

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Ana KVAS

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI GENSKIH
ZAPISOV ZNAČILNIH ZA ZUNAJČREVESNE
PATOGENE PRI KOMENZALNIH GOVEJIH SEVIH
BAKTERIJE *Escherichia coli***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Ana KVAS

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI GENSKIH ZAPISOV ZNAČILNIH
ZA ZUNAJČREVESNE PATOGENE PRI KOMENZALNIH GOVEJIH
SEVIH BAKTERIJE *Escherichia coli***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**DETECTION OF GENES CHARACTERISTIC FOR
EXTRAINTESTINAL PATHOGENS IN CATTLE COMMENSAL
STRAINS OF *Escherichia coli***

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Microbiology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

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

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Somentorica: izr. prof. Marjanca Starčič Erjavec

Recenzentka: prof. dr. Katja Seme

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Alojz Ihan

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

Članica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: izr. prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec

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:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Ana Kvas

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 579.25.065 : 577.2.083 : 616-092 (043) = 163.6
KG	<i>Escherichia coli</i> /komenzalni sevi/filogenetske skupine/filogenetske podskupine/virulentni dejavniki/občutljivost za protimikrobne učinkovine/PCR/govedo/črevesna mikrobiota goveda
AV	KVAS, Ana, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	ŽGUR-BERTOK, Darja (mentorica)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (somentorica)/SEME, Katja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2013
IN	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI GENSKIH ZAPISOV ZNAČILNIH ZA ZUNAJČREVESNE PATOGENE PRI KOMENZALNIH GOVEJH SEVIH BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	X, 62 str., 17 pregl., 1 sl., 4 pril., 57 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AB	Bakterija <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) je pomemben član črevesne mikrobiote ljudi in številnih živali. Poleg komenzalnih sevov obstajajo tudi patogeni sevi <i>E. coli</i> , ki povzročajo različne črevesne (sevi IPEC) in zunajčrevesne okužbe (sevi ExPEC). Da bi ugotovili, ali lahko govedo predstavlja rezervoar sevov ExPEC, smo pripravili zbirko izolatov, 89 sevov, bakterije <i>E. coli</i> iz blata zdravega goveda. Vseh 89 sevov smo uvrstili v filogenetske skupine in jim določili prevalenco zapisov za 16 različnih virulentnih dejavnikov, značilnih za seve ExPEC. Za vse seve smo tudi preverili občutljivost za štiri različne antibiotike. V filogenetsko skupino B1 smo uvrstili 48 (54 %) sevov, v skupino A 28 (31 %), v skupino D 9 (10 %) in v skupino B2 4 (4 %). Odkrili smo 10 različnih zapisov za virulentne dejavnike: zapis <i>fimH</i> smo odkrili pri 58 (65 %) sevih, zapis <i>fyuA</i> pri 13 (15 %), zapis <i>iucD</i> pri 12 (13 %), zapis <i>hlyA</i> pri 8 (9 %), zapis <i>iha</i> pri 6 (7 %) ter zapisa <i>ibeA</i> in <i>kpsMT</i> pri 3 (3 %) sevih. Zapis <i>usp</i> , <i>ireA</i> in <i>hbp</i> je imel le 1 (1 %) sev. Zapisov <i>papGII</i> , <i>papGIII</i> , <i>sfaDE</i> , <i>afa/draBC</i> , <i>cnf1</i> in <i>tcpC</i> nismo odkrili. Vsi sevi so bili občutljivi za ampicilin in nalidiksično kislino. 86 (97 %) sevov je bilo občutljivih za tetraciklin, 85 (96 %) sevov pa je bilo občutljivih za streptomycinu. Naši rezultati so tako pokazali, da goveji komenzalni sevi <i>E. coli</i> nimajo visokega virulentnega potenciala za povzročitev zunajčrevesnih okužb.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
DC UDC 579.25.065 : 577.2.083 : 616-092 (043) = 163.6
CX *Escherichia coli*/commensal strains/phylogenetic groups/phylogenetic subgroups/virulence factors/susceptibility to antimicrobials/PCR/cattle/intestinal microbiota of cattle
AU KVAS, Ana
AA ŽGUR-BERTOK, Darja (supervisor)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (co-advisor)/SEME, Katja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study of Microbiology
PY 2013
TI DETECTION OF GENES CHARACTERISTIC FOR EXTRAINTESTINAL PATHOGENS IN CATTLE COMMENSAL STRAINS OF *Escherichia coli*
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO X, 62 p., 17 tab., 1 fig., 4 ann., 57 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Bacteria *Escherichia coli* is an important member of the intestinal of humans and many other animals. However, it is also known that some strains can cause intestinal (IPEC) or extraintestinal (ExPEC) infections. The aim of this study was to characterize commensal *E. coli* isolates from feces of healthy cattle for their potential for ExPEC infections. In total 89 *E. coli* strains were with the help of PCR classified into phylogenetic groups and the presence of 16 known ExPEC virulence factors genes was determined. Further, susceptibility to 4 different antibiotics was examined. 48 (54 %) of isolates belonged to the phylogenetic group B1, 28 (31 %) to A, 9 (10 %) to D and 4 (4 %) to the group B2. Ten different ExPEC virulence factors genes were detected: *fimH* in 58 (65 %), *fyuA* in 13 (15 %), *iucD* in 12 (13 %), *hlyA* in 8 (9 %), *iha* in 6 (7 %), *ibeA* and *kpsMT* in 3 (3 %), and *usp*, *ireA* and *hbp* in 1 (1 %) of tested isolates. All isolates were negative for *papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *cnf1* and *tcpC*. 96 % isolates were susceptible to streptomycin and 97 % to tetracycline. Ampicilin and nalidixic acid inhibited growth of all isolates. Our resultsshowed that commensal *E. coli* isolates from cattle have a low virulence potential for causing extraintestinal pathogenic infections.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PRILOG	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i>	3
2.2 SEVI IPEC	4
2.3 SEVI ExPEC	5
2.4 VIRULENTNI DEJAVNIKI	7
2.4.1 Adhezini	7
2.4.1.1 Fimbrije tipa I	7
2.4.1.2 P-fimbrije	8
2.4.1.3 S-fimbrije	8
2.4.1.4 Afa/Dr	8
2.4.2 Toksini	9
2.4.2.1 CNF1	9
2.4.2.2 HlyA	9
2.4.2.3 Usp	10
2.4.2.4 IbeA	10
2.4.3 Sistemi za privzemanje železa	10
2.4.4 Dejavniki za izogibanje imunskemu odzivu	11
2.5 ERIC-PCR	12
2.6 FILOGENETSKE SKUPINE	13
2.7 ANTIBIOTIKI	15
2.7.1 Antibiotiki, ki zavirajo sintezo celične stene	15
2.7.3 Antibiotiki, ki zavirajo sintezo beljakovin	16
2.7.4 Antibiotiki, ki zavirajo sintezo nukleinskih kislin	16
2.7.5 Odpornost bakterij proti antibiotikom	17
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 MATERIALI	19
3.1.1 Bakterijski sevi	19
3.1.1.1 Goveji sevi	19
3.1.1.2 Človeški komenzalni sevi	20
3.1.1.3 Pozitivni kontrolni bakterijski sevi	20

3.1.2 Gojišča	21
3.1.2.1 Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB).....	21
3.1.2.2 Priprava trdnih gojišč LB v petrijevkah	21
3.1.2.3 Priprava trdnih gojišč LB z dodanim antibiotikom	22
3.1.2.4 Priprava trdnih gojišč MacConkey-agar.....	22
3.1.2.5 UriSelectTM 4	22
3.1.3 Kemikalije	23
3.1.4 Encimi	24
3.1.5 Začetni oligonukleotidi.....	24
3.1.6 Oprema	25
3.2 METODE.....	26
3.2.1 Gojenje izolatov	26
3.2.2 Preverjanje izolatov.....	26
3.2.3 Preverjanje občutljivosti za antibiotike.....	26
3.2.4 Shranjevanje bakterijske kulture	26
3.2.5 Priprava lizatov	27
3.2.6 Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	27
3.2.6.1 ERIC-PCR	27
3.2.6.3 Določanje zapisov za virulentne dejavnike	29
3.2.7 Elektroforeza DNA v agaroznem gelu	32
3.2.8 Statistične metode	33
4 REZULTATI.....	34
4.1 ERIC-PCR	34
4.2 FILOGENETSKE (POD)SKUPINE	34
4.3 VIRULENTNI DEJAVNIKI.....	35
4.3.1 Prevalenca virulentnih dejavnikov	35
4.3.2 Število virulentnih dejavnikov po filogenetskih (pod)skupinah.....	36
4.3.3 Porazdelitev virulentnih dejavnikov glede na filogenetske (pod)skupine	37
4.4 PRIMERJAVA SEVOV AK IN BJ	40
4.4.1 Filogenetske (pod)skupine	40
4.4.2 Prevalenca virulentnih dejavnikov pri sevih AK in BJ.....	40
4.4.3 Primerjava zapisov za virulentne dejavnike po filogenetskih (pod)skupinah pri sevih AK in BJ.....	41
4.4.4 Število zapisov za virulentne dejavnike pri sevih AK in BJ	45
4.4.5 Število zapisov za virulentne dejavnike po posameznih filogenetskih skupinah pri sevih AK in BJ.....	46
4.5 OBČUTLJIVOST ZA ANTIBIOTIKE	47
5 RAZPRAVA.....	48
6 SKLEPI	53
7 POVZETEK	54
8 VIRI	55
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Podatki o vzorcih govejih iztrebkov, pridobljenih na kmetiji Gošnik.	19
Preglednica 2: Pozitivne kontrole, ki smo jih uporabili za verižno reakcijo s polimerazo.....	21
Preglednica 3: Končne koncentracije posameznih antibiotikov v gojišču LB.....	22
Preglednica 4: Program za pomnoževanje odsekov DNA za določanje filogenetskih (pod)skupin.	29
Preglednica 5: Programi za določevanje zapisov za virulentne dejavnike.	30
Preglednica 6: Koncentracija agaroze v gelu, ki je potrebna za uspešno ločitev pomnoženih DNA odsekov.	33
Preglednica 7: Število sevov iz zbirke AK v posamezni filogenetski (pod)skupini.....	35
Preglednica 8: Prevalenca zapisov za virulentne dejavnike pri sevih iz zbirke AK.	36
Preglednica 9: Prevalenca sevov iz zbirke AK glede na število zapisov za virulentne dejavnike po filogenetskih skupinah.	36
Preglednica 10: Porazdelitev virulentnih dejavnikov glede na filogenetske skupine.....	38
Preglednica 11: Porazdelitev virulentnih dejavnikov glede na filogenetske podskupine.....	39
Preglednica 12: Primerjava sevov AK in sevov BJ glede na uvrstitev v filogenetske (pod)skupine.	40
Preglednica 13: Primerjava prevalence virulentnih dejavnikov pri sevih AK in sevih BJ.....	41
Preglednica 14: Primerjava zapisov za virulentne dejavnike po filogenetskih skupinah pri sevih AK in sevih BJ.	43
Preglednica 15: Primerjava zapisov za virulentne dejavnike po filogenetskih podskupinah pri sevih AK in sevih BJ.....	44
Preglednica 16: Število zapisov za virulentne dejavnike pri sevih AK in sevih BJ.	45
Preglednica 17: Število zapisov za virulentne dejavnike po posameznih filogenetskih skupinah pri sevih AK in sevih BJ.	46

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz določevanja filogenetskih skupin in podskupin glede na prisotnost oziroma odsotnost specifičnih produktov PCR (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011).....	14
--	----

KAZALO PRILOG

Priloga A: Preglednica s podatki o zbirki govejih izolatov Skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Priloga B: Preglednica rezultatov analize sevov iz zbirke AK; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost zapisov za virulentne dejavnike.

Priloga C: Preglednica rezultatov analize sevov iz zbirke BJ; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost zapisov za virulentne dejavnike.

Priloga D: Primeri slik elektroforez pomnožkov PCR.

Priloga D1: Primer elektroforeze pomnožkov PCR za ugotavljanje filogenetskih (pod)skupin sevov iz zbirke AK.

Priloga D2: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *papGII* sevov iz zbirke AK.

Priloga D3: Primer elektroforeze pomnožkov gena *papGIII* sevov iz zbirke AK.

Priloga D4: Primer elektroforeze pomnožkov gena *sfaDE* sevov iz zbirke AK.

Priloga D5: Primer elektroforeze pomnožkov gena *afa/draBC* sevov iz zbirke AK.

Priloga D6: Primer elektroforeze pomnožkov gena *cnf1* sevov iz zbirke AK.

Priloga D7: Primer elektroforeze pomnožkov gena *hlyA* sevov iz zbirke AK.

Priloga D8: Primer elektroforeze pomnožkov gena *usp* sevov iz zbirke AK.

Priloga D9: Primer elektroforeze pomnožkov gena *iucD* sevov iz zbirke AK.

Priloga D10: Primer elektroforeze pomnožkov gena *tcpC* sevov iz zbirke AK.

Priloga D11: Primer elektroforeze pomnožkov gena *ibeA* sevov iz zbirke AK.

Priloga D12: Primer elektroforeze pomnožkov gena *fimH* sevov iz zbirke AK.

Priloga D13: Primer elektroforeze pomnožkov gena *fyuA* sevov iz zbirke AK.

Priloga D14: Primer elektroforeze pomnožkov gena *ireA* sevov iz zbirke AK.

Priloga D15: Primer elektroforeze pomnožkov gena *iha* sevov iz zbirke AK.

Priloga D16: Primer elektroforeze pomnožkov gena *hbp* sevov iz zbirke AK.

Priloga D17: Primer elektroforeze pomnožkov gena *kpsMT* sevov iz zbirke AK.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Amp	ampicilin
bp	bazni par
CNF	citotoksični nekrotizirajoči dejavnik (ang. »cytotoxic necrotizing factor«)
DAEC	difuznoadherenti sevi <i>E. coli</i> (ang. »diffusely adherent <i>E. coli</i> «)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. »deoxyribonucleic acid«)
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
EAEC	enteroagregativni sevi <i>E. coli</i> (ang. »enteroaggregative <i>E. coli</i> «)
EHEC	enterohemoragični sevi <i>E. coli</i> (ang. »enterohaemmoragic <i>E. coli</i> «)
EIEC	enteroinvazivni sevi <i>E. coli</i> (ang. »enteroinvasive <i>E. coli</i> «)
EPEC	enteropatogeni sevi <i>E. coli</i> (ang. »enteropathogenic <i>E. coli</i> «)
ERIC-PCR	PCR z začetnimi oligonukleotidi, ki nalegajo na zaporedja ERIC
ETEC	enterotoksigeni sevi <i>E. coli</i> (ang. »enterotoxigenic <i>E. coli</i> «)
ExPEC	zunajčrevesni patogeni sevi <i>E. coli</i> (ang. »extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> «)
HUS	hemolitični uremični sindrom
IBC	znotrajcelične bakterijske skupnosti (ang. »intracellular bacterial community«)
IPEC	črevesni patogeni sevi <i>E. coli</i> (ang. »intestinal pathogenic <i>E. coli</i> «)
LB	gojišče Luria-Bertani
MNEC	sevi <i>E. coli</i> , ki povzročajo neonatalni meningitis (ang. »meningitis-associated <i>E. coli</i> «)
Nal	nalidiksična kislina
PAI	otoki patogenosti (ang. »pathogenicity islands«)
PBP	penicilin vezavne beljakovine (ang. »penicillin binding proteins«)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. »polymerase chain reaction«)
RNA	ribonukleinska kislina (ang. »ribonucleic acid«)
Sm	streptomycin
Tc	tetraciklin
TIR	domena Toll-interlevkinskega receptorja (ang. »Toll-inteleukin receptor«)

TL	toplotno labilni enterotoksin
TLR	Toll-u podoben receptor (ang. »Toll-like receptor«)
UPEC	uropatogeni sevi <i>E. coli</i> (ang. »uropathogenic <i>E. coli</i> «)
UTI	okužbe urinarne poti (ang. »urinary tract infections«)
VD	virulentni dejavnik
zbirka AK	zbirka govejih komenzalnih sevov <i>E. coli</i>
zbirka BJ	zbirka človeških komenzalnih sevov <i>E. coli</i> Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani

1 UVOD

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) kolonizira prebavni trakt ljudi, toplokrvnih živali in plazilcev. Zaradi razlik v telesni velikosti, morfologiji prebavnega trakta, načinu prehrane, sestavi mikrobiote in zadrževalnih časih zaužite hrane se med različnimi gostitelji razlikuje koncentracija *E. coli* v njihovih iztrebkih. Koncentracija *E. coli* v iztrebkih ljudi se tako giblje med 10^7 in 10^9 cfu/g, medtem ko je pri domačih živalih mnogo manjša in se v povprečju giblje med 10^4 in 10^6 cfu/g (Tenaillon in sod., 2010).

Poleg komenzalnih sevov *E. coli* obstajajo tudi patogeni sevi, ki povzročajo različne črevesne in zunajčrevesne okužbe ter letno povzročijo več kot 2 milijona človeških smrti. Zaradi te raznolikosti *E. coli* predstavlja odličen model za proučevanje prehodov med mutualizmom, komenzalizmom in patogenostjo. Največ raziskav je bilo do sedaj narejenih na patogenih sevih, vendar bo v prihodnje potrebno večjo pozornost nameniti tudi raziskavam o različnih ekoloških in evolucijskih pritiskih, ki vplivajo na populacijsko strukturo komenzalnih sevov *E. coli*, saj novejša študije kažejo, da lahko komenzalni sevi predstavljajo rezervoar za razvoj patogenih sevov in sevov, odpornih proti antibiotikom (Tenaillon in sod., 2010).

Ker se pojavlja vedno več dokazov, da zunajčrevesni patogeni sevi *E. coli* (sevi ExPEC) izvirajo iz živil živalskega izvora, smo se v našem magistrskem delu odločili proučiti goveje komenzalne seve *E. coli*, ki bi lahko predstavljali vir za zunajčrevesne okužbe ljudi. Zaradi široke uporabe antibiotikov v živinoreji nas je zanimalo tudi, ali bi lahko goveji komenzalni sevi *E. coli* predstavljali rezervoar za razvoj sevov, odpornih proti antibiotikom.

1.1 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je bil pripraviti zbirko izolatov bakterije *E. coli* iz blata zdravega goveda in jih med sabo razlikovati s pomočjo metode ERIC-PCR ter jim z verižno reakcijo s polimerazo določiti prisotnost genskih zapisov za virulentne dejavnike (*papGIII*, *papGII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *cnf1*, *hlyA*, *usp*, *iucD*, *tcpC*, *ibeA*, *fimH*, *fyuA*, *ireA*, *iha*, *hbp* in *kpsMT*), ki so značilni predvsem za zunajčrevesne patogene seve *E. coli* (ExPEC). Vse izolate smo tudi uvrstili v filogenetske skupine in podskupine ter jim preverili občutljivost za antibiotike ampicilin, nalidiksično kislino, streptomycin in tetraciklin.

Cilji naloge:

- ugotoviti prevalenco genskih zapisov za virulentne dejavnike ExPEC pri govejih črevesnih sevih *E. coli*;
- ugotoviti, ali obstaja povezava med prisotnostjo zapisov za virulentne dejavnike, posameznimi filogenetskimi (pod)skupinami in odpornostjo proti antibiotikom;
- primerjati prevalenco genskih zapisov za virulentne dejavnike sevov *E. coli* iz blata goveda in sevov *E. coli* iz blata ljudi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Escherichia coli*

Bakterijo *Escherichia coli* (*E. coli*), ki danes velja za enega izmed najboljše proučenih mikroorganizmov, je leta 1885 prvi izoliral Theodor Escherich (Kaper in sod., 2005). *E. coli* kolonizira prebavila ljudi in toplokrvnih živali že nekaj ur po njihovem rojstvu. S svojim gostiteljem običajno živi v komenzalnem razmerju in ima kot del mikrobiote pomembno vlogo pri presnovi, zaščiti pred kolonizacijo s patogenimi mikroorganizmi in pri sintezi nekaterih vitaminov ter rastnih dejavnikov (Madigan in sod., 2003; Nataro in Kaper, 1998).

Bakterija *E. coli* je glavna predstavnik velike bakterijske družine *Enterobacteriaceae*. Bakterije iz te družine so po Gramu negativni fakultativno anaerobni bacili (Sousa, 2006). Večina sevov je gibljivih in imajo peritrihe bičke (Madigan in sod., 2003).

Določeni sevi *E. coli* imajo lahko tudi zapise za specifične virulentne dejavnike. Ti zapisi se pogosto nahajajo na mobilnih genetskih elementih, kar omogoča nastajanje sevov z novimi kombinacijami različnih virulentnih dejavnikov. Najuspešnejše kombinacije virulentnih dejavnikov so vodile do nastanka specifičnih patotipov, ki lahko povzročijo bolezen tudi pri zdravem posamezniku (Kaper in sod., 2004).

Okužbe s patogenimi sevi *E. coli* delimo na črevesne, ki jih povzročajo t. i. črevesni patogeni sevi *E. coli* (sevi IPEC), in zunajčrevesne okužbe, ki jih povzročajo t. i. zunajčrevesni patogeni sevi *E. coli* (sevi ExPEC). Med črevesne patogene spadajo enteropatogena *E. coli* (EPEC), enterohemoragična *E. coli* (EHEC), enterotoksigena *E. coli* (ETEC), enteroagregativna *E. coli* (EAEC), enteroinvazivna *E. coli* (EIEC) in difuznoadherentna *E. coli* (DAEC). Med zunajčrevesnimi okužbami so najpogostejše okužbe urinarnega trakta, ki jih povzroča uropatogena *E. coli* (UPEC). Pogoste so tudi okužbe s patotipom, ki povzroča meningitis in sepso (MNEC) (Kaper in sod., 2004).

2.2 SEVI IPEC

Za enteropatogene *E. coli* (EPEC) je značilno lokalno pritrjevanje s fimbrijami na površino sluznice tankega črevesa. Sevi se tesno pritrdijo na mikrovile enterocitov in jih uničijo. Sevi EPEC povzročajo sporadične primere in izbruhe driske pri otrocih do 3. leta starosti. V državah v razvoju so sevi EPEC še vedno med najpogostejšimi povzročitelji drisk pri dojenčkih (Andlovic, 2002).

Enterotoksigene *E. coli* (ETEC) izločajo toplotno-labilni enterotoksin (TL), ki je podoben kolerinemu toksinu. Posledica je obilna vodena driska. Sevi ETEC povzročajo drisko pri dojenčkih in majhnih otrocih, pogosto povzročajo tudi potovalno drisko. Prenašajo se predvsem s hrano in z vodo, le redko s stikom (Andlovic, 2002).

Enterohemoragične *E. coli* (EHEC) izločajo toksine, ki so zelo podobni Šigovim toksinom bakterije *Shigella dysenteriae* serotipa 1. Najbolj znan serotip iz te skupine je *E. coli* O157:H7. Vir te bakterije so prebavila goveda in verjetno tudi drugih živali. Bolezen se prenaša s kontaminirano hrano, predvsem z izdelki iz mletega govejega mesa in z vodo. V razvitih državah je *E. coli* O157 povzročila številne epidemije, medtem ko so v manj razvitih državah opisali samo posamične primere. *E. coli* O157 povzroča krvavo drisko (včasih samo blago vodeno drisko) in hemoragični kolitis. Pri majhnih otrocih in starejših ljudeh se lahko 5 do 10 dni po nastopu driske pojavijo nevarni zapleti, ki se kažejo v obliki hemolitičnega uremičnega sindroma (HUS) z ledvično odpovedjo in nevrološkimi zapleti (Andlovic, 2002).

Enteroinvazivne *E. coli* (EIEC) so po biokemičnih lastnostih in sposobnosti invazije zelo podobne šigelam. Pripnejo se na mikrovile enterocitov, ki so na površini sluznice tankega črevesa in jih uničijo. V državah v razvoju povzročajo drisko in potovalno drisko, vendar so epidemije opisali tudi v razvitih državah. Bolezen poteka s povišano telesno temperaturo in krvavo drisko (Andlovic, 2002).

Enteroagregativne *E. coli* (EAEC) se pritrjujejo na celice v značilnem vzorcu in izločajo enterotoksin. V državah v razvoju povzročajo pri otrocih dolgotrajno drisko (Andlovic, 2002).

Epidemiologija in patogeneza difuznoadherentnih *E. coli* (DAEC) še ni popolnoma pojasnjena (Sousa, 2006). Sevi DAEC najpogosteje povzročajo drisko pri otrocih mlajših od 12 mesecev (Kaper in sod., 2004).

2.3 SEVI ExPEC

Zunajčrevesne okužbe običajno povzročata dva patotipa *E. coli*. Sevi UPEC povzročajo okužbe urinarne poti, medtem ko sevi MNEC povzročajo neonatalni meningitis in sepso (Sousa, 2006).

Sevi UPEC so povzročitelji več kot 90 % vseh UTI (Zhang in Foxman, 2003). Izhajajo iz črevesne mikrobiote in večinoma spadajo v filogenetsko skupino B2, deloma tudi v filogenetsko skupino D (Zhang in sod., 2002).

Vedno več novejših študij je usmerjenih v odkrivanje tudi drugih rezervoarjev sevov ExPEC. Posebna pozornost je namenjena živilom živalskega izvora, še posebej perutnini. Rezultati različnih študij so pokazali, da je meso perutnine pogosto kontaminirano s sevi *E. coli*, ki vsebujejo podobne zapise za virulentne dejavnike kot sevi ExPEC izolirani iz ljudi. Sevi, ki so izolirani iz perutnine, so pogosto tudi bolj odporni proti antibiotikom in drugim protimikrobnim sredstvom (Manges in Johnson, 2012).

Pri raziskovanju patogeneze UTI ima poleg zapisov za virulentne dejavnike pomembno vlogo tudi razumevanje populacijske dinamike črevesne mikrobiote. »Hipoteza prevalence« pravi, da lahko dolga perzistenca ali dominantnost določenega seva povečata njegove možnosti, da lahko povzroči bolezen. Zato je potrebno raziskati vlogo perzistence, dominantnosti in raznolikosti črevesnih sevov *E. coli* pri razvoju ponavljajočih se UTI (Manges in Johnson, 2004).

Okužbe urinarne poti (UTI) spadajo med najpogostejše bakterijske okužbe pri ljudeh (Bien in sod., 2012). Zaradi razlik v anatomiji so ženske podvržene večjemu tveganju za razvoj UTI kot moški (Zhang in Foxman, 2003). Okoli 50 % vseh žensk je do svojega 30. leta že imelo UTI, pri 5 % se razvije kronična ponavljajoča se okužba (Marrs in sod., 2005).

Obstajajo tri poti širjenja okužbe: ascendentna, hematogena in limfogena. Najpogostejša je ascendentna pot širjenja, od sečnice proti mehurju. V primeru retroperitonealnega abscesa ali resne okužbe črevesa lahko pride tudi do širjenja bakterij preko limfnega sistema. Hematogena pot širjenja pri zdravih posameznikih ni znana, občasno se pojavlja le pri imunsko oslabljenih bolnikih, pri katerih pride do bakteriemije ali fungemije oralnega izvora (Davids in Flood, 2011).

Da lahko sevi UPEC povzročijo bolezen, potrebujejo zapise za virulentne dejavnike. V prvi stopnji okužbe so pomembne predvsem fimbrije in adhezini, ki preprečijo, da bi bakterije odnesel tok urina. Po kolonizaciji periuretralnega predela se sevi UPEC preko sečnice ascendentno širijo proti mehurju. Približno 4 do 24 ur po okužbi začnejo sevi UPEC zaradi drugačnega okolja v mehurju izražati fimbrije tipa I, ki imajo pomembno vlogo v začetni fazi UTI (Kaper in sod., 2004). Po pritrditvi sevi UPEC vstopijo v epiteljske celice mehurja. Znotraj epiteljskih celic se najprej nahajajo v strukturi, ki spominja na pozni endosom ali lizosom, nato sledi razmnoževanje bakterij v citosolu. Pride do sprožitve zapletene signalizacijske kaskade, ki vodi do vezave bakterijskih fimbrij tipa I na uroplakine in tvorbe znotrajceličnih bakterijskih skupnosti (ang. »intracellular bacterial community« - IBC). Med tvorbo IBC hitro rastoče bakterije v obliki bacilov dozoriijo v počasi rastoče in zelo organizirane skupnosti, ki spominjajo na biofilm. Zreli IBC so sestavljeni iz več tisoč kokoidnih bakterij, ki zavzemajo večino citoplazme epiteljskih celic in povzročijo morfološke spremembe epiteljskih celic. Bakterije se nato ponovno pretvorijo v gibljive bacile, ki se lahko širijo v sosednje epiteljske celice urinarnega trakta (Agarwal in sod., 2012). Bakterije, ki se nahajajo znotraj epiteljskih celic, lahko delujejo tudi kot rezervoar za ponavljajoče se okužbe (Kaper in sod., 2004).

2.4 VIRULENTNI DEJAVNIKI

Čeprav obstaja veliko število različnih virulentnih dejavnikov, lahko vse uvrstimo v eno izmed štirih različnih skupin: adhezine, toksine, sisteme za privzem železa ali dejavnike za izogibanje imunskemu odzivu (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011). Virulentni dejavniki omogočijo kolonizacijo in vdor v gostitelja, izogibanje ali motnje v delovanju imunskega sistema, nastanek poškodb gostiteljevega tkiva in/ali spodbudijo škodljiv prekomerni vnetni odziv (Johnson in Stell, 2000). Zapisi za virulentne dejavnike se pogosto nahajajo na mobilnih genetskih elementih (plazmidih, bakteriofagih, otokih patogenosti (PAI) in transpozonih) (Agarwal in sod., 2012).

2.4.1 Adhezini

Na začetku okužbe imajo najpomembnejšo vlogo adhezini. Poleg njihove primarne vloge, da omogočajo pritrjevanje, lahko delujejo tudi kot invazini, promotorji tvorbe biofilma in prenašalci signala do epitelijskih celic (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011). Adhezine delimo na fimbrijske in nefimbrijske; glede na to, ali se nahajajo na koncu fimbrij ali neposredno na bakterijski površini. Fimbrije so površinski glikoproteini, ki delujejo kot ligandi za glikolipidne in glikoproteinske receptorje na površini epitelijskih celic urinarne poti (Le Bouguénec, 2005). V premeru merijo 5–10 μm , dolge so do 2 μm (Davids in Flood, 2011). Pri pritrjevanju bakterij imajo najpomembnejšo vlogo fimbrije tipa I, P-fimbrije, S-fimbrije in družina adhezinov Afa/Dr. Čeprav imajo bakterije zapise za več različnih fimbrij, le redko izražajo več kot en tip fimbrij hkrati. Kateri tip fimbrij bodo bakterije izražale, je odvisno od signalov iz okolja (Castelain in sod., 2010).

2.4.1.1 Fimbrije tipa I

Sevi *E. coli* za pritrjevanje najpogosteje uporabljajo fimbrije tipa I. Zapise zanje vsebuje velika večina sevov UPEC in tudi številni drugi patogeni ter komenzalni sevi. Vezavo na receptor omogoča protein FimH, ki prepozna manozne ostanke na glikoproteinskih receptorjih gostiteljskih celic. Obstaja več različic proteina FimH. Sevi UPEC imajo FimH, ki se veže na monomanozne in trimanozne ostanke glikoproteinskih receptorjev, medtem

ko protein FimH komenzalnih sevov prepozna le trimanozne ostanke (Bower in sod., 2005).

2.4.1.2 P-fimbrije

Mnoge študije so pokazale, da se zapisi za P-fimbrije pogosteje nahajajo pri sevih UPEC kot pri črevesnih komenzalnih sevih (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011). Izražanje P-fimbrij je še posebej pogosto pri sevih UPEC, ki povzročajo pielonefritis (Wiles in sod., 2008). Pritrditev omogoča adhezin PapG, ki se nahaja na koncu P-fimbrij in se veže na glikolipide gostiteljskih celic (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011). Obstajajo tri različice proteina PapG, ki se vežejo na različne izoreceptorje. PapGII se veže na glikolipid, ki se nahaja na večini celic človeškega urotelija in se pogosto izraža pri sevih, ki povzročajo pielonefritis, medtem ko je PapGIII pogosteje izražen pri sevih, ki povzročajo cistitis. Adhezin PapGI se veže na glikolipide, ki se nahajajo predvsem na epitelijskih celicah urinarne poti psov, čeprav so že odkrili različico PapGI na uroteliju človeka (Wiles in sod., 2008).

2.4.1.3 S-fimbrije

S-fimbrije so značilne predvsem za seve, ki povzročajo UTI in meningitis pri novorojenčkih. Adhezina SfaI in SfaII se vežeta na ostanke sialične kisline na glikoproteinskih receptorjih, ki so prisotni na epitelijskih celicah in zunajceličnem matriksu (Hacker in sod., 1993). Študije so pokazale, da sevi *E. coli*, ki povzročajo UTI, pogosteje vsebujejo zapise za S-fimbrije kot črevesni komenzalni sevi (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011).

2.4.1.4 Afa/Dr

V družino adhezinov Afa/Dr spadajo fimbrijski adhezini (Dr, Dr-II in F1845) in nefimbrijski adhezini (AFA-I in AFA-II). Receptor za družino adhezinov Afa/Dr je beljakovina DAF (ang. »decay accelerating factor«), ki ima vlogo zaščite gostiteljevega tkiva pred citotoksičnimi vplivi aktivacije komplementa. Vsi adhezini te družine imajo podobno gensko organizacijo – operon, ki je sestavljen iz vsaj petih genov. Geni *draA*, *draB*, *draC* in *draD* (*afa*, *afaB*, *afaC* in *afaD*) imajo zapise za podporne beljakovine in so

močno ohranjeni pri vseh adhezinih iz te družine, medtem ko se samo gen *dra* (*afaE*), ki vsebuje zapis za adhezinsko molekulo, razlikuje (Wroblewska-Seniuk in sod., 2005).

2.4.2 Toksini

Pomembno vlogo v patogenezi bakterij imajo toksini. Patogeni sevi *E. coli* vsebujejo zapise za številne različne toksine, med katerimi sta za seve UPEC najbolj značilna toksina alfa hemolizin (HlyA) in citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (CNF1) (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011). Za razliko od številnih drugih patogenih bakterij, ki za vnos toksinov v gostiteljsko celico uporabljajo sistem izločanja tipa III, sevi UPEC običajno uporabljajo sistem izločanja tipa I ali V (Wiles in sod., 2008).

2.4.2.1 CNF1

Citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (CNF1) je 115 kDa velik A–B toksin. Katalitična podenota A se nahaja na C-terminalnem delu, podenota B, ki omogoča vezavo na gostiteljsko celico, pa se nahaja na N-terminalnem delu. Zapis za CNF1 vsebuje približno ena tretjina sevov UPEC. Tarča CNF1 so trije proteini iz družine Rho, in sicer: RhoA, Rac1 ter Cdc42. CNF1 povzroči, da so ti proteini neprestano aktivni, kar vodi do sprememb v celičnem citoskeletu, nastanka večjedrnih celic velikank in nekroze celic (Kouokam in sod., 2006).

2.4.2.2 HlyA

Podatki različnih študij kažejo, da zapis za alfa hemolizin (HlyA) vsebuje 25–56 % sevov UPEC. HlyA na krvnem agarju okoli kolonij tvori velike cone hemolize. Spada v družino toksinov RTX (ang. »repeat in toxin«) in tvori pore v celični membrani eritrocitov, levkocitov in ledvičnih tubularnih celic (Kerényi in sod., 2005). Glavna vloga toksina HlyA naj bi bila poškodba gostiteljskih celic, kar omogoča sproščanje železa in hranil, potrebnih za bakterijsko rast. Vendar novejša študija kažejo, da lahko toksin HlyA v nizkih koncentracijah deluje tudi tako, da spremeni signalne poti gostiteljskih celic, ki imajo pomembno vlogo pri celičnem ciklu, metabolizmu celice, vezikularnem transportu in preživetju celic (Wiles in sod., 2008).

2.4.2.3 Usp

Kurazono in sod. so leta 2000 naključno odkrili gen, ki vsebuje zapis za uropatogeni specifični protein (Usp). Odkrili so ga v študiji, v kateri so iskali gene, homologne genom zot (ang. »zonula occuldens toxin«) pri *Vibrio cholerae*. Na mišjem modelu je bilo dokazano, da Usp poveča infektivnost sevov *E. coli*. Zapis za Usp se nahaja na majhnem (42 kbp) otoku patogenosti in ga v svojem genskem zapisu bistveno pogosteje vsebujejo sevi UPEC, ki povzročajo UTI kot sevi, ki so izolirani iz blata zdravih ljudi (Nakano in sod., 2001).

2.4.2.4 IbeA

Protein IbeA spada med virulentne dejavnike, značilne za seve ExPEC. Prvič so ga odkrili pri sevu *E. coli*, ki povzroča meningitis pri novorojenčkih. Spada med invazine, ki sevom *E. coli* omogočajo vdor v endotelijske celice krvno-možganske pregrade. Genski zapis za protein IbeA je pogosto prisoten tudi pri sevih, ki povzročajo cistitis in/ali pielonefritis (Cortes in sod., 2008).

2.4.3 Sistemi za privzemanje železa

Ker je železo nujno potreben kofaktor v številnih metabolnih poteh, so bakterije razvile specializirane sisteme za privzemanje železa. Najbolj znani so siderofori, ki jih bakterije izločajo v okolje in imajo visoko afiniteto za Fe^{+3} ione. Receptorji in porinom podobni transporterji omogočajo prenos sideroforov z vezanim železom skozi bakterijske membrane v citosol, kjer se železo sprosti (Wiles in sod., 2008). Bakterije lahko sprejemajo tudi siderofore, ki jih v zunajcelično okolje izločajo druge bakterije in celo glive (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011). Sevi *E. coli* najpogosteje izločajo siderofor imenovan enterobaktin. Zapis zanj vsebujejo tako komenzalni kot tudi patogeni sevi *E. coli*. Sevi ExPEC poleg enterobaktina izločajo tudi številne druge sideroforje kot so salmohelin, jersiniabaktin in aerobaktin (Wiles in sod., 2008).

Pomembno vlogo pri pridobivanju železa imajo tudi avtotransporterski proteini kot je hemoglobinaska proteaza (Hbp). Hbp veže hemoglobin, ga razgradi in veže sproščen hem.

Gen za Hbp se nahaja na plazmidu pCoIV-K30, ki so ga doslej izolirali le pri patogenih sevih (Otto in sod., 1998).

2.4.4 Dejavniki za izogibanje imunskemu odzivu

Patogene bakterije za izmikanje gostiteljevemu imunskemu odzivu uporabljajo širok spekter različnih virulentnih dejavnikov, od polisaharidnih kapsul, determinant odpornosti proti serumu do modulatorjev imunskega odziva (Kaper in sod., 2004).

Kapsule so sestavljene iz urejenih plasti zunajceličnih polisaharidov, ki obdajajo bakterijsko celico. Kapsule ščitijo patogene bakterije pred opsonizacijo s protitelesi in fagocitozo ter preprečujejo aktivacijo komplementa (Roberts in sod., 1995). Za komenzalne seve *E. coli* so značilne kapsule iz skupine 1 z veliko molekulsko maso in nizko gostoto naboja, medtem ko so za seve ExPEC značilne kapsule iz skupin 2 in 3, ki imajo nizko molekulsko maso in visoko gostoto naboja na površini. Obstaja velika strukturna raznolikost kapsularnih polisaharidov, saj pri bakteriji *E. coli* poznamo več kot 80 različnih kapsularnih serotipov (Johnson in O'Bryan, 2004). Pri UPEC sevih se najpogosteje pojavljajo K-antigeni K1, K5, K30 in K92 (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011).

Nedavno je bila pri sevih UPEC odkrita beljakovina TcpC, ki vsebuje domeno TIR (Toll/interlevkin-1 receptor) in inhibira delovanje Toll-u podobnih receptorjev (ang. »Toll-like receptors« – TLR). Zaporedja, ki so homologna genu *tcpC*, so odkrili pri 40 % izolatov bolnikov s pielonefritisom, pri 21 % izolatov bolnikov s cistitisom, pri 16 % izolatov bolnikov z asimptomatsko bakteriurijo in le pri 8 % komenzalnih izolatov (Cirl in sod., 2008, Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011).

2.5 ERIC-PCR

Bakterijski genomi so v primerjavi z evkariontskimi genomi mnogo manjši, vendar kljub temu vsebujejo številne družine kratkih (30–150 bp) ponavljajočih se zaporedij. Večina teh zaporedij je značilna za posamezno bakterijsko vrsto ali za zelo sorodne vrste. Do danes je malo znanega o njihovem izvoru, evoluciji in možnih funkcijah. Ker obstajajo tudi bakterijske vrste, ki teh ponavljajočih se elementov ne vsebujejo, ta zaporedja verjetno ne sodelujejo pri pomembnejših življenjskih funkcijah, kot so rast, preživetje ali pomnoževanje DNA. Bakterijska ponavljajoča se zaporedja so ponavadi nepopolni palindromi in lahko tvorijo sekundarne strukture, ki stabilizirajo mRNA (Wilson in Sharp, 2006).

Zaporedja ERIC se od ostalih bakterijskih ponavljajočih se zaporedij razlikujejo po tem, da jih lahko najdemo pri večjem številu bakterijskih vrst, predvsem pri članih iz družin *Enterobacteriaceae* in *Vibrionaceae*. So nepopolni palindromi, dolgi 127 bp, čeprav so bila odkrita tudi krajša oz. daljša zaporedja ERIC. Najprej so jih odkrili pri *E. coli* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Wilson in Sharp, 2006). Razvili so začetne oligonukleotide za pomnoževanje z verižno reakcijo s polimerazo, ki se nalegajo na jedro zaporedja ERIC v nasprotni smeri tako, da se pomnožujejo deli genoma med dvema bližnjima zaporedjema ERIC (Versalovic in sod., 1991). Ker se število zaporedij ERIC v genomu posameznih vrst oziroma sevov razlikuje, metoda ERIC-PCR omogoča pridobivanje specifičnih DNA-prstnih odtisov, značilnih za posamezno bakterijsko vrsto oz. sev (Chulain in sod., 2006).

Številne študije so pokazale, da lahko z metodo ERIC-PCR pridobimo DNA-prstne odtise tudi pri organizmih, za katere ni znano, da bi v genomu imeli zapise zaporedij ERIC. To so do sedaj uspeli dokazati pri članih iz bakterijskih rodov *Rhizobium*, *Frankia*, *Staphylococcus*, *Legionella*, *Xanthomonas* in *Pseudomonas* ter pri glivah iz rodov *Aspergillus* in *Fusarium*. Ti rezultati kažejo na to, da se začetni oligonukleotidi vežejo nespecifično na naključna mesta v genomu in da metoda ERIC-PCR lahko deluje tudi po principu naključno pomnoženih fragmentov (ang. »random amplification of polymorphic DNA« – RAPD) (Gillings in Holley, 1996).

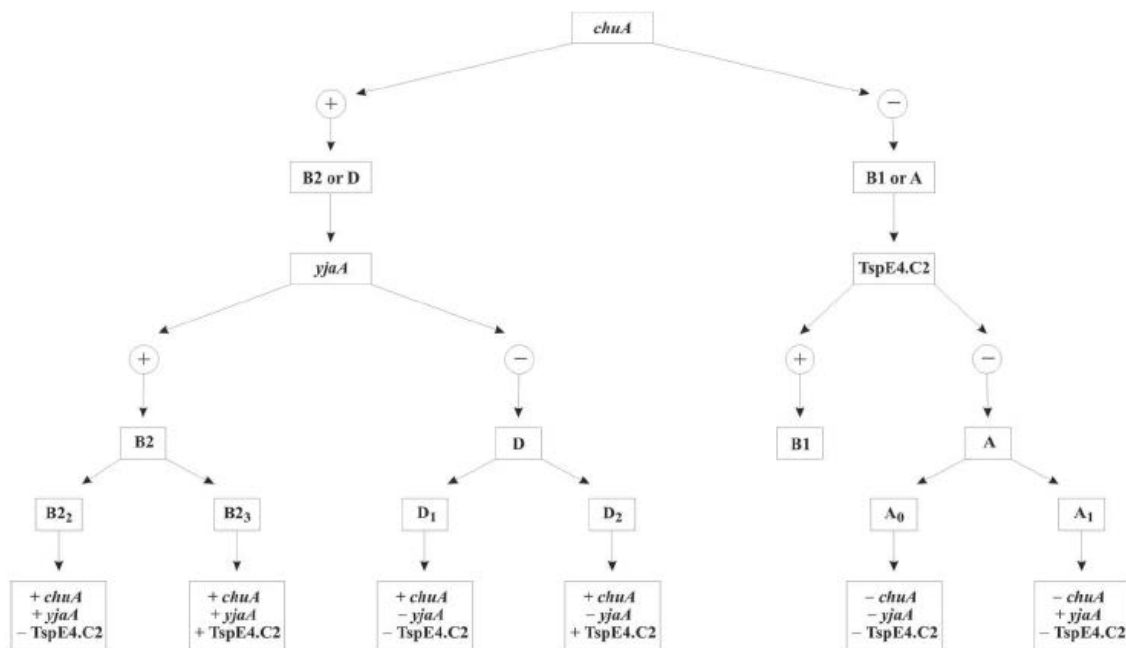
2.6 FILOGENETSKE SKUPINE

Seve *E. coli* lahko uvrstimo v štiri glavne filogenetske skupine (A, B1, B2 in D). Komenzalni sevi običajno spadajo v skupini A in B1, večina enteropatogenih sevov spada v skupino D, medtem ko se v skupini B2 nahajajo predvsem sevi, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe (Subarinath in sod., 2011).

Sevi iz različnih filogenetskih skupin se med sabo razlikujejo v velikosti genomov in v številu zapisov za virulentne dejavnike. Sevi iz filogenetskih skupin A in B1 imajo v primerjavi s sevi iz filogenetskih skupin B2 in D manjše genome in manj zapisov za virulentne dejavnike (Carlos in sod., 2010).

Razvrščanje sevov v različne filogenetske skupine z metodo verižne reakcije s polimerazo temelji na dokazovanju prisotnosti določenih genov oziroma fragmentov DNA: gena *chuA*, ki je potreben za transport hema v enterohemoragični O157:H7 *E. coli* in gena *yjaA* ter fragmenta TSPE4.C2, ki zaenkrat še nimata znane funkcije (Clermont in sod., 2000).

Gen *chuA* je prisoten pri sevih iz skupin B2 ter D in odsoten pri sevih iz skupin A ter B1. Gen *yjaA* omogoča razlikovanje med skupinama B2 (gen *yjaA* prisoten) in D (gen *yjaA* odsoten). Filogenetski skupini B1 in A lahko ločimo s pomočjo fragmenta TSPE4.C2, ki je prisoten v skupini B1 in odsoten v skupini A (Clermont in sod., 2000). Kot je prikazano na **Sliki 1**, lahko seve na podoben način uvrstimo še v šest različnih podskupin: A₀, A₁, B2₂, B2₃, D₁ in D₂.



Slika 1: Shematski prikaz določevanja filogenetskih skupin in podskupin glede na prisotnost oziroma odsotnost specifičnih produktov PCR (Starčič Erjavec in Žgur-Bertok, 2011).

Novejše študije se ukvarjajo z razširjenostjo glavnih filogenetskih skupin pri sevih *E. coli*, izoliranih iz blata človeka in različnih živali. Gordon in Cowling (2003) sta v svoji študiji ugotovila, da je pogostost določene filogenetske skupine pri sesalcih odvisna od tipa prehrane, telesne mase in morfologije prebavnega trakta gostitelja. Pri pticah in karnivornih sesalcih, ki imajo relativno preprosto zgradbo prebavnega trakta, prevladuje filogenetska skupina B1. Pri omnivorih in herbivorih, ki imajo za razliko od karnivorov dobro razvito slepo črevo, pa prevladuje filogenetska skupina B2. Podobno študijo so naredili tudi Carlos in sod. (2010), ki so prav tako dokazali, da filogenetske skupine med različnimi gostitelji niso razporejene naključno. Obstajala naj bi podobnost v populacijski strukturi *E. coli* pri ljudeh in prašičih (monogastrični omnivori, pri katerih prevladuje filogenetska skupina A) ter pri kravah, kozah in ovcah (herbivorni prežvekovalci, pri katerih prevladuje filogenetska skupina B1). Ker so si rezultati različnih študij glede prevladujočih filogenetskih skupin pri različnih gostiteljih med sabo nasprotujoči, bo v prihodnje potrebno opraviti še več študij, ki bodo dale bolj jasno sliko o razširjenosti posameznih filogenetskih skupin pri različnih gostiteljih.

2.7 ANTIBIOTIKI

Antibiotiki so naravne spojine, ki jih tvorijo glive in bakterije. Na druge mikroorganizme delujejo tako, da jih ubijejo ali preprečujejo njihovo rast. Čeprav so v naravi odkrili veliko število različnih antibiotikov, je manj kot 1 % le-teh klinično uporabnih (Madigan in sod., 2003). Kemoterapevtiki so protimikrobna zdravila, ki so izdelana s sintezo ali kemijsko modifikacijo naravnega antibiotika. Obe metodi izboljšata njihove protimikrobne in farmakološke lastnosti. Sodobni antibiotiki so večinoma kemoterapevtiki (Kotnik, 2002).

Antibiotike lahko glede na način delovanja razdelimo v štiri skupine, in sicer:

- antibiotiki, ki zavirajo sintezo celične stene;
- antibiotiki, ki preprečujejo normalno delovanje celične membrane;
- antibiotiki, ki preprečujejo sintezo beljakovin (zavirajo transkripcijo ali translacijo);
- antibiotiki, ki zavirajo sintezo nukleinskih kislin.

2.7.1 Antibiotiki, ki zavirajo sintezo celične stene

Bakterijska celična stena je zgrajena iz peptidoglikana, sestavljenega iz verig glikozaminoglikanov, ki so prečno povezane z oligopeptidi. Struktura peptidoglikana se vzdržuje z aktivnostjo encimov transglikozilaz, ki dodajajo disaharidne pentapeptide na že obstoječe glikozaminoglikanske verige in transpeptidaz, ki navzkrižno povežejo oligopeptide sosednjih verig (Brooks in sod., 2010).

Betalaktami in glikopeptidi sta skupini antibiotikov, ki vplivata na specifične korake v sintezi celične stene. Betalaktami (npr. penicilini, karbapenemi in cefalosporini) preprečujejo navzkrižno povezovanje peptidoglikanskih enot. Vežejo se na penicilin vezavne proteine (ang. »penicillin binding proteins« – PBP) in jim preprečujejo izvedbo transpeptidazne reakcije. Na novo nastajajoča celična stena ni več navzkrižno povezana in zato izgubi mehansko trdnost (Kohanski in sod., 2010). Vezava betalaktamskega antibiotika na PBP sproži tudi sproščanje avtolizinov, ki razgradijo že obstoječo celično steno (Madigan in sod., 2003).

Glikopeptidi (vankomicin, teikoplanin) delujejo kot sterični zaviralci sinteze celične stene. Vežejo se na D-alanin D-alanin dipeptid posamezne peptidoglikanske enote in tako preprečijo delovanje transglikozilaz (Kohanski in sod., 2010).

Mehanizem delovanja polimiksinov je podoben delovanju detergentov. Njihovo strukturo predstavlja polikationski peptidni obroč. Delujejo tako, da se vežejo na LPS po Gramu negativnih bakterij in oslabijo kalcijeve ter magnezijeve mostičke, ki omogočajo stabilnost zunanje membrane. Pride do sprememb v prepustnosti zunanje membrane, kar vodi do celične smrti (Zavascki in sod., 2007).

2.7.3 Antibiotiki, ki zavirajo sintezo beljakovin

Antibiotike, ki zavirajo sintezo beljakovin, lahko razdelimo v dve skupini: tiste, ki zavirajo delovanje 50S-ribosomske podenote, in tiste, ki zavirajo delovanje 30S-ribosomske podenote.

Med zaviralce 50S-ribosomske podenote spadajo makrolidi (npr. eritromicin), linkozamidi (npr. klindamicin), streptogramini (npr. dalfopristin/kvinupristin), amfenikoli (npr. kloramfenikol) in oksazolidinoni (npr. linezolid). Delujejo tako, da bodisi zavirajo iniciacijo translacije beljakovin, bodisi preprečujejo translokacijo peptidil-tRNA, kar preprečuje podaljševanje nastajajoče peptidne verige (Kohanski in sod., 2010).

Med zaviralce 30S-ribosomske podenote spadajo tetraciklini in aminociklitoli. Med aminociklitole spadajo aminoglikozidi (npr. streptomycin, kanamicin in gentamicin) ter spektinomycin. Vežejo se na 16S-rRNA na ribosomski podenoti 30S in preprečujejo podaljševanje peptidne verige. Tetraciklini delujejo tako, da preprečujejo dostop aminoacil-tRNA do ribosoma (Kohanski in sod., 2010).

2.7.4 Antibiotiki, ki zavirajo sintezo nukleinskih kislin

Med zaviralce sinteze nukleinskih kislin spadajo kinoloni, rifampin, sulfonamidi in trimetoprim. Rifampin zavira sintezo RNA. Deluje tako, da se veže na od DNA-odvisno RNA-polimerazo. Vsi kinoloni in fluorokinoloni zavirajo delovanje DNA-giraze (Brooks in sod., 2010). DNA-giraza je encim, ki med podvojevanjem DNA tvori negativne navoje

in na ta način olajša delovanje helikaze (Madigan in sod., 2003). Sulfonamidi preprečujejo sintezo folne kisline, ki spada med osnovne gradnike nukleinskih kislin. Delujejo selektivno, saj bakterije same sintetizirajo folno kislino, evkariontske celice pa so odvisne od zunanjih virov in zato sulfonamidi nanje ne delujejo. Trimetoprim zavira delovanje encima, ki reducira dihidrofolno kislino do tetrahidrofolne kisline. Ta reakcija predstavlja pomemben korak pri sintezi purinov in posledično vpliva na sintezo nukleinskih kislin. Sulfonamide in trimetoprim je mogoče uporabljati tudi v kombinaciji. V tem primeru se učinkovitost obeh antibiotikov poveča in govorimo o sinergizmu (Brooks in sod., 2010).

2.7.5 Odpornost bakterij proti antibiotikom

Odkritje antibiotikov pomeni enega najpomembnejših mejnikov v razvoju in napredovanju medicine. Vendar njihova uporaba ni samo močno zmanjšala smrtnosti zaradi infekcijskih bolezni, ampak je na žalost tudi povzročila pojav vse večjih bakterijskih sevov, ki so odporni (rezistentni) proti posameznim ali celo več različnim antibiotikom (Seme, 2002).

O naravni (intrinzični) odpornosti bakterij proti antibiotikom govorimo takrat, kadar je vsa bakterijska vrsta odporna proti neki skupini antibiotikov. Posamezne bakterijske vrste ali rodovi so naravno odporni proti nekaterim antibiotikom, kadar nimajo tarčnih mest, na katere antibiotiki delujejo. Nekatere vrste bakterij z značilno sestavo celične stene antibiotikom preprečujejo prodor do tarčnega mesta njihovega delovanja.

Pridobljeno odpornost bakterij proti antibiotikom imajo v nasprotju z naravno samo posamezni sevi neke bakterijske vrste ali rodu. Lahko je posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena posamezne bakterijske celice ali pridobitve nove genetske informacije z genskim prenosom iz druge bakterijske celice, predvsem s konjugacijo ali transformacijo (Seme, 2002).

Poznamo pet osnovnih mehanizmov bakterijske odpornosti proti antibiotikom, in sicer:

- sprememba tarčnega mesta oziroma prijemališča antibiotika (npr. sprememba penicilin vezavnih beljakovin);

- encimska razgradnja antibiotika (npr. razgradnja betalaktamskih antibiotikov z betalaktamazami);
- neprepustnost oziroma zmanjšana prepustnost celične membrane za antibiotik (npr. zmanjšana prepustnost za betalaktamske antibiotike zaradi spremembe porinov v celični steni po Gramu negativnih bakterij);
- sprememba presnovne poti, na katero deluje antibiotik (npr. preprečena sinteza timina v bakterijski celici povzroči odpornost proti sulfonamidom in trimetoprimu);
- aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice z aktivnim prenosom (npr. odpornost po Gramu pozitivnih bakterij proti tetraciklinom) (Seme, 2002).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

3.1.1.1 Goveji sevi

V magistrsko nalogo je bilo vključenih 23 vzorcev govejih iztrebkov, ki so prikazani v **Preglednici 1**. Vzorčenje je potekalo 7. 4. 2012 na kmetiji Gošnik v Slovenskih Konjicah. Iz teh vzorcev smo pregledali 115 izolatov *E. coli*. 59 izolatov izvira iz zbirke govejih izolatov Skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, ki so bili pridobljeni v času od 20. 12. 2007 do 1. 2. 2008. Podatki o teh izolatih se nahajajo v **Prilogi A**.

Preglednica 1: Podatki o vzorcih govejih iztrebkov, pridobljenih na kmetiji Gošnik.

Vzorec	Datum vzorčenja	Kraj	Žival	Oznaka živali
1	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Krava	6837
2	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Krava	6831
3	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Krava	8025
4	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Krava	3116
5	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	574438
6	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	574447
7	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	574431
8	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	574432
9	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	574442
10	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	574441
11	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	574430
12	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	690361
13	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Krava	2118
14	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	616222
15	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	602467
16	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	602495
17	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	600780

Se nadaljuje

Nadaljevanje **Preglednice 1**: Podatki o vzorcih govejih iztrebkov, ki so bili pridobljeni na kmetiji Gošnik.

Vzorec	Datum vzorčenja	Kraj	Žival	Oznaka živali
18	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	616202
19	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	574435
20	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	574429
21	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Bik	574444
22	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Krava	5960
23	07. 04. 2012	Kmetija Gošnik	Krava	5967

3.1.1.2 Človeški komenzalni sevi

Uporabljeni človeški komenzalni sevi spadajo v zbirko BJ Skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Zbirka je bila narejena v času od 01.03. do 04.09.2009 in vsebuje 90 izolatov *E. coli*, izoliranih iz blata zdravih ljudi. Vsi podatki o človeških komenzalnih sevih iz zbirke BJ, ki smo jih uporabili pri našem magistrskem delu, so prikazani v **Prilogi C**. Ti podatki izhajajo iz diplomskega dela Manuele Čitar oz. iz podatkov, ki so dostopni na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.1.1.3 Pozitivni kontrolni bakterijski sevi

Pozitivne kontrole, ki smo jih uporabili v verižni reakciji s polimerazo, spadajo v zbirko človeških komenzalnih sevov (zbirka BJ) Skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Preglednica 2: Pozitivne kontrole, ki smo jih uporabili za verižno reakcijo s polimerazo.

Gen oz. fragmenet	Pozitivna kontrola
Filogenija	BJ97
<i>papGIII</i>	BJ32
<i>papGII</i>	BJ60
<i>sfaDE</i>	BJ19
<i>afa/draBC</i>	BJ54
<i>cnf1</i>	BJ33
<i>hlyA</i>	BJ27
<i>usp</i>	BJ10
<i>iucD</i>	BJ53
<i>tcpC</i>	BJ57
<i>ibeA</i>	BJ19
<i>fimH</i>	BJ45
<i>fyuA</i>	BJ30
<i>ireA</i>	BJ60
<i>iha</i>	BJ2
<i>hbp</i>	BJ20
<i>kpsMT</i>	BJ36

3.1.2 Gojišča

3.1.2.1 Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)

Za pripravo tekočega gojišča LB smo v deionizirani vodi raztopili 25 g/L osnove za gojišče LB (0,5 % kvasni ekstrakt, 1 % tripton, 1 % NaCl). Gojišče smo dobro premešali na magnetnem mešalu in odpipetirali 5 mL gojišča v epruvete. Gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C.

3.1.2.2 Priprava trdnih gojišč LB v petrijevkah

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

3.1.2.3 Priprava trdnih gojišč LB z dodanim antibiotikom

Trdna gojišča LB z dodanim antibiotikom smo pripravili po enakem postopku kot trdna gojišča LB, le da smo ohlajenemu gojišču po avtoklaviranju dodali ustrezno količino antibiotika (glej **Preglednico 3**) in razlili v sterilne plastične petrijevke.

Preglednica 3: Končne koncentracije posameznih antibiotikov v gojišču LB.

Antibiotik	Koncentracija
ampicilin	100 µg/mL
tetraciklin	10 µg/mL
nalidiksična kislina	5 µg/mL
streptomycin	100 µg/mL

3.1.2.4 Priprava trdnih gojišč MacConkey-agar

Za pripravo gojišč MacConkey-agar smo v deionizirani vodi raztopili 50 g/L agarja MacConkey. Gojišče smo dobro premešali na magnetnem mešalu in sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 55 °C, smo ga razlili v sterilne plastične petrijevke.

3.1.2.5 UriSelect™ 4

Pri delu smo uporabili tudi že pripravljeno selektivno gojišče UriSelect. To gojišče omogoča rast različnim urinarnim patogenim bakterijam, ki jih lahko ločimo na podlagi barve in oblike zraslih kolonij. Kolonije *E. coli* so na tem gojišču obarvane roza.

3.1.3 Kemikalije

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemčija

- agaroz

Fermentas, Vilna, Litva

- pufer za *Taq*-polimerazo z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- mešanica dNTP-jev (10 mM)
- MgCl_2 (25 mM)
- nanašalni elektroforezni pufer
- standardna DNA-lestevica 50 bp (velikosti fragmentov v bp: 1000, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, **250**, 200, 150, 100 in 50 bp)
- standardna DNA-lestevica 100 bp (velikosti fragmentov v bp: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100 bp)
- standardna DNA-lestevica 1 kbp (velikosti fragmentov v bp: 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250 bp)

Merck, Darmstadt, Nemčija

- MacConkey agar

Polichimica s.r.l. socio unico, Bologna, Italija

- glicerol

SIGMA Chemicals, St. Louis, Missouri, ZDA

- LB (Luria-Broth medium)
- agaroz
- etidijev bromid (10 mg/mL)
- baza TRIS
- EDTA

3.1.4 Encimi

Fermentas, Vilna, Litva

- DNA-polimeraza *Taq* (5 U/ μ L)

3.1.5 Začetni oligonukleotidi

Jena Bioscience GmbH, Jena, Nemčija

- ERIC 1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3')
- ERIC2 (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3')
- papG_II r (5'-CGGGCCCCCAAGTAACTCG-3')
- papG_II f (5'-GGGATGAGCGGGCCTTTGAT-3')
- SFA-1 (5'-CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC-3')
- SFA-2 (5'-CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA-3')
- afa/draBC-f (5'-GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC-3')
- afa/draBC-r (5'-CCCGTAACGCGCCAGCATCTC-3')
- hlyA.1 (5'-AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT-3')
- hlyA.2 (5'-ACCATATAAGCGGCTATTCCCGTCA-3')
- N6 (5'-ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT-3')
- N7 (5'-CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT-3')
- tcpC-for (5'-GGCAACAATATGTATAATATCCT-3')
- tcpC-rev (5'-GCCCAGTCTATTTCTGCTAAAGA-3')
- Ibe10f (5'-AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC-3')
- Ibe01r (5'-TGGTGCTCCGGCAAACCATGC-3')
- FimH1 (5'-CAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG-3')
- FimH2 (5'-TGCGTACCAGCATTAGCAATGTCC-3')
- fyuA 1 (5'-TGATTAACCCCGCGACGGGAA-3')
- fyuA 2 (5'-CGCAGTAGGCACGATGTTGTA-3')
- ireA f (5'-TGGTCTTCAGCTATATGG-3')
- ireA r (5'-ATCTATGATTGTGTTGGT-3')
- iha f (5'-CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA-3')
- iha r (5'-TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA-3')

- Hbp f (5'-GGTGAAGGTACGCTGACGGT-3')
- Hbp r (5'-GCGTGACGCTGGAGTTATCT-3')
- kpsMT II f (5'-GCGCATTTGCTGATACTGTTG-3')
- kpsMT II r (5'-CATCCAGACGATAAGCATGAGCA-3')
- ChuA. 1 (5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3')
- ChuA. 2 (5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3')
- YjaA.1 (5'-TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG-3')
- YjaA.2 (5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3')
- TspE4C2.1 (5'-GAGTAATGTCTGGGGCATTCA-3')
- TspE4C2.2 (5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3')

Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, ZDA

- CNF1-1 (5'-CTGACTTGCCGTGGTTTAGTCGG-3')
- CNF1-2 (5'-TACACTATTGACATGCTGCCCCGGA-3')
- Aer1 (5'-TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT-3')
- Aer2 (5'-AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG-3')
- papG_III r (5'-GGCCTGCAATGGATTACCTGG-3')
- papG_III f (5'-CCACCAAATGACCATGCCAGAC-3')

3.1.6 Oprema

Seznam opreme, ki smo jo uporabili pri delu:

- rotacijski stresalnik (Infors HT, Bottmingen, Švica);
- avtomatske pipete Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- namizna centrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- elektroforeza 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma, Stockholm, Švedska);
- tehnika KERN PFB (Balingen-Frommern, Nemčija);
- UV luč 2011 Macrovue (LKB Bromma, Stockholm, Švedska);
- aparatura za PCR:
 - GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Ontario, Kanada);

- Biometra UNO II (Biometra, Göttingen, Nemčija);
- vroča kopel LBB – »Multi temp II« (Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, ZDA).

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje izolatov

Vse izolate smo gojili na trdnih gojiščih LB in MacConkey-agar ter tekočih gojiščih LB. Inkubirali smo jih preko noči pri 37 °C, tekoča gojišča smo inkubirali preko noči na stresalniku pri enaki temperaturi.

3.2.2 Preverjanje izolatov

Vzorce govejih iztrebkov smo najprej nacepili na plošče MacConkey-agar. Temno vijolične kolonije smo še enkrat precepili na MacConkey-agar in nato še na gojišče LB, da smo dobili čisto kulturo. Za preverjanje izolatov smo posamezne kolonije napikirali na selektivno gojišče UriSelect, kjer so bile kolonije *E. coli* obarvane roza. Za dokončno potrditev izolatov smo naredili še test za indol, ki je pri bakteriji *E. coli* pozitiven.

3.2.3 Preverjanje občutljivosti za antibiotike

Občutljivost sevov za antibiotike smo preverili tako, da smo vsak sev s cepilno zanko nanegli na trdno gojišče LB z dodanim antibiotikom (ampicilin, tetraciklin, nalidiksična kislina in streptomycin). Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C in naslednji dan preverili rast sevov.

3.2.4 Shranjevanje bakterijske kulture

Izolate smo nacepili v tekoč LB in jih inkubirali na stresalniku preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo odpipetirali 0,75 mL prekonočne kulture in dodali 0,75 mL 30 % glicerola v tekočem gojišču LB. Vsebino smo dobro premešali in kriovialke shranili pri – 80 °C.

3.2.5 Priprava lizatov

Seve smo preko noči gojili v tekočem LB na stresalniku pri 37 °C. Drugi dan smo odpipetirali 1 mL prekonočne bakterijske kulture v mikrocentrifugirko in centrifugirali v mikrocentrifugi 1 minuto pri 14 000 obratih na minuto. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v 200 µL sterilne destilirane vode. Suspenzijo smo nato inkubirali 10 minut pri 100 °C. Po inkubaciji smo mikrocentrifugirko centrifugirali 10 minut pri 14 000 obratih na minuto. Nato smo v svežo mikrocentrifugirko prenesli 150 µL supernatanta in do uporabe shranili pri – 80 °C.

3.2.6 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo je metoda, ki omogoča pomnoževanje DNA. Reakcija poteka v treh stopnjah. Najprej poteče denaturacija pri 90–97 °C, pri čemer se dvoverižna DNA razklene in dobimo enoverižno DNA. Nato sledi znižanje temperature in prileganje začetnih oligonukleotidov na matrično DNA. Temperatura prileganja je običajno 3–5 °C pod temperaturo tališča začetnih oligonukleotidov. V zadnji stopnji poteka sinteza komplementarne verige z DNA-polimerazo pri temperaturi, ki je optimalna za uporabljen encim.

3.2.6.1 ERIC-PCR

Reakcijska zmes je vsebovala:

- 26,75 µL sterilne destilirane vode;
- 1 µL začetnega oligonukleotida ERIC 1R (2 pmol/µL);
- 1 µL začetnega oligonukleotida ERIC 2 (2 pmol/µL);
- 1 µL dNTP-jev (10 mM);
- 5 µL pufra za *Taq*-polimerazo brez MgCl₂;
- 5 µL MgCl₂ (25 mM);
- 0,25 µL *Taq*-polimeraze (5 U/ µL);
- 10 µL bakterijskega lizata.

Uporabili smo naslednji PCR-program:

- Začetna denaturacija.....94 °C, 4 min
 - Denaturacija.....94 °C, 30 s
 - Naleganje.....40 °C, 15 s
 - Sinteza DNA.....72 °C, 5 min
 - Zaključna sinteza DNA.....72 °C, 7 min
- } 35 ×

3.2.6.2 Določanje filogenetskih (pod)skupin

Reakcijska zmes je vsebovala:

- 6,1 µL sterilne destilirane vode;
- 1 µL začetnega oligonukleotida ChaA.1 (20 pmol/µL);
- 1 µL začetnega oligonukleotida ChuA.2 (20 pmol/µL);
- 1 µL začetnega oligonukleotida YjaA.1 (20 pmol/µL);
- 1 µL začetnega oligonukleotida YjaA.2 (20 pmol/µL);
- 1 µL začetnega oligonukleotida TspE4C2.1 (20 pmol/µL);
- 1 µL začetnega oligonukleotida TspE4.C2.2 (20 pmol/µL);
- 0,4 µL dNTP-jev (10 mM);
- 2 µL pufra za *Taq*-polimerazo brez MgCl₂;
- 2 µL MgCl₂ (25 mM);
- 0,5 µL *Taq*-polimeraze (5 U/ µL);
- 3 µL bakterijskega lizata.

Uporabili smo PCR-program, ki je prikazan v **Preglednici 4**.

Preglednica 4: Program za pomnoževanje odsekov DNA za določanje filogenetskih (pod)skupin.

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

3.2.6.3 Določanje zapisov za virulentne dejavnike

Reakcijska zmes je vsebovala:

- 13,375 µL destilirane vode;
- 0,5 µL posameznih začetnih oligonukleotidov (20 pmol/µL);
- 0,5 µL dNTP-jev (10 mM);
- 2,5 µL pufra za *Taq*-polimerazo brez MgCl₂;
- 2,5 µL MgCl₂ (25 mM);
- 0,125 µL *Taq*-polimeraze (5 U/µL);
- 5 µL bakterijskega lizata.

Za določanje zapisov za virulentne dejavnike smo uporabili PCR-programe, ki so prikazani v **Preglednici 5**.

Preglednica 5: Programi za določevanje zapisov za virulentne dejavnike.

Posamezen odsek DNA	Začetni oligonukleotidi	Produkt (bp)	Program	Referenca
<i>papGII</i>	PapG_II r papG_II f	190	<u>95 °C 2,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 55 °C 1 min 25× <u>72 °C 30 sec</u> 72 °C 7 min 1×	Johnson in Brown, 1996
<i>papGIII</i>	PapG_III r papG_III f	258	<u>94 °C 2,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 63 °C 30 sec 25× <u>72 °C 3 min</u> 72 °C 10 min 1×	Johnson in Brown, 1996
<i>sfaDE</i>	SFA-1 SFA-2	408	<u>94 °C 3 min 1×</u> 94 °C 2 min 65 °C 1 min 25× <u>72 °C 2 min</u> 72 °C 10 min 1×	Le Bouguenec in sod., 1992
<i>Afa/draBC</i>	afa/draBC-r afa/draBC-f	594	<u>95 °C 4 min 1×</u> 94 °C 30 sec 63 °C 30 sec 25× <u>68 °C 3 min</u> 72 °C 10 min 1×	Johnson in Stell, 2000
<i>cnf1</i>	CNF1-1 CNF1-2	1295	<u>94 °C 4 min 1×</u> 94 °C 1,5 min 59 °C 1,5 min 30× <u>72 °C 2 min</u> 72 °C 5 min 1×	Kuhar in sod., 1998
<i>hlyA</i>	hlyA.1 hlyA.2	1177	<u>95 °C 2,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 64 °C 30 sec 30× <u>72 °C 1,5 min</u> 72 °C 7 min 1×	Yamamoto in sod., 1995

Se nadaljuje

Nadaljevanje **Preglednice 5:** Programi za določevanje zapisov za virulentne dejavnike.

Posamezen odsek DNA	Začetni oligonukleotidi	Produkt (bp)	Program	Referenca
<i>usp</i>	N6 N7	1000	<u>94 °C 2,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 68 °C 1 min 30× <u>72 °C 1 min</u> 72 °C 1 min 1×	Nakano in sod., 2001
<i>iucD</i>	Aer1 Aer2	602	<u>94 °C 4,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 62 °C 30 sec 35× <u>72 °C 50 sec</u> 72 °C 10 min 1×	Yamamoto in sod., 1995
<i>tcpC</i>	tcpC-for tcpC-rev	386	<u>94 °C 4,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 60 °C 30 sec 25× <u>72 °C 1 min</u> 72 °C 10 min 1×	Starčič Erjavec in sod., 2010
<i>ibeA</i>	Ibe10_f IbeA_r	170	<u>94 °C 2,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 63 °C 30 sec 25× <u>72 °C 3 min</u> 72 °C 10 min 1×	Johnson in Stell, 2000
<i>fimH</i>	FimH1 FimH2	461	<u>94 °C 2,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 64 °C 30 sec 30× <u>72 °C 30 sec</u> 72 °C 7 min 1×	Starčič Erjavec in sod., 2011
<i>fyuA</i>	fyuA 1 fyuA 2	785	<u>94 °C 2,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 63 °C 30 sec 25× <u>72 °C 3 min</u> 72 °C 10 min 1×	Johnson in Stell, 2000; Schubert in sod., 1998

Se nadaljuje

Nadaljevanje **Preglednice 5**: Programi za določevanje zapisov za virulentne dejavnike.

Posamezen odsek DNA	Začetni oligonukleotidi	Produkt (bp)	Program	Referenca
<i>ireA</i>	ireA f ireA r	421	<u>94 °C 2,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 55 °C 1 min 25× <u>72 °C 30 sec</u> 72 °C 10 min 1×	Johnson in sod., 2000
<i>iha</i>	iha f iha r	827	<u>94 °C 4 min 1×</u> 94 °C 30 sec 58 °C 30 sec 30× <u>72 °C 1 min</u> 72 °C 8 min 1×	Johnson in sod., 2000
<i>hbp</i>	Hbp f Hbp r	925	<u>94 °C 4,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 65 °C 1 min 35× <u>72 °C 1 min</u> 72 °C 10 min 1×	Starčič Erjavec in sod., 2009
<i>kpsMT</i>	kpsMT_II f kpsMT_II r	270	<u>94 °C 4,5 min 1×</u> 94 °C 30 sec 64 °C 1 min 25× <u>72 °C 30 sec</u> 72 °C 7 min 1×	Johnson in Stell, 2000

3.2.7 Elektroforeza DNA v agaroznem gelu

Gel smo pripravili tako, da smo zatehtali ustrezno količino agaroze (glej **Preglednico 6**) in dodali 30 mL 0,5 × TBE. Erlenmajerico smo segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se agarosa ni popolnoma raztopila. Ko se je erlenmajerica ohladila na približno 60 °C smo dodali še 1,5 µL 10 mg/mL etidijevega bromida. Mešanico smo vlili v pripravljen nosilec za gel in počakali, da gel polimerizira. Nato smo odstranili glavničke, gel prenesli v elektroforezno banjico in ga prelili z ostankom 0,5 × TBE. V jamice smo nanašali 5 µL pomnožkov PCR. Pred nanosom smo le-te zmešali z nanašalnim pufrom v razmerju 5:1. Kot označevalec velikosti fragmentov smo na gel nanесли tudi 3 µL standardne DNA

lestvice 1-kb. Elektroforeza je potekala pri napetosti 110 V. Na koncu smo gele presvetlili z UV svetlobo valovne dolžine 302 nm in rezultate fotografirali.

Preglednica 6: Koncentracija agaroze v gelu, ki je potrebna za uspešno ločitev pomnoženih DNA odsekov.

Koncentracija agaroze v gelu	Velikost DNA, ki se uspešno loči (kbp)
0,3	60–5
0,6	20–1
0,7	10–0,8
0,9	7–0,5
1,2	6–0,4
1,5	4–0,2
2,0	3–0,1

3.2.8 Statistične metode

Rezultate smo statistično obdelali s Fischerjevim eksaktnim testom in z Bonferronijevo korekcijo. Kadar smo za kako povezavo dveh podatkov dobili končno P vrednost manjšo od 0,05, smo povzeli, da je povezava med dvema podatkomata statistično značilna (Langsrud, 2004).

4 REZULTATI

4.1 ERIC-PCR

Z metodo ERIC-PCR smo med 115-imi izolati, pridobljenimi na kmetiji Gošnik v Slovenskih Konjicah, razlikovali 41 različnih sevov. Med 59-imi izolati Skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani pa smo razlikovali 48 različnih sevov. Skupno smo med 174-imi izolati določili 89 različnih ERIC-PCR profilov, ki predstavljajo zbirko govejih sevov AK. Podatki o teh sevih se nahajajo v **Prilogi B**.

4.2 FILOGENETSKE (POD)SKUPINE

Vse seve iz zbirke AK smo s pomočjo filogenetskega PCR razvrstili v filogenetske (pod)skupine. Iz **Preglednice 7** je razvidno, da smo največ sevov uvrstili v skupino B1, kamor smo uvrstili 48 (54 %) sevov. Druga najštevilčnejša skupina je bila filogenetska skupina A. Vanjo smo uvrstili 28 (31 %) sevov, od tega 13 (15 %) v filogenetsko podskupino A₀ in 15 (17 %) v filogenetsko podskupino A₁. V filogenetsko skupino D je bilo uvrščenih 9 (10 %) sevov, in sicer 7 (8 %) sevov v filogenetsko podskupino D₁ in 2 (2 %) seva v filogenetsko podskupino D₂. Najmanj zastopana je bila filogenetska skupina B2, kamor smo uvrstili le 4 (4 %) seve.

Preglednica 7: Število sevov iz zbirke AK v posamezni filogenetski (pod)skupini.

Filogenetska (pod)skupina	Število sevov (%)
A	28 (31)
A ₀	13 (15)
A ₁	15 (17)
B1	48 (54)
B2	4 (4)
B2 ₂	1 (1)
B2 ₃	3 (3)
D	9 (10)
D ₁	7 (8)
D ₂	2 (2)
Skupaj	89 (100)

4.3 VIRULENTNI DEJAVNIKI

4.3.1 Prevalenca virulentnih dejavnikov

Z verižno reakcijo s polimerazo smo preverili prisotnost zapisov za 16 virulentnih dejavnikov. Iz skupine adhezinov smo preverjali prisotnost *papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *fimH* in *iha*, iz skupine toksinov smo preverjali *cnf1*, *hlyA*, *usp* in *ibeA*, iz skupine za privzem železa smo preverjali *iucD*, *fyuA*, *ireA* in *hbp* ter iz skupine za izogibanje imunskemu odzivu smo preverjali *kpsMT* in *tcpC*. Primeri elektroforeznih gelov za posamezne gene so prikazani na slikah, ki so v **Prilogi D**. Iz **Preglednice 8** je razvidno, da smo pri sevih AK našli zapise za 10 virulentnih dejavnikov, medtem ko se vsi pridobljeni rezultati nahajajo v **Prilogi B**.

Pri sevih AK se najpogosteje pojavlja zapis *fimH*, ki smo ga našli kar pri 58 (65 %) sevih. Temu sta sledila *fyuA* s 13 (15 %) in *iucD* z 12 (13 %) pozitivnimi sevi. Gen *hlyA* smo našli pri 8 (9 %) sevih, gen *iha* pa pri 6 (7 %) sevih. Zapis *ibeA* in *kpsMT* so imeli 3 (3 %) sevi, zapise *usp*, *ireA* in *hbp* pa smo našli le pri 1 (1 %) sevu.

Preglednica 8: Prevalenca zapisov za virulentne dejavnike pri sevih iz zbirke AK.

Število oz. prevalenca zapisov virulentnih dejavnikov (N[%])										
	<i>hlyA</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>ibeA</i>	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>ireA</i>	<i>iha</i>	<i>hbp</i>	<i>kpsMT</i>
Število pozitivnih sevov	8	1	12	3	58	13	1	6	1	3
Odstotek pozitivnih sevov	9 %	1 %	13 %	3 %	65 %	15 %	1 %	7 %	1 %	3 %

4.3.2 Število virulentnih dejavnikov po filogenetskih (pod)skupinah

Rezultati iz **Preglednice 9** kažejo, da prevladujejo sevi, ki imajo malo zapisov preučevanih virulentnih dejavnikov. 64 (72 %) sevov AK je imelo zapis za vsaj enega ali več virulentnih dejavnikov. Od teh jih je največ, 41 (44 %) sevov, imelo zapis za en virulentni dejavnik. Največ zapisov za virulentne dejavnike sta imela 2 (2 %) seva, ki sta imela zapise za 6 različnih virulentnih dejavnikov. 25 (27 %) sevov AK ni imelo zapisa za noben virulentni dejavnik.

Preglednica 9: Prevalenca sevov iz zbirke AK glede na število zapisov za virulentne dejavnike po filogenetskih (pod) skupinah.

št. VD	Prevalenca (N[%])				
	A n=28	B1 n=48	B2 n=4	D n=9	Vsi sevi AK n=89
0	13 (46)	10 (19)	0 (0)	2 (22)	25 (27)
1	13 (46)	23 (44)	2 (50)	3 (33)	41 (44)
2	2 (7)	10 (19)	0 (0)	0 (0)	12 (13)
3	0 (0)	4 (8)	0 (0)	4 (44)	8 (9)
4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
5	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	1 (1)
6	0 (0)	1 (2)	1 (25)	0 (0)	2 (2)
povp. št. VD	0,6	1,3	3,3	1,7	1,2

V povprečju so imeli sevi AK 1,2 zapisa za virulentne dejavnike. Največ zapisov za virulentne dejavnike so imeli sevi iz filogenetske skupine B2 (v povprečju 3,3 zapisa) in

filogenetske skupine D (v povprečju 1,7 zapisa). Vendar ti rezultati zaradi majhnega števila sevov v teh dveh filogenetskih skupinah verjetno niso reprezentativni. V filogenetskih skupinah A in B1, ki vsebujeta večje število sevov, so sevi v povprečju vsebovali 0,6 oz. 1,3 zapisa za virulentne dejavnike.

4.3.3 Porazdelitev virulentnih dejavnikov glede na filogenetske (pod)skupine

Iz **Preglednice 10** je razvidno, da so imeli sevi iz filogenetske skupine B1 največ zapisov za različne virulentne dejavnike. Pri teh sevih smo našli zapise za 8 različnih (*hlyA*, *iucD*, *ibeA*, *fimH*, *fyuA*, *ireA*, *iha* in *kpsMT*) virulentnih dejavnikov, vendar je bila samo povezava z zapisom *fimH* statistično značilna ($P = 0,0143$). Zapis *fimH* je statistično značilno povezan tudi s filogenetsko skupino A ($P = 0,0167$). Poleg zapisa *fimH* smo pri sevih iz filogenetske skupine A odkrili še zapise *iucD*, *fyuA* in *hbp*, vendar so ti rezultati statistično neznačilni. V filogenetski skupini B2 smo našli zapise *hlyA*, *iucD*, *ibeA*, *fimH*, *fyuA* in *kpsMT*. Izmed le-teh so s filogenetsko skupino B2 statistično značilno povezani zapisi *hlyA*, *ibeA*, *fyuA* in *kpsMT*. Zapisi *hlyA*, *iucD*, *ibeA* in *kpsMT* so statistično značilno povezani tudi s filogenetsko podskupino B2₃. V filogenetski skupini D smo odkrili le štiri različne zapise za virulentne dejavnike: *usp*, *iucD*, *fimH* in *iha*. Od teh sta *iucD* in *iha* statistično značilno povezana tako s filogenetsko skupino D kot tudi s filogenetsko podskupino D₁. Filogenetska podskupina D₂ je edina skupina, pri kateri nismo našli nobenega zapisa za virulentne dejavnike.

Zaradi velikega števila primerjav smo izvedli še Bonferronijevo korekcijo, ki zmanjša število lažno pozitivnih rezultatov. Ob upoštevanju novih P-vrednosti so statistično značilne ostale le še štiri povezave: zapis *iha* je statistično značilno povezan tako s filogenetsko skupino D ($P = 0,0112$), kot tudi s filogenetsko podskupino D₁ ($P = 0,0032$), filogenetska podskupina B2₃ pa je statistično značilno povezana z zapisoma *ibeA* ($P = 0,0368$) in *kpsMT* ($P = 0,0368$).

Preglednica 10: Porazdelitev virulentnih dejavnikov glede na filogenetske skupine.

Prevalenca (N[%]) sevov													
Filogenetska skupina													
VD	A	P	P (Bonferroni)	B1	P	P (Bonferroni)	B2	P	P (Bonferroni)	D	P	P (Bonferroni)	Skupaj
<i>papGII</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)
<i>papGIII</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)
<i>sfaDE</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)
<i>afa/draBC</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)
<i>cnfI</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)
<i>hlyA</i>	0 (0)	0,0525	0,84	6 (13)	0,2790	4,464	2 (50)	0,0390	0,624	0 (0)	1,0000	16	8 (9)
<i>usp</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	0,4607	7,3712	0 (0)	1,0000	16	1 (11)	0,1011	1,6176	1 (1)
<i>iucD</i>	2 (7)	0,3260	5,216	4 (8)	0,2120	3,392	2 (50)	0,0862	1,3792	4 (44)	0,0172	0,2752	12 (13)
<i>tcpC</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)
<i>ibeA</i>	0 (0)	0,5488	8,7808	1 (2)	0,5925	9,48	2 (50)	0,0045	0,072	0 (0)	1,0000	16	3 (3)
<i>fimH</i>	13 (46)	0,0167	0,2672	37 (77)	0,0143	0,2288	2 (50)	0,6082	9,7312	6 (67)	1,0000	16	58 (65)
<i>fyuA</i>	1 (4)	0,0554	0,8864	9 (19)	0,3672	5,8752	3 (75)	0,0092	0,1472	0 (0)	0,3463	5,5408	13 (15)
<i>ireA</i>	0 (0)	1,0000	16	1 (2)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	1 (1)
<i>iha</i>	0 (0)	0,1710	2,736	2 (4)	0,4081	6,5296	0 (0)	1,0000	16	4 (44)	0,0007	0,0112	6 (7)
<i>hbp</i>	1 (4)	0,3146	5,0336	0 (0)	0,4607	7,3712	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	1 (1)
<i>kpsMT</i>	0 (0)	0,5488	8,7808	1 (2)	0,5928	9,4848	2 (50)	0,0045	0,072	0 (0)	1,0000	16	3 (3)

Opomba: VD – virulentni dejavniki, N – število. Rezultati, ki so statistično značilni, so v preglednici prikazani z rumenim ozadjem. Rezultati, ki so statistično značilni tudi po Bonferronijevi korekciji, so v preglednici prikazani z rdečim ozadjem. Mejna vrednost za statistično značilne rezultate je $P < 0,05$.

Preglednica 11: Porazdelitev virulentnih dejavnikov glede na filogenetske podskupine.

Prevalenca (N [%]) sevov																		
Filogenetska podskupina																		
VD	A0	P	P (Bonf.)	A1	P	P (Bonf.)	B22	P	P (Bonf.)	B23	P	P (Bonf.)	D1	P	P (Bonf.)	D2	P	P (Bonf.)
<i>papGII</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16
<i>papGIII</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16
<i>sfaDE</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16
<i>afa/draBC</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16
<i>cnfI</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16
<i>hlyA</i>	0 (0)	0,5976	9,5616	0 (0)	0,3424	5,4784	0 (0)	1,0000	16	2 (67)	0,0205	0,328	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16
<i>usp</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	1 (14)	0,0787	1,2592	0 (0)	1,0000	16
<i>iucD</i>	0 (0)	0,2011	3,2176	2 (13)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	2 (67)	0,0467	0,7472	4 (57)	0,0056	0,0896	0 (0)	1,0000	16
<i>tcpC</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16
<i>ibeA</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	2 (67)	0,0023	0,0368	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16
<i>fimH</i>	5 (38)	0,0548	0,8768	8 (53)	0,3745	5,992	0 (0)	0,3483	5,5728	2 (67)	1,0000	16	6 (86)	0,4140	6,624	0 (0)	0,1187	1,8992
<i>fyuA</i>	0 (0)	0,2013	3,2208	1 (7)	0,6879	11,0064	1 (100)	0,1461	2,3376	2 (67)	0,0547	0,8752	0 (0)	0,5875	9,4	0 (0)	1,0000	16
<i>ireA</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16
<i>iha</i>	0 (0)	0,5867	9,3872	0 (0)	0,5842	9,3472	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	4 (57)	0,0002	0,0032	0 (0)	1,0000	16
<i>hbp</i>	1 (8)	0,1461	2,3376	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16
<i>kpsMT</i>	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16	2 (67)	0,0023	0,0368	0 (0)	1,0000	16	0 (0)	1,0000	16

Opomba: VD – virulentni dejavniki, N – število. Rezultati, ki so statistično značilni, so v preglednici prikazani z rumenim ozadjem. Rezultati, ki so statistično značilni tudi po Bonferronijevi korekciji, so v preglednici prikazani z rdečim ozadjem. Mejna vrednost za statistično značilne rezultate je $P < 0,05$.

4.4 PRIMERJAVA SEVOV AK IN BJ

4.4.1 Filogenetske (pod)skupine

Preglednica 12 prikazuje zastopanost posameznih filogenetskih (pod)skupin glede na vir seva. Rezultati so bili statistično neznačilni za filogenetske podskupine A₀, A₁, B₂ in D₂ ter filogenetsko skupino A. Tudi po Bonferronijevi korekciji so statistično značilne ostale povezave med sevi BJ in filogenetskima skupinama B2 (P = 0,0004) in D (P = 0,0052) ter filogenetskima podskupinama B₂₃ (P = 0,0004) in D₁ (P = 0,0268). Edina statistično značilna povezava sevov AK z določeno filogenetsko (pod)skupino je povezava s filogenetsko skupino B1 (P = 0,0004).

Preglednica 12: Primerjava sevov AK in sevov BJ glede na uvrstitev v filogenetske (pod) skupine.

Filogenetska (pod)skupina	Št. sevov (%)		P-vrednost	P-vrednost (Bonferroni)
	Sevi AK	Sevi BJ		
A	28 (31)	20 (22)	0,1800	0,72
A ₀	13 (15)	7 (8)	0,1624	0,6496
A ₁	15 (17)	13 (14)	0,6857	2,7428
B1	48 (54)	13 (14)	0,0001	0,0004
B2	4 (4)	30 (33)	0,0001	0,0004
B ₂ ₂	1 (1)	1 (1)	1,0000	4
B ₂ ₃	3 (3)	29 (32)	0,0001	0,0004
D	9 (10)	27 (30)	0,0013	0,0052
D ₁	7 (8)	21 (23)	0,0067	0,0268
D ₂	2 (2)	6 (7)	0,2779	1,1116
Skupaj	89 (100)	90 (100)		

Opomba: rezultati, ki so statistično značilni, so v preglednici prikazani z rumenim ozadjem. Rezultati, ki so statistično značilni tudi po Bonferronijevi korekciji, so v preglednici prikazani z rdečim ozadjem. Mejna vrednost za statistično značilne rezultate je P < 0,05.

4.4.2 Prevalenca virulentnih dejavnikov pri sevih AK in BJ

V **Preglednici 13** je prikazana prevalenca zapisov za virulentne dejavnike pri sevih AK in BJ. Ob upoštevanju Bonferronijeve korekcije smo statistično značilne povezave odkrili pri zapisih *sfaDE*, *usp*, *iucD*, *fimH*, *fyuA*, *ire*, *iha* in *kpsMT*, ki se pogosteje pojavljajo pri sevih

BJ. Sevi AK niso statistično značilno povezani z nobenim zapisom za posamezni virulentni dejavnik.

Preglednica 13: Primerjava prevalence virulentnih dejavnikov pri sevih AK in sevih BJ.

Virulentni dejavnik	Št. sevov (%)		P-vrednost	P-vrednost (Bonferroni)
	Sevi AK	Sevi BJ		
<i>papGII</i>	0 (0)	7 (8)	0,0138	0,2208
<i>papGIII</i>	0 (0)	3 (3)	0,2458	3,9328
<i>sfaDE</i>	0 (0)	15 (17)	0,0001	0,0016
<i>afa/draBC</i>	0 (0)	4 (4)	0,1208	1,9328
<i>cnf1</i>	0 (0)	5 (6)	0,0590	0,944
<i>hlyA</i>	8 (9)	7 (8)	0,7943	12,7088
<i>usp</i>	1 (1)	22 (24)	0,0001	0,0016
<i>iucD</i>	12 (13)	35 (39)	0,0002	0,0032
<i>tcpC</i>	0 (0)	7 (8)	0,0138	0,2208
<i>ibeA</i>	3 (3)	12 (13)	0,0280	0,448
<i>fimH</i>	58 (65)	79 (88)	0,0004	0,0064
<i>fyuA</i>	13 (15)	59 (66)	0,0001	0,0016
<i>ireA</i>	1 (1)	18 (20)	0,0001	0,0016
<i>iha</i>	6 (7)	35 (39)	0,0001	0,0016
<i>hbp</i>	1 (1)	5 (6)	0,2108	3,3728
<i>kpsMT</i>	3 (3)	52 (58)	0,0001	0,0016

Opomba: rezultati, ki so statistično značilni, so v preglednici prikazani z rumenim ozadjem. Rezultati, ki so statistično značilni tudi po Bonferronijevi korekciji, so v preglednici prikazani z rdečim ozadjem. Mejna vrednost za statistično značilne rezultate je $P < 0,05$.

4.4.3 Primerjava zapisov za virulentne dejavnike po filogenetskih (pod)skupinah pri sevih AK in BJ

Iz **Preglednic 14 in 15** je razvidno, da sevi AK iz posamezne filogenetske (pod)skupine niso statistično značilno povezani z nobenim zapisom za posamezni virulentni dejavnik. Vse statistično značilne P-vrednosti ($P < 0,05$) namreč prikazujejo statistično značilne povezave med sevi BJ iz določene filogenetske (pod) skupine in z določenimi zapisi za virulentne dejavnike. Največ statistično značilnih povezav smo opazili pri sevih BJ iz

filogenetske skupine A, saj so ti sevi statistično značilno povezani z zapisi *iucD* ($P = 0,01$), *fyuA* ($P = 0,0061$), *ire* ($P = 0,0249$), *iha* ($P = 0,0091$) in *kpsMT* ($P = 0,0001$). Tudi sevi BJ iz filogenetske podskupine A_0 so statistično značilno povezani z zapisi *iucD* ($P = 0,0307$), *fimH* ($P = 0,0147$) in *kpsMT* ($P = 0,0014$), medtem ko so sevi iz filogenetske podskupine A_1 statistično značilno povezani z zapisoma *fyuA* ($P = 0,0286$) in *iha* ($P = 0,0349$).

Sevi BJ iz filogenetske skupine B1 so statistično značilno povezani z zapisoma *iha* ($P = 0,0157$) in *kpsMT* ($P = 0,0426$), saj so zapis *iha* imeli 4 (31 %) sevi BJ in le 2 (4 %) seva AK, zapis *kpsMT* pa sta imela 2 (15 %) seva BJ in nobeden sev AK iz filogenetske skupine B1.

Zapis *usp* je v filogenetski skupini B2 imelo kar 18 (60 %) sevov BJ in nobeden sev AK. To statistično značilno povezavo sevov BJ z zapisom *usp* potrjuje tudi izračunana P-vrednost (0,0392).

Sevi BJ iz filogenetske skupine D so statistično značilno povezani z zapisoma *fyuA* ($P = 0,0012$) in *kpsMT* ($P = 0,0136$). Tudi sevi BJ iz filogenetske podskupine D_1 so statistično značilno povezani s tema dvema zapisoma, vendar sta izračunani P-vrednosti še nekoliko nižji (0,0069 za zapis *fyuA* in 0,0103 za zapis *kpsMT*).

V filogenetski podskupini D_2 smo odkrili le eno statistično značilno povezavo, in sicer so sevi BJ iz te filogenetske podskupine statistično značilno povezani z zapisom *fimH* ($P = 0,0357$).

Ob upoštevanju Bonferronijeve korekcije so statistično značilne ostale le še tri povezave. Z zapisom *kpsMT* so statistično značilno povezani sevi BJ iz filogenetske skupine A ($P = 0,0016$) in filogenetske podskupine A_0 ($P = 0,0224$). Sevi BJ iz filogenetske skupine D pa so statistično značilno povezani z zapisom *fyuA* ($P = 0,0192$).

Preglednica 14: Primerjava zapisov za virulentne dejavnike po filogenetskih skupinah pri sevih AK in sevih BJ.

Filogen. sk.	Vir seva	Št. sevov (%)															
		<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>cnf1</i>	<i>hlyA</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	<i>ibeA</i>	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>ireA</i>	<i>iha</i>	<i>hbp</i>	<i>kpsMT</i>
A	AK				0 (0)				2 (7)			13 (16)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)
	BJ				1 (5)				8 (40)			15 (75)	7 (35)	4 (20)	5 (25)	1 (5)	9 (45)
	P				0,4167				0,01			0,075	0,0061	0,0249	0,0091	1	0,0001
	P (Bonf.)				6,6672				0,16			1,2	0,0976	0,3984	0,1456	16	0,0016
B1	AK						6 (13)		4 (8)		1(2)	37 (77)	9 (19)	1 (2)	2 (4)	1 (4)	0 (0)
	BJ						0 (0)		0 (0)		0 (0)	13 (100)	6 (46)	0 (0)	4 (31)	0 (0)	2 (15)
	P						0,3258		0,5691		1	0,0997	0,067	1	0,0157	1	0,0426
	P (Bonf.)						5,2128		9,1056		16	1,5952	1,072	16	0,2512	16	0,6816
B2	AK	0 (0)	0 (0)	0 (0)		0 (0)	2 (50)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	2 (50)	2 (50)	3 (75)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (50)
	BJ	4 (13)	3 (10)	15 (50)		5 (17)	6 (20)	18 (60)	16 (53)	7 (23)	12 (40)	26 (87)	29 (97)	8 (27)	11 (37)	3 (10)	28 (93)
	P	1	1	0,1130		1	0,2291	0,0392	1	0,5585	1	0,1347	0,2246	0,5515	0,2799	1	0,0589
	P (Bonf.)	16	16	1,808		16	3,6656	0,6272	16	8,936	16	2,1552	3,5936	8,824	4,4784	16	0,9424
D	AK	0 (0)			0 (0)		0 (0)	1 (11)	4 (44)			6 (67)	0 (0)	0 (0)	4 (44)	0 (0)	0 (0)
	BJ	3 (11)			3 (11)		1 (4)	4 (15)	11 (41)			25 (93)	17 (63)	6 (22)	15 (56)	1 (4)	13 (48)
	P	0,5576			0,5576		1	1	1			0,0876	0,0012	0,3026	0,7060	1	0,0136
	P (Bonf.)	8,9216			8,9216		16	16	16			1,4016	0,0192	4,8416	11,296	16	0,2176

Opomba: rezultati, ki so statistično značilni, so v preglednici prikazani z rumenim ozadjem. Rezultati, ki so statistično značilni tudi po Bonferronijevi korekciji, so v preglednici prikazani z rdečim ozadjem. Mejna vrednost za statistično značilne rezultate je $P < 0,05$.

Preglednica 15: Primerjava zapisov za virulentne dejavnike po filogenetskih podskupinah pri sevih AK in sevih BJ.

Filogenet. Podsk.	Vir seva	Št sevov (%)															
		<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>cnfI</i>	<i>hlyA</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	<i>ibeA</i>	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>ireA</i>	<i>iha</i>	<i>hbp</i>	<i>kpsMT</i>
A ₀	AK								0 (0)			5 (38)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (8)	0 (0)
	BJ								3 (43)			7 (100)	1 (14)	1 (14)	1 (14)	0 (0)	5 (71)
	P								0,0307			0,0147	0,35	0,35	0,35	1	0,0014
	P (Bonf.)								0,4912			0,2352	5,6	5,6	5,6	16	0,0224
A ₁	AK				0 (0)				2 (13)			8 (53)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (50)
	BJ				1 (8)				5 (38)			8 (62)	6 (46)	3 (23)	4 (31)	1 (8)	4 (31)
	P				0,4828				0,185			0,7177	0,0286	0,0873	0,0349	0,4643	0,6703
	P (Bonf.)				7,7248				2,96			11,4832	0,4576	1,3968	0,5584	7,4288	10,7248
B ₂	AK											0 (0)	1 (100)				
	BJ											1 (100)	0 (0)				
	P											1	1				
	P (Bonf.)											16	16				
B ₂ ₃	AK	0 (0)	0 (0)	0 (0)		0 (0)	2 (67)	0 (0)	2 (67)	0 (0)	2 (67)	2 (67)	2 (67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (67)
	BJ	4 (14)	3 (10)	15 (52)		5 (17)	6 (21)	18 (62)	16 (55)	7 (24)	12 (41)	25 (86)	29 (100)	8 (28)	11 (38)	3 (10)	28 (97)
	P	1	1	0,2288		1	0,1468	0,0734	1	1	1	0,4103	0,0938	0,5548	0,5343	1	0,1815
	P (Bonf.)	16	16	3,6608		16	2,3488	1,1744	16	16	16	6,5648	1,5008	8,8768	8,5488	16	2,904
D ₁	AK	0 (0)			0 (0)			1 (14)	4 (57)			6 (86)	0 (0)	0 (0)	4 (57)	0 (0)	0 (0)
	BJ	3 (14)			2 (9)			3 (14)	9 (43)			19 (90)	13 (62)	5 (24)	12 (57)	1 (5)	12 (57)
	P	0,5513			1			1	0,6703			1	0,0069	0,2895	1	1	0,0103
	P (Bonf.)	8,8208			16			16	10,7248			16	0,1104	4,632	16	16	0,1648
D ₂	AK				0 (0)		0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	BJ				1 (17)		1 (17)	1 (17)	2 (33)			6 (100)	4 (46)	1 (17)	1 (17)	3 (50)	1 (17)
	P				1		1	1	1			0,0357	0,4286	1	1	0,4643	1
	P (Bonf.)				16		16	16	16			0,5712	6,8576	16	16	7,4288	16

Opomba: rezultati, ki so statistično značilni, so v preglednici prikazani z rumenim ozadjem. Rezultati, ki so statistično značilni tudi po Bonferronijevi korekciji, so v preglednici prikazani z rdečim ozadjem. Mejna vrednost za statistično značilne rezultate je $P < 0,05$.

4.4.4 Število zapisov za virulentne dejavnike pri sevih AK in BJ

Preglednica 16 prikazuje število zapisov za virulentne dejavnike pri sevih AK in BJ. V povprečju so imeli sevi BJ več zapisov za virulentne dejavnike (4,1) kot sevi AK (1,2). Sevi AK so imeli največ 6 zapisov, medtem ko so sevi BJ imeli največ 10 zapisov za virulentne dejavnike. Rezultati so statistično značilni za seve AK brez zapisov za virulentne dejavnike ter za seve AK s številom virulentnih dejavnikov 1 in 2. Sevi BJ so statistično značilno povezani s sevi s številom virulentnih dejavnikov 4, 5, 7 in 8. Sevi s številom virulentnih dejavnikov 3, 6, 9 in 10 niso statistično značilno povezani niti s sevi AK, niti s sevi BJ.

Preglednica 16: Število zapisov za virulentne dejavnike pri sevih AK in sevih BJ.

Št. VD	Št. sevov (%)		P-vrednost
	AK	BJ	
0	25 (27)	1 (1)	0,0001
1	41 (44)	22 (24)	0,0029
2	12 (13)	3 (3)	0,0160
3	8 (9)	15 (17)	0,1795
4	0 (0)	13 (14)	0,0002
5	1 (1)	11 (12)	0,0048
6	2 (2)	6 (7)	0,2779
7	0 (0)	8 (9)	0,0066
8	0 (0)	7 (8)	0,0138
9	0 (0)	3 (3)	0,2458
10	0 (0)	1 (1)	0,1208
Št. VD/sev	1,2	4,1	

Opomba: VD – virulentni dejavniki. Rezultati, ki so statistično značilni, takrat, ko je $P < 0,05$, so v preglednici prikazani z rumenim ozadjem.

4.4.5 Število zapisov za virulentne dejavnike po posameznih filogenetskih skupinah pri sevih AK in BJ

Preglednica 17 prikazuje število zapisov za virulentne dejavnike za posamezne filogenetske skupine pri sevih AK in BJ. Po opravljeni Bonferronijevi korekciji sta statistično značilni ostali le dve povezavi. Sevi AK iz filogenetske skupine A so statistično značilno povezani s sevi, ki nimajo nobenega zapisa za virulentne dejavnike, saj se je v to skupino uvrstilo kar 13 (46 %) sevov AK in le 1 (5 %) sev BJ. Med sevi iz filogenetske skupine A s 3 zapisi za virulentne dejavnike smo našli 5 (25 %) sevov BJ in nobenega seva AK, kar kaže na statistično značilno večjo prevalenco sevov BJ v tej skupini.

Preglednica 17: Število zapisov za virulentne dejavnike po posameznih filogenetskih skupinah pri sevih AK in sevih BJ.

Filogen. (pod)sk.	Vir seva	Št. VD										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	AK	13 (46)	13 (46)	2 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)				
	BJ	1 (5)	8 (40)	0 (0)	5 (25)	4 (20)	1 (5)	1 (5)				
	P	0,0029	0,7710	0,5035	0,0091	0,0249	0,4167	0,4167				
	P (Bonf.)	0,0116	3,084	2,014	0,0364	0,0996	1,6668	1,6668				
B1	AK	10 (19)	23 (44)	10 (19)	4 (8)	0 (0)		1 (2)				
	BJ	0 (0)	7 (54)	1 (8)	4 (31)	1 (8)		0 (0)				
	P	0,101	0,7622	0,429	0,0555	0,2131		1				
	P (Bonf.)	0,404	3,0488	1,716	0,222	0,8524		4				
B2	AK		2 (50)		0 (0)	0 (0)	1 (25)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	BJ		1 (3)		1 (3)	4 (13)	4 (13)	4 (13)	6 (20)	6 (20)	3 (10)	1 (3)
	P		0,0307		1	1	0,4879	0,4879	1	1	1	1
	P (Bonf.)		0,1228		4	4	1,7116	1,9516	4	4	4	4
D	AK	2 (22)	3 (33)	0 (0)	4 (44)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
	BJ	0 (0)	6 (22)	2 (7)	5 (19)	4 (15)	6 (22)	1 (4)	2 (7)	1 (4)		
	P	0,0571	0,6604	1	0,1841	0,5531	0,3026	1	1	1		
	P (Bonf.)	0,2284	2,6416	4	0,7364	2,2124	1,2104	4	4	4		

Opomba: VD – virulentni dejavniki. Rezultati, ki so statistično značilni, so v preglednici prikazani z rumenim ozadjem. Rezultati, ki so statistično značilni tudi po Bonferronijevi korekciji, so v preglednici prikazani z rdečim ozadjem. Mejna vrednost za statistično značilne rezultate je $P < 0,05$.

4.5 OBČUTLJIVOST ZA ANTIBIOTIKE

Vsi sevi so bili občutljivi za nalidiksično kislino in ampicilin. Proti tetraciklinu so bili odporni le sevi AK4, AK5 in AK48, proti streptomycinu pa sevi AK3, AK4, AK47 in AK48. Vsi ostali sevi so bili občutljivi tudi za tetraciklin in streptomicin.

5 RAZPRAVA

Med 115-imi izolati *E. coli*, ki smo jih pridobili iz vzorcev govejih iztrebkov iz kmetije Gošnik, smo z metodo ERIC-PCR določili 41 različnih sevov. To pomeni, da so v povprečju imeli trije izolati enak profil ERIC-PCR. Med 59-imi izolati *E. coli* Skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani pa smo razlikovali 48 različnih sevov. To pomeni, da je imel skoraj vsak izolat drugačen profil ERIC-PCR. Ker so bili ti izolati pridobljeni iz vzorcev goveda z različnih kmetij in hlevov, medtem ko so bili vzorci na kmetiji Gošnik pridobljeni samo iz enega hleva, ti rezultati kažejo na to, da si živali, ki živijo v tesnem stiku delijo enake seve *E. coli*, medtem ko je pestrost *E. coli* pri govedu z različnih kmetij in hlevov večja.

Številne študije se ukvarjajo z razvrščanjem patogenih in komenzalnih sevov *E. coli* v filogenetske skupine. Sevi, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe običajno spadajo v filogenetsko skupino B2, večina enteropatogenih sevov spada v filogenetsko skupino D, medtem ko komenzalni sevi običajno spadajo v skupini A in B1 (Subarinath in sod., 2011). Razporeditev filogenetskih skupin je odvisna tudi od vrste gostitelja. Pri pticah tako prevladujeta filogenetski skupini D in B1, pri sesalcih filogenetski skupini A in B1 ter pri ljudeh filogenetski skupini A in B2 (Escobar-Páramo, 2006). Pri govedu naj bi prevladovala filogenetska skupina B1 (Carlos in sod., 2010).

Naši rezultati so v skladu s predhodnimi raziskavami o razporeditvi komenzalnih sevov, saj smo večino sevov (54 %) uvrstili v filogenetsko skupino B1, sledila ji je filogenetska skupina A, kamor smo uvrstili 31 % sevov. V filogenetsko skupino D smo uvrstili 10 % sevov. Glede na to, da je bil namen tega magistrskega dela ugotoviti, ali lahko goveji komenzalni sevi predstavljajo rezervoar sevov, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe pri ljudeh, nas je zanimalo, koliko sevov se bo uvrstilo v filogenetsko skupino B2. Naši rezultati so pokazali, da se je v to filogenetsko skupino uvrstilo najmanj sevov, le 4 %.

Ker so bili človeški sevi izolirani iz blata zdravih ljudi, bi pričakovali, da se bo največ sevov uvrstilo v filogenetski skupini A in B1, kamor se običajno uvrščajo komenzalni sevi. Vendar so številne študije pokazale, da pri ljudeh prevladujeta filogenetski skupini A in B2

(Carlos in sod., 2010; Tenaillon in sod., 2010). Iz preglednice je razvidno, da se je največ sevov BJ uvrstilo v filogenetsko skupino B2, največ sevov AK pa v filogenetsko skupino B1. To pomeni, da se naši rezultati skladajo z rezultati predhodnih študij. Da sta ti dve filogenetski skupini statistično značilno povezani s sevi BJ oz. AK, potrjujeta tudi izračunani P-vrednosti (0,0004).

Med zapisi za virulentne dejavnike smo pri sevih AK najpogosteje odkrili zapis za fimbrije tipa I (*fimH*), ki ga je imelo kar 58 (65 %) vseh sevov AK. Primerjali smo tudi pojavnost zapisa *fimH* v posameznih filogenetskih (pod)skupinah. Največ sevov z zapisom *fimH*, kar 37, se je uvrstilo v filogenetsko skupino B1, medtem ko sta bila v filogenetski skupini B2 le 2 seva s tem zapisom. V filogenetskih podskupinah B2₂ in D₂ celo ni bilo nobenega seva AK z zapisom *fimH*. Vendar moramo biti pri interpretaciji teh rezultatov previdni, saj med sabo primerjamo različno velike skupine sevov. V filogenetski podskupini D₂ oz. B2₂ sta bila uvrščena samo 2 oz. 1 sev in nobeden od njiju ni imel zapisa *fimH*. Zaradi tako majhnega števila sevov v teh dveh filogenetskih podskupinah tako ne moremo sklepati, da vsi komenzalni sevi goveda, ki spadajo v filogenetsko podskupino B2₂ ali D₂, nimajo zapisa *fimH*. Za zanesljivejše rezultate bi namreč bilo potrebno med seboj primerjati približno enako velike filogenetske (pod)skupine z dovolj velikim številom sevov. Primerjava s sevi BJ je pokazala, da se zapis *fimH* pri človeških komenzalnih sevih pojavlja še pogosteje kot pri komenzalnih sevih goveda, saj je imelo kar 88 % vseh sevov BJ zapis *fimH*. Tudi pri sevih BJ je bil zapis *fimH* najpogosteje odkrit zapis za virulentni dejavnik.

Naslednja najpogosteje odkrita zapisa za virulentne dejavnike pri sevih AK sta bila zapisa za siderofor jersiniabaktin (*fyuA*) in zapis za siderofor aerobaktin (*iucD*). Zapis *fyuA* je imelo 13 (15 %), zapis *iucD* pa 12 (13 %) sevov AK. Pri primerjavi razporeditve sevov AK s tema dvema zapisoma po filogenetskih (pod)skupinah in ob upoštevanju Bonferronijeve korekcije nismo odkrili nobene statistično značilne povezave. Pri sevih BJ sta se oba zapisa (*iucD* in *fyuA*) pojavljala pogosteje kot pri sevih AK. Zapis *fyuA* je imelo kar 59 (66 %), zapis *iucD* pa 35 (39 %) vseh sevov BJ.

Zapis za alfa hemolizin (*hlyA*) je edini zapis za virulentni dejavnik, ki smo ga pogosteje odkrili pri sevih AK kot pri sevih BJ. Ta zapis smo namreč odkrili pri 8 (9 %) sevih AK in pri 7 (8 %) sevih BJ. Pri statistični obdelavi rezultatov nismo odkrili nobene statistično značilne povezave sevov AK z zapisom *hlyA* in z določeno filogenetsko (pod) skupino. Prav tako smo dobili statistično neznačilne rezultate, ko smo preverjali povezavo med zapisom *hlyA*, določeno filogenetsko (pod)skupino in virom seva.

Zapis za adhezin Iha (*iha*) je imelo 6 (7 %) sevov AK. Naši rezultati so pokazali, da so sevi AK s tem zapisom statistično značilno povezani s filogenetsko skupino D ($P = 0,0112$) in filogenetsko podskupino D_1 ($P = 0,00032$). Primerjava s sevi BJ je pokazala, da se zapis *iha* pri človeških komenzalnih sevih pojavlja pogosteje kot pri komenzalnih sevih goveda, saj je ta zapis imelo kar 35 (39 %) sevov BJ. Izračunane P-vrednosti iz **Preglednic 14 in 15** kažejo, da ob upoštevanju Bonferronijeve korekcije ne obstaja nobena statistično značilna povezava med zapisom *iha*, posamezno filogenetsko skupino in virom seva.

Zapis *ibeA* in zapis *kpsMT* so imeli 3 (3 %) sevi AK. Pri sevih BJ sta se ta dva zapisa pojavljala pogosteje, saj je zapis *ibeA* imelo 12 (13 %), zapis *kpsMT* pa kar 52 (58 %) sevov BJ. Kljub temu, da je kar 50 % sevov AK iz filogenetske skupine B2 in 67 % sevov AK iz filogenetske podskupine B_{2_3} imelo zapisa *ibeA* in *kpsMT*, moramo biti pri interpretaciji teh rezultatov previdni, saj so bili v filogenetsko skupino B2 uvrščeni le štirje sevi, v filogenetsko podskupino B_{2_3} pa le trije sevi AK. Da bi dobili zanesljivejše rezultate, bi v svojo študijo morali vključiti večje število sevov. Iz **Preglednic 14 in 15** je razvidno, da smo odkrili statistično značilni povezavi pri sevih BJ z zapisom *kpsMT* iz filogenetske skupine A ($P = 0,0016$) in filogenetske podskupine A_0 ($P = 0,0224$). Vse ostale povezave so bile statistično neznačilne.

Zapise *usp*, *ireA* in *hbp* je imel le 1 (1 %) sev AK. Pri človeških komenzalnih sevih smo zapis *usp* odkrili pri 22 (24 %), zapis *ireA* pri 18 (20 %) in zapis *hbp* pri 5 (6 %) sevih BJ, kar nakazuje na to, da sta zapisa *usp* in *ireA* statistično značilno povezana s sevi BJ ($P = 0,0016$). Ob upoštevanju Bonferronijeve korekcije statistično značilnih povezav med virom seva, posameznimi filogenetskimi (pod)skupinami in temi tremi zapisi za virulentne dejavnike nismo odkrili.

Pri sevih AK nismo odkrili nobenega seva z zapisom *papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *cnf1* in *tcpC*. So pa bili vsi ti zapisi v različnih odstotkih odkriti pri sevih BJ, kar je prikazano v **Preglednici 13**.

Pri sevih AK smo primerjali tudi število zapisov za proučevane virulentne dejavnike. Največ sevov AK (41 (44 %) sevov) je imelo zapis za 1 virulentni dejavnik. Pri kar 25 (27 %) sevih AK nismo odkrili nobenega zapisa za virulentni dejavnik. Največ zapisov za virulentne dejavnike smo odkrili pri 2 (2 %) sevih AK, ki sta imela 6 zapisov za virulentne dejavnike. Sevov z zapisom za 2 virulentna dejavnika je bilo 12 (13 %), z zapisom za 3 virulentne dejavnike 8 (9 %) in z zapisom za 5 virulentnih dejavnikov 1 (1 %). V skupino s 4 zapisi za virulentne dejavnike se ni uvrstil nobeden sev AK. V povprečju so imeli sevi AK 1,2 zapisa za virulentne dejavnike. Primerjava s sevi BJ je pokazala, da so imeli sevi BJ v povprečju več zapisov za virulentne dejavnike (1,6). Prav tako so bili med sevi BJ tudi taki, ki so imeli 7, 8, 9 oz. 10 zapisov za virulentne dejavnike, medtem ko so imeli sevi AK največ 6 zapisov za virulentne dejavnike. Iskali smo tudi povezave med virom seva, številom zapisov za virulentne dejavnike in filogenetskimi skupinami. Izkazalo se je, da so s filogenetsko skupino A statistično značilno povezani sevi AK brez zapisov za virulentne dejavnike ($P = 0,0116$) in sevi BJ s 3 zapisi za virulentne dejavnike ($P = 0,0364$). Ostale povezave so bile statistično neznačilne.

Antibiotiki se v reji živali ne uporabljajo samo kot sredstva za zdravljenje in preprečevanje bolezni, ampak tudi kot spodbujevalci rasti živali. Čeprav uporaba antibiotikov kot spodbujevalcev rasti v Evropski uniji ni več dovoljena, do prepovedi v nekaterih drugih delih sveta še ni prišlo. Široka uporaba antibiotikov tako lahko vodi do selekcije odpornih sevov *E. coli* v normalni mikrobioti živali, ki bi se lahko preko zaužitja kontaminirane hrane živalskega izvora prenesli tudi na človeka. Ker se zapisi za odpornost proti antibiotikom pogosto nahajajo na mobilnih genetskih elementih, bi to pomenilo tudi možnost prenosa genov za odpornost na patogene bakterije (Bélanger in sod., 2011). V naši študiji smo pri vseh sevih preverili občutljivost za štiri različne antibiotike (ampicilin, streptomycin, tetraciklin in nalidiksično kislino). Vsi sevi AK so bili občutljivi za ampicilin in nalidiksično kislino. Proti tetraciklinu so bili odporni trije, proti streptomycinu pa štirje sevi AK. Izkazalo se je, da je bil najbolj odporen sev AK48, ki je bil edini odporen proti

tetraciklinu in nalidiksični kislini hkrati. Iz naših rezultatov torej lahko sklepamo, da komenzalni sevi goveda ne predstavljajo prevelike nevarnosti za prenos rezistence proti antibiotikom na ostale bakterije. Vendar je potrebno poudariti, da nobena žival, vključena v našo študijo, pred tem ni bila zdravljena z antibiotiki.

6 SKLEPI

- Med proučevanimi 89-imi sevi smo jih 48 (54 %) uvrstili v filogenetsko skupino B1, 28 (31 %) v skupino A, 9 (10 %) v skupino D in 4 (4 %) v skupino B2.
- Primerjava s človeškim sevi BJ je pokazala, da je bilo v filogenetski skupini B1 bistveno več govejih sevov, v filogenetskih skupinah B2 in D pa bistveno več človeških sevov.
- Pri govejih sevih smo najpogosteje odkrili zapis *fimH*, ki ga je imelo 58 (65 %) sevov AK. Ta zapis je bil najpogostejši tudi pri človeških sevih. Imelo ga je 88 % sevov BJ.
- Zapis *fyuA* je imelo 13 (15 %), zapis za *iucD* pa 12 (13 %) sevov AK. Oba zapisa sta se pri človeških sevih pojavljala pogosteje, saj je zapis *fyuA* imelo 59 (66 %), zapis *iucD* pa 35 (39 %) sevov BJ.
- Zapis *hlyA* je edini zapis za virulentni dejavnik, ki smo ga pri sevih AK odkrili pogosteje kot pri sevih BJ. Ta zapis je imelo 8 (9 %) sevov AK in 7 (8 %) sevov BJ.
- Zapis *iha* je imelo 6 (7 %) sevov AK. Izmed teh so bili kar štirje iz filogenetske skupine D oz. filogenetske podskupine D₁.
- Zapis *ibeA* in zapis *kpsMT* so imeli 3 (3 %) sevi AK. Pri sevih BJ sta se ta dva zapisa pojavljala pogosteje. Zapis *ibeA* imelo 12 (13 %), zapis *kpsMT* pa kar 52 (58 %) sevov BJ.
- Zapise *usp*, *ireA* in *hbp* smo odkrili le pri 1 (1 %) sevu AK.
- Zapisov *papGII*, *papGIII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *cnf1* in *tcpC* pri sevih AK nismo našli.
- Sevi AK so imeli največ šest zapisov za virulentne dejavnike, sevi BJ pa največ 10 zapisov za virulentne dejavnike. V povprečju so imeli sevi BJ več zapisov za virulentne dejavnike.
- Za ampicilin in nalidiksično kislino so bili občutljivi vsi sevi AK. Proti tetraciklinu so bili odporni 3, proti streptomycinu pa 4 sevi AK. Samo en sev je bil hkrati odporen proti tetraciklinu in nalidiksični kislini.

7 POVZETEK

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je pomemben član črevesne mikrobiote ljudi in številnih živali. Poleg komenzalnih sevov obstajajo tudi patogeni sevi *E. coli*, ki povzročajo različne črevesne in zunajčrevesne okužbe. Zunajčrevesni patogeni sevi *E. coli* (sevi ExPEC) so pomembni povzročitelji okužb urinarne poti, neonatalnega meningitisa in sepse. Čeprav je znano, da živali predstavljajo rezervoar za črevesne patogene seve *E. coli* (seve IPEC), še vedno ostaja nepojasnjeno, ali lahko živali predstavljajo tudi rezervoar sevov ExPEC, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe pri ljudeh.

Da bi ugotovili, ali lahko govedo predstavlja rezervoar sevov ExPEC, smo pripravili zbirko izolatov bakterije *E. coli* iz blata zdravega goveda. Izolate smo med sabo razlikovali s pomočjo metode ERIC-PCR in vse seve uvrstili v filogenetske (pod)skupine. Z verižno reakcijo s polimerazo smo jim določili prisotnost genskih zapisov za virulentne dejavnike (*papGIII*, *papGII*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *cnf1*, *hlyA*, *usp*, *iucD*, *tcpC*, *ibeA*, *fimH*, *fyuA*, *ireA*, *iha*, *hbp* in *kpsMT*), ki so značilni predvsem za seve ExPEC. Vsem sevom smo določili tudi občutljivost za štiri različne antibiotike (ampicilin, nalidiksično kislino, streptomycin in tetraciklin). Naši rezultati so pokazali, da se je 48 (54 %) sevov uvrstilo v filogenetsko skupino B1, 28 (31 %) v skupino A, 9 (10 %) v skupino D in 4 (4 %) v skupino B2. Zapis *fimH* smo odkrili pri 58 (65 %) sevih, zapis *fyuA* pri 13 (15 %), zapis *iucD* pri 12 (13 %), zapis *hlyA* pri 8 (9 %), zapis *iha* pri 6 (7 %) ter zapisa *ibeA* in *kpsMT* pri 3 (3 %) sevih. Zapise *usp*, *ireA* in *hbp* je imel le 1 (1 %) sev AK. Vsi sevi so bili občutljivi za ampicilin in nalidiksično kislino. Proti tetraciklinu so bili odporni 3, proti streptomycinu pa 4 sevi.

Iz rezultatov, pridobljenih v tem magistrskem delu, tako lahko sklepamo, da goveji komenzalni sevi *E. coli* nimajo visokega virulentnega potenciala, ki bi jim omogočal nastanek zunajčrevesnih okužb. Prav tako ti sevi ne predstavljajo prevelike nevarnosti za razvoj sevov, odpornih proti antibiotikom, saj je bila večina sevov občutljivih za vse testirane antibiotike. Kljub temu pa bo v prihodnosti zaradi hitrega širjenja odpornosti proti antibiotikom in možnega prenosa odpornih sevov na človeka potrebno zmanjšati uporabo antibiotikov in protimikrobnih sredstev v reji živali. Potrebne bodo tudi še dodatne študije, ki bodo razjasnile vlogo različnih živali pri nastanku zunajčrevesnih okužb pri človeku.

8 VIRI

- Agarwal J., Srivastava S., Singh M. 2012. Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. Indian Journal of Medical Microbiology, 30: 141-149.
- Andlovic A. 2002. *Escherichia coli*. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 185-188.
- Bélangier L., Garenaux 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 & Medical Microbiology, 62: 1-10.
- Bien J., Sokolova O., Bozko P. 2012. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. International Journal of Nephrology, 2012: 681473, doi: 10.1155/2012/681473: 15 str.
- Bower J. M., Eto D. S., Mulvey M. A. 2005. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. Traffic, 6, 1:18-31.
- Brooks F. G., Carroll K. C., Butel J. S., Morse S. A., Mietzner T. A. 2010. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. 25th ed. New York, McGraw-Hill: 814 str.
- Carlos C., Pires M. M., Stoppe N. C., Hachich E. M., Sato M., Gomes T. A. T., Amaral L. A., Ottoboni L. M. M. 2010. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. BMC Microbiology, 10:161, doi: 10.1186/1471-2180-10-161: 10 str.
- Castelain M., Sjöström A. E., Fällman E., Uhlin B. E., Andersson M. 2010. Unfolding and refolding properties of S pili on extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. European Biophysics Journal, 39: 1105-1115.

- Chulain M. N., Morris D., Cormican M. 2006 Enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction for typing of uropathogenic *Escherichia coli* is not what it seems. *Clinical Infectious Diseases*, 42, 12: 1805-1806.
- Cirl C., Wieser A., Yadav M., Duerr S., Schubert S., Fischer H., Stappert D., Wantia N., Rodriguez N., Wagner H., Svanborg C. Miethke T. 2008. Subversion of Toll-like receptor signaling by 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 *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 10: 4555-4558.
- Cortes M. A. M., 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.
- Čitar M. 2011. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 97 str.
- Davids N. F., Flood D. F. 2011. The pathogenesis of urinary tract infections. V: Clinical management of complicated urinary tract infection. Nikibakhsh A. (ed.). Rijeka, InTech: 102-120.
- Escobar-Páramo P., Le Menac'h A., Le Gall T., Amorin C., Gouriou S., Picard B., Skurnik D., Denamur E. 2006. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental Microbiology*, 8, 11: 1975-1984.

- Gillings M., Holley M. 1997. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letters in Applied Microbiology*, 25: 17-21.
- Gordon D. M., Cowling A. 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*, 149: 3575-3586.
- Hacker J., Kestler H., Hoschützky H., Jann K., Lottspeich F., Korhonen T.K. 1993. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. *Infection and Immunity*, 61, 2: 544-550.
- Johnson J. R., Brown J.J. 1996. A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant *papG* genes encoding the Gal(al-4)Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 173: 920-926.
- 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 gene, *iha* and *iroN_{E. coli}*, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infection and Immunity*, 68, 5: 3040-3047.
- Johnson J. R., O'Bryan T. T. 2004. Detection of the *Escherichia coli* group 2 polysaccharide capsule synthesis gene *kpsM* by a rapid and specific PCR-based assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4: 1773-1776.
- Johnson J. R., Stell A. L. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* stains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 261-272.
- Kaper J. B. 2005. Pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295: 355-356.

- Kaper J. B., Nataro J. B., Mobley H. L. T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Review Microbiology, 2: 123-140.
- Kerényi M., Allison H. E., Bátaí I., Sonnevend A., Emödy L., Plaveczy N., Pál T. 2005. Occurrence of hlyA and sheA genes in extraintestinal *Escherichia coli* stains. Journal of Clinical Microbiology, 43, 6: 2965-2968.
- Kohanski M. A., Dwyer D. J., Collins J. J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. Nature Reviews Microbiology, 8: 423-435.
- Korazono 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.
- Kotnik V. 2002. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 427-438.
- Kouokam J. C., Wai S. N., Fällman M., Ulrich D., Hacker J., Uhlin B. E. 2006. Active cytotoxic necrotizing factor 1 associated with outer membrane vesicles from uropathogenic *Escherichia coli*. Infection and Immunity, 74, 4: 2022-2030.
- Kuhar I., Grabnar M., Žgur-Bertok D. 1998. Virulence determination of uropathogenic *Escherichia coli* in fecal strains from intestinal infections and healthy individuals. FEMS Microbiology Letters, 164: 243-248.
- Langsrud Ø. 2004. Fischer's exact test. Oslo, Statistics Norway, Division for Statistical Methods and Standards: software.
<http://www.langsrud.com/fisher.htm> (marec, 2013)

Le Bouguénec C., Archambaud M., Labigne A. 1992. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa* and *sfa* adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 5: 1189-1193.

Le Bouguénec C. 2005. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295: 471-478.

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. Upper Saddle River, Prentice-Hall International: 1019 str.

Manges A. R., Johnson J. R. 2012. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infectious. *Clinical Infectious Diseases*, 55: 712-719.

Manges A. R., Johnson J. R., Riley L.W. 2004. Intestinal population of UTI-causing *Escherichia coli* within heterosexual couples. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 5: 49-57.

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: 183-190.

Nakano M., Yamamoto S., Terai A., Ogawa O., Makino S., Hayashi H., Nair G. B., Korazzono H. 2001. Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS Microbiology Letters*, 205: 71-76.

Nataro J. P., Kaper J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 1: 142-201.

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. *Journal of Experimental Medicine*, 188, 6: 1091-1103.

Roberts I. S. 1995. Bacterial polysaccharides in sickness and in health. *Microbiology*, 141: 2023-2031.

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.

Seme K. 2002. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439-446.

Sousa C. P. 2006. The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 12, 3: 363-373.

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

Starčič Erjave M., Palandačič A., Žgur-Bertok D., Ambrožič Avguštin J. 2011. Genetic background od uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Slovenia in relation to fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Acta Biologica Slovenica*, 54, 2: 2-13.

Starčič Erjavec M., Žgur-Bertok D. 2011. Extended characterization of human uropathogenic *Escherichia coli* isolates of Slovenia. V: Clinical management of complicated urinary tract infection. Nikibakhsh A. (ed.). Rijeka, InTech: 36-50.

Subarinath A., Tiwari K. P., Deallie C., Belot G., Vanpee G., MatthewV., Sharma R., Hariharan H. 2011. Antimicrobial resistance and phylogenetic groups of commensal

Escherichia coli isolates from healthy pigs in Grenada. Webmed Central, Veterinary Medicine, 2, 5: WMC001942, http://www.webmedcentral.com/article_view/1942: 10 str.

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

Versalovic J., Koeuth T., Lupski J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research, 19, 24: 6823-6831.

Wiles T. J., Kulesus R. R., Mulvey M. A. 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Experimental and Molecular Pathology, 85, 1: 11-19.

Wilson L. A., Sharp P. M. 2006. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. Molecular Biology and Evolution, 23, 6: 1156-1168.

Wroblewska-Seniuk K., Selvarangan R., Hart A., Pladzyk R., Goluszko P., Jafari A., de Merle L., Nowicki S., Yallampalli C., Le Bouguénec C., Nowicki B. 2005. Dra/AfaE adhesin of uropathogenic Dr/Afa+ *Escherichia coli* mediates morality in pregnant rats. Infection and Immunity, 73, 11: 7597-7601.

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

Zavascki A. P., Goldani L. Z., Li J., Nation L. 2007. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60: 1206-1215.

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

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

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Darji Žgur-Bertok in somentorici izr. prof. dr. Marjanci Starčič Erjavec za vodenje, nasvete in pomoč pri nastajanju magistrske naloge ter za hitro in natančno popravo magistrskega dela. Iskrena hvala tudi prof. dr. Katji Seme za hitro recenzijo.

Posebna zahvala gre moji družini – mami, očetu in sestri Urški za vso pomoč in podporo tekom mojega študija.

Hvala tudi vsem, ki ste kakorkoli pripomogli k uspešnemu zaključku izdelave te magistrske naloge.

PRILOGE

Priloga A: Preglednica s podatki o zbirki govejih izolatov Skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Oznaka izolata	Oznaka AK	Kmetija/kraj	Žival
MB1	AK1	Jože Repar, Preserje	Krava
MB2	AK2	Jože Repar, Preserje	Krava
MB3	AK3	Jože Repar, Preserje	Telica
MB4	AK4	Jože Repar, Preserje	Telica
MB5	AK5	Jože Repar, Preserje	Bik
MB6	AK6	Antonija Petrič, Kamnik pod Krimom	Krava
MB7	AK7	Antonija Petrič, Kamnik pod Krimom	Krava
MB8	AK8	Antonija Petrič, Kamnik pod Krimom	Telica
MB9	AK9	Antonija Petrič, Kamnik pod Krimom	Telica
MB10	AK10	Kmetija Zarnik, Nadgorica	Krava
MB11	AK11	Kmetija Fani Oven, hlev 1	Krava
MB14	AK12	Planina, hlev 2	Krava
MB15	AK13	Planina, hlev 2	Krava
MB16	AK14	Planina, hlev 3	Krava
MB17	AK15	Planina, hlev 3	Krava
MB18	AK16	Planina, hlev 4	Krava
MB19	AK17	Planina, hlev 4	Krava
MB22	AK18	Kmetija Jakl, Nadgorica	Krava
MB23	AK19	Kmetija Matjak, Nadgorica	Krava
MB24	AK20	Kmetija Sabina, Nadgorica	Krava
MB26 (1)	AK21	Antonija Petrič, Kamnik pod Krimom	Telica
MB27 (4)	AK22	Planina	Krava
MB29 (10)	AK23	Planina	Krava
MB30 (12)	AK24	Jože Repar, Preserje	Krava
MB31 (15)	AK25	Planina, hlev 2	Krava
MB32 (18)	AK26	Kmetija Fani Oven, hlev 1	Krava
MB33 (21)	AK27	Planina	Krava
MB34 (24)	AK28	Planina	Krava
MB35 (27)	AK29	Planina	Krava

Se nadaljuje

Nadaljevanje **priloge A**: Preglednica s podatki o zbirki govejih izolatov Skupine za molekularno genetiko Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Oznaka izolata	Oznaka AK	Kmetija/kraj	Žival
MB36 (30)	AK30	Planina	Krava
MB37 (33)	AK31	Planina, hlev 2	Krava
MB38 (36)	AK32	Planina, hlev 3	Krava
MB39 (39)	AK33	Planina, hlev 3	Krava
MB40 (42)	AK34	Kmetija Cveto	Krava
AP KI 1	AK35	Antonija Petrič, Kamnik po Krimom	Krava
AP KI 2	AK36	Antonija Petrič, Kamnik po Krimom	Krava
AP KI 5	AK37	Antonija Petrič, Kamnik po Krimom	Krava
AP TI 1	AK38	Antonija Petrič, Kamnik po Krimom	Telica
AP TII 1	AK39	Antonija Petrič, Kamnik po Krimom	Telica
IGI ŠI 1	AK40	Kmetija Fani Oven	Krava
IGI ŠI 4	AK41	Kmetija Fani Oven	Krava
IGI ŠO 1	AK42	Kmetija Fani Oven	Krava
IGI ŠO 2	AK43	Kmetija Fani Oven	Krava
JR BI 1	AK44	Jože Repar, Preserje	Bik
JR KI 1	AK45	Jože Repar, Preserje	Krava
JR KII 1	AK46	Jože Repar, Preserje	Krava
JR TI 1	AK47	Jože Repar, Preserje	Telica
AP KII 1	AK48	Antonija Petrič, Kamnik pod Krimom	Krava
JR TII 1	AK49	Jože Repar, Preserje	Telica
JR TII 4	AK50	Jože Repar, Preserje	Telica
PKI 1	AK51	Planina	Krava
PKII 1	AK52	Planina	Krava
PKII 5	AK53	Planina	Krava
PKIII 1	AK54	Planina	Krava
PKIII 2	AK55	Planina	Krava
PKIV 1	AK56	Planina	Krava
PKV 1	AK57	Planina	Krava
PKV 3	AK58	Planina	Krava
PKVI 1	AK59	Planina	Krava

Priloga B: Preglednica rezultataov analize sevov iz zbirke AK; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost zapisov za virulentne dejavnike.

AK oznaka seva	Oznaka seva	Filogenetska skupina	Filogenetska podskupina	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>cnf1</i>	<i>hlyA</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	<i>ibeA</i>	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>ireA</i>	<i>iha</i>	<i>hbp</i>	<i>kpsMT</i>
AK1	22/5	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK2	AK2	B1	B ₁	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
AK3	AK3	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
AK4	AK4	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
AK5	AK5	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
AK6	1/1	D	D ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK7	AK7	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK8	1/2	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK9	AK9	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK10	AK10	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK11	AK11	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK12	AK12	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
AK13	AK13	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK14	AK14	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK15	AK15	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK16	AK16	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
AK17	1/4	D	D ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK18	AK18	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK19	AK19	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK20	AK20	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK21	AK21	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK22	AK22	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Opomba: 0 – negativen rezultat, 1 – pozitiven rezultat.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **Priloge B**: Preglednica rezultatov analize sevov iz zbirke AK; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost zapisov za virulentne dejavnike.

AK oznaka seva	Oznaka seva	Filogenetska supina	Filogenetska podskupina	PapGII	PapGIII	SfaDE	Afa/draBC	CnfI	HlyA	Usp	iucD	tcpC	IbeA	fimH	fyuA	IreA	Iha	Hbp	kpsMT
AK23	2/1	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK24	AK24	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AK25	AK25	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK26	AK26	B2	B ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AK27	AK27	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK28	AK28	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK29	3/1	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK30	AK30	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK31	AK31	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK32	AK32	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK33	AK33	B1	B ₁	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
AK34	AK34	B2	B ₂	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
AK35	APKI1	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK36	APKI2	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
AK37	APTI1	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
AK38	APTI1	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
AK43	IGIŠI4	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
AK44	IGIŠO1	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK45	IGIŠO2	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK46	JRBI1	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0

Opomba: 0 – negativen rezultat, 1 – pozitiven rezultat.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **Priloge B**: Preglednica rezultatov analize sevov iz zbirke AK; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost zapisov za virulentne dejavnike.

AK oznaka seva	Oznaka seva	Filogenetska skupina	Filogenetska podskupina	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>cnf1</i>	<i>hlyA</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	<i>ibeA</i>	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>ireA</i>	<i>iha</i>	<i>hbp</i>	<i>kpsMT</i>
AK47	JRKII1	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK48	JRTI1	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
AK49	APKII1	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
AK50	JRTII1	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
AK51	JRTII4	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
AK52	PKI1	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK53	PKII5	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AK54	PKIII2	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK55	PKIV1	B2	B ₂₃	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
AK56	PKV1	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK57	PKV3	B2	B ₂₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK58	PKVI1	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK59	4/1	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK60	4/3	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK61	4/4	B1	B ₁	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK62	5/3	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK63	6/3	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK64	7/2	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK65	8/1	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
AK66	8/5	B1	B ₁	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
AK67	9/4	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Opomba: 0- negativen rezultat, 1 – pozitiven rezultat.

Se nadaljuje

Nadaljevanje **Priloge B**: Preglednica rezultatov analize sevov iz zbirke AK; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost zapisov za virulentne dejavnike.

AK oznaka seva	Oznaka seva	Filogenetska skupina	Filogenetska podskupina	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>cnfI</i>	<i>hlyA</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	<i>ibeA</i>	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>ireA</i>	<i>iha</i>	<i>hbp</i>	<i>kpsMT</i>
AK68	10/2	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK69	11/1	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK70	11/4	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK71	12/3	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK72	13/1	B1	B ₁	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
AK73	13/4	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
AK74	13/5	B1	B ₁	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
AK75	14/1	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK76	14/2	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
AK77	14/3	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK78	15/3	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK79	15/4	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK80	16/1	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK81	16/2	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK82	16/3	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK83	17/1	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK84	17/2	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK85	17/5	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK86	18/1	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK87	19/4	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK88	20/1	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK89	21/1	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK90	21/2	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK91	21/3	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK92	21/4	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AK93	22/4	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Opomba: 0 – negativen rezultat, 1 – pozitiven rezultat.

Priloga C: Preglednica rezultatov analize sevov iz zbirke BJ; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost zapisov za virulentne dejavnike.

Oznaka BJ	Št. BJ	Filog. sk.	filog. podsk.	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>aa/draBC</i>	<i>cnfI</i>	<i>hlyA</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	<i>ibeA</i>	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>ireA</i>	<i>iha</i>	<i>hbp</i>	<i>kpsMT</i>
BJ1	1	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
BJ2	2	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
BJ3	3	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
BJ4	4	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1
BJ5	5	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
BJ6	6	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
BJ7	7	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
BJ8	8	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
BJ9	9	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
BJ10	10	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1
BJ11	11	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1
BJ12	12	D	D ₁	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1
BJ13	13	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
BJ14	14	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ15	15	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
BJ16	16	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ17	17	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
BJ18	18	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
BJ19	19	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1
BJ20	20	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
BJ21	21	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1
BJ22	22	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
BJ23	23	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
BJ25	25	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
BJ26	26	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
BJ27	27	B2	B2 ₃	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1
BJ28	28	D	D ₂	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0
BJ29	29	D	D ₁	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
BJ30	30	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1
BJ31	31	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ32	32	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1
BJ33	33	B2	B2 ₃	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1
BJ34	34	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
BJ35	35	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
BJ36	36	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
BJ37	37	D	D ₁	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
BJ38	38	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
BJ39	39	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
BJ40	40	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
BJ41	41	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
BJ42	42	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
BJ43	43	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ44	44	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
BJ45	45	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ46	46	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ47	47	D	D ₂	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1
BJ48	48	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ49	49	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ50	50	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

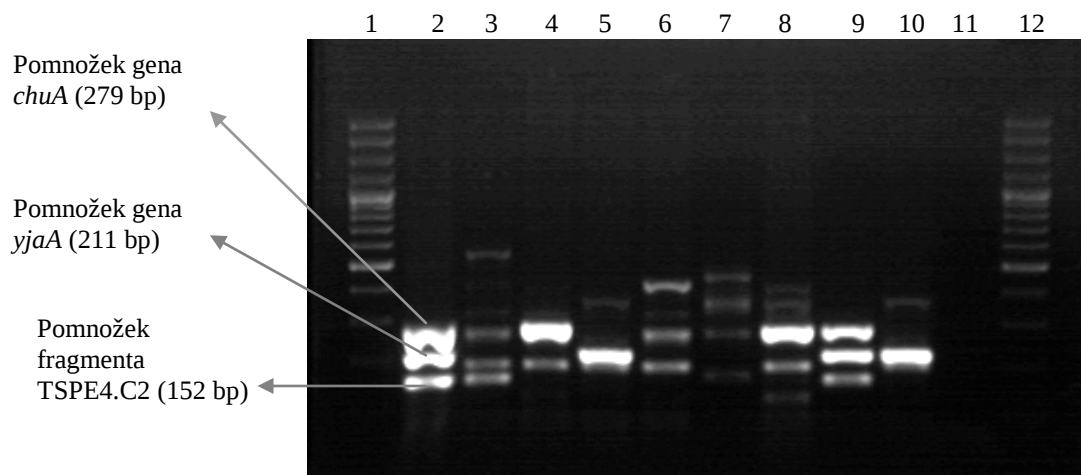
Se nadaljuje

Nadaljevanje **Priloge C**: Preglednica rezultatov analize sevov iz zbirke BJ; uvrstitev v filogenetske (pod)skupine in prisotnost zapisov za virulentne dejavnike.

Oznaka BJ	Št. BJ	Filog. sk.	Filog. pod.sk.	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>afa/dra BC</i>	<i>cnfI</i>	<i>hlyA</i>	<i>usp</i>	<i>iucD</i>	<i>tcpC</i>	<i>ibcA</i>	<i>fimH</i>	<i>fyuA</i>	<i>ireA</i>	<i>iha</i>	<i>hbp</i>	<i>kpsMT</i>
BJ51	51	B2	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
BJ52	52	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
BJ53	53	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
BJ54	54	D	D ₂	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
BJ55	55	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ56	56	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
BJ57	57	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1
BJ58	58	B2	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1
BJ59	59	A	A ₁	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1
BJ60	60	D	D ₁	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
BJ61	61	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
BJ62	62	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
BJ63	63	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
BJ64	64	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ65	65	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ66	66	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ67	67	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1
BJ68	68	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
BJ69	69	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
BJ70	70	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
BJ71	71	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1
BJ72	72	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
BJ73	73	A	A ₀	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
BJ74	74	D	D ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
BJ75	75	D	D ₂	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
BJ76	76	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ77	77	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
BJ78	78	B2	B2 ₃	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
BJ79	79	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ80	80	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ82	82	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ83	83	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1
BJ84	84	B1	B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ88	88	A	A ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ89	89	D	D ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
BJ92	92	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ93	93	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1
BJ94	94	D	D ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BJ95	95	B2	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
BJ96	96	B2	B2 ₃	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
BJ97	97	B2	B2 ₃	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1

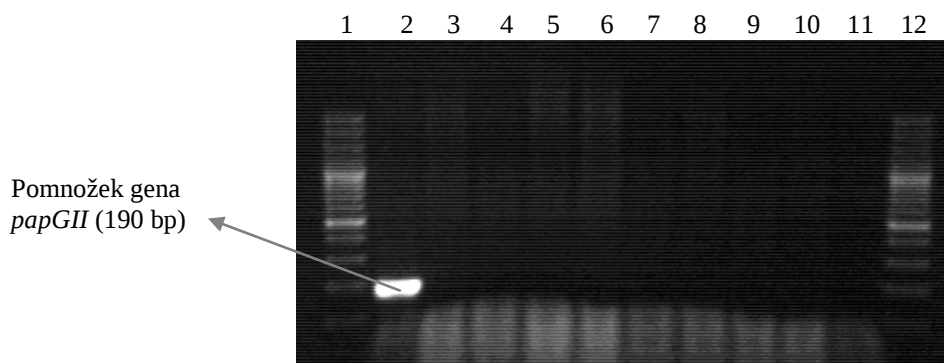
Opomba: 0 – negativen rezultat, 1– pozitiven rezultat.

Priloga D: Primeri slik elektroforez pomnožkov PCR.



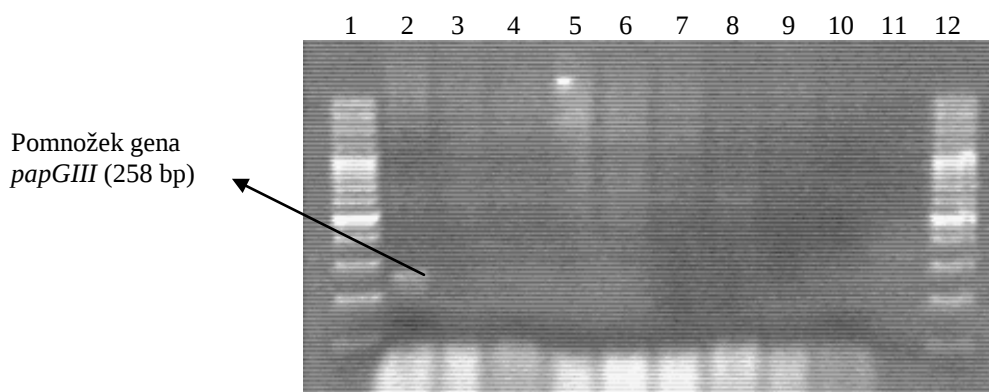
Priloga D1: Primer elektroforeze pomnožkov PCR za ugotavljanje filogenetskih (pod)skupin sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1-standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2–pozitivna kontrola BJ97, 3–AK49 (B₁), 4–AK50 (D₁), 5–AK51 (A₁), 6–AK52 (A₀), 7–AK53 (A₀), 8–AK54 (D₁), 9–AK55 (B₂), 10–AK56 (A₁), 11–negativna kontrola, 12-standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



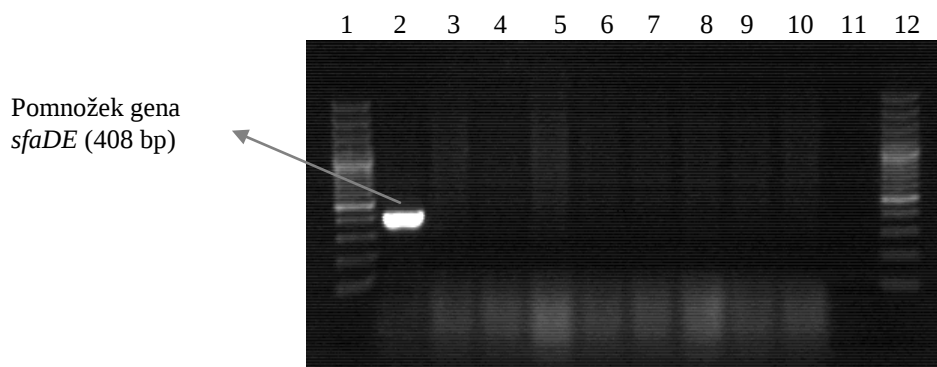
Priloga D2: Primer elektroforeze pomnožkov PCR gena *papGII* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1-standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ60, 3-AK10, 4-AK11, 5-AK12, 6-AK13, 7-AK14, 8-AK15, 9-AK16, 10-AK17, 11-negativna kontrola, 12- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



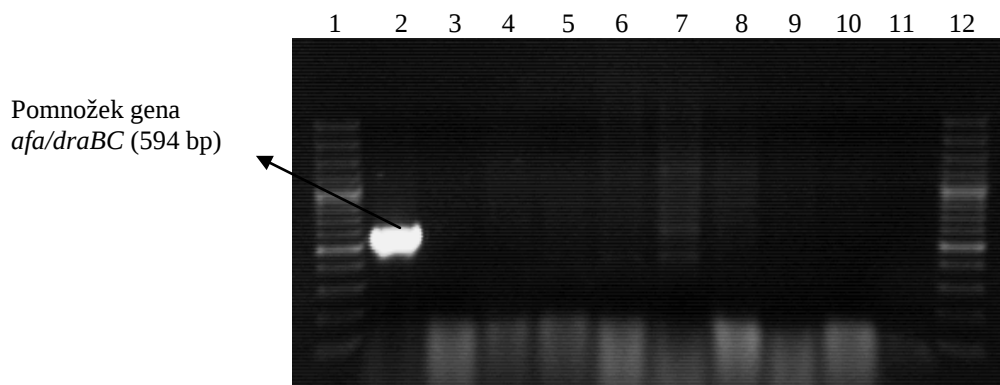
Priloga D3: Primer elektroforeze pomnožkov gena *papGIII* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ32, 3-AK18, 4-AK19, 5-AK20, 6-AK21, 7-AK22, 8-AK23, 9-AK24, 10-AK25, 11-negativna kontrola, 12- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



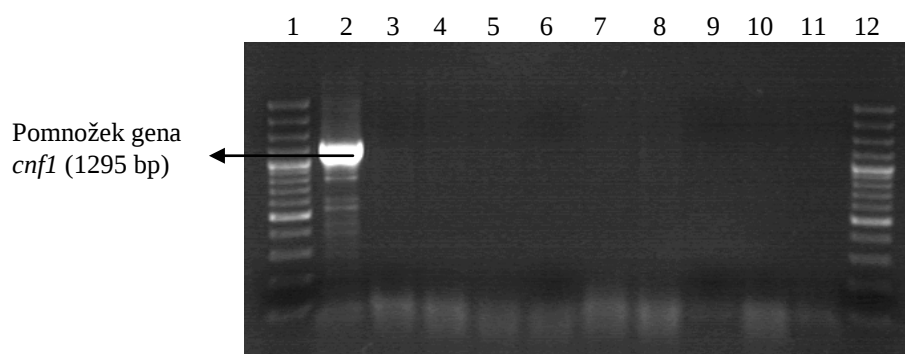
Priloga D4: Primer elektroforeze pomnožkov gena *sfaDE* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ19, 3-AK10, 4-AK11, 5-AK12, 6-AK13, 7-AK14, 8-AK15, 9-AK16, 10-AK17, 11-negativna kontrola, 12- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



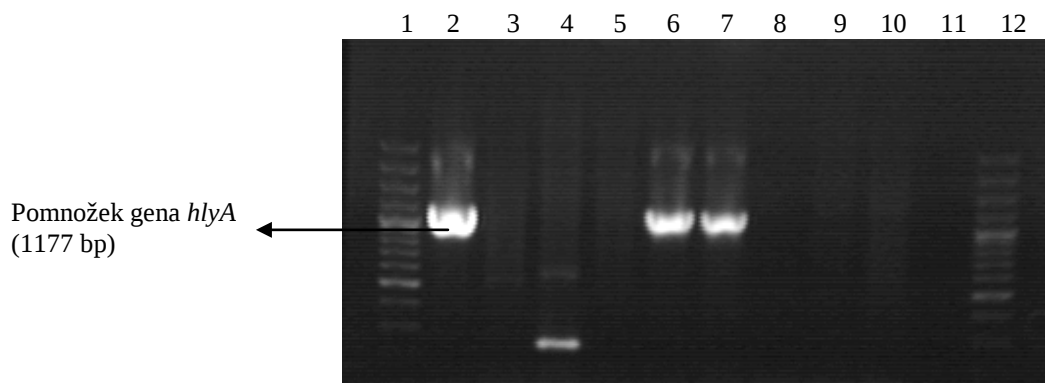
Priloga D5: Primer elektroforeze pomnožkov gena *afa/draBC* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ54, 3-AK10, 4-AK11, 5-AK12, 6-AK13, 7-AK14, 8-AK15, 9-AK16, 10-AK17, 11-negativna kontrola, 12- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



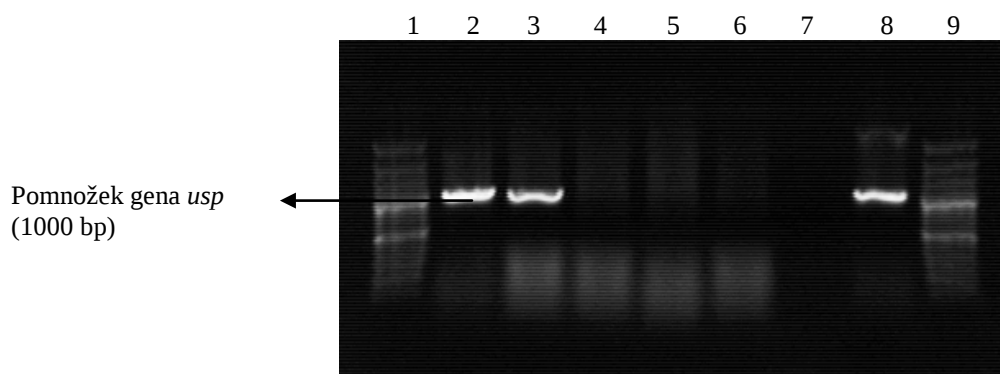
Priloga D6: Primer elektroforeze pomnožkov gena *cnf1* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ33, 3-AK43, 4-AK44, 5-AK45, 6-AK46, 7-AK47, 8-AK48, 9-AK49, 10-AK50, 11-negativna kontrola, 12- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



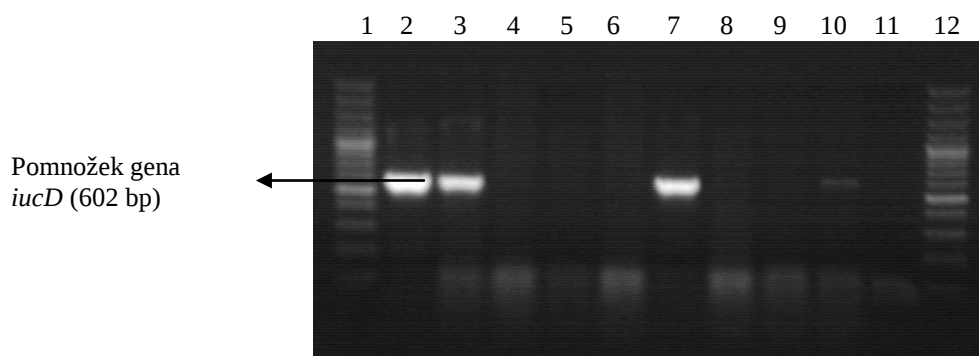
Priloga D7: Primer elektroforeze pomnožkov gena *hlyA* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ27, 3-AK30, 4-AK31, 5-AK32, 6-AK33, 7-AK34, 8-AK35, 9-AK36, 10-AK37, 11-negativna kontrola, 12-standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



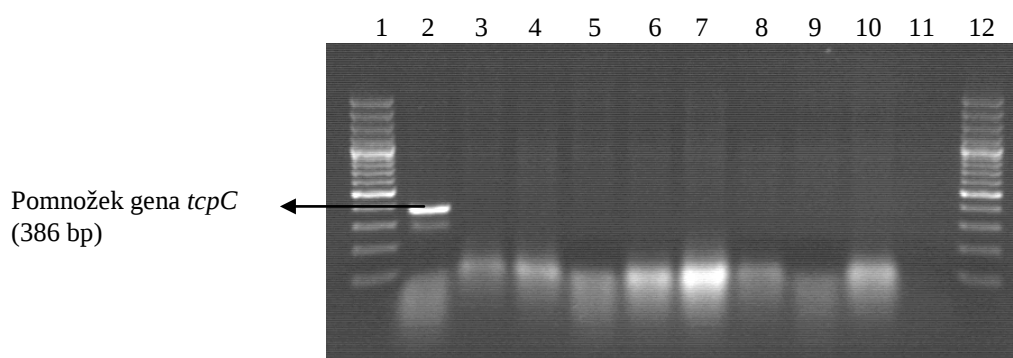
Priloga D8: Primer pomnožkov gena *usp* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ10, 3-AK59, 4-AK60, 5-AK61, 6-AK62, 7-negativna kontrola, 8-pozitivna kontrola BJ10, 9-standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



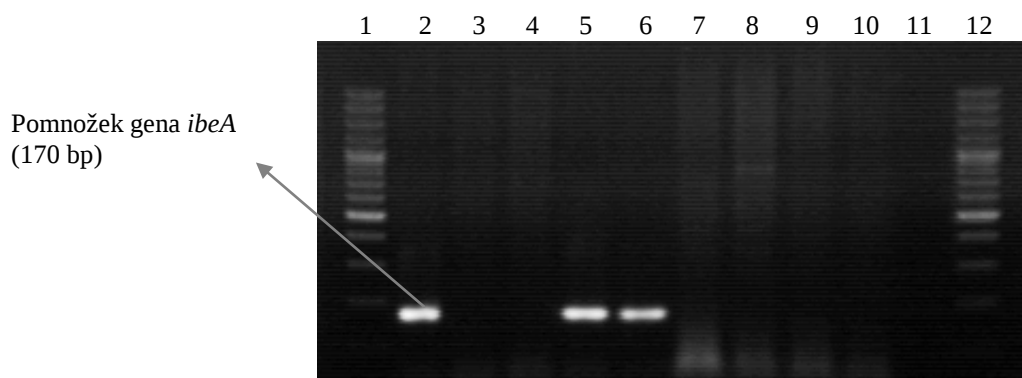
Priloga D9: Primer elektroforeze pomnožkov gena *iucD* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ53, 3-AK51, 4-AK52, 5-AK53, 6-AK54, 7-AK55, 8-AK56, 9-AK57, 10-AK58, 11-negativna kontrola, 12- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



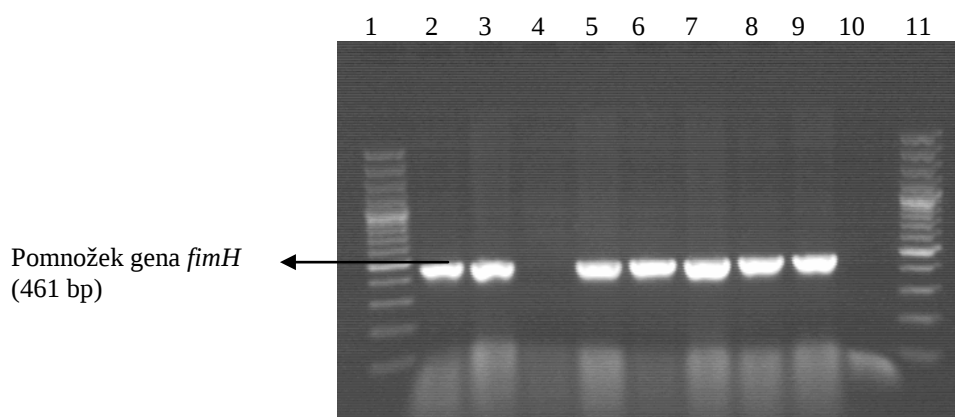
Priloga D10: Primer elektroforeze pomnožkov gena *tcpC* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ57, 3-AK30, 4-AK31, 5-AK32, 6-AK33, 7-AK34, 8-AK35, 9-AK36, 10-AK37, 11-negativna kontrola, 12- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



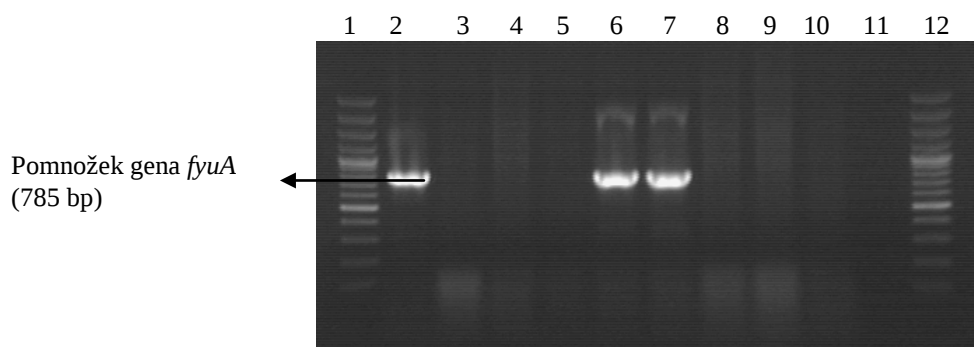
Priloga D11: Primer elektroforeze pomnožkov gena *ibeA* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ19, 3-AK53, 4-AK54, 5-AK55, 6-AK2, 7-AK3, 8-AK4, 9-AK6, 10-AK6, 11-negativna kontrola, 12- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



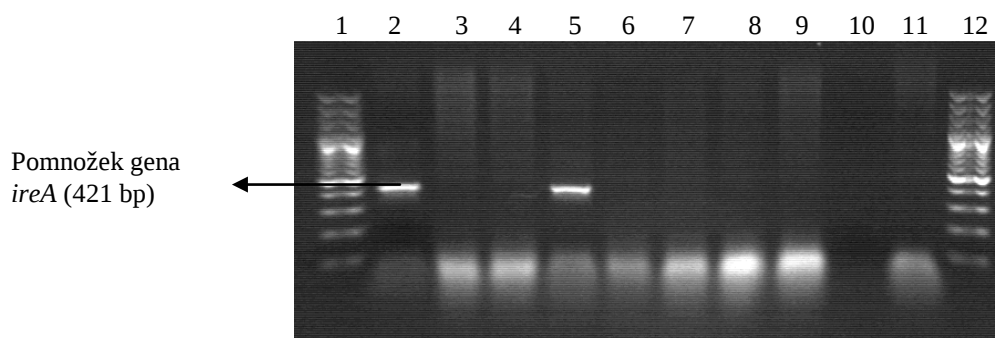
Priloga D12: Primer elektroforeze pomnožkov gena *fimH* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ45, 3-AK51, 4-AK52, 5-AK53, 6-AK54, 7-AK55, 8-AK56, 9-AK57, 10-negativna kontrola, 11- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



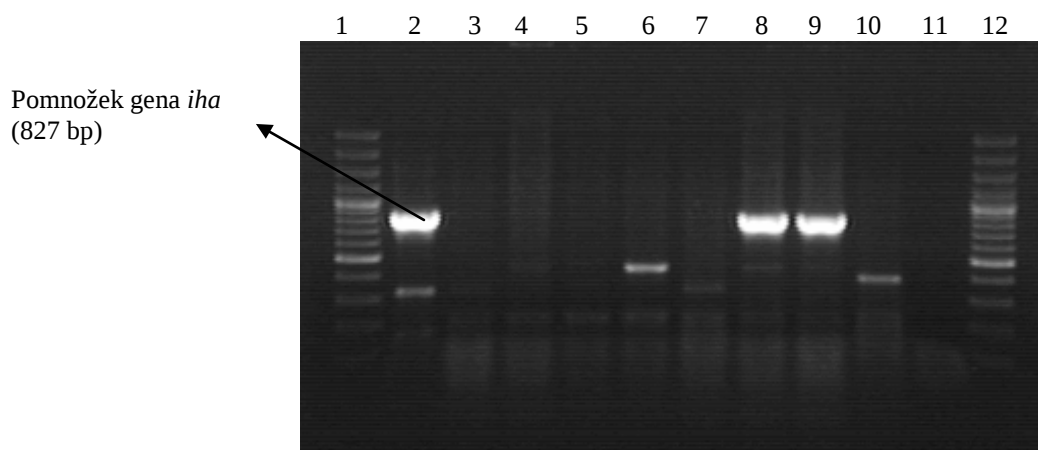
Priloga D13: Primer elektroforeze pomnožkov gena *fyuA* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ30, 3-AK62, 4-AK63, 5-AK64, 6-AK65, 7-AK66, 8-AK67, 9-AK68, 10-AK69, 11-negativna kontrola, 12- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



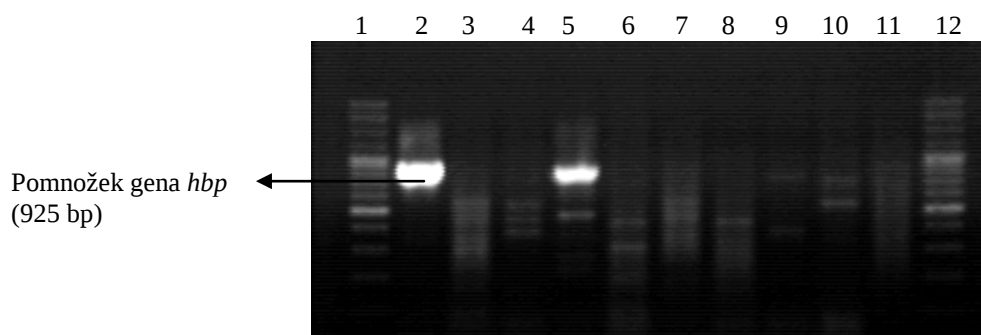
Priloga D14: Primer elektroforeze pomnožkov gena *ireA* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ60, 3-AK10, 4-AK11, 5-AK12, 6-AK13, 7-AK14, 8-AK15, 9-AK16, 10-AK17, 11-negativna kontrola, 12- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



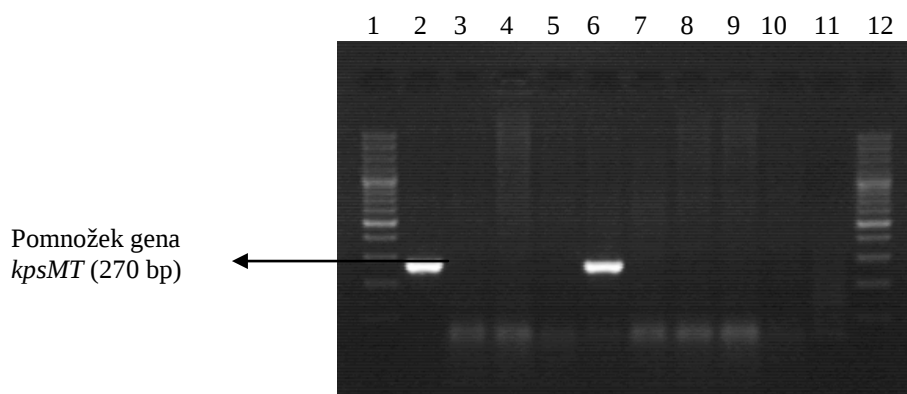
Priloga D15: Primer elektroforeze pomnožkov gena *iha* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ2, 3-AK10, 4-AK9, 5-AK8, 6-AK7, 7-AK6, 8-AK5, 9-AK4, 10-AK3, 11-negativna kontrola, 12- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



Priloga D16: Primer elektroforeze pomnožkov gena *hbp* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ20, 3-AK51, 4-AK52, 5-AK53, 6-AK54, 7-AK55, 8-AK56, 9-AK57, 10-AK58, 11-negativna kontrola, 12- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)



Priloga D17: Primer elektroforeze pomnožkov gena *kpsMT* sevov iz zbirke AK.

Legenda: 1- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas), 2-pozitivna kontrola BJ36, 3-AK51, 4-AK52, 5-AK53, 6-AK54, 7-AK55, 8-AK56, 9-AK57, 10-AK58, 11-negativna kontrola, 12- standardna DNA lestvica 100-bp (Fermentas)