

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Urša GUBENŠEK

**VIRULENTNI POTENCIAL SEVOV *Escherichia coli*,
IZOLIRANIH IZ DOMAČIH KUNCEV IN NJIHOVE
KRME**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIČNA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Urša GUBENŠEK

**VIRULENTNI POTENCIAL SEVOV *Escherichia coli*, IZOLIRANIH IZ
DOMAČIH KUNCEV IN NJIHOVE KRME**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**VIRULENCE POTENTIAL OF *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED
FROM PET AND FARM RABBITS AND THEIR FODDER**

M. Sc. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju Skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec, za somentorico prof. dr. Darjo Žgur Bertok ter za recenzentko prof. dr. Katjo Seme.

Mentorica: izr. prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Somentorica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Recenzentka: prof. dr. Katja Seme

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Tjaša DANEVČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

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

Članica: prof. dr. Katja SEME
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

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.

Urša Gubenšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 579.24/.26.065:577.2.083(043)=163.6
KG	patogeni mikroorganizmi/bakterije/ <i>Escherichia coli</i> /sev ExPEC/virulentni dejavniki/virulentni potencial/kunec
AV	GUBENŠEK, Urša, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (mentorica)/ŽGUR BERTOK, Darja (somentorica)/SEME, Katja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2016
IN	VIRULENTNI POTENCIAL SEVOV <i>Escherichia coli</i> , IZOLIRANIH IZ DOMAČIH KUNCEV IN NJIHOVE KRME
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XII, 69 str., 16 pregl., 14 sl., 6 pril., 115 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Bakterija <i>E. coli</i> je splošno razširjena črevesna bakterija, ki lahko pri človeku povzroča različne tipe okužb. Zunajčrevesne patogene <i>E. coli</i> najdemo tudi pri domačih in rejnih živalih. Zanimale so nas <i>E. coli</i> , prisotne v blatu domačih in hlevskih kuncev ter njihov virulentni potencial. S tem namenom smo zbrali vzorce blata treh domačih kuncev, en vzorec krme za domače kunce in en vzorec pakirane trgovinske krme. Zbrali smo tudi vzorce blata štirih hlevskih kuncev iz dveh kmetij in njihove krme. Iz vzorcev smo poskušali pridobiti izolate <i>E. coli</i> ter opredeliti njihove virulentne dejavnike in filogenetsko skupino. Izolatov <i>E. coli</i> iz blata domačih kuncev in krme za domače kunce nismo uspeli pridobiti. Iz blata rejnih kuncev smo uspešno pridobili 4 različne izolate <i>E. coli</i> iz njihove krme pa 8 izolatov <i>E. coli</i> . Posamični izolati <i>E. coli</i> iz blata rejnih kuncev in njihove krme so imeli enak profil ERIC-PCR. To nakazuje, da je krma pomemben vir <i>E. coli</i> v prebavilih kuncev. Tриje sevi različnih kuncev so se uvrščali v nepatogeno filogenetsko skupino B1, medtem ko se je en sev iz četrtega kunca uvrščal v potencialno patogeno filogenetsko skupino B2. Omenjeni sev je imel v primerjavi z drugimi izolati tudi več zapisov za virulentne dejavnike. Iz rezultatov sklepamo, da je prisotnost <i>E. coli</i> v prebavilih kuncev odvisna od <i>E. coli</i> prisotne v zaužiti krmi. Patogeni sevi <i>E. coli</i> so lahko prisotni pri rejnih kuncih.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN	Du2
DC	UDC 579.24/.26.065:577.2.083(043)=163.6
CX	pathogens/bacteria/ <i>Escherichia coli</i> /strain <i>ExPEC</i> /virulence factors/virulence potential/rabbit
AU	GUBENŠEK, Urša
AA	STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (supervisor)/ŽGUR BERTOK, Darja (co-advisor)/SEME, Katja (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY	2016
TI	VIRULENCE POTENTIAL OF <i>Escherichia coli</i> STRAINS ISOLATED FROM PET AND FARM RABBITS AND THEIR FODDER
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes – Field Microbiology)
NO	XII, 69 p., 16 tab., 14 fig., 6 ann., 115 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p><i>E. coli</i> is a widely distributed intestinal bacterium that can cause several different types of infections. Extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> can be found in humans, but also in house pets and farm animals. The research question of this Master Thesis was whether we can find <i>E. coli</i> in intestine of rabbits (pet and farm animal) and what is their virulence potential. For this reason we collected stool samples of three pet rabbits as well as one fodder sample and a sample of fresh fodder bought in a pet store. We also collected stool samples of four farm rabbits from two farms and their fodder. From these samples we tried to isolate <i>E. coli</i> and determine the virulence factors and phylogenetic group of the isolates. We were not able to isolate <i>E. coli</i> from pet rabbits or their fodder. On the other hand we were able to isolate 4 different <i>E. coli</i> strains from farm rabbits as well as 8 <i>E. coli</i> strains from their fodder. ERIC-PCR profiling showed that some of the strains in stool samples and fodder samples were identical. This revealed that fodder is an important source of <i>E. coli</i> present in the intestine. Three isolates from different rabbits were defined as B1 phylogenetic group isolates, thus unpathogenic. One isolate from the fourth rabbit was defined as a B2 phylogenetic group isolate and was considered pathogenic. The same isolate also had more virulence factors than other isolates. We concluded that rabbits can have <i>E. coli</i> in their intestine, the presence of <i>E. coli</i> is however closely related to their fodder. Virulence potential is low for pet as well as farm rabbits. However, pathogenic <i>E. coli</i> can be found in farm rabbits.</p>

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 <i>Escherichia coli</i>	3
2.2 KOMENZALNI SEVI <i>E. coli</i>	3
2.3 PATOGENI SEVI <i>E. coli</i>	4
2.3.1 Sevi IPEC	4
2.3.2 Sevi ExPEC	6
2.4 FILOGENETSKE SKUPINE	7
2.5 VIRULENTNI DEJAVNIKI PRI <i>E. coli</i>	10
2.5.1 Adhezini	11
2.5.2 Toksini	13
2.5.3 Sistemi za privzem železa	15
2.5.4 Dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu	16
2.6 ŽIVALI KOT POTENCIALNI REZERVOAR SEVOV ExPEC	18
2.6.1 Sevi APEC pri perutnini	19
2.6.2 Sevi ExPEC pri živini in živalskih produktih	19
2.6.3 Sevi ExPEC pri domačih živalih	20
2.7 MIKROBIOTA PREBAVNEGA TRAKTA KUNCEV IN NJIHOVA KRMA	21
2.7.1 Prebavni trakt in mikrobiota kuncev	21
2.7.2 <i>E. coli</i> kot patogen kuncev	22
2.7.3 Vpliv krme na zdravje kuncev	23
3 MATERIALI IN METODE	25
3.1 MATERIALI	25
3.1.1 Vzorci	25
3.1.2 Iz vzorcev izolirani bakterijski sevi	25
3.1.3 Kontrolni sevi	26
3.1.4 Gojišča	28
3.1.4.1 Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)	28
3.1.4.2 Priprava trdnih gojišč LB v petrijevkah	28
3.1.4.3 Priprava trdnih gojišč MacConkey (MAC)	28
3.1.4.4 Priprava trdnih gojišč UriSelect	28

3.1.4.5 Priprava triptičnega sojinega tekočega gojišča (TSB)	28
3.1.4.6 Priprava pufrane peptonske vode (BPW)	29
3.1.4.7 Priprava tekočih gojišč MR in VP (IMVC)	29
3.1.4.8 Priprava tekočih gojišč indol (IMVC)	29
3.1.4.9 Priprava poševnih trdnih citratnih gojišč po Simmonsu (IMVC)	29
3.1.5 Kemikalije	29
3.1.6 Začetni oligonukleotidi	30
3.1.7 Encimi in lestvice DNA	31
3.1.8 Pufri in reagenti	31
3.1.8.1 Pufer 5 × TBE	31
3.1.8.2 Oksidazni reagent	32
3.1.8.3 Reagent metil rdeče	32
3.1.9 Laboratorijska oprema	32
3.2 METODE	32
3.2.1 Shema poteka dela	32
3.2.2 Zbiranje vzorcev	33
3.2.3 Izolacija bakterij iz blata in krme	33
3.2.3.1 Seleksijska trdna gojišča MAC	33
3.2.3.2 Tekoča gojišča LB, TSB in BPW	33
3.2.3.3 Trdna gojišča LB	33
3.2.4 Seleksijske metode za <i>E. coli</i>	33
3.2.4.1 Seleksijska trdna gojišča UriSelect	33
3.2.4.2 Oksidazni test	34
3.2.4.3 Test IMVC	34
3.2.5 Priprava lizatov	34
3.2.6 Oligonukleotidni začetniki in protokol za ERIC–PCR	34
3.2.7 Oligonukleotidni začetniki in program za PCR pri določanju virulentnih dejavnikov	35
3.2.8 Določanje filogenetske skupine	39
3.2.8.1 Začetni oligonukleotidi in program za PCR	39
3.2.8.2 Določanje filogenetske skupine	40
3.2.9 Agarozna gelska elektroforeza	40
4 REZULTATI	41
4.1 IZOLACIJA <i>E. coli</i> IZ BLATA IN KRME	41
4.1.1 Rast na trdnih gojiščih MAC	41
4.1.2 Rast na trdnih gojiščih LB	43
4.2 SELEKCIJSKE METODE ZA <i>E. coli</i>	44
4.2.1 Rast na trdnih gojiščih UriSelect	44
4.2.2 Oksidazni test	45

4.2.3	Test IMVC	45
4.3	ERIC–PCR	46
4.4	DOLOČANJE GENOV ZA VIRULENTNE DEJAVNIKE	49
4.5	DOLOČANJE FILOGENETSKE SKUPINE	50
5	RAZPRAVA	52
6	SKLEPI	56
7	POVZETEK	57
8	SUMMARY	58
9	VIRI	61
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Preiskovani geni za virulentne dejavnike in njihova povezava z različnimi patotipi <i>E. coli</i>	18
Preglednica 2: Vzorci, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu	25
Preglednica 3: Izolati <i>E. coli</i> , ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu	26
Preglednica 4: Kontrolni sevi in njihovi geni virulentni dejavniki	26
Preglednica 5: Sestava reakcijske zmesi za ERIC-PCR	35
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi in program za PCR, ki smo jih uporabili pri ERIC-PCR	35
Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi in program za PCR, ki smo jih uporabili pri določanju prisotnosti zapisov za virulentne dejavnike	35
Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi in program PCR za določanje filogenetske skupine <i>E. coli</i>	39
Preglednica 9: Rast kolonij, izoliranih iz različnih vzorcev	43
Preglednica 10: Rast na trdnih gojiščih LB	44
Preglednica 11: Rast na trdnih gojiščih UriSelect	45
Preglednica 12: Rezultati testa IMVC	46
Preglednica 13: Oznake kunčjih sevov in sevov izoliranih iz krme	46
Preglednica 14: Zbrani izolati in sevi kuncev in njihove krme	48
Preglednica 15: Primerjava velikosti produktov pridobljenih pri ERIC-PCR	49
Preglednica 16: Zbrani rezultati o pomnožkih genov virulentnih dejavnikov pri vseh sevih	50

KAZALO SLIK

Slika 1: Clermontova metoda za določanje filogenetske skupine (Clermont in sod., 2000)	8
Slika 2: Clermontova prenovljena metoda za določanje filogenetske skupine (Clermont in sod., 2013: priloga 2)	9
Slika 3: Shema poteka dela od vzorčenja do določanja filogenetske skupine	32
Slika 4: Izolacija <i>E. coli</i> na trdnih gojiščih MAC	42
Slika 5: Izolacija <i>E. coli</i> iz krme iz kmetije D	42
Slika 6: Izolacija <i>E. coli</i> iz krme iz kmetije K	42
Slika 7: Izolacija <i>E. coli</i> iz krme domačih kuncev na trdem gojišču MAC in LB	43
Slika 8: Rast na trdnih gojiščih UriSelect	44
Slika 9: Primer testa IMVC	45
Slika 10: Profili ERIC–PCR izolatov <i>E. coli</i> , izoliranih iz blata kuncev 1, 2 in 3	47
Slika 11: Profili ERIC–PCR za izolate iz krme iz kmetije D	47
Slika 12: Profili ERIC–PCR za kunca 4 in krmo iz kmetije K	48
Slika 13: Elektroforeza pomnožkov PCR pri določanju filogenetske skupine	51
Slika 14: Shema določanja filogenetske skupine (Clermont in sod., 2013: priloga 2)	51

KAZALO PRILOG

Priloga A: Elektroforeza pomnožkov PCR genov *fimH* in *crl* pri vseh kunčjih sevih

Priloga B: Elektroforeza pomnožkov PCR gena *ompT* pri vseh kunčjih sevih

Priloga C: Elektroforeza pomnožkov PCR gena *traT* pri sevih RK1 in RK2

Priloga D: Elektroforeza pomnožkov PCR gena *iucD* pri sevih RK1 in RK2

Priloga E: Elektroforeza pomnožkov PCR gena *fyuA* pri sevu RK1

Priloga F: Elektroforeza pomnožkov PCR genov *traJ*, *iroN* in APEC-*ompT* pri sevu RK2

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AEEC	pritrjajoči in uničajoči sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>attaching and effacing E. coli</i>)
APEC	ptičja patogena <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>avian pathogenic E. coli</i>)
bp	bazni par, enota dolžine zaporedja nukleinske kisline
BPW	pufrana peptonska voda
DAEC	difuzno adherentni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>diffusely adherent E. coli</i>)
dH₂O	sterilna destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoksiribonukleotidni trifosfati
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
EAggEC	enteroagregativni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>enteroaggregative E. coli</i>)
EHEC	enterohemoragični sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>enterohaemorrhagic E. coli</i>)
EIEC	enteroinvazivni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>enteroinvasive E. coli</i>)
EPEC	enteropatogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>enteropathogenic E. coli</i>)
ERIC	enterobakterijska ponavljanjača se medgenska ohranjena zaporedja (ang. <i>enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>)
ETEC	enterotoksigeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>enterotoxigenic E. coli</i>)
ExPEC	zunajčrevesni patogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>extraintestinal pathogenic E. coli</i>)
RD1	kunčji sev, izoliran iz kunca 1 iz kmetije D
RD2	kunčji sev, izoliran iz kunca 2 iz kmetije D
RD3	kunčji sev, izoliran iz kunca 3 iz kmetije D
RK1	kunčji sev, izoliran iz kunca 1 iz kmetije K
RK2	kunčji sev, izoliran iz kunca 1 iz kmetije K
IMVC	biokemijski test sestavljen iz testov indol, metil-rdeče, Voges-Proskauer in citrat
IPEC	črevesni patogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>intestinal pathogenic E. coli</i>)
K₂HPO₄	dikalijev hidrogenfosfat
kb	1000 baznih parov, enota dolžine zaporedja nukleinske kisline
KH₂PO₄	kalijev 2-hidrogenfosfat
KOH	kalijev karbonat
LB	gojišče Luria-Bertani

MAC	gojišče MacConkey
MgSO₄	magnezijev sulfat
MR	metil rdeče
Na₂HPO₄	dinatrijev hidrogenfosfat
Na₃C₆H₅O₇ × 2H₂O	natrijev citrat
NaCl	natrijev klorid
NEMEC	<i>Escherichia coli</i> , ki povzroča neonatalni meningitis (ang. <i>neonatal meningitis-associated E. coli</i>)
NeuNAc	linearni homopolimeri sialičnih kislin, povezanih z α(2,8)-vezmi
NH₄H₂PO₄	amonijev dihidrogen fosfat
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
rmp	vrtljaji na minuto (ang. <i>revolutions per minute</i>)
SEPEC	<i>Escherichia coli</i> , ki povzroča sepso (ang. <i>sepsis-associated E. coli</i>)
STEC	<i>Escherichia coli</i> , ki tvori šigove toksine (ang. <i>shiga toxicogenic E. coli</i>).
TSB	triptično sojino tekoče gojišče (ang. <i>tryptic soy broth</i>)
U	enota (ang. <i>unit</i>)
UPEC	uropatogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>uropathogenic E. coli</i>)
UTI	okužbe sečil (ang. <i>urinary tract infection</i>)
VP	test Voges-Proskauer

1 UVOD

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je fakultativni anaerob, ki naseljuje prebavni trakt ljudi, živali s stalno telesno temperaturo in plazilcev, kjer je glavni porabnik prostega kisika. *E. coli* je z gostiteljem v tako imenovanem komenzalnem odnosu. Prebavni trakt gostitelja bakteriji predstavlja stabilno in s hranili bogato okolje, v zameno pa prepreči kolonizacijo patogenih bakterij v črevesju. Čeprav so številni sevi *E. coli* komenzalni, pa so nekateri sevi lahko tudi patogeni in povzročajo širok spekter okužb (Tenaillon in sod., 2010).

Patogeni sevi *E. coli* povzročajo črevesne in zunajčrevesne okužbe tako pri ljudeh kot pri živalih. Sevi, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe, običajno živijo v prebavilih kot komenzali, a če se slučajno znajdejo na drugih anatomskeh mestih, lahko tam povzročijo zunajčrevesne okužbe. Najpogosteji zunajčrevesni patogeni sevi *E. coli* (ExPEC) so uropatogeni sevi, ki povzročajo okužbe sečil, tem sledijo sevi *E. coli*, ki povzročajo sepso in sevi, ki povzročajo meningitis pri novorojenčkih (Mainil, 2013; Köhler in Dobrindt, 2011). Seve *E. coli* lahko ločimo tudi glede na filogenetsko skupino. Ti se med sabo razlikujejo glede na prisotnost določenih virulentnih dejavnikov in omogočajo razlikovanje med visoko patogenimi (filogenetska skupina B2), manj patogenimi in nepatogenimi sevi (filogenetski skupini A in B1) (Köhler in Dobrindt, 2011).

Nekateri sevi *E. coli* so sposobni hitrega prilagajanja na spremembe v okolju. Prilagodljivost omogoča hitro razširjanje okužbe tudi med različnimi gostitelji, na primer prenos med človekom in živaljo. To v veliki večini velja za zunajčrevesne patogene *E. coli*, katerih možni živalski rezervoarji so tako živina kot domače živali. Zunajčrevesne seve *E. coli* najpogosteje izoliramo iz piščancev, goveda in prašičev. Potencialen rezervoar so tudi mačke in psi, ki so v tesnem stiku z lastnikom. Patogeni izolati *E. coli* se lahko prenesejo iz domačih živali na človeka in tako predstavljajo potencialni zoonotski agens, in obratno (Bélanger in sod., 2011; Kaper in sod., 2004).

Kunci za ljudi predstavljajo domače ali rejne živali. Rejci kuncev se soočajo z velikimi ekonomskimi težavami zaradi okužb mladičev z *E. coli* (Abecia in sod., 2005). *E. coli*, ki povzroča drisko pri mladih kuncih, je glavni vzrok pogina kuncev na kmetijah. Okužbe z *E. coli* so lahko asimptomatske, se kažejo v blažjih bolezenskih znakih ali pa so življenje ogrožajoče (Blanco in sod., 1996).

Kunci so tudi priljubljene domače otrok, s katerimi so v tesnem stiku. Pojavlja se vprašanje, ali so *E. coli* prisotne v prebavilih domačih in rejnih kuncev in kakšen je virulentni potencial tovrstnih izolatov *E. coli*. Gre za področje, ki je do danes še precej neraziskano. Pri vzpostavitvi mikrobiote prebavnega trakta kuncev je pomembna tudi njihova krma, ta pa se med domačimi in hlevskimi kunci razlikuje. S tem namenom smo

želeli preučili, kako krma vpliva na prisotnost *E. coli* v prebavilih kuncev in njihov virulentni potencial.

1.1 CILJI IN HIPOTEZE

Namen magistrskega dela je bil opredeliti virulentni potencial sevov *E. coli*, izoliranih iz blata domačih in rejnih kuncev. Kunci so kot domače živali pogosto v tesnem stiku z lastnikom in bi lahko predstavljali rezervoar potencialno patogenih sevov *E. coli* in posledično tveganje za njihov prenos na človeka. V nalogi smo zbrali iztrebke različnih zdravih kuncev in njihove krme ter iz njih poskušali izolirati *E. coli*. Pridobljene izolate *E. coli* smo medsebojno primerjali in poskušali ugotoviti povezavo med prisotnostjo *E. coli* v krmi in prisotnostjo *E. coli* v blatu kuncev. Za primerjavo sevov *E. coli* smo uporabili metodo ERIC-PCR. Poleg povezave med krmo in mikrobioto smo želeli opredeliti tudi virulentni potencial sevov *E. coli*, izoliranih iz blata kuncev. V ta namen smo pridobljenim izolatom *E. coli* opredelili njihovo filogenetsko skupino in prisotnost zapisov za izbrane virulentne dejavnike s pomočjo metode PCR. S tem smo želeli pridobiti boljši vpogled v njihov virulentni potencial.

2 PREGLED OBJAV

2.1 *Escherichia coli*

Bakterijo *Escherichia coli* uvrščamo med gamaproteobakterije, natančneje v družino *Enterobacteriaceae* in rod *Escherichia*. *E. coli* je po Gramu negativna, fakultativno anaerobna bakterija, ki ne sporulira. Je paličasta bakterija, njena dolžina in širina pa se gibljeta v območju $1 \times 2 \mu\text{m}$. *E. coli* naseljuje prebavni trakt živali s stalno telesno temperaturo, ljudi in plazilcev. Ena izmed možnih vlog *E. coli* kot komenzalnega mikroorganizma v prebavnem traktu živali in ljudi je sinteza vitamina K. Poleg tega naj bi ščitila prebavni trakt pred kolonizacijo z drugimi patogenih bakterijskimi vrstami, saj prepreči njihovo pritrditev in razmnoževanje. Nadalje *E. coli* v prebavnem traktu porablja kisik in tako pripomore k vzdrževanju anoksičnih razmer v črevesju. *In vitro* jo lahko enostavno gojimo na različnih virih ogljika in energije (sladkorji, aminokisline in organske kisline) (Madigan in sod., 2011).

E. coli je eden od glavnih modelnih mikroorganizmov. Genom bakterije *E. coli* je bil eden od prvih v celoti sekvenciranih bakterijskih genomov in je do danes že dodobra raziskan. Poleg tega so za *E. coli* vzpostavljeni številni protokoli za genetsko manipulacijo (Tenaillon in sod., 2010). V večini laboratorijskih je v uporabi dobro karakteriziran referenčni sev K-12, ki se uporablja v raziskavah na področju genetike, molekularne biologije, fiziologije bakterij in biokemije. Genom *E. coli* K-12 je krožni kromosom dolžine 4,6 Mbp (NCBI, 2013; Madigan in sod., 2011; Tenaillon in sod., 2010).

Pri ljudeh postane *E. coli* glavni fakultativni anaerob že nekaj ur po rojstvu, kjer ostane kot del naravne mikrobiote prebavnega trakta vse do konca življenja. Večina sevov *E. coli* v človeškem prebavnem traktu je tako komenzalnih, vendar to ne velja za vse seve, saj so nekateri sevi za človeka patogeni (Crossman in sod., 2010). Patogene seve *E. coli* glede na prisotnost različnih virulentnih dejavnikov delimo v več skupin oz. patotipov. Glede na anatomske pozicije okužb v telesu seve razdelimo v dva patotipa: črevesne in zunajčrevesne *E. coli*. Črevesna *E. coli* ali IPEC (ang. *intestinal pathogenic E. coli*) povzroča okužbe prebavnega trakta, je obligatni patogen in povzroča drisko. Ti sevi niso del normalne mikrobiote prebavnega trakta in vedno nakazujejo na okužbo. V telo pridejo s kontaminirano hrano ali vodo. Drugi patotip je zunajčrevesna *E. coli* ali ExPEC (ang. *extraintestinal pathogenic E. coli*), ki je za razliko od IPEC lahko del normalne mikrobiote prebavnega trakta (je komenzal) in tam ne povzroča težav. Okužba lahko nastopi, ko bakterija zaide v druge, večinoma sterilne, anatomske predele (npr. sečila, trebušna votlina), kjer povzroča različne okužbe (Madigan in sod., 2011; Köhler in Dobrindt, 2011).

2.2 KOMENZALNI SEVI *E. coli*

Človeški prebavni trakt predstavlja življenjski prostor zelo raznoliki skupini mikroorganizmov, med katerimi prevladujejo bakterije. Večino bakterijskih vrst v

prebavnem traktu uvrščamo v štiri debla (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* in *Proteobacteria*). Človeški prebavni trakt naseljuje preko 1000 različnih bakterijskih vrst, med drugim *E. coli*. Večino bakterij v prebavnem traktu uvrščamo med anaerobne komenzale. Komenzalne bakterije fermentirajo ogljikove hidrate v kratkoverižne maščobne kisline, ki jih človek lahko nato prebavi. Sodelujejo tudi pri sintezi in olajšani absorbciji različnih vitaminov, kot je na primer folna kislina. Njihove funkcije so tudi ohranjanje homeostaze energije, ohranjanje neprepustnosti črevesne stene in angiogeneza. Poleg tega imajo pozitivne učinke na strukturo in razvoj imunskega sistema v prebavnem traktu (Tchaptchet in Hansen, 2011; Bakhtiar in sod., 2013). Človek jim v zameno nudi stabilno okolje in konstanten vir hrani (Tenallon in sod., 2010).

Do kolonizacije črevesja pride takoj po rojstvu. Sestava mikrobioma prebavnega trakta se razlikuje glede na način poroda in dojenja. To pomeni, da se mikrobiom prebavnega trakta začne oblikovati že zelo zgodaj v življenju in se ne preneha oblikovati in spremenjati do smrti. V odraslem obdobju doseže svojo maksimalno raznolikost in takšen ostane večino življenja. V starosti se raznolikost začne zmanjševati in mikrobiom prebavnega trakta postane manj stabilen (Bakhtiar in sod., 2013; Biagi in sod., 2010).

E. coli večinoma prebivajo v debelem črevesju sesalcev. Glavni dejavnik, ki jim omogoča rast v takšnem okolju, je sposobnost pritrditve in sposobnost namnoževanja v njem. *E. coli* se lahko pritrdijo na specifične receptorje epitelijskih celic, ki so prekrite s sluzjo (mukusom) (Conway in sod., 2004). *E. coli* lahko tako raste v tem okolju in pridobiva hraniila z razgrajevanjem sluzi, kot so monosaharidi in drugi mukozni glikoproteini, ki se sproščajo iz mucina. Rast v sluzi je ključnega pomena za preživetje tako komenzalnih kot patogenih vrst *E. coli* v prebavnem traktu (Chang in sod., 2004; Conway in sod., 2004).

2.3 PATOGENI SEVI *E. coli*

Patogeni organizmi so tisti organizmi, ki imajo sposobnost povzročitev bolezni v gostitelju, kot na primer ljudeh in živalih. Veliko sevov *E. coli* je patogenih. V telo lahko vstopijo z zaužitjem kontaminirane hrane ali vode ter povzročajo črevesne okužbe (IPEC) ali pa so že prisotni v črevesju in se nato razširijo v druge anatomske dele telesa (ExPEC) (Alberts in sod., 2008).

2.3.1 Sevi IPEC

Črevesni *E. coli* sevi pri ljudeh povzročajo enterična obolenja in drisko. So patogeni, ki vstopijo v telo s kontaminirano hrano in/ali vodo. Delimo jih v šest patotipov. Medtem ko se večina opisov teh sevov nanaša na okužbe pri ljudeh, je vredno omembe, da lahko nekateri patotipi z enakimi virulentnimi dejavniki povzročajo okužbe tudi v živalskem črevesju (EPEC, EHEC, ETEC) (Köhler in Dobrindt, 2011; Kaper in sod., 2004). Glavni virulentni dejavniki IPEC sevov so površinsko specifični adhezini, ki jim omogočajo kolonizacijo prebavnega trakta (Katouli, 2010).

Glavni povzročitelj drisk po svetu je enterotoksigena *E. coli* ali ETEC (ang. *enterotoxigenic E. coli*). ETEC je najbolj razširjena med otroci v državah v razvoju s slabo higieno in nezadostnimi rezervoarji čiste pitne vode. Sinonim za okužbo z ETEC je tudi popotniška driska. ETEC vdre v epitelij tankega črevesja in tam izloča endotoksine (toksini, podobni koleri, in peptidni toksini, podobni hormonom), ki povzročijo hudo vodeno drisko (Crossman in sod., 2010; Katouli, 2010).

Enteropatogeni sev *E. coli* ali EPEC (ang. *enteropathogenic E. coli*) je prvi opisan patotip *E. coli*. Sevi EPEC sintetizirajo posebne fimbrije, ki omogočajo medsebojno povezovanje med celicami in s tem olajšajo pritrjanje. To povzroči strukturne spremembe v črevesju in uniči strukturo mikrovilov. Uničeni mikrovili onemogočijo absorbcijo hrani v črevesju, prav tako pa pride do vnetnega odziva, kar vodi v vodeno drisko (Katouli, 2010; Kaper in sod., 2004).

Enteroagregativna *E. coli* ali EAEC (ang. *enteroaggregative E. coli*) se pripne na epitelij tankega in debelega črevesja, kjer tvori debel biofilm. To ji omogoča dobro pritrditev, kar povzroči dolgotrajno drisko pri otrocih. EAEC prav tako izloča topotno stabilen EAEC enterotoksin 1 (Kaper in sod., 2004; Katouli, 2010).

Enterohemoragična *E. coli* ali EHEC/STEC (ang. *enterohaemorrhagic E. coli*), poznana tudi kot *E. coli*, ki tvori šigove toksine (ang. *shiga-like toxin producing E. coli*), se pritrdi na celice črevesne sluznice. Mehanizem pripenjanja je podoben kot pri patotipu EPEC. EHEC poleg tega tvori toksin, podoben šigovemu toksinu. Receptorji za šigov toksin so na površini črevesnih in ledvičnih celic, kar lahko skupaj s krvavo drisko vodi v odpoved ledvic in hemolitični uremični sindrom (Kaper in sod., 2004; Katouli, 2010).

Enteroinvazivna *E. coli* ali EIEC (ang. *enteroinvasive E. coli*) je sorodna bakteriji *Shigella* spp. Sevi EIEC vstopijo v celice črevesnega epitelija z endocitozo in se sprva v celici nahajajo v fagosomu. EIEC nato razgradi membrano fagosoma, pobegne iz fagosoma in se nato nemoteno razmnožuje v celici. S pomočjo aktinskih filamentov se lahko EIEC neposredno premikajo med sosednjimi epitelijskimi celicami. Neposredna invazija epitelijskih celic vodi v krvavo drisko (grižo) (Kaper in sod., 2004; Katouli, 2010).

Difuzno-adherentna *E. coli* ali DAEC (ang. *diffusely adherent E. coli*) je nedavno opisan patotip. DAEC se lahko pritrdi na enterocite v tankem črevesju in povzroči prekomerno rast mikrovilov, ki ovijejo bakterijo in omogočajo pritrditev. Celotni mehanizem pritrjanja in povzročanja okužbe še ni znan (Kaper in sod., 2004; Katouli, 2010).

2.3.2 Sevi ExPEC

Zunajčrevesna *E. coli* povzroča okužbe na različnih anatomskeh predelih v telesu. Najpogosteje povzroča okužbe sečil, krvi, osrednjega živčevja, dihal in okužbe trebušne votline. Ne glede na anatomsko mesto okužbe imajo različni sevi ExPEC med seboj zelo podobne virulentne dejavnike, hkrati pa se ti razlikujejo od dejavnikov pri IPEC in komenzalnih sevih. Glavna skupna lastnost ExPEC sevov je, da lahko oslabijo in premostijo obrambni mehanizem človeka in živali (Russo in Johnson, 2000; Johnson in Russo, 2005). Sevi ExPEC imajo številne virulentne dejavnike, kot so različni adhezini, toksini, siderofori in kapsule. Ti virulentni dejavniki so pomembni za patogenezo in omogočajo preživetje sevov ExPEC zunaj črevesja (Katouli, 2010). Pogosto so sevi ExPEC prisotni v prebavnem traktu ljudi in tam ne povzročajo težav. Okužba nastopi, ko bakterija prestopi prebavno pregrado in okuži normalno sterilne predele telesa (Russo in Johnson, 2003).

Uropatogena *E. coli* ali UPEC (ang. *uropathogenic E. coli*) povzroča okužbe sečil (UTI, ang. *urinary tract infections*). Okužbe sečil sodijo med najpogostejše okužbe pri ženskah, *E. coli* pa je glavni povzročitelj UTI. Sevi UPEC lahko povzročajo enostavne okužbe, kot je vnetje mehurja, in/ali zapletene okužbe, kot je vnetje ledvic. Okužbe se ponavljajo z enakim ali z različnimi sevi UPEC. Sevi UPEC izražajo različne virulentne dejavnike. Glavno vlogo imajo adhezini (adhezini P, fimbrije tipa 1 in drugi), ki omogočajo pritrjanje na gostiteljeve celice in posledično omogočajo okužbo izven črevesja. Adhezini in fimbrije prav tako omogočijo premostitev obrambnega mehanizma in preprečijo odstranitev bakterij s tokom urina. UPEC izražajo toksine, kot sta hemolizin in citotoksični nekrotizirajoči dejavnik (CNF), ki poškodujeta tkivo gostitelja. Prva stopnja kolonizacije se prične v črevesju. Od tod se lahko preko različnih poti razširi do sečnice in mehurja. V mehurju sevi UPEC izražajo fimbrije tipa 1, ki jim omogočajo dobro pritrditev na manozne dele epitelijskih celic. Med drugim lahko invazivno vstopajo v celice ali pa tvorijo mostičke, v katere se pritrdijo in obdajo z zunajceličnim polisaharidnim matriksom. Omenjena virulentna dejavnika sta pomembna pri pritrjanju, obstoji in sposobnosti rasti v mehurju in pridobivanju železa iz okolja. Iz mehurja se lahko sevi UPEC kasneje razširijo vse do ledvic (Kaper in sod., 2004; Katouli, 2010).

Septični sevi *E. coli* ali SEPEC (ang. *sepsis-associated E. coli*) povzročajo septikemijo ali sepso. O septikemiji govorimo, kadar so v krvi prisotni mikroorganizmi ali njihovi deli. Ko je v krvi prisotno visoko številko mikroorganizmov ali njihovih delov in ti lahko vstopajo v različne organe v telesu, govorimo o sepsi. Prisotnost *E. coli* v krvi nakazuje na hudo okužbo, ki nastopi večinoma v kombinaciji s septičnim sindromom, hudo sepso (kjer prizadene enega ali več organov) ali septičnim šokom (prenehanje delovanja enega ali več organov). Septikemija, ki jo povzročajo sevi ExPEC, ima zelo visoko smrtnost. Sevi SEPEC vstopijo v kri skozi poškodbe na koži (rane ali opeklne), nato pa po krvi potujejo

do različnih organov, kjer lahko povzročijo hkratno odpoved več organov in septični šok. Sevi SEPEC imajo različne zapise za virulentne dejavnike, kot so na primer adhezini in sideroforji (Katouli, 2010; Russo in Johnson, 2003; Johnson in Russo, 2005).

Seve *E. coli*, ki povzročajo neonatalni meningitis pri novorojenčkih, v določenih primerih pa tudi pri otrocih in odraslih z okrnjenim imunskim sistemom, imenujemo NEMEC (ang. *neonatal meningitis-associated E. coli*). NEMEC povzroči vnetje zunanjih možganskih ovojnici in ovojnice hrbtnače. Najbolj pomemben korak pri okužbi je prestop krvno-možganske pregrade. Sevi NEMEC imajo različne virulentne dejavnike, med drugim kapsularne polisaharide K1, S-fimbrije in toksin CNF1, ki omogočajo prestop krvno-možganske pregrade. Kapsula K1 ima tudi druge funkcije, kot je varovanje bakterije, saj omogoča odpornost proti dejavnikom seruma. Sevi NEMEC imajo tudi različne sideroforje, saj rastejo v mikraerofilnem okolju z nizkimi koncentracijami prostega železa (Katouli, 2010; Kaper in sod., 2004).

Sevi ExPEC lahko povzročajo okužbe tudi v drugih predelih telesa, vendar ti sevi med seboj niso dovolj različni, da bi jih lahko razvrstili v nove patotype. Sevi ExPEC lahko povzročajo okužbe trebušne votline, okužbe kirurških ran, redkeje povzročajo tudi pljučnico (Russo in Johnson, 2003). Omembna vredna je tudi skupina sevov *E. coli*, ki povzročajo okužbe znotraj trebušne votline ali IAIs (ang. *intra abdominal infections*). Te seve *E. coli* vedno izoliramo skupaj z bakterijo *Bacteroides fragilis*; skupaj povzročata abscese, rane v trebušni votlini ter vnetje slepiča in trebušne membrane (Kaper in sod., 2004). *E. coli* lahko v izjemno redkih primerih najdemo v skoraj vsakemu organu in anatomskemu delu telesa (Russo in Johnson, 2003).

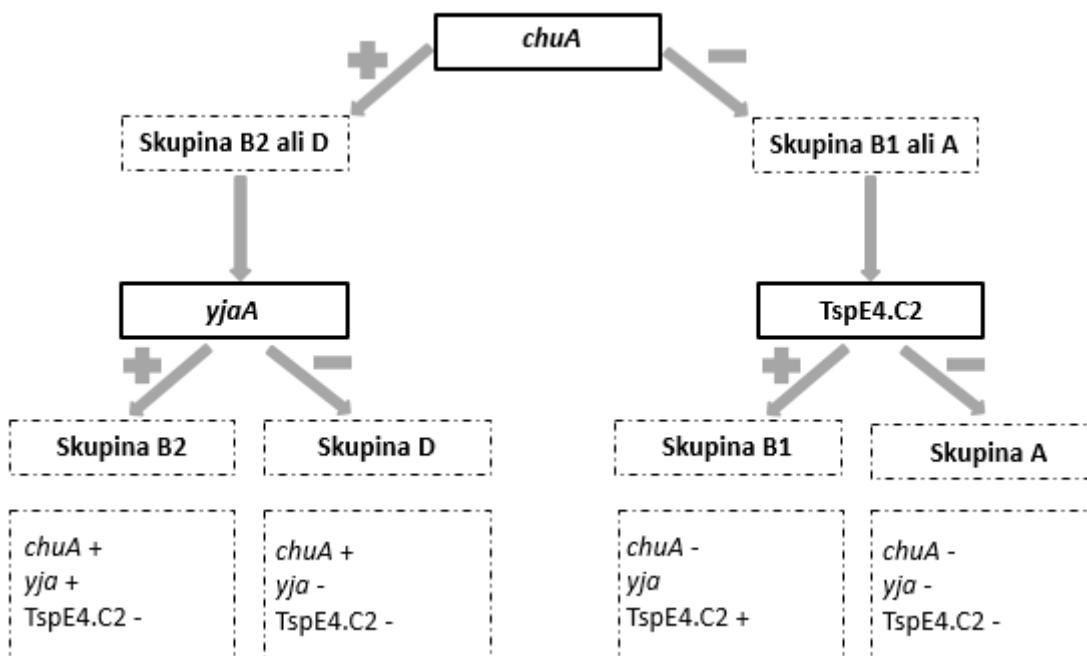
2.4 FILOGENETSKE SKUPINE

Clermont in sod. so leta 2000 postavili enostavno metodo za določanje filogenetskih skupin različnih sevov *E. coli*. Filogenetske analize sevov *E. coli* so pokazale, da lahko seve *E. coli* ločimo v štiri glavne filogenetske skupine glede na prisotnost ali odsotnost različnih DNA fragmentov. Glavne štiri filogenetske skupine so A, B1, B2 in D. Komenzalne in nepatogene seve večinoma uvrščamo v skupini A in B1, medtem ko virulentne seve ExPEC večinoma uvrščamo v skupino B2, redkeje v skupino D (Clermont in sod., 2000). Sevi *E. coli*, ki pripadajo različnim filogenetskim skupinam, večinoma naseljujejo tudi različne niše. Seve skupin B2 in D večinoma izoliramo iz sesalcev in jih le redko najdemo v okolju in v živalih, ki nimajo stalne telesne temeprature. Sevi skupine B2 so sevi, ki so dlje časa prisotni pri otrocih kot sevi iz drugih filogenetskih skupin. Filogenetsko določanje nam torej omogoča boljšo opredelitev preiskovanega izolata *E. coli*, saj nam poda določene informacije o njegovi virulenci (Gordon in sod., 2008).

Clermontova metoda temelji na prisotnosti ali odsotnosti treh različnih genov oz. fragmentov DNA v sevih *E. coli*. Prvi je gen *chuA*, ki je potreben za transport hema pri

sevih EHEC. Drugi je gen *yjaA*, ki ga najdemo v sevu *E. coli* K-12, njegova funkcija pa še ni znana. Tretji označevalski fragment je anonimni fragment DNA, imenovan TspE4.C2. Prisotnost oz. odsotnost označevalskih genov/fragmentov lahko hitro in zanesljivo opredelimo s PCR (Clermont in sod., 2000).

Glede na prisotnost teh treh genov oz. fragmentov lahko *E. coli* seve razdelimo v štiri različne filogenetske skupine (slika 1). Glede na prisotnost oz. odsotnost gena *chuA* ločimo skupini A in B1 od skupin B2 in D, saj je gen *chuA* prisoten le pri slednjih. Glede na prisotnost oz. odsotnost gena *yjaA* ločimo med skupinama B2 in D; gen *yjaA* je prisoten pri izolatih B2 in odsoten pri izolatih D. Podobno nalogu ima fragment TspE4.C2, ki loči med skupinama B1 in A. TspE4.C2 je prisoten pri skupini B1 in odsoten pri skupini A (Clermont in sod., 2000).

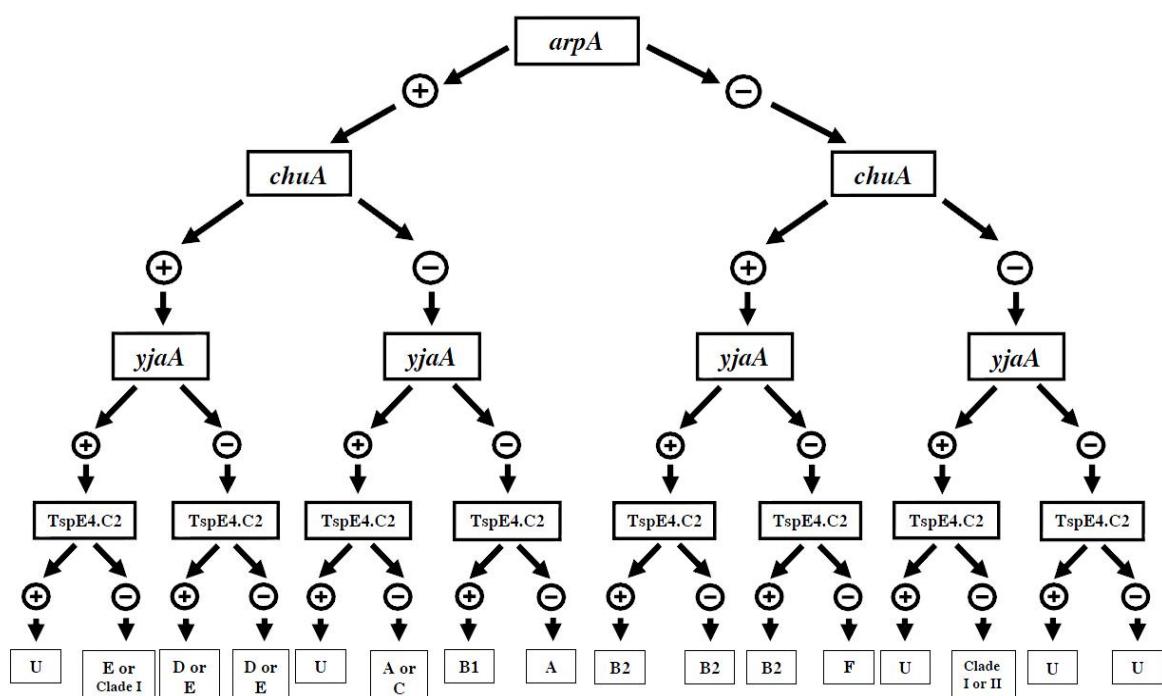


Slika 1: Clermontova metoda za določanje filogenetske skupine (Clermont in sod., 2000).

Figure 1: Clermont's method for phylogenetic determination (Clermont et al., 2000).

Leta 2013 so Clermont in sod. metodo dodatno izpopolnili. Že obstoječim filogenetskim skupinam so dodali nove skupine C, E, F in *Escherichia* kriptična skupina I. Filogenetska skupina F je sestrinska skupina filogenetske skupine B2. Sevi iz filogenetske skupine C so sorodni, vendar različni od sevov iz filogenetske skupine B1. Filogenetska skupina E vsebuje seve, ki jima s prejšnjo metodo ni bilo mogoče določiti filogenetske skupine, kot je na primer sev EHEC O157:H7. *Escherichia* kriptična skupina I vsebuje seve *Escherichia*, ki so genetsko različni, filogenetsko pa povsem identični sevom *E. coli* (Clermont in sod., 2013).

Za določanje osmih različnih filogenetskih skupin so Clermont in sod. izdelali nov protokol PCR. Metoda še vedno vsebuje že znane gene oz. odseke genov (*chuA*, *yjaA* in TspE4.C2), dodan pa je še gen *arpA*. Gen *arpA* služi kot označevalec kakovosti izolirane DNA, saj omogoča pri reakcijah PCR vsaj en pozitiven produkt. Poleg tega omogoča razlikovanje med sevi, ki so jih prej uvrščali v filogenetsko skupino D in jih sedaj uvrščamo v filogenetsko skupino F. Za določanje filogenetskih skupin sta bila dodana še dva za alel specifična začetna oligonukleotida, ki omogočata ločevanje sevov iz skupin C in E. Protokol za določanje filogenetskih skupin je povzet na sliki 2 (Clermont in sod., 2013).



Slika 2: Clermontova prenovljena metoda za določanje filogenetske skupine (Clermont in sod., 2013: priloga 2).

Figure 2: Clermont's revisited method for phylogenetic determination (Clermont et al., 2013: supplementary information 2).

Clermontovo metodo za določanje filogenetskih skupin so uporabili v številnih raziskavah za določanje filogenetskih skupin človeških izolatov *E. coli*. Zhang in sod. (2002) so metodo uporabili za določanje filogenetskih skupin *E. coli*, izoliranih iz urina in prebavnega trakta, kjer so ugotovili, da večina izolatov pripada filogenetski skupini B2. Metodo so uporabili tudi za določanje filogenetskih skupin živalskih izolatov *E. coli*. Damborg in sod. (2009) so preučevali možne poti prenosa *E. coli* med družinskimi članji in njihovimi domačimi živalmi (psi). Ugotovili so, da sevi *E. coli*, ki so izolirani iz vseh članov družine, pripadajo večinoma filogenetski skupini B2 in v nekaj primerih

filogenetski skupini D. Ta raziskava je podprla hipotezo, da se sevi ExPEC lahko prenašajo med družinskimi člani in domačimi živalmi.

Dosedanje raziskave kažejo, da lahko neznane izolate *E. coli*, ki pripadajo filogenetskima skupinama B2 in D, smatramo kot seve ExPEC. Če je takšen sev izoliran iz domače živali, ta sev predstavlja potencialen zoonotski agens in se lahko prenese na druge družinske člane (Zhang in sod., 2002; Damborg in sod., 2009).

2.5 VIRULENTNI DEJAVNIKI PRI *E. coli*

Virulenten mikroorganizem je vsak mikroorganizem, ki lahko povzroča bolezen pri gostitelju. Prisotnost genov za virulentne dejavnike v genomu mikroorganizma nakazuje na potencialno patogenost za gostitelja. Geni za virulentne dejavnike se večinoma nahajajo blizu skupaj na tako imenovanih otokih patogenosti, ki se lahko nahajajo na kromosomu ali na (konjugativnih) plazmidih. To patogenim mikroorganizmom omogoča hitro razširjanje virulentnih dejavnikov s horizontalnimi genskimi prenosi. Gene za virulentne dejavnike najdemo tudi v genomih bakteriofagov. Prenos genov omogoča bakterijam hitro evolucijo in življenje v novih nišah (Alberts in sod., 2008).

Patogeni mikroorganizmi potrebujejo za obstoj in razmnoževanje v gostitelju različne virulentne dejavnike. Prvi korak pri okužbi je zmožnost kolonizacije gostitelja. Pri kolonizaciji je najpomembnejša dobra adhezija bakterije na celice gostitelja z virulentnimi dejavniki, kot so adhezini. Pri adheziji mora biti tudi uspešnejša od bakterij preostale mikrobiote, ki je prisotna na določenih delih gostitelja, kot so koža in prebavni trakt. Bakterija po prpenjanju potrebuje virulentne dejavnike, ki omogočajo izogibanje pred gostiteljevim imunskim sistemom. V črevesju lahko bakterija veliko hranil pridobi iz okolja. Sevi ExPEC povzročajo zunajčrevesne okužbe, to je na mestih, kjer ni na voljo veliko prostih hranil. Zaradi tega potrebujejo dodatne virulentne dejavnike, ki jim omogočajo prevzem hranil iz takšnega okolja, kot so na primer siredoforji za prevzem železa. Drug način pridobivanja hranil je uničevanje gostiteljevih celic s pomočjo izločanja toksinov. Nekateri patogeni imajo sposobnost neposredne invazije celic, kar jim omogoča izogib imunskemu sistemu, hkrati pa dostop do veliko hranil. Takšni patogeni potrebujejo še dodatne virulentne dejavnike, ki jim omogočajo vstop in izstop iz gostiteljeve celice (Alberts in sod., 2008). Poznamo veliko različnih virulentnih dejavnikov, vsaka bakterija pa ima nabor specifičnih virulentnih dejavnikov, ki pogojuje njihovo patogenost in interakcijo z gostiteljem.

Sevi ExPEC imajo širok nabor različnih virulentnih dejavnikov, saj morajo preživeti v različnih nišah gostitelja. Najprej morajo preživeti v prebavnem traktu, ki je okolje bogato s hranili, kasneje pa morajo kolonizirati zunajčrevesne predele telesa z malo hranili. Sevi ExPEC imajo tako različne tipe adhezinov, kot so fimbrije tipa 1 in P-fimbrije; toksine, kot so hemolizin in CNF; polisaharidno kapsulo in različne sisteme za pridobivanje železa iz

okolja. Vsi virulentni dejavniki se ne izražajo stalno, temveč je njihovo izražanje tesno uravnano glede na razmere v okolju, v katerem se nahajajo – izražajo se npr. v odvisnosti od vrednosti pH, osmolarnosti in temperature (Katouli, 2010). Za ExPEC značilni virulentni dejavniki so zbrani v preglednici 1.

2.5.1 Adhezini

Pri prvem koraku kolonizacije so najpomembnejši adhezini. Patogeni sevi *E. coli* jih uporablajo za kolonizacijo prebavnega trakta, sečnice, mehurja in drugih anatomskega predelov. Adhezine delimo v skupine glede na njihovo morfologijo in strukturo. V grobem jih razdelimo v dve skupini. Fimbrije so debelejše (premera 5–10 nm), medtem ko so fibrile tanjše (premera 2–4 nm). Lahko so dolge in toge ali pa kodraste in prožne (Kaper in sod., 2004).

Fimbrije tipa 1 so nitasti izrastki na površini bakterij. Njihova struktura je zelo ohranjena in značilna za seve UPEC kot tudi komenzalne seve. V splošnem kar 80–90% vseh sevov *E. coli* izraža fimbrije tipa 1. So glavni virulentni dejavnik, ki omogoča kolonizacijo sečil, zaradi svoje razširjenosti med sevi *E. coli* pa v primeru prisotnosti fimbrij tipa 1 v sevu ne moremo trditi, da gre za patogen sev UPEC (Katouli, 2010; Wiles in sod., 2008). Te fimbrije kodira skupina genov, imenovana *fim*. Skupina je sestavljena iz šestih genov, ki kodirajo celotno fimbrijo. Gen *fimH* kodira konico fimbrije, ki omogoča vezavo na glikoproteine (v tem primeru oligosaharide), ki se nahajajo na celični membrani epitelijskih celic. Kljub temu da je prisotnost *fimH* v sevu zelo pogosta pri patogenih in komenzalnih sevih, *E. coli* brez *fimH* ne more okužiti sečil. Zaradi tega je *fimH* pomemben virulentni dejavnik sevov UPEC. Fimbrije tipa 1 naj bi bile pomemben virulentni dejavnik tudi pri sevih SEPEC (Johnson, 1991; Katouli, 2010).

P-fimbrije kodira gruča genov, imenovana *pap*. V omenjeni gruči genov so številni geni, kot so *papF*, *papG* in drugi. Produkt gena *papD* je odgovoren za sestavo fimbrij, medtem ko produkt gena *papB* uravnava izražanje P-fimbrij. P-fimbrije so pogost virulentni dejavnik pri *E. coli* in omogočajo kolonizacijo zgornjih sečil. Mnogi sevi UPEC vsebujejo tako fimbrije tipa 1 kot tudi P-fimbrije, vendar različne tipe fimbrij ne izražajo istočasno. Trenutna hipoteza je, da P-fimbrije sevom ExPEC omogočajo oz. olajšajo kolonizacijo prebavnega trakta, saj jim omogočajo pripenjanje na receptorje prebavnih epitelijskih celic, ki imajo na površini izražen Gal α 1g4Gal β . Vezavo na receptorje omogoča protein PapG, ki se nahaja na vrhu P-fimbrije. Poznamo tri različne tipe PapG proteinov, ki omogočajo vezavno v različnih predelih telesa. PapG II se veže na globozid, ki je prisoten v ledvicah, prav tako je pomemben dejavnik pri povzročanju urosepse. Protein PapG III je pomemben dejavnik pri povzročanju vnetja sečnice, vendar pa ne omogoča vstopa v krvni obtok pri zdravih posameznikih, temveč izolate *E. coli* s *papG* III pogosto izoliramo iz bolnikov z oslabljenim imunskim sistemom (Katouli, 2010).

S-fimbrije (vezava na sialično kislino) najdemo tako pri sevih UPEC kot tudi pri sevih NEMEC. S-fimbrije kodira gruča genov, imenovana *sfa*. Te fimbrije se vežejo na glikoproteine na površini celic, njihovo izražanje pa je odvisno od razmer v okolju, v katerem se bakterija nahaja (Sokolowska-Köhler in sod., 1997; Le Bouguenec in sod., 1992).

Kodrasta vlakna so adhezivna površinska vlakna, ki so tanka in aggregativna. Izražajo jih sevi ExPEC in SEPEC, kot tudi nepatogeni *E. coli* sevi in sevi, ki povzročajo okužbe ptic (sevi APEC). Kodira jih gruča genov *csg*, ki vsebuje dva operona. Kodrasta vlakna se sestavijo zunaj celice in omogočajo adhezijo na različne molekule, ki so na površini gostiteljevih celic. Med te sodijo laminin, fibronektin, plazminogen in MHC I molekule. Kodrasta vlakna igrajo pomembno vlogo pri invaziji gostiteljevih celic, saj se vežejo na fibronektin. Kodrasta vlakna lahko najdemo pri patogenih in nepatogenih sevih, njihovo izražanje pa verjetno uravnavajo okoljski dejavniki. Komenzalni sevi *E. coli* v gostitelju najverjetneje ne izražajo kodrastih vlaken, medtem ko jih sevi SEPEC v enakem okolju izražajo (Gophna in sod., 2001; Mokady in sod., 2005).

Afimbrijski adhezini so družina adhezinov, kjer najdemo različne podskupine, kot so Afa, Dr, M, AAF adhezini in drugi. Geni, ki kodirajo te adhezine, se nahajajo na kromosomu in/ali na plazmidih. Afimbrijski skupini adhezinov Afa in Dr lahko primerjamo s skrajšanimi adhezini. Sestavljeni so le iz nekaj osnovnih enot in enote, ki je pomembna za pritrjanje, ter imajo fino fimbrialno strukturo (Mainil, 2013; Kaper in sod., 2004). Ena izmed enot je invazin, ki omogoča vstop bakterij v gostiteljsko celico. Z afimbrijskimi adhezini se bakterije vežejo na glikoproteine, katere najdemo na površini epitelijskih in črevesnih celic ter celicah sečil. Afimbrijski adhezini Afa in Dr, ki se imenujejo tudi adhezini Afa/Dr, omogočajo vezavo tudi na kolagen tipa 4 in antigenske celične adhezine. Afa/Dr adhezini so virulentni dejavniki sevov UPEC in SEPEC, sintetizirajo pa jih lahko tudi sevi IPEC (Le Bouguenec in sod., 1992; Mainil, 2013).

Homologni adhezin IrgA, imenovan **Iha** (ang. *IrgA homologue adhezin*) je protein, ki se nahaja na zunanjih membranah bakterij, kodira pa ga gen *iha*. Prvič so ga opisali Tarr in sod. leta 1999. Iha je nov ne-hemaglutininski adhezin, ki ima povsem drugačno strukturo kot drugi adhezini. Iha je 67 kDa velik protein, njegov zapis se nahaja na kromosomskega patogenem otoku *E. coli* in ni prisoten pri nepatogenih sevih *E. coli* (Tarr in sod., 2000; Johnson in sod., 2005). Gen *iha* najpogosteje najdemo pri sevih UPEC. Leta 2005 so Johnson in sod. določili prevalenco *iha* pri sevih UPEC in ExPEC. Gen *iha* je bil prisoten pri kar 74 % vseh izoliranih sevov. Vredno je omeniti, da gen *iha* najdemo tudi pri črevesnih oz. fekalnih izolatih *E. coli*, vendar je prevalenca nižja (22 %) (Johnson in sod., 2005).

AggR je transkripcijski aktivator sinteze AAF/I in AAF/II. Večina sevov EAggEC vsebuje plazmid, ki ima zapise za različne virulentne dejavnike, med drugim afimbriske adhezine tipov AAF/I, AAF/II in AAF/III (Kahali in sod., 2004). Adhezin AAF/I sodeluje pri sintezi biofilma in hemaglutinaciji s človeškimi eritrociti (Scheutz in sod., 2011) in predstavlja glavni virulentni dejavnik sevov EAggEC.

2.5.2 Toksini

Toksini povzročajo poškodbe gostitelja. Delimo jih v dve skupini: eksotoksine in endotoksine. Povzročajo lahko poškodbe membrane (hemolizini in lizini) in znotrajcelične poškodbe; v tem primeru se toksini vežejo na celične receptorje, preidejo celično membrano in delujejo na znotrajcelično tarčo (Middlebrook in Dorland, 1984). *E. coli* tvori različne tipe toksinov, sposobna je tvorbe oligopeptidnih toksinov in toksinov AB – v obeh primerih gre za eksotoksine. Sposobna je tudi sinteze toplotno nestabilnih enterotoksinov, verotoksinov, šigovih toksinov in toksinov, ki tvorijo pore (Mainil, 2013).

Alfa-hemolizin je lizin, ki tvori pore v gostiteljevih celicah. *E. coli* alfa-hemolizin sprosti v okolje, kjer povzroča lizo eritrocitov in ledvičnih epitelijskih celic. Z lizo celic se sprosti prosto železo, ki ga bakterija prevzame s pomočjo sideroforjev. Alfa-hemolizin je toksičen za evkarionte in povzroči vnetje ter uničenje tkiva. Gen *hlyA*, ki kodira alfa-hemolizin, se nahaja v kromosomu, njegovo izražanje pa uravnava koncentracija prostega železa v okolju. Prisotnost gena *hlyA* v izolirani *E. coli* večinoma nakazuje na okužbo zgodnjega dela sečil s sevi UPEC, redkeje pa ga najdemo pri komenzalnih sevih (Katouli, 2010).

Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 ali CNF1 (ang. *cytotoxic necrotising factor*) sintetizirajo sevi UPEC in se večinoma sintetizira skupaj z alfa-hemolizino. Gen *cnf1*, ki kodira CNF1, je na bakterijskem kromosomu. Gen *cnf1* kodira 113 kDa velik protein, katerega tarča je Rho družina GTP-vezavnih proteinov. CNF1 tarčo aktivira, kar vpliva na številne celične aktivnosti, kot so sinteza stresnih aktinskih filamentov, lamelopodov, dilopodov in modulacija vnetnih signalnih poti. CNF1 se najprej veže na lamininski receptor na površini celic, s pomočjo katerega vstopi v celico. Sevi UPEC, ki imajo zapis za CNF1, imajo prednost pred drugimi virulentnimi sevi, saj jim toksin omogoča apoptozo celic in s tem prodror v globlje plasti sečil. Med drugim spodbuja gibljivost celic in invazijo bakterij v gostiteljske celice (Wiles in sod., 2008; Katouli, 2010).

Uropatogeni specifični protein oz. Usp (ang. *uropathogenic specific protein*) je homolog toksinu zonula occludens, ki ga sintetizira *Vibrio cholerae*. Toksin *V. cholerae* poveča prepustnost epitelija tankega črevesja, saj spremeni tesne stike med celicami, imenovane zonula occludens. Gen, podoben genu *zot*, najdemo pri sevih UPEC, predvsem pri izolatih iz bolnikov z vnetjem ledvic (Kurazono in sod., 2000; Bauer in sod., 2002; Marrs in sod., 2005). Usp-toksin je nukleazni bakteriocin, ter ima nespecifično nukleazno aktivnost,

podobno kolicinom, kar povzroči razgradnjo DNA. Povezujemo ga s sevi UPEC, vendar ga lahko najdemo tudi pri nekaterih drugih sevih ExPEC (Zaw in sod., 2013).

OmpT (ang. *outer membrane protease*) uvrščamo v družino visoko homolognih proteaz zunanje membrane (omptinov). Najdemo jih pri različnih po Gramu negativnih baterijah. OmpT kodira gen *ompT*, ki nakazuje na zapletene okužbe sečil, zaradi česar ga obravnavamo kot pomemben virulentni dejavnik UPEC. OmpT cepi in tako deaktivira protamin, ki ga izločajo epitelijske celice sečil in deluje kot antimikotik (Webb in Lundrigan, 1996; Vandeputte-Rutten in sod., 2001). Proteolitična aktivnost omptinov omogoča bakterijam, da se branijo pred gostiteljem, vstopajo v gostiteljeve celice in se nato gibljejo znotraj celic (Vandeputte-Rutten in sod., 2001). Sevi, ki imajo gen *ompT*, so bolj virulentni, saj povzročajo vnetje ledvic in sistemskie okužbe bolj pogosto kot vnetje sečnice (Webb in Lundrigan, 1996).

Kolibacin, imenovan tudi NRP-poliketidni protein, najdemo v veliko komenzalnih in ExPEC sevih, ki pripadajo filogenetski skupini B2. Kolibacin je neribosomski peptid oz. NRP (ang. *non-ribosomal peptide*), kodira pa ga gruča genov, imenovana *clb*. Kolibacin v evkariontskih celicah povzroča prelom dvostranske DNA. Ker povzroča poškodbe gostiteljevega dednega zapisa, ni le patogen za gostitelja, temveč lahko povzroča tudi rakava obolenja (Homburg in sod., 2007; Bian in sod., 2013). Poškodbe DNA aktivirajo celične signalne poti v gostitelju, kar vodi do zaustavitve celičnega cikla, povečanje celic in vodi v celično smrt (Johnson in sod., 2008a). Gruča genov *clb* je sestavljena iz več enot. Gen *clbA* kodira fosfopantetil transferazo, ki je eden najbolj pomembnih proteinov pri sintezi NRP, saj je posttranslacijski aktivator. *clbQ* gen kodira tioesterazo (Homburg in sod., 2007; Bian in sod., 2013). Genetski otok, ki kodira mehanizem za sintezo kolibacina, se imenuje otok *pks*, gena *clbA* in *clbQ* pa sta označevalca otoka *pks* (Johnson in sod., 2008a).

IbeA je verjetno invazin, ki igra vlogo v patogenezi različnih patotipov ExPEC, največkrat pa ga najdemo pri sevih NEMEC in APEC. Gen *ibeA* kodira 50 kDa velik protein in se nahaja na genskem otoku, imenovanem GimA (Germon in sod., 2005; Homeier in sod., 2010). Sodeluje pri vdoru v mikrovaskularne endotelne celice in povzroča meningitis pri novorojenčkih. Zaenkrat še ni zapisov o IbeA najdenih pri sevih UPEC (Mahjoub-Messai in sod., 2011). Receptorji za IbeA spominjajo na albuminske receptorje, najdemo pa jih na mikrovaskularnih endotelijskih celicah ljudi in goveda. IbeA ima tudi pomembno vlogo pri sevih APEC, ki okužujejo piščance ter povzročajo sistemskie okužbe vključno z vnetjem možganov (Cortes in sod., 2008; Wang in sod., 2011).

Stx1 in Stx2 sta proteina *E. coli*, ki sta sorodna šigovemu toksinu šigel. *E. coli*, ki sintetizira šigov toksin, povzroča izbruhe hemoragične mrzlice in hemoragičnega uremičnega sindroma pri ljudeh. Šigovi toksini so AB-toksini, ki so zgrajeni iz ene A-

podenote in petih B-podenot (Fraser in sod., 2004). Povzročajo poškodbe mikrovaskularnih endotelijskih celic, kar vodi v prenehanje sinteze proteinov in apoptozo. Stx2 ima med drugim večji citotoksični učinek na glomerularne endotelijске celice (Karmali, 2004).

2.5.3 Sistemi za privzem železa

Sevi ExPEC večinoma naseljujejo predele telesa, ki imajo nizke koncentracije železa, saj je železo vezano na železo-vezavne proteine (npr. transferin) in je tako nedosegljivo za patogene bakterije. Bakterije potrebujejo železo za rast, prav tako je železo glavni kofaktor v metabolizmu bakterij. Če želi bakterija preživeti v okolju, kjer ni prostega železa, mora sintetizirati proteine, ki imajo večjo afiniteto za železo kot gostiteljevi železo-vezavni proteini. Takšni bakterijski proteini, ki omogočajo vezavo železa, se imenujejo sideroforji. Bakterija jih izloči v okolje, kjer nato tekmujejo za železo, kasneje pa so znova privzeti s strani bakterij. Bakterije sintetizirajo sideroforje z različno afiniteto do železa, ki jih nato sproščajo v okolje glede na koncentracijo železa v okolju. Sideroforji so bistveni za preživetje patogenih bakterij v gostitelju (Mokady in sod., 2005).

Aerobaktin je dihidroksamatni siderofor. Sprva so ga odkrili pri bakteriji *Enterobacter aerogenes*, zdaj pa vemo, da je prisoten tudi pri drugih članih enterobakterijah in je pomemben virulentni dejavnik pri *E. coli* in tudi pri bakteriji *Klebsiella pneumoniae*. Predstavlja pomemben siderofor pri sevih ExPEC, ki okužijo človeka, kot tudi pri sevih, ki so patogeni za domače živali. Geni, ki kodirajo aerobaktin, se nahajajo v plazmidih (npr. plazmid pColV-K30) ali v bakterijskem kromosomu. Gruča genov, povezana z aerobaktinom, je sestavljena iz petih genov (*iucABCD* in *iutA*). Gen *iucD* kodira encim, ki je pomemben na začetku sinteze aerobaktina. Gen *iutA* kodira receptor za siderofor (Thariath in sod., 1993). Aerobaktin je pomemben virulentni dejavnik sevov APEC in SEPEC (Mokady in sod., 2005).

IroN je receptor siderofora salmohelin (Feldmann in sod., 2007). Gen, ki kodira IroN se nahaja v lokusu *iroA*, ki je sestavljen iz dveh operonov *iroN* in *iroBCDE* (Hantke in sod., 2003). Receptor IroN, ki ga najdemo pri *E. coli* ima visoko homologijo (77%) s siderofornim receptorjem IroN_{sal} pri bakteriji *Salmonella* (Russo in sod., 2002). IroN je virulentni dejavnik sevov ExPEC in sodeluje pri invaziji urotelijskih celic (Feldmann in sod., 2007). Koncentracija železa v okolju uravnava izražanje gena *iroN*; do izražanja pride v urinu, kot tudi v krvi pri ljudeh. Russo in sod. (1999) so odkrili, da je prisotnost proteina IroN veliko višja pri izolatih, ki povzročajo okužbe sečil in krvi kot pri črevesnih izolatih *E. coli*. Kasneje so odkrili tudi, da sevi, ki ne izražajo proteina IroN, niso sposobni preživeti v urinu. IroN lahko najdemo tudi pri sevih SEPEC (Russo in sod., 1999; Russo in sod., 2002).

Hbp oz. hemoglobin vezavna proteaza (ang. *haemoglobin-binding protease*), je proteaza, ki jo najdemo pri sevih ExPEC. Hbp je identičen proteinu Tsh, ki je temperaturno odvisen avtotransporter za hemoglobin, ki ga najdemo pri sevih APEC (Otto in sod., 2002; Kaper in sod., 2004). Hbp sodi v skupino IgA1 proteaznih proteinov, njegova naloga pa je vezava hema. Hbp se veže na haemoglobin, ga razgradi in ostane vezan na sproščenem hemu. Gen *hbp*, ki kodira Hbp, so prvotno našli v plazmidu pColV-K30 (Otto in sod., 1998). *E. coli* sprošča Hbp v okolje, le ta pa prinaša hem tudi *B. fragilis*, kar omogoča preživetje *B. fragilis* v okolju z nizko koncentracijo železa (Otto in sod., 2002; Kaper in sod., 2004).

IreA oz. element, ki se odziva na železo (ang. *iron-responsive element*), je 75,3 kDa velik protein, katerega kodira gen *ireA*. Najdemo ga na patogenem otoku sevov *E. coli*. IreA večinoma najdemo v sevih ExPEC, kjer ima poleg vezave železa, vlogo tudi pri pritrjanju na površino. Podoben je mnogim bakterijskim siderofornim receptorjem, med drugim IrgA, ki je s strani železa reguliran adhezin pri bakteriji *Vibrio cholerae*. *ireA* ima povišano izražanje v urinu in krvi, sodeluje pa tudi pri kolonizaciji mehurja. Zaradi tega je verjetno, da ima vlogo pri okužbah s sevi UPEC (Russo in sod., 2001).

FyuA je receptor za jersinijabaktin in omogoča kolonizacijo sečil (Spurbeck in sod., 2012). Jersinijabaktin je siderofor in je pomemben virulentni dejavnik pri vrstah iz rodu *Yersinia*. Geni, ki kodirajo protein in sistem privzema, se nahajajo na otoku visoke patogenosti (ang. *high-pathogenicity island*, HPI). HPI je zelo pogost tudi pri sevih *E. coli* (Schubert in sod., 2000). FyuA je najbolj pogost pri izolatih UPEC in SEPEC, najdemo pa ga tudi pri izolatih NEMEC (Johnson in Stell, 2000; Johnson in sod., 2002).

2.5.4 Dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu

Imunski sistem je pomemben mehanizem, ki preprečuje okužbe gostitelja s patogenimi organizmi. Bakterije, ki želijo rasti v takšnem okolju, potrebujejo virulentne dejavnike, ki jim omogočajo premagovanje, izogib ali onemogočanje delovanja imunskega sistema. Razširjen mehanizem bakterij, ki omogoča izogibanje pred imunskim sistemom, je sinteza kapsule. Kapsula prekrije bakterijo in tako zakrije njene antigene, imunski sistem pa je tako ne prepozna. Pomemben je tudi antigenski premik, ki omogoči spremištanje antigenov na površini bakterij, kar onemogoča pritrditev specifičnih protiteles na bakterijo (Cirl in sod., 2008).

TraT je zunanji izključitveni protein, ki sodeluje pri prenosu plazmidov. Omogoča odpornost proti serumu, saj preprečuje pravilno sestavo in delovanje membranskega komplementnega sistema (Starčič Erjavec in sod., 2011; Wooley in sod., 1993). Gre za 25 kDa velik lipoprotein zunanje membrane, gen *traT* pa se nahaja v velikem plazmidu IncF (Johnson, 1991). TraT je eden najpomembnejših virulentnih dejavnikov pri sevih ExPEC; izolirali so ga iz več kot 70 % izolatov UPEC in več kot 50 % izolatov SEPEC (Starčič Erjavec in sod., 2011).

TcpC je protein, ki ga kodira gen *tcpC* in je del Toll/interlevkinu podobnega receptorja 1. Inhibira Toll-u podobne receptorje in MyD88 signaliziranje v gostitelju, kar onemogoča hitri prirojeni imunski odziv. Bakterije sintetizirajo TcpC in ga sprostijo v okolje. TcpC je inhibitorni homolog in direktno preprečuje funkcijo toll-u podobnega receptorja. To omogoča preživetje bakterij v zgodnji fazi okužbe, saj omogoča rast populacije do kritične mase. TcpC poveča resnost okužbe s sevi UPEC pri ljudeh. Sevi UPEC, ki sintetizirajo TcpC, povzročajo resne okužbe ledvic in so večinoma izolirani iz otrok, ki imajo akutno vnetje ledvic. Seve, ki tvorijo TcpC, redko najdemo v okoljskih sevih *E. coli*. Zaradi tega je TcpC klinično pomemben virulentni dejavnik (Starčič Erjavec in sod., 2010; Cirl in sod., 2008).

Iss je protein, ki poveča preživetje v serumu. Gen *iss*, ki kodira Iss, najdemo v plazmidih ColV pri *E. coli*, tovrstni izolati pa povzročajo okužbe pri ljudeh. Iss je 10-11 kDa velik lipoprotein, najdemo pa ga v zunanji bakterijski membrani. Iss ima anti-komplementarni efekt. Sevi APEC, ki imajo *iss*, so do 100-krat bolj virulentni kot sevi brez omenjenega gena. Iss je torej pomemben virulentni dejavnih sevov APEC (Nolan in sod., 2003). Gen *iss* pa ni prisoten le pri sevih APEC; najdemo ga tudi pri črevesnih izolatih *E. coli* in še bolj pogosto pri krvnih izolatih *E. coli* (Fernandez-Beros, 1990). Iss najdemo tudi pri sevih, ki povzročajo vnetje ledvic in redkeje pri sevih, ki povzročajo okužbe sečil (Johnson, 1991).

Kapsularni polisaharidi skupine III so pomembni virulentni dejavniki sevov ExPEC. Omogoča preživetje v serumu, preprečuje detekcijo s strani O antiga in fagocitozo (Katouli, 2010; Russo in sod., 1998). Kapsularni polisaharidi skupine III kodirajo geni *kspDMTE*. KspMT se vstavi v membrano in omogoča vezavo ATP. Kapsule skupine III so homologne kapsulam K1 (Russo in sod., 1998).

Polisaharidne kapsule *E. coli* K1 so največkrat prisotne pri sevih NEMEC. Kapsula K1 prekrije bakterije, na površini je izražena sialična kislina, ki onemogoča zaznavo s prirojenim imunskim sistemom in omogoča interakcijo s površino gostiteljevih celic (Daines in sod., 2000; Severi in sod., 2007). Kapsula K1 je sestavljena iz linearnih homopolimerov sialičnih kislin (NeuNAc), povezanih z $\alpha(2,8)$ -vezmi. Genski lokus *ksp* ima tri funkcionalne regije, ki so odgovorne za sintezo kapsule K1. Protein NeuB je sintaza sialične kisline, ki omogoča sintezo NeuNAc (Daines in sod., 2000).

TraJ pri sevih NEMEC sodeluje pri prehodu krvno-možganske pregrado. TraJ je pozitivni regulator več genov, ki so potrebni pri konjugaciji. Njegova vloga pa je pomembna tudi pri invaziji humanih možganskih mikrovaskularnih endotelijskih celic, ki sestavljajo krvno-možgansko pregrado. Trenutno obstaja več modelov, kako TraJ prispeva k prehodu skozi krvno-možgansko pregrado (Hill in sod., 2004; Badger in sod., 2000).

Preglednica 1: Preiskovani geni za virulentne dejavnike in njihova povezava z različnimi patotipi *E. coli*.
 Table 1: Summary of virulent genes and their correlation with different *E. coli* groups.

Geni	UPEC	SEPEC	NEMEC	IPEC	APEC	DRUGO
<i>fimH</i>	+					
<i>papGII</i>	+					
<i>papGIII</i>	+					
<i>sfa</i>	+		+			
<i>csg</i>	+	+	+		+	
<i>afa/dr</i>	+	+				
<i>iha</i>	+	+	+	+		
<i>aggR</i>				+(EAggEC)		
<i>hlyA</i>	+					
<i>cnf1</i>	+					
<i>usp</i>	+					
<i>ompT</i>	+					
<i>clbQ/A</i>	+	+	+			
<i>ibeA</i>			+		+	
<i>stx12</i>				+(STEC)		
<i>iucD</i>		+			+	
<i>iroN</i>	+	+				
<i>hbp</i>						+(IAI)
<i>ireA</i>	+	+				
<i>fyuA</i>	+	+	+			
<i>traT</i>	+	+				
<i>tcpC</i>	+					
<i>iss</i>	+	+			+	
<i>kspMT</i>	+	+	+			
<i>neuD</i>			+			
<i>traJ</i>			+			

2.6 ŽIVALI KOT POTENCIALNI REZERVOAR SEVOV ExPEC

V zadnjih letih se pojavljajo hipoteze o potencialnem živalskem rezervoarju ExPEC in njihovem morebitnem virulentnem potencialu. Kot potencialni živalski gostitelji se omenjajo mačke, psi, perutnina in živina (govedo in prašiči). Dokazanih je bilo več prenosov sevov UPEC med družinskimi člani, skupaj z njihovimi domačimi živalmi. Pomemben rezervoar sevov ExPEC, bi lahko bila perutnina – ta je namreč velikokrat tarča ptičje patogene *E. coli* ali (ang. *avian pathogenic E. coli*), ki je genetsko zelo podobna sevom ExPEC. Sevi ExPEC med drugim povzročajo vnetje mlečnih žlez pri govedu, kontaminirano mleko pa lahko predstavlja vir okužbe za ljudi. Zaključimo lahko, da številne živalske vrste predstavljajo potencialni rezervoar za seve ExPEC, obstaja pa tudi več poti prenosa ExPEC. ExPEC se med družinskimi člani prenašajo po fekalno-oralni poti. APEC pri perutnini se na ljudi prenaša s kontaminirano hrano. Podobno velja za živino, z ExPEC sevi okuženo meso lahko najdemo tako v klavnicah kot tudi v predelovalnih obratih in v končnem živilu. Kljub temu obstaja odprto vprašanje, ali sevi

ExPEC resnično izvirajo iz živalskega rezervoarja ali do kontaminacije pride med obdelavo živil živalskega izvora (Bélanger in sod., 2011).

2.6.1 Sevi APEC pri perutnini

Sevi APEC povzročajo kolibacilozo pri perutnini. Kolibaciloza je sindrom, pri katerem pride do poškodb več organov (npr. zračne vreče, žrela, ovoja trebušne votline), osteomielitisa ali okužbe rumenjakov. Najpogosteje pride najprej do okužbe dihal, sledi pa sepsa in v večini primerov smrt. Kolibaciloza je glavni povzročitelj smrti perutnine na svetu. Diagnoza je postavljena, ko so sevi APEC izolirani iz drugače sterilnih predelov perutnine (Ewers in sod., 2004). Sevi APEC poleg perutnine povzročajo okužbe puranov, rac in drugih ptičev. Uvrščamo jih v skupino ExPEC, saj imajo širok nabor podobnih oz. enakih virulentnih dejavnikov, zaradi česar bi sevi APEC predstavljeni potencialno tveganje za zoonotski prenos na človeka (Ewers in sod., 2004; Antão in sod., 2009). Zapise za virulentne dejavnike najdemo v plazmidih, med katerimi je najbolj pomemben veliki plazmid pAPEC-O2-ColV. Zaradi visoke podobnosti med sevi APEC in ExPEC (predvsem sevi UPEC) je bilo narejenih več študij, ki govorijo o zoonotskem potencialu sevov APEC (Skyberg in sod., 2006). Plazmid pAPEC-O2-ColV je visoko homogen plazmidu in patogenem otoku PAI III pri humanem sevu UPEC 536 (Skyberg in sod., 2006). Skyberg in sod. (2006) so ustvarili sev *E. coli*, v katerega so vključili pAPEC-O2-ColV ter nato opazovali uropatogene značilnosti. Sevu je plazmid omogočil rast v urinu, sposoben pa je bil tudi okužbe sečil miši. Plazmid ima med drugim zapise za prevzem želeta iz okolja, katere najdemo tako pri sevi APEC in UPEC (Skyberg in sod., 2006). Moulin-Schouleur in sod. (2007) so določali filogenetske skupine izolatov APEC in UPEC. Določili so filogenetsko podskupino B2-1, ki je vsebovala 28 APEC sevov in 25 človeških ExPEC sevov. Sevi v tej skupini so bili visoko virulentni in so vsebovali enake virulentne dejavnike, med seboj pa so bili v veliki meri neločljivi. Rezultati so tako nakazovali, da določene podskupine ExPEC in APEC niso specifične za gostitelja in lahko okužijo različne gostitelje, kar potrjuje hipotezo o zoonotskem potencialu sevov APEC (Moulin-Schouleur in sod., 2007).

2.6.2 Sevi ExPEC pri živini in živalskih produktih

Sevi *E. coli* poleg človeškega prebavnega trakta naseljujejo tudi prebavne trakte drugih sesalcev, kot so govedo in prašiči. Med *E. coli* sevi pa se znajdejo tudi ExPEC sevi (Bélanger in sod., 2011). Sevi ExPEC povzročajo mastitis (okužbe mlečnih žlez) pri govedu. To povzroča velike izgube v mlečni industriji, vendar ne vodi do prenosa na ljudi, saj je prodaja surovega mleka v mnogih državah prepričena, obstajajo pa tudi strogi protokoli pregleda mleka pred prodajo (Bélanger in sod., 2011; Shpigel in sod., 2008). Do prenosa ExPEC na ljudi prihaja preko kontaminiranih mesnih produktov. Sklep, da je do okužbe prišlo res zaradi prenosa ExPEC iz kontaminirane hrane, izvira iz dejstva, da so bili zabeleženi izbruhi UTI okužb v določenih regijah. Ti izbruhi niso bili zabeleženi med družinskimi člani, temveč med posamezniki, kar kaže na prenos okužbe preko

kontaminirane hrane (Vincent in sod., 2010). Izbruhi so v določenih primerih izvirali iz obdelanega mesa (Vincent in sod., 2010) ali pa direktno iz mesnic (Santo in sod., 2007). Santo in sod. (2007) so vzorčili mleto goveje meso, naprave za mletje mesa in roke mesarjev, kjer so med vzorčenjem na podlagi prisotnosti virulentnih dejavnikov odkrili več sevov ExPEC. Sevi ExPEC so bili prisotni na mesu, kot tudi na napravah. Poleg tega so bili prisotni sevi tudi odporni proti več antibiotikom, kar otežuje zdravljenje in predstavlja tveganje za širjenje odpornosti (Santo in sod., 2007). Vincent in sod. (2010) so vzorčili hrano iz restavracij in obdelano meso iz trgovin, ter primerjali izolirane seve ExPEC s sevi, ki so povzročali okužbe sečil pri ljudeh. Največ sevov ExPEC so našli pri pakiranem piščančjem mesu, nekaj primerov pa je bilo tudi pri govejem in svinjskem mesu (pri slednjem je bilo prisotnih manj vzorcev), izolirani sevi ExPEC pa so bili neločljivi od človeških sevov, ki povzročajo okužbe sečil. Za določanje točnega izvora ExPEC je potrebno še več raziskav, saj iz dosedanjih raziskav ni razvidno, ali ExPEC izvirajo iz živalskega rezervoarja ali je do kontaminacije prišlo med obdelavo mesa (Vincent in sod., 2010). Iz dosedanjih podatkov lahko sumimo, da ExPEC lahko izvirajo iz živalskih rezervoarjev in preidejo na meso v klavnicih, vendar so za potrditev hipoteze potrebne dodatne raziskave (Bélanger in sod., 2011).

2.6.3 Sevi ExPEC pri domačih živalih

Domače živali že vrsto let živijo in se razvijajo v bližini ljudi. Psi in mačke, so poleg ljudi pogoste tarče *E. coli*, ki povzroča okužbe sečil. Še ne dolgo nazaj je veljalo, da so si ti sevi med seboj različni in so specifični za določene gostitelje (Beutin, 1999). Danes imamo na voljo več metod za določanje virulentnih dejavnikov in podobnosti med različnimi sevi. Zdaj vemo, da lahko sevi *E. coli*, ki povzročajo okužbe sečil pri psih, povzročajo okužbe tudi pri ljudeh, med drugim lahko vidimo tudi prenos genov za odpornost proti antibiotikom (Johnson in sod., 2001a). Johnson in sod. (2001a) so preučili več sevov, izoliranih iz psov in ljudi z okužbami sečil, ki niso živeli v isti skupnosti. Izoliranim sevom *E. coli* so določili fenotip MRHA (ang. *mannose-resistant hemagglutination*) in njihove virulentne dejavnike. Rezultati so pokazali, da se populaciji sevov iz psov in ljudi prekrivata, določene skupine klonov pa lahko povzročajo okužbe pri obeh gostiteljskih vrstah, saj jih med seboj ni mogoče ločiti. Domače živali tako predstavljajo potencialni rezervoar *E. coli*, prisoten je tudi zoonotski potencial. Kljub temu je vredno omembe, da lahko do prenosa *E. coli* pride tudi v obratni smeri (Johnson in sod., 2001a). Johnson in sod. (2001b) so preučili še več humanih izolatov *E. coli* in izolatov iz domačih živali (psov in mačk), ki so bili razporejeni v pet skupin ET (ET – multilokusne encimsko-elektroforezne skupine). Ugotovili so, da se izolati glede na prisotne virulentne dejavnike, patotipe ali glede na rezultate elektroforeze v pulzirajočem električnem polju ne razvrstijo v podskupine glede na gostitelja. Našli so izolate iz psov in ljudi, ki imajo skoraj identičen profil virulentnih dejavnikov, kar prav tako podpira hipotezo prenosa med različnimi gostitelji (Johnson in sod., 2001b).

V nadaljevanju so analizirali izolate *E. coli* iz domačih živali in ljudi, ki živijo v isti skupnosti. Johnson in sod. (2008b) so leta 2008 objavili rezultate prenosa izolatov *E. coli* med družinskimi člani, vključno z domačimi živalmi. S študijo so najprej potrdili, da imajo člani v enaki skupnosti velikokrat prisotne enake fekalne seve *E. coli*. Enake seve si najbolj pogosto delijo domače živali iste skupnosti, nato družinski člani, na tretjem mestu pa so sevi, ki so prisotni tako pri domači živali, kot pri družinskem članu. Iz tega je mogoče zaključiti, da nevarnost prenosa iz živali na človeka ni višja, kot je prenos med ljudmi. Kljub temu je vredno omeniti, da je imelo več kot 50 % živalskih fekalnih izolatov *E. coli* zapis za virulentne dejavnike, ki potencialno lahko povzročajo okužbe pri ljudeh, kar poveča nevarnost prenosa iz domače živali na ljudi (Johnson in sod., 2008b). Johnson in sod. (2009) so leta 2009 končno potrdili prisotnost enakih klonov UPEC pri mačkah, psih in družinskih članih, pri vseh pa so povzročali okužbe sečil (Johnson in sod., 2009). Vsi ti rezultati potrjujejo sum, da so domače živali potencialni rezervoar patogenih sevov *E. coli*, potrebno pa je preučiti še več dejavnikov, kar bi omogočilo določitev njihove zoonotske grožnje. Prav tako še ni dokazano, ali prenos resnično poteka po fekalno-oralni poti (Bélanger in sod., 2011).

2.7 MIKROBIOTA PREBAVNEGA TRAKTA KUNCEV IN NJIHOVA KRMA

Kunci, zajci in drugi majhni rastlinojedci imajo drugačen prebavni trakt kot ljudje. Za razliko od ljudi, lahko kunci prebavijo hrano, ki vsebuje veliko vlaknin (Grün, 2002). Njihova mikrobiota pa se, kot pri ljudeh, spreminja skozi življenje. Mladiči imajo v mikrobioti prisotne anaerobe in fakultativno anaerobne bakterije, kasneje pa prevladujejo arheje, ki omogočajo prebavo vlaknin (Combes in sod., 2011; Fortun-Lamothe in Boullier, 2007). *E. coli* je v prebavnem traktu večinoma prisotna pri mladičih, kjer lahko povzroča različna obolenja, kot prehoden mikroorganizem pa se lahko pojavi tudi kasneje. Patogena *E. coli* predstavlja velik problem pri mladičih, okužbe pa lahko zmanjšamo z nadzorovanim vnosom hranil (Blanco in sod., 1996; Fortun-Lamothe in Boullier, 2007) ali zmanjšanim vnosom krme (Gidenne in sod., 2012). Pravilna prehrana in higiena pomembno vplivata na zdravje kuncev v rejništvu.

2.7.1 Prebavni trakt in mikrobiota kuncev

Prebavni trakt kuncev omogoča prebavo hranil, ki vsebujejo veliko vlaknin. 40 % prebavnega trakta predstavlja povečan slepi izrastek ali cekum, ki leži na meji med debelim in tankim črevesom. V tem predelu se nahajajo mikroorganizmi, ki omogočajo razgradnjo celuloze (Heric, 2005). Pri kuncih je pomembna tudi cekotrofija, kjer kunci izločeno mehko blato ponovno zaužijejo (Kušar in Avguštin, 2010). Večinski del fermentacije zaužite hrane kuncev se odvija v cekumu, kjer se proizvede med 30–40 % potrebne energije za preživetje kunca, energija pa nastaja pri sintezi kratkoverižnih maščobnih kislin in absorbciji (Kušar in Avguštin, 2010).

Vsek gram mikrobiote cekuma odraslega kunca vsebuje 10^{11} mikrobnih celic. Večinski del mikroorganizmov so bakterije in metanogene arheje (Kušar in Avguštin, 2010), prisotne so lahko tudi kvasovke in protoziji (Fortun-Lamothe in Boullier, 2007), mikrobiota pa se skozi staranje kunca spreminja (Combes in sod., 2011). Kot pri drugih sesalcih, je fetus kunca pred rojstvom sterilен. Ob rojstvu prejme mladič kunca mikrobioto, ki naseljuje porodni kanal in mikrobe bližnje okolice (Combes in sod., 2011), kar zaznamuje končno sestavo mikrobiote prebavnega trakta (Fortun-Lamothe in Boullier, 2007). V prvih dveh tednih življenja so prisotni anaerobni in fakultativno anaerobni organizmi. Fakultativni anaerobi, predvsem *Streptococcus* in *E. coli* dosežejo največjo gostoto v drugem ali tretjem tednu življenja, kasneje pa so večinoma odsotni. Večina mikrobov v prebavnem traktu kunca so po Gramu negativne bakterije, ne-sporulirajoči *Bacteroides*, v manjšini pa so prisotne sporulirajoče bakterije, kot so *Clostridium* in druge (Fortun-Lamothe in Boullier, 2007). Med odraščanjem kunca pride do več sprememb v sestavi mikrobiote, za katero se predvideva, da doseže svojo končno sestavo pri 70. dnevu življenja kunca. Pri razgradnji rastlinskega materiala imajo pomembno vlogo arheje, katere so v prebavilu kunca prisotne po sedmem dnevu življenja oz. ko mladič prične s hranjenjem z rastlinskim materialom (Combes in sod., 2011, Fortun-Lamothe in Boullier, 2007). Ko mladič preneha sesati, se te namnožijo, najbolj zastopane pa so metanogene arheje iz rodu *Metanobrevibacter* (Kušar in Avguštin, 2010).

Podobno kot pri ljudeh igra mikrobiota prebavnega trakta pomembno vlogo pri zaščiti kuncev pred okužbo s patogenimi sevi, saj predstavlja pregrado in preprečuje pritrjanje patogenih sevov. Prav tako vpliva na razvoj in končno delovanje imunskega sistema prebavnega trakta (Fortun-Lamothe in Boullier, 2006).

Kljub temu da *E. coli* večinoma ni prisotna v prebavnem traktu kunca po več kot treh tednih oz. ko prenehajo sesati, se *E. coli* lahko kasneje ponovno pojavi v prebavnem traktu (Fortun-Lamothe in Boullier, 2007; Prohászka, 1980). Pri odraslih kuncih, ki so uživali krmo, kontaminirano s patogeno *E. coli*, ne pride do okužbe, *E. coli* pa je prisotna v blatu kuncev pet do 18 dni po zaužitju (Prohászka, 1972). To pomeni, da je bila *E. coli*, ki so jo izolirali iz prebavnega trakta odraslih kuncev, tam prisotna le prehodno in ni predstavljala njihove naravne mikrobiote (Prohászka, 1972; Blanco in sod., 1996; Peeters in sod., 1988).

2.7.2 *E. coli* kot patogen kuncev

Sevi *E. coli*, ki okužijo kunce, povzročajo največ problemov pri industrijskih rejcih kuncev. *E. coli* v teh primerih predstavlja glavni razlog smrti rejnih kuncev. Glavni vzrok pogina so okužbe s sevi EPEC, za katere je znano, da niso sposobni tvorbe toplotno stabilnih ali nestabilnih toksinov, prav tako niso invazivni. Sevi EPEC se pritrđijo na črevesne epitelijske celice in mikrovile, kolonizirajo predel ter povzročajo razgradnjo mikrovilov. Takšne seve imenujemo tudi AEEC (ang. *attaching and effacing E. coli*) (Blanco in sod., 1996). S pomočjo histološkega pregleda preparatov in elektronske

mikroskopije so pokazali, da se ti sevi tesno pritrdijo na epitelijske celice, kjer povzročajo razgradnjo mikrovilov, lučenje epitelijskih celic in poškodbe stene črevesja, kar vodi v podhranjenost ter smrt. AEEC povzročajo kolibaktozo pri mladičih in odraslih kuncih, smrtnost pa je odvisna od seva. Sevi AEEC, izolirani iz mladičev, so pripeti v vseh delih črevesja, povzročajo rumeno vodeno blato in imajo visoko smrtnost. Sevi AEEC, ki so jih izolirali iz odraslih kuncev, se pritrjajo le na epitelijske celice končnega dela tankega črevesja in na celice debelega črevesja, smrtnost pa je odvisna od virulence prisotnega seva (Blanco in sod., 1996). Peeters in sod. (1988) so pokazali, da lahko sevi AEEC, izolirani iz kunčnih mladičev, okužijo tudi odrasle kunce, smrtnost pa je pri teh primerih zelo nizka.

Mehanizem okužbe sevov EPEC pri kuncih je podoben mehanizmu okužbe ljudi. Pri humanih sevih EPEC je bil odkrit gen *eae*, ki ima zapis za zunanjih membranski protein, ki omogoča pritrditev in uničenje mikrovilov. Homologe *eae* so našli pri kunčjih sevih AEEC, ki predstavljajo virulentni označevalec in omogočajo določanje okužbe s PCR. Poleg tega je pomembno določanje O-serološke skupine, saj imajo sevi *E. coli*, ki so prisotni pri zdravih kuncih druge O-serološke skupine kot sevi, ki so prisotni pri bolnih kuncih (Blanco in sod., 1996).

Manj patogeni sevi povzročajo težave pri kuncih, ki so rejeni na kmetijah s slabimi higieniskimi razmerami, saj je okužbo mogoče preprečiti z izboljšanjem higieniskih razmer in uvedbo antibiotikov. Na drugi strani pa so visoko patogeni sevi težko obvladljivi, saj antibiotiki ne omogočijo izboljšanja stanja in v večini primerov povzročijo smrt celotnega legla kuncev. Zaradi tega je določanje seva, ki povzroči okužbo, zelo pomembno že na začetku okužbe (Peeters in sod., 1988). Najbolj pomemben serotip *E. coli*, ki povzroča kolibaktozo kunčjih mladičev je O109:K-:H2. Drugi serotipi povzročajo okužbe odraslih kuncev, najbolj patogeni pa so serotipi O15:K-:H, O26:K-:H2 in O103:K-:H2, ki povzročajo do 50 % smrtnost (Blanco in sod., 1996).

2.7.3 Vpliv krme na zdravje kuncev

Okolje, v katerem se kunci rodijo pogojuje sestavo njihove mikrobiote prebavnega trakta. Pri tem pa je zelo pomembna tudi zaužita krma (Combes in sod., 2011). Zaužita krma ima velik vpliv na prebavo in zdravje kuncev. Vsebuje hranila, potrebna za delovanje celic v prebavilih, pomembna pa je tudi pri vzdrževanju mikrobiote prebavnega trakta. Prav tako vpliva na fizikalno-kemijske parametre v prebavilih ter na čas in uspešnost prebavljanja. V največji nevarnosti pred okužbami so mladiči (15 do 35 dni), saj mikrobiota in imunski sistem črevesja še nista povsem razvita. V tem času pride do spremembe prehrane, ko mladiči prenehajo sesati in pričnejo jesti trdo hrano. Sestavine, ki jih mladi kunci zaužijejo, neposredno vplivajo na razvoj imunskega sistema, saj služijo kot substrati in encimski kofaktorji, ter omogočajo sintezo protiteles, komplementa in drugih komponent imunskega sistema. Glede na zaužito hrano pa se sintetizirajo tudi hormoni, ki uravnavajo imunski sistem črevesja (Fortun-Lamothe in Boullier, 2007).

Med pomembna hranila sodijo lipidi, maščobne kisline in minerali. Zaužiti lipidi in maščobne kisline imajo pomembno vlogo pri razvoju imunskega sistema, tako pri človeku kot pri kuncih. Lipidi in maščobne kisline so sestavni deli celičnih membran in signalne molekule ter prekurzorji sinteze vnenčno odzivnih molekul. Preobilni ali zmanjšani vnos negativno vplivata na imunski sistem prebavnega trakta. Velik vpliv na imunski sistem prebavnega trakta imajo minerali, kot so cink, magnezij in železo, sodelujejo pri fagocitozi in sintezi imunoglobulinov. Mikrobiota slepega črevesja (cekuma) tvori velike količine vodotopnih proteinov, ki zadostijo potrebam gostitelja po vitaminu B in C, saj izločke cekuma kunci ponovno zaužijejo s cekotrofijo. V primeru bolezni živali je priporočljivo dodajanje vitamina B in C v prehrano (Fortun-Lamothe in Boullier, 2007).

Največji vpliv na zdravje imajo zaužita vlakna. Raziskavi Gidenne in sod. (2000) in Bennegadi in sod. (2001) sta pokazali, da prenizek vnos vlaknin glede na zaužito hrano neposredno vpliva na težave v prebavi mladih zajcev. Vlaknine predstavljajo velik delež celotne krme, njihova razgradnja poteka v cekumu, kjer poteka mikrobna fermentacija (Fortun-Lamothe in Boullier, 2007; Gidenne in sod., 2000; Bennegadi in sod., 2001). Leta 1990 so Maître in sod. odkrili, da imajo predvsem težko razgradljive vlaknine pozitivni vpliv na zdravje mladičev saj zmanjšajo prebavne težave, hipotezo pa so večkrat potrdili v kasnejših raziskavah (Fortun-Lamothe in Boullier, 2007; Maître in sod., 1990; Gidenne in sod., 2001). Gidenne in sod. (2000 in 2004) so ugotovili, da težko razgradljive vlaknine hitreje potujejo skozi prebavni trakt in tako skrajšajo čas, v katerem bi se patogeni mikroorganizmi lahko pritrdirili na črevesje in namnožili (Fortun-Lamothe in Boullier, 2007; Gidenne in sod., 2000; Gidenne in sod., 2004). Po priporočilih morajo biti zaužite vlaknine sestavljeni iz lignoceluloze (18 %), lignina ($> 5\%$) ter iz razgradljivih vlaknin (Gidenne, 2014). Vpliva vodotopnih vlaknin na zdravje kuncev zaenkrat še ne poznamo (Gidenne, 2014), prav tako ne poznamo vpliva škroba, proteinov ter probiotikov in prebiotikov (Fortun-Lamothe in Boullier, 2007).

Pozitiven vpliv na zdravje pa ima tudi zmanjšani vnos krme pri mladičih. Ta metoda je sedaj v širši uporabi v Franciji in ima velik vpliv na zdravje kuncev. Zmanjšani vnos krme pri mladičih znatno zmanjša prebavne motnje in posledično uporabo antibiotikov. Prehrana je tako zmanjšana na 80 % priporočenega vnosa krme v prvih dveh tednih po prenehanju sesanja in poleg pozitivnega učinka nima velikega vpliva na težo živali. Takšno prehranjevanje delno spremeni fiziologijo prebavnega trakta, fermentacijski potek ter mikrobioto. Točnega razloga, zakaj pride do izboljšanja zdravja, še ne poznamo (Gidenne in sod., 2012).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

Vzorce, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu, smo pridobili v obdobju od marca do avgusta 2015. Vzorce blata in krme smo pridobili iz dveh kmetij (kmetija D in kmetija K) in v treh domovih (dom 1, 2 in 3). Na kmetiji D so imeli 15 kuncev, vzorčili smo tri medsebojno ločene kunce. Na kmetiji K so imeli enega kunca, ki smo ga tudi vzorčili. Vsak dom je imel kot domačo žival enega kunca, ki smo ga vzorčili. Dodatno smo vzorčili še v trgovini kupljeno kunčjo krmo (kontrola krme domačih kuncev) ter zrak v obeh kmetijah. Vsi vzorci, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu, so zbrani v preglednici 2.

Preglednica 2: Vzorci, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu.

Table 2: Samples collected during this study.

Vzorec	Kmetija / Dom	Dodatne informacije
Kunec 1 blato	Kmetija D	Vsi trijeunci iz kmetije D so bili v različnih kletkah, v istem prostoru pa se je nahajalo tudi govedo.
Kunec 2 blato	Kmetija D	
Kunec 3 blato	Kmetija D	
Kunec 4 blato	Kmetija K	V kletki, skupni prostor s svinjami.
Kunec 5 blato	Dom 1	Kletka v dnevni sobi.
Kunec 6 blato	Dom 2	Kletka v dnevni sobi.
Kunec 7 blato	Dom 3	Kletka v otroški sobi.
Krma D	Kmetija D	V posebni sobi za shranjevanje krme.
Krma K	Kmetija K	V posebni sobi za shranjevanje krme.
Krma 5	Dom 1	Odprta vrečka s kunčjo krmo.
Krma T	Trgovina	Sveža, zaprta vrečka s kunčjo krmo.
Zrak D	Kmetija D	Odprti trdni gojišči LB in MAC poleg kletk.
Zrak K	Kmetija K	Odprti trdni gojišči LB in MAC poleg kletke.

3.1.2 Iz vzorcev izolirani bakterijski sevi

Seve *E. coli*, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu, smo izolirali iz kunčjega blata in njihove krme avgusta 2015. Vsi izolati *E. coli* so zbrani v preglednici 3.

Preglednica 3: Izolati *E. coli*, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu.
 Table 3: *E. coli* isolates, used in this study.

Izolati	Vrsta bakterije	Mesto izolacije	Starost	Spol
RD1	<i>E. coli</i>	Kunec 1, Kmetija D	1 leto	Ženski
RD2	<i>E. coli</i>	Kunec 2, Kmetija D	Pol leta	Ženski
RD3	<i>E. coli</i>	Kunec 3, Kmetija D	1 leto	Nepoznan
RK1	<i>E. coli</i>	Kunec 4, Kmetija K	9 mesecev	Ženski
RK2	<i>E. coli</i>	Kunec 4, Kmetija K	9 mesecev	Ženski
FD1	<i>E. coli</i>	Krma D, Kmetija D	NR	NR
FD2	<i>E. coli</i>	Krma D, Kmetija D	NR	NR
FK1	<i>E. coli</i>	Krma K, Kmetija K	NR	NR
FK2	<i>E. coli</i>	Krma K, Kmetija K	NR	NR
FK3	<i>E. coli</i>	Krma K, Kmetija K	NR	NR
FK4	<i>E. coli</i>	Krma K, Kmetija K	NR	NR
FK5	<i>E. coli</i>	Krma K, Kmetija K	NR	NR
FK6	<i>E. coli</i>	Krma K, Kmetija K	NR	NR

Legenda: NR – ni relevantno.

3.1.3 Kontrolni sevi

Kot kontrolo pri PCR za določanje genov za virulentne dejavnike smo uporabili DNA iz sevov, ki so potrjeno imeli določene genske zapise (preglednica 4). Vsi sevi BJ so sevi *E. coli*, ki so bili izolirali iz človeškega blata zdravih ljudi. Sev CVUG34 je sev *E. coli*, izoliran iz čistilne naprave.

Preglednica 4: Kontrolni sevi in njihovi geni za virulentne dejavnike.

Table 4: Control strains and their virulence genes.

Kontrolni sevi	Geni za virulentne dejavnike	Vir
BJ1	<i>usp, kpsMT, ompT, traT</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF
BJ2	<i>iucD, iha, kpsMT, ompT, traT</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF
BJ3	<i>iucD, iha</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF
BJ7	<i>ibeA, sfaDE, hbp, neuB, APEC-ompT, clbA, clbQ, TraJ</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 4: Kontrolni sevi in njihovi geni za virulentne dejavnike.

Kontrolni sevi	Geni za virulentne dejavnike	Vir
BJ8	<i>iroN</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF
BJ9	<i>ibeA, sfaDE, iroN, neuB, APEC-ompT, clbA, clbQ, TraJ, iss</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF
BJ12	<i>papGII, ireA</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF
BJ18	<i>iss</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF
BJ19	<i>cnfI, hlyA, ireA</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF
BJ20	<i>hbp</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF
BJ29	<i>papGII</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF
BJ30	<i>cnfI, hlyA, papGIII, tcpC</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF
BJ32	<i>papGIII, tcpC</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF
BJ54	<i>afa/draBC</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF
BJ59	<i>afa/draBC</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF
Stx-pozitiven sev <i>E. coli</i>	<i>stx1, stx2</i>	zbirka sevov Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano
Agg-pozitiven sev <i>E. coli</i>	<i>aggR</i>	zbirka sevov Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano
CVUG34	<i>fimH, crl</i>	zbirka sevov Skupine za molekularno genetiko BF

Kot pozitivne kontrole v reakcijah PCR za določanje filogenetskih skupin smo uporabili naslednje seve: sev BJ2, ki ima filogenetsko skupino B2, za *chuA* in *yjaA* (v kvadruleks PCR), sev BJ4, ki ima filogenetsko skupino E, za *arpA*, *chuA*, TspE4C2 (v kvadruleks PCR in PCR za skupino E), sev BJ5, ki ima filogenetsko skupino E, za *arpA* (v PCR za

skupino E) ter BJ20, ki ima filogenetsko skupino C, za *trpA* (v PCR za skupino C). Sev *E. coli* 264 smo kot kontrolo uporabili pri testu IMVC.

3.1.4 Gojišča

3.1.4.1 Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)

Pri pripravi tekočih gojišč LB smo raztopili 25 g gojišča LB (0,5 % kvasni ekstrakt, 1 % tripton, 1 % NaCl) v 1 l destilirane vode (dH₂O) v erlenmajericah. Gojišče smo dobro premešali z magnetnim mešalom in odpipetirali v epruvete (3 ml ali 5 ml). Epruvete smo sterilizirali z avtoklaviranjem (15 minut, 121 °C, 1,1 bar) in jih do uporabe shranili pri 4 °C.

3.1.4.2 Priprava trdnih gojišč LB v petrijevkah

Pri pripravi trdnih gojišč LB smo raztopili 25 g gojišča LB, 15 g agarja v 1 l dH₂O v erlenmajericah. Gojišče smo dobro premešali z magnetnim mešalom in ga sterilizirali z avtoklaviranjem (15 minut, 121 °C, 1,1 bar). Po avtoklaviranju smo erlenmajerice prestavili v vodno kopel (55 °C) za najmanj 15 minut. Po ohlajanju smo gojišče razlili v plastične sterilne petrijevke (približno 25 ml/petrijevko) ter jih do uporabe shranili pri 4 °C.

3.1.4.3 Priprava trdnih gojišč MacConkey (MAC)

Pri pripravi trdnih gojišč MAC smo raztopili 50 g agarja MacConkey v 1 l dH₂O v erlenmajericah. Gojišče smo dobro premešali z magnetnim mešalom in ga raztopili v vodni kopeli pri 100 °C (približno 30 minut). Gojišče smo nato sterilizirali z avtoklaviranjem (15 minut, 121 °C, 1,1 bar). Po avtoklaviranju smo gojišče prenesli v vodno kopel (55 °C) in po 20 minutah razlili v plastične sterilne petrijevke (približno 25 ml/petrijevko) ter jih do uporabe shranili pri 4 °C.

3.1.4.4 Priprava trdnih gojišč UriSelect

Pri pripravi trdnih gojišč UriSelect smo raztopili 56,8 g agarja UriSelect v 1 l dH₂O v erlenmajericah. Gojišče smo dobro premešali z magnetnim mešalom in raztopili v vodni kopeli pri 100 °C (približno 30 minut). Gojišče smo nato sterilizirali z avtoklaviranjem (15 minut, 121 °C, 1,1 bar). Po avtoklaviranju smo gojišče prenesli v vodno kopel (55 °C) in po 20 minutah sterilno razlili v plastične sterilne petrijevke (približno 10 ml/petrijevko) ter jih do uporabe shranili pri 4 °C.

3.1.4.5 Priprava triptičnega sojinega tekočega gojišča (TSB)

Pri pripravi tekočih gojišč TSB smo raztopili 15 g triptona, 5 g sojtona in 5 g NaCl v 1 l dH₂O. Gojišče smo nato dobro premešali z magnetnim mešalom in pH gojišča uravnali na 7,3. Gojišče smo nato odpipetirali v epruvete (5 ml/epruveto). Epruvete z gojiščem smo sterilizirali z avtoklaviranjem (15 minut, 121 °C, 1,1 bar) ter jih do uporabe shranili pri 4 °C.

3.1.4.6 Priprava pufrane peptonske vode (BPW)

Za pripravo pufrane peptonske vode (BPW) smo raztopili 10 g peptona, 5 g NaCl, 9 g Na₂HPO₄ in 1,5 g K₂HPO₄ v 1 l dH₂O. Gojišče smo nato dobro premešali z magnetnim mešalom in uravnali pH na 7,0–7,2. Gojišče smo nato odpipetirali v epruvete (5 ml/epruveto). Epruvete smo sterilizirali z avtoklaviranjem (15 minut, 121 °C, 1,1 bar) ter jih do uporabe shranili pri 4 °C.

3.1.4.7 Priprava tekočih gojišč MR in VP (IMVC)

Pri pripravi tekočih gojišč, uporabljenih pri MR (metil-rdeče) in VP (voges-proskauer) testu, smo raztopili 5 g peptona, 5 g glukoze in 5 g K₂HPO₄ v 1 l dH₂O. Gojišče smo nato dobro premešano z magnetnim mešalom in uravnali pH na 7,5. Gojišče smo nato odpipetirali v epruvete (5 ml za test MR in 3 ml za test VP). Epruvete smo sterilizirali z avtoklaviranjem, (15 minut, 121 °C, 1,1 bar) ter jih do uporabe shranili pri 4 °C.

3.1.4.8 Priprava tekočih gojišč indol (IMVC)

Pri pripravi tekočih gojišč, uporabljenih za indol test, smo raztopili 20 g peptona in 1 g NaCl v 1 l dH₂O. Gojišče smo dobro premešali z magnetnim mešalom in uravnali pH gojišča na 7,2. Gojišče smo nato odpipetirali v epruvete (5 ml/epruveto). Epruvete smo sterilizirali z avtoklaviranjem (15 minut, 121 °C, 1,1 bar) ter jih do uporabe shranili pri 4 °C.

3.1.4.9 Priprava poševnih trdnih citratnih gojišč po Simmonsu (IMVC)

Pri pripravi trdnega citratnega gojišča po Simmonsu smo v 1 l dH₂O raztopili 5 g NaCl, 0,2 g MgSO₄, 1g NH₄H₂PO₄, 1g KH₂PO₄, 5g Na₃C₆H₅O₇ × 2H₂O, 20 g agarja in 40 ml bromtimol modrega. Pred dodatkom agarja smo gojišče premešali z magnetnim mešalom in uravnali pH gojišča na 6,8. Nato smo gojišču dodali agar in ga ponovno premešali z magnetnim mešalom. Raztopljeno gojišče smo nato odpipetirali v epruvete (2 ml) in sterilizirali z avtoklaviranjem (15 minut, 121 °C, 1,1 bar). Po sterilizaciji smo epruvete postavili poševno, dokler se gojišča niso popolnoma strdila. Epruvete smo nato do uporabe shranili pri 4 °C.

3.1.5 Kemikalije

agar	Sigma-Aldrich, ZDA
agar MacConkey	Merck, Nemčija in Formedium, ZDA
agaroza	Carl-Roth, Nemčija
bromfenolmodro	FERMENTAS, Litva
dH ₂ O	
etilendiamintetraocenta kislina (EDTA, 25 mM)	Invitrogen, ZDA
etanol	Merck, Nemčija
etidijev bromid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, ZDA

glicerol	Sigma-Aldrich, ZDA
K ₂ HPO ₄	Merck, Nemčija
KH ₂ PO ₄	Merck, Nemčija
gojišče LB	Sigma-Aldrich, ZDA
MgCl ₂	Merck, Nemčija
MgSO ₄	Merck, Nemčija
NaCl	Merck, Nemčija
NH ₄ H ₂ PO ₄	Carl-Roth, Nemčija
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ × 2H ₂ O	Sigma-Aldrich, ZDA
pepton	Merck, Nemčija
glukoza	Kemika, Hrvaska
Na ₂ HPO ₄	Merck, Nemčija
bacto-tripton	Sigma-Aldrich, ZDA
bacto-sojton	Sigma-Aldrich, ZDA
trdno gojišče UriSelect	Bio-Rad, Velika Britanija
baza Tris	Sigma-Aldrich, ZDA
borova kilsina	Merck, Nemčija
N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorid	Merck, Nemčija
KOH	Sigma-Aldrich, ZDA
A-naftanol	Sigma-Aldrich, ZDA
6 × nalagalni pufer	Thermo Scientific, ZDA
10 mM dNTPs	Thermo Scientific, ZDA
10× pufer za polimerazo <i>Taq</i>	Thermo Scientific, ZDA
metil rdeče	Merck, Nemčija
indol	Merck, Nemčija

3.1.6 Začetni oligonukleotidi

ERIC1R in ERIC2	Pharmacia Biotech, ZDA
CNF1-1 in CNF1-2	Pharmacia Biotech, ZDA
hlyA.1 in hlyA.2	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
USPdeg 1 in USPdeg 2	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
Ibe10_f in IbeA-r	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
FimH1 in FimH2	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
papG_II_r in papG_II_f	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
papG_III_r in papG_III_f	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
SFA-1 in SFA-2	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
afa/draBC-r in afa/draBC-f	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
Aer1 in Aer2	Pharmacia Biotech, ZDA

fyuA 1 in fyuA 2	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
ireA f in ireA r	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
iha f in iha r	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
Hbp f in Hbp f	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
iroN f in iroN r	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
kspMT_II f in kspMT_II r	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
neuB-F in neuB-r	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
tcpC-for in tcpC-rev	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
ompT-APEC f in ompT-APEC r	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
ompT f in ompT r	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
IHAPJPN42 in IHAPJPN46	Macrogen, Nizozemska
IHAPJPN55 in I HAPJPN56	Macrogen, Nizozemska
PTraJ-1 in PTraJ-2	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
Iss1 in Iss2	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
traT1 in traT2	Macrogen, Nizozemska
Stx1F in Stx1R	Macrogen, Nizozemska
Stx2F in Stx2R	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
AggRks1 in AggRks2	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
Crl-F in Crl-R	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
AceK.f in ArpA1.r	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
chuA.1b in chuA.2	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
YjaA.1b in YjaA.2b	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
TspE4C2.1b in TspE4C2.2b	Jena Bioscience GmbH, Nemčija
ArpAgpE.f in ArpAgpE.r	Macrogen, Južna Koreja
trpBA.f in trpBA.r	Macrogen, Južna Koreja
trpAgpC.1 in trpAgpC.2	Macrogen, Južna Koreja

3.1.7 Encimi in lestvice DNA

lestvica GeneRuler™ 50 bp plus DNA	Thermo Fischer Scientific, ZDA
lestvica GeneRuler™ 100 bp plus DNA	Thermo Fischer Scientific, ZDA
Taq-polimeraza DNA	Thermo Fischer Scientific, ZDA

3.1.8 Pufri in reagenti

3.1.8.1 Pufer 5 × TBE

Pri pripravi pufra 5×TBE smo raztopili 54 g tris baze, 27,5 g borove kisline in 200 ml 0,5 M EDTA v 1 l dH₂O. pH raztopine je bil 8,0. Pufer smo sterilizirali z avtoklaviranjem, (15 minut, 121 °C, 1,1 bar) ter ga do uporabe shranili pri sobni temperaturi.

3.1.8.2 Oksidazni reagent

Oksidazni reagent smo pripravili svež ob vsaki uporabi. Pri pripravi oksidaznega reagenta smo raztopili 1 g N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorida v 10 ml dH₂O (1-odstotni oksidazni reagent).

3.1.8.3 Reagent metil rdeče

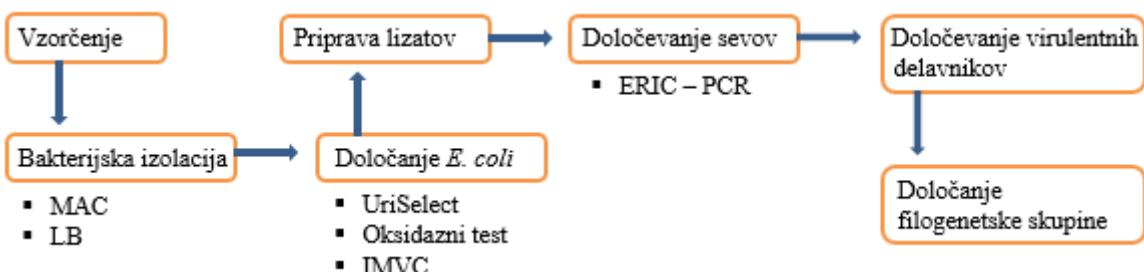
Pri pripravi reagenta metil rdeče smo raztopili 4 mg založnega reagenta metil rdeče v 40 ml 96-odstotnega etanola in 100 ml dH₂O.

3.1.9 Laboratorijska oprema

15-ml steklene epruvete	Corning, ZDA
avtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija
50-ml plastične epruvete	Corning, ZDA
Eppendorf namizna centrifuga 5424	Eppendorf, Nemčija
rotacijski stresalnik, Biofuge 13	Heraeus, Nizozemska
vroča kopel Multi temp II	Pharmacia Biotech, ZDA
plastične petrijevke	Corning, ZDA
posoda za gelček HE33	Hoeffer, ZDA
PCR GeneAmp System 2400	Perkin Elmer, Kanada
PCR Biometra UNO II	Biometra, Nemčija
PCR MyCycler	Bio-Rad, ZDA
sistem za elektroforezo 2301 Macrodrive 1	LKB Bromma, Švedska
namizna tehnica KERN PFB	Balingen-Frommern, Nemčija
UV-presvetljevalnik G:BOX F3	Syngen, ZDA

3.2 METODE

3.2.1 Shema poteka dela



Slika 3: Shema poteka dela od vzorčenja do določanja filogenetske skupine.

Figure 3: Schematic illustration of the work flow in the study from sampling to phylogenetic determination.

3.2.2 Zbiranje vzorcev

Vzorce blata smo odvzeli s sterilno pinceto in shranili v sterilnih 50-ml plastičnih epruvetah. Blato kuncev smo odvzeli neposredno iz kletke; blato ni bilo starejše od dveh dni. Krmo pri kmetijah smo prejeli iz sobe s krmo, pri domačih zajcih pa smo jo odvzeli iz že odprte vrečke s krmo. Vzorec iz sveže trgovinske krme smo odvzeli sterilno v laboratoriju (laminariju). Pred naceplitvijo smo vzorce shranili pri 4 °C za največ en dan. Pri vzorčenju zraka smo postavili trdna gojišča LB in MAC v hlev poleg kunčijh kletk ter jih pustili odprtih dve uri, čez noč smo jih pustili pri sobni temperaturi.

3.2.3 Izolacija bakterij iz blata in krme

Vsa nacepljena trdna gojišča smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Nacepljena tekoča gojišča smo inkubirali preko noči s stresanjem na rotacijskem stresalniku pri 37 °C.

3.2.3.1 Seleksijska trdna gojišča MAC

Vse vzorce smo najprej nacepili na trdna gojišča MAC. Vzorce smo na trdna gojišča MAC nacepili na dva različna načina. Prvi način je bil neposredni razmaz vzorca na gojišče s sterilno cepilno zanko. Pri drugem načinu smo vzorec najprej resuspendirali v 100 µl fiziološke raztopine (0,9-odstotni NaCl) in nato suspenzijo s sterilno spatulo Drigalski razmazali po celotni površini plošče. Na enak način smo vzorce nacepili tudi na trdna gojišča LB, ki so nam služila kot kontrola. Po inkubaciji smo izbrali do 20 posamičnih kolonij rdeče do vijolične barve, pri katerih smo nadaljevali z identifikacijo.

3.2.3.2 Tekoča gojišča LB, TSB in BPW

Vzorec smo nacepili tudi v tekoče gojišče LB (5 ml), ki smo ga nato inkubirali preko noči pri 37°C za obogatitev kulture. Po inkubaciji smo 100 µl kulture nacepili na trdno gojišče MAC. Na enak način smo vzorce nacepili tudi na gojišča TSB in BPW, ki sta omogočala boljšo rast *E. coli*.

3.2.3.3 Trdna gojišča LB

Rdeče do vijolične kolonije iz trdnih gojišč MAC smo s sterilnimi zobotrebci precepili na sterilne trdne plošče LB. Na posamično gojišče LB smo nacepili do 6 različnih kolonij. Po prekonočni inkubaciji smo posamezne kolonije ponovno precepili na novo sterilno trdno gojišče LB do posameznih kolonij. S to metodo smo poskrbeli, da je kolonija čista (namnožena posamezna bakterijska celica).

3.2.4 Seleksijske metode za *E. coli*

3.2.4.1 Seleksijska trdna gojišča UriSelect

Posamezne kolonije iz trdnih gojišč LB smo s sterilnim zobotrebcem precepili na trdna gojišča UriSelect (do 40 kolonij na posamezno gojišče UriSelect). Po prekonočni

inkubaciji smo izbrali kolonije, ki so bile obarvane rdeče do vijolično, pri teh smo nadaljevali z identifikacijo.

3.2.4.2 Oksidazni test

Pri oksidaznem testu smo uporabljali sveže preko nočne kolonije. Na filtrirni papir smo kapnili kapljico oksidaznega reagenta, preko nje pa smo razmazali svežo kolonijo s plastično zanko. Kolonije, ki se niso obarvale modro (prisotnost encima citokrom-oksidaza), smo nadalje obravnavali.

3.2.4.3 Test IMVC

IMVC je test, sestavljen iz štirih različnih testov (metil rdeče, indol, Voges-Proskauer in citrat). Pri indolnem testu smo kolonije prenesli v tekoče gojišče za indolni test. Pri testih MR in VP smo kolonije prenesli v gojišča za test MR in VP. Epruvete za vse tri teste smo inkubirali tri dni pri 37 °C. Po treh dneh smo gojiščem za indolni test dodali tri kapljice indolnega reagenta. Test je bil pozitiven, če se je barva gojišča spremenila v rdečo. V epruvete MR smo dodali eno do dve kapljici indikatorja MR. Rdeča barva je pomenila, da je reakcija potekla. V epruvete VP smo dodali štiri kapljice 5 % α-naftanola in 2 kapljici 40 % KOH. Test je bil pozitiven, če se je barva v epruveti spremenila v rožnato-rdečo bravo. Pri citratnem testu smo kolonije razmazali na citratnem gojišču po Simmonsu in jih pri 37 °C inkubirali cel teden. Reakcija je bila pozitivna, če je kolonija rastla, barva gojišča pa se je spremenila iz zelene v modro. Izolate s pozitivnim testom MR in indolnim testom ter negativnim testom VP in citratnim testu, smo privzeli kot *E. coli*.

3.2.5 Priprava lizatov

Izolate *E. coli* smo preko noči inkubirali v 5 ml tekočega gojišča LB. Naslednji dan smo 1 ml preko nočne kulture odpipetirali v mikrocentrifugirko. Mikrocentrifugirke smo centrifugirali 1 min pri 10.000 vrt./min. Supernatant smo zavrgli, usedlino celic pa resuspendirali v 200 µl destilirane vode. Mikrocentrifugirke smo nato inkubirali v vodni kopeli pri 100 °C za 10 min. Po inkubaciji smo jih ponovno centrifugirali za 10 min pri 10.000 vrt./min. 150 µl supernatanta smo nato odpipetirali v nove mikrocentrifugirke in jih shranili pri -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.6 Oligonukleotidni začetniki in protokol za ERIC-PCR

Metodo ERIC-PCR smo uporabljali za medsebojno ločevanje različnih sevov *E. coli*. Polimerazna reakcija je potekala v 25-µl reakcijskih zmeseh. Sestava reakcijske zmesi je povzeta v preglednici 5, zaporedja začetnih oligonukleotidov in program za PCR pa so povzeti v preglednici 6.

Preglednica 5: Sestava reakcijske zmesi za ERIC-PCR.

Table 5: ERIC-PCR reaction mixture.

ERIC - PCR reakcijska zmes	1 × 25 µl
dH ₂ O	13,375 µl
Taq-polimerazni pufer	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	2,5 µl
20 pmol/µl ERIC1R končni oligonukleotidni začetnik	0,5 µl
20 pmol/µl ERIC2 začetni oligonukleotidni začetnik	0,5 µl
10 mM dNTP	0,5 µl
Taq-polimeraza	0,125 µl
bakterijski lizat	5 µl

Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi in program za PCR, ki smo jih uporabili pri ERIC-PCR.

Table 6: Oligonucleotide primers and PCR program.

Oligonukleotidni začetnik	Nukleotidno zaporedje (5' → 3')	Program za PCR	Vir
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTTC	<u>94 °C, 4:00 min</u> 1 ×	Versalovic in sod., 1991
	AC	94 °C, 0:30 min	
ERIC2	AAGTAAGTGACTGACTGGG	40 °C, 0:15 min 35 ×	Versalovic in sod., 1991
	GTGAGCG	<u>72 °C, 5:00 min</u>	
		72 °C, 7:00 min 1 ×	

3.2.7 Oligonukleotidni začetniki in program za PCR pri določanju virulentnih dejavnikov

Polimerazna reakcija je potekala v 25-µl reakcijskih zmeseh. Sestava reakcijskih zmesi je bila enaka kot pri ERIC-PCR (preglednica 6), le da smo pri reakcijah uporabili druge začetne oligonukleotide. Vsi oligonukleotidni začetniki, njihova zaporedja in program za PCR so povzeti v preglednici 7.

Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi in program za PCR, ki smo jih uporabili pri določanju prisotnosti zapisov za virulentne dejavnike.

Table 7: Oligonucleotide primers and PCR program for virulence factor genes.

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Program za PCR	Velikost produkta (bp)	Vir
<i>cnf1</i> PCR		<u>94 °C, 4:00 min</u> 1 ×	1295	Kuhar in sod., 1998
CNF1-1	CTACCCCTTTGAC	94 °C 1:30 min		
	GAAGAC	59 °C 1:30 min 30×		
CNF1-2	ACACACCTGACCCC	<u>72 °C 2:00 min</u>		
	AATAAC	72 °C 5:00 min 1×		
<i>hlyA</i> PCR		<u>95 °C 2:30 min</u> 1 ×	1177	Yamamoto in sod., 1995
hlyA.1	AACAAGGATAAGCA	94 °C 0:30 min		
	CTGTTCTGGCT	64 °C 0:30 min 30×		
hlyA.2	ACCATATAAGCGGT	<u>72 °C 1:30 min</u>		
	CATTCCCGTCA	72 °C 7:00 min 1×		

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 7: Začetni oligonukleotidi in program za PCR, ki smo jih uporabili pri določanju prisotnosti zapisov za virulentne dejavnike.

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Program za PCR	Velikost produkta (bp)	Vir
<i>usp</i> PCR		95 °C 5:00 min 1×	1017	
USPdeg 1	ATGCTACTGTTCC GGGTAGTSTGT	95 °C 0:30 min 56 °C 0:30 min 30×		Jernea Ambrožič Avguštin
USPdeg 2	CATCRTGTAGTCKG GGSGTAACAAAT	<u>72 °C 1:30 min</u> 72 °C 7:00 min 1×		
<i>ibeA</i> PCR		94 °C 2:30 min 1×	170	Johnson in Stell, 2000
Ibe10_f	AGGCAGGTGTGCGC CGCGTAC	94 °C 0:30 min 63 °C 0:30 min 25×		
IbeA-r	TGGTGCTCCGGCAA ACCATGC	<u>72 °C 3:00 min</u> 72 °C 10:00 min 1×		
<i>fimH</i> PCR		94 °C 2:30 min 1×	461	Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011
FimH1	CAGCGATGATTCC AGTTGTGTG	94 °C 0:30 min 64 °C 0:30 min 30×		
FimH2	TGCGTACCAAGCATT AGCAATGTCC	<u>72 °C 0:30 min</u> 72 °C 7:00 min 1×		
<i>papGII</i> PCR		95 °C 2:30 min 1×	190	
papG_II r	CGGGCCCCAAGTA ACTCG	94 °C 0:30 min 55 °C 1:00 min 25×		Johnson in Brown, 1996
papG_II f	GGGATGAGCGGGCC TTTGAT	<u>72 °C 0:30 min</u> 72 °C 7:00 min 1×		
<i>papGIII</i> PCR		94 °C 2:30 min 1×	258	
papG_III r	CTACCCCTTTGAC GAAGAC	94 °C 0:30 min 63 °C 0:30 min 25×		Johnson in Brown, 1996
papG_III f	ACACACCTGACCCC AATAC	<u>72 °C 3:00 min</u> 72 °C 10:00 min 1×		
<i>sfaDE</i> PCR		94 °C 3:00 min 1×	408	Le Bouguenec in sod., 1992
SFA-1	CTCCGGAGAACTGG GTGCATCTTAC	94 °C 2:00 min 65 °C 1:00 min 25×		
SFA-2	CGGAGGAGTAATTA CAAACCTGGCA	<u>72 °C 2:00 min</u> 72 °C 10:00 min 1×		
<i>afa/draBC</i> PCR		94 °C 4:00 min 1×	594	Johnson in Stell, 2000
afa/draBC-r	CCCGTAACGCGCCA GCATCTC	94 °C 0:30 min 63 °C 0:30 min 25×		
afa/draBC-f	GGCAGAGGGCCGGC AACAGGC	<u>72 °C 3:00 min</u> 72 °C 10:00 min 1×		
<i>iucD</i> PCR		94 °C 4:30 min 1×	602	Yamamoto in sod., 1995
Aer1	CTACCCCTTTGAC GAAGAC	94 °C 0:30 min 62 °C 0:30 min 35×		
Aer2	ACACACCTGACCCC AATAC	<u>72 °C 0:50 min</u> 72 °C 10:00 min 1×		
<i>fyuA</i> PCR		94 °C 2:30 min 1×	785	Johnson in Stell, 2000; Schubert in sod., 1998
fyuA 1	TGATTAACCCCGCG ACGGGAA	94 °C 0:30 min 63 °C 0:30 min 25×		
fyuA 2	CGCAGTAGGCACGA TGTTGTA	<u>72 °C 3:00 min</u> 72 °C 10:00 min 1×		

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 7: Začetni oligonukleotidi in program za PCR, ki smo jih uporabili pri določanju prisotnosti zapisov za virulentne dejavnike.

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Program za PCR	Velikost produkta (bp)	Vir
<i>ireA</i> PCR		94 °C 2:30 min 1×	421	Russo in sod., 2001
ireA f	TGGTCTTCAGCTAT	94 °C 0:30 min		
	ATGG	55 °C 1:00 min 25×		
ireA r	ATCTATGATTGTGTT	<u>72 °C 0:30 min</u>		
	GGT	72 °C 7:00 min 1×		
<i>iha</i> PCR		94 °C 4:00 min 1×	827	Johnson in sod., 2000
iha f	CTACCCCTTTGAC	94 °C 0:30 min		
	GAAGAC	58 °C 0:30 min 30×		
iha r	ACACACCTGACCCC	<u>72 °C 1:00 min</u>		
	AATAC	72 °C 8:00 min 1×		
<i>hbp</i> PCR		94 °C 4:30 min 1×	925	Starčič Erjavec in sod., 2009
Hbp f	CTACCCCTTTGAC	94 °C 0:30 min		
	GAAGAC	65 °C 1:00 min 35×		
Hbp r	ACACACCTGACCCC	<u>72 °C 1:00 min</u>		
	AATAC	72 °C 10:00 min 1×		
<i>iroN</i> PCR		94 °C 2:30 min 1×	668	Johnson in sod., 2000
iroN f	AAGTCAAAGCAGGG	94 °C 0:30 min		
	GTTGCCG	68 °C 0:30 min 25×		
iroN r	GACGCCGACATTAA	<u>72 °C 2:00 min</u>		
	GACGCAG	72 °C 10:00 min 1×		
<i>kpsMT</i> PCR		94 °C 4:30 min 1×	270	Johnson in sod., 2000
kspMT_II f	CTACCCCTTTGAC	94 °C 0:30 min		
	GAAGAC	64 °C 1:00 min 25×		
kspMT_II r	ACACACCTGACCCC	<u>72 °C 0:30 min</u>		
	AATAC	72 °C 7:00 min 1×		
<i>neuB</i> PCR		94 °C 4:30 min 1×	493	Nowrouzian in sod., 2001
neuB-F	CTACCCCTTTGAC	94 °C 0:30 min		
	GAAGAC	64 °C 0:30 min 30×		
neuB-r	ACACACCTGACCCC	<u>72 °C 1:00 min</u>		
	AATAC	72 °C 7:00 min 1×		
<i>tcpC</i> PCR		94 °C 4:30 min 1×	386	Starčič Erjavec in sod., 2010
tcpC-for	GGCAACAATATGTA	94 °C 0:30 min		
	TAATATCCT	60 °C 0:30 min 25×		
tcpC-rev	GCCCAGTCTATTCT	<u>72 °C 1:00 min</u>		
	GCTAAAGA	72 °C 10:00 min 1×		
APEC-<i>ompT</i> PCR		94 °C 4:30 min 1×	581	Marjanca Starčič Erjavec, 2016
ompT-APEC f	CAGAGTATCTGTCG	94 °C 0:30 min		
	GTGCCTCA	60 °C 1:00 min 25×		
ompT-APEC r	TACGGTTCCATGTT	<u>72 °C 1:00 min</u>		
	CCTTCGAC	72 °C 0:00 min 1×		
<i>ompT</i> PCR		95 °C 4:00 min 1×	559	Foxman in sod., 1995
ompT f	ATCTAGCCGAAGAA	94 °C 0:30 min		
	GGAGGC	57 °C 1:00 min 25×		
ompT r	CCCGGGTCATAGTG	<u>72 °C 1:00 min</u>		
	TTCATC	72 °C 10:00 min 1×		

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 7: Začetni oligonukleotidi in program za PCR, ki smo jih uporabili pri določanju prisotnosti zapisov za virulentne dejavnike.

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Program za PCR	Velikost produkta (bp)	Vir
<i>clbA</i> PCR		94 °C 4:30 min 1×	1002	
IHAPJPN42	CAGATACACAGATA	94 °C 0:30 min		Johnson in sod., 2008
	CCATTCA	57 °C 0:30 min 30×		
IHAPJPN46	CTAGATTATCCGTG	<u>72 °C 1:00 min</u>		
	GCGATTTC	72 °C 10:00 min 1×		
<i>clbQ</i> PCR		94 °C 4:30 min 1×	821	
IHAPJPN55	TTATCCTGTTAGCTT	94 °C 0:30 min		Johnson in sod., 2008a
	TCGTTTC	57 °C 0:30 min 30×		
IHAPJPN56	CTTGTATAGTTACA	<u>72 °C 1:00 min</u>		
	CAACTATTTC	72 °C 10:00 min 1×		
<i>traJ</i> PCR		94 °C 4:30 min 1×	210	
PTraJ-1	TCCAAAAAAATGATG	94 °C 0:30 min		Čitar, 2010
	ATGAAT	67 °C 0:30 min 30×		
PTraJ-2	ATAGGAACCTCCTC	<u>72 °C 0:30 min</u>		
	ACAAAG	72 °C 10:00 min 1×		
<i>iss</i> PCR		95 °C 4:30 min 1×	791	
Iss1	ACGATACTCCGTAG	94 °C 0:30 min		
	CCAGAGAT	68 °C 0:30 min 30×		Starčič Erjavec in Žgur Bertok., 2011
Iss2	ATGAACAGTGCAGA	<u>72 °C 1:00 min</u>		
	TGAGCTCC	72 °C 7:00 min 1×		
<i>traT</i> PCR		95 °C 4:30 min 1×	210	
traT1	GGTGTGGTGCATG	94 °C 0:30 min		Johnson in Stell, 2000
	AGCACAG	71 °C 0:30 min 30×		
traT2	CACGGTTCAGCCAT	<u>72 °C 0:30 min</u>		
	CCCTGAG	72 °C 7:00 min 1×		
<i>stx1</i> PCR		94 °C 4:30 min 1×	180	
Stx1F	ATAAAATGCCATT	94 °C 0:33 min		Paton in Paton, 1998
	GTTGACTAC	68 °C 0:33 min 30×		
Stx1R	AGAACGCCACTGA	<u>72 °C 0:33 min</u>		
	GATCATC	72 °C 7:00 min 1×		
<i>stx2</i> PCR		94 °C 4:30 min 1×	255	
Stx2F	GGCACTGTCTGAAA	94 °C 0:33 min		Paton in Paton, 1998
	CTGCTCC	68 °C 0:33 min 30×		
Stx2R	TCGCCAGTTATCTG	<u>72 °C 0:33 min</u>		
	ACATTCTG	72 °C 7:00 min 1×		
<i>aggR</i> PCR		94 °C 5:00 min 1×	254	
AggRks1	GTATACACAAAAGA	94 °C 0:33 min		Ratchtrachen-chai in sod., 2012
	AGGAAGC	60 °C 0:33 min 30×		
AggRks2	ACAGAACATCGTCAGC	<u>72 °C 0:33 min</u>		
	ATCAGC	72 °C 7:00 min 1×		
<i>crl</i> PCR		94 °C 2:30 min 1×	250	
Crl-F	TTTCGATTGTCTGG	94 °C 0:30 min		Maurer in sod., 1998
	CTGTATG	64 °C 0:30 min 30×		
Crl-R	CTTCAGATTCAAGCG	<u>72 °C 0:30 min</u>		
	TCGTC	72 °C 7:00 min 1×		

3.2.8 Določanje filogenetske skupine

3.2.8.1 Začetni oligonukleotidi in program za PCR

Polimerazna reakcija za določanje filogenetske skupine je bila izvedena v 20 µl reakcijskih zmeseh, v katere je bilo dodanih do 8 različnih oligonukleotidnih začetnikov. Filogenetski kvadrupleks je vseboval 20 pmol začetnih in končnih oligonukleotidnih začetnikov chuA.1b, chuA.2, YjaA.1b, Yja.2b, TspE4C2.1b in TspE4C2.2b ter 40 pmol AceK-f in ArpA1.r. Reakcija za določanje filogenetske skupine C je vsebovala 20 pmol začetnih in končnih oligonukleotidnih začetnikov trpAgpC.1 in trpAgpC.2 ter 12 pmol trpBA.f in trpBA.r. Reakcija za določanje filogenetske skupine E je vsebovala 20 pmol začetnih in končnih oligonukleotidnih začetnikov ArpAgpE.f in ArpAgpE.r ter 12 pmol trpBA.f in trpBA.r. Vse reakcijske zmesi so vsebovale tudi 40 pmol posamičnih dNTP-jev, 2 U *Taq*-DNA polimerze, 1×*Taq*-DNA polimerazni pufer, 3 µl bakterijske DNA in dH₂O. Vsi oligonukleotidni začetniki, njihova zaporedja in program za PCR so povzeti v preglednici 8.

Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi in program PCR za določanje filogenetske skupine *E. coli*.

Table 8: Oligonucleotide primers and PCR program for phylo-typing.

Oligonukleotidni začetniki	Nukleotidno zaporedje (5' to 3')	Program za PCR		Velikost produkta (bp)	Vir
Kvadrupleks PCR					
<i>arpA</i>	AceK.f	AACGCTATTGCG CAGCTTGC	94 °C 4:30 min 1× 94 °C 0:30 min	400	Clermont in sod., 2013
	ArpA1.r	TCTCCCCATACC GTACGCTA	59 °C 0:30 min 30× <u>72 °C 0:30 min</u>		
<i>chuA</i>	chuA.1b	ATGGTACCGGAC GAACCAAC	72 °C 5:00 min 1×	288	Clermont in sod., 2013
	chuA.2	TGCCGCCAGTAC CAAAGACA			
<i>yjaA</i>	YjaA.1b	CAAACGTGAAGT GTCAGGAG		211	Clermont in sod., 2013
	YjaA.2b	AATGCGTTCCCTC AACCTGTG			
<i>TspE4C2</i>	TspE4C2.1b	CACTATTCTGAA GGTCATCC		152	Clermont in sod., 2013
	TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTG CGGGTCGC			
Skupina E					
<i>arpA</i>	ArpAgpE.f	GATTCCATCTTG TCAAAATATGCC	94 °C 4:30 min 1× 94 °C 0:30 min	301	Clermont in sod., 2013
	ArpAgpE.r	GAAAAGAAAAAA GAATTCCCAAGA G	57 °C 0:30 min 30× <u>72 °C 0:30 min</u> 72 °C 5:00 min 1×		
<i>trpA control</i>	trpBA.f	CGGCGATAAAGA CATCTTCAC		489	Clermont in sod., 2013
	trpBA.r	GCAACGGGGCCT GGCGGAAG			

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 8: Začetni oligonukleotidi in program PCR za določanje filogenetske skupine *E. coli*.

Oligonukleotidni začetniki	Nukleotidno zaporedje (5' to 3')	Program za PCR		Velikost produkta (bp)	Vir
Skupina C					
<i>trpA</i>	trpAgpC.1	AGTTTTATGCC	94 °C 4:30 min 1×	219	Clermont in sod., 2013
		AGTGCAG	94 °C 0:30 min		
	trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTC	59 °C 0:30 min 30×		
		ACGCC	72 °C 0:30 min		
<i>trpA control</i>	trpBA.f	CGGCGATAAAAGA	72 °C 5:00 min 1×	489	Clermont in sod., 2013
		CATCTTCAC			
	trpBA.r	GCAACGCGGCCT			
		GGCGGAAG			

3.2.8.2 Določanje filogenetske skupine

Filogenetsko skupino smo najprej določili s pomočjo kvadrupleks PCR. Določanje je potekalo glede na prisotnost ali odsotnost štirih genov-fragmentov DNA (*chuA*, *yjaA*, *tspE4C2* in *arpA*), določanje pa je povzeto v poglavju 2.4 Filogenetske skupine. V primeru možnosti uvrstitev v skupine C ali E glede na rezultate kvadrupleks PCR, smo izvedli tudi PCR za določitev skupine C in E.

3.2.9 Agarozna gelska elektroforeza

Pri agarozni gelski elektroforezi smo uporabljali 1,5-odstotni (0,45 g agaroze, raztopljene v 30 ml 0,5 × pufra TBE) ali 2,0-odstotni agarozni gel (0,6 g agaroze, raztopljene v 30 ml 0,5 × pufra TBE). Agarozo smo raztopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Agarozni gel smo pred vlitjem ohladili na temperaturo 55–60 °C in dodali etidijev bromid v končni koncentraciji 0,7 µg/ml. Agarozni gel smo nato vlili v nosilec za gel z vstavljenim glavničkom za jamice. Ko je gel polimeriziral, smo glavniček odstranili, gel vstavili v elektroforezno banjico s pufrom in ga prelili z 0,5 × pufrom TBE. Vzorcem smo dodali nanašalni pufer in jih nanesli v jamice gela. Vzorce smo glede na velikost fragmentov DNA ločevali pri napetosti 90–110 V/cm. Elektroforezno ločevanje je potekalo približno 30 min, po končani elektroforezi smo gel vizualizirali z UV-presvetljevalnikom GeneBox.

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA *E. coli* IZ BLATA IN KRME

Seve *E. coli* iz blata in krme smo uspešno izolirali pri rejnih kuncih, *E. coli* pa nismo uspeli izolirati iz vzorcev domačih kuncev in njihove krme. Prav tako *E. coli* nismo uspeli izolirati iz sveže kupljene trgovinske krme za kunce. *E. coli* smo poskušali izolirati na več različnih načinov in v več ponovitvah, prav tako smo enega izmed domačih kuncev vzorčili trikrat. Kljub večkratnemu poskušanju nismo nikoli zaznali rast na trdnih gojiščih MAC, zaradi česar smo zaključili, da *E. coli* v tovrstnih vzorcih ni prisotna. Rezultati nakazujejo, da ima krma, s katero krmijo kunce, velik pomen na prisotnost ali odsotnost *E. coli* v prebavnem traktu. Rezultati posameznih korakov izolacije so povzeti v naslednjih poglavjih.

4.1.1 Rast na trdnih gojiščih MAC

Pri vzorcih blata vseh rejnih kuncev smo zaznali rast rožnatih kolonij na trdnih gojiščih MAC. Različni izolacijski tehniki sta prikazani na sliki 4.

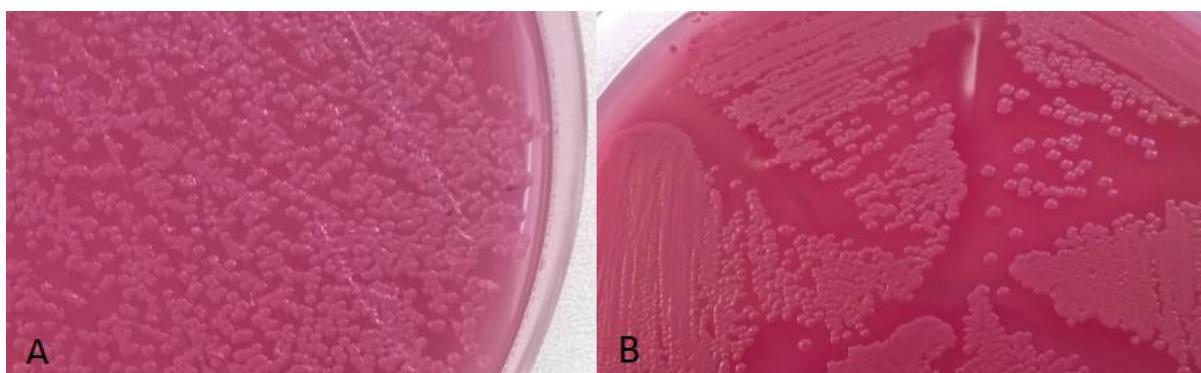
Na trdnih gojiščih MAC nismo zaznali rasti v primeru blata domačih kuncev, prav tako ni bilo rasti na trdnih gojiščih MAC po obogatitvi vzorcev blata s pomočjo tekočih gojišč BPW, TSB ali LB (slika 7).

Pri vzorcih krme iz kmetije D in kmetije K smo prav tako zaznali rast rožnatih kolonij. Rožnate kolonije so bile prisotne na gojišču z neposrednim razmazom krme in pri resuspendiranih vzorcih. Pri vzorcih krme iz kmetije D (slika 5) je bilo prisotnih več rožnatih kolonij kot iz kmetije K (slika 6), prisotne so bile tudi kolonije bež barve. V nadaljevanju smo analizirali le rožnate kolonije.

Pri vzorcih krme domačih kuncev in trgovinske krme nismo zaznali rasti na trdnem gojišču MAC.

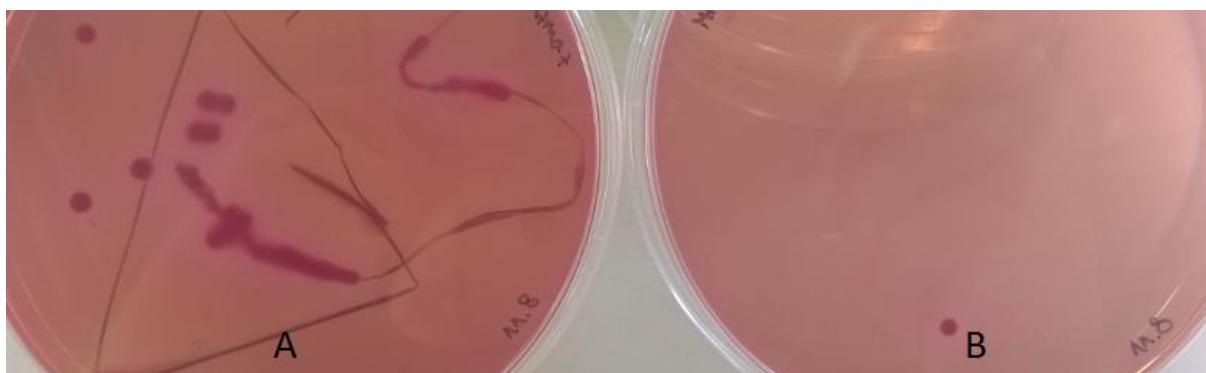
Na dveh trdnih gojiščih MAC, ki sta bili odprti v obeh hlevih, nismo zaznali rasti. Odprti trdni gojišči LB sta bili preraščeni in izbrali smo nekaj kolonij, sumljivih za *E. coli*, ki smo jih v nadaljevanju razmazali na trdna gojišča MAC. Rasti na gojiščih MAC nismo zaznali v nobenem primeru.

Rezultati rasti kolonij, izoliranih iz različnih vzorcev, in končno število izbranih kolonij za nadaljnjo analizo so povzeti v preglednici 9.



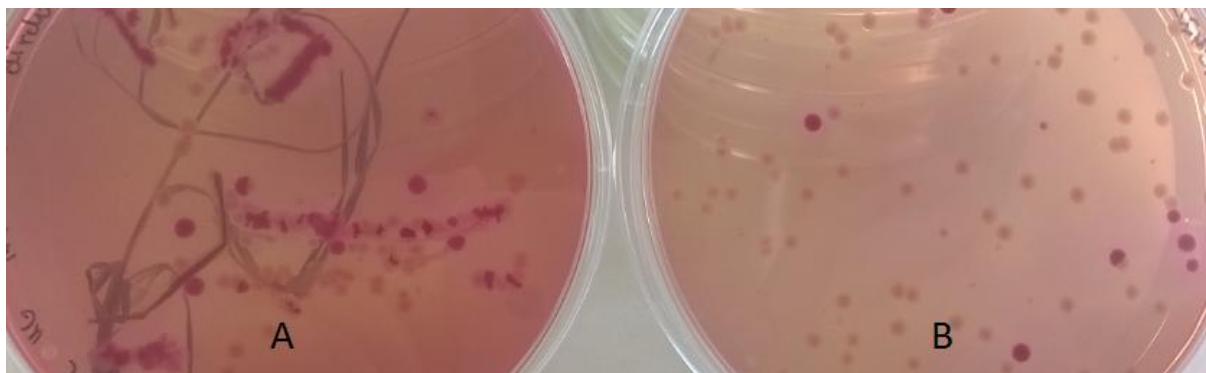
Slika 4: Izolacija *E. coli* na trdnih gojiščih MAC. (A) Gojišče A, na katero smo nanesli resuspendiran vzorec blata hlevskega kunca. (B) Gojišče B, na katerega smo precepili posamične kolonije.

Figure 4: MAC isolation of *E. coli* from farm rabbits faeces. (A) Figure A shows growth of resuspended faeces and high density growth of pink colonies. (B) Figure B shows growth of single pink colonies streaked out on a MAC plate.



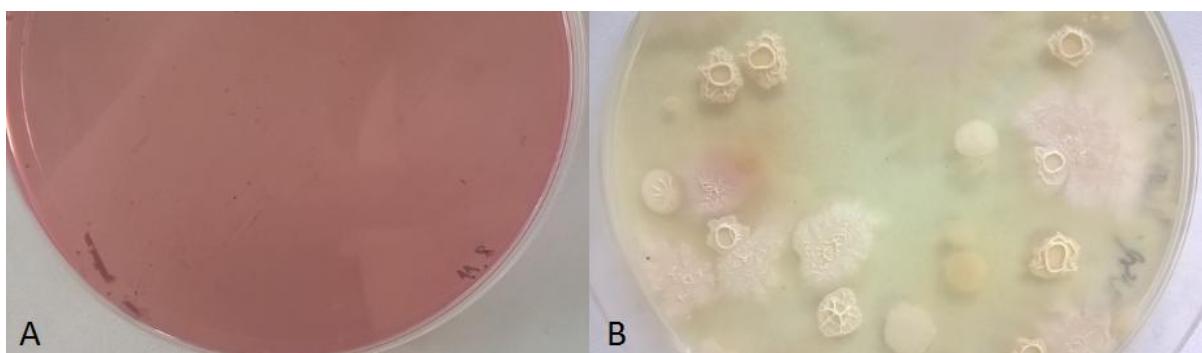
Slika 5: Izolacija *E. coli* iz krme iz kmetije D. (A) Gojišče A, na katero smo neposredno nacepili vzorec krme, vidimo rast rožnatih kolonij. (B) Gojišče B, na katero smo resuspendirali vzorec krme, vidimo rast ene same rožnate kolonije.

Figure 5: MAC isolation of *E.coli* from farm D fodder. (A) On plate A we see direct isolation method and growth of pink colonies. (B) On plate B, we see resuspended fodder isolation method and growth of a single pink colony.



Slika 6: Izolacija *E. coli* iz krme iz kmetije K. (A) Plošča A, na katero smo neposredno nacepili vzorec krme, vidimo rast rožnatih in bež kolonij.. (B) Plošča B, na katero smo resuspendirali vzorec, vidimo rast rožnatih in bež kolonij.

Figure 6: MAC isolation of *E.coli* from farm K fodder. (A) On plate A we see direct isolation method and growth of pink and beige colonies. (B) On plate B, we see resuspended fodder isolation method and again growth of pink and beige colonies.



Slika 7: Izolacija *E. coli* iz krme domačih kuncev na trdem gojišču MAC in LB. (A). Plošča A je trdno gojišče MAC kjer nismo zaznali rasti. (B) Plošča B je trdno gojišče LB, ki je bilo preraščeno s kolonijami, ki niso podobne *E. coli*.

Figure 7: Isolation of pet rabbit fodder on MAC and LB plates. (A) Plate A shows no growth on MAC plates. (B) Plate B shows extensive growth on LB plates of colonies that do not resemble *E. coli*.

Preglednica 9: Rast kolonij, izoliranih iz različnih vzorcev, in končno število izbranih kolonij za nadaljnjo analizo.

Table 9: Colony growth on MAC and final number of colonies selected from different samples.

Vzorec	MAC	BPW	TSB	Št. izbranih kolonij
Kunec 1	Rast	NR	NR	20
Kunec 2	Rast	NR	NR	20
Kunec 3	Rast	NR	NR	20
Kunec 4	Rast	NR	NR	20
Kunec 5	Ni rasti	Rast	Rast	0
Kunec 6	Ni rasti	Rast	Rast	0
Kunec 7	Ni rasti	Rast	Rast	0
Krma kmetija D	Rast	NR	NR	10
Krma kmetija K	Rast	NR	NR	15
Krma 5	Ni rasti	NR	NR	0
Krma T	Ni rasti	NR	NR	0
Odprta plošča kmetija K	Ni rasti	NR	NR	0
Odprta plošča kmetija D	Ni rasti	NR	NR	0

Legenda: NR – ni relevantno.

4.1.2 Rast na trdnih gojiščih LB

Iz trdnih gojišč MAC smo na trdna gojišča LB precepili do 20 kolonij ter jih razmazali do posameznih kolonij. Kolonije, ki niso rasle na trdnih gojiščih LB ali pa so bile drugačne barve (rožnate) smo izključili iz nadaljnje analize. Za nadaljnjo analizo so bili izbrani vsi izolati kuncev 3 in 4. Zavrgli smo štiri izolate kunca 1, tri od teh so bile rožnate barve, ena pa ni rastla. Rasla nista tudi dva izolata kunca 2, ki smo ju prav tako zavrgli. Število kolonij, ki niso rastle na LB ali niso predstavljale *E. coli* (drugačna barva) ter število kolonij, ki so bile izbrane za nadaljnjo analizo so povzete v preglednici 10.

Preglednica 10: Rast na trdnih gojiščih LB.

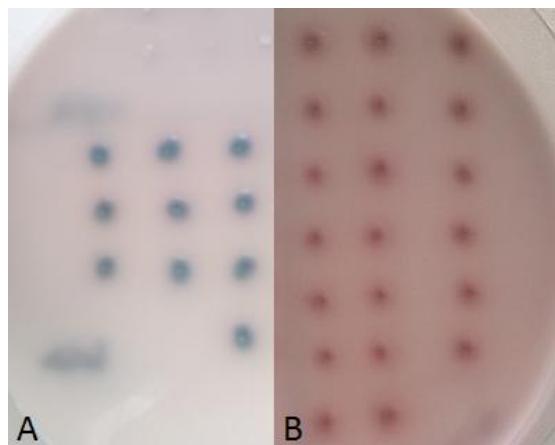
Table 10: Growth on LB plates.

Vzorec	Ni rasti	Kolonije, ki niso <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> podobne kolonije
Kunec 1	1	3	16
Kunec 2	2	0	18
Kunec 3	0	0	20
Kunec 4	0	0	20
Krma kmetija D	0	0	10
Krma kmetija K	0	0	15

4.2 SELEKCIJSKE METODE ZA *E. coli*

4.2.1 Rast na trdnih gojiščih UriSelect

Na trdnih gojiščih UriSelect smo detektirali rast kolonij v treh različnih barvah (slika 8). Kolonije rožnate do vijolične barve smo privzeli kot kandidatne izolate *E. coli*, zato smo jih v nadaljevanju analizirali. Iz nadaljnje analize pa smo izvzeli modre ali bele kolonije, saj te najverjetneje ne predstavljajo *E. coli*. Zavrgli smo osem izolatov kunca 1 (pet kolonij je bilo modrih, tri so bile bele) ter pet izolatov kunca 4 (štiri kolonije so bile modre, ena bela). Zavrgli smo tudi tri izolate krme iz kmetije D (dve koloniji sta bili modri, ena bela). Vsi rezultati rasti na trdnih gojiščih UriSelect so povzeti v preglednici 11 na naslednji strani.



Slika 8: Rast na trdnih gojiščih UriSelect. (A) Modre ali bele kolonije so predstavljale bakterije, ki niso *E. coli*. (B) Rožnate kolonije so predstavljale možne *E. coli*.

Figure 8: Growth on UriSelect. (A) Blue or pink colonies were considered not *E. coli*-like. (B) Pink colonies were considered to be *E. coli*.

Preglednica 11: Rast na trdnih gojiščih UriSelect.

Table 11: Growth on UriSelect plates.

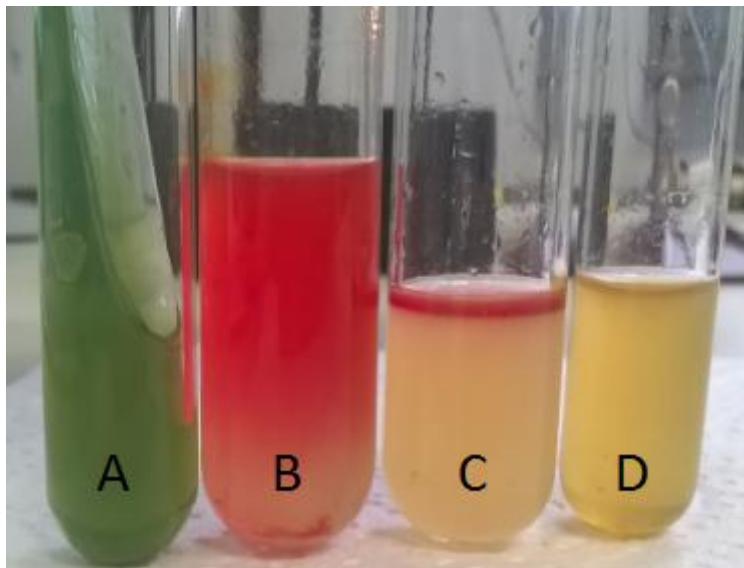
Vzorec	Modre kolonije	Bele kolonije	<i>E. coli</i> podobne kolonije
Kunec 1	5	3	8
Kunec 2	0	0	18
Kunec 3	4	1	15
Kunec 4	0	0	20
Krma kmetija D	2	1	7
Krma kmetija K	0	0	15

4.2.2 Oksidazni test

Vsi izolati iz različnih vzorcev so bili negativni pri oksidaznem testu in so bili nadaljnje analizirani.

4.2.3 Test IMVC

Zadnji test, ki smo ga opravili pri potrjevanju *E. coli*, je bil test IMVC (slika 9). Izolati, ki so bili izključeni so bili ali negativni pri testu indol ali testu MR ali pa pozitivni pri citratnem testu. S tem testom smo izključili en izolat kunca 3, šest izolatov kunca 4 in dva izolata iz krme iz kmetije K (preglednica 12).



Slika 9: Primer testa IMVC. Epruveta A je negativni rezultat citratnega testa. Epruveta B je pozitivni rezultat testa MR. Epruveta C je pozitivni rezultat indolnega testa. Epruveta D je negativni rezultat testa VP. Takšni rezultati so značilni za *E. coli*.

Figure 9: An example of an IMVC test. A tube is a negative result for citrat test. B tube is a positive result for MR test. C tube is a positive result for indol test. D tube is a negative result for VP test. Such results are typical for *E. coli*.

Preglednica 12: Rezultati testa IMVC.

Table 12: IMVC test results.

Vzorci	I+	MR+	VP-	CIT-	Št. izločenih sevov	Končno št. izolatov <i>E. coli</i>
Kunec 1	8	8	8	8	0	8
Kunec 2	18	18	18	18	0	18
Kunec 3	13	14	14	13	1	13
Kunec 4	18	17	20	19	6	14
Krma kmetija D	10	10	10	10	0	10
Krma kmetija K	10	12	12	12	2	10

Legenda: I+ – pozitivni rezultat testa indol, MR+ – pozitivni rezultat testa MR, VP- – negativni rezultat testa VP, CIT- – negativni rezultat citratnega testa.

4.3 ERIC-PCR

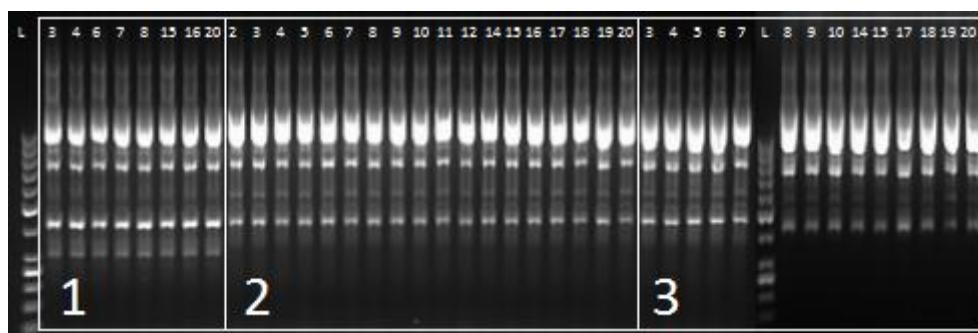
Z ERIC-PCR smo lahko opredelili, koliko različnih sevov *E. coli* smo izolirali (preglednica 13). Ugotovili smo, da so vsi izolati kunca 1 en sev, označili smo ga RD1 (slika 10). Iz profila ERIC-PCR sevov kunca 2 in 3 je bilo razvidno, da so vsi izolati identični, kljub temu smo pri vsakem kuncu izbrali en sev (pri pregledovanju virulentnih dejavnikov in določanju filogenetske skupine smo preverili oba). Sev kunca 2 smo označili RD2, sev kunca 3 pa RD3 (slika 10). Predvidevali smo, da je prišlo do izolacije identičnih sevov, ker sta se kunca nahajala na isti kmetiji. Pri kuncu 4 smo lahko razločili dva različna seva, označili smo ju RK1 in RK2 (slika 12). Pri krmi iz kmetije D smo določili dva različna seva (FD1 in FD2), FD1 pa je bil identičen sevoma RD2 in RD3 (slika 11). Pri krmi iz kmetije K smo določili šest različnih sevov (FK1-FK6), FK3 pa je bil identičen sevu RK1 (slika 12). Prisotnost dveh različnih sevov v kuncu 4 bi lahko bila posledica prisotnosti več različnih sevov v krmi kmetije K.

Preglednica 13: Oznake kunčjih sevov in sevov izoliranih iz krme.

Table 13: Strain names and their origin of isolation.

Vir seva	Število različnih sevov iz vzorca	Oznaka seva	Opomba
Kunec 1 – kmetija D	1	RD1	NR
Kunec 2 – kmetija D	1	RD2	Sev identičen RD3
Kunec 3 – kmetija D	1	RD3	Sev identičen RD2
Kunec 4 – kmetija K	2	RK1, RK2	NR
Krma – kmetija D	2	FD1, FD2	FD1 sovpada s sevoma RD2 in RD3
Krma – kmetija K	6	FK1, FK2, FK3, FK4, FK5, FK6	FK3 sovpada s sevom RK1

Legenda: NR – ni relevantno.

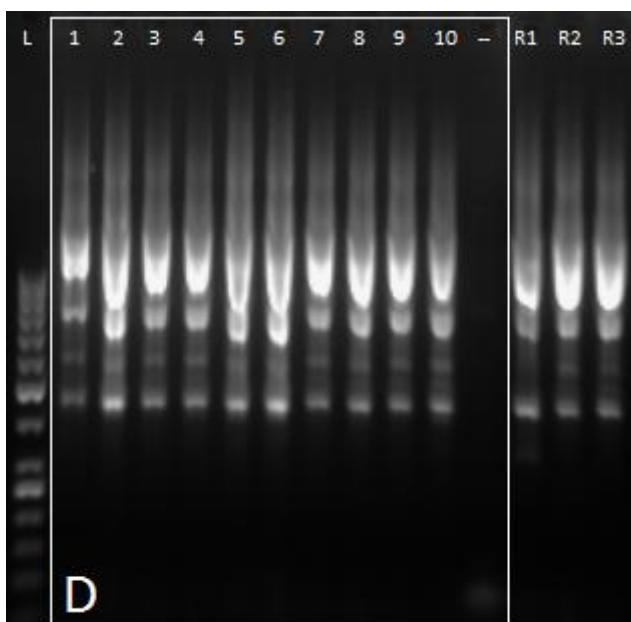


Slika 10: Profili ERIC–PCR izolatov *E. coli*, izoliranih iz blata kuncev 1, 2 in 3. Iz rezultatov je razvidno, da so vsi izolati iz kunca 1 en sev (RD1), ter da so vsi izolati iz kunca 2 in 3 drug sev (RD2 in RD3).

Legenda: L – standardna 50 bp lestvica, 1 – izolati kunca 1, 2 – izolati kunca 2, 3 – izolati kunca 3.

Figure 10: ERIC–PCR profiles for rabbit 1, 2 and 3. Rabbit 1 isolates are all the same strain (RD1). Rabbit 2 and rabbit 3 isolates are as well the same strain (RD2 and RD3).

Legend: L – standard 50 bp ladder, 1 – rabbit 1 isolates, 2 – rabbit 2 isolates, 3 – rabbit 3 isolates.

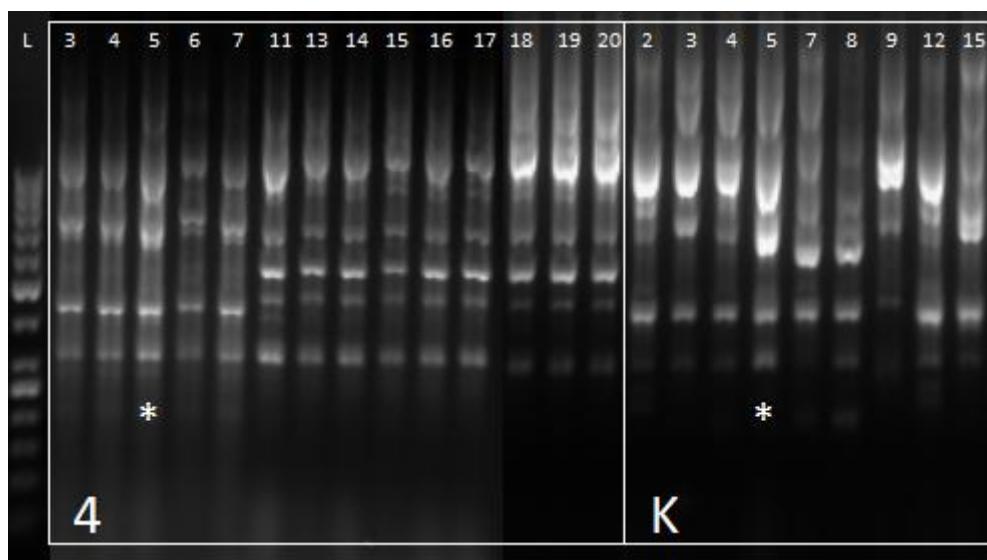


Slika 11: Profili ERIC–PCR za izolate iz krme iz kmetije D. Prisotna sta dva različna seva. Prvi sev so izolati 1, 3, 4, 7, 8, 9 in 10 (FD1), drugi sev pa so izolati 2, 5 in 6 (FD2). Prvi sev lepo sovpada s sevoma RD2 in RD3 (R2 in R3).

Legenda: L – standardna 50 bp lestvica, D – izolati krme kmetije D, R1 – RD1, R2 – RD2, R3 – RD3.

Figure 11: ERIC–PCR results for farm D fodder. It can be concluded from the picture that there are two strains present in farm D fodder, one strain are isolates 1, 3, 4, and from 7 to 10 (FD1). This strain correlates nicely to RD2 and RD3 strains presented on the right side of the gel (R2 and R3). Another strain are isolates 2, 5 and 6 (FD2).

Legend: L – standard 50 bp ladder, D – farm D fodder isolates, R1 – RD1, R2 – RD2, R3 – RD3.



Slika 12: Profili ERIC-PCR za kunca 4 in krmo iz kmetije K. Pri kuncu 4 smo lahko ločili dva različna seva, izolati 3 do 7 so prvi sev (RK1), izolati 11 do 20 pa drugi sev (RK2). Sev RK1 lepo sovpada z izolatom 5 iz krme iz kmetije K. Izolate iz krme iz kmetije K smo ločili v šest različnih sevov. Izolata 2 in 12 sta prvi sev (FK1), izolati 3, 4 in 9 pa drugi sev (FK2). Izolati 5 je tretji sev (FK3), izolata 7 in 8 pa četrti sev (FK4). Izolat 12 je peti sev (FK5), izolat 15 pa šesti sev (FK6). Identična seva sta označena z zvezdico.

Legenda: L – standardna 50 bp lestvica, 4 – izolati kunca 4, K – izolati iz kmetije K, * – identični sevi.

Figure 12: ERIC-PCR results for rabbit 4 and farm K fodder. There are 2 different strains present in rabbit 4, first strain are isolates from 3 to 7 (RK1) and the second one isolates from 11 to 20 (RK2). RK1 correlates well with isolate 5 from farm K fodder. There are 6 different strains present in farm K fodder, first strain are isolates 2 and 12 (FK1), second one are isolates 3, 4 and 9 (FK2), third strain is isolate 5 (FK3), fourth are isolates 7 and 8 (FK4), fifth is isolate 12 (FK5) and sixth is isolate 15 (FK6). Star sign marks identical strains.

Legend: L – standard 50 bp ladder, 4 – rabbit 4 isolates, K – farm K fodder isoaltes, * – identical strains.

Zaradi boljše preglednosti so rezultati profilov ERIC-PCR povzeti v preglednici 14.

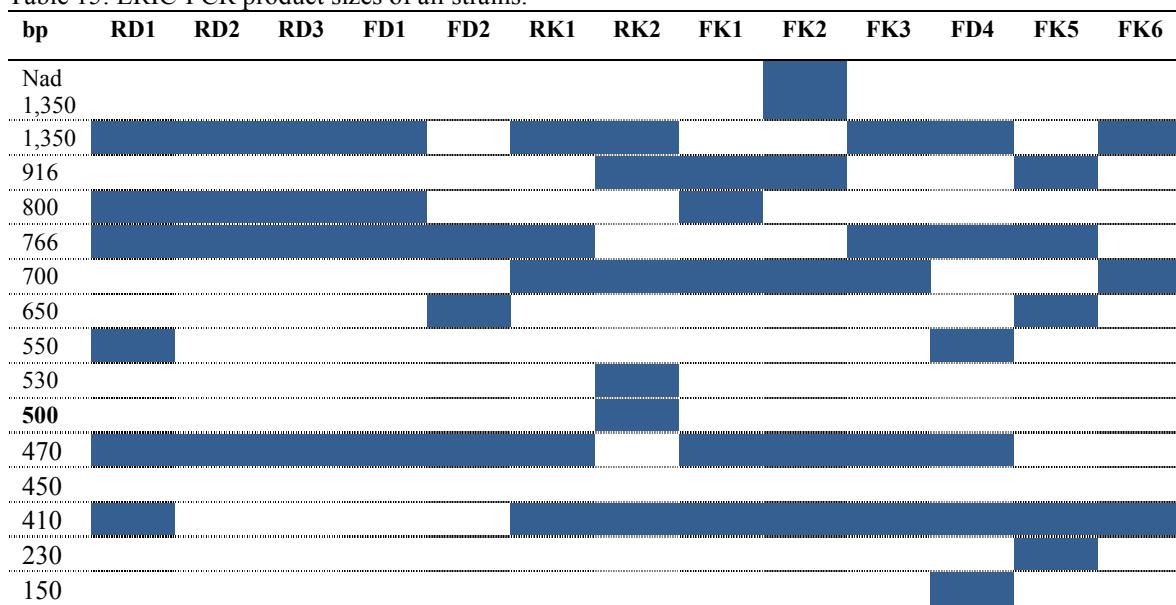
Preglednica 14: Zbrani izolati in sevi kuncev in njihove krme.

Table 14: All isolates and strains from rabbits and their fodder.

Vzorec	Izolati	Sevi	Končno št. sevov
Kunec 1 (kmetija D)	3 – 8, 15, 16, 20	RD1	1
Kunec 2 (kmetija D)	2 – 12, 13 – 20	RD2	1
Kunec 3 (kmetija D)	3 – 10, 14, 15, 17 – 20	RD3	1
Kunec 4 (kmetija K)	3 – 7 11 – 20	RK1 RK2	2
Krma 1 (kmetija D)	1, 3, 4, 7 – 10 2, 5, 6	FD1 FD2	2
Krma 2 (kmetija K)	2, 12 3, 4, 9 5 7, 8 12 15	FK1 FK2 FK3 FK4 FK5 FK6	6

Preglednica 15: Primerjava velikosti produktov pridobljenih v ERIC-PCR.

Table 15: ERIC-PCR product sizes of all strains.



Iz primerjave velikosti produktov med različnimi (preglednica 15) sevi je razvidno, da sevi RD2, RD3 in RK1 sovpadajo s sevoma iz krme, s katero je bil zajec krmljen, medtem ko preostala kunčja seva ne sovpadata s sevi iz krme (RD2 in RD3 sovpadata s sevom FD1, RK1 sovpada s sevom FK3). To kaže na možnost, da pridobljene *E. coli* izvirajo tudi iz drugih virov, ne le krme, ali pa je bil sev v krmi prisoten v preteklosti. Prav tako ne izključujemo možnosti kontaminacije, saj hlev ni sterilno območje, kunci si ga med drugim delijo s hlevskimi živalmi in različni sevi so tako prisotni v hlevu. *E. coli* bi v območje hleva lahko prišle tudi na mnoge druge načine (npr. bližina kurnikov, preko rok oskrbovalcev). Kljub temu ti rezultati nakazujejo na povezavo med *E. coli* v krmi in *E. coli* v kunčjem blatu.

4.4 DOLOČANJE GENOV ZA VIRULENTNE DEJAVNIKE

Gene za virulentne dejavnike smo določili za vse seve izolirane iz štirih kuncev (5 sevov). Vsi sevi so imeli prisotne gene *fimH*, *crl* in *ompT*. Seva RK1 in RK2 sta imela dodatno prisotna tudi gena *traT* in *iucD*. RK1 je imel prisoten še gen *fyuA*, medtem ko je imel RK2 dodatno prisotne še tri gene, APEC-*ompT*, *traJ* in *iroN*. Rezultati so povzeti na naslednji strani v preglednici 16. Iz rezultatov v tabeli, je razvidno, da je imel sev kunca 4 (RK2) največ genov za viruletne dejavnike.

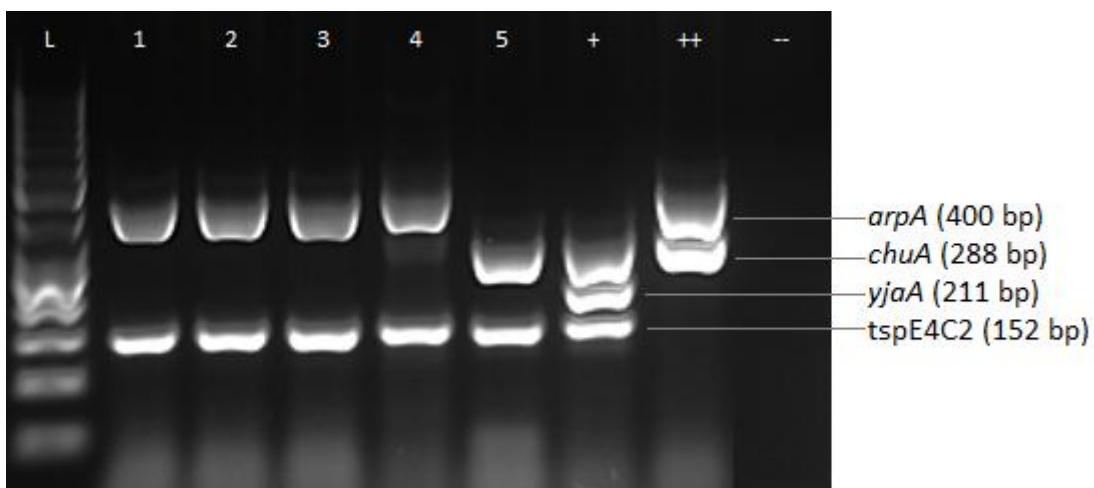
Preglednica 16: Zbrani rezultati o pomnožkih genov za virulentne dejavnike pri vseh sevih.
 Table 16: Collected results for all tested virulence factor genes.

Geni za virulentne dejavnike \ Sevi	RD1	RD2	RD3	RK1	RK2	Odstotek prisotnosti gena med sevi (%)
<i>fimH</i>	+	+	+	+	+	100
<i>crl</i>	+	+	+	+	+	100
<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-	0
<i>usp</i>	-	-	-	-	-	0
<i>ibeA</i>	-	-	-	-	-	0
<i>papGIII</i>	-	-	-	-	-	0
<i>fyuA</i>	-	-	-	+	-	20
<i>papGII</i>	-	-	-	-	-	0
<i>ireA</i>	-	-	-	-	-	0
<i>kspMT</i>	-	-	-	-	-	0
<i>tcpC</i>	-	-	-	-	-	0
APEC-ompT	-	-	-	-	+	20
<i>ompT</i>	+	+	+	+	+	100
<i>traJ</i>	-	-	-	-	+	20
<i>traT</i>	-	-	-	+	+	40
<i>sfaDE</i>	-	-	-	-	-	0
<i>afa/draBC</i>	-	-	-	-	-	0
<i>iroN</i>	-	-	-	-	+	20
<i>iha</i>	-	-	-	-	-	0
<i>neuB</i>	-	-	-	-	-	0
<i>iss</i>	-	-	-	-	-	0
<i>hlyA</i>	-	-	-	-	-	0
iucD	-	-	-	+	+	40
<i>hbp</i>	-	-	-	-	-	0
<i>clbA</i>	-	-	-	-	-	0
<i>clbO</i>	-	-	-	-	-	0
<i>stx1</i>	-	-	-	-	-	0
<i>stx2</i>	-	-	-	-	-	0
<i>aggR</i>	-	-	-	-	-	0
Št. virulentnih genov v posameznem sevu	3	3	3	6	8	

Slike gelov – glej priloge A, B, C, D, E in F.

4.5 DOLOČANJE FILOGENETSKE SKUPINE

Kvadrupleks PCR in PCR za skupino C in E smo opravili istočasno. Rezultati so pokazali, da je bil za pridobitev filogenetske skupine potreben le kvadrupleks PCR. Iz slike 13 je razvidno, da so sevi RD1, RD2, RD3 in RK1 pozitivni za DNA fragmenta *arpA* in *tspE4C2*, sev RK2 pa je pozitiven za *chuA* in *tspE4C2*. Iz teh rezultatov je bilo razvidno, da sevi RD1, RD2, RD3 in RK1 pripadajo filogenetski skupini B1, sev RK2 pa filogenetski skupini B2 (slika 14). Ti rezultati sovpadajo z rezultati o prevalenci genov za virulentne dejavnike, prisotnih v posameznih sevih, saj ima sev RK2, ki je bil uvrščen v filogenetsko skupino B2, največ prisotnih genov za virulentne dejavnike.

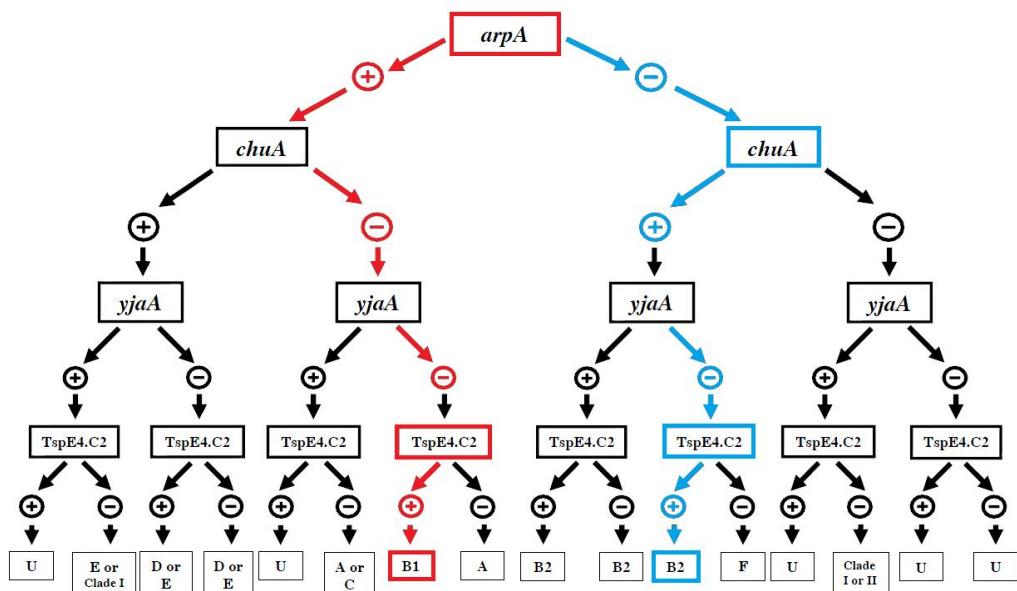


Slika 13: Elektroforeza pomnožkov PCR pri določanju filogenetske skupine.

Legenda: L – standardna 50 bp lestvica, 1 – RD1, 2 – RD2, 3 – RD3, 4 – RK1, 5 – RK2, + – pozitivna kontrola (BJ2), ++ – pozitivna kontrola (BJ4), -- – negativna kontrola (dodatek sterilne destilirane vode namesto DNA).

Figure 13: Electrophoresis of PCR products for quadruplex phylo-typing determination.

Legend: L – standard 50 bp ladder, 1 – RD1, 2 – RD2, 3 – RD3, 4 – RK1, 5 – RK2, + – positive control (BJ2), ++ – positive control (BJ4), -- – negative control (addition of sterile water instead of DNA).



Slika 14: Shema določanja filogenetske skupine (Clermont in sod., 2013: priloga 2).

Figure 14: Phylo-type determination results (Clermont et al., 2013: supplementary information 2).

5 RAZPRAVA

E. coli naseljuje prebavni trakt živali s stalno telesno temperaturo, ljudi in plazilcev (Madigan in sod., 2011). V zadnjem času pridobivajo na pomenu raziskave, ki opredeljujejo zoonozni –virulentni potencial *E. coli* iz različnih možnih rezervoarjev. V naši raziskavi smo se tako osredotočili na vprašanje: Ali so lahko kunci možen rezervoar za patogene seve *E. coli*? Prvi korak pri iskanju odgovora je bila torej izolacija *E. coli* iz kunčjega blata. Predvidevali smo, da bo ta korak enostaven, vendar se je izkazalo, da *E. coli* ni bila prisotna pri vseh vzorcih. *E. coli* smo poskušali izolirati iz blata treh kuncev, ki so kot domače živali prebivali pri treh različnih družinah. *E. coli* nismo uspeli izolirati iz nobenega od domačih kuncev, kljub temu, da smo enega kunca vzorčili kar trikrat in bili še posebej pozorni, da je bilo blato sveže. Po več poskusih smo tako zaključili, da *E. coli* v teh vzorcih ni bila prisotna. Za razliko od vzorcev blata kuncev domačih živali, smo iz vzorcev blata hlevskih kuncev brez težav izolirali *E. coli*.

Znano je, da *E. coli* je prisotna v mikrobioti kunčjih mladičev, kasneje pa je v črevesju prisotna le prehodno (dva do tri tedne), kadar je zaužita s krmo (Fortun-Lamothe in Boullier, 2007). Predvidevali smo, da je prisotnost *E. coli* v vzorcih pogojena s kontaminacijo zaužite krme. Zbrali smo vzorce krme vzorčenih kuncev, hkrati pa smo vzorčili tudi svežo, še neodprto vrečko krme iz trgovine za male živali. Kljub temu da je *E. coli* široko razširjena v okolju, krma, ki so jo prejemali hišni kunci, ni vsebovala *E. coli*. Prav tako *E. coli* ni bila prisotna v kontrolni, trgovinski krmi. Ti rezultati se skladajo z napisanim, *E. coli* ni prisotna v črevesju teh kuncev, saj prav tako ni prisotna v njihovi krmi. Rezultati krme iz hleva pa so bili povsem drugačni, iz hlevske krme smo brez težav izolirali *E. coli* in z metodo ERIC-PCR smo tudi pokazali, da lahko v hlevski krmi najdemo isti sev, kot v hlevskem kuncu. Zaključimo lahko, da prisotnost *E. coli* v krmi pomeni vsaj prehodno prisotnost *E. coli* tudi v črevesju kuncev, ki to krmo uživajo. To potrjuje tudi to, da smo tako pri kuncu 2, kuncu 3 in kuncu 4 izolirali vsaj en sev, ki je bil identičen sevu izoliranemu iz njihove krme. Nadalje smo z metodo ERIC-PCR tudi pokazali, da lahko sev prisoten v krmi, najdemo tudi v živalih. Na primer, iz krme kmetije K smo izolirali šest različnih sevov, eden je bil enak sevu kunca te kmetije. Predvidevamo, da več prisotnih sevov v krmi pomeni več prisotnih sevov v kuncu, a da v črevesju kunca pride do selekcije oz. da mora biti infektivna doza za posamezen sev *E. coli* zadosti visoka, da se ta ohrani v črevesju.

V blatu kuncev pa smo našli tudi seve, ki jih ni bilo v krmi. Razlogov za to je lahko več. Kunci se nahajajo v hlevu, v katerem so v bližini prisotne tudi druge živali oz. so prav tako v bližini hlevskega gnoja. Prisotne so lahko kontaminacije, saj je vzorčenje hleva težka naloga, prav tako ne vemo, ali smo uspeli vzeti reprezentativen vzorec krme. Slama predstavlja večino kunčje krme, shranjujejo jo v posebnem prostoru, dodatno pa dobivajo tudi sadje in zelenjavno. Zaradi tega smo vzorčili stalno prisotno krmo – slamo. Ostaja torej

možnost, da so bili drugi izolati *E. coli* prisotni na sadju ali zelenjavi ali pa, da je bil ta sev *E. coli* prej prisoten v krmi in ga zdaj ni več, ker pa v črevesju ostane dva do tri tedne, smo le-ta sev kljub temu zaznali.

Sevi *E. coli* predstavljajo glavni razlog pogina rejnih kuncev (Blanco in sod., 1996). Najbolj ogrožena skupina so mladi kunci, kolibaktozo pa sevi *E. coli* povzročajo tudi pri odraslih kuncih (Peeters in sod., 1988). Zaradi tega ni presenetljivo, da trgovinska hrana ne vsebuje *E. coli*, kunci - domači ljubljenčki so tako manj podvrženi okužbi. Krma hlevskih kuncev pa ima prisotne različne seve *E. coli*. Vsi štirje hlevski kunci so bili kolonizirani s *E. coli*, noben kunc pa ni bil bolan ali imel driske. Kar se sklada z objavljenimi raziskavami pri odraslih kuncih, ki so uživali krmo, kontaminirano z *E. coli*, kjer je bila *E. coli* v blatu kuncev prisotna še 5 do 18 dni in ni povzročila okužbe. *E. coli* v teh primerih predstavlja le prehodno mikrobioto (Prohászka, 1972; Blanco in sod., 1996; Peeters in sod., 1988).

Drugi pomemben del izvedene raziskave je bil ugotavljanje prisotnosti zapisov za virulentne dejavnike sevov *E. coli*, izoliranih iz rejnih in domačih kuncev, in posledično sklepanje, kakšen je virulentni potencial teh sevov in ali ti sevi lahko predstavljajo grožnjo človeku. V literaturi se kot potencialni živalski gostitelji in torej vir patogenih sevov za človeka, omenjajo domače živali (mačke in psi). Dokazanih je bilo več prenosov sevov UPEC iz domačih živali na človeka in obratno, raziskave pa so bile večinoma opravljene na psih in mačkah zaradi neposredne bližine z lastnikom (Bélanger in sod., 2011). Ker *E. coli* nismo uspeli izolirati iz domačih kuncev, lahko zaključimo, da domači kunci kljub neposredni bližini, lastnikom ne predstavljajo neposrednega tveganja za okužbo.

Pomemben rezervoar sevov ExPEC je tudi perutnina in živina (Bélanger in sod., 2011). Pri perutnini največ težav povzročajo sevi APEC, ki so v določenih primerih neločljivi od humanih sevov UPEC (Ewers in sod., 2004; Moulin-Scouleur in sod., 2007). Sevi ExPEC pa prav tako povzročajo mastitis pri govedu (Bélanger in sod., 2011), beležimo pa tudi podatke o sevih ExPEC najdenih na živalskih produktih in v klavnicih, zaradi katerih so bili beleženi izbruhi UTI-okužb (Vincent in sod., 2010). Podatkov o kuncih kot nosilcih sevov ExPEC še ni, zato smo pri izoliranih sevih *E. coli* preverili veliko število možnih prisotnih virulentnih dejavnikov, seve *E. coli* pa smo med drugim razvrstili v filogenetske skupine.

Vsi sevi *E. coli* izolirani iz hlevskih kuncev, so imeli prisotne tri gene: *fimH*, *crl* in *ompT*. Gena *fimH*, pomemben za sintezo fimbrij tipa 1 (Katouli, 2010) in *crl*, pomemben za sintezo kodrastih vlaken (Gophna in sod., 2001), sta prisotna tako pri sevih UPEC kot tudi pri komenzalnih, nepatogenih sevih *E. coli*. Pomembna sta za pritrjanje na površino gostiteljevih celic in tako nista glavna pokazatelja patogenih sevov (Katouli, 2010; Gophna in sod., 2001). OmpT ima drugačno funkcijo, saj omogoča bakterijam, da se branijo pred

gostiteljem, vstopajo v gostiteljeve celice in omogoča znotrajcelično gibanje (Vandeputte-Rutten in sod., 2001). Sevi, ki vsebujejo *ompT* so bolj virulentni, OmpT pa predstavlja pomemben virulentni dejavnik pri sevih UPEC (Webb in Lundrigan, 1996). Sevi UPEC potrebujejo za uspešno okužbo večji nabor virulentnih dejavnikov, zato predvidevamo, da OmpT v tem primeru služi le kot obramba pred gostiteljevim imunskim sistemom. Iz teh rezultatov smo sklepali, da trije sevi, izolirani iz kuncev kmetije D, nimajo visokega virulentnega potenciala in ne predstavljajo virulentne grožnje človeku. Nadalje je ta analiza potrdila, da sta RD2 in RD3 enak sev, saj sta imela enak nabor zapisov virulentnih dejavnikov.

Seva RK1 in RK2 iz kmetije K vsebujeta gena *iucD* in *traT*. *iucD* je pomemben za sintezo aerobaktina, siderofora, ki je prav tako pomemben virulentni dejavnik sevov APEC in SEPEC (Thariath in sod., 1993; Mokady in sod., 2005). *traT* sodeluje pri prenosu plazmidov (razširjanje odpornosti in drugih virulentnih dejavnikov), omogoča odpornost proti serumu, saj prepreči delovanje membranskega komplementnega sistema (Starčič Erjavec in sod., 2011; Wooley in sod., 1993). TraT je med drugim med najpomembnejšimi virulentnimi dejavniki sevov ExPEC, predvsem UPEC in SEPEC (Starčič Erjavec in sod., 2011). Sev RK1 je dodatno vseboval še *fyuA*, gen za receptor za jersinijabaktin, ki omogoča kolonizacijo sečil. Nahaja se na otoku visoke patogenosti (Schubert in sod., 2000) in je pogost pri UPEC in SEPEC (Johnson in Stell, 2000). Sev RK1 tako vsebuje kar šest genov za dejavnike, povezane z virulenco. Kljub temu, da ta sev ni povzročal okužb kunca, bi lahko predstavljal sev ExPEC in potencialno virulentno grožnjo, saj so tako *iucD*, *traT* in *fyuA* pomembni geni sevov ExPEC.

Največ zapisov virulentnih dejavnikov je vseboval sev RK2. Ta vsebuje vse do sedaj naštete gene (*fimH*, *crl*, *ompT*, *iucD* in *traT*), poleg teh pa vsebuje še dodatne tri gene APEC-*ompT*, *traJ* in *iroN*. To skupno predstavlja več kot četrtnino preverjenih genov virulentnih dejavnikov. Produkt gena *traJ* je pomemben virulentni dejavnik sevov NEMEC, kjer sodeluje pri prehodu krvno-možganske pregrado (Hill in sod., 2004; Badger in sod., 2000). IroN pa je siderofor, večinoma prisoten pri sevih UPEC, najdemo pa ga tudi pri sevih SEPEC (Russo in sod., 1999; Russo in sod., 2002). Glede na visoko število prisotnih zapisov virulentnih dejavnikov specifičnih za seve ExPEC, sklepamo, da ima ta sev, izmed vseh izoliranih, največji patogeni potencial in tako predstavlja možno tveganje za okužbo človeka.

Pri ocenitvi virulentnega potenciala in patogenosti izoliranih sevov je pomembno vlogo igralo tudi določanje filogenetske skupine sevov. Določanje filogenetske skupine nam omogoča razločevanje med patogenimi in komenzalnimi sevi *E. coli*. Komenzalne in nepatogene seve tako večinoma uvrščamo v skupini A in B1, v skupino B2 in delno v skupino D pa spadajo virulentni sevi ExPEC (Clermont in sod., 2000). Metoda je bila uporabljena za določanje filogenetske skupine izolatov *E. coli* iz urina, kot tudi izolatov iz

domačih živali z okužbo sečil, filogenetska skupina teh izolatov pa je v večini primerov bila B2 (Zhang in sod., 2002; Damborg in sod., 2009). Metoda je torej odlična za opredelitev patogenega potenciala naših sevov, rezultati pa omogočajo boljši vpogled v virulentni potencial sevov.

Rezultati določanja filogenetske skupine so pokazali, da sevi RD1, RD2, RD3 in RK1 spadajo v filogenetsko skupino B1, sev RK2 pa v skupino B2. Sev RK2 ima prav tako največ prisotnih zapisov virulentnih dejavnikov. Sev RK1 ima prav tako več zapisov virulentnih dejavnikov, vendar je bil uvrščen v skupino B1. Iz tega sklepamo, da so prisotni zapisi virulentnih dejavnikov pomembni za preživetje in rast v gostitelju, in da torej verjetno predstavljajo komenzalne, in ne patogene, seve. Pri sevih iz kuncev iz kmetije D smo zaradi prisotnosti treh od skupno 29 analiziranih zapisov virulentnih dejavnikov predvidevali, da spada v skupino A ali B1, določanje filogenetske skupine pa je to potrdilo. Nadalje se je ponovno izkazalo, da sta RD2 in RD3 enak sev, saj sta bila uvrščena tudi v enako filogenetsko skupino.

Od petih izoliranih sevov v patogeno filogenetsko skupino B2 spada le en sev, RK2. Ta sev je torej možen sev ExPEC, ki bi lahko mogoče povzročal okužbe pri ljudeh in tako predstavljal možno virulentno grožnjo. Ve se, da v klavnicih lahko pride do prenosa ExPEC iz živalskih rezervoarjev na meso (Bélanger in sod., 2011). To pomeni, da kljub temu da ta kunc ni v neposrednem stiku z ljudmi, saj ni domača žival, bi lahko do prenosa prišlo v klavniči s slabšimi higieniskimi razmerami. Za potrditev, ali bi do tega res lahko prišlo, bi bilo potrebno opraviti še veliko raziskav, med drugim bi bilo potrebno vzorčiti kunčje meso v klavnicih. Vse ostale seve smo uvrstili v skupino B1 in ne predstavljajo tveganja za človeka.

Iz tega lahko zaključimo, da tveganje za človeka pri kuncihi obstaja, vendar je tveganje nizko. Kunci, ki so domače živali, ne predstavljajo tveganja v primeru, da se prehranjujejo s trgovinsko hrano, saj tako niso izpostavljeni sevom *E. coli*. Hlevski kunci lahko predstavljajo tveganje za človeka, vendar je to tveganje nizko ter je ob pravilni higieni lahko preprečeno. Za boljše razumevanje in določanje virulentnega in zoonoznega potenciala za seve ExPEC pri kuncihi bi bilo potrebno opraviti še več študij, potreben bi bil veliko večji nabor vzorcev, tako blata kot krme. Potrebno bi bilo vzorčenje blata in krme skozi čas in spremljanje prisotnosti in odsotnosti *E. coli*. Prav tako bi bilo potrebno vzorčenje blata drugih živali, ki so v enakem prostoru in vzorčenje klavnic. Potrebno bi bilo tudi vzorčenje domačih kuncev, ki se ne prehranjujejo s trgovinsko hrano in preverjanje prisotnosti sevov *E. coli* pri njih, kot tudi pri članih družine.

6 SKLEPI

- *E. coli* smo uspešno izolirali iz rejnih kuncev in njihove krme. *E. coli* nismo uspeli izolirati iz domačih kuncev, prav tako bakterije nismo našli v njihovi krmi.
- Potrdili smo povezavo med izolati *E. coli* iz kunčeje krme in kunčjega blata.
- Med 5 izoliranimi kunčjimi sevi *E. coli* smo štiri izolate uvrstili v filogenetsko skupino B1, en izolat pa v filogenetsko skupino B2. Seve skupine B1 smo označili kot najverjetneje nepatogene, ki bi pri človeku najverjetneje predstavljali komenzalne seve. Sev, ki smo ga uvrstili v skupino B2, smo označili kot potencialno patogeni sev ExPEC, ki predstavlja potencialno tveganje za človeka.
- Kunčji sevi *E. coli*, ki smo jih uvrstili v filogenetsko skupino B1, so imeli od tri do šest prisotnih zapisov virulentnih dejavnikov, kar je manj kot kunčji sev, ki smo ga uvrstili v filogenetsko skupino B2.
- Kunčji sev *E. coli*, ki smo ga uvrstili v skupino B2, je imel prisotnih osem od 29 analiziranih zapisov virulentnih dejavnikov, kar je več kot četrtina vseh preverjenih virulentnih dejavnikov. Gre za potencialno virulentni izolat *E. coli*, ki lahko predstavlja grožnjo za človeka.
- Iz dobljenih rezultatov sklepamo, da so kunci možni potencialni rezervoar patogenih sevov *E. coli*, vendar je tveganje za prenos povzročitelja na človeka nizko. Pri domačih kuncih, ki so v tesnem stiku z ljudmi, nismo našli *E. coli*. Rejni kunci so lahko kolonizirani s potencialnimi sevi ExPEC, kar nakazuje na možnost zoonotskega prenosa sevov ExPEC iz kunca na človeka.

7 POVZETEK

Bakterija *E. coli* oz. njeni sevi ExPEC so glavni povzročitelji okužb sečil pri ženskah, povzročajo pa tudi sepso in neonatalni meningitis. Sevi ExPEC so torej pomembni povzročitelji okužb pri ljudeh, a odkriti so bili tudi pri domačih in rejnih živalih. V dosedanjih raziskavah je bilo pokazano, da lahko sevi ExPEC okužijo različne vrste gostiteljev ter se med njimi prenašajo, kar odpira vprašanje zoonotskega potenciala sevov ExPEC, prisotnih pri živalih. V tej raziskavi smo se osredotočili na zoonotski potencial domačih in rejnih kuncev in virulentni potencial njihovih sevov *E. coli*.

V ta namen smo zbrali vzorce blata treh domačih kuncev in štirih rejnih kuncev, ter njihove krme. V blatu in krmi domačih kuncev ni bilo prisotnih *E. coli*, medtem ko so v blatu rejnih kuncev in njihovi krmi bili prisotni različni sevi *E. coli*. Iz treh rejnih kuncev smo uspešno izolirali po en sev *E. coli* (RD1, RD2 in RD3), iz enega kunca pa dva različna seva (RK1 in RK2). Iz njihove krme smo uspešno izolirali več sevov *E. coli* (krma iz kmetije D je vsebovala dva različna seva, FD1 in FD2, krma iz kmetije K pa kar šest različnih sevov, FK1, FK2, FK3, FK4, FK5 in FK6). Seve smo med seboj ločili na podlagi njihovih profilov ERIC-PCR. Dokazali smo povezavo med sevi *E. coli* prisotnimi v krmi in v kuncih, saj smo iz krme izolirali seve, identične sevom RD2, RD3 in RK1. Sevom, ki smo jih izolirali iz kuncev, smo določili virulentni potencial z določanjem prisotnosti zapisov različnih virulentnih dejavnikov, značilnih za seve ExPEC. Vsi sevi so imeli prisotne tri gene virulentnih dejavnikov (*fimH*, *crl* in *ompT*). Seva RK1 in RK2 sta imela prisotnih več genov virulentnih dejavnikov, RK1 je imel prisotnih šest genov virulentnih dejavnikov (dodatev še *traT*, *iucD* in *fyuA*), medtem ko je imel sev RK2 prisotnih kar osem različnih genov virulentnih dejavnikov (dodatev še *traT*, *iucD*, *traJ*, APEC-*ompT* in *iroN*). Sevom smo določili tudi njihovo filogenetsko skupino. Sevi RD1, RD2, RD3 in RK1 spadajo v filogenetsko skupino B1, ki je povezana s komenzalnimi sevi, sev RK2 pa v filogenetsko skupino B2, ki je povezana s potencialno patogenimi sevi. Rezultati so potrdili, da je krma pomemben vir *E. coli* prisotnih v kuncih.

Iz dobljenih rezultatov sklepamo, da domači kunci ne predstavljajo rezervoarja patogenih sevov *E. coli*. Rejni kunci lahko predstavljajo rezervoar patogenih sevov *E. coli*, vendar je tveganje za prenos na gostitelja nizko, saj z njimi niso v tesnem stiku. Prav tako smo potrdili prenos *E. coli* sevov iz krme na kunca in tako sklepamo, da je krma pomemben vir *E. coli* v prebavilih kuncev.

8 SUMMARY

In this thesis we tried to evaluate the *E. coli* virulence potential and zoonotic threat of farm and pet rabbits and the connection between *E. coli* in rabbit intestine and their fodder. For that reason pet and farm rabbit faeces and their fodder was collected. *E. coli* was isolated from these samples and tested for presence of several virulence factor genes and phylo-groups.

For *E. coli* isolation and identification purposes MAC and UriSelect plates were used. Further, oxidase and IMVC test were performed. After isolation, the isolates were distinguished from one another on the basis of ERIC-PCR profiles. Finally, we assigned them to different phylo-groups and determined the presence of virulence factor genes with PCR. We sampled three pet rabbits and four farm rabbits and their fodder. First three farm rabbits (further referred to as rabbit 1, rabbit 2 and rabbit 3) were living in separate cages on the farm D. Fourth farm rabbit (further referred to as rabbit 4) was from the farm K. Fodder from farm D is further referred to as fodder D, and fodder from farm K is further referred to as fodder K. Additionally we sampled pet rabbit fodder bought at a pet store.

While we had no problems isolating *E. coli* from farm rabbit faeces and their fodder, we were not able to isolate any *E. coli* from pet rabbits and their fodder. With all selective methods, we isolated 8 *E. coli* isolates from rabbit 1, 18 isolates from rabbit 2, 13 isolates from rabbit 3, 14 isolated from rabbit 4 and 10 isolates from fodder D and K.

ERIC-PCR profiling showed that all isolates from rabbit 1 were one strain (RD1), all isolates from rabbit 2 and 3 were identical (however, we decided to choose one isolate of each rabbit for further evaluation, RD2 strain from rabbit 2 and RD3 strain from rabbit 3), and that two different strains were present in rabbit 4 (RK1 and RK2). ERIC-PCR profiling also showed that there were two different strains present in fodder D and six different strains in fodder K. All isolated strains are presented in Table 13. ERIC-PCR profiles showed us that some of the strains from the rabbits and their fodder were the same: the rabbit strains RD2, RD3 were identical to the fodder strain FD1 and rabbit strain RK1 was identical to the fodder strain FK3.

The next important step was to determine virulence factor genes and the phylo-group of isolated rabbit strains. We tested 29 different virulence factor genes, most of them are typical for ExPEC strains. Three of the tested virulence factor genes, *stx1*, *stx2* and *aggR*, are connected with IPEC strains. Virulence factor genes *fimH*, *crl* and *ompT* were found in all strains. Virulence factor genes *traT* and *iucD* were found in strains RK1 and RK2. Strain RK1 had an additional virulence factor gene *fyuA*, while RK2 had three additional virulence factor genes, APEC-*ompT*, *traJ* and *iroN*. Results showed that RK2 had the highest number of virulence factor genes (8 out of 29) and was thus suspected as most

virulent. All virulence factor genes that were tested and the results are collected in Table 15. The virulence potential of the isolated rabbit strains was also determined by using the phylo-typing method. Results showed that strains RD1, RD2, RD3 and RK1 belonged to the commensal B1 phylo-group, while the strain RK2 belonged to the more virulent B2 phylo-group.

From the obtained results we could conclude, that *E. coli* strains were not present in tested pet rabbits or their fodder. Since pet rabbits are in close proximity with their owners they could possess a zoonotic threat for their owners, however, this study showed that they are not a zoonotic threat as long as they are fed with store bought fodder. Even though *E. coli* is not part of the adult rabbit microbiota, we were able to isolate *E. coli* strains from farm rabbits and their fodder. Since we were able to find identical *E. coli* strains in rabbits as well as in fodder we can suspect, that fodder is one of the main sources of *E. coli* in farm rabbits. The results also showed that the more strains are present in the fodder, the more strains are present in the rabbit's intestine. However, two of the rabbit strains were not present in their fodder. This might be due to the fact that *E. coli* can stay in rabbit intestine up to 18 days after ingestion, which means the isolated *E. coli* strain might have been in their fodder before. It might also be present in another type of rabbit's fodder since we only sampled straw fodder (main fodder).

Isolated rabbit strains had different arrays of virulence factor genes, however, three virulence factor genes (*fimH*, *crl* and *ompT*) were found in all of the isolated strains. Since *fimH* and *crl* are important in adhesion and *ompT* plays a role in avoiding the human immune system we concluded that they simply had a role in colonization of the intestine and not in infections. Further, these strains (RD1, RD2 and RD3) were also typed as B1 phylo-group. All these assays also showed that the RD2 and RD3 were actually the same strain as already revealed by ERIC-PCR profiling. RK1 belonged to the commensal B1 phylo-group as well, even though it had additional three virulence factor genes *traT*, *iucD* and *fyuA*. *traT* is important in serum survival, while *iucD* and *fyuA* help in iron acquisition and are important UPEC virulence factors. We suspect, that the found six virulence factor genes are not enough for causing an infection and the strain would thus probably be a commensal in human intestine. Strain RK2 had the most virulence factor genes present: *fimH*, *crl*, *ompT*, APEC-*ompT*, *traJ*, *traT*, *iucD* and *iroN*. *traJ* and *iroN* are also important ExPEC virulence factor genes and such strain could be a human pathogen. As further, the strain RK2 belonged to B2 phylo-group, the typical ExPEC phylo-group, we concluded, that this strain might be a zoonotic threat to humans.

In conclusion, rabbits might be a possible zoonotic threat to humans however, the threat is low. Pet rabbits are not directly exposed to *E. coli* as *E. coli* is not present in their commercial fodder and thus do not present a zoonotic threat. Since one of the farm rabbits belonged to B2 phylo-group, there might be a low chance of zoonotic transfer to humans,

which can be avoided with proper hygiene. Further studies have to be done to better determine the zoonotic threat, like a larger sampling group and sampling rabbit faeces and their fodder through a longer period of time. It would be also interesting to sample pet rabbits that are not fed with commercial fodder and their owners and study their *E. coli*.

9 VIRI

- Abecia L., Fondevila M., Balcells J., Edwards J. E., Newbold C. J., McEwan N. R. 2005. Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. FEMS Microbiology Letters, 244, 1: 111-115.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter K. 2008. Molecular biology of the cell. 5th ed. New York, Garland Science, Taylor & Francis Group: 1486 str.
- Antão E. M., Ewers C., Gürlebeck D., Preisinger R., Homeier T., Li G., Wieler L. H. 2009. Signature-tagged mutagenesis in a chicken infection model leads to the identification of a novel avian pathogenic *Escherichia coli* fimbrial adhesin. PLoS One, 4, 11: e7796, doi:10.1371/journal.pone.0007796: 13 str.
- Badger J. L., Wass C. A., Weissman S. J., Kim K. S. 2000. Application of signature-tagged mutagenesis for identification of *Escherichia coli* K1 genes that contribute to invasion of human brain microvascular endothelial cells. Infection and Immunity, 68, 9: 5056-5061.
- Bakhtiar S. M., LeBlanc J. G., Salvucci E., Ali A., Martin R., Langella P., Chatel J.M., Miyoshi A., Bermúdez-Humarán L.G., Azevedo V. 2013. Implications of the human microbiome in inflammatory bowel diseases. FEMS Microbiology Letters, 342, 1: 10-17.
- Bauer R. J., Zhang L., Foxman B., Siitonen A., Jantunen M. E., Saxen H., Marrs C. F. 2002. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection—*usp*, *iha*, and *iroN*. *E. coli*. Journal of Infectious Diseases, 185, 10: 1521-1524.
- Bélanger L., Gareaux A., Harel J., Boulianne M., Nadeau E., Dozois C. M. 2011. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 62, 1: 1-10.
- Bennegadi N., Gidenne T., Licois D. 2001. Impact of fibre deficiency and sanitary status on non-specific enteropathy of the growing rabbit. Animal Research, 50, 5: 401-413.
- Beutin L. 1999. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. Veterinary Research, 30, 2: 285-298.
- Biagi E., Nylund L., Candela M., Ostan R., Bucci L., Pini E., Nikkila J., Monti D., Satokari R., Franceschi C., De Vos W. 2010. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. PloS One, 5, 5: e10667, doi:10.1371/journal.pone.0010667: 14 str.
- Bian X., Fu J., Plaza A., Herrmann J., Pistorius D., Stewart A. F., A.F., Zhang Y., Müller R. 2013. *In vivo* evidence for a prodrug activation mechanism during colibactin maturation. ChemBioChem, 14, 10: 1194-1197.
- Blanco J. E., Blanco M., Blanco J., Mora A., Balaguer L., Mourino M., Juarez A., Jansen W. H. 1996. O serogroups, biotypes, and eae genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. Journal of Clinical Microbiology, 34, 12: 3101-3107.
- Chang D. E., Smalley D. J., Tucker D. L., Leatham M. P., Norris W. E., Stevenson S. J., Anderson A.B., Grissom J.E., Laux D.C., Cohen P.S., Conway T. 2004. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 19: 7427-7432.

- Cirl C., Wieser A., Yadav M., Duerr S., Schubert S., Fischer H., Stappert D., Wantia N., Rodriguez N., Wagner H., Svanborg C. 2008. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nature Medicine*, 14, 4: 399-406.
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 10: 4555-4558.
- Clermont O., Christenson J. K., Denamur E., Gordon D. M. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5, 1: 58-65.
- Combes S., Michelland R. J., Monteils V., Cauquil L., Soulié V., Tran N. U., Gidenne T., Fortun-Lamothe L. 2011. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. *FEMS Microbiology Ecology*, 77, 3:680-689.
- Conway T., Krogfelt K. A., Cohen P. S. 2004. The life of commensal *Escherichia coli* in the mammalian intestine. *EcoSal Plus*, 1: 9, doi:10.1128/ecosalplus.8.3.1.2: 2 str.
- Cortes M. A., Gibon J., Chanteloup N. K., Moulin-Schouleur M., Gilot P., Germon P. 2008. Inactivation of *ibeA* and *ibeT* results in decreased expression of type 1 fimbriae in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908. *Infection and Immunity*, 76, 9: 4129-4136.
- Crossman L. C., Chaudhuri R. R., Beatson S. A., Wells T. J., Desvaux M., Cunningham A. F., Petty N.K., Mahon V., Brinkley C., Hobman J.L., Henderson I. R. 2010. A commensal gone bad: complete genome sequence of the prototypical enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407. *Journal of Bacteriology*, 192, 21: 5822-5831.
- Čitar M. 2010. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 97 str.
- Daines D. A., Wright L. F., Chaffin D. O., Rubens C. E., Silver R. P. 2000. NeuD plays a role in the synthesis of sialic acid in *Escherichia coli* K1. *FEMS Microbiology Letters*, 1890, 2: 281-284.
- Damborg P., Nielsen S. S., Guardabassi L. 2009. *Escherichia coli* shedding patterns in humans and dogs: insights into within-household transmission of phylotypes associated with urinary tract infections. *Epidemiology and Infection*, 137, 10: 1457-1464.
- NCBI. 2013. *Escherichia coli* strain K-12 sumstrain MG1655 complete genome. Maryland, National Center for Biology Information: 2 str.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U00096.2> (maj, 2016)
- Ewers C., Janßen T., Kießling S., Philipp H. C., Wieler L. H. 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary Microbiology*, 104, 1: 91-101.
- Fajs L., Jelen M., Borić M., Đapa T., Žgur-Bertok D., Starčič Erjavec M. 2013. The discriminative power in determining genetic diversity of *Escherichia coli* isolates: comparing ERIC-PCR with AFLP. *African Journal of Microbiology*, 20: 2416-2419.
- Feldmann F., Sorsa L. J., Hildinger K., Schubert, S. 2007. The salmochelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* *in vitro*. *Infection and Immunity*, 75, 6: 3183-3187.

- Fernandez-Beros M. E., Kissel V., Lior H., Cabello F. C. 1990. Virulence-related genes in ColV plasmids of *Escherichia coli* isolated from human blood and intestines. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 4: 742-746.
- Fortun-Lamothe L., Boullier S. 2007. A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. *Livestock Science*, 107, 1: 1-18.
- Foxman B., Zhang L., Palin K., Tallman P., Marrs C. F. 1995. Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection. *Journal of Infectious Diseases*, 171, 6: 1514-1521.
- Fraser M. E., Fujinaga M., Cherney M. M., Melton-Celsa A. R., Twiddy E. M., O'Brien A. D., James M. N. 2004. Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 26: 27511-27517.
- Germon P., Chen Y. H., He L., Blanco J. E., Brée A., Schouler C., Huang S.H., Moulin-Schouleur M. 2005. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 151, 4: 1179-1186.
- Gidenne T. 2015. Dietary fibres in the nutrition of the growing rabbit and recommendations to preserve digestive health. *Animal*, 9, 2: 227-242.
- Gidenne T., Arveux P., Madec O. 2001. The effect of the quality of dietary lignocellulose on digestion, zootechnical performance and health of the growing rabbit. *Animal Science*, 73, 1: 97-104.
- Gidenne T., Combes S., Fortun-Lamothe L. 2012. Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health. *Animal*, 6, 9: 1407-1419.
- Gidenne T., Jehl N., Lapanouse A., Segura M. 2004. Inter-relationship of microbial activity, digestion and gut health in the rabbit: effect of substituting fibre by starch in diets having a high proportion of rapidly fermentable polysaccharides. *British Journal of Nutrition*, 92, 1: 95-104.
- Gidenne T., Pinheiro V., e Cunha L. F. 2000. A comprehensive approach of the rabbit digestion: consequences of a reduction in dietary fibre supply. *Livestock Production Science*, 64, 2: 225-237.
- Gophna U., Barlev M., Seijffers R., Oelschlager T. A., Hacker J., Ron E. Z. 2001. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 69, 4: 2659-2665.
- Gordon D. M., Clermont O., Tolley H., Denamur E. 2008. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*, 10, 10: 2484-2496.
- Grün P. 2002. Reja kuncev. Ljubljana, Kmečki glas: 62 str.
- Hantke K., Nicholson G., Rabsch W., Winkelmann, G. 2003. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7: 3677-3682.
- Hill V. T., Townsend S. M., Arias R. S., Jenabi J. M., Gomez-Gonzalez I., Shimada H., Badger J. L. 2004. TraJ-dependent *Escherichia coli* K1 interactions with professional phagocytes are important for early systemic dissemination of infection in the neonatal rat. *Infection and Immunity*, 72, 1: 478-488.

- Homburg S., Oswald E., Hacker J., Dobrindt U. 2007. Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters, 275, 2: 255-262.
- Homeier T., Semmler T., Wieler L. H., Ewers C. 2010. The GimA locus of extraintestinal pathogenic *E. coli*: does reductive evolution correlate with habitat and pathotype. PLoS One, 5, 5: e10877, doi:10.1371/journal.pone.0010877: 9 str.
- Johnson J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clinical Microbiology Reviews, 4, 1: 80-128.
- Johnson J. R., Brown J. J. 1996. A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant *papG* genes encoding the Gal (α 1-4) Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*. Journal of Infectious Diseases, 173, 4: 920-926.
- Johnson J. R., Delavari P., Stell A. L., Whittam T. S., Carlino U., Russo T. A. 2001b. Molecular comparison of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of the same electrophoretic lineages from humans and domestic animals. Journal of Infectious Diseases, 183, 1: 154-159.
- Johnson J. R., Jelacic S., Schoening L. M., Clabots C., Shaikh N., Mobley H. L., Tarr P. I. 2005. The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. Infection and Immunity, 73, 2: 965-971.
- Johnson J. R., Johnston B., Kuskowski M. A., Nougayrede J. P., Oswald E. 2008a. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. Journal of Clinical Microbiology, 46, 12: 3906-3911.
- Johnson J. R., Miller S., Johnston B., Clabots C., DebRoy C. 2009. Sharing of *Escherichia coli* sequence type ST131 and other multidrug-resistant and urovirulent *E. coli* strains among dogs and cats within a household. Journal of Clinical Microbiology, 47, 11: 3721-3725.
- Johnson J. R., Oswald E., O'Bryan T. T., Kuskowski M. A., Spanjaard L. 2002. Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. Journal of Infectious Diseases, 185, 6: 774-784.
- Johnson J. R., Owens K., Gajewski A., Clabots C. 2008b. *Escherichia coli* colonization patterns among human household members and pets, with attention to acute urinary tract infection. Journal of Infectious Diseases, 197, 2: 218-224.
- Johnson J. R., Russo T. A. 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. International Journal of Medical Microbiology, 295, 6: 383-404.
- Johnson J. R., Russo T. A., Tarr P. I., Carlino U., Bilge S. S., Vary J. C., Stell A. L. 2000. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iron* *E. coli*, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. Infection and Immunity, 68, 5: 3040-3047.
- Johnson J. R., Stell A. L. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. Journal of Infectious Diseases, 181, 1: 261-272.
- Johnson J. R., Stell A. L., Delavari P., Murray A. C., Kuskowski M., Gaastra W. 2001a. Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. Journal of Infectious Diseases, 183, 6: 897-906.

- Kahali S., Sarkar B., Rajendran K., Khanam J., Yamasaki S., Nandy R. K., Bhattacharya S.K., Ramamurthy T. 2004. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 9: 4111-4120.
- Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 2: 123-140.
- Karmali M. A. 2004. Prospects for preventing serious systemic toxemic complications of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using shiga toxin receptor analogues. *Journal of Infectious Diseases*, 189, 3: 355-359.
- Katouli M. 2010. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iranian Journal of Microbiology*, 2, 2: 59-72.
- Köhler C. D., Dobrindt U. 2011. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 8: 642-647.
- Kuhar I., Grabnar, M. Žgur-Bertok D. 1998. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* in fecal strains from intestinal infections and healthy individuals. *FEMS Microbiology Letters*, 164: 243-248.
- Kurazono H., Yamamoto S., Nakano M., Nair G. B., Terai A., Chaicumpa W., Hayashi H. 2000. Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. *Microbial Pathogenesis*, 28, 3: 183-189.
- Kušar D., Avguštin G. 2010. Molecular profiling and identification of methanogenic archaeal species from rabbit caecum. *FEMS Microbiology Ecology*, 74, 3: 623-630.
- Le Bouguenec C., Archambaud M., Labigne A. 1992. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 5: 1189-1193.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D. A., Clark D. P. 2011. Brock biology of microorganisms. 13th ed. San Francisco, Benjamin Cummings: 1155 str.
- Mahjoub-Messai F., Bidet P., Caro V., Diancourt L., Biran V., Aujard Y., Y., Bingen E., Bonacorsi S. 2011. *Escherichia coli* isolates causing bacteremia via gut translocation and urinary tract infection in young infants exhibit different virulence genotypes. *Journal of Infectious Diseases*, 203: 1844-1849.
- Mainil J. 2013. *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152, 1: 2-12.
- Maître I., Lebas F., Arveux P., Bourdillon A., Duperray J., Saint Cast Y. 1990. Taux de lignocellulose (ADF de Van-Soest) et performances de croissance du lapin de chair. 5^e Journées de la Recherche Cunicole, 2: 12-13.
- Marrs C. F., Zhang L., Foxman B. 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiology Letters*, 252, 2: 183-190.
- Maurer J. J., Brown T. P., Steffens W. L., Thayer S. G. 1998. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 1: 106-118.
- Middlebrook J. L., Dorland R. B. 1984. Bacterial toxins: cellular mechanisms of action. *Microbiological Reviews*, 48, 3: 199-221.
- Mokady D., Gophna U., Ron E. Z. 2005. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 6: 455-462.

- Moulin-Schouleur M., Répérant M., Laurent S., Brée A., Mignon-Grasteau S., Germon P., Rasschaert D., Schouler C. 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 10: 3366-3376.
- Nolan L. K., Horne S. M., Giddings C. W., Foley S. L., Johnson T. J., Lynne A. M., Skyberg J. 2003. Resistance to serum complement, *iss*, and virulence of avian *Escherichia coli*. *Veterinary Research Communications*, 27, 2: 101-110.
- Nowrouzian F., Adlerberth I., Wold A. E. 2001. P fimbriae, capsule and aerobactin characterize colonic resident *Escherichia coli*. *Epidemiology and Infection*, 126, 1: 11-18.
- Otto B. R., Van Dooren S. J., Dozois C. M., Luirink J., Oudega B. 2002. *Escherichia coli* hemoglobin protease autotransporter contributes to synergistic abscess formation and heme-dependent growth of *Bacteroides fragilis*. *Infection and Immunity*, 70, 1: 5-10.
- Otto B. R., Van Dooren S. J., Nuijens J. H., Luirink J., Oudega B. 1998. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. *The Journal of Experimental Medicine*, 188, 6: 1091-1103.
- Paton A. W., Paton J. C. 1998. Detection and characterization of shiga toxicigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx* 1, *stx* 2, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb* O111 and *rfb* O157. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 2: 598-602.
- Peeters J. E., Geeroms R., Orskov F. 1988. Biotype, serotype, and pathogenicity of attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *Infection and Immunity*, 56, 6: 1442-1448.
- Prohászka L. 1972. Study of pathogenesis of enteric *Escherichia coli* infection in model experiments on rabbits. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie, 221, 3: 314-323.
- Prohaszka L. 1980. Antibacterial effect of volatile fatty acids in enteric *E. coli*-infections of rabbits. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 27, 8: 631-639.
- Ratchatrachenchai O. A., Subpasu S., Ito K. 2012. Investigation on enteroaggregative *Escherichia coli* infection by multiplex PCR. *Bulletin of the Department of Medical Sciences*, 39, 4: 211-220.
- Russo T. A., Carlino U. B., Johnson J. R. 2001. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 69, 10: 6209-6216.
- Russo T. A., Carlino U. B., Mong A., Jodush S. T. 1999. Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression after exposure to human urine. *Infection and Immunity*, 67, 10: 5306-5314.
- Russo T. A., Johnson J. R. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases*, 181, 5: 1753-1754.
- Russo T. A., Johnson J. R. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, 5, 5: 449-456.
- Russo T. A., McFadden C. D., Carlino-MacDonald U. B., Beanan J. M., Barnard T. J., Johnson J. R. 2002. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence

- factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. Infection and Immunity, 70, 12: 7156-7160.
- Russo T. A., Wenderoth S., Carlino U. B., Merrick J. M., Lesse A. J. 1998. Identification, genomic organization, and analysis of the group III capsular polysaccharide genes *kpsD*, *kpsM*, *kpsT*, and *kpsE* from an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* (CP9, O4/K54/H5). Journal of Bacteriology, 180, 2: 338-349.
- Santo E., Rodolpho D., Marin J. M. 2007. Presence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in butcheries in Taquaritinga, SP, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 38, 4: 591-593.
- Scheutz F., Nielsen E. M., Frimodt-Møller J., Boisen N., Morabito S., Tozzoli R., Nataro J.P., Caprioli A. 2011. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. Euro Surveillance, 16, 24: 6 str.
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?Articleid=19889> (februar, 2016)
- Schubert S., Cuenca S., Fischer D., Heesemann J. 2000. High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. Journal of Infectious Diseases, 182, 4: 1268-1271.
- Schubert S., Rakin A., Karch H., Carniel E., Heesemann J. 1998. Prevalence of the “high-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. Infection and Immunity, 66, 2: 480-485.
- Severi E., Hood D. W., Thomas G. H. 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. Microbiology, 153, 9: 2817-2822.
- Shpigel N. Y., Elazar S., Rosenshine I. 2008. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. Current Opinion in Microbiology, 11, 1: 60-65.
- Skyberg J. A., Johnson T. J., Johnson J. R., Clabots C., Logue C. M., Nolan L. K. 2006. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. Infection and Immunity, 74, 11: 6287-6292.
- Sokolowska-Köhler W., Schönian G., Bollmann R., Schubert A., Parschau J., Seeberg A., Presber W. 1997. Occurrence of S and F1C/S-related fimbrial determinants and their expression in *Escherichia coli* strains isolated from extraintestinal infections. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 18, 1: 1-6.
- Spurbeck R. R., Dinh P. C., Walk S. T., Stapleton A. E., Hooton T. M., Nolan L. K., Kim K.S., Johnson J.R., Mobley H. L. 2012. *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. Infection and Immunity, 80, 12: 4115-4122.
- Starčič Erjavec M., Arbiter T., Žgur-Bertok, D. 2009. Pathogenicity islands, plasmids and iron uptake systems in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. Acta Biologica Slovenica, 52, 2: 73-83.
- Starčič Erjavec M., Jesenko B., Petkovšek Ž., Žgur-Bertok D. 2010. Prevalence and associations of *tcpC*, a gene encoding a Toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein, among *Escherichia coli* urinary tract infection, skin and soft tissue infection, and commensal isolates. Journal of Clinical Microbiology, 48, 3: 966-968.

- Starčič Erjavec M., Žgur-Bertok D. 2011. Extended characterization of human uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Slovenia V: Clinical Management of Complications of Urinary Infections. Nikibakhsh A. A. (ed). Rijeka, Intech: 35-50.
- Starčič Erjavec, M., Palandačić A., Žgur-Bertok D., Ambrožič Avguštin, J. 2011. Genetic background of uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Slovenia in relation to fluoroquinolone and sulfamethoxazole(trimethoprim resistance. Acta Biologica Slovenica, 54: 5–13.
- Tarr P. I., Bilge S. S., Vary J. C., Jelacic S., Habeeb R. L., Ward T. R., Baylor M.R., Besser T. E. 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157: H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. Infection and Immunity, 68, 3: 1400-1407.
- Tchaptchet S., Hansen J. 2011. The yin and yang of host-commensal mutualism. Gut Microbes, 2, 6: 347-352.
- Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology, 8, 3: 207-217.
- Thariath A., Socha D., Valvano M. A., Viswanatha T. 1993. Construction and biochemical characterization of recombinant cytoplasmic forms of the IucD protein (lysine: N6-hydroxylase) encoded by the pColV-K30 aerobactin gene cluster. Journal of Bacteriology, 175, 3: 589-596.
- Vandeputte-Rutten L., Kramer R. A., Kroon J., Dekker N., Egmond M. R., Gros P. 2001. Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. The EMBO Journal, 20, 18: 5033-5039.
- Vincent C., Boerlin P., Daignault D., Dozois C. M., Dutil L., Galanakis C., Reid-Smith R.J., Tellier P.P., Tellis P.A., Ziebell K., Manges A. R. 2010. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. Emerging Infectious Diseases, 16, 1: 88-95.
- Wang S., Niu C., Shi Z., Xia Y., Yaqoob M., Dai J., Lu C. 2011. Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. Infection and Immunity, 79, 1: 279-287.
- Webb R. M., Lundrigan M. D. 1996. OmpT in *Escherichia coli* correlates with severity of disease in urinary tract infections. Medical Microbiology Letters, 5, 1: 8-14.
- Wiles T. J., Kulesus R. R., Mulvey M. A. 2008. Oridins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Experimental and Molecular Pathology, 85: 11-19.
- Wooley R. E., Nolan L. K., Brown J., Gibbs P. S., Giddings C. W., Turner K. S. 1993. Association of K-1 capsule, smooth lipopolysaccharides, *traT* gene, and colicin V production with complement resistance and virulence of avian *Escherichia coli*. Avian Diseases, 37, 4: 1092-1096.
- Yamamoto S., Terai A., Yuri K., Kurazono H., Takeda Y., Yoshida O. 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 12, 2: 85-90.
- Zaw M. T., Yamasaki E., Yamamoto S., Nair G. B., Kawamoto K., Kurazono H. 2013. Uropathogenic specific protein gene, highly distributed in extraintestinal uropathogenic *Escherichia coli*, encodes a new member of HNH nuclease superfamily. Gut Pathogens, 5, 1, doi: 10.1186/1757-4749-5-13: 13 str.

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

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem družini in fantu za vso pomoč in podporo med izdelavo magistrske naloge. Posebna zahvala gre tudi vsem, ki so mi pomagali pri zbiranju vzorcev.

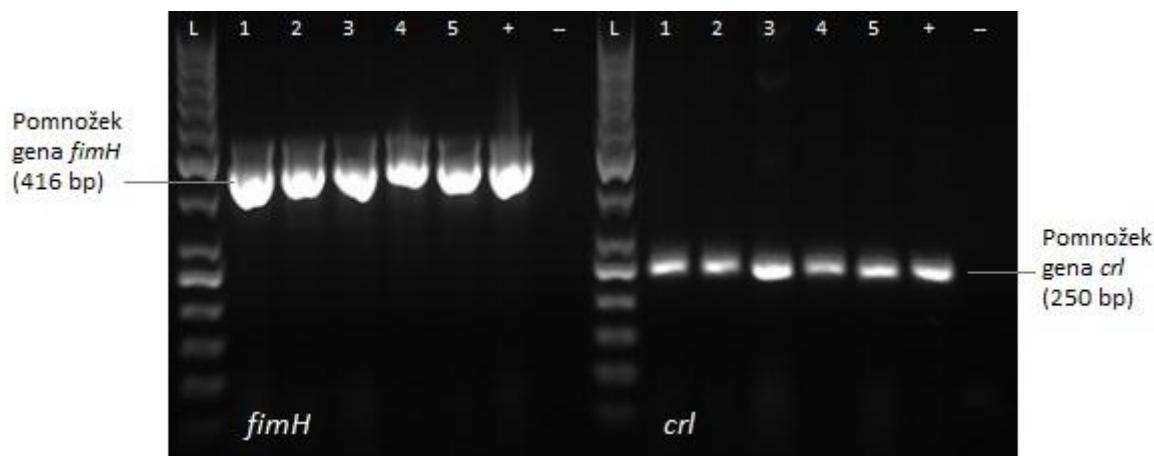
Velika zahvala gre mentorici doc. dr. Marjanci Starčič-Erjavec za pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Hvala somentorici doc. dr. Darji Žgur-Bertok za pregled magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi recenzentki doc. dr. Katji Seme za temeljit pregled in konstruktivne popravke dela.

Hvala tudi vsem prijateljem, ki so mi tekom izdelave magistrske naloge stali ob strani, kot tudi kolegom in tehnikom iz laboratorija. Posebej bi se zahvalila še Bojanu, za večkratni temeljiti pregled slovničnih napak.

PRILOGE

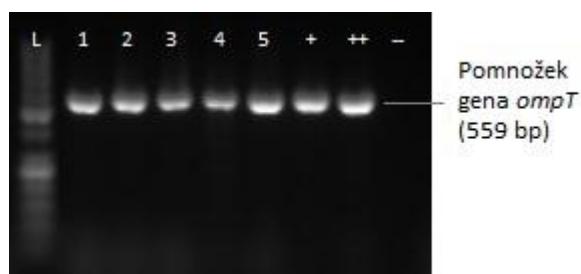
Priloga A: Elektroforeza pomnožkov PCR genov *fimH* in *crl* pri vseh kunčjih sevih.
Annex A: Electrophoresis of PCR products for *fimH* and *crl* genes in all rabbit strains.



Legenda: L – standardna 50 bp lestvica, 1 – RD1, 2 – RD2, 3 – RD3, 4 – RK1, 5 – RK2, + – pozitivna kontrola (CVUG34), -- – negativna kontrola (dodatek sterilne destilirane vode namesto DNA).

Legend: L – standard 50 bp ladder, 1 – RD1, 2 – RD2, 3 – RD3, 4 – RK1, 5 – RK2, + – positive control (CVUG34), -- – negative control (addition of sterile water instead of DNA).

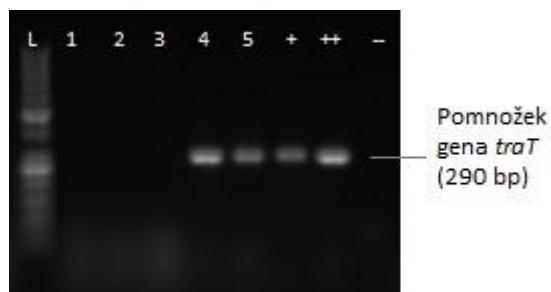
Priloga B: Elektroforeza pomnožkov PCR genov *ompT* pri vseh kunčjih sevih.
Annex B: Electrophoresis of PCR products for *ompT* gene in all rabbit strains.



Legenda: L – standardna 50 bp lestvica, 1 – RD1, 2 – RD2, 3 – RD3, 4 – RK1, 5 – RK2, + – pozitivna kontrola (BJ1), ++ – pozitivna kontrola (BJ2), --- – negativna kontrola (dodatek sterilne destilirane vode namesto DNA).

Legend: L – standard 50 bp ladder, 1 – RD1, 2 – RD2, 3 – RD3, 4 – RK1, 5 – RK2, + – positive control (BJ1), ++ – positive control (BJ2), --- – negative control (addition of sterile water instead of DNA).

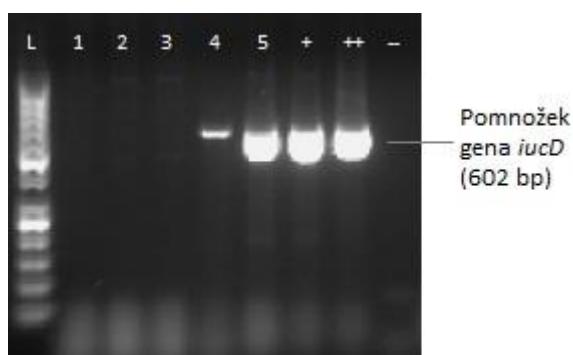
Priloga C: Elektroforeza pomnožkov PCR genov *traT* pri sevih RK1 in RK2.
Annex C: Electrophoresis of PCR products for *traT* gene in strains RK1 and RK2.



Legenda: L – standardna 50 bp lestvica, 1 – RD1, 2 – RD2, 3 – RD3, 4 – RK1, 5 – RK2, + – pozitivna kontrola (BJ1), ++ – pozitivna kontrola (BJ2), -- – negativna kontrola (dodatek sterilne destilirane vode namesto DNA).

Legend: L – standard 50 bp ladder, 1 – RD1, 2 – RD2, 3 – RD3, 4 – RK1, 5 – RK2, + – positive control (BJ1), ++ – positive control (BJ2), -- – negative control (addition of sterile water instead of DNA).

Priloga D: Elektroforeza pomnožkov PCR gena *iucD* pri sevih RK1 in RK2.
Annex D: Electrophoresis of PCR products for *iucD* gene in strains RK1 and RK2.

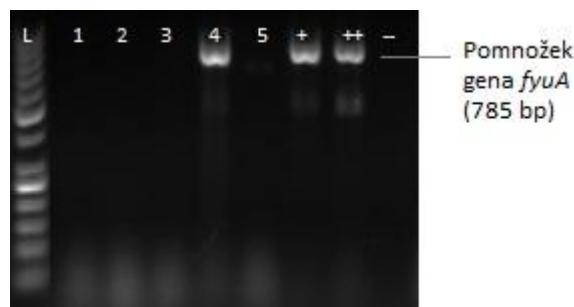


Legenda: L – standardna 50 bp lestvica, 1 – RD1, 2 – RD2, 3 – RD3, 4 – RK1, 5 – RK2, + – pozitivna kontrola (BJ2), ++ – pozitivna kontrola (BJ3), -- – negativna kontrola (dodatek sterilne destilirane vode namesto DNA).

Legend: L – standard 50 bp ladder, 1 – RD1, 2 – RD2, 3 – RD3, 4 – RK1, 5 – RK2, + – positive control (BJ2), ++ – positive control (BJ3), -- – negative control (addition of sterile water instead of DNA).

Priloga E: Elektroforeza pomnožkov PCR gena *fyuA* pri sevu RK1

Annex E: Electrophoresis of PCR products for *fyuA* gene in strain RK1.

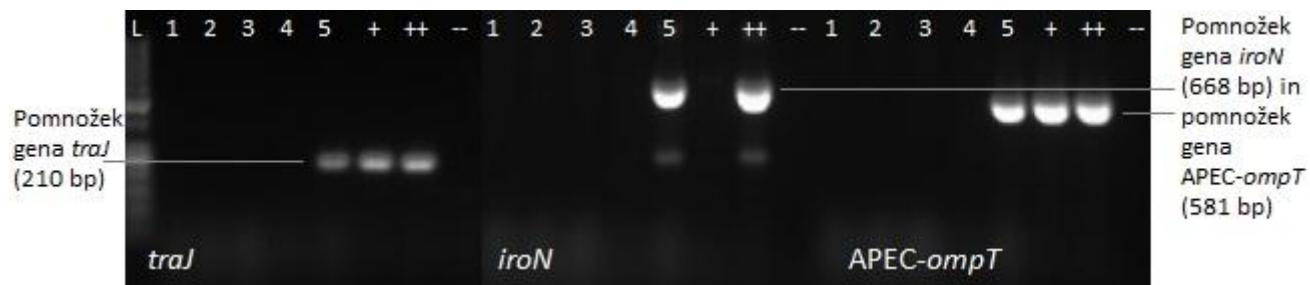


Legenda: L – standardna 50 bp lestvica, 1 – RD1, 2 – RD2, 3 – RD3, 4 – RK1, 5 – RK2, + – pozitivna kontrola (BJ1), ++ – pozitivna kontrola (BJ2), -- – negativna kontrola (dodatek sterilne destilirane vode namesto DNA).

Legend: L – standard 50 bp ladder, 1 – RD1, 2 – RD2, 3 – RD3, 4 – RK1, 5 – RK2, + – positive control (BJ1), ++ – positive control (BJ2), -- – negative control (addition of sterile water instead of DNA).

Priloga F: Elektroforeza pomnožkov PCR genov *traJ*, *iroN* in APEC-*ompT* pri sevu RK2.

Annex F: Electrophoresis of PCR products for *traJ*, *iroN* and APEC-*ompT* genes in strain RK2.



Legenda: L – standardna 50 bp lestvica, 1 – RD1, 2 – RD2, 3 – RD3, 4 – RK1, 5 – RK2, + – pozitivna kontrola (BJ7 pri APEC-*ompT* in *traJ*, BJ8 pri *iroN*), ++ – pozitivna kontrola (BJ9), -- – negativna kontrola (dodatek sterilne destilirane vode namesto DNA).

Legend: L – standard 50 bp ladder, 1 – RD1, 2 – RD2, 3 – RD3, 4 – RK1, 5 – RK2, + – positive control (BJ7 for APEC-*ompT* and *traJ*, BJ8 for *iroN*), ++ – positive control (BJ9), -- – negative control (addition of sterile water instead of DNA).