske regije IncP sevov zbirke BJ, TA, DL.	44
Preglednica 9	Prevalenca sevov s prisotnostjo več kot ene replikacijske regije v sevu med zbirkami BJ, TA, DL.	45
Preglednica 10	Kontingenčna tabela 2x2 za izračun po Fisherjevem natančnem testu za izračun statističnega ovrednotenja RepFIIA pri zbirki BJ.	45
Preglednica 11	Statistično ovrednotenje rezultatov replikacijskih regij glede na zbirke sevov BJ, DL, TA.	46
Preglednica 12	Povezanost inkompatibilnostne skupine RepFIIA z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotikom in filogenetskimi skupinami v zbirkah BJ, DL in TA.	47
Preglednica 13	Povezanost inkompatibilnostne skupine RepFIB z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotikom in filogenetskimi skupinami v zbirkah BJ, DL in TA.	48
Preglednica 14	Povezanost inkompatibilnostne skupine IncP z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotikom in filogenetskimi skupinami pri zbirkah BJ, DL in TA.	49
Preglednica 15	Povezanost replikacijskih regij RepFIIA in RepFIB v enem sevu z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotikom in filogenetskimi skupinami pri zbirkah BJ, DL in TA.	50

Preglednica 16	Primerjava prevalence preučevanih plazmidnih replikacijskih regij med zbirkami različnih študij.	52
-----------------------	--	-----------

KAZALO PRILOG

- Priloga A** Pregled rezultatov sevov *E. coli* zbirke BJ in prevalenca replikacijskih regij *repFIIA*, *repFIB* in *incP* s PCR metodo.
- Priloga B** Pregled rezultatov sevov *E. coli* zbirke DL in prevalenca replikacijskih regij *repFIIA*, *repFIB* in *incP* s PCR metodo.
- Priloga C** Pregled rezultatov sevov *E. coli* zbirke TA in prevalenca replikacijskih regij *repFIIA*, *repFIB* in *incP* s PCR metodo.
- Priloga D** Podatki o sevih *E. coli* zbirke komenzalnih sevov, dobljeni v predhodnih raziskavah (Čitar, 2010).
- Priloga E** Podatki o sevih *E. coli* zbirke SSTI, dobljeni v predhodnih raziskavah (Čitar, 2010).
- Priloga F** Podatki o sevih *E. coli* zbirke UTI, dobljeni v predhodnih raziskavah (Čitar, 2010).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Amp	ampicilin
APEC	za ptice patogena <i>Escherichia coli</i> (ang. »avian pathogenic <i>E. coli</i> «)
Cip	ciprofloksacin
CNF	citotoksičen nekrotizirajoči faktor (ang. »cytotoxic necrotizing factor«)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. »deoxyribonucleic acid«)
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
EAEC	enteroagregativni sevi <i>E. coli</i> (ang. »enteroaggregative <i>E. coli</i> «)
EIEC	enteroinvazivni sevi <i>E. coli</i> (ang. »enteroinvasive <i>E. coli</i> «)
EHEC	enterohemoragični sevi <i>E. coli</i> (ang. »enterohemorrhagic <i>E. coli</i> «)
EPEC	enteropatogeni sevi <i>E. coli</i> (ang. »enteropathogenic <i>E. coli</i> «)
ETEC	enterotoksigeni sevi <i>E. coli</i> (ang. »enterotoxigenic <i>E. coli</i> «)
ExPEC	zunajčrevesni patogeni sevi <i>E. coli</i> (ang. »extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> «)
HU	Shemolitični uremični sindrom (ang. »hemolytic uremic syndrome«)
IBC	znotrajcelične biofilmom podobne združbe (ang. »intracellular bacterial community«)
IPEC	črevesni patogeni sevi <i>E. coli</i> (ang. »intestinal pathogenic <i>E. coli</i> «)
LB	tekoče gojišče Luria-Bertani
NMEC	sevi <i>E. coli</i> , ki povzročajo neonatalni meningitis (ang. »neonatal meningitis associated <i>E. coli</i> «)
PAI	otoki patogenosti (ang. »pathogenic islands«)
PAP	fimbrije tipa P (ang. »pyelonephritis-associated pili«)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. »polymerase chain reaction«)
QIR	utišani znotrajcelični rezervoarji (ang. »quiescent intracellular reservoirs«)
SEPEC	sevi <i>E. coli</i> , ki povzročajo sepso (ang. »sepsis associated <i>E. coli</i> «)
ssi	majhne palindromske sekvence (ang. »small palindromic sequences«)
SSTI	okužba kože in mehkih tkiv (ang. »skin and soft tissue infection«)
Tc	tetraciklin
UPEC	uropatogeni sevi (ang. »uropathogenic <i>E. coli</i> «)
UTI	okužba urinarne poti (ang. »urinary tract infection«)
USP	uropatogeni specifični protein (ang. »uropathogenic specific protein«)
Zbirka BJ	zbirka komezalnih sevov <i>E. coli</i> Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani
Zbirka DL	klinična zbirka patogenih sevov <i>E. coli</i> urinarnih okužb, izoliranih v

Komac S. Replikacijska regija RepFIIA, RepFIB in IncP plazmidov v izolatih bakterije *Escherichia coli*.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2015

	Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko okužb sečil na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani
Zbirka TA	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

1 UVOD

Na/V človeškem telesu najdemo mnogo mikroorganizmov, ki skupaj predstavljajo mikrobioto človeka. V zadnjem času vse bolj ugotavljajo velik pomen vpliva mikrobiote na zdravje gostitelja. Največji del človeške naravne mikrobiote predstavlja mikrobioto gastrointestinalnega trakta, mikroorganizmi pa se nahajajo tudi na koži, v respiratornem traktu, ustni votlini in urogenitalnem traktu.

Sluznica gastrointestinalnega trakta ima površino 300 m² (Kerckhoffs in sod., 2006).in jo lahko kolonizira tudi do 10¹⁰ do 10¹¹ bakterij na gram vsebine v primeru debelega črevesja in do 500 različnih vrst (Tenailon in sod., 2010). Sestava naravne mikrobiote gastrointestinalnega trakta je odvisna od pH, peristaltike črevesa, oksido-redukcijskega potenciala tkiva, bakterijske adhezije, bakterijske komunikacije, sekrecije mucina, ki vsebuje imunoglobuline (Ig), dostopnosti hranil, oziroma prehrane in bakterijskega antagonizma (Kerckhoffs in sod., 2006).

Escherichia coli (*E. coli*) je ena od mnogih bakterijskih vrst, ki jih najdemo kot komenzale prebavil ljudi in živali s stalno telesno temperaturo. Za človeka je pomembna, saj sintetizira vitamin K in sodeluje pri metabolizmu ter prevzemanju vitaminov B-kompleksa, poleg teh funkcij nudi tudi zaščito črevesja pred ostalimi patogeni. Čeprav je *E. coli* za človeka nepatogena vrsta, lahko v določenih pogojih povzroči obolenja. Patogenost je odvisna od dejavnikov virulence, ki so lahko zapisani na kromosomu in/ali na plazmidih. Plazmidi so izvenkromosomski elementi DNA, ki imajo od kromosoma neodvisno samostojno pomnoževanje, svojevrstno evolucijo in pogosto tudi možnost prenosa med sevi, včasih tudi med bakterijskimi vrstami in celo rodovi.

1.1 NAMEN DELA

V raziskavi smo se osredotočili na pogostost pojavljanja zapisov plazmidnih replikacijskih regij RepFIIA, RepFIB in IncP med zbirkami komenzalnih sevov *E. coli* (zbirka BJ), zbirko sevov *E. coli* izolirano iz urinarnih okužb (zbirka DL) in zbirko sevov izolirano iz okužb kože in mehkih tkiv (zbirka TA). Zbirka BJ vsebuje 90 komenzalnih sevov *E. coli*, izoliranih iz blata zdravih ljudi, različnih starosti in spola, ki niso prejeli nobenih antimikrobnih zdravil za terapevtske oziroma zdravstvene namene. Sevi *E. coli* zbirke TA povzročajo okužbe kože in mehkih tkiv in so bili izolirani iz okužb mehkega tkiva in kože bolnikov. Zbirka sevov TA vsebuje 102 sevov, ki so jih izolirali v Laboratoriju za diagnostiko aerobnih in anaerobnih bakterijskih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Sevi DL so bili izolirani iz urina bolnikov, ki so imeli urinarno infekcijo. Zbirka vsebuje 110 sevov DL, izoliranih na

Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani v Laboratoriju za diagnostiko okužb sečil.

Iskali smo tudi povezave replikacijskih regij RepFIIA, RepFIB in IncP z virulentnimi dejavniki, filogenetskimi skupinami in antibiotičnimi rezistencami predhodnih raziskav. Določeni dejavniki virulence, antibiotiki imajo zapise na plazmidih, zato pri teh pričakujemo večje število zapisov med replikacijskimi regijami plazmidov.

Cilj naloge:

- Ugotoviti prevalenco plazmidnih replikacijskih regij RepFIIA, RepFIB in IncP med sevi zbirk BJ, TA in DL.
- Primerjati prevalenco replikacijskih regij z dejavniki virulence *papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *hlyA*, *cnfI*, *usp*, *iucD*, *tcpC*, *traJ*.
- Primerjati prevalenco replikacijskih regij s filogenetskimi skupinami.
- Primerjati prevalenco replikacijskih skupin z odpornostjo proti antibiotikom ampicilin, tetraciklin in ciprofloksacin.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *E. COLI*

Bakterija *E. coli* je uvrščena med gama-proteobakterije v red *Enterobacteriales*, družino *Enterobacteriaceae* in rod *Escherichia*.

E. coli je eden najboljše okarakteriziranih modelnih organizmov. Referenčni sev *E. coli* K-12 in njegovi derivati so ključni za napredek v genetiki, molekularni biologiji, fiziologiji in biokemiji. V naravi ocenjujejo velikost populacije *E. coli* na okoli 10^{20} . *E. coli* ima zanimive lastnosti, saj je razširjen črevesni komenzal ljudi in živali s stalno telesno temperaturo, kot tudi vsestranski patogen, ki vsako leto ubije več kot 2 milijona ljudi po svetu. Kot takšna je idealni kandidat za študije prehoda med komenzalizmom in patogenostjo (Tenaillon in sod., 2010).

Bakterije roda *Escherichia* so paličaste oblike, povprečne velikosti okoli $1,1\text{--}1,5\ \mu\text{m} \times 2,0\text{--}6,0\ \mu\text{m}$ s po Gramu negativno celično steno (Scheut in Strockbine, 2005). So peritriho običkane in gibljive, nesorulirajoče, oksidaza negativne in katalaza pozitivne in imajo zelo preproste prehranjevalne zahteve. So anaerobno fakultativne, sposobne mešano-kislinske fermentacije glukoze in drugih ogljikovih hidratov. Rastejo tako v anaerobnih kot tudi v aerobnih pogojih, kjer za pridobivanje energije uporabljajo različna hranila kot substrat. Večina *E. coli* je sposobna rasti v zelo širokem temperaturnem spektru približno od 15 do 48 °C, ampak najhitrejša rast je pri od 37 do 42 °C (Welch, 2006).

E. coli pogosto naseljuje gastrointestinalni trakt ljudi in živali. Je črevesni komenzal, poznamo pa tudi patogene seve. Patogene seve delimo glede na mesto infekcije v dve skupini: v črevesne (IPEC) in zunajčrevesne patogene (ExPEC). Kot posledico kontaminacije s fekalijami *E. coli* najdemo kot prostoživečo tudi v različnih vodnih virih in v prsti (Kaper in sod., 2004; Tenaillon in sod., 2010; Croxen in Finlay, 2010).

Nenevarne *E. coli* pridobijo gene virulence, kar jim nudi večjo možnost adaptacije na nove niše in lahko povzročajo širok spekter bolezni. Razlikujemo tri glavne tipe infekcij, ki jih povzročajo patogeni sevi *E. coli*:

- črevesne infekcije,
- infekcije urinarnega trakta,
- sepe in meningitise (Kaper in sod., 2004).

Na podlagi nabora dejavnikov virulence, patogene seve delimo v številne skupine imenovane patotipi. V skupino *E. coli*, ki povzročajo driske in poškodbe črevesja (IPEC) spadajo:

- enterotoksigeni sevi *E. coli* (ETEC), ki so povezani z driskami na potovanjih in driskami prašičev in goveda,
- enteropatogeni sevi *E. coli* (EPEC), ki povzročajo driske pri otrocih in živalih,
- enterohemoragični sevi *E. coli* (EHEC), ki so povezani s hemoragičnimi kolitisi in hemolitičnimi uremičnimi sindromi pri ljudeh,
- enteroagregativni sevi *E. coli* (EAEC), ki so povezani s kroničnimi driskami pri ljudeh,
- enteroinvazivni sevi *E. coli* (EIEC), ki so povzročitelji invazivnih črevesnih okužb z vodenimi driskami in dizenterijami pri ljudeh in živalih (Kaper in sod., 2004).

V skupino zunajčrevesnih patogenih sevov *E. coli* (ExPEC) spadajo različne skupine, najbolj znane skupine patotipov so: sevi *E. coli*, ki povzročajo infekcije urinarnega trakta ljudi, psov in mačk (UPEC), sevi *E. coli*, ki povzročajo neonatalni meningitis (NMEC) in sevi *E. coli*, ki povzročajo sepse (SEPEC) (Kaper in sod., 2004).

2.1.1 Komenzalni sevi *E. coli*

E. coli najdemo v mikrobioti prebavil, ki pa jo sestavlja več kot 500 vrst bakterij in vsebuje od 10^{10} do 10^{11} bakterijskih celic na gram vsebine debelega črevesja. Gostitelji *E. coli* se razlikujejo v velikosti, morfologiji črevesja, načinu prehranjevanja, hitrosti prebave in mikrobioti. Te karakteristike posameznega gostitelja vplivajo na razširjenost in gostoto *E. coli*, ki se lahko spreminja preko 6 redov velikosti pri določeni vrsti gostitelja. Pri ljudeh najdemo *E. coli* pri več kot pri 90 %, pri sesalcih 56 %, 23 % razširjenost je pri pticah in 10 % pri plazilcih. Pri ljudeh število bakterij *E. coli* v iztrebkih variira, od 10^7 do 10^9 bakterij na gram iztrebka. Pri domačih živalih je število bakterij na gram iztrebka precej nižje, v povprečju je med 10^4 in 10^6 bakterij *E. coli* na gram iztrebka (Tenaillon in sod., 2010).

V prebavnem traktu komenzalne seve *E. coli* najdemo v debelem črevesju, posebej v slepem črevesu in v kolonu. Prebivajo v sluzi, ki prekriva epitelijske celice, v prebavni lumen se izločajo z razgrajenimi komponentami sluznice in se izločajo v iztrebek (Tenaillon in sod., 2010).

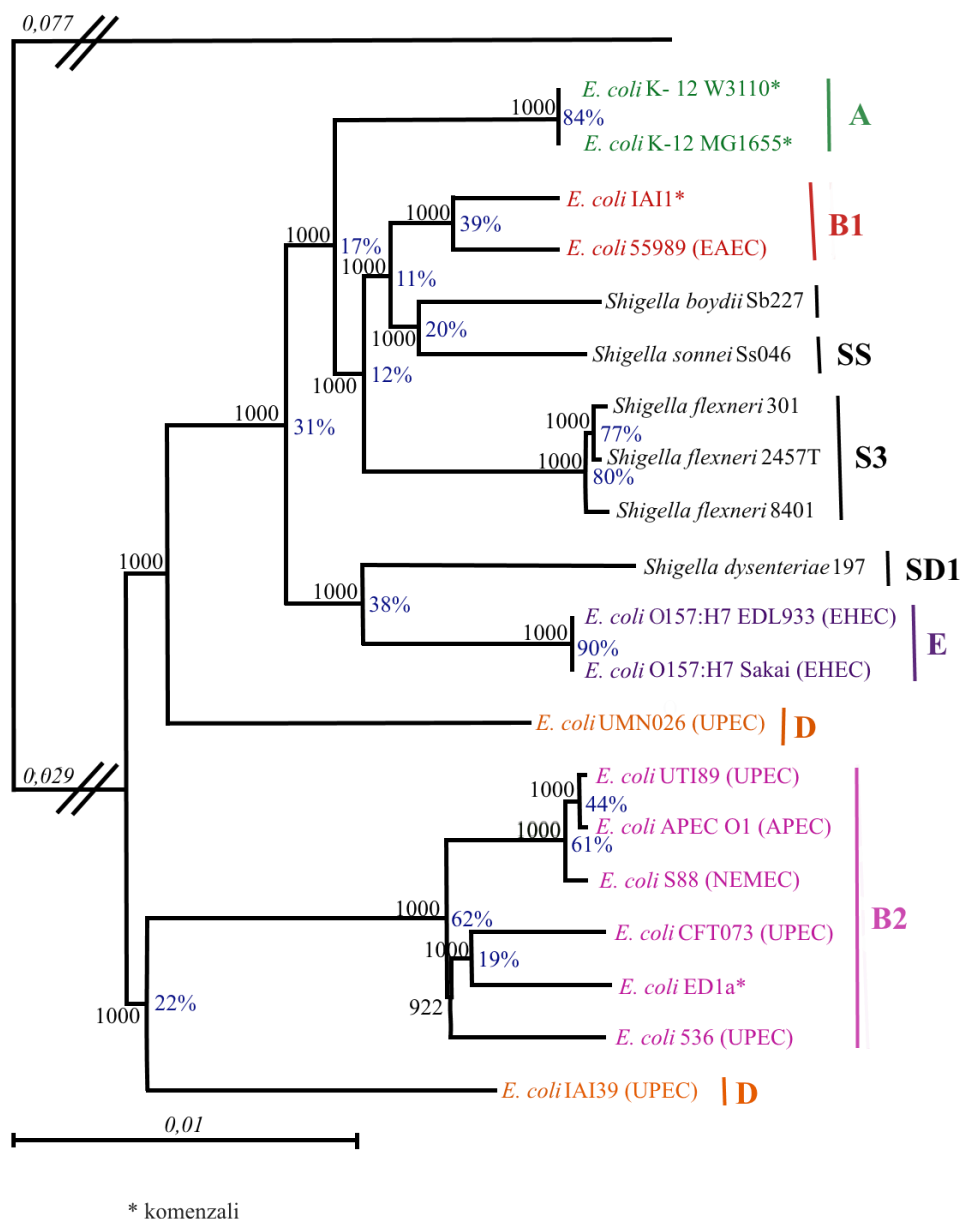
E. coli je ena izmed prvih bakterijskih vrst, ki naseljujejo črevesje takoj po rojstvu, kjer doseže zelo visoko gostoto (višjo kot 10^9 bakterij na gram iztrebka), še pred razširitvijo anaerobnih vrst. Po 2. letu starosti gostota pade in se ustali pri 10^8 bakterij na gram iztrebka, dokler se v starosti postopoma ne zmanjšuje. Začetni sevi *E. coli*, ki naseljujejo

prebavila dojenčka izvirajo iz materine naravne mikrobiote, lahko tudi osebja, ki skrbi za dojenčka. Vendar je visoka higiena v bolnišnicah in gospodinjstvih zmanjšala zgodnjo kolonizacijo z *E. coli* (Tenaillon in sod., 2010).

Odnos med *E. coli* in gostiteljem je posledica interakcije med njima in se izraža tako, da imata eden ali oba organizma korist, pri čem nobeden od njiju ni oškodovan (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2015). Sevi *E. coli* od gostitelja dobijo hranila in varno okolje, zaščito pred stresom, transport in razširjanje. *E. coli* koristi gostitelju z zaščito pred kolonizacijo patogenih mikroorganizmov s pomočjo bakterocinov in drugih mehanizmov (Tenaillon in sod., 2010).

Pri komenzalnih sevih opazimo pomanjkanje specifičnih dejavnikov virulence patogenih sevov *E. coli*, čeprav komenzalni sevi lahko v določenih pogojih povzročajo zunaj črevesne okužbe (npr. urinarni kateter, osebe z oslabljenim imunskim sistemom, osebe z lokalnimi anatomskimi deformacijami, kontaminacija peritonealne votline z iztrebkom) (Russo in Johnson, 2009).

Sevi ExPEC so filogenetsko in epidemiološko oddaljeni od sevov komenzalnih in črevesnih patogenov *E. coli* (Slika 1) ter imajo zmožnost kolonizacije prebavila. Pri asimptomatski naselitvi prebavnega sistema torej sodelujejo tako komenzalni sevi *E. coli* kot tudi sevi ExPEC (Russo in Johnson, 2009).



Slika1: Filogenetsko drevo 20 sevov *E. coli* in *Shigella* glede na 1878 genov genoma *Escherichia*. Za koreninjenje drevesa so izbrali najbolj oddaljeno skupino *E. fergusonii*. Črno so označene številke ponovljivosti vozlišča pri 1000 ponovitvah z metodo vezanja. Modro označeni odstotki so končni rezultat ta ponazarja odstotek genov, kar določa dolžino veje, ki ločuje *E. fergusonii* od sevov *E. coli* in niso po skali. Števila nad vejami predstavljajo dolžino. Daljica prikazuje 0,01 spremembo na mestu nukleotida (Touchon in sod., 2009).

2.1.2 Sevi ExPEC

Sevi ExPEC imajo sposobnost kolonizacije zunajčrevesnih gostiteljskih niš, najdemo jih v krvi, osrednjem živčevju, urinarnem traktu, peritonealni votlini in pljučih. Tako genetsko kot v kliničnih znakih, ki jih povzročijo, se precej razlikujejo od IPEC in komenzalnih *E. coli*. Nedavno so predlagali skupno poimenovanje ExPEC sevov namesto ločitev na seve UPEC, SEPEC in NMEC. Določeno število sevov ExPEC je sposobno tudi povzročati infekcije kirurških ran, osteomielitis, miositis, ampak taki primeri so redki. Najdemo jih kot komenzale v prebavilih, ampak ne povzročajo gastroenteritisov (Russo in Johnson, 2009).

Genom patogenih *E. coli* je zelo raznolik in je lahko zaradi pridobitve ali izgube otokov patogenosti (PAI) in drugih genetskih materialov tudi do 1 Mb večji kot genom komenzalnih sevov. Osnovni genom *E. coli* naj bi tako vseboval približno 2.200 genov, a v različnih sevih *E. coli* so že odkrili vsega skupaj 13.000 genov. Genom patogenih sevov *E. coli* naj bi imel približno 5.000 genov. Pridobitev ali izguba otokov patogenosti tako omogoča znatno genetsko diverziteto in plastičnost pri patogenih sevih *E. coli*. Primer je sev CFT073 (patotip UPEC), ki vsebuje 13 genomskih otokov, kar predstavlja 13 % vsega genoma (Croxen in Finlay, 2010).

V skupino ExPEC spadajo sevi UPEC, ki povzročajo okužbe urinarnih poti (UTI). UTI se pojavi največkrat pri osebah s telesnimi anomalijami in anatomskimi spremembami urinarnega trakta, inficirajo se lahko tudi zdrave osebe (Petrovska, 2002).

Okužbe so pogostejše pri ženskah (zlasti od 10. leta starosti ter med 20. in 40. letom). Vzrok so anatomske razlike med ženskami in moškimi sečili. Kratka ženska sečnica se navzven odpira v vlažno, za bakterijsko rast ugodno območje vulve, medtem ko se moška sečnica odpira v razmeroma suh predel sluznice in kože. Pomembna je tudi znatno manjša razdalja med anusom in sečnico pri ženskah, zaradi česar je pri njih prenos črevesnih bakterij v sečila pogostejši (Petrovska, 2002).

Okužbe navadno najprej zajamejo spodnja sečila (sečnico, mehur), lahko pa se širijo tudi v zgornja sečila (sečevod, ledvice). Cistitis je okužba mehurja, ki jo spremljajo značilni klinični znaki (pekoče in pogosto siljenje na vodo). Pielonefritis pomeni okužbo zgornjih sečil. Bolnik ima vročino in bolečino v ledvenem predelu (Petrovska, 2002).

Dovzetnost za okužbe sečil določajo številni dejavniki. Večja je pri otrocih, ki imajo anatomske ali fiziološke motnje, ki ovirajo normalno pretakanje seča. Nekatere ženske imajo v sluznici močno povečano koncentracijo receptorjev, na katere se pritrjujejo

patogene bakterije. Spolna aktivnost in uporaba spermicidov, zlasti pri mladih ženskah, povečata nevarnost okužbe sečil. Izjemno pa nevarnost okužbe poveča uporaba urinskih katetrov. Tudi ob optimalni izvedbi kateterizacije in ustrezni higieni je bakterijska kolonizacija mehurja 50 % po 4-5 dneh, 75 % po 7-9 dneh in 100 % po 2 tednih od uvedbe (Petrovska, 2002).

UPEC naj bi bila odgovorna za približno 80 % vseh UTI. Največji izziv za seve UPEC je prehod iz prebavnega trakta v urinarni. UPEC so razvile posebne mehanizme prevzema peptidov in aminokislin kot glavni vir hranil za rast, zaradi omejitev hranil v urinarnem traktu. Kar nekaj dejavnikov virulence sodeluje pri patogenezi v sečilih (fimbrije, toksini, sistemi za privzem železa, polisaharidna kapsula) (Croxen in Finlay, 2010).

Zdrava sečila so bakteriološko sterilna, izjema je iztočni del sečnice, ki ga normalno naseljujejo različne komenzalne bakterije. Okužba sečil se običajno začne zaradi bakterij iz prebavil in vagine, ki se naseljujejo v sečnico. Ascendentno širjenje bakterij v mehur in ledvice preprečuje normalen tok, pretok in iztok seča, zlasti pa normalno delovanje sečnih zaklopk. Bakterije, ki pridejo v mehur, se ob popolnem praznjenju mehurja izperejo. Ostanjejo le tiste, ki so se zmožne dovolj trdno pritrčiti na sluznico – take bakterije tudi izzovejo vnetje sluznice, klinične znake in simptome (Petrovska, 2002).

Uropatogeni sevi sprva kolonizirajo debelo črevo gostitelja, od koder s pomočjo iztrebka pride do kontaminacije sečnega mehurja. Po 4 do 24 urah pride do tvorbe fimbrij tipa 1, ki imajo poglavitno vlogo v začetni fazi razvoja bolezni, saj omogočajo naselitev spodnjega predela urinarnega trakta. P-fimbrije se izražajo kasneje ter omogočajo adhezijo in kolonizacijo zgornjih predelov urinarnih poti in posledično nastanek pielonefritisov in kasneje tudi urosepso. Pritrditev bakterije s fimbrijami omogoča tesno in specifično povezavo bakterije s celicami urinarne poti, ki je zato normalen tok urina ne more odluščiti in odstraniti (Kaper in sod., 2004). Po uspešni pritrditvi sevi, ki so invazivni vstopijo v epiteljske celice sečnega mehurja, kjer se uspešno razmnožujejo in tvorijo znotrajcelične bakterijske združbe (IBC). IBC ima vlogo zaščite bakterijskih celic UPEC pred vplivi gostiteljskih celic. Gibljivi sevi UPEC imajo zmožnost zapustitve IBC-jev in okužbe ostalih urotelijskih celic. Telo se pred inficiranimi celicami brani z luščenjem in pri tem zmanjša število bakterijskih celic prisotnih v sečilih, vendar prav tako odkriva nižje sloje nezrelih epiteljskih celic, ki so bolj dovzetni za okužbe (Croxen in Finlay, 2010). V spodnjih in zgornjih slojih epitelnih celic se lahko tvorijo utišani znotrajcelični rezervoarji (QIR), ti služijo kot oblika mirovanja in so eden pogostih vzrokov za ponavljajoče okužbe, saj lahko v tej obliki bakterijska celica preživi tudi do enega leta (Jorgensen in Seed, 2012).

Bakterije UPEC lahko povzročajo tudi bakteremijo, saj pogosto sintetizirajo toksin hemolizin. Hemolizin poškoduje ledvični epitelij in omogoči bakterijam prosto pot do krvnega ožilja, kjer povzročajo bakteremijo (Kaper in sod., 2004).

NMEC so pogosto prebivalci prebavnega trakta in je najpogostejša po Gramu negativna bakterija, ki povzroča meningitise pri novorojenčkih (Croxen in Finlay, 2010). Umrljivost je od 15 do 40 %, pri preživelih dojenčkih pa opazimo resne nevrološke spremembe. Sevi NMEC se prenašajo po krvi. Pojav meningitisa je odvisen do količine bakterij v krvi. Pri bakteremiji z več kot 10^3 bakterij na mililiter krvi bo prej prišlo do razvoja meningitisa, kot pri osebah z nižjim koncentracijam bakterij v krvi (Kaper in sod., 2004). Kot zaščito pred imunskim odgovorom gostitelja imajo ti sevi *E. coli* antifagocitične kapsule. NMEC prav tako interagirajo z imunskimi celicami, makrofagi in monociti ter preprečujejo apoptozo in sproščanje kemokinov. V makrofagih in monocitih se celice NMEC delijo in nato potujejo v krvni obtok (Croxen in Finlay, 2010).

Bariera kri-možgani je čvrsta bariera iz možganskih mikrovaskularnih endotelijskih celic skozi katero poteka vdor preko aktivnosti proteinov Ibe, FimH, OmpA in citonekrotizirajočega faktorja 1 (CNF1). Receptorji proteinov Ibe so neznani, medtem ko je receptor za CNF1 67 kDa velik laminski receptor. CNF1 je toksin, ki deaminira proteine družine Rho GTPaz in sodeluje pri reorganizaciji miozina. Pri vdoru NMEC sodeluje tudi kapsula K1 (prisotna pri 80 % sevov NMEC), ki ima vlogo v preprečevanju lizosomske fuzije, kar omogoča prost prehod živih bakterij v centralni živčni sistem (Croxen in Finlay, 2010).

Sevi SSTI bakterije *E. coli* so patogeni kože in mehkih tkiv. Infekcije kože in mehkih tkiv se lahko same omejijo ali pa jih zdravimo z antibiotiki. Včasih, pri bolj resnih okužbah, je potrebna hospitalizacija in parenteralne terapije. Čeprav te okužbe v večini povzroča *Staphylococcus aureus* in aerobni streptokoki, so pomembni patogeni tudi sevi *E. coli*. Sevi SSTI *E. coli* povzročajo vnetje popka pri novorojenčkih, celulitise, nekrotizirajoče fasciitise, infekcije kirurških ran, infekcije ran opeklin in druge infekcije. Patogenost sevov SSTI naj bi bila povezana s CNF1 (gen *cnf1*), ki je poznan po tem, da preprečuje celjenje ran črevesnega epitelija in hemolizinom (gen *hlyA*) (Petkovšek in sod., 2009).

2.1.3 Hitro določanje filogenetskih skupin in podskupin pri bakteriji *E. coli*

Seve *E. coli* lahko, na podlagi kombinacije treh genskih označevalcev *chuA*, *yjaA* in fragment DNA TspE4C2, uvrstimo v eno od glavnih štirih filogenetskih skupinah A, B1, B2 in D, ki pa so lahko razdeljene še naprej v podskupine A₀, A₁, B1, B2₂, B2₃, D₁ in D₂, (Preglednica 1) (Carlos in sod., 2010).

Preglednica 1: Pregled kombinacij genskih označevalcev *chuA*, *yjaA* in fragment DNA TspE4C2 glede na filogenetske podskupine (Carlos in sod., 2010).

Filogenetska podskupina pri <i>E. coli</i>	Genski označevalec		
	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	DNA fragment TspE4C2
A ₀	-	-	-
A ₁	-	+	-
B1	-	-	+
B2 ₂	+	+	-
B2 ₃	+	+	+
D1	+	-	-
D2	+	-	+

Takšna metoda se uporablja za hitro določitev filogenetske skupine *E. coli*. Tradicionalno uvrščanje *E. coli* v filogenetske skupine temelji na fenotipu, serotipu, biotipu, vsebnosti fagov in antibiotikov. Molekularne tehnike, ki se uporabljajo za uvrstitev *E. coli* v filogenetske skupine zavzemajo sekveniranje ali hibridizacijo celotnega genoma oziroma čim več genov v genomu (Slika 1) (Touchon in sod., 2014).

Filogenetske skupine se razlikujejo po ekoloških nišah, življenjski zgodovini, izkoriščanju različnih prehranskih virov, antibiotičnih rezistentnih profilov. Večina sevov prostoživeče *E. coli* v okolju pripada filogenetski skupini B1. Filogenetske skupine se razlikujejo tudi v velikosti genoma, A1 in B1 imata krajši genom, medtem ko skupini B2 in D daljšega. Filogenetske skupine B2 in D vsebujeta več dejavnikov virulence kot sevi, ki spadajo v skupino A in B1 (Carlos in sod., 2010).

Sevi ExPEC pripadajo filogenetskim skupinam B2 in D, komenzalni sevi skupinam A in B1, sevi IPEC pa se največkrat uvrstijo med filogenetske skupine A, B1, D in E. Nekatere študije so se lotile tudi preučevanja distribucije filogenetskih skupin sevov *E. coli* izoliranih iz blata ljudi in živali. Številčnost in porazdelitev filogenetskih skupin *E. coli* med sesalci je odvisna glede na prehranjevalne navade gostitelja, teže gostitelja in klimatskih razmer (Carlos in sod., 2010).

2.2 PLAZMIDI BAKTERIJE *E. COLI*

Bakterijski plazmidi so zunajkromosomski elementi DNA, ki se avtonomno podvajajo. Pogosto so ključni za spremembo mikrobne populacije, saj ti elementi spodbujajo razširjanje lastnosti (Preglednica 2), kot so virulenca, izboljšana rast, odpornost proti antibiotikom in metaboliziranje redkih hranil (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011).

Preglednica 2: Lastnosti tipičnih plazmidov (Chaudhari, 2014).

Tip plazmida	Funkcija genov	Primer
Plazmidi rezistence	Odpornost proti antibiotikom in toksinom.	Rbk pri <i>E. coli</i> in drugih bakterijah. Rbk je plazmid R.
Konjugativni plazmidi	Omogočajo konjugacijo in medcelični prenos plazmida v drugo celico.	F plazmid pri <i>E. coli</i> .
Ubijalski plazmidi	Imajo gene za toksine potrebne za propad drugih bakterij.	Plazmidi Col pri <i>E. coli</i> , ki imajo zapise za kolicine.
Razgrajevalni plazmidi	Encimi za metabolizem nenavadnih molekul.	TOL pri <i>Pseudomonas putida</i> pri metabolizmu toulena.
Plazmidi virulence	Omogočajo patogenost bakterij.	Plazmid Ti pri <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ta povzroči kronske šiške ali tumorji pri dvokaličnicah.

Plazmide so prvič identificirali pri družini *Enterobacteriaceae*, kasneje so jih našli v vseh rodovih in kraljestvih. Bolj pogosto se pojavljajo pri arhejah in bakterijah, kjer predstavljajo tudi do 25 % skupnega genetskega materiala (Starčič Erjavec, 2003).

Plazmidi imajo zapise, ki gostiteljem omogočajo preživetje in prilagajanje v neugodnih življenjskih razmerah ali nudijo določeno selekcijsko prednost v mikrobnii združbi. Poleg teh zapisov se nahajajo na plazmidih tudi geni za mehanizme, ki omogočajo plazmidu ohranjanje v celici in uspešno širjenje (Johnson in Nolan, 2009; Starčič Erjavec, 2003; Chaudahari, 2014).

Plazmide običajno sestavlja krožna dvovertižna DNA. Bakterijski vrsti *Streptomyces* in *Borrelia* vsebujejo linearne plazmide. Nekateri glivi vsebujejo tudi RNA-plazmide, ki pa jih niso našli pri bakterijah. Dolžina plazmidov zelo variira: od nekaj kilobaz (kb) do tudi več megabaznih (Mb) parov (Starčič Erjavec, 2003).

Glede na genetsko sestavo poznamo dva tipa plazmidov, nekonjugativne in konjugativne. Nekonjugativni plazmidi vsebujejo gene za replikacijo, ne pa tudi za prenos DNA v recipientsko celico ob neposrednem stiku, t. i. konjugacijo. Konjugativni plazmidi pa so tisti plazmidi, ki imajo tudi zapise za prenos DNA v recipientsko celico (Starčič Erjavec, 2003).

Ker na plazmidih torej niso zapisane lastnosti, ki bi jih bakterijska gostiteljska celica potrebovala za svojo rast in razvoj, izguba plazmidov v večini primerov za celico ne povzroči letalnih posledic (Johnson in Nolan, 2009).

2.2.1 Klasifikacija plazmidov in inkompatibilnostne skupine

Današnja delitev plazmidov temelji na inkompatibilnostnih skupinah. Inkompatibilnost (Inc) dveh plazmidov ugotavljajo na podlagi zmožnosti koeksistence obeh plazmidov v isti gostiteljski celici. Ugotovili so namreč, da se v primeru plazmidov z enakim replikacijskim mehanizmom, eden od plazmidov izgubi (Johnson in Nolan, 2009).

Zaenkrat ločimo 26 inkompatibilnostnih skupin (Preglednica 3), a le nekaj od teh je povezanih z virulenco *E. coli*. Plazmidi povezani z virulenco večinoma pripadajo inkompatibilnostni skupini IncF. Klasifikacija plazmidov v skupine Inc je zelo zaželeno, saj določene skupine Inc združujejo plazmide povezane z virulenco in/ali mikrobo rezistenco (Johnson in sod., 2007).

Pred kratkim so predlagali nov način plazmidnega tipiziranja, ki bi temeljil na iniciatorskih proteinih plazmidne konjugacije, s čimer bi združili širšo skupino plazmidov, tudi tistih s sekrecijskim sistemom IV in mobilizacijskimi regijami, vendar tehnika še ni v široki uporabi, čeprav dosti obljublja v prihodnosti (Johnson in Nolan, 2009).

2.2.1.1 Inkompatibilnostna skupina IncF

Plazmid F *E. coli* je dolgo služil kot model bakterijske konjugacije. Uvrščen je v inkompatibilnostno skupino IncF in na podlagi replikacijskih regij, v podskupine od IncFI do IncFVII. Plazmidi IncF so plazmidi z nizkim številom kopij v celici, ki pogosto vsebujejo več kot eno replikacijsko regijo (Carattoli, 2009).

Plazmidi IncF, ki imajo gene za odpornost proti antibiotikom *bla*_{CTX-M-15}, niso homogena skupina plazmidov, zelo se ločijo tudi po velikosti. Imajo lahko replikon RepFII, ki je prisoten sam ali v kombinaciji z drugimi replikoni, pogosto RepFIA in/ali RepFIB. Replikoni RepFII imajo različna zaporedja protiprepisne RNA, ki uravnava podvajanje plazmida. Glede na raziskave so zaključili, da plazmidi evoluirajo s pomočjo spremembe zaporedja v replikonu, mozaicizmom in resolucijskim procesom s kointegracijo replikona (Carattoli, 2009).

Komac S. Replikacijska regija RepFIIA, RepFIB in IncP plazmidov v izolatih bakterije *Escherichia coli*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2015

Preglednica 3: Seznam znanih inkompatibilnostnih skupin (Inc) pri bakterijah iz skupine *Enterobacteriaceae* (Johnson in Nolan, 2009).

skupina Inc	Značilnosti								Primer iz podatkovne baze NCBI	Velikost (kbp) ^a	Izvor ali GenBank številka
	Veliki plazmidi	Širok spekter gostiteljev	Zapis genov za konjugacijo	Zapis genov za MDR	Zapis genov za DV	Zapis genov za metabolne poti	Povezanost s fagi	Samoprenosljivi in integrirajoči elementi			
com9	-	-	+	+	-	-	-	-	pIP71A	86	Sanger Institute
IncA/C	-	+	+	+	-	-	-	-	pSN254	176	CP000604
IncB/O	-	-	+	+	+	-	-	-	pTP113	96	Sanger Institute
IncD	-	-	-	-	-	-	+	-	Noben		
IncFIA	-	-	+	+	+	-	-	-	Plasmid F	99	AP001918
IncFIB	-	-	+	+	+	-	-	-	pO157	92	AF074613
IncFIC	-	-	+	+	+	-	-	-	Plasmid F	99	AP001918
IncFIIA	-	-	+	+	+	-	-	-	pR100	94	AP000342
IncFIV	-	-	+	+	+	-	-	-	pSU316	~77	P36REPA
IncFV	-	-	+	+	+	-	-	-	pED208	~90	AF411480
IncFVI	-	-	+	+	+	-	-	-	pSU212	ND	X55895
IncFVII	-	-	+	+	+	-	-	-	pSU221	ND	P2SINC
IncHI1	-	-	+	+	-	-	-	-	pR27	181	AF250878
IncHI2	-	-	+	+	-	-	-	-	pR478	275	BX664015
IncHI3	-	-	+	+	-	-	-	-	Mip233	ND	AF192489
IncHII	-	-	+	+	-	-	-	-	pHH1508a	ND	ECOTEHAB
IncI1	-	-	+	+	-	-	-	-	pR64	121	AP005147
IncI2	-	-	+	+	-	-	-	-	R721	76	AP002527
IncJ	-	-	+	-	-	-	-	+	ICE R391	89	AY090559
IncK	-	-	+	+	-	-	-	-	pR387	88	Sanger Institute
IncL/M	-	-	+	+	-	-	-	-	pCTX-M3	89	AF550415
IncN	-	+	+	+	-	-	-	-	R46	51	AY046276
IncP-α	-	+	+	+	-	-	-	-	RP4	60	L27758
IncP-β	-	+	+	+	-	-	-	-	pB4	79	AJ431260
IncP-γ	-	+	+	+	-	-	-	-	pQKH54	70	AM157767
IncP-δ	-	+	+	+	-	-	-	-	pEST4011	77	AY540995
IncP6 (IncG)	-	+	+	+	-	-	-	-	Rms149	57	AJ877225
IncP7	-	+	+	+	-	-	-	-	pCAR1	199	AB088420
IncP9	-	+	+	+	-	-	-	-	pWWO	ND	WWODIRRPTA
IncQ1	-	+	-	+	-	-	-	-	RSF1010	9	RSFRMRA
IncQ2	-	+	-	+	-	-	-	-	pTC-F14	14	AF325537
IncR	-	-	+	+	-	-	-	-	pK245	98	DQ449578
IncT	+	-	+	+	-	-	-	-	pRts1	217	AP004237
IncU	-	-	+	+	-	-	-	-	pFBAOT6	84	CR376602
IncV	-	-	+	+	-	-	-	-	Nobeden		
IncW	-	+	+	+	-	-	-	-	pR7K	40	AM901564
IncX1	-	-	+	+	-	-	-	-	pOLA52	52	EU370913
IncX2	-	-	+	+	-	-	-	-	pR6K	40	Sanger Institute
IncY	-	-	-	-	-	-	-	+	P1	94	AF234173

ND - ni določeno, MDR – multiple determinante rezistence, DV – dejavniki virulence, - - negativno, + pozitivno

2.2.1.2 Inkompatibilnostna skupina IncP

Družina *Enterobacteriaceae* in rod *Pseudomonas* vsebujeta plazmide več kot 30 skupin Inc. Plazmidi štirih skupin Inc (IncP, W, N in Q) se lahko prenašajo in obstanejo med pripadniki družine *Enterobacteriaceae* in rodom *Pseudomonas*. Skupina IncP plazmidov je široko razširjena med po Gramu negativnimi bakterijami, kot so *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella aerogenes* in *Sphingomonas* (Popowska in Krawczyk-Balska, 2013).

Plazmidi podskupine IncP-1 so zanimivi tako molekularnim biologom, kot tudi ekologom, zaradi visoke zmožnosti konjugacijskega prenosa in sposobnosti replikacije v mnogo gostiteljih. Ti plazmidi izkazujejo veliko raznolikost, filogenetske študije so namreč pokazale prisotnost 45 temeljnih genov pri plazmidih IncP-1, ampak samo 33 genov je skupnih vsem sekveniranim plazmidom te skupine (Popowska in Krawczyk-Balska, 2013).

Natančna filogenetska analiza in študija aminokislinskega zaporedja proteina TrfA (začetnika replikacije plazmida) razdeli skupino IncP-1 v šest klasifikacijskih podskupin: - α , - β , - γ , - δ , - ϵ in - ζ ter v neimenovano podskupino. Neobjavljeni viri tudi navajajo prisotnost podskupine η . Plazmide IncP-1 so našli tako pri študijah kliničnih sevov kot tudi v okoljskih sevih po vsem svetu. Bakterije, ki vsebujejo te plazmide so izolirane iz prsti v območjih, kjer se pojavlja industrijska kontaminacija, iztrebkih prašičev, industrijskih odpadnih voda, rečnih sedimentih in sladkovodnih izviroh (Popowska in Krawczyk-Balska, 2013). Plazmidi IncP imajo visok potencial za širjenje in prenos ter zapleten mehanizem regulacije, ki omogoča plazmidu stabilnost v različnih gostiteljskih celicah (Adamczyk in Jagura-Burdzy, 2003).

Plazmidi skupine IncP-1 α imajo pogosto zapise za multiple determinante rezistence proti antibiotikom, medtem ko IncP-1 β imajo zapise za multiple determinante rezistence proti antibiotikom in razgrajevalne kasete (Adamczyk in Jagura-Burdzy, 2003).

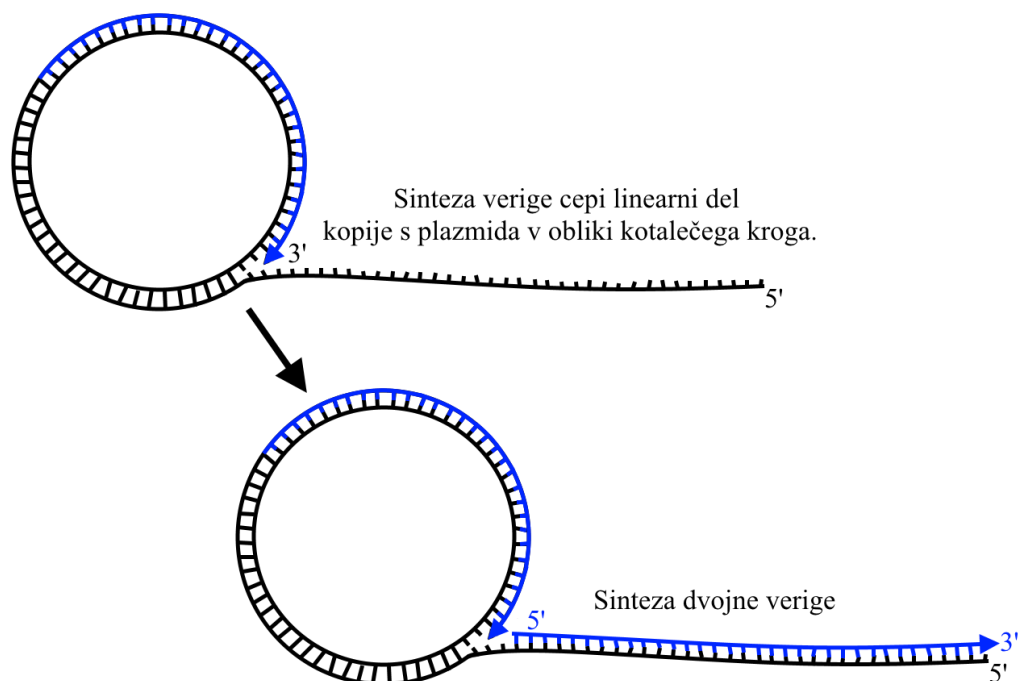
2.2.2 Replikacija plazmidov

Lastnost, ki plazmide loči od ostalih zunajkromosomskih genetskih elementov, npr. transpozonov, je kontrolirana replikacija, ki omogoča stabilno dedovanje med delitvijo bakterijske celice in uspešen prenos plazmida v hčerinski celici. Proces replikacije plazmida poteka v treh fazah: iniciacija, elongacija in terminacija. Ne glede na plazmidno velikost osnovni replikon plazmida sestavlja zaporeden set informacij, ki vključujejo mesto začetka DNA replikacije (*ori*) in enega ali več sosednih kontrolnih elementov. Odsek teh informacij je večinoma dolg do 3 kb (Espinosa in sod., 2000) in zajema nekaj sto bp *oriV* z mesti za prepoznavanje začetka plazmidne replikacije in vezavo gostiteljskih proteinov, ki

so odgovorni za iniciacijo in začetek replikacije (Moat in sod., 2002). Večina plazmidov ima en začetek podvajanja najdemo pa tudi plazmide z dvema in tremi replikoni. Ti plazmidi so večinoma sestavljeni plazmidi pravimo jim tudi mozaični plazmidi (Starčič Erjavec, 2003). Najbolj značilni naravni veliki plazmidi imajo pogosto neaktiven replikon RepFII in aktivno replikacijsko skupino RepFIA ali/in RepFIB (Starčič Erjavec, 2003; Villa in sod. 2010). Obstajajo mozaični plazmidi z več aktivnih replikonov, eden takšnih je pRK100, ki ima aktivni replikacijski regiji RepFIB in RepFIIA (Starčič Erjavec, 2003).

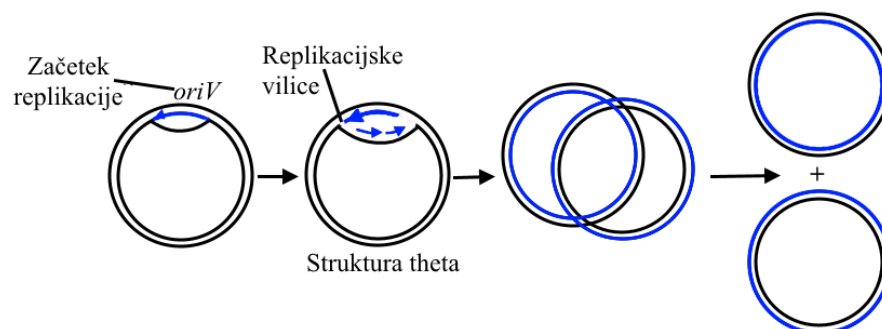
Poznamo 3 tipe mehanizmov replikacije krožnih plazmidov: theta (θ) tip, tip kotalečega se kroga (ang. »rolling circle«) in mehanizem premestitve verig (Slika 2, 3, 4) (Moat in sod., 2002).

Tip replikacije theta je eden najbolj preučenih mehanizmov pri po Gramu negativnih bakterijah. Mehanizem vsebuje taljenje verig na delu *ori* plazmida, sintezo RNA-začetnega oligonukleotida in sintezo DNA s pomočjo kovalentnega podaljševanja začetnega oligonukleotida hčerinske verige. Sinteza DNA se lahko začne na enem koncu ali multiplih delih plazmida in je lahko enosmerna ali dvosmerna, kar je odvisno od plazmida. Elektronska mikroskopija je razkrila, da intermediati mehanizma podvajanja theta tvorijo obliko črke theta (θ), od tod tudi ime (Moat in sod., 2002).

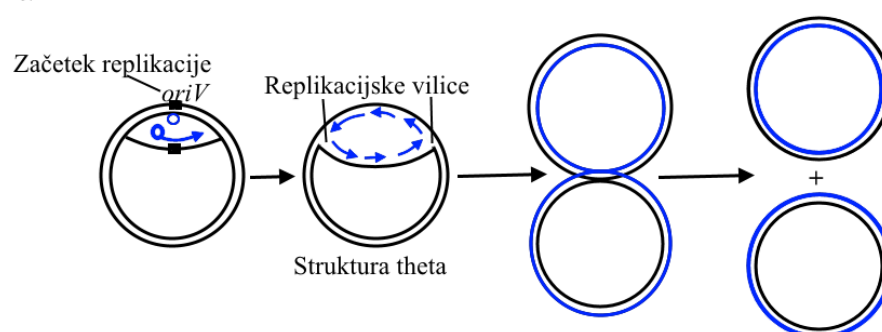


Slika 2: Podvajanje plazmida po mehanizmu kotalečega se kroga (Chaudhari, 2014).

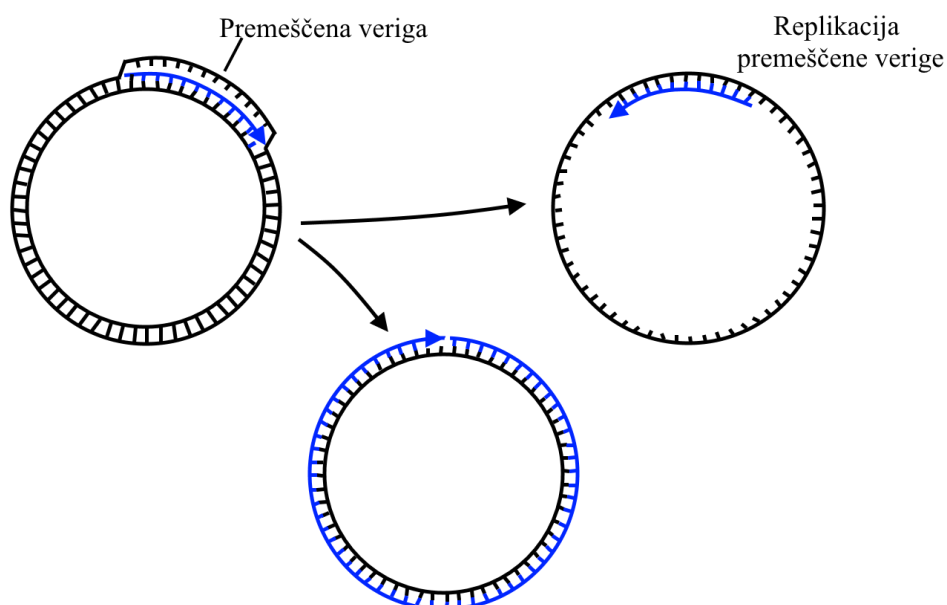
Enosmerna



Dvosmerna



Slika 3: Podvajanje plazmida s θ (theta) vmesno obliko (Chaudhari, 2014).



Slika 4: Podvajanje plazmida po mehanizmu premestitve verig (Chaudhari, 2014).

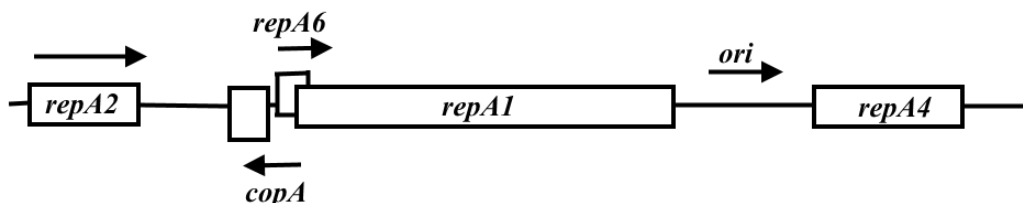
Podvajanje po mehanizmu kotalečega se kroga (ang. »rolling circle«) je enosmerno, ki se začne z vezavo Rep-iniciatorskega proteina podvojevanja na plus verigo plazmida. Konec 3'-OH deluje kot začetnik sinteze vodilne verige in vključuje replikacijske proteine gostiteljev (DNA-polimeraza III, Ssb, helikaza). Elongacija konca 3'-OH je neprekinjeno premikanje replikona po vodilni verigi dokler ne konča v terminalnem delu. Podvajanje vodilne verige poteka ločeno od zaostajajoče (Moat in sod., 2002).

Podvajanje po mehanizmu premestitve verig je bilo najboljše preučeno na promiskuitetnem plazmidu družine IncQ. Replikacijo omogoča združitev treh plazmidno kodiranih proteinov RepA, B, C s 5'-3' helikazo, primazo in inhibitorjem. RepC se veže na iteronska zaporedja v delu *ori* plazmida in verjetno s pomočjo RepA in helikaze povzročajo izpostavljenost majhnih palindromskih zaporedij *ssi* (ang. »small palindromic sequences«), ki so locirane nasproti regije *ori*. Zankam podobne strukture (ang. »stem-loop«), ki nastanejo s pomočjo zaporedij *ssi*, so potrebne za sestavljanje primaz RepB (Moat in sod., 2002).

Podvajanje linearnih plazmidov je na podlagi mehanizmov, ki vključujejo vezavne proteine 5'-konca obeh verig. Ti delujejo kot začetni oligonukleotid sinteze DNA. Linearni plazmidi z lasnicami se replicirajo s pomočjo konkatemernih intermediatov (Moat in sod., 2002).

2.2.2.1 Replikacijska regija RepFIIA

Replikacijsko regijo **RepFIIA** sestavlja gen *repA2* (zapis za represor), gen *copA* (zapis za protiprepisno molekulo RNA), gen *repA1* (zapis za replikacijski protein), gen *repA6* (zapis za kratek vodilni peptid) in regija *repA4* ter regija *ori*, kamor se vežejo proteini, da pričnejo plazmidno replikacijo (Slika 5). RepFIIA je mozaično sestavljena replikacijska plazmidna regija. Predvideva se, da represor RepA2 nadzoruje regijo *repA1* na mRNA, medtem ko protiprepisna RNA CopA regulira translacijo, saj je komplementarna vodilni regiji *repA1* mRNA (CopT). Vezava CopA na CopT pa zavira izražanje *repA6*, ki je potrebno za sintezo RepA1. RepA4 je ključen pri ohranjanju stabilnosti plazmida (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2006).

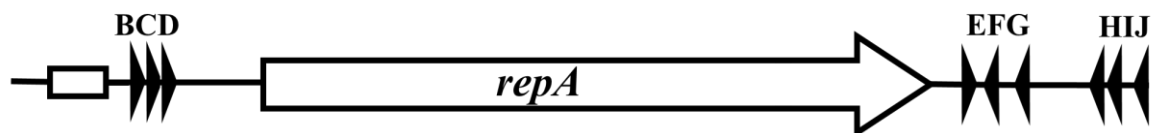


Slika 5: Mapa replikona RepFIIA. Označeni so geni/regije tipičnega replikona RepFIIA. Zaradi preglednosti lege preučevanih zaporedij, so nekateri okvirčki, ki prikazujejo gene/regije, premaknjeni. Označena je tudi smer prepisa mRNA posameznega gena. Na regijo *ori* se veže replikatorski protein RepA1 in prične s podvajanjem plazmida (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2006).

2.2.2.2 Replikacijska regija RepFIB

Replikon **RepFIB**, katerega so prvič odkrili prav pri plazmidu F na 7,5 kb fragmentu *EcoRI* f7. Pri preučevanju ostalih plazmidov z replikacijsko regijo RepFIB so odkrili visoko homologijo DNA v približno 2 kb regiji. Replikacijska regija RepFIB je zelo majhna regija, saj vsebuje samo en bralni okvir. Ta kodira odločilen protein pri replikaciji plazmida, RepA velik od 28,9 do 34,7 kDa. RepFIB sestavlja gen *repA*, ki je obdan z direktnimi trojnimi zgornjimi ponovitvami (B, C in D) oziroma iteroni. Poleg zgornjih ponovitev vsebuje tudi spodnje, ki so bolj kompleksne in v šestih ponovitvah (E, F, G, H, I in J). Zaporedje, ki se ponavlja je 5'-ANATAAGCTTAGNNNGYAAA-3' in pri ponovitvah E, F, G, H, I in J so odgovorni za inkompatibilnost RepFIB s skupino IncE. Zaporedje *repA* je pri RepFIB homologen z ostalimi plazmidi, ki vsebujejo RepA (R6K, RK2, pSC101, mini-F in mini-P1), čeprav ni nobene podobnosti med ponavljajočimi zaporedji (Slika 6) (Gibbs in sod., 1993).

Uravnavanje podvajanja poteka preko vezave proteina RepA na iteronska zaporedja (Gibbs in sod., 1993).

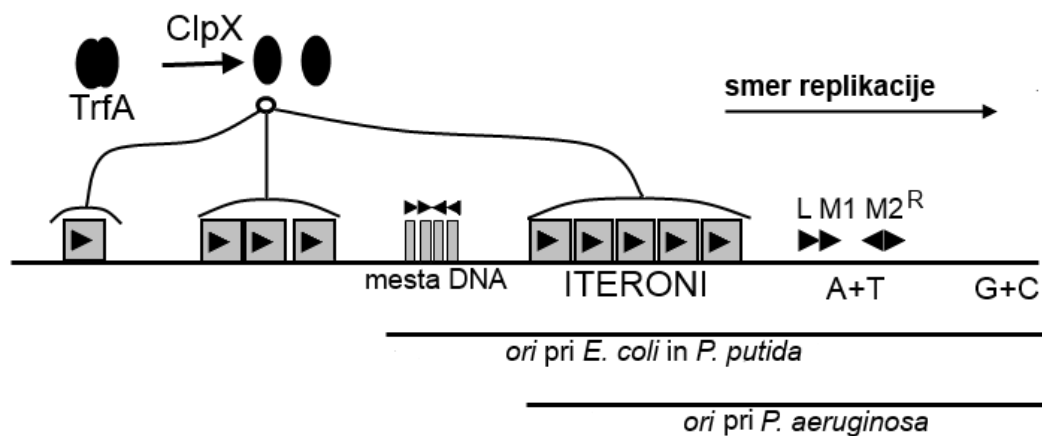


Slika 6: Mapa replikona RepFIB. Minimalni replikon RepFIB je sestavljen iz samo enega gena, ki je nujen regulator za replikacijo *repA*, *repA* je obdan z obeh strani s ponavljajočimi se DNA regijami (BCD, EFG in HIJ) - iteroni. BCD ponavljajoča se regija s pripadajočim predzaporedjem označenim kot bel pravokotnik tvorita regijo začetka podvojevanja (Gibbs in sod., 1993).

2.2.2.3 Replikacijska regija IncP

Plazmidi s širokim naborom gostiteljev se razlikujejo, saj je plazmid-kodirajoča replikacijska funkcija in regulacija teh plazmidov (posebej IncP in IncQ plazmidih) veliko bolj kompleksna. Skupini se tudi razlikujeta po legi genov nujnih za replikacijo, namreč skupina plazmidov s širokim naborom gostiteljev ima gene razpršene po regijah, ki so razporejeni po celotnem plazmidu (Adamczyk in Jagura-Burdzy, 2003).

Replikacijski sistem podvajanja plazmida RK2 lahko izpostavimo kot model podvajanja plazmidov IncP. Podvajajo se po podvajalnem mehanizmu theta (Adamczyk in Jagura-Burdzy, 2003). Ključni segmenti DNA, ki sodelujejo pri podvajanju in sestavljajo replikacijsko regijo plazmida IncP so regija *oriV* (mesto pričetka replikacije) in regija *trfA*. Ključni gostiteljski proteini, ki sodelujejo pri podvajanju so: DnaA, DnaB, DnaC, DNA giraza, DnaG primaze in holoencim DNA polimeraza III. Analiza *oriV* nukleotidnega zaporedja plazmidov RK2 in R751 je razkrila, da je to regija s precej ohranjenimi lastnostmi. Minimalni segment DNA, ki omogočajo aktivnost *oriV*, so iteroni (17 merni), ki so dolgi 393 bp in jih sestavlja 9 ponovitev. A+T bogate ponovitve so na mestih L, M1, M2 in R, ki so ključna začetna mesta destabilizacije heliksa. TrfA je zelo ohranjen regulatorni protein. Iteroni, na katere se monomerni TrfA proteini vežejo, so organizirani v 3 skupine glede na eno, tri in pet kopij direktnih ponovitev. Iteroni 5 do 9 formirajo gručo v zgornjem delu A+T bogatih regij, ki predstavlja minimalni začetek, katerega aktivira iniciacijski protein TrfA. Dimeri TrfA naj bi bili ključni pri negativni kontroli replikacije. Protein TrfA ima dve vlogi pri replikaciji RK2, kot pozitivni inhibitor replikacije in negativni regulator kopij plazmidnega števila (Slika 7) (Adamczyk in Jagura-Burdzy, 2003).



ITERONI zaporedje **TGACA^{C/G}AT^{A/T}TGAGGGGCGAN^{C/G}**

Slika 7: Regija *oriV* plazmida RK2. TrfA (replikacijski iniciatorski protein) se veže direktno na ponavljajoča se iteronska zaporedja, ClpX (šaperoni) monomerizirajo TrfA. Orientacija iteronov, zaporedij vezave DnaA in z A+T bogatih regij je označene s puščico (Adamczyk in Jagura-Burdzy, 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

Zbirke bakterijskih sevov so pridobljene z izolacijo bakterij *E. coli* iz človeškega blata zdravih ljudi, iz vzorcev bolnikov z okužbami mehkega tkiva in kože ter iz urina bolnikov z urinarnimi okužbami. Izolatoma čistih bakterijskih kultur so določene lastnosti in iz zbirk so izločeni vsi bakterijski izolati, ki se ponavljajo, tako se zbirke sestojijo iz 90 različnih sevov *E. coli* iz blata zdravih ljudi, 102 različnih sevov *E. coli* iz okužb mehkih tkiv in kože ter 110 različnih sevov *E. coli* iz urinarnih okužb. Izolati so izolirani mikroorganizmi (Slovenski medicinski slovar, 2014).

3.1.1.1 Zbirka BJ – zbirka komenzalnih sevov *E. coli*

Zbirka sevov BJ, ki smo jo uporabili pri diplomski nalogi je v zbirki sevov Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Zbirka BJ vsebuje 90 komenzalnih sevov *E. coli*, izoliranih iz blata zdravih ljudi, različnih starosti in spola, ki niso prejeli nobenih protimikrobnih zdravil za terapevtske oziroma zdravstvene namene. Zbirka BJ je nastala v obdobju od 01.03.2009 do 04.09.2009. Na inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani so za vsak sev zbirke BJ ugotovili minimalno inhibitorno koncentracijo za ampicilin, tetraciklin in ciprofloksacin.

3.1.1.2 Zbirka sevov TA – zbirka sevov *E. coli*, izoliranih iz infekcij kože in mehkih tkiv

Zbirka sevov TA vsebuje 102 sevov, ki so jih izolirali v Laboratoriju za diagnostiko aerobnih in anaerobnih bakterijskih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani v obdobju od 28.08.2008 do 30.11.2008. Sevi *E. coli* zbirke TA povzročajo okužbe kože in mehkih tkiv in so bili izolirani iz okužb mehkega tkiva in kože bolnikov.

3.1.1.3 Zbirka sevov DL – zbirka sevov *E. coli*, izoliranih iz urinarnih infekcij

Sevi DL so bili izolirani iz urina bolnikov, ki so imeli urinarno infekcijo. Zbirka vsebuje 110 sevov DL, izoliranih na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani v Laboratoriju za diagnostiko okužb sečil v obdobju med 01.02.2002 do 30.05.2002.

3.1.2 Gojišča

3.1.2.1 Priprava tekočega gojišča Luria - Bertani (LB)

Za pripravo tekočega gojišča LB smo v 1 L deionizirane vode raztopili 25 g/L osnove LB (5 g kvasnega ekstrakta, 10 g triptona, 10 g NaCl). Gojišče smo dobro premešali z magnetnim mešalom. Nato smo odpipetirali v epruvete (po 5 ml ali 10 ml) ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C.

3.1.2.2 Priprava trdnega gojišča (LB) v petrijevkah

Za pripravo 1 L gojišča LB smo v deionizirani vodi raztopili 25 g/L gojišča LB in 15 g/L agarja ter dobro premešali z magnetnim mešalom. Premešano in raztopljeno gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 55 °C, smo razlili v sterilne plastične petrijevke ter zaprte pustili, da se ohladijo.

3.1.3 Kemikalije

BIOLIFE ITALIANA, MILANO, ITALIJA

- agar-agar

FERMENTAS, Vilina, Litva

- $MgCl_2$ (25 mM)
- pufer za *Taq*-polimerazo DNA
- bromfenol modro
- zmes dNTP – 10 mM koncentracija vsakega dNTP
- *Taq*-polimeraza DNA
- 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 1-kb (velikosti fragmentov v bp: 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250 bp)
- RIEDEL DE HAËN
- borova kislina

- ROTH
- baza Tris
- SEAKEM
- agaroz
- SIGMA Chemicals, St. Louis, Missouri, ZDA
- etidijev bromid (10 mg/ml)
- LB (Luria-Broth medium)
- baza TRIS
- borova kislina
- TRIS-HCl
- EDTA
- Na-citrat
- Agaroz

3.1.4 Začetni oligonukleotidi

JENA Bioscience GmbH, Jena, Nemčija

- Sal14-a
- Sal14-b
- Rep FIB-E1
- Rep FIB-E2
- Inc-P1
- Inc-P2

3.1.5 Pufri in reagenti

3.1.5.1 Ločevanje nukleinskih kislin z elektroforezo v agaroznem gelu

Za pripravo agaroznih gelov in elektroforezo smopotrebovali:

- **0,5 × TBE** (0,45 M 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 × TBE, segreli, da se je agaroz raztopila, ohladili do 60 °C ter nato v gel dodali 6 µl etidijevega bromida (10 mg/ml) in vlili v naprej pripravljen plastični nosilec za gelček.

- **2 % elektroforezni agarozni gel** smo pripravili tako, da smo 2,4 g agaroze dodali v 120 ml pufru $0,5 \times$ TBE. Nato smo mešanico segreli dokler se agarosa 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 gel.
- **Nanašalni elektroforezni pufer** (0,25 % bromfenol modro; 0,25 % ksilen cianol; 40 % saharoza, sterilna voda).

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,
- termobloki 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.

3.1.7 Metode

3.1.7.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda, ki omogoča hitro pomnoževanje specifičnih in nespecifičnih odsekov DNA *in vitro*. Metoda poteka v treh stopnjah. V prvi stopnji reakcijsko mešanico segrejemo na določeno temperaturo, ki je od 90 do 96 °C ter omogočamo denaturacijo oz. razcepitev dvoverižne DNA. Na razviti in ločeni DNA matrični verigi se vežejo in prilegajo začetni oligonukleotidi. Stopnja prileganja oligonukleotidov poteka ob določeni temperaturi, ki je okoli temperature tališča začetnih oligonukleotidov. Po uspešnem prileganju sledi sinteza komplementarne verige, s termostabilno DNA-polimerazo. Temperaturo dvignemo na optimalno temperaturo delovanja DNA-polimeraze (pri *Taq*-polimerazi 72 °C).

3.1.7.1.1 Gojenje sevov

Vse seve zbirk shranjene pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo precepili do posameznih kolonij na trdna gojišča LB in inkubirali preko noči pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posamezne kolonije določenih sevov smo precepili v tekoča gojišča in jih inkubirali na stresalniku pri 250 obratih/min pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noči.

3.1.7.1.2 Priprava lizatov

Seve, iz katerih smo pripravili lizate smo shranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in kasneje smo jih nacepili na plošče LB do posameznih kolonij in inkubirali preko noči pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po prekonočni inkubaciji smo posamezno kolonijo vsakega seva zbirk BJ, TA in DL prenesli v 5 ml tekočega gojišča LB in inkubirali na rotacijskem stresalniku preko noči pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Drugi dan smo prenesli 1 ml prekonočne bakterijske kulture v sterilno mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 minuto pri 13.000 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 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, zatem smo celice centrifugirali 10 minut pri 13.000 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant, v kateri je celokupna celična DNA, smo uporabili kot matrično DNA pri kasnejši izvedbi verižne reakcije s polimerazo.

3.1.7.1.3 Sestava reakcijske mešanice PCR za ugotavljanje prisotnosti zapisov

Za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov *repFIIA*, *repFIB* in *incP* smo pripravili 25 μl reakcijske mešanice.

25 μL mešanica PCR vsebovala:

- 1 μl posameznih začetnih oligonukleotidov koncentracije 20 pmol/ μl
- 0,5 μl 10 mM dNTP-jev
- 2,5 μl 10 $\times$ pufer za *Taq*-polimerazo z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (750 ml Tris-HCl (pH 8,8 pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% (v/v) Tween 20)
- 2,5 μl 25 mM MgCl_2
- 0,125 μl *Taq*-polimeraze koncentracije 5 U/ μl
- 12,375 μl destilirane sterilne vode
- 5 μl celičnega lizata.

V preglednici 4 so shematično prikazani geni z zapisi za posamične gene, ki smo jih pomnoževali in tako ugotavljali njihovo prisotnost, zaporedja posameznih uporabljenih oligonukleotidov, velikost nastale DNA in pogoji pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo.

3.1.7.1.4 Začetni oligonukleotidi za PCR

V preglednici so prikazani začetni oligonukleotidi in pričakovana velikost produktov.

Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri PCR, njihovo nukleotidno zaporedje in velikost DNA, ki nastane pri PCR.

Posamezen odsek DNA	Začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje 5'→3'	Sev za pozitivno kontrolo	Velikost produkta (bp)	Referenca
RepFIIA	Sal14-a	CCCTGAAGTGACCTCCTCTG	MS16	840	Starčič Erjavec, 2003
	Sal14-b	GAAAGGCGGCACTCTGTGT			
RepFIB	RepFIB-E1	GGAATTCTCGCTGCAAACCTTGTCCT	MS16	1595	Starčič Erjavec, 2003
	RepFIB-E2	GGAATTCGGAGATCCTGCGTACACTGCCT			
IncP	Inc-P1	TGATTTTACGCGAGTTTCCC	H8	240	Sobecky in sod., 1997
	Inc-P2	AAAAGACAGGTTAGCGGTGG			

3.1.7.1.5 Pogoji pomnoževanja s PCR

Vse reakcije smo ponovili dvakrat v primeru odstopanja tudi večkrat.

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov RepFIIA s parom začetnih oligonukleotidov Sal14-a in Sal14-b.

začetna denaturacija	94 °C	4 min 30s	1 ×
denaturacija	94 °C	30 s	
prileganje začetnih oligonukleotidov	63 °C	30 s	30 ×
pomnoževanje	72 °C	2 min	
končno pomnoževanje	72 °C	10 min	1 ×

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov RepFIB s parom začetnih oligonukleotidov RepFIB-E1 in RepFIB-E2.

začetna denaturacija	94 °C	4 min 30s	1 ×
denaturacija	94 °C	30 s	
prileganje začetnih oligonukleotidov	63 °C	30 s	30 ×
pomnoževanje	72 °C	2 min	
končno pomnoževanje	72 °C	10 min	1 ×

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov IncP s parom začetnih oligonukleotidov IncP-1 in IncP-2.

začetna denaturacija	94 °C	3 min	1 ×
denaturacija	94 °C	1 min	
prileganje začetnih oligonukleotidov	65 °C	1 min	30 ×
pomnoževanje	72 °C	30 s	
končno pomnoževanje	72 °C	10 min	1 ×

3.1.7.1.6 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 različnih velikosti fragmentov DNA smo pripravili gele z gostoto 1 % in 2 % agaroze. Pomnožke PCR gena RepFIIA (1595 kbp) in RepFIB (840 kbp) smo vnesli v 1 % agarozni gel, pomnožke PCR gena IncP smo vnesli v 2 % gele, saj je njihova velikost manjša 240 baznih parov. Pri elektroforezi RepFIIA in RepFIB smo kot označevalec velikosti fragmentov v jamice dodali 3 µl standardne DNA – lestvice 1-kb, pri IncP pa standardne DNA – lestvice 50-bp. V jamice smo vnesli po 5 µl pomnožkov PCR skupaj z nanašalnim elektroforeznim pufrom v razmerju 5:1. Gelska elektroforeza je tekla pri napetosti 100 V v pufru 0,5x TBE. Po končani elektroforezi smo gele presvetlili z UV-svetlobo valovne dolžine 302 nm in slikali rezultate.

3.1.7.1.7 Statistične metode

Statistično značilnost povezav dobljenih rezultatov smo ugotavljali s programom Fisherjev natančni test, ki je dostopen na internetu – <http://www.langsrud.com/fisher.htm>. Statističen test se uporablja za nenaključne povezave med dvema spremenljivkama pri majhnih vzorcih. Imenujemo ga natančni test, saj devianco oziroma odstopanje od nulte hipoteze lahko določimo natančno. Kot statistično značilne rezultate označimo tiste, katerih P-vrednost je $\leq 0,05$.

Nulta hipoteza testa govori o tem, da med vrsticami in stolpci kontingenčne tabele 2×2 (Preglednica 5) ni nobenih povezav. Torej sta vzorca neodvisna eden od drugega. Rezultate

Fisherjevega natančnega testa prikazujemo dihotomno, na primer: z da/ne, pozitivnim/negativnim, črnim/belim itd. (Osborn, 2006).

Preglednica 5: Kontingenčna tabela 2x2, ki se uporablja pri Fisherjevem natančnem testu (Osborn, 2006).

	Skupina vzorcev 1	Skupina vzorcev 2	Seštevek stolpcev
Rezultat 0	a	b	a + b
Rezultat 1	c	d	c + d
Seštevek vrstic	a + c	b + d	N = a + b + c + d

Prednost testa je, ker ga lahko uporabljamo pri majhnih vzorcih tudi pri frekvenci posameznih vzorcev manjši kot 5 celo enaki 0. Izračunavamo direktno p vrednost, ki predstavlja oceno napake pri trditvi, da je med frekvencama razlika (Enačba 1) (Osborn, 2006).

$$p = \frac{\frac{a+b}{a} \frac{c+d}{c}}{\frac{n}{a+c}} = \frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{a! b! c! d! N!} \quad \dots (1)$$

Zaradi zelo kompleksnega računanja pri Fisherjevi natančni metodi ga uporabljamo samo pri manjših vzorcih, medtem ko pri velikih ga zamenjamo s χ^2 testom. Sicer Fisherjev natančni test predstavlja območje računanja katerega χ^2 test ne pokriva (Osborn, 2006).

4 REZULTATI

4.1 PREVALENCA REPLIKACIJSKIH REGIJ MED ZBIRKAMI SEVOV *E. COLI* BJ, TA IN DL

S PCR smo testirali zbirke sevov *E. coli*: zbirko DL (110 sevov UPEC), zbirko TA (102 seva SSTI) in zbirko BJ (90 komenzalnih sevov), da bi ugotovili, kakšna je prevalenca posameznih replikacijskih regij v posamezni zbirki. Vsi rezultati za posamezne seve v zbirkah so zbrani v prilogah A, B, C, medtem ko so na podlagi pridobljenih podatkov izračunane prevalence prikazane v preglednicah 6-9.

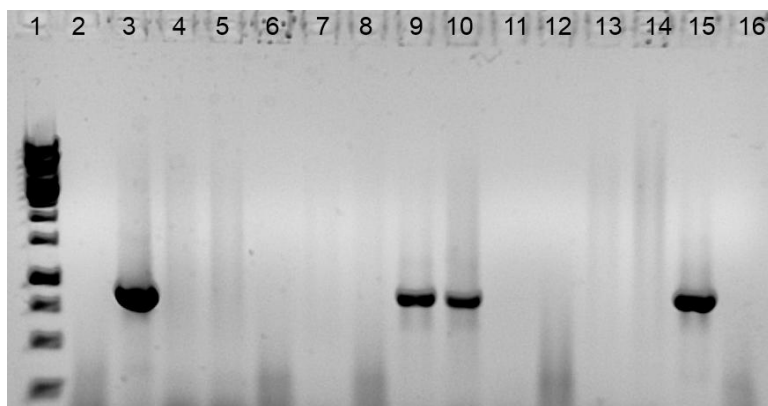
4.1.1 Prevalenca replikacijske regije RepFIIA v zbirkah sevov *E. coli* BJ, TA in DL

Ugotavljali smo prevalenco replikacijske regije RepFIIA v zbirkah BJ, DL in TA in podatke zbrali v preglednici 6.

Preglednica 6: Prevalenca replikacijske regije RepFIIA sevov zbirke BJ, TA, DL.

	Zbirka BJ	Zbirka DL	Zbirka TA
	Št. pozitivnih sevov BJ/št. vseh sevov BJ (rezultat izražen v %)	Št. pozitivnih sevov DL /št. vseh sevov DL (rezultat izražen v %)	Št. pozitivnih sevov TA/št. vseh sevov TA (rezultat izražen v %)
RepFIIA	33/90 (37)	33/110 (30)	22/102 (22)

Opazimo, da je RepFIIA precej razširjena replikacijska regija, saj jo najdemo v primerljivih odstotkih v vseh zbirkah. RepFIIA smo v zbirki BJ (komezalni sevi) našli pri 33 sevih (37 %), v zbirki DL (sevi iz UTI) pri 33 (30 %) in v zbirki TA (sevi iz SSTI) pri 22 (22 %) sevih.



Slika 8: Rezultati pomnožkov PCR replikacijske regije RepFIIA na lizatih iz zbirke sevov BJ *E. coli*. 1 – 1kb lestvica, 2 – negativna kontrola H₂O, 3 – pozitivna kontrola sev *E. coli* MS16, 4 – BJ22, 5 – BJ23, 6 – BJ26, 7 – BJ25, 8 – BJ27, 9 – BJ28, 10 – BJ29, 11 – BJ30, 12 – BJ31, 13 – BJ32, 14 – BJ33, 15 – BJ34, 16 – BJ35.

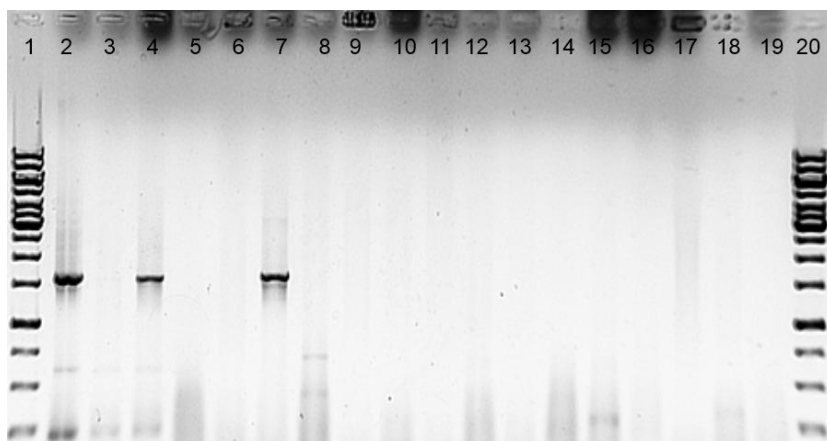
4.1.2 Prevalenca replikacijske regije RepFIB med zbirkami sevov *E. coli* BJ, TA in DL

Ugotavljali smo prevalenco replikacijske regije RepFIB med zbirkami BJ, DL in TA in podatke zbrali v preglednici 7.

Preglednica 7: Prevalenca replikacijske regije RepFIB sevov zbirke BJ, TA, DL.

	Zbirka BJ	Zbirka DL	Zbirka TA
	Št. pozitivnih sevov BJ/št. vseh sevov BJ (rezultat izražen v %)	Št. pozitivnih sevov DL /št. vseh sevov DL (rezultat izražen v %)	Št. pozitivnih sevov TA/št. vseh sevov TA (rezultat izražen v %)
RepFIB	30/90 (33)	39/110 (35)	23/102 (23)

Pri RepFIB smo ugotovili, da je precej razširjena replikacijska regija. Po zbirkah je razporejena v primerljivih odstotkih v vseh zbirkah. RepFIB smo v zbirki BJ našli pri 30 sevih (33 %), v zbirki DL pri 39 sevih (35 %) in v zbirki TA pri 23 (23 %) sevih.



Slika 9: Rezultati pomnožkov PCR replikacijske regije RepFIB na lizatih iz zbirke sevov TA bakterije *E. coli*. 1 – 1kb lestvica, 2 – pozitivno kontrolni sev *E. coli* MS16, 3 – TA8, 4 – TA10, 5 – TA11, 6 – TA16, 7 – TA18, 8 – TA20, 9 – TA24, 10 – TA105, 10 – TA25, 11 – TA26, 12 – TA27, 13 – TA30, 14 – TA31, 15 – TA33, 16 – TA35, 17 – TA36, 18 – TA36, 19 – TA37, 20 – 1kb lestvica.

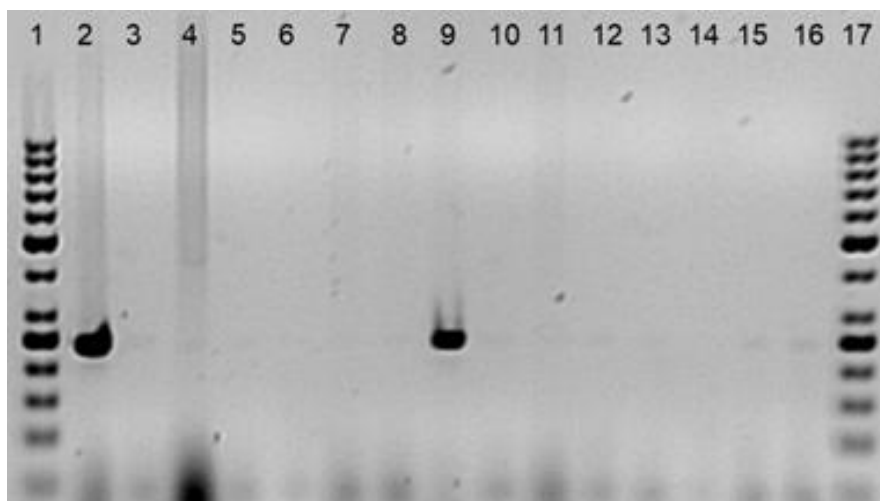
4.1.3 Prevalenca replikacijske regije IncP med zbirkami sevov *E. coli* BJ, TA in DL

Ugotavljali smo prevalenco replikacijske regije IncP med zbirkami BJ, DL in TA in podatke zbrali v preglednici 8.

Preglednica 8: Prevalenca replikacijske regije IncP sevov zbirke BJ, TA, DL.

	Zbirka BJ	Zbirka DL	Zbirka TA
	Št. pozitivnih sevov BJ/št. vseh sevov BJ (rezultat izražen v %)	Št. pozitivnih sevov DL /št. vseh sevov DL (rezultat izražen v %)	Št. pozitivnih sevov TA/št. vseh sevov TA (rezultat izražen v %)
IncP	2/90 (2)	10/110 (9)	2/102 (2)

Ugotovili smo, da je IncP redko prisotna v preučevanih zbirkah, saj smo je našli: v zbirki DL pri 10 sevih (9 %), v zbirki BJ sta 2 seva (2 %) in 2 seva (2 %) v zbirki sevov TA.



Slika 10: Rezultati pomnožkov PCR replikacijske regije IncP na lizatih iz zbirke sevov TA *E. coli*. 1 – 50bp lestvica, 2 – pozitivna kontrola *E. coli* H8, 3 – TA186, 4 – TA183, 5 – TA180, 6 – TA179, 7 – TA178, 8 – TA176, 9 – TA174, 10 – TA171, 11 – TA169, 12 – TA168, 13 – TA162, 14 – TA161, 15 – TA158, 16 – TA157, 17 – 50bp lestvica.

4.1.4 Prevalenca več kot ene replikacijske regije RepFIIA, RepFIB in IncP v sevu med zbirkami sevov *E. coli* BJ, TA in DL

Pregledali smo tudi hkratno prisotnost več replikacijskih regij v posameznem sevu zbirke ter ugotavljali njihovo razširjenost v zbirkah BJ, DL in TA ter podatke zbrali v preglednici 9.

Preglednica 9: Prevalenca sevov s prisotnostjo več kot ene replikacijske regije.

	Zbirka BJ	Zbirka DL	Zbirka TA
	Št. pozitivnih sevov BJ/št. vseh sevov BJ (rezultat izražen v %)	Št. pozitivnih sevov DL /št. vseh sevov DL (rezultat izražen v %)	Št. pozitivnih sevov TA/št. vseh sevov TA (rezultat izražen v %)
RepFIIA+RepFIB	14/90 (16)	25/110 (23)	11/102 (11)
RepFIIA+RepFIB+IncP	0 (0)	5 (5)	1 (1)

Sevi z replikacijskima skupinama RepFIIA in RepFIB so zelo pogosto skupaj v celicah, saj smo takšnih sevov ugotovili pri zbirki BJ 14 (16 %), pri sevih zbirke DL 25 (23 %) in pri zbirki TA 11 sevov (11%). Vse tri replikacijske regije se redko pojavljajo skupaj v sevih. Takšnih sevov nismo odkrili pri zbirki BJ, medtem ko je pri zbirki DL takšnih sevov 5 (5 %) in pri zbirki TA je takšen en sev (1 %).

4.2 STATISTIČNO ZNAČILNA POVEZANOST REPLIKACIJSKIH REGIJ Z ZBIRKAMI SEVOV *E. COLI* BJ, DL, TA.

S Fisherjevim natančnim testom smo za dobljene podatke preverjali statistično značilnost in opredelili zaupanje ter poiskali povezave med replikacijskimi regijami in zbirkami BJ, DL in TA. Podatke smo zbrali v preglednici 11.

Primer izračuna:

Preglednica 10: Kontingenčna tabela 2x2 za izračun po Fisherjevem natančnem testu za izračun statističnega ovrednotenja RepFIIA pri zbirki BJ.

	BJ zbirka	DL in TA zbirki	
Vsebuje zapis za RepFIIA	33	55	88
NE vsebuje zapisa za RepFIIA	57	157	214
	90	212	302

$$p = \frac{\frac{33 + 55}{33} \cdot \frac{57 + 157}{57}}{\frac{302}{33 + 57}} = \frac{88! \cdot 214! \cdot 90! \cdot 212!}{33! \cdot 55! \cdot 57! \cdot 157! \cdot 302!} = 0,07196 \quad \dots (2)$$

Preglednica 11: Statistično ovrednotenje rezultatov replikacijskih regij glede na zbirke sevov BJ, DL, TA.

Plazmidna replikacijska regija	P-vrednost pri zbirkah sevov		
	Zbirka BJ	Zbirka DL	Zbirka TA
RepFIIA	0,0720°	0,7942	0,0447 ^(*)
RepFIB	0,4964	0,1561	0,0350 ^(*)
IncP	0,2438	0,0085*	0,1515
RepFIIA+RepFIB	0,8661	0,0362*	0,0709□°
RepFIIA+RepFIB+IncP	0,1840	0,0256*	0,6676

Opombe: Statistično značilne vrednosti P, ki smo jih dobili s Fisherjevim natančnim testom, so označene z *. Znak * pomeni $P < 0,05$; ** pomeni $P < 0,005$ in *** pomeni $P < 0,0005$, vse vrednosti smo za boljši pregled izpostavili z rdečim ozadjem. Vrednosti P, ki so na meji, da bi bile statistično značilne oziroma takrat ko je $0,05 > P > 0,10$ so v tabeli označeni z ° in z rumenim ozadjem. Z ^(*) smo označili vse seve, ki se negativno statistično povezujejo.

Iz tabele je razvidno, da se določene replikacijske regije povezujejo z zbirkami in so za njih značilne. Zbirka BJ se je razlikovala pri replikacijski regiji RepFIIA glede na zbirki sevov DL in TA, saj ima najvišji delež zapisov replikacijske regije RepFIIA in je na meji statistične značilnosti. Zbirka DL se statistično povezuje z replikacijsko skupino IncP s P vrednostjo 0,0085. Statistično se povezuje tudi s sevi, ki vsebujejo hkrati replikacijski skupini RepFIIA in RepFIB s P vrednostjo 0,0362 in s sevi, ki vsebujejo vse tri replikacijske skupine s P vrednostjo 0,0256. Pri zbirki TA smo opazili statistično signifikantni primanjkljaj replikacijskih skupin RepFIIA in RepFIB.

4.3 STATISTIČNO ZNAČILNA POVEZANOST REPLIKACIJSKIH REGIJ RepFIIA, RepFIB IN IncP Z DEJAVNIKI VIRULENCE, ODPORNOSTI PROTI ANTIBIOTIKI IN FILOGENETSKIMI SKUPINAMI

Analize podatkov občutljivosti sevov na antibiotike dobljenih z Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo ter analize podatkov z Biotehniške fakultete Oddelka za biologijo o prevalenci dejavnikov virulence pri zbirkah sevov BJ, DL in TA smo primerjali s prevalenco replikacijskih regij RepFIIA, RepFIB in IncP ter ugotavljali statistično značilnost povezave.

Glede na študije, ki patogenim sevom pripisujejo večji nabor dejavnikov virulence in višjo mero odpornosti proti antibiotikom tetraciklina, ampicilina in ciprofloksacina, smo pričakovali, da bodo sevi z replikacijskimi regijami RepFIIA, RepFIB in IncP odstopali od sevov, ki nimajo zapisov za te replikacijske regije. Primerjali smo prevalenco replikacijskih regij glede na zapise dejavnikov virulence *papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *hlyA*, *cnfI*, *usp*, *iucD*, *tcpC*, *traJ*.

Predvidevamo, da tisti dejavniki virulence, ki se povezujejo s plazmidi, se bodo tudi v naši študiji povezovali s plazmidi.

4.3.1 Statistično značilna povezanost replikacijske regije RepFIIA z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotiki in filogenetskimi skupinami

Prevalenco replikacijske regije RepFIIA smo primerjali z že znanimi rezultati predhodnih študij dejavnikov virulence, odpornosti proti antibiotikom in filogenetskih skupin ter značilnost povezave statistično ovrednotili. Podatke in izračune smo zbrali v preglednici 12.

Preglednica 12: Povezanost inkompatibilnostne skupine RepFIIA z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotikom in filogenetskimi skupinami v zbirkah BJ, DL in TA.

Porazdelitev (N[%]) replikacijske regije RepFIIA glede na dejavnike virulence, odpornost proti antibiotikom in filogenetske skupine.			
Prevalenca (št. [%] sevov)			
	<i>repFIIA</i> ⁺ 88[29]	<i>repFIIA</i> ⁻ 214[71]	P vrednost
Dejavnik virulence			
<i>papGII</i>	22(25)	35(16)	0,1048
<i>papGIII</i>	6(7)	28(11)	0,1600
<i>sfaDE</i>	18(20)	67(31)	0,0671°
<i>afa/draBC</i>	3(3)	4(2)	0,4197
<i>hlyA</i>	14(16)	56(26)	0,0711°
<i>cnfI</i>	15(17)	52(24)	0,2224
<i>usp</i>	34(39)	79(37)	0,7946
<i>iucD</i>	50(57)	80(37)	0,0022*
<i>tcpC</i>	11(12)	43(20)	0,1380
<i>traJ</i>	37(42)	50(23)	0,0019*
Odpornost proti antibiotiku			
Ampicilin	44(50)	82(38)	0,0723°
Tetraciklin	34(39)	75(35)	0,5986
Ciprofloksacin	8(9)	27(13)	0,4339
Filogenetska skupina			
A	15(17)	45(21)	0,5259
B1	6(7)	20(9)	0,6521
B2	45(52)	106(50)	0,8992
D	21(24)	43(20)	0,5355

Opombe: Statistično značilne vrednosti P, dobljene s Fisherjevim natančnim testom, so označene z *. Znak * pomeni $P < 0,05$; ** pomeni $P < 0,005$ in *** pomeni $P < 0,0005$; vse vrednosti smo za boljši pregled izpostavili z rdečim ozadjem. Vrednosti P, ki so na meji, da bi bile statistično značilne oziroma takrat ko je $0,05 > P > 0,10$ so v tabeli označeni z ° in z rumenim ozadjem. Z (*) smo označili vse seve, ki se povezujejo negativno statistično.

Ugotovili smo, da večina genov za dejavnike virulence ni povezana s preučevano replikacijsko skupino RepFIIA. Sevi, ki vsebujejo gen *iucD* in *traJ* so bolj značilni za plazmide in se pogosteje pojavljajo pri sevih, ki vsebujejo replikacijsko skupino RepFIIA. Za P-vrednost gena *iucD* smo izračunali 0,0022, pri genu *traJ* pa je p-vrednost izračunana 0,0019. Sevi, ki vsebujejo gene *hlyA* in *sfaDE* se ne povezujejo s sevi, ki imajo gen replikacijske skupine RepFIIA.

Sevi, ki kažejo odpornost proti ampicilinu so na statistični meji povezovanja s sevi, ki vsebujejo RepFIIA. Vrednost P je na meji statističnih povezav 0,0723.

Pri filogenetskih skupinah ne opazimo nobenih povezav z replikacijsko regijo RepFIIA.

4.3.2 Statistično značilna povezanost replikacijske regije RepFIB z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotiki in filogenetskimi skupinami

Prevalenco replikacijske regije RepFIB smo primerjali in statistično ovrednotili povezave z že znanimi rezultati predhodnih študij dejavnikov virulence, odpornosti proti antibiotikom in filogenetskih skupin. Podatke in izračune smo zbrali v preglednici 13.

Preglednica 13: Povezanost inkompatibilnostne skupine RepFIB z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotikom in filogenetskimi skupinami v zbirkah BJ, DL in TA.

Porazdelitev (N[%]) replikacijske regije RepFIB glede dejavnike virulence, odpornost proti antibiotikom in filogenetske skupine.			
Prevalenca (št. [%] sevov)			
	<i>repFIB</i> ⁺ 92[30]	<i>repFIB</i> ⁻ 210[70]	P vrednost
Dejavnik virulence			
<i>papGII</i>	22(24)	35(17)	0,1520
<i>papGIII</i>	4(4)	30(14)	0,0102 [*]
<i>sfaDE</i>	22(24)	63(30)	0,3310
<i>afa/draBC</i>	5(5)	2(1)	0,0292 [*]
<i>hlyA</i>	14(15)	56(27)	0,0375 [*]
<i>cnfI</i>	16(17)	51(24)	0,2288
<i>usp</i>	37(40)	76(36)	0,5205
<i>iucD</i>	49(53)	81(39)	0,0228 [*]
<i>tcpC</i>	13(14)	41(20)	0,3279
<i>traJ</i>	49(53)	38(18)	2x10 ⁻⁴ ***
Odpornost proti antibiotiku			
Ampicilin	50(54)	76(36)	0,0036 ^{**}
Tetraciklin	39(42)	70(33)	0,1524
Ciprofloksacin	8(9)	27(19)	0,3355
Filogenetska skupina			
A	19(21)	41(20)	0,8757
B1	6(7)	20(10)	0,5058
B2	48(52)	103(49)	0,7077
D	19(21)	45(21)	1

Opombe: Statistično značilne vrednosti P, dobljene s Fisherjevim natančnim testom, so označene z *. Znak * pomeni $P < 0,05$; ** pomeni $P < 0,005$ in *** pomeni $P < 0,0005$; vse vrednosti smo za boljši pregled izpostavili z rdečim ozadjem. Z (*) smo označili vse seve, ki se povezujejo negativno statistično.

Sevi z genom *iucD*, *traJ* so statistično značilno povezani z replikacijsko skupino RepFIB. P-vrednost pri *iucD* je 0,0228, medtem ko je pri *traJ* 2×10^{-9} . Sevi s geni *papGIII*, *afa/draBC*, *hlyA* niso značilni za seve, ki vsebujejo replikacijsko regijo RepFIB.

Sevi z replikacijsko skupino RepFIB se statistično povezuje s sevi, ki kažejo odpornost proti ampicilinu (p-vrednost 0,0036).

Tudi pri RepFIB nismo opazili nobenih povezav med replikacijskimi regijami in filogenetskimi skupinami.

4.3.3 Statistično značilna povezanost replikacijske regije IncP z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotiki in filogenetskimi skupinami

Prevalenco replikacijske regije IncP smo primerjali in statistično ovrednotili povezave z že znanimi rezultati predhodnih študij dejavnikov virulence, odpornosti proti antibiotikom in filogenetskih skupin. Podatke in izračune smo zbrali v preglednici 14.

Preglednica 14: Povezanost inkompatibilnostne skupine IncP z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotikom in filogenetskimi skupinami pri zbirkah BJ, DL in TA.

Porazdelitev (N[%]) replikacijske regije IncP glede na dejavnike virulence, odpornost proti antibiotikom in filogenetske skupine.			
Prevalenca (št. [%] sevov)			
	<i>incP</i> ⁺ (14[5])	<i>incP</i> ⁻ (288[95])	P vrednost
Dejavnik virulence			
<i>papGII</i>	2(14)	55(19)	1
<i>papGIII</i>	2(14)	32(11)	0,6629
<i>sfaDE</i>	3(21)	82(28)	0,7640
<i>afa/draBC</i>	0(0)	7(2)	1
<i>hlyA</i>	2(14)	68(24)	0,5338
<i>cnfI</i>	2(14)	65(23)	0,7423
<i>usp</i>	5(36)	108(37)	1
<i>iucD</i>	5(36)	125(43)	0,7854
<i>tcpC</i>	0(0)	54(19)	0,0827°
<i>traJ</i>	5(36)	82(28)	0,5544
Odpornost proti antibiotiku			
Ampicilin	7(50)	119(41)	0,5844
Tetraciklin	10(71)	101(35)	0,0090*
Ciprofloksacin	2(14)	33(11)	0,6699
Filogenetska skupina			
A	4(29)	56(19)	0,4893
B1	0(0)	26(9)	0,6189
B2	6(43)	145(50)	0,7855
D	4(29)	60(21)	0,5051

Opombe: Statistično značilne vrednosti P, dobljene s Fisherjevim natančnim testom, so označene z *. Znak * pomeni $P < 0,05$; ** pomeni $P < 0,005$ in *** pomeni $P < 0,0005$; vse vrednosti smo za boljši pregled izpostavili z rdečim ozadjem. Vrednosti P, ki so na meji, da bi bile statistično značilne oziroma takrat ko je $0,05 > P > 0,10$ so v tabeli označeni z ° in z rumenim ozadjem. Z (*) smo označili vse seve, ki se povezujejo negativno statistično.

Pri sevih z IncP ne opazimo nobenih povezav s filogenetskimi skupinami.

Replikacijska regija IncP se ne povezuje z nobenim dejavnikom virulence.

Sevi z replikacijsko regijo IncP se statistično povezujejo s sevi odpornimi proti tetraciklinu (P vrednostjo 0,009).

4.3.4 Statistično značilna povezanost hkrati prisotnih replikacijskih regij RepFIIA in RepFIB z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotiki in filogenetskimi skupinami

Ocenjevali smo tudi seve, ki vsebujejo več replikacijskih plazmidnih regij RepFIIA in RepFIB in njihovo prevalenco glede na dejavnike virulence, odpornosti proti antibiotikom in filogenetskimi skupinami. Podatke in izračune smo zbrali v preglednici 15.

Preglednica 15: Povezanost replikacijskih regij RepFIIA in RepFIB v enem sevu z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotikom in filogenetskimi skupinami pri zbirkah BJ, DL in TA.

Porazdelitev (N[%]) replikacijskih regij RepFIIA in RepFIB glede na dejavnike virulence, odpornost proti antibiotikom in filogenetske skupine.			
Prevalenca (št. [%] sevov)			
	(repFIIA+repFIB)+ (50[17])	(repFIIA+repFIB)- (252[83])	P vrednost
Dejavnik virulence			
<i>papGII</i>	13(26)	44(17)	0,1684
<i>papGIII</i>	3(6)	29(12)	0,3205
<i>sfaDE</i>	11(22)	74(29)	0,3892
<i>afa/draBC</i>	4(8)	5(2)	0,0444*
<i>hlyA</i>	9(18)	61(24)	0,4629
<i>cnfI</i>	10(20)	57(23)	0,8523
<i>usp</i>	21(42)	91(36)	0,4284
<i>iucD</i>	27(54)	99(39)	0,0605°
<i>tcpC</i>	9(18)	30(12)	0,2505
<i>traJ</i>	29(58)	58(23)	2,1×10 ⁻⁸ ***
Odpornost proti antibiotiku			
Ampicilin	30(60)	95(38)	0,0045**
Tetraciklin	21(42)	82(33)	0,2526
Ciprofloksacin	4(8)	30(12)	0,6238
Filogenetska skupina			
A	9(18)	51(20)	0,8470
B1	2(4)	25(10)	0,2764
B2	31(62)	120(48)	0,0879°
D	8(16)	56(22)	0,4483

Opombe: Statistično značilne vrednosti P, dobljene s Fisherjevim natančnim testom, so označene z *. Znak * pomeni $P < 0,05$; ** pomeni $P < 0,005$ in *** pomeni $P < 0,0005$; vse vrednosti smo za boljši pregled izpostavili z rdečim ozadjem. Vrednosti P, ki so na meji, da bi bile statistično značilne oziroma takrat ko je $0,05 > P < 0,10$ so v tabeli označeni z ° in z rumenim ozadjem. Z (*) smo označili vse seve, ki se povezujejo negativno statistično.

Sevi, ki hkrati vsebujejo RepFIIA in RepFIB se statistično povezujejo s sevi, ki vsebujejo *traJ* (P vrednost $2,1 \times 10^{-6}$) in *afa/draBC* (P vrednost 0,0444). Na meji statistične značilnosti se sevi z replikacijskima skupinama RepFIIA in RepFIB povezujejo z dejavnikom virulence *iucD*.

Sevi odporni proti ampicilinu se povezujejo s sevi, ki vsebujejo sočasno replikacijski regiji RepFIB in RepFIIA (P vrednost 0,0045).

Izračunali smo statistično mejno povezavo med sevi z replikacijskima skupinama RepFIIA in RepFIB in sevi, ki spadajo v filogenetsko skupino B2.

5 RAZPRAVA

5.1 PREVALENCA REPLIKACIJSKIH REGIJ RepFIIA, RepFIB IN IncP V ZBIRKAH SEVOV *E. COLI* BJ, DL IN TA.

S tehniko PCR smo hoteli ugotoviti prevalenco replikacijskih regij RepFIIA, RepFIB in IncP v zbirkah BJ, DL, TA. Nakar smo s Fisherjevim natančnim testom preverili statistično značilne povezave zbirk sevov z replikacijskimi regijami plazmidov. Pod drobnogled smo vzeli tudi povezave med preučevanimi replikacijskimi regijami in že znanimi rezultati dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotikom in filogenetskimi skupinami.

Preglednica 16: Primerjava prevalence preučevanih plazmidnih replikacijskih regij med zbirkami različnih študij.

Izvor zbirke sevov [število izolatov]	Prevalenca plazmidnih replikacijskih regij izražena v %			
	RepFIIA	RepFIB	IncP	RepFIIA+RepFIB
Naša študija				
Komenzalni sevi <i>E. coli</i> – zbirka BJ [90]	37	33	2	16
UPEC sevi – zbirka DL [110]	30	35	9	23
SSTI sevi <i>E. coli</i> – zbirka TA [102]	22	23	2	11
Študija Johnson in sod., 2007 in 2012				
Komenzalni sevi <i>E. coli</i> – ZDA [156]	1,3	44,9	1,3	1
UPEC sevi – ZDA [559]	3	32,9	0,7	2,5
NMEC sevi – Nizozemska [70]	1,4	85,7	11,4	NZ
Sevi <i>E. coli</i> izolirani iz nožnice žensk – Japonska [86]	0	66,3	2,3	NZ
APEC – ZDA [909]	12,8	84,8	19,4	0,9
Komenzalni sevi <i>E. coli</i> izolirani iz ptičev – ZDA [422]	4,7	32,7	8,1	0
Študija Moran in sod., 2015				
Komenzalni sevi <i>E. coli</i> – Avstralija [111]	56,8	58,6	0,9	48,6
Študija Abraham in sod., 2012; Abraham, 2011				
UPEC – Avstralija [159]	1,9	64,1	0,6	0
ETEC izolirani prašičev – Avstralija [73]	0	76,7	5,5	0
Komenzalni sevi <i>E. coli</i> izolirani iz prašičev – Avstralija [146]	0	47,9	5,5	0

NZ – podatek ni naveden

Plazmidi RepFIB so se izkazali kot najbolj razširjeni plazmidi med zbirkami *E. coli*. Najvišji odstotek smo izračunali pri zbirki UPEC sevov (35 %), nato pri komenzalnih sevih (33 %), najnižje število je vsebovala zbirka sevov *E. coli* SSTI (23 %). Največ odstopanja med različnimi študijami smo opazili pri plazmidni replikacijski regiji RepFIIA. Plazmidi z RepFIIA so precej razširjeni med sevi *E. coli*, kar lahko že sklepamo iz objavljenih

člankov in študij, ki navajajo precej veliko število plazmidov s prisotnostjo replikacijske regije RepFIIA (Villa in sod., 2010). Pri zbirkah BJ, DL in TA smo prav tako opazili visoke deleže prisotnosti zapisa replikacijske regije RepFIIA. Najvišji delež zapisov je vsebovala zbirka komezalov BJ 37 %, sledi ji zbirka UPEC sevov s 30 %, najnižje odstotke plazmidne replikacijske skupine RepFIIA je vsebovala zbirka sevov *E. coli* SSTI 22 %.

Med preučevanimi plazmidnimi replikacijskimi regijami so najmanj zastopani plazmidi inkompatibilnostne skupine IncP. Enake odstotke zapisov IncP je vsebovala zbirka sevov *E. coli* SSTI in zbirka komezalnih sevov (2 %), največji odstotek zapisov IncP je vsebovala zbirka sevov UPEC (9 %). Plazmidi inkompatibilnostne skupine IncP nosijo v večini gene odpornosti proti mnogim antibiotikom. Sklepamo, da so sevi UPEC po vsej verjetnosti bolj odporni proti antibiotikom, kot ostali sevi. Oziroma, da prisotnost plazmidov z replikacijsko skupino IncP nudi določene ugodnosti pri naselitvi in okužbi urinarnega trakta. Naša študija se sovpadala z ostalimi.

Kot smo pričakovali, smo v vseh zbirkah ugotovili pozitivne zapise za plazmidne replikacijske regije, vendar nobeno od preučevanih skupin ne moremo označiti kot značilno skupino za posamezno preučevano zbirko *E. coli*. Največ plazmidov smo ugotovili pri inkompatibilnostni skupini plazmidov F med katere spadata tudi RepFIIA in RepFIB. Tudi ostali članki navajajo takšne ugotovitve.

V preglednici 16 smo zbrali rezultate ostalih študij in jih primerjali z našimi rezultati. Johnson s sodelavci je leta 2007 ocenjeval prevalenco inkompatibilnostnih skupin plazmidov med zbirkami komezalnih sevov izoliranih iz človeških iztrebkov, zbirko sevov UPEC, izolatov ptičjih sevov iz ptic obolelih s kolibaceliozo, zdravih ptičev in maloprodajno perutnino (Johnson in sod., 2007). Leta 2012 so raziskavo razširili in primerjali zbirko sevov UPEC, zbirko komezalnih sevov ljudi in ptic, zbirko izolatov ptičjih sevov obolelih z kolibaceliozo, zbirko sevov *E. coli* izoliranih iz mikrobiote nožnice žensk na Japonskem in zbirko sevov NMEC izolirane na Nizozemskem (Johnson in sod., 2012).

Preučevali so plazmidno raznovrstnost med komezalnimi sevi tudi v Avstraliji. Moran in sodelavci so ugotovili visoko prisotnost plazmidov inkompatibilnostnih skupin RepFIIA (57 %) in RepFIB (59 %). Inkompatibilnostna skupina plazmida IncP je bila prisotna samo pri enem sevu (1 %) (Moran in sod., 2015).

Abraham (2011) in Abraham s sodelavci (2012) so v raziskavi izračunali zelo nizke odstotke replikacijske skupine RepFIIA in IncP (Abraham 2011; Abraham in sod., 2012).

Medtem, ko pri vseh študijah prevladuje replikacijska skupina RepFIB, kar smo opazili tudi pri naši študiji.

Med pregledom povezav med replikacijskimi regijami in patogenostjo smo pričakovali precej višje število replikacijskih regij pri patogenih izolatih kot komenzalnih, saj smo sklepali, da so dejavniki virulence in geni odpornosti na antibiotike zapisani na plazmidih, kar nudi patogenim *E. coli* prednost pri okužbi. Naša predvidevanja se niso izkazala za pravilna, kar potrjujejo tudi ostale študije. Pri patogenih sevih smo dobili nižje odstotke zapisov replikacijskih regij RepFIIA, najnižji odstotek je bil pri zbirki TA (sevi *E. coli* SSTI).

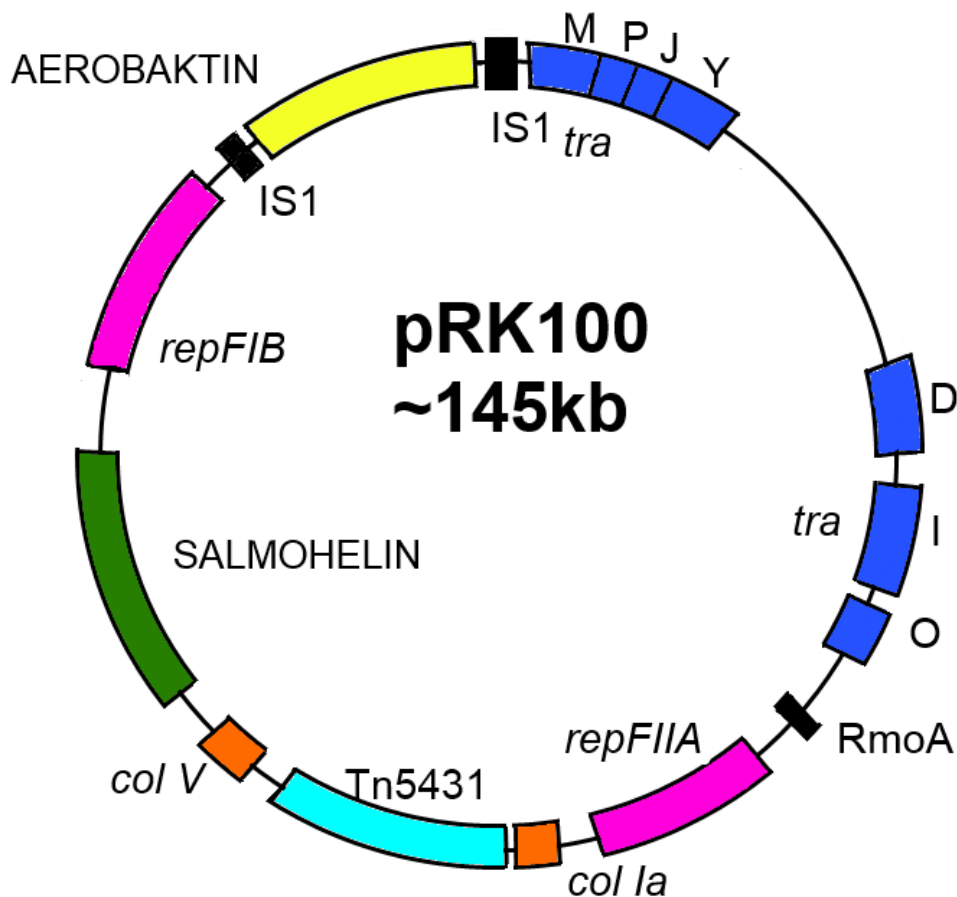
Rezultate bi lahko pojasnili z izvorom ExPEC, saj študije trdijo, da del UPEC in ostale ExPEC imajo izvor iz prebavil, so oportuno patogeni oziroma je patogenost povezana s specifičnostjo naselitve določenega ugodnega okolja. Pri tem ne povzročajo bolezenskih znakov kot del mikrobiote črevesja, kakor jih povzročajo črevesni patogeni, ki nikakor niso del naravne združbe (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2015).

Prav tako študije navajajo visok virulentni potencial komenzalnih sevov in njihove zmožnosti sprejema in razširjanja virulentnih genov in genov odpornosti proti antibiotikom (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2015).

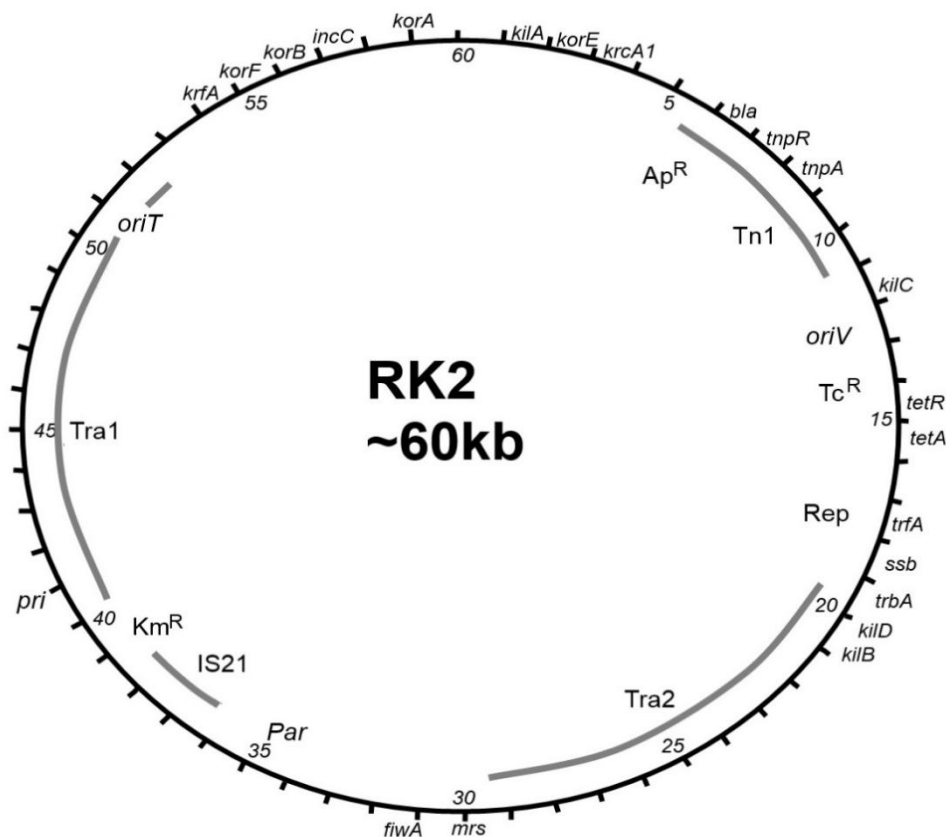
Bakterijske celice lahko vsebujejo več plazmidov oziroma plazmide z več replikoni, ki so mozaično sestavljeni plazmidi (Villa in sod., 2010; Starčič Erjavec, 2003). Takšni plazmidi imajo več replikacijskih regij, pri čemer je lahko aktivna ena ali pa celo obe/več regiji (Starčič Erjavec, 2003). Največ takšnih sevov je vsebovala zbirka sevov UPEC.

5.2 PREVALENCA REPLIKACIJSKIH REGIJ RepFIIA, RepFIB in IncP V POVEZAVI Z DEJAVNIKI VIRULENCE, ODPORNOSTJO PROTI ANTIBIOTIKOM IN FILOGENETSKIMI SKUPINAMI.

Pri študiji smo se osredotočili na povezave med replikacijskimi regijami RepFIIA, RepFIB in IncP pri zbirkah komenzalnih sevov *E. coli*, sevov UPEC in sevov SSTI *E. coli*. Poleg povezav med zbirkami in replikacijskimi regijami smo poiskali tudi povezave z dejavniki virulence, odpornosti proti antibiotikom in filogenetskimi skupinami. Ker se plazmidni inkompatibilnostni skupini F in P zelo razlikujeta, smo naredili mapi obeh predstavnikov inkompatibilnostnih skupin (Sliki 11 in 12) na kateri smo označili značilne gene ter njihovo razporeditev.



Slika 11: Mapa plazmida pRK100. Mapa prikazuje plazmid pRK100 in gene, ki jih ta plazmid vsebuje. Plazmid pRK100 vsebuje replikacijsko regijo RepFIIA in RepFIB, ki sta aktivni. Insercijske sekvence IS so označene s črnimi kvadrati. Transpozon Tn5431 ima zapisano odpornost proti ampicilinu in tetraciklinu. Pred vstavitvijo transpozona sta bili regiji *col V* in *col Ia* povezani. Replikacijska regija RepFIB se pogosto pojavlja s ColV-plazmidi, ki imajo večinoma tudi zapis za aerobaktinski sistem privzema železa. Aerobaktin pogosto obdajata na koncih insercijske sekvence IS1. Plazmid pRK100 ima tudi genski zapis za povečano rezistenco proti serumu (*traT* in *iss*) (Ambrožič in sod., 1998).



Slika 12: Mapa organizacije genov na plazmidu RK2. Plazmid RK2 je tipičen IncP-1 plazmid. Vsebuje zapise za odpornost proti kanamicinu, tetraciklinu in ampicilinu. RK2 vsebuje gene *kil* in nabor genov traskripcijskih represorjev (*kor*), ki inaktivirajo gene *kil*. Začetek replikacije je *oriV*, medtem ko je začetek konjugacije *oriT*. Konjugativen prenos omogočajo geni zbrani v dveh regijah Tra1 in Tra2 (Waters, 1999).

RepFIIA in RepFIB se pogosto nahajata na plazmidih F, ki so zelo razširjeni med sevi *E. coli* (Johnson in sod. 2007, Johnson in sod. 2012). Ugotovili smo, da večina preučevanih virulentnih genov spada med kromosomsko zapisane gene, nekatere najdemo kot del otokov patogenosti. Dokazali smo, da dejavniki virulence, ki niso povezani s plazmidi se tudi pri naši študiji niso povezovali z replikacijskimi regijami. Za takšne so se izkazali tudi nekateri dejavniki virulence v tej študiji: *papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *hlyA*, *cnfI*, *usp*, *tcpC*.

Za aerobaktinski sistem privzema železa potrebujemo 4 gene *iucABCD* in gen, ki kodira zunajcelični membranski receptor *iutA* (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011). Vsi geni so zapisani na operonu kot del otoka patogenosti ali na plazmidu. Pri sevih s prisotnimi replikacijskimi regijami RepFIB in RepFIIA so višji odstotki prisotnosti gena *iucD* glede na tiste seve, ki teh replikacijskih regij ne vsebujejo. Rezultati so statistično značilni, zato seve z dejavnikom virulence *iucD* lahko povežemo z replikacijskima regijama RepFIIA in RepFIB. Povezav med *iucD* in plazmidno replikacijsko regijo IncP nismo ugotovili.

Za plazmide inkompatibilostne skupine F je značilna regija *tra* in preučevani gen *traJ* se je statistično povezoval z replikacijskimi regijami RepFIIA in RepFIB. Ne moremo pa *tra* regije povezovati s plazmidi inkompatibilnostne skupine IncP, saj ta inkompatibilnostna skupina plazmidov ne vsebuje regije *tra* oz. je regija *tra* drugačna, kot lahko vidimo tudi na mapah plazmidov s slik 11 in 12. Operon *tra* je odgovoren za konjugacijo in prenos plazmidov iz ene v drugo celico. Operon *tra* je sestavljen 35 genov. TraJ je pozitiven regulator in se nahaja na začetku operona *tra*. Poleg *traJ* gena, ki smo ga preučevali v tej študiji se v operonu nahaja tudi *traT* gen. TraT je dejavnik virulence. Najdemo ga pri 50 % septičnih sevov *E. coli* in 68 % uropatogenih *E. coli*, kar ga uvršča med najbolj prevalentne dejavnike virulence patogenih *E. coli*. TraT je površinski izključevalni protein pri konjugaciji in je znan kot protein, ki povečuje rezistenco proti serumu (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011). Predvidevamo, da sevi, ki vsebujejo gene *traJ* vsebujejo celoten operon *tra* in so zmožni konjugacije.

Seve *E. coli*, ki imajo adhezine družine Afa/Dr, povezujejo z urinarnimi in črevesnimi infekcijami. Poznanih je 13 skupin adhezinov, ki so zapisani na operonih z najmanj 5 genov. Gena *A* in *D* sta zelo ohranjena, medtem ko je gen *E* variabilen in kodira vezavni del molekule adhezina (Servin, 2005). Sevi, ki vsebujejo replikacijsko skupino RepFIB se statistično povezujejo z *afa/draBC*, pri ostalih inkompatibilnostnih skupinah tega nismo ugotovili. Povezanost RepFIB z *afa/draBC* verjetno izvira iz evlucijskega razvoja, saj domnevajo, da *afa3* izhaja iz plazmida. Navzgor od genov *afa3* se nahaja regija velikosti 1,2 kb, ki je 96 % podobna replikacijski regiji RepFIB plazmida P307 enterotoksogene *E. coli* (Servin, 2005).

Analizirali smo seve z replikacijskima regijama RepFIIA in RepFIB. Pri takšnih sevih sklepamo, da lahko vsebujejo bodisi vsaj dva enostavna plazmida (plazmid z replikacijsko regijo RepFIIA in plazmid z replikacijsko regijo RepFIB), bodisi mozaične plazmide (plazmid z več replikacijskimi regijami). Rezultati sevov z replikacijskimi regijami RepFIIA in RepFIB se ne razlikujejo glede na posamezne replikacijske regije, zato iz rezultatov ne moremo povzeti nobenih zaključkov o bakterijskih sevih z več plazmidi oz. z mozaično sestavljenimi plazmidi.

Pri študijah smo dokazali, da se nekateri geni dejavnikov virulence povezujejo z replikacijskimi regijami. Določeni dejavniki virulence se izključno povezujejo z določenimi inkompatibilnostnimi skupinami pri plazmidih.

Rezultati se sovpadajo z ostalimi študijami. Abraham in sodelavci 2011 je preučeval *papC*, *papGI*, *papGII*, *papGIII* (P fimbrijski adhezini), *fimH* (adhezini tipa I), *sfaS* (S fimbrijski adhezini), *focG* (F1C fimbrijska podenota proteina), *afa/draBC* (adhezini družine Afa/Dr),

flu (antigen 43), *hlyA* (hemolizin), *cnf1* (citotoksični nekrotizirajoči faktor I), *fyuA* (jersinijabaktinski receptor), *iutA* (aerobaktinski receptor), *iroN* (salmohelinski receptor), *kpsMTIII* (ovojnica skupine 3), *kpsMTII* (ovojnica skupine 2), *kpsMT K1* (ovojnica skupine 1), *kpsMT K5* (ovojnica skupine 5) gene, kjer pri nobenem ni ugotovil povezave s plazmidi skupin FIB, FIIA in IncP (Abraham in sod., 2011).

Johnson s sodelavci v študiji povezuje plazmidno skupino IncFIB z geni za kapsule *kI*, *kII*, *malPAI*, *ibeA*, *fyuA*, *cvaC* (operon kolicina ColV), *iss* (geni povešujejo odpornost proti serumu), *iutA*, *traT*, and *fliC* (flagelin kodirajoči geni) (Johnson in sod., 2012).

V zgodovini so plazmide, ki vsebujejo gene odpornosti proti antibiotikom poimenovali kot R-plazmide. Preverjali smo povezanost rezistenc proti ampicilinu, tetraciklinu in ciprofloksacinu z replikacijskimi regijami RepFIIA, RepFIB in IncP. Veliko študij je že ugotavljajo povezavo plazmidov z rezistencami proti antibiotikom in tudi mi smo pričakovali, da bomo v sevih z replikacijskimi regijami našli višjo odpornost proti antibiotikom glede na tiste, ki replikacijskih regij ne vsebujejo.

Replikacijska regija RepFIIA ima najvišji odstotek povezave z odpornostjo proti ampicilinu, takšnih sevov je bilo 44 (50 %), a glede na statistično oceno ne moremo trditi, da je odpornost proti ampicilinu v povezavi z replikacijsko regijo RepFIIA. RepFIB se povezuje z odpornostjo proti ampicilinu, kar lahko tudi opazimo pri študiji Morana s sodelavci (Moran in sod., 2015).

Članek Johnsona s sodelavci pa povezuje replikacijsko regijo IncP s odpornostjo proti tetraciklinu (Johnson in sod., 2012), kar se je izkazalo tudi pri naši študiji. Odpornost proti ciprofloksacinu je edina od preučevanih rezistenc proti antibiotikom, ki se ni povezovala z nobeno replikacijsko regijo, kar smo tudi pričakovali, saj se rezistenca proti ciprofloksacinu izraža kot mutacija DNA-giraze in permeabilnosti membrane, obe lastnosti sta zapisani na kromosomu.

Sevi, ki vsebujejo sočasno replikacijski regiji RepFIIA in RepFIB ne odstopajo glede na seve s prisotnostjo samo ene od regij. Za te seve smo izračunali statistično povezavo z odpornostjo proti ampicilinu glede na ostale skupine zbirk.

Nobenih statističnih povezav nismo izračunali pri primerjavi rezultatov filogenetskih skupin in replikacijskih regij plazmidov, kar smo tudi pričakovali glede na predhodne objave.

Kakor smo ugotovili, v določenih parametrih naša študija odstopa od predhodnih objavljenih raziskav, v določenih pa se sovpada. To predvsem lahko pripisujemo različni

geografski legi in posledično različnem življenjskem načinu prebivalcev. Vse več je objav o vplivu geografske lege na filogenetske porazdelitve med bakterijami *E. coli* (Bailey in sod., 2010; Duriez in sod., 2001), razlikah med dejavniki virulence, razlikah v odpornosti proti antibiotikom (Allocati in sod., 2013). Zato lahko predvidevamo, da so razlike tudi v vsebnosti plazmidov.

Takšne študije nam omogočajo vpogled v razvoj mikrobiote ter opredeliti vplive, ki jo spreminjajo. Omogočajo nam tudi spremljanje prenosa genov odpornosti proti antibiotikom in pravilno načrtovanje uporabe antibiotikov.

6 SKLEPI

- V preučevanih zbirkah sevov *E. coli* smo opazili prisotnost plazmidnih replikacijskih regij RepFIIA, RepFIB in IncP, pri čemer so razlike v prevalencah med tremi preučevanimi zbirkami (DL, TA in BJ) zelo majhne.
- Plazmidi inkompatibilnostnih skupin RepFIIA, RepFIB in IncP niso v povezavi s filogenetskimi skupinami.
- Sevi z replikacijsko regijo RepFIIA so statistično značilno povezani z odpornostjo proti ampicilinu in sevi z replikacijsko regijo IncP so statistično značilno povezani s odpornostjo proti tetraciklinu.
- Nekaj dejavnikov virulence je zapisanih tudi na plazmidih, a niso značilno povezani z replikacijskimi skupinami IncP, RepFIIA in RepFIB plazmidov.
- Gen *traJ*, ki je eden od genov operona *tra* in sodeluje pri konjugacijskem prenosu za plazmidov tipa F je povezan in zapisan na plazmidih, ki so sposobni konjugacije v našem primeru sta to inkompatibilnostni skupini RepFIIA oz. RepFIB.

7 POVZETEK

Bakterije vrste *E. coli* so del naravne črevesne flore ljudi in toplokrvnih živali. Nekateri sevi so patogeni in povzročajo črevesne bolezni, sepse, meningitis ter infekcije sečil.

Sposobnost, da sevi vrste *E. coli* povzročijo bolezen, je odvisna od prisotnosti genetskih zapisov za različne dejavnike virulence, ki bakterijam omogočijo kolonizacijo novih ekoloških niš v gostitelju, invazijo globljih celičnih plasti ter preživetje v gostitelju. Te lastnosti so lahko zapisane na kromosomih, pogosto v otokih patogenosti ali pa na zunajkromosomskih elementih med katere spadajo tudi plazmidi.

Plazmidi imajo od kromosoma neodvisno samostojno pomnoževanje, svojevrstno evolucijo in pogosto tudi možnost prenosa med sevi, včasih tudi med bakterijskimi vrstami in celo rodovi. Pogosto so ključni za spremembo mikrobne populacije, saj ti elementi spodbujajo razširjanje lastnosti, kot so virulenca, izboljšana rast, odpornost proti antibiotikom in metaboliziranje redkih hranil.

Plazmide so prvič identificirali pri družini *Enterobacteriaceae*, kasneje so jih našli v vseh rodovih in kraljestvih. Bolj pogosto se pojavljajo pri arhejah in bakterijah, kjer predstavljajo tudi do 25 % skupnega genetskega materiala.

Poznamo dva tipa plazmidov, nekonjugativne in konjugativne. Konjugativni plazmidi so plazmidi, ki imajo zapise za prenos DNA v recipientsko celico s tesnim stikom t. i. konjugacijo, medtem ko nekonjugativni, genov ne vsebujejo in niso zmožni konjugacije. Današnja delitev plazmidov temelji na inkompatibilnostnih skupinah. Inkompatibilnost (Inc) dveh plazmidov ugotavljajo na podlagi zmožnosti koeksistence plazmidov v isti gostiteljski celici. Ugotovili so namreč, da se v primeru plazmidov z enakim replikacijskim mehanizmom, eden od plazmidov izgubi. Zaenkrat ločimo 26 inkompatibilnostnih skupin, a le nekaj od teh je povezanih z virulenco *E. coli*. Plazmidi povezani z virulenco večinoma pripadajo inkompatibilnostni skupini IncF.

Z metodo PCR smo naredili pregled replikacijskih regij RepFIIA, RepFIB in IncP med zbirkami komenzalnih sevov *E. coli* – BJ zbirka sevov; zbirke sevov *E. coli*, izoliranih iz infekcij kože in mehkih tkiv – TA zbirka sevov in zbirke sevov *E. coli*, izoliranih iz urinarnih infekcij – DL zbirka sevov.

Ugotovili smo prisotnost replikacijskih regij plazmidov pri vseh zbirkah sevov, vendar za nobeno zbirko ne moremo trditi, da je zbirka sevov statistično povezana z katero od replikacijskih regij. Nismo opazili tudi odstopanja v prisotnosti replikacijskih regij med

patogenimi sevi in komenzalnimi sevi. Replikacijsko regijo RepFIIA je vsebovalo 33 (37 %) sevov zbirke BJ, 33 (30 %) sevov zbirke DL in 22 (22 %) sevov zbirke TA. Replikacijsko regijo RepFIB je vsebovalo 30 (33 %) sevov zbirke BJ, 39 (35 %) sevov zbirke DL in 23 (23 %) sevov zbirke TA. Replikacijsko regijo IncP sta vsebovala 2 (2 %) seva zbirke BJ, 10 (9 %) sevov zbirke DL in 2 (2 %) seva zbirke TA.

Zaradi prisotnosti plazmidov z več replikacijskimi regijami pri katerih je velikokrat med replikacijo aktivna ena replikacijska regija lahko pa tudi več smo se odločili tudi te seve opredeliti. Seve z zapisi RepFIIA in RepFIB je v zbirki sevov BJ 14 (16 %), v zbirki sevov DL 25 (23 %) in v zbirki sevov TA 11 (11 %). Sevov z vsemi tremi replikacijskimi regijami so vsebovale samo patogene zbirke DL 5 (5 %) in TA 1 (1 %).

Poleg prisotnosti replikacijskih regij med zbirkami sevov smo si pogledali tudi prevalence zapisov replikacijskih skupin RepFIIA, RepFIB, IncP med dejavniki virulence *papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *hlyA*, *cnfI*, *usp*, *iucD*, *tcpC* in *traJ*; odpornostmi proti atibiotikom ampicilin, tetraciklin in ciprofloksacin ter filogenetskimi skupinami.

Replikacijska skupina RepFIIA se statistično povezuje z dejavnikoma virulence *iucD* in *traJ*. RepFIB se je statistično povezovala z *afa/draBC*, *iucD*, *traJ*. Za replikacijsko skupino IncP ni značilen noben od preučevanih dejavnikov virulence. Sevi, ki so vsebovali hkrati zapise za RepFIIA in RepFIB so statistično povezani z *afa/draBC* in *traJ*.

Odpornost proti ampicilinu je značilna za seve, ki vsebujejo RepFIB in seve, ki vsebujejo hkrati RepFIIA in RepFIB. Sevi, ki vsebujejo RepFIIA so na meji statistične značilnosti. Odpornost proti tetraciklinu se povezuje s sevi, ki vsebujejo replikacijsko skupino IncP. Preučevane replikacijske skupine se ne povezujejo z odpornost proti ciprofloksacinu.

Med filogenetskimi skupinami in preučevanimi regijami nismo opazili povezav.

8 VIRI

- Abraham S. 2011. Molecular characterization of commensal and pathogenic *Escherichia coli* that colonise human urinary tract and the porcine gastrointestinal tract and the development of whole cell biosensors to evaluate bacteriocin mediated bacterial interactions. Doctor of Philosophy Thesis. Wollongong, School of Biological Sciences, University of Wollongong: 151 str.
- Abraham S., Chapman T.A., Zhang R., Chin J., Mabbett A.N., Totsika M., Schembri M.A. 2012. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains that cause symptomatic and asymptomatic urinary tract infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 3: 1027-1030.
- Adamczyk M., Jagura-Burdzy G. 2003. Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta Biochimica Polonica*, 50, 2: 425-453.
- Allocati N., Masulli M., Alexeyev M. F., Di Ilio C. 2013. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 12: 6235-6254.
- Ambrožič J., Ostroveršnik A., Starčič M., Kuhar I., Grabnar M., Žgur-Bertok Darja. 1998. *Escherichia coli* ColV plasmid pRK100: Genetic organisation, stability and conjugal Transfer. *Microbiology*, 144: 343-352.
- Bailey J. K., Pinyon J. L., Anantham S., Hall R. M. 2010. Distribution of human commensal *Escherichia coli* phylogenetic groups. Letters to the Editor. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 9: 3455-3456.
- Carlos C., Pires M. M., Stoppe N. C., Hachich E. M., Sato M. I., Gomes T. A., Amaral L. A., Ottoboni L. M. 2010. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiology*, 10.161, doi: 10.1186/1471-2180-10-161: 10 str.

- Carattoli A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 6: 2227-2238.
- Chaudhari K. 2014. *Microbial genetics*. New Delhi, The Energy and Resources Institute, TERI Press: 208-217.
- Croxen M. A., Finlay B. B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 1: 26-38.
- Čitar M. 2010. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 97 str.
- Duriez P., Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E., Chaventré A., Elion J., Picard B., Denamur E. 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*, 147, 6: 1671-1676.
- Espinosa M., Cohen S., Couturier M., Solar G. del, Díaz-Orejas R., Giraldo R., Jániniere L., Miller C., Osborn M., Thomas C.M. 2000. Plasmid replication and copy number control. V: *The horizontal gene pool – bacterial plasmids and gene spread*. Thomas C. M. (ed.). Amsterdam, Harwood academic publishers: 1-47.
- Gibbs M. D., Spiers A. J., Bergquist P. L. 1993. RepFIB: a basic replicon of large plasmids. *Plasmid*, 29, 3: 165-179.
- Johnson T. J., Logue C. M., Johnson J. R., Kuskowski M. A., Sherwood J. S., Barnes H. J., DebRoy C., Wannemuehler Y. M., Obata-Yasuoka M., Spanjaard L., Nolan L. K. 2012. Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9, 1: 37-46.
- Johnson T.J., Nolan L.K. 2009. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, 4: 750-774.

Komac S. Replikacijska regija RepFIIA, RepFIB in IncP plazmidov v izolatih bakterije *Escherichia coli*.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2015

Johnson T. J., Wannemuehler Y. M., Johnson S. J., Logue C. M., White D. G., Doetkott C., Nolan L. K. 2007 Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6: 1976-1983.

Jorgensen I., Seed P. C. 2012. How to make it in the urinary tract: a tutorial by *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens*, 8, 10, doi: 10.1371/journal.ppat.1002907: 4 str.

Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 2: 123-140.

Kerckhoffs A. P. M., Samsom M., P. van Berge Henegouwen G., Akkermans L. M. A., Nieuwenhuijs V. B., Visser M. R. 2006. 2 Sampling microbiota in the human gastrointestinal tract. V: *Gastrointestinal microbiology*. Ouwehand A. C., Vaughan E. E. (eds.). New York, Taylor & Francis: 22-50.

Moat A. G., Foster J. W., Spector M. P. 2002. *Microbial physiology*. 4th ed. New York, Wiley-Liss, Inc.: 101-167.

Moran R. A., Anantham S., Pinyon J. L., Hall R. M. 2015. Plasmids in antibiotic susceptible and antibiotic resistant commensal *Escherichia coli* from healthy Australian adults. *Plasmid*, 80: 24-31.

Osborn C. E. 2006. *Statistical applications for health information management*. Ohio, Jones and Bartlett Publishers, Inc: 261-263.

Petkovšek Ž., Eleršič K., Gubina M., Žgur-Bertok D., Starčič Erjavec M. 2009. Virulence potential of *Escherichia coli* isolates from skin and soft tissue infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 6: 1811-1817.

Petrovska M. 2002. Okužbe sečil. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 379-382.

- Popowska M., Krawczyk-Balska A. 2013. Broad-host-range IncP-1 plasmids and their resistance potential. *Frontiers in Microbiology*, 4: 44, doi: 10.3389/fmicb.2013.00044: 8 str.
- Russo T. A., Johnson J. R. 2009. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. V: *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases*. Barrett A. D. T., Stanberry L. R. (eds.). Oxford, Elsevier Inc: 940-954.
- Scheutz F., Strockbine N. A. 2005. Genus I. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941T^{AL}. 2007. V: *Bergey's manual® of systematic bacteriology*. Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: The *Gammaproteobacteria*. 2nd ed. Garrity G., Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. R. (eds.). New York, Springer-Verlag New York Inc.: 607-624.
- Servin A. L. 2005. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 2: 264-292.
- Slovenski medicinski slovar. 2014. Kamišnik M., Radšel-Medvešček A., Sever-Jurca D., Sket D. (ur.). 5. razširjena izd. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta. Amebis, d. o. o.: 1298 str.
- Sobecky P. A., Mincer T. J., Chang M. C., Helinski D. R. 1997. Plasmids isolated from marine sediment microbial communities contain replication and incompatibility regions unrelated to those of known plasmid groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3: 888-895.
- Starčič Erjavec M. 2003. Mosaic structure and regulation of conjugal transfer of the *Escherichia coli* plasmid pRK100. Ph.D. Thesis. Utrecht, Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Infectious Diseases and Immunology: 112 str.
- Starčič Erjavec M., Žgur-Bertok D. 2011 Extended characterization of human uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Slovenia. V: *Clinical management of complicated urinary tract infection*. Nikibakhsh A. (ed.). Rijeka, InTech: 33-50.

Starčič Erjavec M., Žgur-Bertok D. 2006. The RepFIIA replicon of the natural *Escherichia coli* plasmid pRK100. Replikon RepIIA naravnega plazmida pRK100 bakterije *Escherichia coli*. Acta biologica Slovenica, 49, 2: 3-12.

Starčič Erjavec M., Žgur-Bertok D. 2015. Virulence potential for extraintestinal infections among commensal *Escherichia coli* isolated from healthy humans – the Trojan horse within our gut. FEMS Microbiology Letters, 362, 5: fnu061, doi: 10.1093/femsle/fnu061: 9 str.

Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology, 8, 3: 207-217.

Touchon M., Hoede C., Tenaillon O., Barbe V., Baeriswyl S., Bidet P., Bingen E., Bonacorsi S., Bouchier C., Bouvet O., Calteau A., Chiapello H., Clermont O., Cruveiller S., Danchin A., Diard M., Dossat C., Karoui E. M., Frapy E., Garry L., Ghigo J. M., Gilles A. M., Johnson J., Le Bougue´nec C., Lescat M., Mangenot S., Martinez-Je´hanne V., Matic I., Nassif X., Oztas S., Agne`s Petit M., Pichon C., Rouy Z., Saint Ruf C., Schneider D., Tourret J., Vacherie B., Vallenet D., Me´digue C., P. C. Rocha E., Denamur E. 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. PLoS Genetics, 5, 1: e1000344, doi: 10.1371/journal.pgen.1000344: 25 str.

Villa L., Garcí­a-Fernández A., Fortini D., Carattoli A. 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65, 12: 2518-2529.

Waters V. L. 1999. Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. Frontiers in Bioscience, 1, 4: 433-456.

Welch R. A. 2006. The genus *Escherichia*. V: Prokaryotes. Vol. 6. Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H., Stackebrandt E (eds.). New York, Springer Science Business Media: 60-71.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem moji mentorici prof. dr. Darji Žgur-Bertok in somentorici prof. dr. Marjanci Starčič Erjavec za mentorstvo in strokovno vodenje pri nastanku diplomske naloge.

Zahvaljujem se recenzentu doc. dr. Tomažu Accetto za hiter, strokoven pregled in končno podobo diplomske naloge.

Zahvaljujem se vsem zaposlenim na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov za pomoč in uporabne praktične nasvete pri delu v laboratoriju.

Največja zahvala gre mojima staršema, sestri Snežani in možu Mladenu za moralno podporo in potrpljenje.

Hvala vsem, ki so mi na poti v času šolanja stali ob strani, mi pomagali, me spodbujali, da je bila ta pot lažja.

PRILOGE

Priloga A: Pregled rezultatov sevov *E. coli* zbirke BJ in prevalenca replikacijskih regij *repFIIA*, *repFIB* in *incP* s PCR metodo.

Sev	<i>repFIIA</i>	<i>repFIB</i>	<i>incP</i>	Sev	<i>repFIIA</i>	<i>repFIB</i>	<i>incP</i>
BJ1	0	0	1	BJ47	1	1	0
BJ2	1	1	0	BJ48	0	0	0
BJ3	0	0	0	BJ49	0	0	0
BJ4	1	1	0	BJ50	0	0	0
BJ5	0	0	0	BJ51	1	1	0
BJ6	0	0	0	BJ52	0	0	0
BJ7	1	0	0	BJ53	1	0	0
BJ8	1	0	0	BJ54	0	1	0
BJ9	1	1	0	BJ55	0	0	0
BJ10	1	1	0	BJ56	0	0	0
BJ11	0	0	0	BJ57	0	0	0
BJ12	1	1	0	BJ58	0	0	0
BJ13	1	0	0	BJ59	1	1	0
BJ14	1	0	0	BJ60	0	1	0
BJ15	1	0	0	BJ61	0	0	0
BJ16	0	0	0	BJ62	0	0	0
BJ17	1	0	0	BJ63	1	1	0
BJ18	0	1	0	BJ64	0	1	0
BJ19	0	0	0	BJ65	0	0	0
BJ20	1	1	0	BJ66	0	0	0
BJ21	0	0	0	BJ67	0	0	0
BJ22	0	0	0	BJ68	0	1	0
BJ23	0	0	0	BJ69	1	0	0
BJ25	0	0	0	BJ70	0	0	0
BJ26	0	0	0	BJ71	1	0	0
BJ27	0	0	0	BJ72	0	0	0
BJ28	1	0	0	BJ73	0	1	0
BJ29	1	0	0	BJ74	0	1	0
BJ30	0	0	0	BJ75	0	1	0
BJ31	0	0	0	BJ76	0	1	0
BJ32	0	0	0	BJ77	1	1	0
BJ33	0	0	0	BJ78	1	0	0
BJ34	1	1	0	BJ79	0	0	0
BJ35	0	0	0	BJ80	0	1	0
BJ36	0	0	0	BJ82	0	1	0
BJ37	1	1	0	BJ83	1	0	0
BJ38	1	0	0	BJ84	0	0	0
BJ39	0	0	0	BJ88	0	1	0
BJ40	0	0	0	BJ89	1	0	0
BJ41	0	0	0	BJ92	0	1	0
BJ42	1	0	0	BJ93	0	1	1
BJ43	1	0	0	BJ94	0	1	0
BJ44	0	0	0	BJ95	1	0	0
BJ45	0	0	0	BJ96	1	0	0
BJ46	1	1	0	BJ97	0	1	0

Opomba: 1 – pozitiven rezultat, 0 – negativen rezultat

Priloga B: Pregled rezultatov sevov *E. coli* zbirke DL in prevalenca replikacijskih regij *repFIIA*, *repFIB* in *incP* s PCR metodo.

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

Opomba: 1 – pozitiven rezultat, 0 – negativen rezultat

Priloga C: Pregled rezultatov sevov *E. coli* zbirke TA in prevalenca replikacijskih regij *repFIIA*, *repFIB* in *incP* s PCR metodo.

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

Opomba: 1 – pozitivni rezultat, 0 – negativni rezultat

Priloga D: Podatki o sevih *E. coli* zbirke komenzalnih sevov, dobljeni v predhodnih raziskavah (Čitar, 2010).

Oznaka seva	Filog. sk.	Filog. podsk.	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnfI</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	<i>traJ</i>	Amp	Cip	Tc
BJ1	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
BJ2	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	S
BJ3	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
BJ4	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	R
BJ5	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ6	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ7	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	S	S	S
BJ8	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ9	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	S	S	S
BJ10	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	S	S	S
BJ11	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
BJ12	D	D1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	S	S	S
BJ13	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ14	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ15	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	R
BJ16	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	S
BJ17	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ18	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	S	S
BJ19	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	S	S	S
BJ20	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	S
BJ21	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	R	R
BJ22	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
BJ23	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	S	S	S
BJ25	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ26	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	S
BJ27	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	R	S	S
BJ28	D	D2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	R	S	S
BJ29	D	D1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	S	S	S
BJ30	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	S	S	S
BJ31	B2	B2 ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ32	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	S	S	S
BJ33	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	S	S	S
BJ34	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	S	S	S
BJ35	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ36	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ37	D	D1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ38	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	S	S	S
BJ39	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ40	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
BJ41	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ42	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	S	S	S
BJ43	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
BJ44	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	S	S	R
BJ45	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ46	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	S	S	S
BJ47	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	S
BJ48	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ49	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ50	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
BJ51	B2	B2 ₃	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	S	S	S
BJ52	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ53	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	R	R
BJ54	D	D2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	R	S	R
BJ55	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ56	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ57	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	S	S	I
BJ58	B2	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	S	S	S
BJ59	A	A1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	R	S	S
BJ60	D	D1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
BJ61	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	I
BJ62	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ63	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	S	S
BJ64	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	R
BJ65	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ66	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	I
BJ67	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	S	S	S
BJ68	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	S	S	I
BJ69	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
BJ70	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	R
BJ71	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	S
BJ72	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	S	R

Opomba: 1 – pozitivni rezultat, 0 – negativni rezultat, R – odporen, S – občutljiv, I – intermediaren, N – ni bilo določeno.

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge D: Podatki o sevih *E. coli* zbirke komenzalnih sevov, dobljeni v predhodnih raziskavah (Čitar, 2010).

Oznaka seva	Filog. sk.	Filog. podsk.	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnfI</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	<i>traJ</i>	Amp	Cip	Tc
BJ73	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	S	R
BJ74	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	R
BJ75	D	D2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ76	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ77	D	D1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	R	S	S
BJ78	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	S	S	S
BJ79	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	I	S	S
BJ80	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ82	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ83	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
BJ84	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ88	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	I
BJ89	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	S	S	I
BJ92	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
BJ93	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	S	S	S
BJ94	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	S
BJ95	B2	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	S	S	S
BJ96	B2	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	S	S	S
BJ97	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	S	S	S

Opomba: 1 – pozitivni rezultat, 0 – negativni rezultat, R – odporen, S – občutljiv, I – intermediaren, N – ni bilo določeno.

Priloga E: Podatki o sevih *E. coli* zbirke SSTI, dobljeni v predhodnih raziskavah (Čitar, 2010).

Oznaka seva	Filog. sk.	Filog. podsk.	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnfI</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	<i>traJ</i>	Amp	Cip	Tc
TA3	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	S	S	S
TA5	B2	B2 ₂	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	S	S	S
TA6	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA7	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	S	S	S
TA8	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	R	S	S
TA10	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	R	S	S
TA11	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	R	S	S
TA16	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	R	S	S
TA18	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	S
TA20	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	S	S	N
TA24	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
TA25	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	S	S	S
TA26	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	S	S	S
TA27	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	S	R	S
TA30	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	S	S
TA31	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	R	S	S
TA33	B1	B1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	R	R	R
TA35	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	R	S
TA36	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA37	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	S	S	S
TA42	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	S
TA43	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	R	R
TA44	B2	B2 ₃	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	S	S	S
TA45	B2	B2 ₂	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	R	S	S
TA46	B2	B2 ₂	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	R	S	S
TA49	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
TA50	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	R	S	R
TA55	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	S	S	S
TA56	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	R	S	S
TA57	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA60	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA65	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	S	S	S
TA67	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	S	S	S
TA70	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	S	S	S
TA71	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	S
TA72	A	A1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	S	S	R
TA73	B2	B2 ₂	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	S	R	S
TA81	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	S	S	R
TA82	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	S	S	S
TA83	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	R	R
TA84	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	R	R
TA85	B2	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	R	S	S
TA91	D	D1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
TA93	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
TA94	B2	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	S	S	S
TA95	B2	B2 ₂	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	S	S	S
TA96	B2	B2 ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	S	S	S
TA99	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	R	S	S
TA101	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	R	S	S
TA103	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
TA106	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	R	R
TA107	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA110	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	S	S	S
TA112	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA113	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	S	S	S
TA115	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	S
TA116	D	D1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	S	S	S
TA117	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	S
TA118	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	R	S
TA127	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	R
TA128	D	D1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	R	R
TA129	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	R	S	S
TA130	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	S	S	S
TA131	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	S	R	S
TA133	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	S	S	S
TA136	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	S	S	S
TA140	A	A0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA142	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	S	S	S
TA143	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	I
TA144	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	S	S	S
TA147	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	R	S	R

Opomba: 1 – pozitivni rezultat, 0 – negativni rezultat, R – odporen, S – občutljiv, I – intermediaren, N – ni bilo določeno.

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge E: Podatki o sevih *E. coli* zbirke SSTI, dobljeni v predhodnih raziskavah (Čitar, 2010).

Oznaka seva	Filog. sk.	Filog. podsk.	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnfI</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	<i>traJ</i>	Amp	Cip	Tc
TA155	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	R	S	S
TA156	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	S	S	S
TA157	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	S
TA158	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	R	R	R
TA161	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	R	S	S
TA162	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA168	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	R	R	R
TA169	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
TA171	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	R	R
TA174	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R
TA176	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
TA178	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	R	R
TA179	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	S	S	S
TA180	D	D2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
TA183	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	S	S	S
TA186	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	I	R
TA188	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	S	S	S
TA192	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	S	S	S
TA194	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	R
TA195	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	R	R
TA196	D	D1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	S	S	S
TA198	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	S	R
TA199	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	S	S	S
TA203	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	S	S	S
TA206	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	R	S
TA207	B2	B2 ₂	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	R	S	S
TA208	B2	B2 ₃	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	R	S	R
TA209	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	R	S	S
TA210	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	R	S
TA213	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	S	S	S
TA216	B1	B1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S

Opomba: 1 – pozitivni rezultat, 0 – negativni rezultat, R – odporen, S – občutljiv, I – intermediaren, N – ni bilo določeno

Priloga F: Podatki o sevih *E. coli* zbirke UTI, dobljeni v predhodnih raziskavah (Čitar, 2010).

Oznaka seva	Filog. sk.	Filog. podsk.	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnfI</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	<i>traJ</i>	Amp	Cip	Tc
DL1	B2	B2 ₃	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	S	S	S
DL2	B2	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL3	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	S	S	S
DL4	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
DL5	B2	B2 ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL6	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	R
DL7	B2	B2 ₂	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	S	R
DL8	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	R	R
DL9	B2	B2 ₂	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	S	R
DL10	A	A0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	S	S	R
DL11	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL12	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	R	S	R
DL13	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	R	S	R
DL14	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	S	R
DL15	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
DL16	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	R	S	S
DL17	D	D1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL18	B2	B2 ₂	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	S	S	S
DL19	D	D1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL20	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL21	D	D1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	R
DL22	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	R	R
DL23	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	R	R
DL24	B2	B2 ₃	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	S	S	R
DL25	B2	B2 ₃	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	S	S	R
DL26	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	R	R
DL27	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	S	R
DL28	D	D1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	R	S	R
DL29	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	S	S	S
DL30	B2	B2 ₃	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	S	S	S
DL31	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	S	S	S
DL32	B2	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
DL33	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL34	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	S
DL35	D	D1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	R
DL36	B2	B2 ₃	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	R	S	R
DL37	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	R
DL38	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	R	S	R
DL39	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R
DL40	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	S
DL41	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	S
DL42	B2	B2 ₂	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	S	S	S
DL43	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL44	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
DL45	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	R	R
DL46	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	R
DL47	D	D1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	R
DL48	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	R	R
DL49	A	A1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	S	S	S
DL50	B2	B2 ₃	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	S	S	R
DL51	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	S	S	R
DL52	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	S	S	S
DL53	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	S	S	S
DL54	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	S	S	S
DL55	B2	B2 ₃	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	S	S	S
DL56	D	D2	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	S	R	R
DL57	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL58	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	S	S	S
DL59	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	S	S	S
DL60	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	S	S	S
DL61	B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL62	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	R	S	R
DL63	D	D1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	S	R
DL64	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	S	S	S
DL65	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	S	S	R
DL66	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	R	S	R
DL67	A	A1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	R	S	R
DL68	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	R	S	R
DL69	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	R	S	R
DL70	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	R	S	S
DL71	D	D1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	S	S	R
DL72	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	S	S	S

Opomba: 1 – pozitivni rezultat, 0 – negativni rezultat, R – odporen, S – občutljiv, I – intermediaren, N – ni bilo določeno.

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge F: Podatki o sevih *E. coli* zbirke UTI, dobljeni v predhodnih raziskavah (Čitar, 2010).

Oznaka seva	Filog. sk.	Filog. podsk.	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnfI</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	<i>traJ</i>	Amp	Cip	Tc
DL73	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL74	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	R	S	S
DL75	B2	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	S	S	S
DL76	D	D1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL77	B2	B2 ₂	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	S	S	S
DL78	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	R
DL79	D	D1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	S	S	S
DL80	A	A0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL81	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL82	B2	B2 ₃	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	R	S	S
DL83	B2	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	S	S	S
DL84	A	A1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	R	R
DL85	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	S	S	S
DL86	B1	B1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL87	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
DL88	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	S	S	S
DL89	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	S	S	R
DL90	A	A1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	R	R	R
DL91	B	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	R	R
DL92	B	B2 ₃	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	S	S	S
DL93	B	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	S	S	S
DL94	A	A1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
DL95	B	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	R	S	R
DL96	D	D2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL97	D	D2	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	R	S	R
DL98	B	B2 ₃	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	R	S	R
DL99	A	A1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	S	S	S
DL100	B	B2 ₃	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	R	S	R
DL101	B	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
DL102	B	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	S	S	S
DL103	B	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	S
DL104	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S	S	R
DL105	B	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	S
DL106	D	D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R	S	R
DL107	D	D1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	R	S	R
DL108	B	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	R	S	S
DL109	A	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	S	R
DL110	B	B2 ₃	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	R	S	R

Opomba: 1 – pozitivni rezultat, 0 – negativni rezultat, R – odporen, S – občutljiv, I – intermediaren, N – ni bilo določeno